

Aus der Abteilung Prothetik  
(Prof. Dr. med. Dr. med. dent. A. Hüls)  
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

Nidogen-1 and Nidogen-2  
in Healthy Human Cartilage and in Late-Stage Osteoarthritis Cartilage

**INAUGURAL – DISSERTATION**

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

vorgelegt von  
Jenny Krügel  
aus Wolmirstedt

Göttingen 2009

**Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel**

**I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. N. Miosge**

**II. Berichterstatter/in: Priv.-Doz. Dr. med. K.-H. Frosch**

**III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. P. Virsik-Köpp**

**Tag der mündlichen Prüfung: 31. 05. 2010**

## Inhaltsverzeichnis

---

|      |  |    |
|------|--|----|
| 1.   | Einleitung .....   | 1  |
| 2.   | Material und Methoden .....  | 4  |
| 2.1  | Antikörper .....   | 4  |
| 2.2  | Gewinnung des Knorpelgewebes .....   | 5  |
| 2.3  | Gewebepräparation .....  | 6  |
| 2.4  | Kolloidales Gold herstellen zum Antikörper koppeln .....   | 6  |
| 2.5  | Vorbereitende Methoden zum mRNA-Nachweis .....   | 7  |
| 2.6  | Sondenbau zur in-situ-Hybridisierung von Nidogen-1 .....   | 7  |
| 2.7  | Lichtmikroskopische Immunhistochemie von Nidogen-1 und Nidogen-2 .....   | 8  |
| 2.8  | Elektronenmikroskopische Immunogoldhistochemie von Nidogen-1 und Nidogen-2 .....                                       | 9  |
| 2.9  | Quantitative real-time RT-PCR für Nidogen-2 .....  | 10 |
| 2.10 | Lichtmikroskopische in-situ-Hybridisierung für Nidogen-1 .....   | 11 |
| 2.11 | Elektronenmikroskopische in-situ-Hybridisierung für Nidogen-1 .....  | 12 |
| 2.12 | Zellisolation .....  | 13 |
| 2.13 | Zelladhäsions- und Zellinhibitionsassay .....  | 13 |
| 2.14 | Pre-embedding Methode .....  | 14 |
| 2.15 | Fluorescence-activated cell sorting (FACS) .....   | 15 |
| 2.16 | Lichtmikroskopische Immunfluoreszenz .....   | 15 |
| 2.17 | Ultrastrukturelle Kolo-kalisation von Nidogen-1 bzw. Nidogen-2 mit Integrinen in vivo .....                            | 16 |
| 3.   | Ergebnisse & Diskussion .....  | 17 |
| 3.1  | Nidogene sind EZM-Komponenten in gesundem, humanem Knorpel und in den späten Stadien der Osteoarthritis .....          | 17 |
| 3.2  | Unterschiede in den Nidogen-Mengen in Abhängigkeit vom Knorpel-Areal und dem Chondrozyten-Phänotyp .....               | 19 |
| 3.3  | Nachweise von Nidogen-Chondrozyten-Interaktionen in den späten Stadien der Osteoarthritis – in vitro und in vivo ..... | 22 |
| 3.4  | Fazit .....  | 25 |
| 4.   | Literaturverzeichnis .....   | 26 |
| 5.   | Publikation .....  | 27 |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|            |  |
|------------|--|
| AEC        | 3-Amino-9-Ethylkarbazol                                      |
| AK         | Antikörper   |
| aqua dest. | destilliertes Wasser   |
| BMP        | bone morphogenetic protein                                   |
| BSA        | bovine serum albumin   |
| bzw.       | beziehungsweise  |
| °C         | Grad Celsius   |
| ca.        | circa  |
| cDNA       | komplementäre Desoxyribonukleinsäure                         |
| DAB        | Diaminobenzidine   |
| DAPI       | 4', 6'-Diamidino-2-phenylindol                               |
| DIG        | Digoxigenin  |
| DMEM       | Dulbecco's Modified Eagle Medium                             |
| DNA        | Desoxyribonukleinsäure                                       |
| dsDNA      | doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure                       |
| EDTA       | Ethylendiamintetraacetat                                     |
| EZM        | extrazelluläre Matrix  |
| FACS       | fluorescence-activated cell sorting (= Durchflusszytometrie) |
| FBS        | fötale Kälberserum   |
| FGF        | fibroblast growth factor                                     |
| FITC       | Fluorescein isothiocyanate                                   |
| GW         | Gestationswoche  |
| h          | Stunde   |
| HE         | Hämalaun – Eosin   |
| HRP        | Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)              |
| IgG        | Immunglobulin G  |
| Lsg.       | Lösung   |
| min        | Minute   |
| mRNA       | messenger Ribonukleinsäure                                   |
| OA         | Osteoarthrose  |
| OT         | Objektträger   |
| PAP        | Peroxidase-Anti-Peroxidase                                   |
| PBS        | Phosphate Buffered Saline                                    |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|            |  |
|------------|--|
| PE         | Phycoerythrin  |
| P/S        | Penicillin / Streptomycin                                    |
| RT         | Raumtemperatur   |
| RT-PCR     | Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion               |
| S.         | Seite  |
| s.         | siehe  |
| sek        | Sekunde  |
| SSC        | Natriumzitat-Puffer  |
| SYBR Green | interkalierender Fluoreszenzfarbstoff zum Nachweis von dsDNA |
| TEP        | Total-Endoprothese   |
| ü.N.       | über Nacht   |
| UpM        | Umdrehungen pro Minute                                       |
| v.a.       | vor allem  |
| z. B.      | zum Beispiel   |

---

## 1. Einleitung

Die extrazelluläre Matrix (EZM) von Geweben bietet eine mechanische und chemische Struktur welche für die Entwicklung von Organismen und die Antworten auf (patho)-physiologische Signale unerlässlich ist (Ross 2004). Die unterschiedlichen Charakteristika verschiedener EZMs, wie z.B. die Festigkeit und Komposition, sind mitverantwortlich für das variable Verhalten von Zellen in gesunden und kranken Geweben (Hynes 2009).

Eine hochspezialisierte EZM ist die Basalmembran (BM). Diese ist eine dünne Schicht, welche unterschiedlichen Zellen anliegt und diese zum einen von ihrer interstitiellen Matrix trennt und zum anderen die Zellen mit der Matrix verbindet (Timpl 1996). BM-en sind für eine normale Entwicklung von Geweben und deren Funktion absolut notwendig (Smyth et al. 1999) und zeigen in unterschiedlichen Geweben eine bemerkenswerte Komplexität ihrer Zusammensetzung, wodurch eine große Anzahl von funktionell gewebs- und ortsspezifischen BM-en entsteht (McMillan et al. 2003). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass BM-Komponenten nicht in der typischen, elektronenmikroskopisch-ersichtlichen, membranartigen Struktur vorliegen müssen, sondern innerhalb der EZM arrangiert sein können, wie z.B. in Lymphknoten (Timpl und Brown 1996) oder im hyalinen Gelenkknorpel (Kvist et al 2008). Mittels dieser Komplexität regulieren BM-Komponenten so – mithilfe von Integrinen aber auch Nicht-Integrin-Rezeptoren und dem Einfluss auf Wachstumsfaktoren und Zytokinen – unterschiedliche biologische Aktivitäten wie Proliferation, Differenzierung, Wachstum, Migration und Chemotaxis von Zellen (Hynes 2009, Erickson und Couchman 2000). Veränderungen in der qualitativen und/oder quantitativen Komposition, Lokalisation oder Struktur von BM-Komponenten spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung verschiedenster Erkrankungen. Trotz der komplexen Zusammensetzungen von BM-en gibt es ubiquitäre BM-Proteine (Timpl 1996), zu denen neben den Isoformen des Laminins, Kollagen Typ IV und Perlekan, auch Nidogen-1/Entactin-1 (Carlin et al. 1981) und Nidogen-2/Entactin-2 (Kohfeldt et al. 1998) zählen.

Eine weitere einzigartige EZM im menschlichen Körper besitzt der hyaline Gelenkknorpel. Im speziellen besteht dieser aus einem Netzwerk von Kollagenen, v.a. Kollagen Typ II, zusammen mit nicht-kollagenen Molekülen wie Proteoglykanen, v.a. Aggrekan, und Glykoproteinen welche, durch die Verlinkung der Kollagene, eine stabilisierende Funktion haben. Diese EZM wird nur von wenigen Chondrozyten gebildet und aufrechterhalten (Kuettner 1992; Heinegard et al. 1999). Sowohl der Erhalt als auch das Gleichgewicht der oben erwähnten Komponenten der EZM sind wichtig für die biomechanischen Funktionen

---

wie die Festigkeit und auch den Widerstand des hyalinen Knorpels gegen Kompression und Scherkräfte (Morris et al. 2002). Hierbei spielt auch die Kommunikation zwischen den Zellen eine wichtige Rolle. Die Chondrozyten des gesunden hyalinen Gelenkknorpels besitzen jedoch keine Zell-Zell-Kontakte, sondern sind auf Zell-Matrix-Interaktionen angewiesen (Kuettner 1992). Hierfür besitzen Chondrozyten eine Vielzahl verschiedenster Rezeptoren, wie z.B. Integrine (Loeser 2002).

Es scheint daher nicht verwunderlich, dass gerade gestörte Zell-Matrix-Interaktionen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Osteoarthritis (OA) spielen (Poole 1999). Des Weiteren ist bekannt, dass sich in der OA die Expression des Integrin-Musters verändert (Ostergaard et al. 1998; Loeser 2000). Typische Zeichen der späten Stadien der OA sind sowohl ein Verlust an Kollagen Typ II, Aggrecan und der superfizialen Zone, als auch tiefe Fissuren und Kollagenfibrillationen. Zusätzlich sind aber auch Zeichen der Regeneration wie Klusterbildung im OA Knorpel zu finden (Aigner und McKenna 2002; Sandell und Aigner 2001; Tesche und Miosge 2005). Der Prozess der Regeneration wird v.a. durch elongierte Chondrozyten (Poole 1999; Bock et al. 2001; Koelling et al. 2006) und, wie vor kurzem beschrieben, durch chondrogene Progenitorzellen (Koelling et al 2009) beeinflusst.

Erst kürzlich wurden alle oben beschriebenen Basalmembran-Komponenten im hyalinen Gelenkknorpel der Maus und des Rindes, v.a. in der perizellulären Matrix der Chondrozyten, beschrieben (Kvist et al. 2008). Somit wäre eine direkte Interaktion der BM-Komponenten mit Chondrozyten und daraus folgend eine Beeinflussung des Verhaltens der Zellen in gesundem und OA Knorpel möglich. Es ist bekannt, dass Perlekan während der Extremitätenentwicklung im Knorpel vorhanden ist (Handler et al. 1997) und eine wichtige Rolle in diesem Prozess spielt (Costell et al. 1999; Rodgers et al. 2007). Weiterhin ist Perlekan eine Komponente des humanen hyalinen Gelenkknorpels (SundarRaj et al. 1995) und spielt eine Rolle in der Pathogenese der OA (Tesche und Miosge 2004). Auch Laminin-111 wurde im Knorpel während der Extremitätenentwicklung nachgewiesen (Hausler et al. 2002) und auch im hyalinen Gelenkknorpel des Menschen gefunden (Durr et al. 1996).

Die Glykoproteine Nidogen-1 und Nidogen-2 sind im Mesenchym von verschiedenen Mausgeweben während der Extremitätenentwicklung nachgewiesen wurden (Thomas und Dziadek 1993) und es konnte auch gezeigt werden, dass beide Nidogene in Rippen-Anlagen bei 17-Tage-alten Mausföten zu finden sind (Salmivirta et al. 2002). Nidogen-Doppel-Knockout-Mäuse sind kleiner als Wildtyp-Mäuse (+/+) im gleichen Alter (Bader et al. 2005) und zeigen außerdem Syndaktyly, zusammen mit einer teilweisen Fusion der distalen

---

Fingerglieder. Einige dieser Tiere weisen zudem schwerere Defekte am Skelett auf, wie z.B. Hypoplasien (Bose et al. 2006). Trotz allem ist bis heute noch nichts über die Rolle von Nidogen-1 und Nidogen-2 im humanen Knorpelgewebe bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb als erstes zu zeigen, dass Nidogene im humanen hyalinen Knorpel vorkommen. Hierfür wurden lichtmikroskopische Methoden zum Nachweis der Nidogene auf Proteinebene, zum einen während der Knorpelentwicklung des menschlichen Embryos, aber auch in gesundem adulten Gelenkknorpel, angewandt.

Weiterhin sollten mögliche Unterschiede von Nidogenen im gesunden und osteoarthrotischen Gelenkknorpel dargestellt werden. Dafür wurden licht- und elektronenmikroskopische Versuche durchgeführt, sowohl auf Protein-, als auch auf mRNA-Ebene. Auch die quantitative real-time RT-PCR kam hierbei zum Einsatz.

Um Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung auf das Zellverhalten durch Chondrozyten-Nidogen-Interaktionen zu finden, welche für die Knorpelintegrität in den späten Stadien der OA eine Rolle spielen könnte, wurden in-vitro-, aber auch in-vivo-Methoden angewandt.



## 2. Material und Methoden

Dieser Abschnitt ist so gegliedert, dass die Methoden in einen eher funktionellen Zusammenhang gebracht werden. Der erste Teil befasst sich mit allgemein vorbereitenden Methoden (2.1 – 2.6). Es wird dann unterschieden zwischen Versuchen auf Proteinebene (2.7 + 2.8) bzw. mRNA-Ebene (2.9 – 2.11). Der letzte Teilbereich (2.12 – 2.17) beschreibt die Versuche zum Nachweis von Nidogen-Chondrozyten-Interaktionen. Diese Gliederung nimmt somit Bezug auf den darauf folgenden Ergebnis- und Diskussionsteil.

### 2.1 Antikörper

| <b>primäre Antikörper für Immunhistochemie</b>                     | <b>Spezies</b>         | <b>erhalten von</b>                      |
|--|------------------------|--|
| Nidogen-1 (JF4)  | Rat-anti-human IgG     | Dr. Takako Sasaki (Portland, OR)         |
| Nidogen-2 (1080 + E2)  | Rabbit-anti-human IgG  | Dr. Takako Sasaki (Portland, OR)         |
| Integrin- $\alpha$ 3 (# C2404-08A)                                 | Mouse-anti-human IgG   | Biomol (Hamburg, Deutschland)            |
| Integrin- $\beta$ 1 (# CSA-500)                                    | Mouse-anti-human IgG   | Biomol (Hamburg, Deutschland)            |
| Integrin $\alpha$ v (# C75120)                                     | Mouse-anti-rat IgG     | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| <b>sekundäre und tertiäre Antikörper für Immunhistochemie (LM)</b> | <b>Spezies</b>         | <b>erhalten von</b>                      |
| Rabbit (Z0196)   | Swine-anti-rabbit IgG  | Dako (Hamburg, Deutschland)              |
| Rat (HRP-gekoppelt; # P0450)                                       | Rabbit-anti-rat IgG    | Dako (Hamburg, Deutschland)              |
| PAP Rabbit (Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex; # Z0113)           | Rabbit-anti-peroxidase | Dako (Hamburg, Deutschland)              |
| <b>Antikörper für FACS und Immunfluoreszenz</b>                    | <b>Spezies</b>         | <b>erhalten von</b>                      |
| Integrin $\alpha$ 1 (PE-gekoppelt; # 559596)                       | Mouse-anti-human IgG   | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| Integrin $\alpha$ 2 (FITC-gekoppelt; # 555498)                     | Mouse-anti-human IgG   | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| Integrin $\alpha$ 3 (PE-gekoppelt; # 556025)                       | Mouse-anti-human IgG   | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| Integrin $\alpha$ 4 (PE-gekoppelt; # 555503)                       | Mouse-anti-human IgG   | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| Integrin $\alpha$ 5 (PE-gekoppelt; # 555617)                       | Mouse-anti-human IgG   | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| Integrin $\alpha$ 6 (FITC-gekoppelt; # 555735)                     | Rat-anti-human IgG     | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |

|   |                         |                                   |
|---|-------------------------|-----------------------------------|
| Integrin $\beta$ 1<br>(FITC-gekoppelt; # 140299)                          | Mouse-anti-human IgG    | e-Biosciences<br>(CA, USA)        |
| Integrin $\alpha$ $\beta$ 3<br>(FITC-gekoppelt; # 110519)                 | Mouse-anti-human IgG    | e-Biosciences<br>(CA, USA)        |
| <b>Antikörper für<br/>in-situ-Hybridisierung</b>                          | <b>Spezies</b>          | <b>erhalten von</b>               |
| Anti-DIG<br>(AP-gekoppelt) (Sondenbau)<br>(# 1093274)                     | Sheep-anti-digoxigenin  | Roche<br>(Mannheim, Deutschland)  |
| Digoxigenin<br>(HRP-gekoppelt; # P5104)                                   | Rabbit-anti-digoxigenin | Dako<br>(Hamburg, Deutschland)    |
| sekundärer „Envision“<br>(# K4002)  | Goat-anti-rabbit IgG    | Dako<br>(Hamburg, Deutschland)    |
| Digoxigenin (für EM)<br>(an 16nm Gold gekoppelt)<br>(# CU-3210-0488-IgPG) | Sheep-anti-digoxigenin  | Biogenesis Ltd.<br>(NH, USA)      |
| <b>sekundäre Antikörper für<br/>Immunogoldhistochemie</b>                 | <b>Spezies</b>          | <b>erhalten von</b>               |
| Mouse<br>(an 8nm Gold gekoppelt)<br>(# 115-005-068)                       | Goat-anti-mouse IgG     | Dianova<br>(Hamburg, Deutschland) |
| Rabbit<br>(an 16nm Gold gekoppelt)<br>(# L42000)                          | Goat-anti-rabbit IgG    | Medac<br>(Hamburg, Deutschland)   |
| Rat<br>(an 16nm Gold gekoppelt)<br>(# 112-005-075)                        | Goat-anti-rat IgG       | Dianova<br>(Hamburg, Deutschland) |

## 2.2 Gewinnung des Knorpelgewebes

Humane Embryos und gesunder humaner Gelenkknorpel wurden, entsprechend den Anordnungen der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen, gesammelt. Die Embryos wurden wie folgt klassifiziert: 3 Embryos der Gestationswoche (GW) 7, 2 Embryos aus GW 9, und 2 Embryos aus GW 12. Die GW's wurden entsprechend den Carnegie-Stadien eingeteilt (O'Rahilly und Muller 1996). Es wurden keine Fehlbildungen oder andere Abnormalitäten gefunden.

Krankes Knorpelgewebe von Patienten mit späten Stadien der Osteoarthritis (OA), ohne Zeichen rheumatoider Veränderungen, wurde von 10 Patienten (Alter zwischen 65–75 Jahre) gewonnen, welche eine Knie-TEP eingesetzt bekamen. Das Knorpelgewebe wurde direkt nach Entfernung in einer 1:1 PBS/DMEM-Lösung gegeben und danach sofort weiterverarbeitet. Alle Patienten entsprachen den „American College of Rheumatology“-Klassifikationskriterien für Knie-OA (Altman et al. 1986). Sie gaben vor der Operation ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung der Proben und wurden über die Ziele dieser Studie aufgeklärt. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät

---

der Universität Göttingen genehmigt.

### 2.3 Gewebepräparation

Für die lichtmikroskopische Gewebepräparation (Koelling et al. 2006) wurden die OA-Knie zuerst makroskopisch in einen noch gesund-aussehenden Bereich (= intaktes Areal) und in einen Defekt-Bereich (= OA-Defekt) eingeteilt. Daraufhin wurden mithilfe eines Skalpell ca. 1 x 0,5cm große Knorpelstücke aus den jeweiligen Bereichen ausgeschnitten. Hierbei wurde auch darauf geachtet, dass ein Teil des darunter liegenden Knochens mit entfernt wird. Diese Präparation galt auch für den ganz gesunden Knorpel. Die Fixierung mit gepuffertem Formalin nach Lillie wurde ü.N. bei 4°C durchgeführt. Danach wurden die Knorpelstücke aufgrund des noch anliegenden Knochens für ca. 4 Wochen in 20% EDTA zur Entkalkung überführt. Weiterführend wurden die Knorpelstücke für mindestens 3 Tage in 70% Ethanol überführt und bei 4°C gelagert. Es folgte ein Standardprotokoll zum Einbetten in Paraffin. Die histopathologische Klassifikation der Knorpelstücke aus OA-Gewebe erfolgte nach Pritzker et al. 2006.

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde der Knorpel nach Standardprotokoll präpariert und eingebettet (Miosge et al. 1999). Von den oberen intermediären Zonen des gesunden Knorpels und des intakten Areals bzw. des Defektes der OA wurden pro Patient 5 Knorpelstücke von je 1mm<sup>3</sup> entnommen in LR-Gold-Fixans fixiert und in den hydrophoben Kunststoff LR-Gold eingebettet.

### 2.4 Kolloidales Gold herstellen zum Antikörper koppeln

Für 8-nm-Goldkugeln wurden in einem sterilen Zwei-Hals-Kolben, welcher an eine Rückflusskühlung angeschlossen war, 106ml 2,2 mM Tri-Natrium-Citrat mithilfe eines Brenners unterm Abzug erhitzt. Danach wurden 955µl einer 1%igen Tetrachlorgoldsäure-Lösung dazu pipettiert. Das ganze musste dann mindestens 15min kochen. Da sich für das Koppeln von Antikörpern ein pH von 9 bewährt hat, wurde das Gold nach dem Abkühlen mit ~650µl 0,2 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auf diesen eingestellt.

Für 16-nm-Goldkugeln wurden zuerst 49,5ml aqua dest. mit 0,5ml 1%ige Tetrachlorgoldsäure in einem sterilen Zwei-Hals-Kolben auch wie oben mit einer Rückflusskühlung erhitzt. Die Lösung sollte 5min lang sprudelnd kochen. Danach wurde 1ml 1%ige Tri-Natrium-Citrat-dihydrat-Lsg. dazugegeben und weitere 10min gekocht. Auch hier fand ein Farbumschlag zu einem hellen Rot statt. Die 16-nm-Goldkugeln wurden mit ca. 400µl 0,2 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auf einen pH von 9 eingestellt.

## 2.5 Vorbereitende Methoden für mRNA-Nachweis

Die RNA-Isolierung wurde von jeweils 3 gesunden bzw. 3 dem intakten Areal und Defekt der OA entnommenen nativen Knorpelproben durchgeführt. Als Kontrolle wurde RNA aus humanem Plazentagewebe isoliert, da hier viele Basalmembranen vorhanden sind und damit viel Nidogen-mRNA erwartet werden konnte. Die Konzentrationsbestimmung wurde mittels eines Biophotometers (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) spektroskopisch vorgenommen. Mithilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, # 205313) erfolgte die cDNA-Synthese der oben beschriebenen RNA. Die Primersequenzen für die PCR von Nidogen-1 und dem hier verwendeten „Housekeeping-Gen“ Hypoxanthin-Phospho-Ribosyl-Transferase 1 (HPRT-1) wurden mithilfe der Primer3 shareware hergestellt. Die Sequenzen für Nidogen-2 wurden der Publikation von Dooley et al. entnommen (Dooley et al. 2003). Alle Primersequenzen wurden mithilfe der Datenbank von NCBI Blast (Nucleotide-Nucleotide Blast (blastn), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (2007)) überprüft.

| Zielgen   | Reverse<br>(5' → 3')  | Forward<br>(5' → 3')      | Annealing<br>Temperatur (°C) |
|-----------|-----------------------|---------------------------|------------------------------|
| Nidogen-1 | gtgcctccatgtaggaag    | atagaagtggcgaagctgg       | 57                           |
| Nidogen-2 | cggtgttgaacctatgtgtct | ttcaggtcacactacaccttaagtc | 57                           |
| HPRT-1    | tcccctgttgactggtcatt  | tgctcgagatgtgatgaagg      | 63                           |

Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde durchgeführt um die Spezifität und Signifikanz der Primer zu ermitteln. Diese wurde von den Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttingen, Deutschland) mithilfe der Methode nach Sanger durchgeführt.

## 2.6 Sondenbau zur in-situ-Hybridisierung von Nidogen-1

Die weiter oben beschriebenen Nidogen-1-Primer wurden vor dem 5'-Ende mit spezifischen T7- (Antisense) bzw. SP6 (Sense)-Nukleotidsequenzen verlängert.

| Zielgen   | T7 + reverse<br>(5' → 3')                             | SP-6 + forward<br>(5' → 3')                         | Annealing<br>Temperatur (°C) |
|-----------|---|---|------------------------------|
| Nidogen-1 | <b>taatacgaactcactatagggaga</b><br>gtgcctccatgtaggaag | <b>atttaggtgacactatagaag</b><br>atagaagtggcgaagctgg | 60                           |

---

Für den PCR-Ansatz wurde cDNA aus der Plazenta verwendet, da hier aufgrund der vorkommenden Basalmembranen viel Produkt erwartet werden konnte. Die PCR wurde mithilfe der Hotstartaq-Polymerase von Qiagen durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde danach in einem Agarose-Gel überprüft.

Die folgenden Schritte der In vitro Transkription wurden genutzt, um mithilfe von zwei unterschiedlichen RNA-Polymerasen die Antisense- bzw. die Sense-Sonde für Nidogen-1 herzustellen. Die Polymerasen erkennen hier spezifisch die durch die PCR entstandenen Produkte der vorher angefügten T7- oder SP-6-Primersequenzen. Dadurch wird in dem einen Eppendorfcup nur die Antisense-Sonde und in dem anderen die Sense-Sonde gebildet. Gleichzeitig werden die Sonden bei der Transkription mithilfe des Dig-Labeling Mix mit Digoxigenin markiert.

Um die Effizienz der Sondenmarkierung zu bestimmen und eine Aussage über die Konzentration der Sonden machen zu können, wurde ein Dot Blot angefertigt.

## **2.7 Lichtmikroskopische Immunhistochemie von Nidogen-1 und Nidogen-2**

Im Folgenden sind die Protokolle der beiden Nidogene genauer beschrieben. Da sie sich nur in den verwendeten Antikörpern voneinander unterscheiden, werden sie am Anfang und Ende als ein Protokoll dargestellt.

Die OT wurden in eine Halterung eingehängt, mit Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolverdünnungsreihe rehydriert. Die OT wurden danach in eine Küvette mit 70ml Methanol und 700µl 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zum Blocken der endogenen Peroxidase gestellt. Danach folgte der erste Vorverdau mit Protaqs I für 20min bei 60°C. Die OT wurden dann in eine Petrischale gelegt, und es wurden ca. 50-100µl Protease XXIV auf den Schnitt pipettiert und 5min bei RT inkubiert.

Nach dem Vorverdau wurden die primären Antikörper vorbereitet; JF4 für Nidogen-1 und 1080+E2 für Nidogen-2. Beide wurden 1:100 in 1% BSA in PBS (pH 7,4) verdünnt. Pro Schnitt wurden 50-100µl Antikörper verwendet. Beide primären Antikörper wurden für 1h bei RT inkubiert. Als Negativ-Kontrolle – um unspezifische Bindungen der sekundären Antikörper oder des PAP-Komplexes zu erkennen – wurden die Schnitte nur mit 1% BSA in PBS (pH 7,4), ohne den primären Antikörper inkubiert.

Danach wurden die Schnitte für den Nidogen-1-Nachweis für 1h mit einem sekundären anti-Rat-Antikörper/HRP-gekoppelt inkubiert. Der Antikörper wurde 1:100 in 1% BSA in PBS (pH 7,4) verdünnt und davon wieder 50-100µl auf jeden Schnitt pipettiert.

---

Für den Nidogen-2-Nachweis wurden die Schnitte mit einem 1:50 in 1% BSA in PBS (pH 7,4) verdünnten Anti-Rabbit Brückenantikörper (50-100µl/Schnitt) für 30min behandelt. Danach folgte ein Rabbit-PAP-Komplex. Dieser wurde 1:150 in 1% BSA in PBS (pH 7,4) verdünnt und 50-100µl/Schnitt auf die Schnitte pipettiert und für 30min inkubiert.

Die nächsten Schritte sind für beide Antikörper wieder identisch. Die Schnitte wurden mit 200µl/Schnitt DAB in der Petrischale für 10min behandelt. Die Petrischale wurde dabei lichtundurchlässig mit Aluminiumfolie umschlossen. Die Reaktionen wurden nach 10min mit 1xPBS gestoppt. Um das nicht-angefärbte Gewebe sichtbar zu machen, wurde eine Gegenfärbung mit Hämalaun nach Meyer durchgeführt, woraufhin die OT in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert wurden. Danach wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckt, getrocknet und konnten lichtmikroskopisch beurteilt werden.

## **2.8 Elektronenmikroskopische Immunogoldhistochemie von Nidogen-1 und Nidogen-2**

Der Nidogen-1 Antikörper wurde 1:120 in 1% BSA in PBS (pH 7,4) und der Nidogen-2 Antikörper 1:60 in 1% BSA in PBS verdünnt. Von jedem verdünnten Antikörper wurde 20µl/Grid auf Parafilm pipettiert. Der Grid wurde dann mit einer Pinzette auf den Tropfen gelegt. Die Petrischale wurde abgedeckt und die Grids wurden für 1h bei RT mit Nidogen-1 bzw. für 16h bei 37°C in einem Wärmeschrank mit Nidogen-2 inkubiert. Danach wurden die Grids mit ca. 100ml/Grid 1xPBS abgespült und die restliche Flüssigkeit mit Filterpapier vorsichtig vom Grid abgezogen. Die sekundären Antikörper wurden an 16nm kolloidales Gold gekoppelt und sind bereits 1:10 verdünnt. Für die Inkubation wurde sowohl der sekundäre Anti-Rat für Nidogen-1 als auch der Anti-Rabbit für Nidogen-2 nochmals 1:40 mit 1x PBS verdünnt. Beide Antikörper wurden wieder zu je 20 µl auf den Parafilm pipettiert und die Grids für 20min bei RT inkubiert. Danach wurden die Grids mit ca. 100 ml/Grid aqua dest. abgespült. Als Negativ-Kontrollen wurde der primäre Antikörper weggelassen und stattdessen 1% BSA in PBS benutzt. Um eine mögliche Bindung von ungekoppeltem kolloidalem Gold an Gewebestrukturen auszuschließen, wurden die Grids nur mit purem kolloidalem Gold inkubiert. Um die Gewebe im Elektronenmikroskop sichtbar zu machen wurden die Grids kontrastiert. Danach konnte die Immunogoldhistochemie mithilfe eines LEO 906 E Elektronenmikroskops analysiert und statistisch ausgewertet werden.

In der statistischen Auswertung wurde zwischen gesunden Chondrozyten aus gesundem Knorpel (n=3) und erkrankten bzw. elongierten Chondrozyten jeweils aus dem intakten bzw. defekten Areal der OA (n=5) unterschieden. Jeweils 10 der verschiedenen Zelltypen, mit

Nahaufnahmen der perizellulären Matrix, wurde pro Patient fotografiert. Dann wurde das perizelluläre Nidogen-1 bzw. Nidogen-2, welches mittels 16-nm-Goldkugeln sichtbar gemacht werden konnte, mithilfe von Schablonen in einem Areal von 2000 nm<sup>2</sup> ausgezählt. Die Ergebnisse der Auszählung wurden daraufhin für jeden Zelltyp aus den unterschiedlichen Arealen zu einem Mittelwert zusammengefasst und der Standardfehler berechnet. Um signifikante Unterschiede zwischen dem perizellulären Protein der verschiedenen Zelltypen und Areale festzustellen, wurde der Wilcoxon/Mann-Whitney Test für ungleiche Stichproben genutzt. Als signifikant wurden hierbei  $p$ -Werte  $\leq 0,05$  angesehen.

## 2.9 Quantitative real-time RT-PCR für Nidogen-2

Für die qRT-PCR von Nidogen-2 wurde die gewonnene cDNA [3x gesunder Knorpel, jeweils 3x OA Knorpel (intaktes Areal bzw. Defekt)] nach folgendem Schema vorbereitet.

|                        | Pro Well                 | Mastermix (3x)           |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| cDNA                   | 10 ng                    | 30 ng                    |
| Primer (for + rev)     | je 20 pmol               | je 60 pmol               |
| SYBR-Green Mix         | 5 $\mu$ l                | 15 $\mu$ l               |
| Nuklease-freies Wasser | auf 10 $\mu$ l auffüllen | auf 30 $\mu$ l auffüllen |

Die qRT-PCR wurde jeweils 3-mal mit 3-fachen Ansätzen mithilfe eines Mastercycler Realplex<sup>2</sup> S (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und folgendem Protokoll durchgeführt:

|                        |          |                                   |           |
|------------------------|----------|-----------------------------------|-----------|
| Initiale Denaturierung | 3min     | 95°C                              |           |
| Denaturierung          | 20sek    | 94°C                              |           |
| Anlagerung (Annealing) | 20sek    | 57°C (Nidogen-2)<br>60°C (HPRT-1) | 45 Zyklen |
| Verlängerung           | 20sek    | 68°C                              |           |
| Letzte Verlängerung    | 10min    | 68°C                              |           |
|                        | $\infty$ | 4°C                               |           |

Die statistische, erforderliche Normalisierung der PCR-Daten erfolgte gegen die mRNA des gesunden Knorpels mithilfe des Housekeeping-Gens HPRT-1 nach Pfaffl (2001). Da HPRT-1 in unseren Proben identische ct-Werte aufwies, wurde es als Housekeeping-Gen eingesetzt.

Um die Effizienz der PCR zu bestimmen wurde eine Standardkurve exemplarisch für HPRT-1

---

durch eine Standardverdünnungsreihe generiert. Als Standard-DNA wurde die cDNA des gesunden Knorpels mit einer Konzentration von 20 ng/ $\mu$ l eingesetzt. Der Verdünnungsbereich der cDNA lag zwischen 1:1 und 1:1000 (Verdünnungen jeweils in 1:10 Schritten). Diese wurden in den oben beschriebenen PCR-Ansatz von 10 $\mu$ l eingesetzt.

Zur weiteren Berechnung der Ratio, durch die ein Vergleich der Proben möglich ist, wurde sichergestellt, dass alle durch die qRT-PCR ermittelten Ergebnisse (ct-Werte) einer Intertest- und Intratest-Variationsbreite von  $\leq 1\%$  unterlagen. Der relative Expressionsunterschied zwischen dem Housekeeping-Gen zur Referenzprobe, normalisiert durch das Referenzgen HPRT-1, wird hierbei aus der arithmetischen Formel  $E^{-\Delta\Delta CT}$  ( $E$  = Effizienz der PCR) berechnet. Die Effizienz des HPRT-1 ergab einen Wert von 2,01. Die Effizienz der Referenzprobe wurde somit als 2 angenommen, woraus sich die Formel:  $2^{-\Delta\Delta CT}$  für die Bestimmung der Ratio ergab.

## 2.10 Lichtmikroskopische in-situ-Hybridisierung für Nidogen-1

Alle Lösungen wurden einen Tag vor Beginn angesetzt, da die meisten autoklaviert wurden. Die verwendeten Küvetten, Messzylinder und -becher sind in einem Heizofen einen Tag zuvor für 4h bei 180°C ausgebrannt wurden.

Die Nidogen-1-Sonden wurden in einem Thermoblock für 3min bei 65°C inkubiert und gleich danach in Eis gelegt, um mögliche Hybridisierungen, die in der Zeit der Lagerung entstanden sind, aufzubrechen. Die Nidogen-Sonden wurden dann beide jeweils mit einer Hybridisierungslösung so gemischt, dass jeder Schnitt mit 50ng Sonde inkubiert werden konnte. Die OT wurden nach dem Rehydrieren nah um das Präparat – ohne es zu beschädigen – mit Filterpapier abgewischt. 50 $\mu$ l der Antisense- bzw. der Sense-Sonden wurden auf jeweils einen Schnitt pipettiert. Die Petrischale wurde abgedeckt und in einem Wärmeschrank bei 37°C ü.N. inkubiert. Die OT wurden am nächsten Tag in einer Küvette mit 2x SSC (2x für je 5min) gewaschen. Danach folgte das Blocken der endogenen Peroxidase mit 3%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei RT in einer abgedunkelten Küvette. Die Präparate wurden anschließend 2x für 5min mit 1xPBS gewaschen. Im Weiteren wurde ein Rabbit-anti-dig-HRP-Antikörper (Dako, # P5104) mit einem Blockierungsreagenz („AK Diluent“, Dako, # S3022) 1:50 verdünnt und je 50 $\mu$ l/Schnitt auf die Präparate pipettiert und für 1h im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Präparate wurden danach erneut 2x für 5min mit 1xPBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte mit dem sekundären Antikörper „Envision“ (Goat-anti-rabbit-HRP-Antikörper; Dako, # K4002) für 30min im Dunkeln bei RT inkubiert. Dieser ist schon eine fertige Lösung und muss deshalb nicht weiter verdünnt werden, sondern es können 2 Tropfen direkt auf das



---

Präparat gegeben werden. Die Präparate wurden danach erneut 2x für 5min mit 1xPBS gewaschen. Dann folgte die Sichtbarmachung mit der Färbelösung AEC (Dako, # K3464). Die Kerne und die restliche EZM wurden mit Hämalaun nach Meyer gegengefärbt. Die Schnitte wurden danach mit „Aqueous Mounting Medium“ (Dako, # S3025) und OT-Gläschen eingedeckt.

## **2.11 Elektronenmikroskopische in-situ-Hybridisierung für Nidogen-1**

Für die Grids wurde eine Petrischale mit Filterpapier ausgelegt und mit aqua dest. angefeuchtet. Auf das Filterpapier wird Parafilm gelegt. Danach wurden die Antisense- und die Sense-Sonde vorbereitet. Jeweils 20µl von der Antisense- bzw. Sense-Sonde wurde mit einer Endkonzentration von 100ng/20µl Hybridisierungslösung auf den Parafilm pipettiert. Die Grids wurden dann mit einer Pinzette auf die Tropfen gelegt und für 20h bei 37°C in einem Wärmeschrank mit den Sonden inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Grids mit verschieden konzentriertem SSC und 1x PBS gewaschen. Der an 16-nm-Gold gekoppelte Anti-Digoxigenin-Antikörper wurde 1:40 mit 1x PBS verdünnt. Der Antikörper wurde zu je 20µl auf den Parafilm pipettiert und die Grids für 20min bei RT inkubiert. Danach wurden die Grids mit ca. 100ml/Grid aqua dest. abgespült. Neben der Sense-Sonde wurde hier als Negativkontrolle noch zusätzlich entweder die Sonde weggelassen und stattdessen nur die Hybridisierungslösung benutzt oder um eine mögliche Bindung von ungekoppeltem kolloidalem Gold an Gewebestrukturen auszuschließen, wurden die Grids nur mit purem kolloidalem Gold inkubiert. Um die Gewebe im Elektronenmikroskop sichtbar zu machen wurden die Grids kontrastiert. Danach konnte die in-situ-Hybridisierung mithilfe eines LEO 906 E Elektronenmikroskops analysiert und statistisch ausgewertet werden.

In der statistischen Auswertung wurde zwischen gesunden Chondrozyten aus gesundem Knorpel (n=3) und erkrankten bzw. elongierten Chondrozyten jeweils aus dem intakten bzw. defekten Areal der OA (n=5) unterschieden. Jeweils 10 der verschiedenen Zelltypen, mit Nahaufnahmen der intrazellulären Matrix, wurden pro Patient fotografiert. Dann wurde die Nidogen-1- bzw. Nidogen-2-mRNA, welches mittels 16-nm-Goldkugeln sichtbar gemacht werden konnte, mithilfe von Schablonen in einem Areal von 2000 nm<sup>2</sup> ausgezählt. Die Ergebnisse der Auszählung wurden daraufhin für jeden Zelltyp aus den unterschiedlichen Arealen zu einem Mittelwert zusammengefasst und der Standardfehler berechnet. Um signifikante Unterschiede zwischen der mRNA der verschiedenen Zelltypen und Areale festzustellen, wurde der Wilcoxon/Mann-Whitney Test für ungleiche Stichproben genutzt. Als signifikant wurden hierbei  $p$ -Werte  $\leq 0,05$  angesehen.

---

## 2.12 Zellisolation

Auch bei der Isolation der Chondrozyten aus OA Gewebe wurde makroskopisch zwischen einem intakten Bereich und einem Defekt unterschieden. Unter sterilen Bedingungen wurde der Knorpel mit 10 mg Kollagenase I (152 units/ml; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 10 mg Kollagenase II (280 units/ml; Biochrom, Berlin, Deutschland) verdaut, die Zellen nach Standardprotokoll isoliert und in DMEM mit 10% FBS und entsprechenden Antibiotika kultiviert. Die Monolayer-Kultur wurde gewählt, um die möglichen toten Zellen von den noch Lebenden zu trennen. Sie wurde aber nur für eine Nacht (16h) angewandt, um eine komplette Dedifferenzierung der Chondrozyten auf Plastik zu verhindern.

Nach 16h wurde der Überstand abgesaugt und noch 2x mit 1x PBS gründlich gewaschen, sodass nur die adhärennten Zellen übrig blieben. Diese wurden dann mit einem Zellschaber (Bio-one; Greiner, Solingen, Deutschland) vorsichtig vom Boden abgelöst. In die Flaschen wurden je 5ml 1x PBS, bzw. für die Adhäsions- und Inhibitionsassays Serum-freies Medium (ohne FBS) pipettiert und die Zellen mit einer Pipette in einem Röhrchen gesammelt. Die so isolierten Chondrozyten wurden dann für die Adhäsions- und Inhibitionsassays, die pre-embedding Methode, FACS-Analyse und lichtmikroskopische Immunfluoreszenz, welche im Folgenden beschrieben werden, weiterverwendet.

## 2.13 Zelladhäsions- und Zellinhibitionsassay

### Zelladhäsionsassay

Die 96-well-Platten (Sarstedt, # 83.1835) wurden unter sterilen Bedingungen mit aufsteigenden Konzentrationen von Nidogen-1 bzw. Nidogen-2 (0 – 8µg/ml aqua dest.; 100µl/well) ü.N. bei 4°C beschichtet. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Wells mit je 100µl 1% BSA ü.N. bei 4°C inkubiert. Die Chondrozyten wurden zu je 3000Zellen/200µl Serum-freiem Medium in die vorbereiteten Wells pipettiert und 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, die Wells 2x mit je 200µl 1x PBS vorsichtig gewaschen und danach die Zellkerne der adhäsiven Zellen mit 100µl/Well DAPI-Lösung im Dunkeln angefärbt, sodass die Kerne ausgezählt werden konnten.

### Zellinhibitionsassay

Die 96-well-Platten (Sarstedt, # 83.1835) wurden mit konstanten Konzentrationen von Nidogen-1 bzw. Nidogen-2 (8µg/ml aqua dest.; 100µl/Well) ü.N. bei 4°C beschichtet. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Wells mit je 100µl 1% BSA ü.N. bei 4°C inkubiert. Das BSA wurde abgesaugt und die Wells wurden dann mit aufsteigenden Verdünnungen (0 –

---

1:1600 in 1xPBS; 100µl/Well) von Nidogen-1 (JF4) bzw. Nidogen-2 (1080+E2) Antikörper für 1h bei RT inkubiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Wells 2x mit 1xPBS kurz gewaschen. Die Chondrozyten wurden zu je 3000Zellen/200µl Serum-freiem Medium in die vorbereiteten Wells pipettiert und 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, die Wells 2x mit je 200µl 1x PBS vorsichtig gewaschen und danach die Zellkerne der adhäsiven Zellen mit 100µl/Well DAPI-Lösung im Dunkeln angefärbt, sodass die Kerne mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axiovert 40 CFL) manuell ausgezählt werden konnten.

Die gezählten Zellen aus der Negativkontrolle wurden von den Ergebnissen der eigentlichen Assays subtrahiert. Jedes einzelne im Diagramm dargestellte Ergebnis (Mittelwert ± Standardfehler) wurde mit 2-fach Ansätzen von je 5 Patienten ermittelt.

## 2.14 Pre-embedding Methode

Beide Proteine wurden an 16-nm-Gold gekoppelt. Für beide Proteine lag die Konzentration der Stammlösung über 1mg/ml. In der erstellten pH-Reihe, zeigte sich dass ein Gold-pH von ~9 keine Ausfällungen der Proteine aufwies. Daher wurde das Gold mittels  $K_2CO_3$  auf pH 9 eingestellt und so weiterverwendet. Das Protein-Gold ließ sich so sehr gut koppeln und war dadurch für ca. 2 Tage gut stabilisiert. Da es im nächsten Schritt auch immer sofort weiterverwendet wurde, wurde deshalb auf eine maximale Stabilisierung mit BSA verzichtet. Die weiter oben beschriebenen isolierten Chondrozyten aus dem Kollagenaseverdau von je 2 OA Patienten wurden mithilfe eines Cellometers gezählt. Pro Ansatz wurden 600000 Chondrozyten genutzt. Die Zellen wurden in ein 14-ml-Röhrchen überführt, zentrifugiert (1200UpM, 10min) und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Die Zellen wurden dann 1x mit 1xPBS gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Danach wurden die Zellen mit dem oben beschriebenen Protein-Gold – entweder Nidogen-1 oder Nidogen-2 – vermischt. Dabei wurde für einen Ansatz jeweils die Hälfte durch einmal Koppeln entstandenes Protein-Gold benutzt. Als Negativ-Kontrolle wurde pures Gold (pH 7,4) mit den Zellen inkubiert. Die Zell-Gold-Suspensionen wurden je in einen 1,5-ml-Eppendorfcup überführt und in einem Heizblock für 1h bei 37°C und 400 UpM inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension erneut in ein 14-ml-Röhrchen pipettiert. Das Röhrchen wurde mit 2ml 1xPBS aufgefüllt, kurz geschüttelt und zentrifugiert (1200UpM, 10min). Der Überstand wurde abgesaugt. Danach wurden die Zellen noch 2x mit 2ml 1xPBS gewaschen, wieder zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden daraufhin direkt in LR-Gold eingebettet. Der Schritt mit Ammoniumchlorid entfiel hier, da nachfolgend

---

keine Immunogoldhistochemie mehr ausgeführt werden sollte und so die Zentrifugationsschritte verringert werden konnten. Sonst ist das Protokoll von den benutzten Reagenzien her, nicht von der schon beschriebenen Einbettung nativer Gewebe in LR-Gold zu unterscheiden (Miosge et al. 1999).

### **2.15 Fluorescence-activated cell sorting (FACS)**

Für diesen Versuch wurden isolierte Chondrozyten von 3 OA Patienten benutzt, welche jeweils in doppelten Ansätzen untersucht wurden. Pro Ansatz wurden ca. 10000 lebende Zellen analysiert.

Die Chondrozyten wurden mit einem Cellometer gezählt. Sie wurden dann zu je 10000 Zellen in für die Durchflusszytometrie vorgesehenen Röhrchen (Becton Dickinson, # 352058) überführt und bei 1200UpM für 10min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit einem der jeweiligen Integrin-Antikörper für 1h bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Antikörper wurden alle 1:50 in je 200µl 1xPBS verdünnt. Die Chondrozyten wurden danach erneut wie oben beschrieben abzentrifugiert und 2x mit je 2ml 1xPBS gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Die Zellen wurden zum Schluss mit 2ml 1xPBS verdünnt, und konnten dann mithilfe eines FACScan (Becton Dickinson, CA, USA), wie oben erläutert, analysiert werden. Die Ergebnisse wurden mithilfe einer WinMDI Version 2.9 Software ausgewertet.

### **2.16 Lichtmikroskopische Immunfluoreszenz**

Für diesen Versuch wurden isolierte Chondrozyten von 3 OA Patienten benutzt, welche jeweils in 3-fachen Ansätzen untersucht wurden.

Die Chondrozyten wurden bei 1200UpM für 10min abzentrifugiert und mit 1ml Kultivierungsmedium vermischt. Die Zellen wurden dann mithilfe eines Cellometers gezählt und so in Kultivierungsmedium weiter verdünnt, dass sie auf einer 96-well-Platte zu je 600 Zellen/100µl Kultivierungsmedium/Well ausgesät werden konnten. Die Chondrozyten konnten dann über Nacht an das Plastik anhaften. Am nächsten Tag wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 100µl/Well 70% Ethanol für 10min inkubiert und somit am Plastik fixiert. Danach wurde das Ethanol abgesaugt und die Zellen kurz mit 100µl/Well 1xPBS gewaschen. Die fluoreszenzmarkierten Integrin-Antikörper wurden 1:50 in 1xPBS verdünnt, das 1xPBS von den Zellen abgesaugt und jeweils 100µl des Antikörpers pro Well auf die Zellen pipettiert. Die Inkubation wurde für 1h bei RT im Dunkeln

---

durchgeführt. Danach folgten 2 Waschschritte mit 1xPBS welches nach jedem Waschschritt abgesaugt wurde. Die Zellkerne der Chondrozyten wurden mit DAPI angefärbt und die Zellen dann unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 40 CFL) analysiert. Die Fotos wurden mithilfe einer Coolpix MDC Kamera (Nikon, Tokyo, Japan) angefertigt.

### **2.17 Ultrastrukturelle Kolokalisation von Nidogen-1 bzw. Nidogen-2 mit Integrinen in vivo**

Nidogen-1 wurde 1:120 in 1% BSA in PBS (pH 7,4) und Nidogen-2 1:60 in 1% BSA in PBS verdünnt. Von jedem verdünnten Antikörper wurde 20 $\mu$ l/Grid auf den Parafilm pipettiert und für 1h bei RT mit Nidogen-1 bzw. für 16h bei 37°C in einem Wärmeschrank mit Nidogen-2 inkubiert. Die sekundären Antikörper wurden an 16-nm-Gold gekoppelt und sind bereits 1:10 verdünnt. Für die Inkubation wurde sowohl der sekundäre Anti-Rat für Nidogen-1 als auch der Anti-Rabbit für Nidogen-2 nochmals 1:40 mit 1x PBS verdünnt. Dadurch war die Verdünnung der Antikörper am Ende 1:400. Beide Antikörper wurden wieder zu je 20 $\mu$ l auf den Parafilm pipettiert und die Grids für 20min bei RT inkubiert.

Dann wurden die primären Antikörper für die zweite Reaktion vorbereitet. Mouse-anti- $\alpha$ 3 wurde 1:50 in 1% BSA in PBS, Mouse-anti- $\alpha$ v 1:50 in 1xPBS und Mouse-anti- $\beta$ 1 1:50 in 1% BSA in PBS verdünnt. Von jedem verdünnten Antikörper wurde 20 $\mu$ l/Grid auf den Parafilm pipettiert. Und für für 16h bei 37°C mit Mouse-Anti- $\alpha$ 3, für 1h bei RT mit Mouse-Anti- $\alpha$ v bzw. für 16h bei RT mit Mouse-Anti- $\beta$ 1 inkubiert. Der sekundäre Antikörper Anti-Mouse wurde an 8-nm-Gold gekoppelt und ist bereits 1:10 verdünnt. Für die Inkubation wurde er nochmals 1:40 mit 1x PBS verdünnt. Um die Gewebe im Elektronenmikroskop sichtbar zu machen wurden die Grids kontrastiert und mithilfe eines LEO 906 E Elektronenmikroskops analysiert.

---

### **3. Ergebnisse und Diskussion**

#### **3.1 Nidogene sind EZM-Komponenten in gesundem, humanem Knorpel und in den späten Stadien der Osteoarthrose**

Dies ist die erste Studie, welche die beiden Basalmembranproteine Nidogen-1 und Nidogen-2, sowohl als EZM-Komponenten in humanem Knorpel während der Extremitätenentwicklung des Embryos, als auch im gesunden humanen Kniegelenksknorpel und deren Veränderung in den späten Stadien der Osteoarthrose zeigt.

Mithilfe der lichtmikroskopischen Immunhistochemie waren starke Reaktionen für Nidogen-1 und Nidogen-2 in den Knorpelanlagen humaner Embryos aus der Gestationswoche (GW) 7 – 12 nachweisbar. Schon im kondensierten Mesenchym eines sich entwickelnden Metakarpus aus der GW 7 waren beide Nidogene zu finden. Auch in Rippenanlagen aus GW 9 waren die Nidogene in der EZM der Chondrozyten zu sehen. Im Perichondrium, welches die Rippenanlagen direkt umgibt, waren dagegen beide Nidogene nicht nachweisbar. Die strikte Begrenzung der Nidogene schon im kondensierten Mesenchym auf Bereiche welche später die Knorpelanlagen bilden und das Fehlen der Nidogene im Perichondrium könnte dafür sprechen, dass Nidogene eine unterstützende Rolle in der Entwicklung von Chondrozyten spielen. Zusammenfassend gibt es noch weitere Hinweise für eine Rolle der Nidogene während der Extremitätenentwicklung. Nidogen-1 und Nidogen-2 wurden bereits im Mesenchym unterschiedlicher Gewebe – während der Extremitätenentwicklung der Maus (Thomas und Dziadek 1993) und in Rippenanlagen von Mäuseföten (Salmivirta et al. 2002) – beschrieben. Schon länger wird vermutet, dass die Komponenten der EZM, mesenchymale Zellen in ihrem Phänotyp beeinflussen können, und das Nidogen-1 z.B. mithilfe seiner RGD-Sequenz Zell-Matrix-Interaktionen während der Extremitätenentwicklung mittels Integrine beeinflussen könnte (Thomas und Dziadek 1993). Des Weiteren fand man während der Chondrozyten-Entwicklung Integrin-Untereinheiten, die durchaus Nidogene binden könnten. Diese Integrin-Untereinheiten verändern sich, je nach Entwicklungsstadium der Chondrozyten (Hausler et al. 2002; Salter et al. 1995; Shakibaei et al. 1995). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Wachstumsfaktoren wie BMP's und FGF's, welche zentrale Rollen bei der Bildung und Entwicklung der Extremitäten spielen, bei Nidogen-Doppel-Knockout-Mäusen verändert sind (Bose et al. 2006). Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die Funktionen der beiden Nidogene während der Knorpelentwicklung

---

herauszufinden.

Ein weiteres Interesse lag darin, nachzuweisen, ob beide Nidogene auch Komponenten des adulten, humanen, gesunden und osteoarthrotischen Knorpelgewebes sind. Hierfür wurde zuerst die lichtmikroskopische Immunhistochemie angewandt.

In physiologisch gesundem Knorpel des menschlichen Kniegelenkes, fand sich eine homogene Reaktion in der gesamten EZM des Knorpels für Nidogen-1, während der darunter liegende subchondrale Knochen keine Reaktion aufwies. Im Gegensatz dazu war Nidogen-2 in physiologisch gesundem Knorpel nur schwach in der perizellulären Matrix der Chondrozyten nachweisbar und fehlte vollständig in der interterritorialen Matrix und auch im subchondralen Knochen. Diese unterschiedlichen Verteilungsmuster weisen auf unterschiedliche Funktionen und Bindungspartner von Nidogenen in physiologisch gesundem Gelenkknorpel hin.

In osteoarthrotischem Gelenkknorpel war die interterritoriale Reaktion für Nidogen-1 im Bereich der Intermediärzone (obere Schicht im OA-Knorpel) stark erhöht. Diese vermehrte Reaktion war vor allem in Arealen des OA-Knorpels zu finden, in denen gleichzeitig tiefe Fissuren nachzuweisen waren. Die radiale Zone (tiefste Schicht) in OA zeigte schwächere Reaktionen im Vergleich zum gesunden Knorpel. Auch die perizelluläre Matrix in OA zeigte eine eher schwache Reaktion für Nidogen-1, auffallend auch im Bereich von Chondrozyten-Klusterformationen. Für Nidogen-2 war im osteoarthrotischen Knorpel, vor allem im Bereich der Chondrozyten-Kluster und der Intermediärzone, eine Erhöhung der Reaktion zu erkennen. Jedoch blieb die Reaktion auch hier auf die perizelluläre Matrix begrenzt.

Aufgrund der Verteilung könnte Nidogen-1 in gesundem Gelenkknorpel mit Aggrekan oder Kollagen Typ II verbunden sein. In den späten Stadien der OA, wären aufgrund des Verteilungsmusters und auch indiziert durch in-vitro-Daten (Kohfeldt et al. 1998; Dziadek et al. 1985) zu vermuten, dass Nidogen-1 auch mit Kollagen Typ I und Fibronectin in Verbindung stehen könnte. Funktionell könnte Nidogen-1 damit ein „Link-Protein“ im Knorpel darstellen, eine Aufgabe die schon für andere Glykoproteine im Knorpel beschrieben wurde (Heinegard et al. 1999) und die für Nidogen-1 in Basalmembranen bekannt ist (Fox et al. 1991). Nidogen-2, dagegen, könnte, aufgrund seiner strikt perizellulären Lokalisation, seiner Erhöhung im Bereich der Chondrozyten-Kluster und wegen der Ergebnisse anhand unterschiedlicher Zelllinien (Kohfeldt et al. 1998), ein Adhäsionsprotein im Gelenkknorpel darstellen.

---

### 3.2 Unterschiede in den Nidogen-Mengen in Abhängigkeit vom Knorpel-Areal und dem Chondrozyten-Phänotyp

Aufgrund der oben beschriebenen, schon lichtmikroskopisch erkennbaren Unterschiede in den Nidogen-Mengen bzw. -Verteilungen war das nächste Ziel die genauere Quantifizierung dieser Ergebnisse. Dafür wurde die elektronenmikroskopische Immunogoldhistochemie auf Proteinebene und die elektronenmikroskopische in-situ-Hybridisierung für Nidogen-1, bzw. die qRT-PCR für Nidogen-2 auf mRNA-Ebene angewandt.

Bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde der gesunde Knorpel mit dem makroskopisch intakten Areal der OA und dem OA Defekt verglichen. Zusätzlich war es möglich mithilfe der Elektronenmikroskopie in OA-Knorpel zwischen erkrankten Chondrozyten und elongierten Chondrozyten zu differenzieren. Physiologisch gesunder Knorpel enthielt gesunde Chondrozyten mit den für sie typischen Merkmalen, wie wenig endoplasmatisches Retikulum und gut ausgebildete Mikrovilli. In OA-Knorpel, hingegen, waren erkrankte Chondrozyten mit einem dem gesunden Chondrozyten ähnlichem Phänotyp zu finden. Von den elongierten Chondrozyten, welche einen spindelförmigen Phänotyp mit stark ausgeprägtem endoplasmatischem Retikulum besitzen, weiß man, dass sie im Vergleich zu den erkrankten Chondrozyten viele verschiedene Matrixmoleküle vermehrt exprimieren (Poole 1999; Tesche und Miosge 2005; Bock et al. 2001; Koelling et al. 2006). Deshalb waren auch Unterschiede in den Mengen der Nidogene zwischen den erkrankten und elongierten Chondrozyten in OA-Knorpel zu erwarten.

Da die Proteine der perizellulären Matrix einen direkten Einfluss auf Zellen haben können, und weil beide Nidogene lichtmikroskopisch perizellulär an den Chondrozyten lokalisiert waren, wurde die Quantifizierung der Nidogene in der perizellulären Matrix vorgenommen.

Die Untersuchungen der Immunogoldhistochemie ergaben ein 2-fach erhöhtes perizelluläres Nidogen-1 um gesunde Chondrozyten, im Vergleich zu erkrankten Chondrozyten aus dem Defekt der OA ( $p \leq 0,05$ ). Hingegen war – im Vergleich zum gesunden Knorpel – Nidogen-1 2-fach in der perizellulären Matrix der elongierten Chondrozyten des OA-Defektes erhöht ( $p \leq 0,001$ ). Auch waren signifikante Unterschiede zwischen dem perizellulären Nidogen-1 der elongierten Chondrozyten aus den verschiedenen Arealen der OA nachzuweisen. Nidogen-1 war im OA-Defekt 2-fach erhöht, im Vergleich zum intakten Areal der OA ( $p \leq 0,001$ ).

Die elektronenmikroskopische in-situ-Hybridisierung zeigte starke Reaktionen für die Nidogen-1-mRNA am rauen endoplasmatischen Retikulum der Chondrozyten. Eine nicht-



---

signifikante Erhöhung der Nidogen-1-mRNA wurde für erkrankte Chondrozyten aus dem OA Defekt im Vergleich zu gesunden Chondrozyten gefunden (1,2-fach;  $p \geq 0,1$ ). Die mRNA der elongierten Chondrozyten aus dem OA-Defekt dagegen zeigte einen 4-fachen Anstieg des Nidogen-1 verglichen mit den gesunden Chondrozyten ( $p \leq 0,001$ ).

Bei dem Vergleich der Nidogen-1-mRNA mit dem Nidogen-1-Protein fiel auf, dass die Relation der Nidogen-1-mRNA und des Proteins im gesunden Knorpel ( $p \leq 0,05$ ) große Unterschiede verglichen mit der mRNA-Protein-Relation im OA-Defekt ( $p \leq 0,001$ ), sowohl für die erkrankten, als auch für die elongierten Chondrozyten zeigt.

Schon lichtmikroskopisch fand sich eine vor allem in der interterritorialen Matrix auffallende Verteilungsveränderung von Nidogen-1 im OA-Defekt in die obere intermediäre Zone, verglichen mit gesundem Knorpel. Die Nidogen-1-Erhöhungen waren auffallend assoziiert mit tiefen Knorpelfissuren. Diese Nidogen-1-Veränderungen wurden zusätzlich durch die lichtmikroskopische in-situ-Hybridisierung untermauert, bei der die Nidogen-1-mRNA nur in den oberen intermediären Zonen des OA-Defektes nachweisbar war. Die perizelluläre Matrix wies lichtmikroskopisch eine Nidogen-1-Erniedrigung auf, sowohl um einzelne Zellen, als auch im Bereich der Chondrozyten-Kluster des OA-Defektes. In der OA zeigte sich elektronenmikroskopisch eine tatsächliche Nidogen-1-Erniedrigung in der perizellulären Matrix der erkrankten Chondrozyten. Die Nidogen-1-mRNA der erkrankten Chondrozyten hingegen war leicht erhöht im OA-Defekt, verglichen mit gesundem Knorpel. Die elongierten Chondrozyten zeigten sowohl eine Erhöhung des perizellulären Nidogen-1 als auch der Nidogen-1-mRNA. Trotzdem war die Nidogen-1-mRNA-Protein-Relation – also das, was exprimiert wird im Vergleich zu dem Protein, was in der perizellulären Matrix deponiert wird – sowohl bei erkrankten als auch bei elongierten Chondrozyten im Vergleich zu gesunden Chondrozyten stark erhöht. Da diese Erhöhung im intakten Areal der OA schwächer ist als im OA-Defekt ist zu vermuten, dass sie mit dem Fortschreiten der Destruktion des Knorpels assoziiert ist. Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse zum einen darauf hin, dass Nidogen-1 entweder in der OA weniger stark translatiert wird oder es aufgrund der hohen Empfindlichkeit gegenüber Proteasen vielleicht im OA-Knorpel stärker degradiert wird. Zum anderen wäre es auch sehr wahrscheinlich, dass es in der OA mit zunehmender Destruktion zu einer Umverteilung von Nidogen-1 in die interterritoriale Matrix kommt, um die EZM vor allem im Bereich von tiefen Fissuren zu stabilisieren. Dies würde auch die oben schon erwähnte Vermutung stützen, dass Nidogen-1 funktionell ein „Link-Protein“ im Gelenkknorpel des Menschen darstellen könnte.

---

Nidogen-2 war um die erkrankten Chondrozyten aus dem OA-Defekt 5-fach perizellulär erhöht, im Vergleich zu den gesunden Chondrozyten ( $p \leq 0,001$ ). Hingegen war – im Vergleich zum gesunden Knorpel – Nidogen-2 8-fach in der perizellulären Matrix der elongierten Chondrozyten des OA-Defektes erhöht ( $p \leq 0,001$ ). Auch für Nidogen-2 waren signifikante Unterschiede zwischen den elongierten Chondrozyten aus den verschiedenen Arealen der OA nachzuweisen. Nidogen-2 war 5-fach erhöht, im Vergleich zum intakten Areal der OA ( $p \leq 0,001$ ).

Nach den Berechnungen von Pfaffl (Pfaffl 2001), ergaben sich mithilfe der quantitativen real-time RT-PCR folgende Ergebnisse für die Nidogen-2-mRNA. Für das intakte Areal der OA betrug die relative Expression  $3,34 \pm 0,86$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) und für den OA-Defekt  $4,26 \pm 0,37$ . Diese Daten bedeuten 22% weniger Nidogen-2-mRNA im intakten Areal der OA verglichen mit dem OA-Defekt. Die Experimente mit dem „Housekeeping-Gen“ HPRT-1 zeigten identische ct-Werte für das intakte Areal der OA und dem OA-Defekt. Die Validität der PCR-Ergebnisse für die Nidogen-2 mRNA wurden außerdem durch das Sequenzieren der PCR-Produkte und mithilfe der jeweiligen Schmelzkurven bestätigt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Nidogen-2-mRNA, so wie schon das oben beschriebene Protein, in der OA – abhängig von der Destruktion des Gewebes – vermehrt gebildet wird.

Nidogen-2 war im gesunden und auch OA-Knorpel immer strikt perizellulär nachweisbar, sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch. Schon lichtmikroskopisch war eine Erhöhung des Proteins zu finden, vor allem in der perizellulären Matrix der Chondrozyten-Kluster. Zur Quantifizierung wurde auf ultrastruktureller Ebene wieder zwischen erkrankten und elongierten Chondrozyten unterschieden. Im Gegensatz zu Nidogen-1 war allerdings die perizelluläre Menge an Nidogen-2 diesmal bei beiden Zelltypen stärker erhöht, je weiter die Knorpeldestruktion fortgeschritten war. Diese Proteinerhöhung stand auch in Korrelation mit der Nidogen-2-mRNA-Erhöhung im OA-Defekt, verglichen mit gesundem Knorpel. Eine Erklärung für die Erhöhung von Nidogen-2 in OA vor allem in der Matrix von Chondrozyten-Kluster könnte die Adhäsionsfähigkeit dieses Proteins sein, welche durchaus als effektiver als Nidogen-1 beschrieben wurde (Kohfeldt et al. 1998). Des Weiteren weiß man von der Skelett- und Herzmuskulatur aus Nidogen-1-knockout-Mäusen, dass Nidogen-2 bei Verlust von Nidogen-1 kompensatorisch erhöht werden kann (Miosge et al. 2002). Auch diese kompensatorische Funktion könnte hier eine Erklärung darstellen, und wäre zusätzlich unterstützend zu der weiter oben beschriebenen Umverteilungstheorie von Nidogen-1 in den späten Stadien der OA.

---

Aufgrund der erhöhten Expression von Nidogen-2 im OA-Defekt und der dagegen eher sehr schwachen Expression im gesunden Knorpel könnte gerade Nidogen-2, in Bezug auf klinische Relevanz, ein möglicher diagnostischer Marker speziell der späten Stadien der OA sein. Knorpelproteine im Blutserum von Patienten mit OA wurden schon häufiger nachgewiesen; so z.B. beschrieben für COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) (Clark et al. 1999).

Die Regenerationsfähigkeit des OA-Knorpels wird vor allem den elongierten Chondrozyten zugeschrieben, aufgrund ihrer Fähigkeit eine Vielzahl an Molekülen der EZM verstärkt zu exprimieren (Aigner und McKenna 2002; Sandell und Aigner 2001; Tesche und Miosge 2005). Da die elongierten Chondrozyten prinzipiell in jedem Areal der OA auch mehr Nidogene bilden als die erkrankten Chondrozyten im selben Areal bzw. als die gesunden Chondrozyten, und die stärksten perizellulären Reaktionen in der Intermediärzone der OA-Defekte im Bereich tiefer Fissuren zu finden sind, ist somit zu vermuten, dass beide Proteine eine wichtige Funktion für die Regeneration des OA-Knorpels besitzen.

### **3.3 Nachweise von Nidogen-Chondrozyten-Interaktionen in den späten Stadien der Osteoarthritis – in vitro und in vivo**

Um erste Hinweise darauf zu erhalten, ob Nidogene mit Chondrozyten direkt interagieren können, und damit auch die Umverteilung der Nidogene in der OA einen Einfluss auf die Zellen selbst haben könnte, wurden sowohl in vitro als auch in vivo Versuche durchgeführt. Zusätzlich wurde untersucht welche Integrine an Chondrozyten aus dem intakten Areal der OA im Vergleich zum OA-Defekt nachzuweisen sind.

Da Nidogene für einige Zelllinien adhäsive Eigenschaften aufweisen, wurden als erstes Zelladhäsionsassays in vitro durchgeführt. Verglichen mit den Chondrozyten auf den Kontrollplatten ohne Nidogen-1 oder Nidogen-2 banden ungefähr 30-40% der Chondrozyten vom OA-Defekt an Nidogen-1 und auch Nidogen-2. Interessant hierbei ist auch, dass Chondrozyten aus dem intakten Areal der OA keine Adhäsionsfähigkeit an beiden Nidogenen zeigten. Um die Substratspezifität dieser Bindung zu untersuchen, wurden Inhibitionsassays in vitro mithilfe von Nidogen-Antikörpern durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass mit zunehmender Antikörperkonzentration die Adhäsionsfähigkeit der Chondrozyten vom OA-

---

Defekt an beide Nidogene nachlässt. Dagegen konnte keine Inhibition für Zellen vom intakten Areal der OA gefunden werden. Diese Daten zeigen, dass Nidogene, vor allem in den späten Stadien der OA, für die in-vitro-Adhäsion von Chondrozyten verantwortlich sein können.

Zusätzlich zu den Zelladhäsions-Daten in vitro, waren schon in vivo mithilfe der oben beschriebenen elektronenmikroskopischen Immunogoldhistochemie erste Hinweise gefunden, die auf mögliche Nidogen-Chondrozyten-Interaktionen hinwiesen. Beide Nidogene waren direkt an der Zellmembran der Chondrozyten lokalisiert. Um diese möglichen Interaktionen weiter zu stützen, wurde eine pre-embedding-Methode mit Chondrozyten aus der OA in vitro durchgeführt.

Die elektronenmikroskopischen Ergebnisse zeigten, dass sowohl Chondrozyten des intakten Areals der OA, als auch Chondrozyten des OA-Defektes, nach Verdau der EZM, keine Zeichen der Apoptose, Nekrose oder größere perizelluläre Matrix Überreste aufwiesen. Des Weiteren war das Gold-gekoppelte Nidogen-1- und auch Nidogen-2-Protein sowohl an der Zellmembran, als auch an kleineren Matrixüberresten gebunden. Interessant war außerdem, dass die Chondrozyten nicht nur mit den Nidogenen via Zellmembran interagierten, sondern, dass sie die Nidogene sogar internalisierten. Für die Kontrollreaktionen mit purem kolloidalem Gold wurden keine Interaktionen mit Chondrozyten gefunden. Diese Ergebnisse weisen auf eine Rezeptor-vermittelte Interaktion bzw. Internalisation von Nidogenen hin und könnten einen möglichen intrazellulären katabolischen Weg für Nidogene darstellen, wie es auch schon für Hyaluronan vermutet wird (Hua et al. 1993). Es könnten auch Mechanismen zur Speicherung oder zum Abbau von überschüssigen Nidogenen eine Rolle spielen, wie z.B. für Glukagon bekannt ist (Watanabe et al. 1988).

Als nächstes sollten Rezeptoren der OA-Chondrozyten gezeigt werden, welche, mögliche Bindungspartner für Nidogene darstellen können. Integrine wie z.B.  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha3\beta1$  oder  $\alpha6\beta1$  sind als Nidogen-Rezeptoren beschrieben wurden (Salmivirta et al. 2002; Dong et al. 1995; Dedhar et al. 1992) und sie sind als Komponenten des Gelenkknorpels auch im Menschen nachgewiesen worden (Loeser 2002). Um die schon gewonnenen in-vitro-Daten zu untermauern, wurden als erstes die OA Chondrozyten in vitro mittels Fluorescence-activated cell sorting (FACS) und lichtmikroskopischer Immunfluoreszenz auf ihr Integrin-Muster hin untersucht. Da gerade die Chondrozyten des OA-Defektes besonders gut an Nidogenen banden, wurde insbesondere hier eine Veränderung des Integrin-Musters erwartet. Die FACS-Analyse ergab eine starke Reaktion der Integrin-Untereinheiten  $\beta1$  (~ 98%) und  $\alpha3$  an Chondrozyten vom OA-Defekt. Eine eher schwache Fluoreszenz wurde für  $\alpha\beta3$  nachgewiesen (~ 5%). Die  $\alpha3$  Integrin-Untereinheit zeigte eine hohe Standardabweichung bei

---

Chondrozyten des intakten Areals der OA, welches eine hohe interindividuelle Variation in der Expression dieser Untereinheit im intakten Areal der OA vermuten lässt, und eine stabilere  $\alpha 3$  Integrin-Untereinheit Expression im OA-Defekt darstellt. Auch mithilfe der lichtmikroskopischen Immunfluoreszenz waren starke Reaktionen für  $\beta 1$  und  $\alpha 3$  Integrin-Untereinheiten zu finden, wohingegen  $\alpha \nu \beta 3$  in Kultur nicht nachzuweisen war.

Eine wichtige Frage, die durch diese in-vitro-Daten noch nicht beantwortet wurde, war ob diese Integrin-Nidogen-Interaktionen auch in vivo zu finden sein könnten und damit auch eine tatsächliche Rolle in vivo spielen würden. Deshalb wurden Kolokalisationsversuche mit Nidogenen und Integrinen in vivo durchgeführt und die Ergebnisse via Elektronenmikroskopie analysiert.

Die  $\alpha 3$  Integrin-Untereinheit war zwar an den Chondrozyten nachweisbar, aber es konnte keine Kolokalisation mit beiden Nidogenen gezeigt werden. Dies könnte mit unterschiedlichen Bindungspartnern dieses Integrins in vivo zusammenhängen. Des Weiteren waren, sowohl  $\beta 1$ , als auch  $\alpha \nu$  an den Chondrozyten in vivo nachweisbar und sie waren beide mit Nidogen-1 kolokalisiert. Auf ultrastruktureller Ebene waren diese Kolokalisationen weniger als 20nm voneinander entfernt, wodurch molekulare Interaktionen sehr wahrscheinlich sind. Die Tatsache, dass  $\alpha \nu$  nur in vivo nachgewiesen werden konnte, könnte mit dem eingesetzten Kollagenase-Verdau zusammenhängen (Diaz-Romero et al. 2005). Da man weiß, dass Nidogen-1 in der Lage ist den Zellphänotyp einer Zelle in vitro zu verändern (Dong et al. 1995), würde die Möglichkeit bestehen, dass die RGD-Sequenz des Nidogen-1 mithilfe von  $\alpha \nu \beta 3$  einen elongierten Chondrozyten-Phänotyp vermittelt; während eine andere Nidogen-1-Bindungsstelle mit einem Integrin interagiert, welches eine  $\beta 1$  und eine noch unbekannte  $\alpha$ -Untereinheit besitzt, und dadurch einen runden Chondrozyten-Phänotyp bildet. Wenn das den Tatsachen entspräche, wäre es wiederum möglich, dass das Expressionsmuster von verschiedensten Komponenten der EZM des Gelenkknorpels durch Nidogen-1 beeinflusst werden kann, wie z.B. die von Kollagen Typ II oder Kollagen Typ I in der OA (Sandell und Aigner 2001; Tesche und Miosge 2005). Des Weiteren, ist bekannt das  $\alpha \nu \beta 3$  inflammatorische Mediatoren beeinflussen kann, in Abhängigkeit zum jeweiligen Liganden, was wiederum Effekte auf die Homöostase des Knorpels hätte (Attur et al. 2000).

Nidogen-2-Interaktionen mit den Integrin-Untereinheiten  $\beta 1$ ,  $\alpha \nu$  bzw.  $\alpha 3$  waren in vivo nicht zu finden. Deshalb wird Nidogen-2 wahrscheinlich mittels anderer Integrine oder aber auch Nicht-Integrin-Rezeptoren binden, und würde dadurch – im Vergleich zu Nidogen-1 – unterschiedliche Zell-Signale vermitteln. Weiterhin könnte die Umverteilung von viel perizellulärem Nidogen-1 bei gesunden Chondrozyten hin zu viel perizellulärem Nidogen-2

---

bei erkrankten bzw. elongierten Chondrozyten und speziell im Bereich der Chondrozyten-Kluster, Auswirkungen auf das Zellverhalten im Hinblick auf die Regenerationsfähigkeit haben. Dies könnte somit einen Schlüsselmechanismus in der Pathogenese der Osteoarthritis darstellen.

### **3.4 Fazit**

Nidogen-1 und Nidogen-2 wurden hier als neue EZM-Moleküle des humanen Gelenkknorpels nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass die Menge an Nidogenen um die elongierten Chondrozyten der späten Stadien der OA am stärksten erhöht war, was auf deren Regenerationsaktivität hinweist. Zum Abschluss wurden adhäsive Eigenschaften spezifisch für Chondrozyten aus den späten Stadien der OA gezeigt, und Chondrozyten-Nidogen-Interaktionen genauer beleuchtet, infolgedessen nun vermutet werden kann, dass beide Proteine den Chondrozyten dabei helfen, die Knorpelintegrität in den späten Stadien der OA wiederherzustellen. Deshalb scheint es möglich, dass Nidogen-1 und Nidogen-2 Schlüsselrollen in der Pathogenese der OA spielen.

---

## 4. Literaturverzeichnis

Die hier aufgelisteten Literaturangaben sind zusätzlich in der Einleitung zu findende Literaturzitate. Sie sind nicht in der anhängenden Publikation gelistet.

**Erickson AC**, Couchman JR (2000): Still more complexity in mammalian basement membranes. *J Histochem Cytochem* 48:1291-1306

**Hynes RO** (2009): The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326: 1216-1219

**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 \* = both authors contributed equally

**McMillan JR**, Akiyama M, Shimizu H (2003): Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions. *J Dermatol Sci* 31: 169-177

**Ross RS** (2004): Molecular and mechanical synergy: cross-talk between integrins and growth factor receptors. *Cardiovasc Res* 63: 381-390

**Smyth N**, Vatansever HS, Murray P, Meyer M, Frie C, Paulsson M, Edgar D (1999): Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *J Cell Biol* 144: 151-160

**Timpl R**, Brown JC (1996): Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays* 18: 123-132

---

## 5. Publikation

In diesem Abschnitt befindet sich in den gebundenen Exemplaren der Dissertation die folgende Publikation:

Jenny Kruegel, Boguslaw Sadowski and Nicolai Miosge

Nidogen-1 and nidogen-2 in healthy human cartilage and in late-stage osteoarthritis cartilage.

Arthritis and Rheumatism. 2008 Apr 25;58(5):1422-1432.

DOI: 10.1002/art.23480



---

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Nicolai Miosge für seine stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit. Auch danke ich ihm, dass ich während der Zeit in seinem Labor die Freude und das Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten entdeckt habe.

Ein ganz herzlicher Dank gilt auch Frau Boguslawka Sadowski für die Durchführung der FACS-Analyse.

Dr. Takako Sasaki (Portland, USA) danke ich für die freundliche Bereitstellung der Nidogen-Antikörper und der Proteine.

Meinen Mitdoktoranden und Frau Sadowski danke ich für das prima Arbeitsklima und die wirklich immer gute Zusammenarbeit.

---

## Lebenslauf

Am 21. April 1983 wurde ich als zweite Tochter von Renate Krügel, geborene Steinig, und Helmut Krügel in Wolmirstedt geboren. Meine Mutter ist Landwirtin und mein Vater Elektriker. Von 1989 bis 1993 besuchte ich die Grundschule in Wolmirstedt. Danach wechselte ich auf das Kurfürst-Joachim-Friedrich Gymnasium in Wolmirstedt, an dem ich im Jahre 2002 mein Abitur ablegte.

Nach einem halben Jahr in Ottawa (Kanada), in dem ich ein medizinisches Praktikum durchführte, begann ich zum Sommersemester 2003 das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Im März 2005 legte ich dort das Physikum (Ärztliche Vorprüfung) ab. Nach dem Physikum begann ich mit dem experimentellen Arbeiten zu meiner Doktorarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. Nicolai Miosge in der damaligen Abteilung Histologie, Zentrum Anatomie. Im Rahmen meiner Doktorarbeit erhielt ich von April bis Oktober 2007 ein Vollzeit-Forschungsstipendium der Georg-August-Universität in Göttingen. Die Arbeiten beendete ich im Oktober 2007 in der Abteilung Prothetik, Zentrum ZMK. Aus Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten bin ich weiterhin im Labor von Prof. Dr. Miosge tätig, und bin u.a. seit April 2008 für den elektronenmikroskopischen Forschungsbereich – in der Kooperation zwischen den Forschungsabteilungen Prothetik (Prof. Dr. med. N. Miosge) und Nephrologie (PD Dr. med. O. Gross) – zuständig.

Seit Sommer 2007 arbeite ich zusätzlich als studentische Hilfskraft in der Botulinumtoxin-Sprechstunde der Abteilung HNO, unter der Leitung von Prof. Dr. R. Laskawi, zur Unterstützung des Personals bei der Durchführung der Sprechstunde.

Das Staatsexamen der Humanmedizin werde ich voraussichtlich im Wintersemester 2010/2011 ablegen.