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

Die Rolle des TGF-ß-Rezeptors Typ I bei der Überexpression von Smurf1 und Smurf2 in chondrogenen Progenitorzellen

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Agnes Theresa Blume

aus

Hildesheim

Göttingen 2017

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. R. Mausberg
Datum der mündlichen Prüfung:	23.10.2017

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Osteoarthrose 1

1.1.1 Epidemiologie und begünstigende Risikofaktoren 1

1.1.2 Kennzeichen, Symptome und deren Behandlungsmöglichkeiten 2

1.2 Der Gelenkknorpel 3

1.2.1 Zusammensetzung 3

1.2.2 Chondrogenese 6

1.3 Chondrogene Progenitorzellen 7

1.4 Der TGF-β- bzw. BMP-Signalweg 9

1.4.1 Funktion und Ablauf 9

1.4.2 Regulation des Signalwegs bzw. die Rolle von Smurf 11

1.5 Die E3-Ubiquitin-Protein-Ligase Smurf 12

1.5.1 Definition und Struktur 12

1.5.2 Funktion: Proteinabbau durch Ubiquitinierung 12

1.5.3 Rolle im TGF-ß- bzw. BMP-Signalweg 14

1.6 Der Rezeptor 15

1.6.1 Aufbau und Funktion 15

1.6.2 Rezeptor-Degradation 17

1.7 Die Rolle des TGF-ß-Signalwegs bei der Entwicklung von Osteoarthrose 18

1.8 Aufgabenstellung 20

2 Material und Methoden 21

2.1 Probengewinnung und Isolierung von chondrogenen Progenitorzellen 21

2.2 Kultivieren und Passagieren von CPCs 22

2.3 Überexpression von Smurf1 und Smurf2 23

2.3.1 Allgemeines 23

2.3.2 Klonieren der Expressionsvektoren 24

2.3.3 Aufreinigung der Plasmid-DNA 25

2.3.4 Transfektion von CPCs mit den Expressionsvektoren 26

2.4 Real-Time PCR 27

2.4.1 Allgemeines 27

2.4.2 mRNA-Isolation 28

2.4.3 Umschreibung der mRNA in cDNA 30

2.4.4 Protokoll der RT-PCR 31

2.4.5 Verwendete Primer 33

2.4.6 Statistik/Pfaffl 34

2.5 Western Blot 35

2.5.1 Allgemeines 35

2.5.2 Vorbereitung der Proteinproben 36

2.5.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 37

2.5.4 Immunoblot 40

2.5.5 Detektion der Proteine 41

2.5.6 Immunmarkierung 42

2.5.7 Verwendete Antikörper 44

2.6 Immunzytochemie 46

2.6.1 Allgemeines 46

2.6.2 Protokoll-lichtmikroskopische Immunfluoreszenz 46

2.6.3 Verwendete Antikörper 48

3 Ergebnisse 49

3.1 Immunzytochemie: Nachweis auf zellulärer Ebene 49

3.1.1 Der TGF-ß-Typ I-Rezeptor 49

3.1.2 Negativ-Kontrolle 51

3.2 RT-PCR: Nachweis auf Gen-Ebene 52

3.3 Western Blot: Nachweis auf Protein-Ebene 53

3.3.1 Nachweis der Überexpression von Smurf1 53

3.3.2 Nachweis des TGF-ß-Rezeptors in mit Smurf1 überexprimierten CPCs 54

3.3.3 Nachweis der Überexpression von Smurf2 56

3.3.4 Nachweis des TGF-ß-Rezeptors in mit Smurf2 überexprimierten CPCs 57

3.3.5 Densitometrische Analyse 59

4 Diskussion 60

4.1 Die Rolle der chondrogenen Progenitorzellen 60

4.2 Die Rolle von Smurf und des Rezeptors bei Osteoarthrose 61

4.3 Diskussion der Ergebnisse der Immunzytochemie 62

4.4 Diskussion der Smurf-Überexpression 63

4.5 Der Einfluss von Smurf auf den TGF-ß-Typ I-Rezeptor auf Gen- und Protein-Ebene 64

5 Zusammenfassung 69

6 Anhang 70

6.1 Abkürzungsverzeichnis 70

6.2 Abbildungsverzeichnis 73

6.3 Tabellenverzeichnis 74

7 Literaturverzeichnis 75

1 Einleitung

1.1 Osteoarthrose

1.1.1 Epidemiologie und begünstigende Risikofaktoren

Unter Osteoarthrose versteht man eine degenerative Erkrankung des Gelenks, welche am häufigsten Hand, Knie, Hüfte und Wirbelsäule betrifft (Goldring und Goldring 2007). Diese Erkrankung tritt hauptsächlich in der älteren Generation auf und wird als die häufigste aller muskuloskelettalen Erkrankungen bezeichnet (Reginster 2002). Der Gelenkknorpel, der dabei hauptsächlich betroffen ist, hat unter physiologischen Bedingungen die Funktion, die Gelenkenden zu bedecken und somit für eine glatte Gelenkoberfläche zu sorgen. Bei einem gesunden Gelenk ermöglicht dies ein Übereinandergleiten der Knochen und dadurch eine Absorption aller Kräfte, die auf das Gelenk einwirken.

In einem an Osteoarthrose erkranktem Gelenk ist das Knorpelgewebe verändert und in fortgeschrittenem Stadium kann das Gewebe vollständig verloren gehen. Reiben nun die Knochen eines Gelenks bei Bewegung aufeinander, kann dies für den Betroffenen sehr schmerzhaft sein. Das Gelenk schwillt an und die Bewegung wird zunehmend eingeschränkt (NIAMS November 2014, http://www.niams.nih.gov).

Es existieren zahlreiche Risikofaktoren für die Entstehung einer Osteoarthrose. Dazu zählen das Alter, systemische Risikofaktoren wie Fehlernährung (z. B. Vitamin C-Mangel), Östrogenmangel bei Frauen nach der Menopause oder genetisch-bedingte Ursachen. Auch lokale Risikofaktoren wie Übergewicht, Fehlbelastungen des Gelenks, Gelenkverletzungen durch Unfälle oder übermäßiger, die Gelenke stark belastender Sport können die Entstehung einer Osteoarthrose begünstigen (Felson et al. 2000).

Ungefähr fünf Millionen Menschen leiden in Deutschland unter den Beschwerden, die durch solch eine Erkrankung verursacht werden (Deutsche Arthrose-Hilfe e.V. 2015, http://www.arthrose.de). Für die Zukunft wird ein signifikanter Anstieg muskuloskelettaler Erkrankungen wie der Osteoarthrose in der Gesellschaft erwartet. Hierbei spielen Aspekte wie das zunehmende Älterwerden der Menschen eine Rolle.

Darüber hinaus führen die sich verändernden Lebensumstände (Urbanisierung, Motorisierung) zu einem Mangel an körperlicher Bewegung. Gleichzeitig steigt der Anteil der unter Adipositas leidenden Menschen. Dies sind einige der Faktoren, die eine Zunahme der Erkrankung Osteoarthrose in Zukunft bewirken könnten (Woolf und Pfleger 2003).

1.1.2 Kennzeichen, Symptome und deren Behandlungsmöglichkeiten

Primär ist ein an Osteoarthrose erkranktes Gelenk charakterisiert durch einen voranschreitenden Verlust seines hyalinen Gelenkknorpels, durch eine Entzündung im Gelenk mit Synovitis und durch subchondrale sklerotische Veränderungen des Knochens mit Osteophytenbildung an den Rändern des Gelenks. Diese Kennzeichen führen zu chronischen Gelenkschmerzen, Gelenksteifigkeit und schlussendlich zu Bewegungsbeeinträchtigungen (Felson 2006). Problematisch ist jedoch, dass bisher keine ausreichenden klinischen Diagnostikmöglichkeiten für frühe Stadien dieser Erkrankung existieren (Anderson et al. 2011, Bijlsma et al. 2011). Betroffenen Patienten kann u. a. durch Gewichtsreduktion, sportliche Aktivitäten, wie z. B. Physiotherapie, oder auch medikamentöse Therapien zu einer Linderung der Schmerzen verholfen werden. Wenn diese konservativen Therapien jedoch keine Wirkung mehr zeigen, helfen erkrankten Patienten allein operative Maßnahmen, wie z. B. in Form einer totalen Endoprothese (TEP) des Kniegelenks (Van Manen et al. 2012).

1.2 Der Gelenkknorpel

1.2.1 Zusammensetzung

Um die Entstehung von Osteoarthrose besser verstehen zu können, ist es wichtig, die Zusammensetzung des Gelenkknorpels zu kennen. Der Gelenkknorpel besteht aus einer wasserhaltigen extrazellulären Matrix (EZM), in welche die gewebsspezifischen Zellen, die Chondrozyten, eingebettet sind. Chondrozyten machen bei einem Erwachsenen weniger als 5% des Knorpelgewebes aus. Ihnen fehlt der Zell-Zell-Kontakt, weshalb die Kommunikation zwischen diesen Zellen über die EZM stattfinden muss. Der Gelenkknorpel ist einzigartig in seiner Zusammensetzung, da er weder Blutgefäße noch Nervenfasern oder lymphatische Gefäße und zudem keine separierende Basalmembranen besitzt. Der Erhalt von Nährstoffen sowie die Elimination von Abfallstoffen findet allein per Diffusion durch die EZM statt (Kuettner 1992). Die extrazelluläre Matrix besteht hauptsächlich aus Wasser (70%), Kollagen und Proteoglykanen, v.a. Aggrecan, sowie zu geringeren Anteilen aus nichtkollagenen Proteinen und Glykoproteinen (Buckwalter und Mankin 1998). Diese Bestandteile sind wichtig, um die mechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels aufrechtzuerhalten, indem sie dazu beitragen, das Wasser innerhalb der EZM zu speichern (Fox et al. 2009).

Mehr als die Hälfte des Trockengewichts im Gelenkknorpel besteht aus Kollagenen. Davon sind 90% im adulten Knorpel Kollagen Typ II. Der Rest – und somit 10% des Anteils an Kollagen im Gelenkknorpel – setzt sich aus Kollagen Typ IX, X, XI und in geringen Mengen aus Typ VI zusammen (Kuettner 1992). Diese Kollagene bilden ein Netzwerk, welches dem Knorpelgewebe Zugfestigkeit verleiht. Darüber hinaus ermöglichen sie dem Gewebe, dem Druck der in das Faserwerk eingebetteten Proteoglykane standzuhalten (Knudson und Knudson 2001).

Der Gelenkknorpel ist histologisch gesehen in 4 horizontale Zonen unterteilt: eine oberflächliche (superfiziale) Zone, eine mittlere Zone, eine tiefe und eine kalzifizierte Zone (s. Abbildung 1a, 1b). Die oberflächliche Zone besteht aus flachen, scheibenförmigen Chondrozyten, einer dichten Schicht aus Kollagenfibrillen sowie einem geringen Gehalt an Proteoglykan. Die Chondrozyten der mittleren Zone weisen eine eher rundere Form auf. Die Kollagenfibrillen kreuzen untereinander, um einen Übergang zwischen der superfizialen und der tiefen Zone zu erzeugen. Der Gehalt an

Proteoglykan ist zudem erhöht. Die tiefe Zone ist charakterisiert durch runde, in Säulen angeordnete Chondrozyten, ein radiäres Netzwerk aus Kollagenfibrillen sowie einen hohen Gehalt an Proteoglykan (Poole 1997). Diese Zone bietet daher den größten Widerstand gegenüber komprimierenden Kräften (Fox et al. 2009). Die kalzifizierte Zone enthält kein Proteoglykan und besteht aus runden Chondrozyten in nicht-kalzifizierten Lakunen und in der kalzifizierten Matrix verankerten radiären Kollagenfibrillen. Die Verbindung zwischen der tiefen Zone und der kalzifizierten Zone wird als *Tidemark* bezeichnet und erscheint im histologischen Bild als gewellte Linie (Poole 1997). Es kann zusammengefasst werden, dass von der superfizialen zur tiefen Zone hin das Volumen der Zellen und der Gehalt an Proteoglykan relativ zum Kollagen zunehmen (Goldring und Marcu 2009).

Zusätzlich kann die EZM aufgrund ihrer Nähe zu den Chondrozyten, ihrer Zusammensetzung, der Organisation und dem Durchmesser der Kollagen-Fibrillen in verschiedene Regionen eingeteilt werden (s. Abbildung 1c). Direkt angrenzend bzw. die Chondrozyten umgebend befindet sich die perizelluläre Matrix. Diese dünne Schicht beinhaltet hauptsächlich Proteoglykane, aber auch Glykoproteine und andere nichtkollagene Proteine. Die dickere territoriale Matrix, welche die perizelluläre Matrix umschließt, besteht hauptsächlich aus feinen Kollagen-Fibrillen, die ein feines korbähnliches Netzwerk um die Chondrozyten spannen. Die größte der drei Regionen stellt die interterritoriale Matrix dar, die sich durch unterschiedlich orientierte Bündel von großen Kollagen-Fibrillen und reichlich Proteoglykan auszeichnet (Kuettner 1992). Die Zusammensetzung des Knorpels bestimmt dessen biomechanische Eigenschaften. Hier sind besonders die sehr hydrophilen Proteoglykane hervorzuheben, die im Kollagennetzwerk komprimiert in einer unhydrierten Form vorliegen. Sie ermöglichen dem Knorpelgewebe eine reversible Verformung (Kuettner 1992). Die Chondrozyten sind an der Entstehung, der Aufrechterhaltung sowie der Reparatur der EZM beteiligt. Jeder einzelne Chondrozyt ist für den Umsatz der in seiner Nähe befindlichen EZM verantwortlich und errichtet dadurch ein spezifisches Mikroumfeld. Das Proliferationspotenzial der Chondrozyten ist jedoch begrenzt, was alles in allem zur Folge hat, dass z. B. nach einer Verletzung nur eine geringe intrinsische Heilungskapazität des Knorpels besteht. Für das Überleben der Chondrozyten und den Erhalt des Gelenkknorpels ist es daher wichtig, ein mechanisch und chemisch optimales Umfeld aufrechtzuerhalten (Fox et al. 2009).

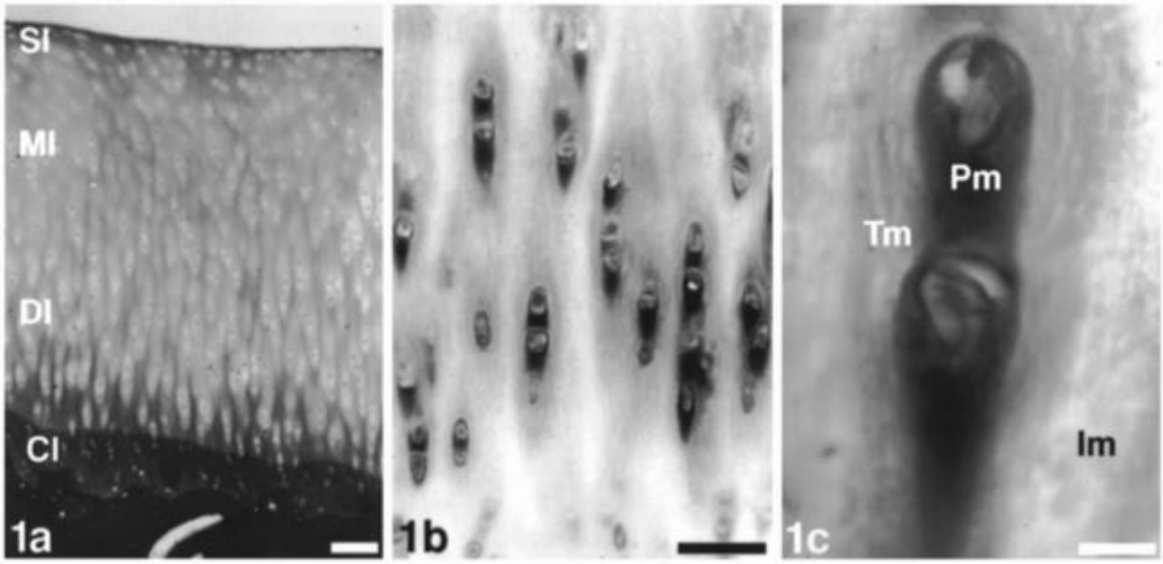

Abbildung 1: Histologie des Gelenkknorpels

1a) 100µm Histologische Zonen: superfiziale (S1), mittlere (M1), tiefe (D1) und kalzifizierte (C1) Zone.
1b) 50µm Illustration der strahlenförmigen Orientierung und Matrixorganisation in den tiefen Schichten.
1c) 10µm Detailaufnahme. Zeigt Differenzierung in perizelluläre (Pm), territoriale (Tm) und interterritoriale (Im) Matrix. Entnommen aus Poole (1997), mit freundlicher Genehmigung des Verlags John Wiley and Sons.

1.2.2 Chondrogenese

Die Bildung von Knorpelgewebe (Chondrogenese) während der Embryonalentwicklung folgt einem streng regulierten Prozess. Nicht-differenzierte mesenchymale Vorläuferzellen kondensieren und durchlaufen eine chondrogene Differenzierung. Die Phase bis zur vollständigen Differenzierung zu Chondrozyten ist charakterisiert durch eine hohe Zellproliferation und durch die Ablagerung knorpel-spezifischer Moleküle, wie z. B. Aggrecan und Kollagen Typ II (van der Kraan et al. 2009). Die Chondrogenese ist ein wichtiger Bestandteil der enchondralen Ossifikation. Das Knorpelgewebe stellt ein Zwischenprodukt für die anschließende Bildung des Skelettsystems dar (Goldring et al. 2006). Die Chondrozyten proliferieren zunächst und werden hypertroph. Dieser Prozess wird als terminale chondrozytäre Differenzierung bezeichnet. Die hypertrophen Chondrozyten gehen dann durch programmierten Zelltod (Apoptose) zugrunde und das hypertrophe Knorpelgewebe wird durch Knochen ersetzt (Goldring 2012). Dies geschieht durch einwandernde Osteoblasten und Osteoklasten. Gleichzeitig wandern von außen Blutgefäße ein, welche die spätere Knochenmarkshöhle bilden (Zuscik et al. 2008). Nach Abschluss des Knochenwachstums bzw. nach Verschluss der Wachstumsfuge (Epiphyse) verbleibt eine dünne Schicht Knorpel an den Enden der Knochen. Diese Knorpelschicht bildet die Gelenkoberfläche (Hollander et al. 2010).

Zentrale Regulatoren sowohl der Chondrogenese als auch der terminalen Differenzierung stellen die Mitglieder der transformierenden Wachstumsfaktor-beta-Superfamilie (*Transforming Growth Factor-beta*, TGF-ß) dar, auf welche ab dem Abschnitt 1.4. näher eingegangen wird (van der Kraan et al. 2009).

1.3 Chondrogene Progenitorzellen

Von der Existenz einer Zelllinie namens chondrogene Progenitorzellen in späten Stadien der Osteoarthrose wurde erstmals von Koelling at al. (Koelling et al. 2009) in osteoarthtritisch verändertem Knorpel berichtet. An Osteoarthrose erkrankter Gelenkknorpel weist im Vergleich zu gesundem Knorpel auf histologischer Ebene an seiner Oberfläche Fissuren auf. Darüber hinaus ordnen sich Zellen zu Clustern an und es kommt zu Brüchen in der *Tidemark*, in welche Blutgefäße einwandern können. Unter dem Elektronenmikroskop konnten an den Brüchen der *Tidemark* längliche Zellen mit einem weiten endoplasmatischen Retikulum festgestellt werden, welche in das Knorpelgewebe zu migrieren scheinen (s. Abbildung 2) (Koelling et al. 2009). Für diese Zellen konnten einzigartige Charakteristika festgestellt werden. CPCs sind multipotent und weisen ein hohes Differenzierungspotenzial auf. Sie lassen sich, abhängig vom äußeren Umfeld, zu Chondrozyten, zu Adipozyten oder auch zu Osteoblasten differenzieren. Dies ist charakteristisch für Stammzellen, von denen sie sich aber eindeutig unterscheiden. CPCs sind zwar positiv für Stammzellmarker wie CD13, CD29, CD44, CD73, CD90 und CD105 sowie für STRO-1. Gleichzeitig weisen sie aber nicht die stammzelltypischen Marker CD18, CD31 und CD34 oder CD117 und CD271 auf. Ihr migratorisches Potenzial und auch ihre Zellteilungsrate sind sehr hoch. Von allen o. g. Differenzierungsmöglichkeiten scheint jedoch das chondrogene Potenzial besonders hoch zu sein. In einem Experiment, bei dem die CPCs in eine 3D-Kultur transferiert wurden, konnte bereits nach drei Wochen eine Veränderung der Zellen beobachtet werden. Sie wiesen einen Chondrozyten-ähnlichen Phänotyp auf, gemeinsam mit hohen Leveln an mRNA und an Protein für Kollagen II. Der Zusatz chondrogener Mediatoren wie TGFß3 oder BMP-6 zeigte sogar noch eine Steigerung an Kollagen II sowie eine Steigerung des Ausmaßes der Faser-Bildung. Dies ist mit ein Grund für die Hoffnung, die in erkranktem Gewebe vorhandenen CPCs für die Entwicklung von OA-relevanten-regenerativen Therapien verwenden zu können (Koelling et al. 2009).

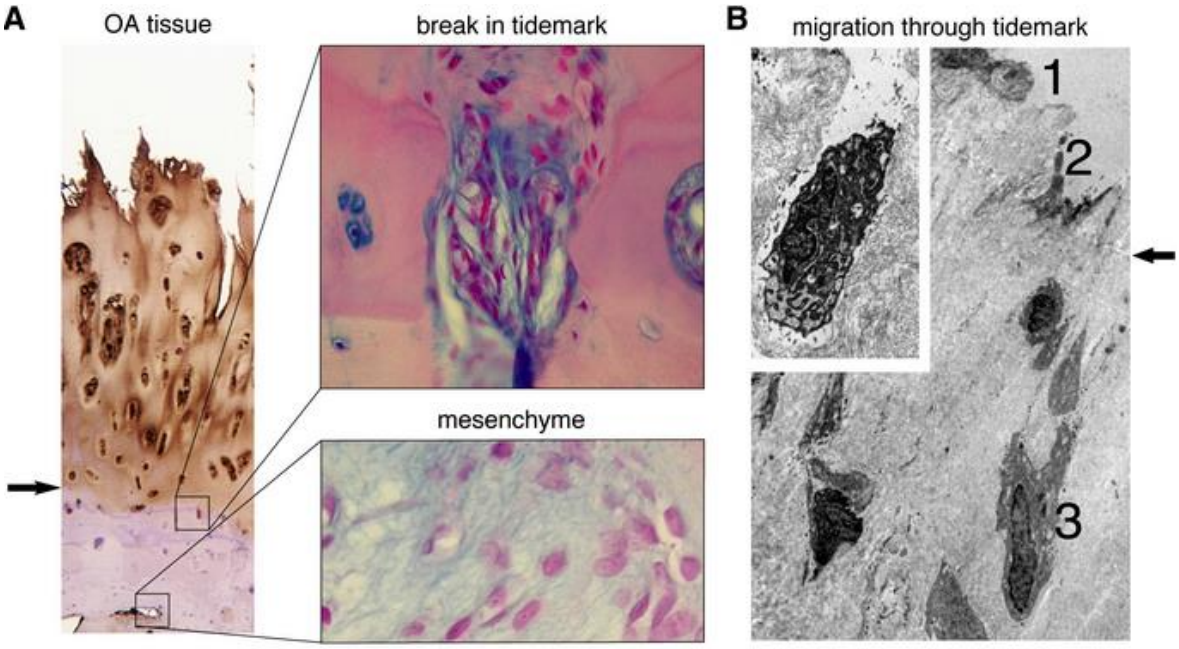

Abbildung 2: OA-Gelenkknorpel im histologischen Schnitt (A) sowie im Elektronenmikroskop (B)

A) Fissuren an der Oberfläche und Bildung von Zell-Clustern in Gewebe von späten Stadien der OA. *Tidemark* (s. Pfeil) mit Brüchen, welche mit Blutgefäßen gefüllt sind.
B) Migration der Zellen von der *Tidemark* (s. Pfeil) in den Knorpel. Weites ER einer Zelle an der Migrationsfront sichtbar. Mit freundlicher Genehmigung entnommen aus Koelling et al. (2009).

1.4 Der TGF-β- bzw. BMP-Signalweg

1.4.1 Funktion und Ablauf

In Säugetieren existieren insgesamt über 30 verschiedene Mitglieder der TGF-ß-Superfamilie. Dazu gehören u. a. die knochenmorphogenetischen Proteine (*Bone Morphogenetic Proteins*, BMPs) und Activine sowie verschiedene Isoformen des TGF-ß selbst (Miyazono et al. 2001). Das erste Mitglied, TGF-ß1, das erstmals von Assoian et al. beschrieben wurde, gab dieser Familie seinen Namen (Assoian et al. 1983). Durch die Mitglieder der TGF-ß-Superfamilie werden eine Vielzahl verschiedener zellulärer Prozesse kontrolliert, u. a. das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und Zellproliferation, die Zellmigration in verschiedene Gewebe sowie die Apoptose. Darüber hinaus haben sie z. B. auch eine wichtige Rolle während der embryonalen Entwicklung (Shen et al. 2014).

Zu Beginn der Signaltransduktion im TGF-ß- bzw. BMP-Signalweg (s. Abbildung 3) bindet ein Ligand der TGF-β-Superfamilie an je zwei Typ I- und Typ II-Serin-/Threonin-Kinase-Rezeptoren und bringt diese somit zusammen. Der bereits aktivierte Typ II-Rezeptor kann nun die Kinase-Domäne des Typ I-Rezeptors phosphorylieren. Dieser Typ I-Rezeptor kann wiederum SMAD-Proteine durch Phosphorylierung aktivieren und das Signal dadurch weiterleiten. Die Mitglieder der SMAD-Familie wurden zuallererst in Fliegen und Würmern durch Genanalysen identifiziert (Shi und Massagué 2003, Attisano und Wrana 2002). Die Namensgebung dieser Familie führt auf die zuerst identifizierten Mitglieder, die Gene Sma (*small body size*) im Fadenwurm und MAD (*mothers against decapentaplegic*) in der Taufliege, zurück (Sekelsky et al. 1995, Savage et al. 1996).

Es existieren drei verschiedene funktionelle Gruppen an SMAD-Proteinen: Rezeptor-regulierte Smads (R-Smads 1,2,3,5 und 8), *common-mediator*-Smads (Co-Smad4) und inhibitorische Smads (I-Smads 6 und 7). R-Smads bilden heteromere Komplexe mit dem Co-Smad4, nachdem sie durch den Typ I-Rezeptor durch Phosphorylierung aktiviert wurden. Dieser aktivierte Smad-Komplex wird dann in den Kern transportiert und bindet dort an bestimmte DNA-bindende Proteine und an transkriptionelle Kofaktoren oder Korepressoren. Durch diese Bindung kann dann die Transkription spezifischer Zielgene reguliert werden (Attisano und Wrana 2002, Shi und Massagué 2003, Schmierer und Hill 2007).

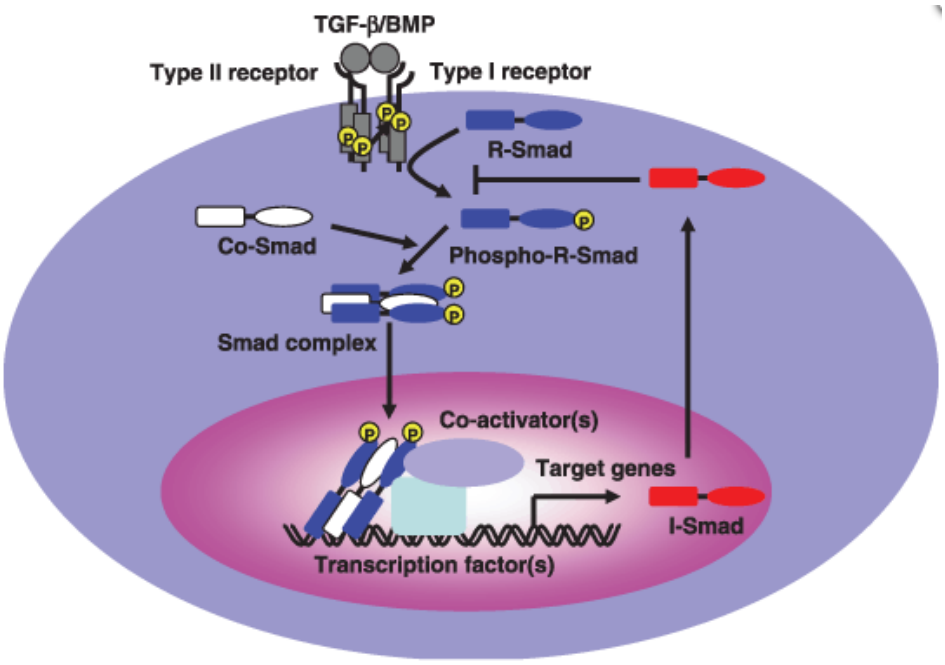

Abbildung 3: TGF-ß-Signalweg

Typ II und Typ I-Rezeptoren assoziieren miteinander zu einem heterodimeren Komplex durch die Bindung des Liganden aus der TGF-ß-Superfamilie. Der Typ I-Rezeptor wird durch die Typ II-Rezeptor-Kinase phosphoryliert und dessen Serin-/Threonin-Kinase-Aktivität dadurch aktiviert. Der Typ I-Rezeptor aktiviert durch Phosphorylierung R-Smads. Anschließend formen aktivierte R-Smads Komplexe mit dem Co-Smad, die dann in den Zellkern translozieren. Im Kern binden diese Komplexe andere Transkriptionsfaktoren sowie auch Korepressoren und Koaktivatoren. Entnommen aus Inoue und Imamura (2008), mit freundlicher Genehmigung des Verlags John Wiley and Sons.

Die N-terminale MH1-Domäne und die C-terminale MH2-Domäne, zwei konservierte globuläre Domänen, sind Bestandteile der Mitglieder der Smad-Familie. Sie werden durch eine Linker-Region getrennt. Die MH1-Domäne ist innerhalb der R-Smads und des Co-Smads 4 hoch konserviert, wohingegen im Vergleich dazu der N-terminale Bereich der I-Smads nur eine schwache Sequenzähnlichkeit zu den MH1-Domänen der R-Smads und des Co-Smads aufweist. Die MH1-Domäne reguliert den Kerntransport, sie ist für die Bindung an die DNA verantwortlich und bestimmt darüber die Transkription bestimmter Zielproteine. Die MH2-Domäne ist innerhalb der

Gesamtheit aller Smads hoch konserviert. Sie reguliert die Oligomerisierung von Smads und interagiert mit zytoplasmatischen Adapterproteinen oder Transkriptionsfaktoren sowie mit dem Typ-I-Rezeptor. R-Smads besitzen innerhalb ihrer C-terminalen Domäne ein SSXS-Motiv. Es handelt sich dabei um Serin-Reste, welche durch den TGF-ß-Typ-I-Rezeptor phosphoryliert werden und dadurch eine Aktivierung der Smads bewirken (Abdollah et al. 1997, Moustakas et al. 2001).

1.4.2 Regulation des Signalwegs bzw. die Rolle von Smurf

Das Ergebnis der Signalübertragung des TGF-ß-Signalwegs, d. h. die Zukunft einer Zelle, hängt von der Dauer und von der Intensität des Einwirkens der Liganden der TGF-ß-Familie ab. Um eine enge Regulation des Signalwegs zu erreichen, müssen daher die Smads negativ reguliert werden. In diesem Zusammenhang spielen die inhibitorischen Smads (I-Smad6 und I-Smad7) eine Rolle. Diese konkurrieren zum einen mit den R-Smads um die Bindungsstelle an aktivierten Typ I-Rezeptoren, wodurch eine Phosphorylierung der R-Smads gehemmt wird. Zum anderen interagieren sie mit dem Co-Smad4, wodurch die Komplexbildung mit R-Smads verhindert wird (Itoh und Dijke 2007). Darüber hinaus gibt es auch noch transkriptionelle Smad-Korepressoren, wie z. B. c-Ski und SnoN, welche verhindern, dass die Smads ihre TGF-ß-Zielgene aktivieren (Luo 2004). Zusätzlich spielt im Rahmen der Regulation und der Kontrolle der verschiedenen o. g. Funktionen der TGF-ß-Superfamilie das Ubiquitin-System eine wichtige Rolle. Smurf (***S****mad* ***u****biquitination* ***r****egulatory* ***f****actor*), eine E3-Ubiquitin-Ligase aus der HECT-Familie, markiert sowohl die Smad-Proteine als auch den Rezeptor für den proteasomalen Abbau, indem es diese Proteine ubiquitiniert (Zhu et al. 1999, Lin et al. 2000, Itoh und Dijke 2007).

1.5 Die E3-Ubiquitin-Protein-Ligase Smurf

1.5.1 Definition und Struktur

Es wurden bisher zwei verschiedene Sorten dieses Enzyms entdeckt: Smurf1 (Zhu et al. 1999) und Smurf2 (Lin et al. 2000). R-Smads, wie z. B. Smad2 oder Smad5, werden durch dieses Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut. Auch der Rezeptor unterliegt dem Abbau durch das o. g. System (Ebisawa et al. 2001). Smurf1 weist eine spezfische Struktur auf. Es besteht aus einer N-terminal gelegenen Phosholipid-/Calcium-bindenden C2-Domäne, zwei WW-Domänen und einer C-terminalen HECT-Domäne (Homologous to E6-AP C-Terminus) (Zhu et al. 1999). Der strukturelle Aufbau von Smurf2 entspricht zu 83 % dem von Smurf1. Jedoch besitzt es im Vergleich zu Smurf1 eine WW-Domäne mehr (Lin et al. 2000).

1.5.2 Funktion: Proteinabbau durch Ubiquitinierung

Das Ubiquitin-System sorgt für den selektiven Abbau vieler kurzlebiger Proteine in eukaryontischen Zellen. Proteine werden hierbei für den Abbau anvisiert, indem sie mit dem kleinen, hoch konservierten Protein Ubiquitin kovalent verknüpft werden. Das Ubiquitin-System spielt daher eine wichtige Rolle bei der Kontrolle einer Vielzahl von zellulären Prozessen (Hershko 1996). Für die Verknüpfung eines Proteins mit Ubiquitin werden drei verschiedene Enzyme benötigt, die nacheinander in Aktion treten (s. Abbildung 4).

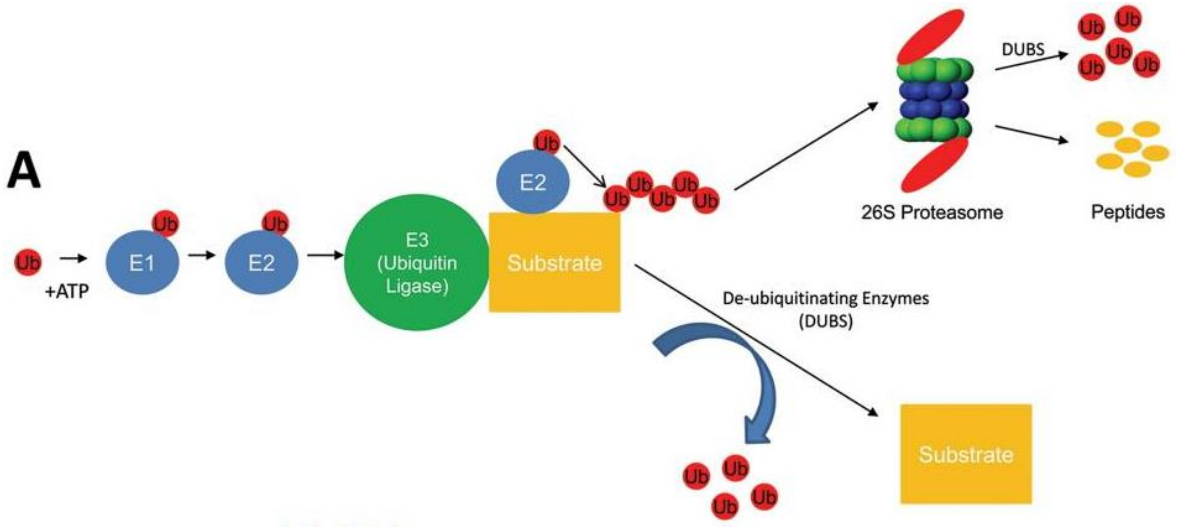

Abbildung 4: Das Ubiquitin-Proteasom-System

A) Das Ubiquitin-Proteasom-System reguliert die Signalwege der Zelle. Mit freundlicher Genehmigung entnommen aus Willis et al. (2010).

Zunächst wird Ubiquitin durch das spezifisch aktivierende Enzym E1 aktiviert, indem beide miteinander verbunden werden. Bei diesem Schritt wird AMP und Pyrophosphat frei, da Energie in Form von ATP benötigt wird. Anschließend wird das nun aktivierte Ubiquitin auf das weiter benötigte Enzym E2 übertragen. Im letzten Schritt wird das Ubiquitin an das Zielprotein gebunden. Dieser Vorgang wird durch eine Ubiquitin-Protein-Ligase bzw. das E3-Enzym katalysiert (Hershko und Ciechanover 1998). Es existiert für ein Protein zumeist ein einzelnes E1-Enzym, viele verschiedene E2-Enzyme und darüber hinaus eine große Familie an E3-Enzymen sowie Komplexe aus mehreren E3-Enzymen. Den E3-Ligasen scheint dabei eine besondere Rolle zuzukommen, da sie durch die selektive Ubiquitin-Verknüpfung die Hauptrolle bei der Auswahl eines Zielproteins spielen und somit maßgeblich daran Anteil haben, welches Protein abgebaut wird. Zusätzlich kann die Bindung des E3-Enzyms an das Zielprotein auch indirekt durch ein Adapter-Protein vermittelt sein. An das mit dem Zielprotein verknüpfte Ubiquitin können weitere Ubiquitin-Proteine gebunden werden; dieser Prozess wird auch Polyubiquitinierung genannt. Das mit Polyubiquitinketten verknüpfte Zielprotein wird dann zumeist dem Proteasom zum Abbau zugeführt (Hershko und Ciechanover 1998).

1.5.3 Rolle im TGF-ß- bzw. BMP-Signalweg

Die Substratspezifität der verschiedenen Smurf-Proteine scheint durch die WW-Domänen bestimmt zu werden, was zur Folge hat, dass Smurf1 die BMP-Smads (1,5,8) für den Proteinabbau anvisiert (Zhu et al. 1999). Smurf2 hingegen kann mit Smad1, wenngleich in einem schwächeren Maße als Smurf1, aber auch mit Smad2 interagieren und dessen Abbau induzieren (Lin et al. 2000, Zhang et al. 2001).

Wie bereits in Abschnitt 1.5.1 erwähnt, existieren für das Ubiquitin-System auch Adapterproteine, die in diesem Fall die Assoziation der E3-Ligasen mit dem Typ I-Rezeptor unterstützen. Als Adapterprotein für die beiden E3-Ligasen Smurf1 und Smurf2 wurde das I-Smad7 im Zusammenhang mit dem TGF-ß-Signalweg entdeckt, welches durch Interaktionen mit dem TGF-ß-Typ I-Rezeptor an die heteromeren Komplexe aus TGF-ß-Typ I- und TGF-ß-Typ II-Rezeptoren bindet (Nakao et al. 1997).

Das inhibitorische Smad7 besitzt wie die anderen Smad-Proteine auch eine MH1- und eine MH2-Domäne; diesem fehlt hingegen das C-terminale SSXS-Motiv, welches bei den R-Smads das Ziel Rezeptor-vermittelter Phosphorylierung darstellt. Dies ist mit ein Grund dafür, warum Smad7 einen negativen Regulator des TGF-ß-Signalwegs darstellt. Es kann mit seiner MH2-Domäne zwar an den Rezeptor binden, steht jedoch nicht als Substrat für die Serin-/Threonin-Kinasen zur Verfügung (Hayashi et al. 1997). Smad7 besitzt zudem ein PY-Motiv in seiner Linker-Region. Dieses Motiv ist für die Assoziation mit den WW-Domänen des Smurf-Proteins verantwortlich (Kavsak et al. 2000).

Smad6, ebenfalls ein inhibitorisches Smad, hat in einer anderen Art und Weise eine negativ regulierende Funktion und agiert nicht mit dem Rezeptor. Es handelt sich ausschließlich um einen Inhibitor des BMP-Signalwegs, da es mit aktiviertem Smad1 um die Bindungsstelle an Co-Smad4 konkurriert. Dadurch können Signale des BMP-Wegs nicht weitergeleitet werden (Hata et al. 1998).

1.6 Der Rezeptor

1.6.1 Aufbau und Funktion

Innerhalb des Signalwegs existieren 5 Typ II- Rezeptoren und 7 Typ I-Rezeptoren, auch *Activin receptor-like Kinasen* (ALK) genannt. Es handelt sich bei diesen Rezeptoren um spezielle Proteinkinasen, auch Serin/Threonin-Kinasen genannt (Derynck und Feng 1997). Diese katalysieren die Phosphorylierung von Hydroxygruppen der Aminosäuren Serin und Threonin in bestimmten Proteinen, was deren Aktivierung bewirkt. Der TGF-ß-Typ I-Rezeptor besteht aus einer extrazellulären Domäne, welche reich an Cystein ist, einer transmembranen Domäne, einer nahe der Membran gelegenen GS-Domäne sowie einer zytoplasmatischen Domäne, welche reich an Serin und Threonin ist (Derynck und Feng 1997). Die GS-Domäne befindet sich unmittelbar vor der zytoplasmatischen Domäne hin zur Zellmembran (juxtamembranös) und besteht aus sich wiederholenden Serin-Glycin-Resten (Franzén et al. 1995). Nähert sich nun ein Ligand aus der TGF-β-Superfamilie der Zellmembran, bindet dieser an ein Dimer aus konstitutiv aktivierten Typ II-Rezeptoren. Dieser Komplex aus zwei Serin-Threonin-Kinasen phosphoryliert daraufhin bestimmte Serin-Glycin-Reste innerhalb der GS-Domäne zweier Typ I-Rezeptoren und verursacht dadurch deren Aktivierung. Es entsteht ein hetero-tetramerer Komplex (zwei Typ II- und zwei Typ I-Rezeptoren, s. Abbildung 5). Der Typ I-Rezeptor erkennt einen Liganden nur, wenn dieser an den Typ II-Rezeptor gebunden vorliegt. Erst durch die Komplexbildung aus den Rezeptoren mit dem Liganden kann der TGF-ß-Typ I-Rezeptor durch den Typ II-Rezeptor phosphoryliert und somit aktiviert werden. In der Folge aktiviert der Typ I-Rezeptor wiederum weitere Signalmoleküle durch Phosphorylierung. Die Form der Signalweitergabe ist von der Art des Typ I-Rezeptors abhängig (Wrana et al. 1994, Miyazawa et al. 2002). BMP-Rezeptoren phosphorylieren Smad1, Smad5 und Smad8, darüber aktivieren sie den BMP-Weg. Die TGF-ß-Rezeptoren phosphorylieren Smad2 und Smad3, somit sorgen sie für eine Aktivierung des TGF-ß-Signalwegs (Chen et al. 1998).

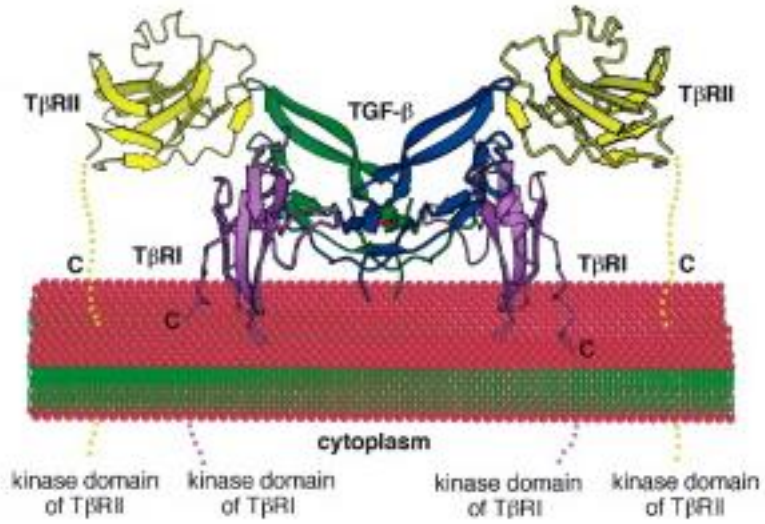

Abbildung 5: Extrazellulärer TGF-ß-Rezeptorkomplex als strukturelles Modell

Der Ligand TGF-ß ist an diesen Komplex gebunden. Übersicht entlang der Plasmamembran. C-Termini der Rezeptoren ragen in die Plasmamembran hinein (gestrichelte Linien). Mit freundlicher Genehmigung entnommen aus Shi und Massagué (2003).

Der TGF-β-Rezeptor, der Gegenstand dieser Arbeit ist, wurde ursprünglich mithilfe eines chemischen Crosslinks von ^{125}I-TGFb an Zelloberflächen-Bindungsproteinen entdeckt. Diese gebildeten Ligand-Rezeptor-Komplexe wurden anschließend elektrophoretisch auf einem Gel aufgetrennt. Dabei konnten aufgrund unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität verschiedene Typen von Zelloberflächenproteinen nachgewiesen werden, u. a. der TGF-β-Typ I-Rezeptor (Cheifetz et al. 1986, 1987). Dieser Rezeptor, auch als ALK-5 (*Activin receptor-like kinase 5*) bezeichnet, dient als spezifischer Rezeptor für den TGF-ß-Signalweg (Miyazawa et al. 2002).

1.6.2 Rezeptor-Degradation

Smad7 ist im Ruhezustand einer Zelle vorwiegend im Zellkern lokalisiert. Eine Vielzahl an verschiedenen Signalen, wie z. B. die Liganden TGF-ß und BMP, bewirken jedoch einen Anstieg der Proteinlevel von Smad7 und dadurch eine Anhäufung des Proteins im Zytoplasma (Itóh et al. 1998). Dies kann als negativer Feedback-Mechanismus bezeichnet werden (Massagué und Chen 2000). Smurf2 befindet sich in unstimulierten Zellen ebenfalls zunächst im Kern. Durch ein o. g. Signal und einen daraus folgenden Anstieg an Smad7-Proteinlevel kommt es zur vermehrten Assoziation von Smad7 und Smurf2 und daraus folgend zu einem vermehrten Export von Smurf 2 aus dem Kern in das Zytoplasma hin zum TGF-ß-Rezeptor-Komplex (Kavsak et al. 2000). Hat der Komplex aus Smurf und Smad7 an den Typ I-Rezeptor gebunden, kann nun Smurf sowohl Smad7 als auch den Rezeptorkomplex ubiquitinieren und beide somit für den proteasomalen Abbau markieren (Kavsak et al. 2000). Dieser Weg bzw. diese Form der Markierung für den Abbau des Rezeptorkomplexes wird ebenso für Smurf1 beschrieben (s. Abbildung 6) (Ebisawa et al. 2001).

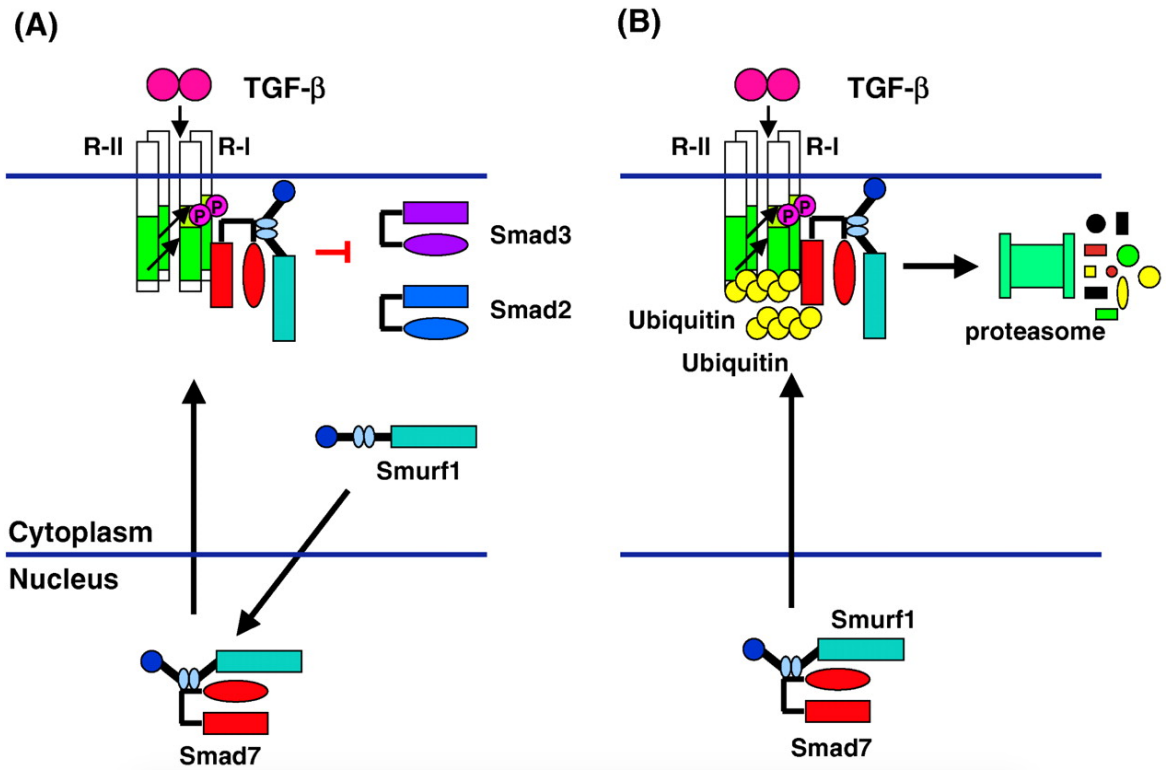

Abbildung 6: Smurf1-Smad7-Komplex unterdrückt den TGF-ß-Signalweg

A) Smurf1 bringt das I-Smad7 zum TGF-ß-Typ I-Rezeptor. B) Ubiquitinierung des Rezeptors und anschließend proteasomaler Abbau des Rezeptors und von Smad7. Mit freundlicher Genehmigung entnommen aus Suzuki et al. (2002).

1.7 Die Rolle des TGF-ß-Signalwegs bei der Entwicklung von Osteoarthrose

Chondrozyten sind diejenigen Zellen, die für das Aufrechterhalten der Homöostase im Knorpelgewebe verantwortlich sind (Buckwalter et al. 2005). Sie zeigen bei einem an OA erkrankten Knorpel Veränderungen in ihrem Phänotyp, welche den Veränderungen der Chondrozyten während der terminalen chondrozytären Differenzierung sehr ähnlich sind. In allen Phasen, sowohl der Chondrogenese als auch der terminalen Differenzierung spielt TGF-ß eine Rolle. Zum einen stellt TGF-ß den Schlüsselinitiator der Chondrogenese dar, zum anderen hemmt es die terminale chondrozytäre Differenzierung (van der Kraan et al. 2009).

Aktuelle Forschungsergebnisse liefern substantielle Beweise dafür, dass der TGF-ß-Signalweg zur Entwicklung und dem Voranschreiten von Osteoarthrose führt. Aufgrund enormer Fortschritte in der Analyse genomweiter Assoziation, kann von einer Korrelation zwischen genetischen Varianten der Komponenten des TGF-ß-Signalwegs und Osteoarthrose ausgegangen werden (Shen et al. 2014). Valdes et al. haben z. B. gezeigt, dass eine genetische Variation des Smad3-Gens in das Risiko involviert ist, an Hüft- oder Knie-OA zu erkranken (Valdes et al. 2010). Darüber hinaus konnte z. B. innerhalb der weiblichen Bevölkerung Japans ein Zusammenhang zwischen einem Polymorphismus innerhalb des TGF-ß1-Gens und der Entwicklung von OA festgestellt werden (Yamada et al. 2000).

In gesundem Knorpelgewebe besteht eine Balance zwischen der Synthese von Knorpelmatrixmolekülen, z. B. Proteoglykan und Kollagen II, und dem Abbau derselben Substanzen. Der Abbau erfolgt durch katabole Enzyme wie Matrix-Metalloproteinasen (MMP) oder Aggrecanasen (ADAMTS) und wird durch das Zytokin Interleukin-1 gesteuert.

TGF-ß stellt einen anabolen Faktor dar, der die EZM-Synthese fördert sowie katabolen Stimuli entgegenwirkt. In von OA betroffenem Knorpelgewebe fehlt TGF-ß jedoch fast vollständig, wodurch die o. g. Balance aufgehoben wird und katabole Vorgänge überwiegen. Ein gestörter Ablauf des TGF-ß-Signalwegs bedeutet somit eine erhöhte Anfälligkeit für eine Zerstörung der Knorpelmatrix. Dies beweist, wie wichtig das endogene TGF-ß für die Aufrechterhaltung des Knorpelgewebes ist (Blaney Davidson et al. 2007). Für die Zukunft könnten somit TGF-ß und die Komponenten des TGF-ß-Signalwegs in der Therapie oder Prävention von OA eine entscheidende Rolle spielen; diese Rolle muss allerdings durch weitere Untersuchungen definiert und abgeklärt werden.

1.8 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss von Smurf1 und Smurf2 auf den Rezeptorkomplex des TGF-ß-Signalwegs untersucht werden. Für die Untersuchung werden humane chondrogene Progenitorzellen verwendet, die aus osteoarthritisch erkranktem Knorpel gewonnen und anschließend immortalisiert wurden.

Gegenstand dieser Dissertation ist der Typ I-Rezeptor des TGF-ß-Signalwegs, auch TGF-ß-Typ I-Rezeptor bzw. TGFßR1 genannt, der als Repräsentator für den Rezeptorkomplex innerhalb dieses Signalwegs steht. TGFßR1 scheint innerhalb der Signalkaskade im Rahmen eines negativen Feedbackmechanismus von Smurf gebunden und im weiteren Verlauf abgebaut zu werden.

Noch nicht veröffentlichte Studien der AG Miosge konnten bereits das Vorhandensein von Smurf1 und Smurf2 in CPCs und deren Einfluss auf einzelne Smad-Moleküle nachweisen. Dabei blieb die zentrale Rolle des TGF-ß-Rezeptors und dessen Regulation im TGF-ß-Signalweg bisher unberücksichtigt.

Dies führte somit zu folgender Fragestellung:

1. Kann die Existenz des TGF-ß-Typ I-Rezeptors innerhalb der CPCs nachgewiesen werden und wie ist dessen Lokalisation zu beurteilen?
2. Welchen Einfluss haben Smurf1 und Smurf2 auf den TGF-ß-Typ I-Rezeptor auf Gen-Ebene?
3. Ist dieser Einfluss auch auf Protein-Ebene feststellbar?

Für die Beantwortung der ersten Frage soll eine Immunzytochemie durchgeführt werden. Um die zweite und dritte Frage beantworten zu können, werden o. g. CPCs mit Smurf1 bzw. mit Smurf2 überexprimiert. Anschließend wird das Rezeptor-Expressionsmuster innerhalb der transfizierten CPCs auf Gen-Ebene sowie auf Protein-Ebene mit dem Expressionsmuster unbehandelter CPCs verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Probengewinnung und Isolierung von chondrogenen Progenitorzellen

Die für die nachfolgenden Versuche verwendeten humanen chondrogenen Progenitorzellen (CPCs) wurden aus osteoarthritisch verändertem hyalinem Knorpel gewonnen. Dieser Knorpel stammt aus dem Kniegelenk eines Patienten im späten Stadium der Erkrankung Osteoarthrose und wurde diesem während einer Operation am Lehrkrankenhaus Neu-Mariahilf entnommen. Entsprechend dem Ethikantrag Nr. 25/12/10 wurden allein das Geschlecht, Gewicht und Alter des Patienten notiert. Die entnommenen Proben wurden dann an die Universitätsmedizin Göttingen zur weiteren Verwendung übergeben.

Um die CPCs aus dem Probenmaterial zu gewinnen, wurde der degenerative Randbereich des Knorpels mit einem Skalpell angeritzt. Nachfolgend wurden von diesen Bereichen winzige, nur wenige mm große Probenstücke abgetragen und diese Stücke in 75 cm^2 große Zellkulturflaschen (Sarstedt, #83.1813.002) mit je 10 ml Kultivierungsmedium gegeben und für ca. 10 Tage bei 37 °C und 5 % CO_2 in einem Brutschrank inkubiert. Innerhalb dieser Inkubationszeit kam es zum Herauswandern der CPCs aus den explantierten, degenerativen Knorpelstücken, d. h. es erfolgte die Besiedlung der Zellkulturflaschen. Nach Herausspülen der Knorpelstücke mittels PBS konnten die Zellen innerhalb der Flaschen gezüchtet und vervielfältigt werden. Durch eine lentivirale Transfektion mit der humanen Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT) wurden die Zellen anschließend immortalisiert. Durch diese Immortalisierung, die von Christa Bode, Mitarbeiterin der AG Miosge, durchgeführt wurde, konnten die Zellen noch bis in hohe Passagen weiter kultiviert werden, ohne dass diese ein Zeichen von Seneszenz aufwiesen (#CPC241ht).

Kultivierungsmedium:
500 ml DMEM (*Dulbecco´s Modified Eagle Medium*; Gibco # 21885)
50 ml FBS (Gibco, # 10270-106)
5 ml Gentamycin (Cellpure®; Art-Nr. HN09.1)

2.2 Kultivieren und Passagieren von CPCs

Die isolierten, immortalisierten Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und das Kultivierungsmedium alle 3 Tage gewechselt. Die Zellen wurden vor dem Wechsel des Mediums und vor ihrer weiteren Verwendung unter einem Mikroskop begutachtet (Carl Zeiss, Göttingen, DE). Wenn die Flaschen zu etwa 85 Prozent gefüllt waren, wurden die Zellen passagiert. Die Kontrolle unter dem Mikroskop war wichtig, damit die Zellen rechtzeitig passagiert wurden und die Flaschen nicht zu voll wuchsen. Bei zu stark voll gewachsenen Zellkulturflaschen besteht die Gefahr, dass sich die Zellen differenzieren. Dies hätte die Ergebnisse beeinträchtigen können.

Die CPCs wurden mithilfe von Trypsin (PAN Biotech, Aidenbach, DE) geerntet, sobald der Boden der Zellkulturflasche zu etwa 85 Prozent mit Zellen bewachsen war. Zunächst wurde das Medium in einen Becher abgeschüttet. Um zu vermeiden, dass die Behandlung mit Trypsin durch Proteinreste in der Zellkulturflasche blockiert wurde, erfolgte ein zweimaliges Ausspülen mit PBS. Danach wurden die noch adhärenten Zellen in der Zellkulturflasche mit jeweils 2 ml Trypsin versetzt und im Brutschrank für einige Minuten inkubiert. Die Zellen, die sich nach der Inkubationszeit noch nicht vom Flaschenboden gelöst hatten, konnten mittels der Klopfmethode mobilisiert werden.
Anschließend wurde ein 50-ml-Falcon-Tube-Röhrchen vorbereitet. Durch das Befüllen mit 2 ml DMEM konnte die Wirkung des Trypsins, das in gleicher Menge zuvor hinzugegeben wurde, aufgehoben werden. Noch verbliebene Zellen in der Zellkulturflasche wurden durch zweimaliges Nachspülen mit DMEM ebenfalls zu dem Falcon-Tube-Röhrchen hinzugegeben. Dieses Röhrchen wurde nachfolgend bei 1200 rpm für 10 Minuten zentrifugiert.

Im Anschluss wurde der Überstand an Kultivierungsmedium abgeschüttet. Das verbliebene Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert. Nun wurde die Zellzahl pro

Milliliter PBS mithilfe des Zellometers (Cellometer™ Auto T4 Cell Counter der Firma Nexcelom Bioscience) bestimmt.
Nach Festlegung der Zellanzahl, die nun weiter kultiviert werden sollte, wurden die Zellkulturflaschen hierfür mit jeweils 10 ml Kultivierungsmedium vorbereitet und dann mit je 2×10^4 Zellen beimpft. Durch die vorherige Behandlung der Zellen mit Trypsin befanden sich die Zellen in den Flaschen nun in ihrer nächstfolgenden Passage.
Die übrigen Zellen wurden abzentrifugiert, mit Datum, Passage und Zellzahl versehen und dann bei -80 °C weggefroren.

2.3 Überexpression von Smurf1 und Smurf2

2.3.1 Allgemeines

Bei einer Überexpression von Zellen handelt es sich um eine im Vergleich zu unbehandelten Zellen erhöhte Expression eines spezifischen Gens. Gleichzeitig ist dadurch auch die Synthese des Proteins erhöht, welches für das gesuchte Gen codiert. Diese Methode wird verwendet, um die Auswirkung eines gebildeten Proteins auf eine Zelle zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebendiese Methode verwendet, um die Auswirkung des Smurf-Proteins auf den TGF-ß-Typ-I-Rezeptor in CPCs zu untersuchen. Für eine derartige Überexpression von Zellen, wird ein entsprechendes Plasmid benötigt, welches die gewünschte, überzuexprimierende Gensequenz beinhaltet. Das Plasmid muss darüber hinaus in ausreichender Menge vorhanden sein, um eine Transfektion durchführen zu können.

Das in Bakterien befindliche Plasmid, das in diesem Fall die Gensequenz für Smurf1 bzw. Smurf2 beinhaltete, musste zunächst über Nacht in den Bakterien vervielfältigt und anschließend aus diesen isoliert werden, um dann in die CPCs transfiziert werden zu können. Bei diesen transfizierten CPCs ging man nun davon aus, dass das Smurf-Protein im Vergleich zu nicht-behandelten Zellen vermehrt exprimiert wurde und, dass dies unabhängig vom restlichen Zellzyklus stattfand.

2.3.2 Klonieren der Expressionsvektoren

Für die geplante Überexpression der CPCs wurden über die Firma Amsbio-OriGene die Plasmide pSmurf1-Myc-DDK (RC222902) und pSmurf2-Myc-DDK (RC210866) bestellt, in denen die zu vervielfältigenden Gene Smurf1 und Smurf2 bereits eingebaut waren. Die Plasmide wurden in DH5α-Bakterien auf Agar geliefert. Sie verfügten zusätzlich über ein Gen mit einer Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin. Um das Plasmid nun vervielfältigen zu können, wurde zunächst ein Schikanekolben vorbereitet, in den ein LB-Medium gefüllt wurde. Zu diesem Medium wurde Kanamycin hinzugefügt. Anschließend wurden die Bakterien mit einem Zahnstocher aus dem Agarmedium gepickt und in den Schikanekolben mit dem Medium überführt. Der Zusatz des Antibiotikums diente als Selektionsmarker, damit nur die Bakterien, die das Plasmid mit der Resistenz aufgenommen hatten, überleben und sich vermehren konnten. Über Nacht wurden die Bakterien in dem Kolben auf einem Schüttler bei 37 °C inkubiert. Diese Zeit diente der Vervielfältigung des Plasmids durch die Bakterien.

2.3.3 Aufreinigung der Plasmid-DNA

Die Isolation des Plasmids aus den Bakterien wurde mit dem *EndoFree Plasmid Maxi Kit* (Ca.No. 12362) der Firma Quiagen durchgeführt. Es wurde hierfür eine Zentrifugation der im Medium befindlichen Bakterien bei 4 °C und 6000 g für 15 Minuten durchgeführt, um im Anschluss das Plasmid aus dem entstandenen Bakterienpellet isolieren zu können. Der Überstand über dem Bakterienpellet wurde zunächst abgeschüttet, das sich am Boden befindende Pellet in 10 ml P1-Puffer resuspendiert und der gesamte Ansatz in ein 50-ml-Röhrchen überführt. In das Röhrchen wurden 10 ml P2-Puffer hinzugegeben, der gesamte Ansatz unter leichtem Invertieren gemischt und dann für 5 Minuten bei RT inkubiert. Dies diente dazu, die Zellmembran der Bakterien zu zerstören. Nun wurden noch 10 ml P3-Puffer hinzugefügt und so lange leicht gemischt bzw. invertiert, bis es zu einem Farbumschlag kam. Der gesamte Inhalt der Röhrchen wurde dann in eine Spritze (*QIAfilter Cartridge*) gefüllt, die in einem neuen 50-ml-Röhrchen steckte und zunächst mit einer Kappe verschlossen war, und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Nachfolgend wurde die Kappe von der Spritze entfernt und der gesamte Inhalt mithilfe eines Stempels und einem Volumenstrom von ungefähr 20 ml pro Minute in das 50-ml-Röhrchen gefiltert. Zu dem Lysat wurden 2,5 ml ER-Puffer hinzugegeben und der gesamte Ansatz dann erneut durch vorsichtiges Invertieren gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Innerhalb dieser Zeit wurde eine Säule (*Qiagen-Tip 500*) auf einen Erlmeyerkolben gesetzt und mit 10 ml QBT-Puffer äquilibriert. Nach Ende der Inkubation wurde dann der gesamte Inhalt des Röhrchens auf die Säule gegeben. Durch die Reduktion der Oberflächenspannung des QBT-Puffers, konnte das Lysat allein aufgrund der Schwerkraft das *Qiagen Tip 500* durchlaufen. Anschließend wurde noch zweimalig mit 30 ml QC-Puffer gewaschen. Die Säule wurde dann auf ein 30-ml-Corex®-Glas (endotoxinfrei) gesteckt und die Plasmid-DNA mithilfe von 15 ml QN-Puffer aus der Säule in das Glas eluiert. Die Säule konnte anschließend verworfen werden. Zu der Plasmid-DNA in dem Corex®-Glas wurden dann 10,5 ml Isopropanol hinzupipettiert und das Glas bei 4 °C und 5000 g für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit der Plasmid-DNA zuerst mit 70%igem endotoxinfreiem Ethanol unter leichtem Schwenken gewaschen und anschließend für ungefähr 30 Minuten getrocknet. 100 µl RNase-freies Wasser dienten am Schluss dem Lösen des Pellets.

Mithilfe des Nano Drops konnte die Konzentration an Smurf1-Plasmid-DNA bzw. Smurf2-Plasmid-DNA bestimmt werden.

2.3.4 Transfektion von CPCs mit den Expressionsvektoren

Für eine Transfektion sät man einen Tag zuvor etwa 200.000 Zellen auf einer Petrischale aus, welche man vorher mit 10 ml Kultivierungsmedium beschickt hat. Dies ist wichtig, um den Zellen genügend Zeit zu geben, am Boden der Schale adhärent zu werden. Darüber hinaus sollte der Boden der Petrischale zu etwa 70 % mit Zellen bewachsen sein. Am Tag der Transfektion saugt man dann die 10 ml an Flüssigkeit ab und gibt 7 ml frisches Kultivierungsmedium hinzu. Nun pipettiert man in ein 1,5-ml-Eppendorf-*Cup* 300 µl DMEM und gibt hier 4 ng der gewünschten Plasmid-DNA hinzu.

Zu diesem Ansatz pipettiert man 25 µl des *Polyfect Transfection Reagent* (Firma QIAGEN). Das gesamte Probengemisch wird dann für 10 Sekunden auf dem Vortex gemischt und anschließend für 5-10 Minuten bei RT inkubiert. Die Inkubationszeit ermöglicht dem *Polyfect Reagent*, mit der Plasmid-DNA einen Komplex auszubilden und diese somit in eine kompaktere Struktur umzuwandeln, sodass die DNA leichter durch die Membran in die Zelle gelangen kann. Dieser Komplex ist positiv geladen und kann daher an negativ geladene Rezeptoren an der Zelloberfläche binden. Ist der Komplex in die Zelle gelangt, bewirkt das *Polyfect* nun eine Hemmung der lysosomalen Nukleasen. Dadurch bleibt die Plasmid-DNA intakt und kann in Form des *Polyfect*-Plasmid-DNA-Komplexes ungestört in den Zellkern gelangen.

Nach ausreichender Inkubationszeit wird 1 ml Kultivierungsmedium zu dem Probenansatz pipettiert, nun aber mit Zusatz eines Antibiotikums und von FBS (s.o.). Das Ganze wird gut durchmischt und nachfolgend dann vollständig auf die sich in der Petrischale befindenden Zellen gegeben. Nach der Zugabe wird die Petrischale für ungefähr 48 Stunden bei 37 °C in den Brutschrank gestellt. Nach 24 Stunden ist das Medium durch 10 ml frisches Kultivierungsmedium zu ersetzen. Die Ernte der transfizierten Zellen entspricht im Prinzip dem im Punkt 2.2 beschriebenen Ablauf. Da die Zellen am Boden der Petrischale etwas stärker haften, kann ein Schaber zur Hilfe genommen werden, um diese vom Boden abzulösen. Das Medium sowie das PBS, das zum Waschen verwendet wird, werden darüber hinaus nicht abgeschüttet, sondern mit einer Glaspasteurpipette und einer Absauganlage entfernt.

2.4 Real-Time PCR

2.4.1 Allgemeines

Mithilfe der quantitativen Real-Time Polymerase-Chain-Reaction (qRT PCR) kann eine spezifische Gensequenz innerhalb der RNA amplifiziert und relativ quantifiziert werden. Zunächst muss dafür die mRNA (*messenger* RNA) aus Zellen isoliert und anschließend in c-DNA (*copy*-DNA) umgeschrieben werden. Die taq-Polymerase, eine thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums Thermus aquaticus, amplifiziert dann den gesuchten Genabschnitt während der eigentlichen Polymerase-Kettenreaktion. Die Quantifizierung findet anhand von Fluoreszenz-Messungen statt, die während der PCR-Zyklen in Echtzeit ermittelt werden. Hierfür wird der DNA-Farbstoff SYBR-Green verwendet, der proportional zu der Synthese der mRNA mit der DNA interkaliert und als immer größer werdende Fluoreszenz messbar ist. Die PCR ist in drei verschiedene, sich wiederholende Phasen aufgeteilt, die bei unterschiedlichen Temperaturen stattfinden:

1. Denaturierung (95 °C):
   Die DNA wird in ihre Einzelstränge aufgespalten
2. Annealing (Primerspezifische Temperatur):
   Anlagerung der Primer an die DNA
3. DNA-Synthese/Extension (72 °C):
   Taq-Polymerase synthetisiert neue DNA-Doppelstränge und SYBR-Green bindet an die kleinen Furchen der doppelsträngigen DNA

Die gesamte PCR wird in einem *Thermocycler* durchgeführt (Mastercycler Realplex^2, Eppendorf). Die drei oben genannten Zyklen laufen darin bis zu 45 Mal ab. Man geht hierbei davon aus, dass sich die Menge der gesuchten DNA je Zyklus verdoppelt. Proportional dazu erhöht sich dadurch auch der messbare Wert der Fluoreszenz des *SYBR-Greens*. Man bestimmt nun aber nicht, wie viel DNA nach einer bestimmten Anzahl an Zyklen gebildet wurde, sondern wie viele Zyklen für einen Ansatz nötig sind, bis das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Die-

ser Wert wird durch den Ct-Wert (engl. *cycle threshold* = Schwellenwert-Zyklus) bestimmt. Mithilfe des Ct-Wertes können dann Rückschlüsse auf die Menge an DNA des Zielgens in der Probe getroffen werden. Je mehr Ziel-DNA vorher in der Probe vorlag, umso schneller ist der Punkt erreicht, an dem die Fluoreszenz erstmals den Schwellenwert überschreitet, d. h. umso kleiner ist der Ct-Wert. Eine geringere Menge an Ziel-DNA vor Beginn der PCR hingegen benötigt eine längere Zeit, um den Schwellenwert zu erreichen, der Ct-Wert wird somit größer.

Am Ende der PCR wird dann eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Durch gleichmäßige, langsame Temperaturerhöhung werden hierbei die gebildeten doppelsträgigen DNA-Produkte wieder aufgeschmolzen. Dies geschieht bei einer für das gesuchte Fragment typischen Schmelztemperatur. Das *SYBR-Green* wird freigesetzt und dessen Fluoreszenzänderung kann gemessen werden. Der Sinn dieser Schmelzkurve liegt darin zu ermitteln, ob wirklich die spezifisch gesuchte Ziel-DNA amplifiziert wurde oder ob z. B. unerwünschte unspezifische Primerdimere als Produkte entstanden sind.

2.4.2 mRNA-Isolation

Für die Isolation der Ribonukleinsäure wurde das *peqGOLD Total RNA Kit* (peqlab) verwendet. Hierfür wurde zunächst ein Zellpellet, das bei -80 °C weggefroren war, auf Eis aufgetaut. Das Zellpellet, das sich in einem 1,5-ml-Eppendorf-*Cup* befand, wurde dann in 400 µl RNA *Lysis Buffer T* resuspendiert, um eine vollständige Lyse der Zellen zu bewirken. Das Lysat wurde dann auf eine DNA-*Removing Column* gegeben, welche in einem 2-ml-c*ollection-tube* steckte, und bei 12.000 g für 1 Minute zentrifugiert. Die DNA-*Removing Column* beinhaltete dann die nicht benötigte DNA und andere Zellbestandteile und konnte verworfen werden. Zu dem Durchfluss in dem *collection tube* gab man hiernach die gleiche Menge an 70%igem Ethanol wie zuvor von dem *Lysis Buffer T* (400 µl) hinzu und überführte dieses Gemisch auf eine *PerfectBind RNA Column*, die wiederum in ein neues 2-ml-*collection-tube* gesteckt wurde. Dies musste wiederum für 1 Minute – jedoch dieses Mal bei 10.000 g – zentrifugiert werden.

Im Folgenden war die *PerfectBind RNA Column* von besonderer Beutung, da diese eine Silikatmembran besitzt, auf welcher nun die RNA gebunden war. Um eine möglichst reine RNA zu erhalten, wurden in drei aufeinanderfolgenden Waschschritten (s. u.) zwei verschiedene Wasch-Puffer auf die Säule gegeben und das Ganze jeweils für 15 Sekunden bei 10.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde dabei immer wieder verworfen und weggeschüttet.

1. Waschschritt: 500 µl RNA Wasch-Puffer I
2. Waschschritt: 600 µl RNA Wasch-Puffer II
   (Pufferkonzentrat mit 4 Volumen 100 % Ethanol)
3. Waschschritt: Wiederholung von Schritt 2

Danach erfolgte ein 2-minütiges Trocknen in der Zentrifuge bei 10.000 g. Die *PerfectBind RNA Column* wurde anschließend auf ein 1,5-ml-RNase-freies-*Cup* gesteckt und mit 30 µl RNase-freiem Wasser beschickt, um eine Elution der RNA zu bewirken und diese von der Silikatmembran abzulösen. Diese wurde zuerst für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach noch ein letztes Mal für 1 Minute bei 5.000 g zentrifugiert. Da RNA sehr instabil ist und leicht destruiert werden kann, wurde das Eppendorf-*Cup* sofort auf Eis gelagert. Mithilfe des Nanodrop 1000 Spectrophotometers konnte im Anschluss die genaue RNA-Konzentration der Lösung photometrisch bestimmt werden.

2.4.3 Umschreibung der mRNA in cDNA

Das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* von der Firma Qiagen diente im Folgenden dazu, die zuvor isolierte mRNA in cDNA umzuschreiben. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt, um einen Abbau der mRNA zu verhindern. Zu Beginn wurde durch Zugabe eines *gDNA wipeout buffers* und 2-minütiger Inkubation bei 42 °C die genomische DNA durch im Puffer enthaltene DNasen aus der Probe entfernt. Anschließend wurde ein Master-Mix angesetzt, der sich aus dem Reverse Transkriptase (RT)-Transkriptionspuffer, der Reversen Transkriptase und einem Primer-Mix zusammensetzte. Dieser Master-Mix wurde dann zu der Probe in entsprechender Menge pipettiert und für 15 Minuten bei 42 °C inkubiert, um eine Umschreibung der mRNA in cDNA zu erzielen. Anschließend wurde die gesamte Probe noch einmal für 3 Minuten bei 95 °C inkubiert, wodurch sich die Stränge wieder lösten und die Reaktion durch Stoppen des Enzyms beendet wurde (s. Tabelle 1). Abhängig von der zuvor im Nanodrop bestimmten vorliegenden mRNA-Konzentration wurde die Probe so mit RNase-freiem Wasser verdünnt, dass eine Konzentration von 1 ng/µl vorlag. Man geht von einer Umschreibung der mRNA in cDNA in einem Verhältnis von 1 : 1 aus.

Tabelle 1: Umschreibung mRNA in cDNA

1 Ansatz	Menge	Inkubation
200 ng mRNA	X µl	→1) 2 min bei 42 °C
gDNA *wipe out*-Puffer x 7	2 µl	
RNase-freies Wasser	Gesamte Menge auf 14 µl auffüllen	
RT-Transkriptionspuffer x 5	4 µl	→2) 15 min bei 42 °C →3) 3 min bei 95 °C
RT-Transkriptase	1 µl	
RT-Primer-Mix	1 µl	

2.4.4 Protokoll der RT-PCR

Für die PCR wurde das *KAPA SYBR FAST Universal* qPCR Master Mix Kit der Firma peqlab verwendet. Zunächst wurde ein Master-Mix angesetzt, welcher aus dem unten genannten *SYBR-Green*, RNase-freiem Wasser sowie einem Primer-Mix (*forward* und *reverse* primer) bestand. Das SYBR-Green beinhaltet die Polymerase, Nukleosidtriphosphate (dNTP) und 10fachen PCR-Puffer. Es wurde immer ein Ansatz mehr berechnet, als man eigentlich benötigte, um gewisse Ungenauigkeiten beim Pipettieren auszugleichen (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Master-Mix-Ansatz

Für 1 Ansatz:	Menge:
SYBR-green	5 µl
Primer-Mix 20 µl *forward* (100 pmol/µl) 20 µl *reverse* (100 pmol/µl) 160 µl H_2O	2 µl
H_2O	2 µl
	9 µl + 1 µl cDNA

Im Folgenden wurde eine *96-Well-PCR-Plate* (Mikrotiterplatte, Firma Starlab) verwendet. Hierfür wurde diese Platte zunächst mit einer *Microseal B Adhesive* Folie (Biozym Scientific GMBH) überklebt und im Anschluss alle *Wells* (kleine voneinander isolierte Näpfchen bzw. Kavitäten der Mikrotiterplatte), die für die PCR nötig waren, wieder mit dem Skalpell freigeschnitten. Von dem angesetzten Master-Mix wurden dann 9 µl in jedes *Well* möglichst blasenfrei pipettiert. Nach Befüllen aller benötigten *Wells* wurden 1 µl der jeweiligen cDNA zu dem schon im *Well* befindlichen Master-Mix hinzugefügt und zum Abschluss alle befüllten *Wells* mit *Optical Flat Caps Strips* (BioRad) fest verschlossen. Um zu garantieren, dass sich alle Ansätze komplett am Boden der *Wells* befanden, wurde die 96-*Well*-Platte anschließend noch einmal kurz bis auf 1000 rpm abzentrifugiert (Taste „*short* "). Anschließend wurde die Platte in den Thermocycler eingesetzt und die RT-PCR einer Probe in je drei Ansätzen an drei aufeinander folgenden Tagen (d. h. 9-fach) nach dem RT-PCR-Protokoll durchgeführt (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: RT-PCR-Protokoll: 45 Zyklen

Phase	Temperatur	Zeit
1) Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
2) Denaturierung	95 °C	15 sec
3) Annealing	Primerspezifisch: →in diesem Fall: 60 °C	15 sec
4) Extension	72 °C	20 sec
5) Finale Extension	72 °C	10 min

2.4.5 Verwendete Primer

Tabelle 4: PCR: Verwendete Primer

Zielgen:	Forward Primer	Reverse Primer	Annealing-Temp.
TGFBR1	AACCTGCTCTCCTGCTTGCT	CTCCCTTCCACCTCTAAT-GACTGA	60 °C
β2M	TGCTGTCTCCATGTTTGATG-TATCT	TCTCTGCTCCCCACCTCTAA	61 °C

2.4.6 Statistik/Pfaffl

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 6 Proben jeweils 9-fach auf die Genexpression des Zielgens *Transforming Growth Factor beta Type 1 Receptor* (TGFßRI) untersucht (s. 2.4.4). Davon waren drei Proben mit Smurf1 und drei Proben mit Smurf2 überexprimiert.

Die Genexpression des TGFßRI wurde nach Beendigung der PCR und Gewinnung der PCR-Daten anhand der Pfaffl-Methode relativ quantifiziert. Hierbei wird das Zielgen auf ein *Housekeeping*-Gen bezogen, welches als Referenzgen dient. *Housekeeping Genes* sind Gene, welche nicht reguliert, das heißt unabhängig von Zelltyp, Zellstadium oder äußeren Einflüssen stets in gleicher Menge exprimiert werden. Die ermittelten Werte für die cDNA des Zielgens TGFßRI aus der PCR wurden in diesem Fall zu dem *Housekeeping Gene* beta 2 microglobulin (ß2M) nach Pfaffl (2001) normalisiert. Die Normalisierung hat den Vorteil, dass das Zielgen und das *Housekeeping*-Gen z. B. durch Fehler bei der Durchführung der PCR oder durch andere Effekte stets gleichermaßen betroffen sind.

Der Expressionsunterschied und zusätzlich das Signifikanzlevel wurden mittels einer Computer-Software berechnet, welche auf der untenstehenden Formel basierte (Pfaffl 2001).

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

2.5 Western Blot

2.5.1 Allgemeines

Der Western Blot ist eine spezielle Methode in der Molekularbiologie, mit der gezielt Proteine auf einem ausgewählten Trägermaterial nachgewiesen werden können. Das Trägermaterial, z. B. eine PVDF- (Polyvinylidenfluorid) oder Nitrozellulose-Membran, dient dazu, Proteine mithilfe von mono- oder polyklonalen Antikörpern nachzuweisen. Hierfür müssen die Proteine vorher mittels der SDS-PAGE-Methode (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach ihrem Molekulargewicht aufgeteilt werden. Diese Methode beinhaltet, dass ein Proteingemisch in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt wird, indem eine elektrische Spannung angeschlossen wird und negativ geladene Proteine zum positiven Pol wandern. Danach erfolgt der eigentliche Immunoblot in einem mit Transferpuffer gefüllten Tank, bei dem die Proteine aus dem Gel durch eine senkrecht zu diesem angelegte elektrische Spannung auf die Membran übertragen werden. Polare und hydrophobe Wechselwirkungen bewirken das Anhaften der Proteine auf der Membran. Durch ein temporäres Anfärben der Proteine mit Coomassie kann die Übertragung überprüft werden. Danach können mithilfe eines Primärantikörpers und eines daran bindenden, mit einem Enzym gekoppelten Sekundärantikörpers durch die Zugabe eines Substrats spezifische Proteine detektiert werden. Der Nachweis findet statt, indem ein Fotofilm in einer Dunkelkammer auf die Membran gelegt wird und der Film danach eine festgelegte Zeit ein Entwicklungs- und ein Fixierungsbad durchläuft.

In den nachfolgenden Abschnitten werden die einzelnen Schritte noch einmal im Detail erläutert.

2.5.2 Vorbereitung der Proteinproben

Zu Beginn des Versuchs mussten die Zellpellets, welche nach dem Ernten bei -80 °C weggefroren wurden, bei Raumtemperatur aufgetaut und speziell behandelt werden. Kurz vor dem Start der Gelelektrophorese wurden hierfür die Zellen in 3-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer resuspendiert, welcher zuvor in einem 1 : 10-Verhältnis mit ß-Mercaptoethanol gemischt worden war. Das ß-Mercaptoethanol bewirkt eine Aufspaltung der Disulfidbrücken, und das SDS sorgt für eine gleichmäßige negative Ladung der Proteine. Hierdurch konnten die Proteine allein anhand ihrer Molekülgröße und unabhängig von ihrer Ladung aufgetrennt werden. Das anschließende Mischen der Proben auf dem Vortex bewirkt, dass die DNA zerstört wird.

<u>3 x SDS-Probenpuffer:</u>

3,6 g	0,3 M Tris
9 g	9 % SDS
22,5 g	22,5 % Glycerin
1	Spatelspitze Bromphenolblau

Vor Zugabe von SDS den Puffer mit HCl auf einen pH von 6,7 bringen und dann auf 100 ml mit destilliertem Wasser auffüllen.

Nachfolgend wurden die Proben für 5 Minuten bei 95 °C auf einem Heizgerät (Thermomixer comfort, Eppendorf) erhitzt. Dies bewirkte die Denaturierung der Proteine, sodass diese sich auf dem Polyacrylamid-Gel auftrennen konnten. Die Proben wurden möglichst zügig und heiß auf das Gel aufgetragen.

2.5.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Herstellung eines Polyacrylamid-Gels mussten zunächst 2 Glasplatten (1 x Ohrenplatte und 1 x Platte mit Spacern) mit 100 % Ethanol gereinigt werden, um mögliche Verunreinigungen vollständig zu entfernen. Nachfolgend dichtete man die Glasplatten gegeneinander mithilfe einer Gummidichtung ab und fixierte dies mit Klemmen. Dann markierte man 6 cm vom unteren Rand der Glasplatten den späteren Übergang vom Trenn- zum Sammelgel. Um eine absolute Dichtigkeit sicherzustellen, schüttete man zunächst Wasser zwischen die beiden Platten. Wenn dann keine Flüssigkeit heraustrat, konnte mit dem Anmischen der Gele begonnen werden. Man begann mit dem Zusammenpipettieren des Trenngels, entsprechend der unten aufgelisteten Tabelle 5. Die Acrylamidkonzentration bestimmt dabei den Vernetzungsgrad und somit die Porengröße des Gels. Das APS (s. u.) durfte erst kurz vor dem Gießen des Gels hinzugegeben werden, da es bewirkt, dass das Gel innerhalb kürzester Zeit polymerisiert. Nun wurde das fertig gemischte Trenngel bis zur Markierung zwischen die Glasplatten gegossen. Um einen blasenfreien und glatten Übergang zum Sammelgel zu erhalten, wurde es temporär mit 100 % Ethanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels, dies war nach ungefähr 20 Minuten der Fall, konnte das Ethanol wieder abgekippt werden. Dann konnte mit dem Zusammenpipettieren des Sammelgels (s. Tabelle 5) begonnen werden. Auch hier erfolgte die APS-Zugabe, wie schon beim Trenngel beschrieben, erst kurz vor dem Gießen. Das Sammelgel wurde dann direkt bis zur oberen Kante der Ohrenplatte auf das Trenngel gegossen. Direkt im Anschluss wurde ein Kamm in das noch flüssige Sammelgel gesetzt. Dieser gab später die entsprechenden Taschen für das Auftragen der Proben vor. Wenn dann nach ca. 30 Minuten das Gel vollständig auspolymerisiert war, konnten der Kamm, die Klemmen sowie die Gummidichtung wieder entfernt werden. Das Gel konnte dann, eingewickelt in feuchte Tücher, für maximal 2 Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Tabelle 5: Western Blot: Zusammensetzung eines Gels

Trenngel	10 %	**Sammelgel**	5 %
Trenngelpuffer	1,4 ml	Sammelgelpuffer	1,25 ml
10 % SDS	55 µl	10 % SDS	50 µl
TEMED	5 µl	TEMED	5 µl
Acrylamid	1,85 ml	Acrylamid	0,8 ml
H_2O	2,0 ml	H_2O	2,7 ml
10 % APS	0,25 ml	10 % APS	0,2 ml

Trenngelpuffer:
1,5 M Tris MG 121,14: 45,4 g
mit HCL auf pH 8,9 einstellen; im Kühlschrank aufbewahren

Sammelgelpuffer:
0,5 M Tris MG 121,14: 15,1 g
mit HCl auf pH 6,8 einstellen; im Kühlschrank aufbewahren

100 % Ethanol: AppliChem, Darmstadt, DE
10 % SDS: 10 g SDS mit H_2O auf 100 ml; bei RT aufbewahren
Acrylamid: 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid (Roth); im Kühlschrank aufbewahren

APS (10 % Ammonium peroxodisulfat):
1 g/10 ml H_2O (im Kühlschrank haltbar für ca. 4 Wochen)

Ein Nachbau der Biometra Elektrophoresekammer wurde für die Gelelektrophorese verwendet. Zunächst wurde nur die untere Elektrophoresekammer mit 1 x Laufpuffer befüllt, in welche dann vorsichtig das Gel hineingestellt und mit Klemmen befestigt wurde, ohne Luftblasen unter das Gel zu ziehen. Danach wurde auch die obere Kammer mit genau so viel Laufpuffer befüllt, dass sich die Taschen des Gels mit Laufpuffer gefüllt hatten. Danach konnten die vorbereiteten Proben in gewünschter Menge auf die Taschen aufgetragen werden, 25 µl entsprachen hierbei ungefähr einer Anzahl von 2 x 10^5 Zellen. Zusätzlich wurde ein Proteinmarker (Page Ruler™, *Prestained Protein Ladder*, *Thermo Scientific*, #26616) in der standardmäßig festgelegten Größe von 4 µl pipettiert.

<u>5 x SDS-Laufpuffer:</u>

1,9 M Glycine MG 75,07: 142,6 g

0,5 % SDS (10 %): 50 ml

mit H_2O auf 1000 ml auffüllen

<u>1 x Laufpuffer:</u>

800 ml H_20 + 200 ml 5 x Laufpuffer

Nun legte man Strom auf die Elektrophoresekammer, um die Proteine gemäß ihrer Molekülgröße aufzuteilen. Die Stromstärke wurde im Abschnitt des Sammelgels auf eine konstante Stromstärke von 10 mA eingestellt, um die Proben zunächst zu konzentrieren und gleichmäßig zur Grenze des Trenngels laufen zu lassen. Im Trenngel fand dann die eigentliche Auftrennung der Proteine statt. Die Stromstärke konnte ab hier dann auf 20 mA verdoppelt werden, wohingegen sich die Voltzahl während des gesamten Ablaufs je nach vorliegendem Widerstand selbst regulierte.

2.5.4 Immunoblot

Für den folgenden eigentlichen Immunoblot (Western Blot) mussten zunächst je Blot 6 Filterpapiere sowie eine PVDF-Membran in einer Größe von 9,5 x 6 cm ausgeschnitten werden, damit entsprachen sie der Größe des Polyacrylamid-Gels. Die Membran wurde für 15 Sekunden in 100 % Methanol getränkt, um diese zu aktivieren. Die Filterpapiere und die Membran wurden dann gemeinsam mit 2 Schwämmen für ungefähr 20 Minuten in kaltem Transferpuffer eingelegt. Wenn die Gelelektrophorese dann beendet war, konnte mit dem Zusammenbau der Blotkassette (PeqLab Biotechnologie GMBH) begonnen werden. Dieser Zusammenbau wurde in einer mit kaltem Transferpuffer gefüllten Schale durchgeführt, um eine blasenfreie Schichtung von Gel und Membran zu ermöglichen. Dazu wurden auf die Anodenseite zuerst ein Schwamm, 3 Filterpapiere und die Membran gelegt. Danach hebelte man die Ohrenplatte von der Platte mit den Spacern, um das Gel aus den Glasplatten zu isolieren. Man entfernte dann das Sammelgel und legte das Trenngel vorsichtig und ohne Blasen auf die Membran. Hierauf folgten erneut 3 Filterpapiere und der zweite Schwamm. Die Blotkassette wurde dann zusammenklappt, diagonal mit je 2 Gummibändern fixiert und in den halb mit Transferpuffer gefüllten Tankblot gestellt. Hierbei war die richtige Orientierung der Blotkassetten entscheidend. Die Membran musste zur Anode und das Gel Richtung Katode gerichtet werden. Danach wurde der Blottank vollständig mit Transferpuffer aufgefüllt. In den Tankblot wurde ein Rührfisch gegeben und eine Wasserkühlung angeschlossen. Die konstante Kühlung war wichtig, um eine gleichmäßige Ionenkonzentration während des Proteintransfers sicherzustellen. Bei einer senkrecht zur Membran angelegten Spannung und einer konstanten Stromstärke von 350 mA benötigte der Proteintransfer von dem Gel auf die Membran (Blot) 90 Minuten.

<u>Transferpuffer:</u>
25 mM Tris MG 121,14: 6,05 g
192 mM Glycine MG 75,07: 28,8 g
20 % (v/v) Methanol: 400 ml
mit H_2O auf 2000 ml auffüllen, pH 8,3; Aufbewahrung im Kühlraum bei 4 °C, zweimalige Benutzung möglich

2.5.5 Detektion der Proteine

Nach Beendigung des Immunoblots öffnete man die Blotkassette, verwarf das Gel und überführte die Membran in ein Kistchen mit 1 x TBS-T. Um zu überprüfen, ob die Proteine im Trenngel aufgetrennt wurden und der Immunoblot korrekt durchgeführt wurde, färbte man die Membran temporär und unspezifisch an. Die Membran wurde dafür für ca. 2-10 Minuten in einem Kistchen, das mit Coomassie-Blau gefüllt war, auf einer Wippe geschwenkt. Unter Sichtkontrolle wurde die Membran solange geschwenkt, bis alle Proteinbanden blau gefärbt waren. Anschließend legte man die Membran in ein Kistchen mit Entfärber. Dieser sorgte dafür, dass der blau gefärbte Hintergrund wieder entfärbt wurde. Dieses Procedere wiederholte man zweimal und ebenfalls unter Sichtkontrolle, bis die gewünschte Hintergrundentfärbung erreicht war.

Coomassie-Blau, Färbelösung:
0,1 % Coomassie *brilliant blue* R: 0,1 g
50 % Methanol: 50 ml
7 % Essigsäure: 7 ml
mit dest. H_2O auf 100 ml auffüllen

Entfärber:
50 % Methanol
7 % Essigsäure
mit dest. H_2O auf 500 ml auffüllen

Danach konnte die Membran eingescannt werden. Bevor man die Membran dann weiter verwendete, legte man diese noch einmal kurz in 1 x TBS-T, um die Bestandteile des Entfärbers (s.o.) herauszuwaschen und somit ein Abflocken der später verwendeten Blocklösung zu verhindern.

10 x TBS-T:
200 mM Tris MG 121,14: 24,2 g
1,5 M NaCl MG 58,44: 87,6 g
0,5 % Tween 20: 5 g
vor der Zugabe von Tween muss der pH auf 7,4 eingestellt werden,
mit H_2O auf 1000 ml auffüllen

1 x TBS-T:
100 ml 10 x TBS-T
mit H_2O auf 1000 ml auffüllen, bei RT lagern

2.5.6 Immunmarkierung

Um die Membran mit dem gewünschten Antikörper behandeln zu können, musste diese zunächst für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einem kleinen Kistchen mit einer frischen 5%igen Blocklösung auf einer Wippe geblockt werden. Dies verhinderte unspezifische Bindungen des Antikörpers und deckte freie Bindungsstellen mit Proteinen ab.

Blocklösung:
5 % Milchpulver in TBS-T frisch ansetzen:
2,5 g Magermilchpulver (*Nonfat dried milk powder*)
50 ml 1 x TBS-T
maximal 2 Tage verwendbar, im Kühlschrank aufbewahren

Danach wurde die Blocklösung abgeschüttet und der Primärantikörper in das Kistchen mit der Membran gegeben. Dieser Primärantikörper wurde zuvor, entsprechend dem mitgelieferten Datenblatt, in Blocklösung verdünnt (s. Tabelle 6). Der Primärantikörper wurde über Nacht im Kühlraum bei 4 °C auf einer Wippe inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper aus dem Kästchen abpipettiert, da er weggefroren und für spätere Versuche wiederverwendet werden konnte. Anschließend musste die Membran im Kistchen 5 Mal für je 5 Minuten mit

1 x TBS-T gewaschen werden. Hierfür wurde das Kistchen erneut auf die Wippe gestellt. Nach dem Waschen wurde der Sekundärantikörper auf die Membran gegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Auch dieser musste zuvor entsprechend der Vorgaben in Blocklösung verdünnt werden (s. Tabelle 7). Die Wahl des Sekundärantikörpers richtet sich nach dem Wirt, aus dem der Primärantikörper gewonnen wurde. An ihm ist das Enzym HRP (*horseraddish peroxidase*) gekoppelt, welches dann später die chemolumineszente Reaktion katalysiert. Nach der Inkubation musste die Membran erneut für 5 Mal 5 Minuten mit 1 x TBS-T gewaschen werden. Für den Nachweis der Immunmarkierung dienten die *Western Blotting Detection Kits* Western Bright™ ECL sowie das sensiblere Western Bright™ Sirius der Firma Advansta. Die beiden Substrate bestehen jeweils aus 2 verschiedenen Komponenten A und B, die in einem Verhältnis von 1 : 1 zusammenpipettiert werden mussten und auf die Membran für 5 Minuten bei Raumtemperatur gegeben wurden. Während der Inkubation musste die Membran abgedeckt werden, um diese vor Licht zu schützen. Im Anschluss daran wurde die Membran möglichst blasenfrei zwischen eine Klarsichtfolie gelegt, welche dann in einer Röntgenkassette zwischengelagert wurde. Leuchtpünktchen, die auf die membranumgebende Folie geklebt wurden, dienten dabei zur späteren Orientierung. Ab hier musste in der Dunkelkammer bei Rotlicht weitergearbeitet werden. Man belichtete zunächst die Leuchtpünktchen. Danach schnitt man sich einen Röntgenfilm (*Lucent Blue x-ray film*, Advansta) entsprechend der Größe der Membran zurecht, legte diesen auf die Membran und schloss die Röntgenkassette. Je nachdem, wie der Antikörper verdünnt wurde, und je nach Menge des gesuchten Proteins konnte der Film dann von 1 Sekunde bis zu einer Stunde auf die Membran gelegt werden. Der Film musste anschließend solange im Entwicklerbad unter Schwenken belassen werden, bis schwarze Banden sichtbar wurden. Hiernach wurde er kurz unter Schwenken in Wasser gewaschen und anschließend unter gelegentlichem Schwenken für mindestens 5 Minuten im Fixierbad belassen. Der Film wurde dann unter fließendem Leitungswasser von Resten des Fixierers befreit und getrocknet. Nach vollständiger Trocknung konnte mithilfe der Membran und der Leuchtpünktchen die Höhe des Proteinmarkers auf den Röntgenfilm übertragen werden. Dies war wichtig, um nachfolgend beurteilen zu können, ob das gewünschte Protein nachgewiesen wurde. Die verschiedenen Banden wurden danach im Rahmen eines quantitativen Vergleichs mithilfe des Programms Image J beurteilt.

2.5.7 Verwendete Antikörper

Tabelle 6: WB: Verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Firma/Nummer	Herkunft	Verdünnung
TGFß RI (V-22)	Santa Cruz sc-398	Kaninchen, IgG, polyklonal	1 : 200
Anti-DDK (Flag-tag 9)	Origene 4C5	Maus, IgG, monoklonal	1 : 1000
Smurf1	Abnova	Maus, IgG, monoklonal	1 : 250
Smurf2	Santa Cruz 393848	Maus, IgG, monoklonal	1 : 500
Anti- α -Tubulin	Sigma-Aldrich DM1A198	Maus, IgG, monokonal	1 : 3000
Anti-GAPDH	mAbcam 9484	Maus, IgG, monoklonal	1 : 100.000

Tabelle 7: WB: Verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Firma/Nummer	Herkunft	Verdünnung
Anti-Mouse, an Peroxidase gekoppelt	Sigma-Aldrich A9917	Ziege, IgG	1 : 40.000
Anti-Rabbit, an Peroxidase gekoppelt	Sigma-Aldrich A0545	Ziege, IgG	1 : 100.000

2.6 Immunzytochemie

2.6.1 Allgemeines

Die Immunzytochemie ist eine spezielle Methode, mit der ein spezifisches zelluläres Protein sowie dessen Lokalisation in der Zelle visuell nachgewiesen werden kann. Der Nachweis erfolgt indirekt, da zunächst ein primärer Antikörper verwendet wird, der spezifisch an das Protein als sein Antigen bindet. Anschließend bindet ein sekundärer Antikörper, der an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist, an den zuvor gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex. Die Fluoreszenz innerhalb der Zelle kann anschließend unter UV-Licht mittels eines Fluoreszenzmikroskopes analysiert werden. Es ergibt sich hierbei ein Fluoreszenzmuster, das zusätzlich zum Nachweis des gesuchten Proteins auch Rückschlüsse über dessen Menge in der Zelle gibt.

2.6.2 Protokoll-lichtmikroskopische Immunfluoreszenz

Für den Nachweis und die genaue Lokalisation des TGF-ß-Typ I-Rezeptors innerhalb der chondrogenen Progenitorzellen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Methode der Immunzytochemie angewendet. Hierfür wurden zunächst die CPCs in Zellkulturflaschen kultiviert und, wie in Punkt 2.1 und 2.2 beschrieben, behandelt und geerntet. Anschließend wurde in jedes *Well* einer 24-*Well*-Platte ein steriles Deckgläschen (DG; 12 mm Durchmesser) gelegt. Um eine möglichst hohe Sterilität der Gläschen zu erreichen, wurden diese zusätzlich noch einmal für 20 Minuten UV-Licht ausgesetzt. Auf jedes DG wurden dann 2 x 10^3 Zellen der geernteten Zellen in je 1 ml Zellkultivierungsmedium resuspendiert. Nach ungefähr 4-5 Tagen bei 37 °C waren die DGs ausreichend bewachsen, um diese weiter zu behandeln. Hierfür wurde zu Beginn das Medium auf den DGs mithilfe einer Glaspasteurpipette abgesaugt und anschließend alle DGs je zweimal mit 400 µl PBS gewaschen. Nun wurden die Zellen für die weitere Bearbeitung fixiert, indem jedes DG für 15 Minuten mit 200 µl 2 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS beschickt wurde. Anschließend wurden die DGs wieder mit je 400 µl gewaschen, um Reste des PFA zu entfernen. Da es sich bei dem TGF-ß-Typ I-Rezeptor um ein Membranprotein handelt, musste der nachfolgende

Schritt des Standardprotokolls, der die Permeabilisierung der Zellen beinhaltete, ausgelassen werden. Im weiteren Verlauf des Versuchs wurde auf einem mit Parafilm überzogenen, durchnummerierten Deckel weitergearbeitet, da dies die nachfolgende Behandlung der Zellen erleichterte. Die DGs wurden hierfür vorsichtig mithilfe einer sterilen Pinzette aus der 24-*Well*-Platte herausgeholt und auf den Deckel gelegt. Zunächst wurden die Zellen auf den DGs für ungefähr 15 Minuten mit 1 % BSA in PBS geblockt, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern und freie Bindungsstellen mit Proteinen abzudecken. In dieser Zeit wurden verschiedene Verdünnungen des Primärantikörpers (s. Tabelle 8) (1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 500) in 1 % BSA in PBS hergestellt, welche nach Absaugen der Block-Lösung durch eine Wasserstrahlpumpe auf die entsprechenden DGs pipettiert wurde. Um die Spezifität des anschließend hinzugefügten Sekundärantikörpers zu beweisen, wurde eine Negativkontrolle für den Zeitraum der Inkubation des Primärantikörpers allein mit 1 % BSA-PBS beschickt. Die Inkubation des primären Antikörpers wurde bei 37 °C für 60 Minuten in einer feuchten Kammer durchgeführt. Während dieser Inkubation wurde dann die Verdünnung des Sekundärantikörpers von 1 : 1000 in 1 % BSA-PBS hergestellt (s. Tabelle 9). Ebenso wurde dieser Verdünnung der Fluoreszenzfarbstoff DAPI in einer Konzentration von 1 : 1000 hinzugefügt. Nach der Inkubation der Primärantikörper-Lösung, Absaugen dieser Lösung und zweimaligem Waschen mit PBS wurden alle DGs, einschließlich der Negativkontrollen, mit der verdünnten Lösung des Sekundärantikörpers beschickt und bei 37 °C für 30-60 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Der Sekundärantikörper war an den Fluoreszenzmarker H&L Alexa Fluor 555 gekoppelt, welcher spezifisch das gesuchte Protein rot fluoreszieren lässt. Das DAPI (4´,6-Diamidin-2-phenylindol der Firma KPL) wurde hinzugefügt, um die Zellkerne blau zu färben und dadurch eine bessere Orientierung innerhalb der Zelle zu ermöglichen. Auch die Lösung des Sekundärantikörpers wurde nach der Inkubation abgesaugt und die DGs erneut zweimalig mit PBS gewaschen. Für das abschließende Eindeckeln der behandelten Zellen wurde der Polyvinylalkohol Mowiol® (Sigma-Aldrich) als Eindeckmedium verwendet. Für ein DG wurde hierzu das o. g. Medium auf einen Objektträger getropft und das Gläschen mit der Zellseite nach unten daraufgelegt. Überschüssiges Medium konnte mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt werden. Die fertig auf dem Objektträger eingedeckelten Zellen konnten dann entweder dunkel im Kühlschrank bei -4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden, oder direkt unter dem *All-in-One Fluorescence Microscope* BZ-X710 der Firma Keyence betrachtet und fotografiert werden.

2.6.3 Verwendete Antikörper

Tabelle 8: ICC: Verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Firma/Nummer	Herkunft	Verdünnung
TGFß RI (V-22)	Santa Cruz sc-398	Kaninchen, IgG, polyklonal	1 : 100; 60 min

Tabelle 9: ICC: Verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Firma/Nummer	Herkunft	Verdünnung
Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (rot)	Alexa Fluor® 555 ab 150074	Kaninchen, IgG, anti-Esel	1 : 1000; 30-60 min

3 Ergebnisse

3.1 Immunzytochemie: Nachweis auf zellulärer Ebene

3.1.1 Der TGF-ß-Typ I-Rezeptor

Die Abbildung 7 ist ein Nachweis für das Vorhandensein des TGF-ß-Typ I-Rezeptors in den chondrogenen Progenitorzellen. Die Zellen hierfür wurden aus erkranktem Knorpelgewebe gewonnen. Durch die rote Fluoreszenz des Fluoreszenzfarbstoffes Alexa Fluor® 555 lässt sich der Rezeptor in den Zellen nachweisen. Darüber hinaus kann auch auf dessen Lokalisation geschlossen werden. In Bild A ist die Lokalisation des Rezeptors in der Zellmembran als auch im Zytoplasma erkennbar. Der vergrößerte Ausschnitt aus dem Bild A (s. Pfeil) dient der zusätzlichen Anschauung. In Bild B ist erkennbar, dass das Protein ebenso im Nukleus der CPCs lokalisiert ist. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI färbt die Zellkerne zur besseren Orientierung in Bild A und C blau.

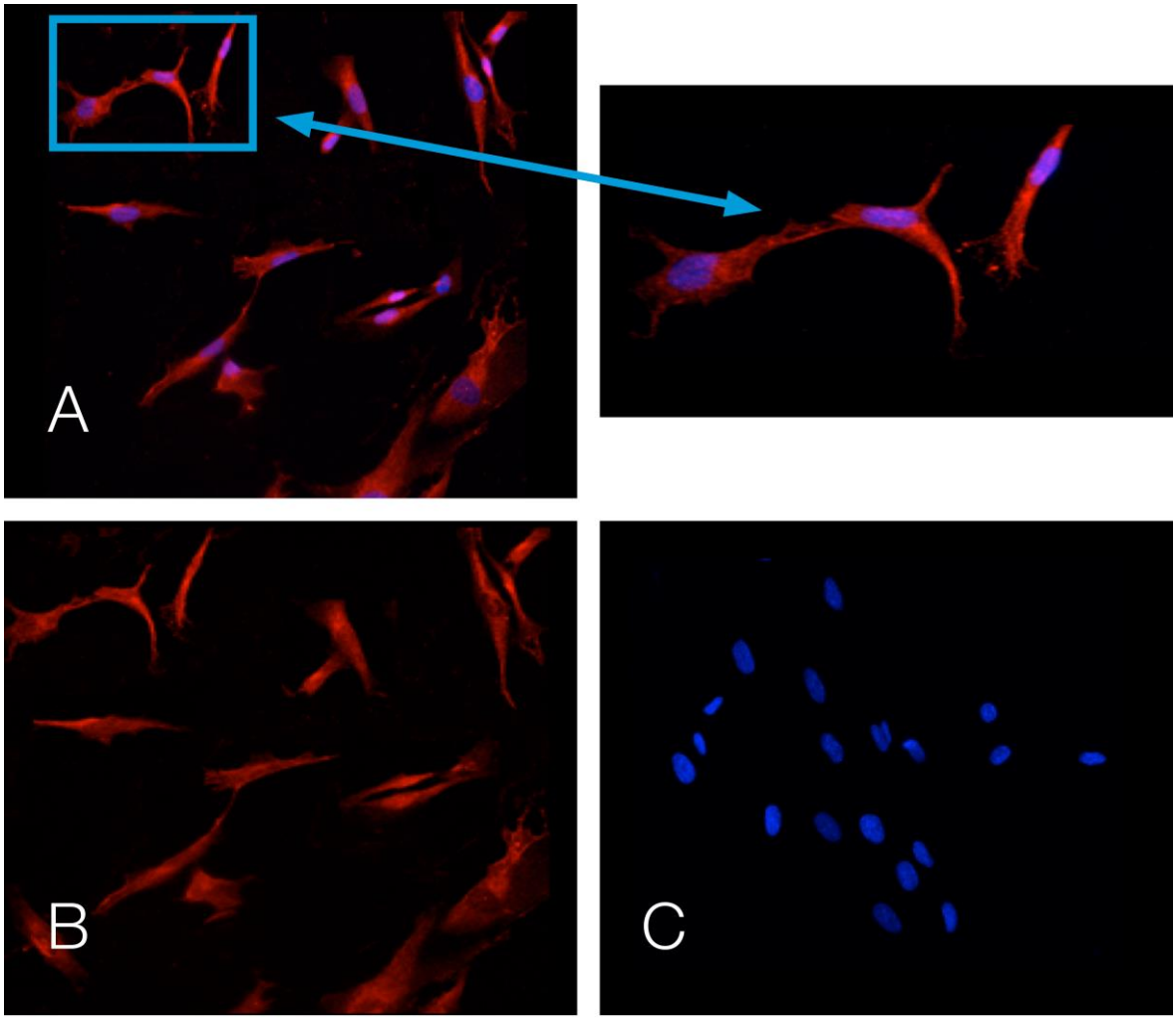

Abbildung 7: Exemplarische Immunzytochemie - Nachweis sowie Lokalisation des TGF-ß-Typ I-Rezeptors in CPCs.

Der TGF-ß-Rezeptor ist sowohl in der Zellmembran und im Zytoplasma (A) als auch im Zellkern (B) lokalisiert. Die Zellkerne sind durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI blau gefärbt (A, C). Der Pfeil weist auf einen vergrößerten Ausschnitt dreier Zellen aus dem Bild A hin. Vergrößerung x 20, n=8, hier: 1 : 100 Verdünnung.

3.1.2 Negativ-Kontrolle

In der Abbildung 8 ist die Negativkontrolle des Versuchs von 3.1.1 dargestellt. Die Negativkontrolle weist sowohl im Overlay-Bild (A) als auch in der reinen Alexa-Fluor® 555-Färbung (B) keinerlei rote Fluoreszenz des TGF-ß-Typ I-Rezeptors auf (A, C), da die CPCs allein mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI färbt die Zellkerne zur besseren Orientierung in Bild A und C blau.

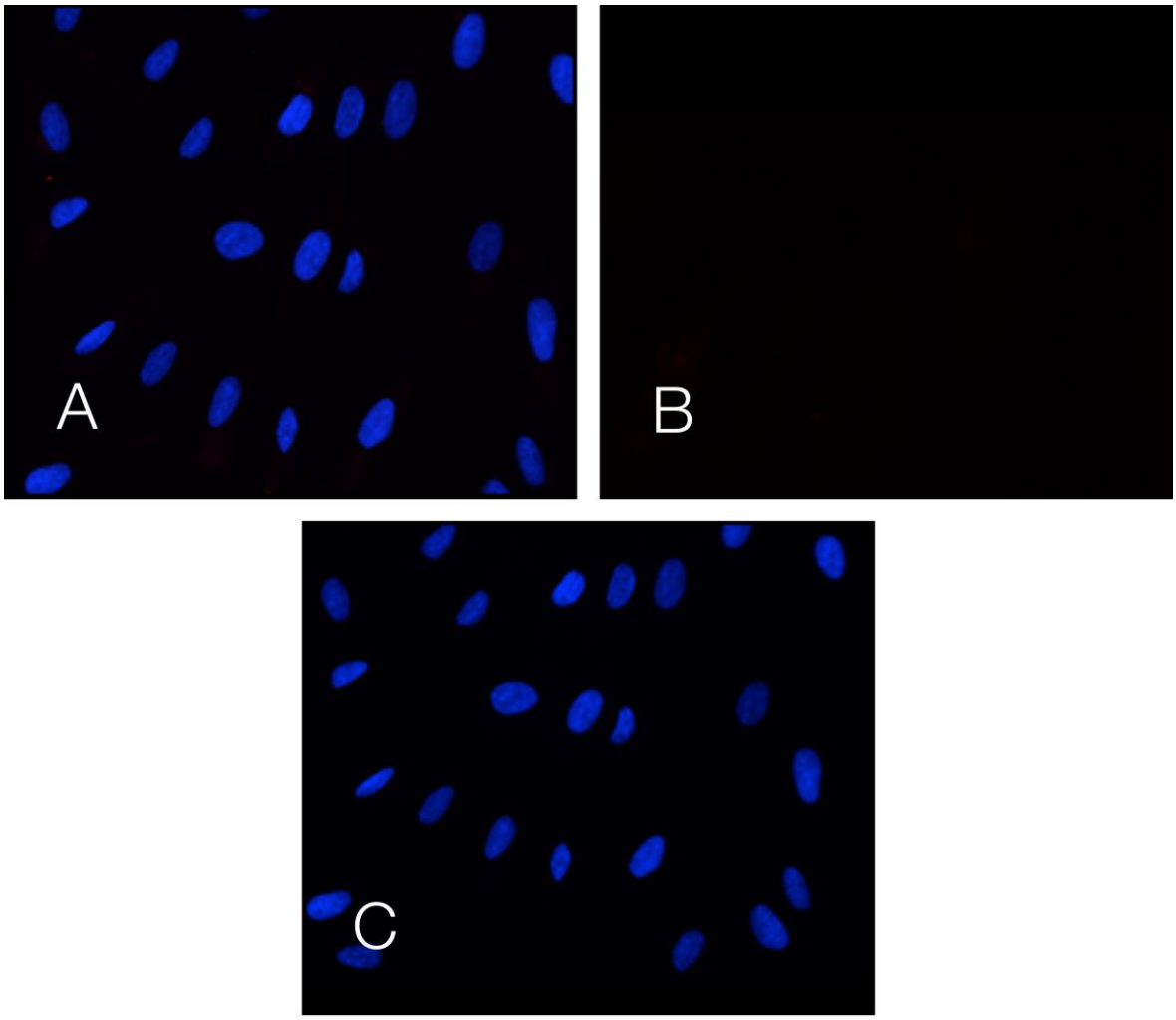

Abbildung 8: Immunzytochemie – Negativkontrolle des Versuchs in 3.1.1

Die Negativkontrolle weist keinerlei Fluoreszenz des TGF-ß-Typ I-Rezeptors auf. Sowohl das Overlay-Bild (A) als auch die reine Alexa-Fluor®555-Färbung (B) zeigen keine rote Fluoreszenz. Die Zellkerne sind durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI blau gefärbt (A, C). Vergrößerung x 20.

3.2 RT-PCR: Nachweis auf Gen-Ebene

Die Abbildung 9 zeigt die relativen Genexpressionslevel für den TGF-ß-Rezeptor in unterschiedlich behandelten CPCs aus CPC241ht. Die erste Säule stellt den mRNA-Level in unbehandelten Zellen dar. Anhand der mittleren und rechten Säule kann eine Abnahme des mRNA-Levels für TGFßR1 festgestellt werden. Die Genexpression des TGF-ß-Typ I-Rezeptors wird sowohl durch die Überexpression von Smurf1 als auch von Smurf2 in CPCs herunterreguliert. Die Überexpression von Smurf1 zeigt eine signifikante Abnahme des Genexpressionslevels von ca. 50 % (0,52 ± 0,04; $p<0{,}001$). Durch die Überexpression von Smurf2 nimmt das mRNA-Level um ca. 40 % (0,62 ± 0,04; $p<0{,}001$) ebenfalls signifikant ab.

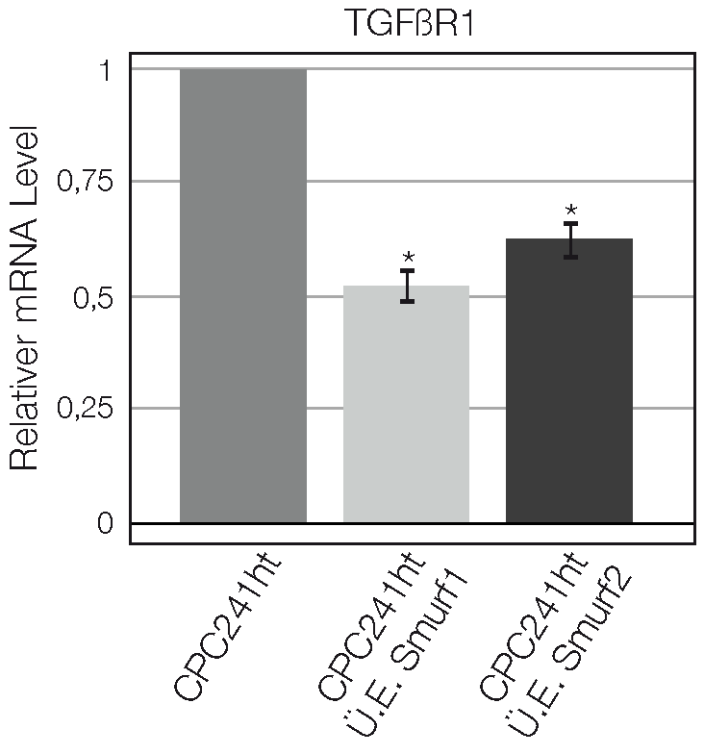

Abbildung 9: Auswertung der RT-PCR

Relative Quantifizierung des mRNA-Levels von TGFßR1 nach Überexpression (Ü.E.) von Smurf1 bzw. Smurf2 in CPC241ht. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. *$p< 0{,}01$; n=27 je Ü.E.

3.3 Western Blot: Nachweis auf Protein-Ebene

3.3.1 Nachweis der Überexpression von Smurf1

Die Abbildung 10 beweist die Überexpression von Smurf1 in den CPCs. Bei den verwendeten CPCs handelt es sich um CPC241ht. Der spezifische Nachweis der Aufnahme des Plasmids in die CPCs (2) erfolgt anhand des DDK-Tag-Antikörpers (Abb. 10 A). In den unbehandelten Zellen (1) ist er entsprechend nicht nachweisbar. Sie dienen allein als Kontrolle. In Abbildung 10 B wird darüber hinaus gezeigt, dass in den mit Smurf1 überexprimierten CPCs im Vergleich zu unbehandelten CPCs die Smurf1-Proteinmenge deutlich vermehrt ist.

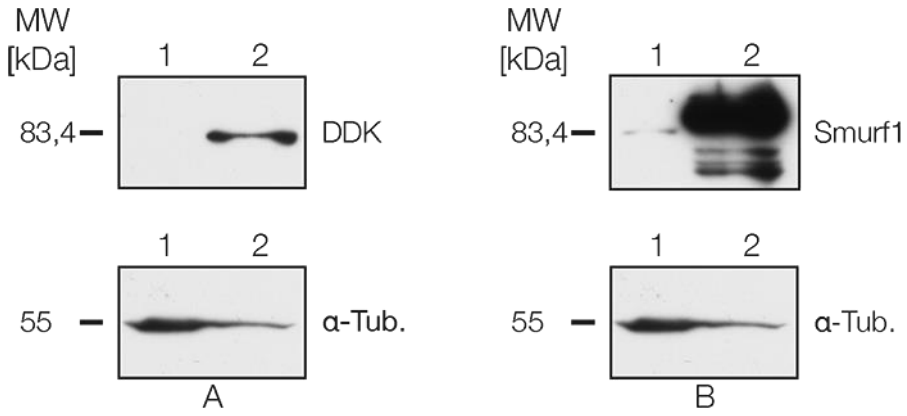

Abbildung 10: Nachweis der Überexpression von Smurf1 in CPCs

Probe 1 besteht aus unbehandelten CPC241ht. Probe 2 wurde mit einer Gensequenz transfiziert, die für das Protein Smurf1 kodiert. A) DDK ist nur in den überexprimierten Zellen nachweisbar. B) Smurf1 wird in den transfizierten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen deutlich vermehrt gebildet. n=3.

3.3.2 Nachweis des TGF-ß-Rezeptors in mit Smurf1 überexprimierten CPCs

Die Abbildung 11 zeigt eine unterschiedliche Genexpression des TGF-ß-Typ I-Rezeptors auf Proteinebene. Für die Proben wurden CPCs aus CPC241ht verwendet. Die Probe 2 wurde jedoch mit einer Gensequenz transfiziert, die für Smurf1 kodiert. Probe 1 dient als Kontrolle und beinhaltet unbehandelte CPCs. In der Coomassie-Färbung zeigt der Proteinmarker die verschiedenen Molekulargewichte (*molecular weight* = MW) der aufgetrennten Proteine. Das MW des TGF-ß-Rezeptors liegt bei 53 kDa. Alpha-Tubulin dient als Kontrollbande und besitzt ein MW von 55 kDa.

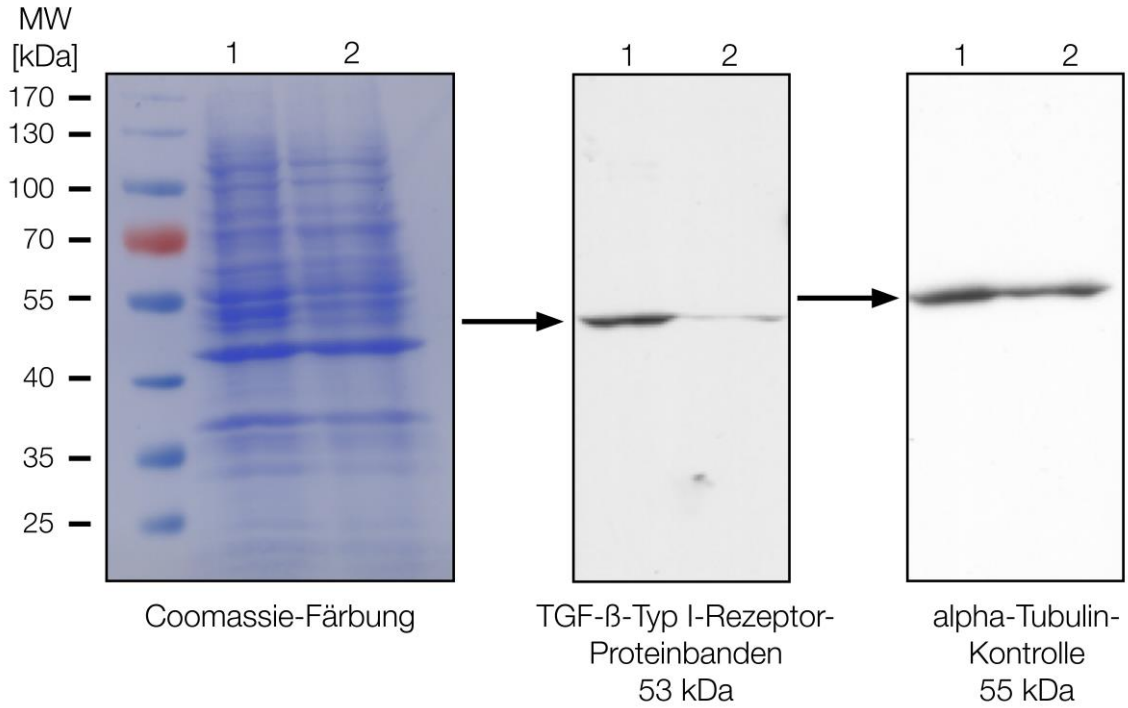

Abbildung 11: Western Blot-Analyse - Nachweis des TGF-ß-Typ I-Rezeptors in unbehandelten und mit Smurf1 transfizierten CPCs

In der Coomassie-Färbung ist die Auftrennung der Proteine erkennbar. Probe 1 besteht aus unbehandelten immortalisierten CPCs (CPC241ht), wohingegen Probe 2 mit Smurf1 überexprimiert wurde. n=3.

Insgesamt konnte der TGF-ß-Typ I-Rezeptor in drei nacheinander wiederholten Versuchen nachgewiesen werden (s. Abbildung 12). Sein theoretisches Molekulargewicht beträgt 53 kDa. Die Probe 1 beinhaltet unbehandelte CPCs (CPC241ht) und dient als Kontrolle. Die Probe 2 wurde mit einer Gensequenz kodiert, die für Smurf1 kodiert. Die Versuche A-C stellen jeweils separate Transfektionen von drei unterschiedlichen Passagen der CPCs dar (P_{45}, P_{47}, P_{50}). Darüber hinaus handelt es sich um drei verschiedene Gele bzw. Blots. Bei jedem dieser Versuche kann durch die Überexpression von Smurf1 eine verringerte Genexpression des TGF-ß-Typ I-Rezeptors auf Proteinebene festgestellt werden. Alpha-Tubulin bzw. GAPDH dienen als Kontrollbande und besitzen ein Molekulargewicht von 53 bzw. 37 kDa.

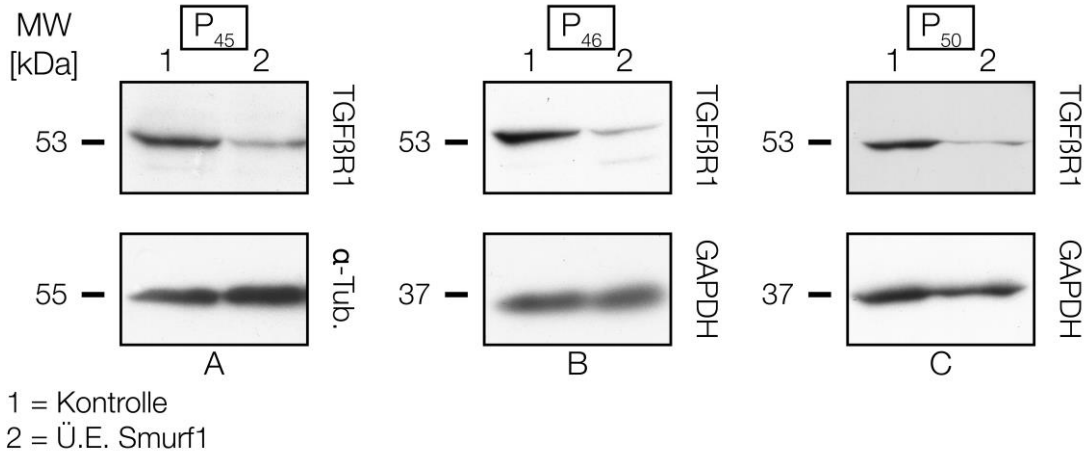

Abbildung 12: Western Blot-Analyse - Überexpression von Smurf1 in CPCs (CPC241ht) bewirkt eine Abnahme des Rezeptors auf Proteinebene

Analyse der Auswirkung auf den TGF-ß-Rezeptor nach Überexpression von Smurf1. Die Probe 1 besteht aus unbehandelten immortalisierten CPCs, wohingegen Probe 2 mit Smurf1 überexprimiert wurde. Die Proben aus A, B und C liefen jeweils in einem separaten Gel bzw. Blot und zeigen drei separate Transfektionen dreier verschiedener Zellpassagen (P_{45}, P_{46}, P_{50}). Als Kontrolle wurden α-Tubulin und GAPDH verwendet. n=3.

3.3.3 Nachweis der Überexpression von Smurf2

Die Abbildung 13 zeigt den Nachweis der durchgeführten Überexpression von Smurf2 in den CPCs. Bei den verwendeten CPCs handelt es sich um CPC241ht. Der DDK-Tag-Antikörper stellt einen spezifischen Nachweis für die Aufnahme des Plasmids in die CPCs dar (Abb. 13 A). Dementsprechend ist der DDK-Tag in den unbehandelten Zellen (1) nicht nachweisbar. Sie dienen allein als Kontrolle. In den mit Smurf2 überexprimierten CPCs (2) ist im Vergleich zu unbehandelten CPCs die Smurf2-Proteinmenge deutlich erhöht (Abb. 13 B).

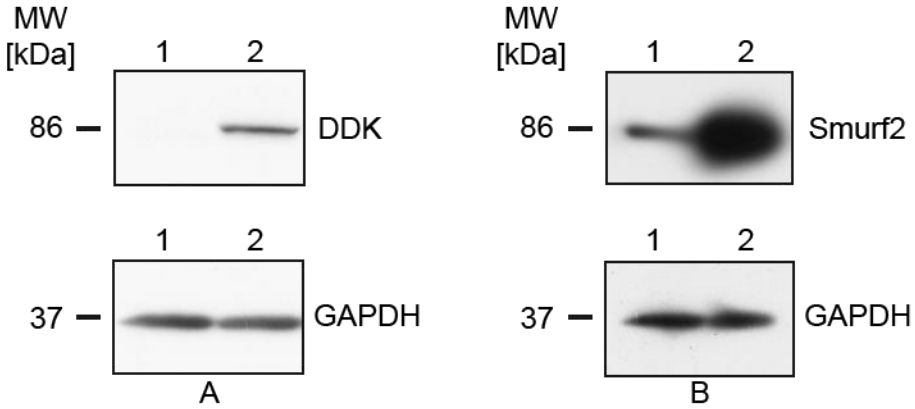

Abbildung 13: Nachweis der Überexpression von Smurf2 in CPCs

Probe 1 beinhaltet unbehandelte CPCs (CPC241ht). Probe 2 wurde mit einer Gensequenz transfiziert, die für das Protein Smurf2 kodiert. A) Nur die überexprimierten Zellen weisen den DDK-Tag auf. B) Die Smurf2-Proteinmenge ist in den transfizierten Zellen gegenüber den unbehandelten Zellen deutlich erhöht. n=3.

3.3.4 Nachweis des TGF-ß-Rezeptors in mit Smurf2 überexprimierten CPCs

In der Abbildung 14 ist der Nachweis des TGF-ß-Typ I-Rezeptors auf Proteinebene dargestellt. Für die Proben wurden CPCs aus CPC241ht verwendet. Die Probe 1 beinhaltet unbehandelte CPCs und dient somit als Kontrolle. Die Probe 2 wurde mit einer Gensequenz transfiziert, die für Smurf2 kodiert. Die verschiedenen Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine können anhand des Proteinmarkers in der Coomassie-Färbung gezeigt werden. Der TGF-ß-Rezeptor weist ein Molekulargewicht von 53 kDa auf. GAPDH besitzt ein MW von 37 kDa und dient als Kontrollbande.

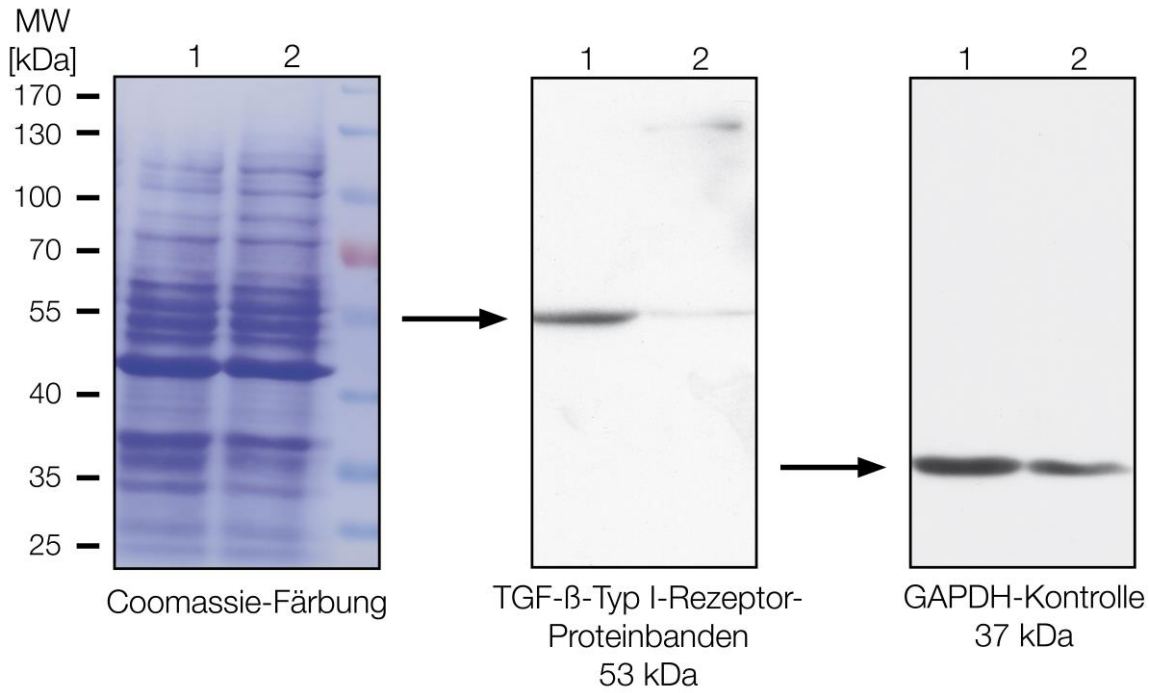

Abbildung 14: Western Blot-Analyse - Nachweis des TGF-ß-Typ I-Rezeptors in unbehandelten und mit Smurf2 transfizierten CPCs

Die Coomassie-Färbung stellt einen Nachweis für die Auftrennung der Proteine dar. Die Proben enthalten jeweils die gleichen Zellen eines Patienten (CPC 241ht). Probe 1 besteht aus unbehandelten immortalisierten CPCs, wohingegen Probe 2 mit Smurf2 überexprimiert wurde. n=3.

Die Abbildung 15 zeigt den Nachweis des TGF-ß-Typ I-Rezeptors in drei nacheinander wiederholten Versuchen. Bei 53 kDa konnte entsprechend dem theoretischen MW des Rezeptors ein starkes Signal festgestellt werden. Die Probe 1 beinhaltet unbehandelte CPCs (CPC241ht) und dient als Kontrolle. Die Probe 2 wurde mit einer Gensequenz codiert, die für Smurf2 kodiert. Die Versuche A-C stellen drei separate Transfektionen von drei unterschiedlichen Passagen der CPCs dar (P_{45}, P_{47}, P_{50}). Darüber hinaus handelt es sich um drei verschiedene Gele bzw. Blots. Es kann auch hier für alle drei Versuche eine unterschiedliche Genexpression des TGF-ß-Typ I-Rezeptors auf Proteinebene durch die Überexpression von Smurf2 in CPCs festgestellt werden. Alpha-Tubulin bzw. GAPDH dienen als Kontrollbande und besitzen ein MW von 53 bzw. 37 kDa.

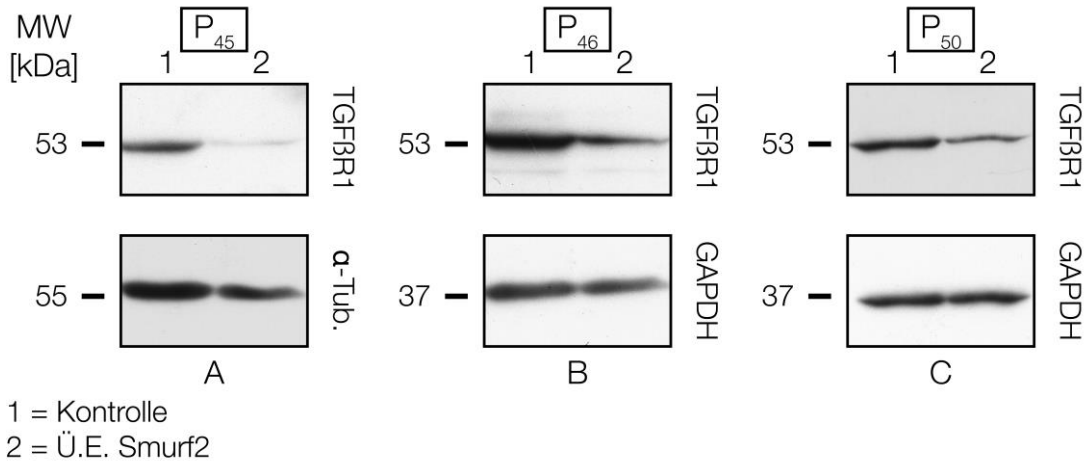

Abbildung 15: Western Blot-Analyse - Überexpression von Smurf2 in CPCs (CPC 241ht) bewirkt eine Abnahme des Rezeptors auf Proteinebene

Analyse der Auswirkung auf den TGF-ß-Rezeptor nach Überexpression von Smurf2. Probe 1 besteht aus unbehandelten immortalisierten CPC241ht, wohingegen Probe 2 mit Smurf2 überexprimiert wurde. Die Proben aus A, B und C liefen jeweils in einem separaten Gel bzw. Blot und zeigen drei separate Transfektionen dreier verschiedener Zellpassagen (P_{45}, P_{46}, P_{50}). Als Kontrolle wurden α-Tubulin und GAPDH verwendet. n=3.

3.3.5 Densitometrische Analyse

Die Abbildung 10 zeigt die densitometrische Analyse der Western Blots. Die Höhe der einzelnen Balken entspricht jeweils dem Mittelwert aus je drei wiederholten Versuchen (n=3). Es wurde teilweise gegen α-Tubulin und teilweise gegen GAPDH normalisiert. Der erste Balken stellt die Kontrolle in Form der unbehandelten CPCs dar und besitzt daher den Wert 1. Die Genexpression weist sowohl bei mit Smurf1 (mittlerer Balken) als auch bei mit Smurf2 überexprimierten CPCs (rechter Balken) eine Abnahme auf Proteinebene auf. Der relative Proteinlevel des TGF-ß-Rezeptors ist im Vergleich zur Kontrolle bei mit Smurf1 überexprimierten Zellen um ca. 80 % (0,2 ± 0,08; $p<0,01$) und bei mit Smurf2 überexprimierten CPCs um ca. 60-80 % (0,34 ± 0,16; $p<0,01$) signifikant gesunken.

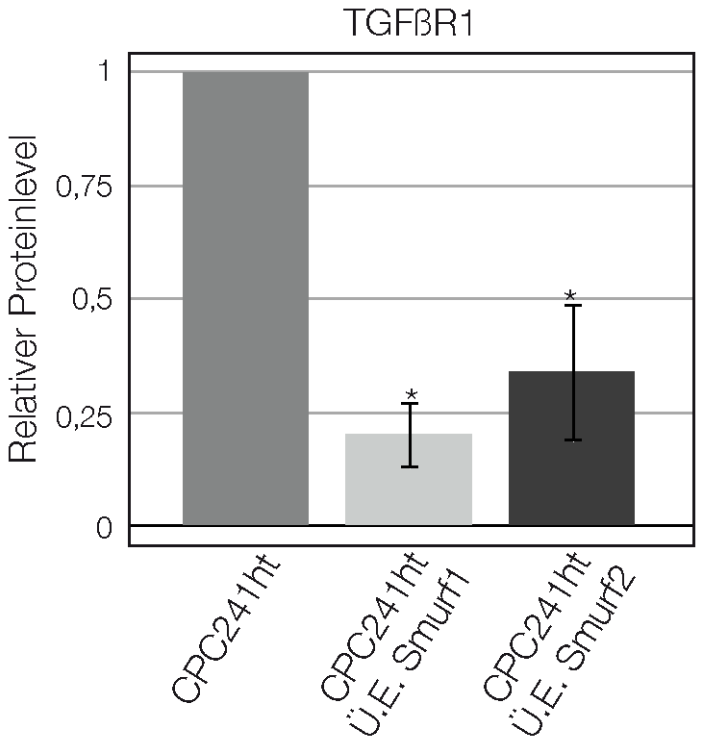

Abbildung 16: Auswertung der Western Blots mittels Densitometrie

Darstellung des relativen Proteinlevels von mit Smurf1 und Smurf2 überexprimierten CPC241ht (mittlerer und rechter Balken) im Vergleich zur Kontrolle (linker Balken). Es wurde gegen α-Tubulin bzw. GAPDH normalisiert. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. *$p < 0,01$; n=3.

4 Diskussion

Osteoarthrose stellt in der heutigen Gesellschaft die häufigste Form aller muskuloskelettalen Erkrankungen dar, welche aufgrund des stetig ansteigenden Alters in der Bevölkerung in ihrer Häufigkeit noch weiter zunehmen wird. Patienten, die an Osteoarthrose erkrankt sind, werden mitunter arbeitsunfähig und leiden unter gesundheitlichen und auch unter sozialen Einschränkungen. Derzeitige Therapieansätze können ausschließlich eine Linderung der Symptome bewirken. Als letzte Möglichkeit der Therapie kann meist allein der Gelenkersatz dem Patienten zu einer Besserung der Schmerzen und der Einschränkungen im täglichen Leben verhelfen (Lohmander und Roos 2007).

4.1 Die Rolle der chondrogenen Progenitorzellen

Die AG Miosge beschäftigt sich daher schon lange mit der Bedeutung der Regeneration von Gewebe im Zusammenhang mit der Osteoarthrose des Knies. Im Rahmen dieser Forschungen konnte gezeigt werden, dass Reparationsgewebe von humanem Knorpelgewebe später Stadien der Osteoarthrose eine einzigartige Vorläufer-(*Progenitor*)-Zellpopulation beherbergt. Solche Zellpopulationen werden als chondrogene Progenitorzellen bezeichnet. Diese Zellen weisen Stammzellcharakteristika wie z. B. Multipotenz und Migrationsfähigkeit auf und besitzen v.a. ein starkes chondrogenes Potenzial. Die Entdeckung dieser Zellen nährt die Hoffnung, in Zukunft neue Möglichkeiten der Behandlung von Osteoarthrose zu finden (Koelling et al. 2009).

Knorpel kann zwar Reparaturgewebe bilden, dieses Gewebe besteht jedoch aus Faserknorpel und ist reich an Kollagen Typ I. Im Vergleich zu physiologisch im Knorpel vorkommendem Kollagen Typ II ist Kollagen Typ I bei weitem nicht so widerstandsfähig und hält starken mechanischen Einwirkungen nicht stand (Miosge et al. 2004). Ein geplanter Ansatz neuer Therapien ist es daher, die in patienteneigenem Knorpelgewebe vorhandenen CPCs so zu behandeln, dass sie eine extrazelluläre Matrix bilden können, die eine höhere mechanische Widerstandsfähigkeit als das faserknorpelige Reparaturgewebe besitzt (Koelling und Miosge 2009).

Eine Vielzahl an verschiedenen zellulären Prozessen wird durch den TGF-ß-Signalweg reguliert, wie z. B. die Differenzierung, Proliferation und Migration von Zellen. Da Dysfunktionen innerhalb dieses Weges zu Erkrankungen führen können, muss eine enge Regulation des Signalwegs stattfinden. Die Modulation der TGF-ß-Rezeptoraktivität spielt dabei eine entscheidende Rolle (Huang und Chen 2012).

Gegenstand dieser Dissertation war es deshalb, weiteres Licht in die Abläufe des TGF-ß-Signalwegs innerhalb der CPCs zu bringen. Der TGF-ß-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Osteoarthrose. Diese Rolle konnte aufgrund der Komplexität des Vorgangs noch immer nicht vollständig definiert werden. Untersucht wurde die Kontrolle bzw. negative Regulation dieses Signalwegs innerhalb der CPCs. Die Vermutung war, dass der TGF-ß-Typ I-Rezeptor in diesen Zellen durch die E3-Ubiquitin-Protein-Ligasen Smurf1 und Smurf2 negativ reguliert wird.

4.2 Die Rolle von Smurf und des Rezeptors bei Osteoarthrose

Der TGF-ß-Typ I-Rezeptor und die Proteine Smurf1 bzw. Smurf2 scheinen eine nicht unbedeutende Rolle bei der Erkrankung Osteoarthrose zu spielen.

Die Rolle von Smurf in an Osteoarthrose erkranktem Knorpel bedarf weiterer Untersuchungen. Hier wäre es z. B. interessant zu untersuchen, ob sich das Expressionsmuster der CPCs für Smurf1 bzw. Smurf2 in gesundem und krankem Knorpelgewebe unterscheidet. So konnten Wu et al. eine Hochregulation von Smurf2 in menschlichem, osteoarthritisch verändertem Knorpel zeigen. Darüber hinaus konnten sie im Rahmen eines Mausmodells an einer transgenen Smurf2-überexprimierenden Maus eine spontane Entwicklung eines osteoarthroseähnlichen Phänotyps feststellen (Wu et al. 2008).

Dem Rezeptor konnte durch experimentelle vergleichende Analysen der molekularen Bestandteile in jungen und alten Mäusen eine nicht unwesentliche Rolle bei dem Erhalt der Struktur des Knorpels nachgewiesen werden. In Studien von Blaney Da-

vidson et al. konnte anhand tibialen Knorpels des Knies aus der Maus gezeigt werden, dass alte Mäuse im Vergleich zu jungen Mäusen eine geringere Anzahl an Knorpelzellen sowie eine reduzierte Expression von TGF-ß-Typ I- und TGF-ß-Typ II-Rezeptoren aufweisen. Die TGF-ß-Signalkapazität entspricht in alten Mäusen also nicht mehr der von jungen Mäusen. Die Abnahme der Rezeptor-Menge im Alter scheint somit u. a. zur Entwicklung altersabhängiger Osteoarthrose zu führen (Blaney Davidson et al. 2005). In osteoarthritisch verändertem Knorpel des Kaninchens konnte nur eine Herunterregulation des TGF-ß-Typ II-Rezeptors festgestellt werden. Aber auch diese Veränderung führt zu einer verminderten Sensitivität der Chondrozyten für TGF-ß und einer Abnahme des Reparaturpotenzials des Knorpels während der Entwicklung von Osteoarthrose, da der Typ II-Rezeptor für die Bindung von TGF-ß sowie die Komplexbildung mit dem Typ I-Rezeptor unbedingt benötigt wird (Boumediene et al. 1998). Verdier et. al. konnten dies auch für den TGF-ß-Typ II-Rezeptor in osteoarthritisch-verändertem humanen Knorpel des Femurkopfes zeigen. Die Abnahme der Rezeptormenge scheint gemeinsam mit der verminderten Antwortfähigkeit der Chondrozyten auf TGF-ß die Irreversibilität der Erkrankung Osteoarthrose zu bewirken (Verdier et al. 2005).

4.3 Diskussion der Ergebnisse der Immunzytochemie

Die Ergebnisse der Immunzytochemie beweisen das Vorhandensein des TGF-ß-Typ I-Rezeptors in den CPCs. Für die Lokalisation des TGF-ß-Rezeptors innerhalb der Zelle könnte der Vorgang der Rezeptorinternalisierung eine Rolle spielen. Es handelt sich um einen wichtigen regulatorischen Vorgang innerhalb der Signaltransduktion. Di Guglielmo et al. konnten z. B. in epithelialen Zellen der Lunge des Nerzes (Mv1Lu-Zellen) zeigen, dass TGF-ß-Rezeptoren über zwei verschiedene Kompartimente internalisiert werden können: Über eine Clathrin-abhängige Internalisierung in EEA1-positive Endosomen oder über eine Internalisierung in *lipid raft*-Caveolae. Innerhalb des Endosoms wird die Signalübertragung des TGF-ß-Signalwegs gefördert, wohingegen die Caveolae, die den Rezeptorkomplex und daran gebunden Smad7 und Smurf beinhalten, zur Herunterregulation der Rezeptoren dienen. Die Signaltransduktion und der Rezeptor-Abbau werden demnach durch die unterschiedliche Aufteilung in die verschiedenen Kompartimente reguliert (Di Guglielmo et al. 2003). Dies

könnte den positiven Nachweis des TGF-ß-Rezeptors innerhalb der Zelle erklären. Ob diese zwei Wege der Rezeptorinternalisierung jedoch in der gleichen Form wie oben beschrieben innerhalb der CPCs stattfinden und inwieweit reguliert werden kann, welcher Weg der Internalisierung in welcher Situation angestrebt wird, bedarf weiterer Untersuchungen.

Des Weiteren kann anhand der immunzytochemischen Ergebnisse auf eine zusätzliche Lokalisation des Rezeptors im Zellkern geschlossen werden. In einer Studie von Mu et al. konnte in humanen Prostatakarzinom-Zellen gezeigt werden, dass der TGF-ß-Typ I-Rezeptor durch den Liganden TGF-ß via Ubiquitin-Ligase TRAF6 (*tumor-necrosis factor receptor-associated factor 6*) polyubiquitiniert wird. Dies bewirkt eine Spaltung des Rezeptors. Die abgespaltene freie intrazelluläre Domäne (ICD=*intracellular domain*) des TGF-ß-Typ I-Rezeptors gelangt in den Zellkern und bindet dort transkriptionelle Regulatoren, die die Expression bestimmter tumorfördernder Gene aktivieren. TGFßRI hat somit auch eine spezifische Rolle bei durch TGF-ß vermittelter Tumor-Invasion (Mu et al. 2011). Welche Rolle der TGF-ß-Typ I-Rezeptor aber im Zellkern osteoarthritisch veränderter CPCs innehat oder ob es sich nur um ein Artefakt handelt, bedarf weiterer Untersuchungen.

4.4 Diskussion der Smurf-Überexpression

Für die Untersuchung der Auswirkung von Smurf auf den TGF-ß-Typ I-Rezeptor wurden verschiedene Zellpassagen der CPCs im Rahmen eines Überexpressions-Experiments mit einer Gensequenz transfiziert, die für Smurf1 bzw. Smurf2 kodiert. Anschließend konnte anhand des DDK-Tags bewiesen werden, dass die Zellen das Plasmid aufgenommen haben und als Folge daraus auch tatsächlich eine gesteigerte Menge an Smurf-Protein im Vergleich zu unbehandelten Zellen gebildet haben (s. Abbildung 10 und 13).

Für einen ordnungsgemäßen Ablauf des TGF-ß-Signalwegs wird eine exakte Regulation benötigt. Die Entdeckung der Smurf-Proteine war ein wichtiger Schritt für die Erforschung der negativen Regulation dieses Signalwegs, zunächst in Hinsicht auf

die Funktionen der Smads. Es konnte gezeigt werden, dass diese E3-Ubiquitin-Ligasen selektiv mit Rezeptor-Smads des TGF-ß- und BMP-Wegs interagieren und dessen Ubiquitinierung und Degradation einleiten. Die Smads werden dadurch inaktiviert (Lin et al. 2000, Zhu et al. 1999). In veröffentlichten und unveröffentlichten Studien dieser Arbeitsgruppe konnte zuvor bereits die Existenz von Smurf1 und Smurf2 sowie die Existenz diverser Smad-Proteine in CPCs nachgewiesen werden (Julius Albert 2013). Wie schon in der Einleitung erwähnt, interagieren Smurf1 und Smurf2 jeweils mit unterschiedlichen Smads des BMP- und TGF-ß-Signalwegs (Zhu et al. 1999, Lin et al. 2000, Zhang et al. 2001).

Gegenstand dieser Dissertation war es nun herauszufinden, ob der TGF-ß-Typ I-Rezeptor vielleicht auch bevorzugt allein mit Smurf1 oder mit Smurf2 interagiert. Für die Fortführung und Analyse der nachfolgenden Ergebnisse auf Gen- und Proteinebene war der Nachweis der Überexpression von entscheidender Bedeutung. Durch die erfolgreiche Überexpression konnte im weiteren Verlauf der Versuche der Einfluss von Smurf auf den TGF-ß-Typ I-Rezeptor in CPCs untersucht werden.

4.5 Der Einfluss von Smurf auf den TGF-ß-Typ I-Rezeptor auf Gen- und Protein-Ebene

In einer Vielzahl an verschiedenen Zelltypen haben diverse Autoren bereits eine Herunterregulation des TGF-ß-Rezeptorkomplexes feststellen können (Kavsak et al. 2000). So konnten Centrella et al. in fetalen Knochenzellen von Ratten sowohl eine ligandenabhängige als auch eine ligandenunabhängige Abnahme des TGF-ß-Rezeptors zeigen (Centrella et al. 1996). Des Weiteren stellten Koli und Arteaga in CCL-64-Epithelzellen der Lunge des Nerzes eine Verringerung der Halbwertszeit des TGF-ß-Typ II-Rezeptors in der Anwesenheit von TGF-ß fest (Koli und Arteaga 1997). In einer weiteren Studie konnte ebenfalls in epithelialen Zellen der Lunge des Nerzes (Mv1Lu CCL-64) sowie in humanen Lungenkarzinom-Zellen und in menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK-293-Zellen) eine Herunterregulation des TGF-ß-Typ I- und Typ II-Rezeptors nachgewiesen werden. Bei dieser Herunterregulation konnte eine Liganden-Dosis-Abhängigkeit festgestellt werden, da die Rezeptorabnahme bei stei-

gender Liganden-Menge ebenfalls zunahm. Darüber hinaus wurde eine Kooperativität der Rezeptoren festgestellt. Bei der Verwendung mutierter Zellen, die z. B. nur den Typ II-Rezeptor, jedoch nicht den Typ I-Rezeptor exprimierten, konnte eine verminderte Herunterregulation des Typ II-Rezeptors im Vergleich zu unbehandelten, beide Rezeptoren exprimierenden Zellen gezeigt werden (Zwaagstra et al. 1999). Die genauen molekularen Abläufe, die die Rezeptoren regulieren, waren für alle o. g. Autoren bis dahin aber weitgehend unbekannt.

Für die Kontrolle der Aktivität von Signalwegen erscheint die Regulation von Zelloberflächenrezeptoren durch ubiquitinabhängige Signalwege von besonderer Bedeutung. Die Konjugation von Ubiquitin an Rezeptoren soll u. a. die Signalübertragung, die Endozytose, aber auch das *steady-state*-Level der Rezeptoren kontrollieren, indem diese proteasomal oder lysosomal abgebaut werden (Hicke 1999). Im Rahmen anderer Studien wurden bereits an verschiedenen Zelllinien die Rolle der E3-Ubiquitin-Ligasen Smurf1 und Smurf2 im Zusammenhang mit dem TGF-ß-Typ I-Rezeptor untersucht, um mehr Licht in die genauen molekularen Abläufe der Rezeptor-Herunterregulation zu bringen. Smurf1 bzw. Smurf2 interagieren mit dem TGF-ß-Typ I-Rezeptor und scheinen dadurch dessen Abbau zu induzieren. So haben z. B. Ebisawa et al. in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK=*Human Embryonic Kidney*, 293T-Zellen) zeigen können, dass Smurf1 für die Ubiquitinierung des TGF-ß-Typ I-Rezeptors verantwortlich ist. Ebenso wiesen sie in transfizierten fibroblastenähnlichen COS7-Zellen, die aus dem Nierengewebe der Grünen Meerkatze gewonnen wurden, die Ubiquitinierung des inhibitorischen Smad7 durch Smurf1 nach. Zusätzlich kann somit Smad7 eine wichtige Rolle innerhalb des Ubiquitinierungsprozesses zugewiesen werden. Ebisawa et. al. zeigten dabei zunächst, dass inhibitorische Smads über ihr PY-Motiv in der Linker-Region an die WW-Domäne von Smurf1 binden können. Gleichzeitig konnten sie feststellen, dass Smurf1 durch diese Bindung eine Änderung der Lokalisation von Smad7 aus dem Kern ins Zytoplasma bewirkt und somit als eine Art Trägerprotein agieren kann. Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Studie die Interaktion von Smurf1 mit dem Rezeptorkomplex über Smad7 nachgewiesen werden. So konnte schließlich festgestellt werden, dass Smurf1 für die Induzierung des Abbaus des TGF-ß-Typ I-Rezeptors aber auch von Smad7 zuständig ist (Ebisawa et al. 2001).

Die Studien von Kavsak et. al., die sich wie Ebisawa et. al. auch mit der Thematik der Art und Weise des Rezeptorabbaus beschäftigt haben, allerdings mit dem Fokus auf

Smurf2, zeigten vergleichbare Ergebnisse zu den o. g. molekularen Mechanismen. So identifizierten sie Smurf2 und konnten zeigen, dass Smad7 als eine Art Adapter-Protein funktioniert, das Smurf2 zum TGF-ß-Rezeptor-Komplex rekrutiert, um dessen Abbau zu fördern. Um den Smurf2-abhängigen Abbau des TGF-ß-Rezeptorkomplexes zu analysieren, haben Kavsak et. al. dessen Auswirkungen in 293T-Zellen und COS-1-Zellen untersucht. Die abbauenden Effekte auf den Rezeptorkomplex von Smurf2 konnten durch die zusätzliche Anwesenheit von Smad7 noch einmal deutlich gesteigert werden. Durch die Koexpression von Smurf2 und Smad7 konnte darüber hinaus auch eine Minderung der Halbwertszeit des TGFßR1 von 4-6h auf ca. 1 h festgestellt werden. Auch der *steady-state*-Level und die Halbwertszeit von Smad7 wurden durch Smurf2 gesenkt (Kavsak et al. 2000). Smurf1 und Smurf2 bauen somit in gleichem Maße den TGF-ß-Typ I-Rezeptor ab. Dies konnte auch in den hier vorliegenden Experimenten in CPCs gezeigt werden.

Die molekularen Abläufe für den Abbau des TGF-ß-Typ II-Rezeptors bleiben jedoch ungeklärt und bedürfen weiterer Untersuchungen (Huang und Chen 2012). Ebenso bleibt die Frage offen, ob Smad7 innerhalb der CPCs ebenfalls die Funktion eines Adapter-Proteins für Smurf1 bzw. Smurf2 übernimmt.

Des Weiteren wäre von Interesse zu untersuchen, ob sich Smurf1 und Smurf2 innerhalb der CPCs auch gegenseitig beeinflussen. In einer Studie an Osteoblasten der Schädelkalotte konnte beobachtet werden, dass die Rezeptor-Stabilität und -Degradation durch eine Smurf1-Defizienz nicht verändert wird. Dies könnte durch die funktionelle Kompensation durch Smurf2 aber auch durch andere E3-Ligasen erklärt werden und lässt vermuten, dass weitere Mechanismen an der Kontrolle der Verfügbarkeit und Stabilität des Rezeptors beteiligt sein müssen. Smurf1 und Smurf2 scheinen zudem überlappende Funktionen zu haben (Yamashita et al. 2005, Kang et al. 2009).

An- bzw. Ausschalt-Mechanismen, die die Dauer und Stärke eingehender Signale regulieren, stellen also einen wichtigen Aspekt einer zellulären Signalübertragung dar. Die Regulation kann auf Ebene des TGF-ß-Rezeptors sowie auf Ebene der Smads in Form einer posttranslationalen Modifikation stattfinden, welche die Stabilität der Schlüsselproteine im Signalweg beeinflusst (Lönn et al. 2009, Kang et al. 2009). Es existieren zahllose Regulationsmechanismen, welche hier aufgrund ihrer jeweiligen Komplexität aber nicht alle genannt werden können. Eine Vielzahl an verschiedenen Proteinen kann eigenständig oder durch ein Gerüst aus inhibitorischen Smads mit

dem Rezeptor assoziieren und dadurch dessen negative Regulation erzielen. Ebenso können z. B. Ko-Rezeptoren die Degradation des Rezeptors fördern (Shi et al. 2004, Kang et al. 2009, Bizet et al. 2012).

Eine Ausnahme scheinen sklerodermale Fibroblasten darzustellen, bei denen die oben beschriebene negative Regulation des TGF-ß-Signalwegs durch Smad7 und Smurf beschädigt zu sein scheint. Trotz vermehrter Expression von Smad7 und daraus folgend gesteigerter Komplexbildung mit dem Rezeptor liegt in sklerodermalen Fibroblasten eine gesteigerte Stabilität des TGF-ß-Typ I-Rezeptors vor, was wohl auf eine gestörte Funktion der Smurf-Proteine zurückgeführt werden kann. Dies führt zu einer konstitutiven Aktivierung des Signalwegs, welche somit für die Erkrankung Sklerodermie verantwortlich zu sein scheint (Asano et al. 2004).

In gesundem Knorpelgewebe ist eine Förderung des TGF-ß-Signalwegs ebenfalls erwünscht und ein Mangel an TGF-ß kann zu einer erhöhten Anfälligkeit für Osteoarthrose führen, da TGF-ß katabolen Zytokinen entgegenwirken und darüber knorpelabbauende Vorgänge überwinden kann. Es stellt somit ein potenzielles Hilfsmittel zur Prävention weiteren Knorpelabbaus und zur Reparatur osteoarthritisch veränderten Knorpelgewebes dar (Blaney Davidson et al. 2007). Eine zu starke negative Regulation des Rezeptors durch Smurf und dadurch eine Ausschaltung des TGF-ß-Signalwegs könnte somit einen unerwünschten Vorgang im Rahmen der Entwicklung von Osteoarthrose darstellen.

Ziel dieser Arbeit war es, die negative Regulierung der Funktion des TGF-ß-Typ I-Rezeptors mittels Smurf, welche – wie erwähnt – bereits von anderen Autoren für viele Zelltypen bewiesen werden konnte, auch innerhalb der CPCs nachzuweisen. Die Ergebnisse sollen weiteres Licht in den komplexen Ablauf des TGF-ß-Signalwegs bringen, um dadurch zu zukünftigen Fortschritten bei der Erforschung neuer Therapieansatzpunkte der Erkrankung Osteoarthrose beizutragen.

Die Ergebnisse der qPCR zeigen eine signifikante Abnahme der mRNA-Menge für den TGF-ß-Typ I-Rezeptor bei der Überexpression von Smurf1 bzw. Smurf2 im Vergleich zu dessen mRNA-Menge in den unbehandelten Kontrollzellen. Dieses Ergebnis auf Gen-Ebene beweist jedoch noch nicht, dass der Rezeptor auch tatsächlich durch Smurf abgebaut wird. Es zeigt aber eine Tendenz und legt die Vermutung nahe, dass diese Abnahme auch auf Protein-Ebene stattfindet.

In der vorliegenden Arbeit konnte anschließend mithilfe von Western Blots das Vorhandensein des TGF-ß-Rezeptors auf Proteinebene innerhalb der chondrogenen Progenitorzellen nachgewiesen werden (s. Abb. 11 u. 14). Zusätzlich konnte anhand quantitativer, densitometrischer Analysen der Ergebnisse der Western Blots eine Abnahme des TGF-ß-Typ I-Rezeptors durch Überexpression der Proteine Smurf1 und Smurf2 festgestellt werden. Die Abbildungen 12 und 14 zeigen in je drei Versuchen, d. h. in drei Transfektionen dreier verschiedener Zellpassagen, eine Abnahme der TGFßR1-Proteinmenge aufgrund der Überexpression von Smurf1 bzw. Smurf2 im Vergleich zu der Proteinmenge in unbehandelten Kontrollzellen. Dadurch konnte die negative Regulation des TGF-ß-Typ I-Rezeptors durch den Einfluss von Smurf1 und Smurf2 für die CPCs bewiesen werden.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser experimentellen Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der TGF-ß-Typ I-Rezeptor innerhalb der CPCs sowohl durch Smurf1 als auch durch Smurf2 negativ reguliert wird. Durch eine Immunzytochemie konnte zunächst auf zellulärer Ebene das Vorhandensein und die Lokalisation des TGF-ß-Typ I-Rezeptors in CPCs gezeigt werden. Im Anschluss wurde auf Gen-Ebene durch eine qPCR gezeigt, dass die mRNA-Menge des Rezeptors durch eine Überexpression von Smurf1 bzw. Smurf2 abnimmt. Anschließend durchgeführte Western Blots bewiesen diese Smurf-abhängige negative Regulation darüber hinaus auf Protein-Ebene. Es konnte allerdings kein Unterschied in der Abnahme des Rezeptors zwischen Smurf1 und Smurf2 festgestellt werden.

Der TGF-ß-Signalweg und darin eingeschlossen all seine einzelnen Komponenten, wie z. B. der Rezeptorkomplex und die R-Smads, aber auch Regulatoren, wie z. B. die E3-Ubiquitin-Ligasen Smurf oder die I-Smads scheinen eine bedeutende und einzigartige Rolle in CPCs und auch während der Entwicklung und Progression von Osteoarthrose zu spielen. Der Weg der Signalübertragung erscheint dabei an sich eher einfach, benötigt jedoch wie jeder zelluläre Vorgang eine Regulation, um nicht unkontrolliert abzulaufen. Durch die unzählig vielen Mitspieler und Regulatoren dieses Signalwegs, die in ihrer Gesamtheit noch weiter erforscht werden müssen, wird die eigentliche Komplexität dieses Signalwegs deutlich. Von der Erforschung dieser zellulären Abläufe erhofft man sich für die Zukunft neue Therapieansätze, die multifaktoriell bedingte Entwicklung der Osteoarthrose und deren Progression zu verhindern bzw. einzudämmen. In dieser Arbeit konnte ein weiterer regulatorischer Einfluss auf den TGF-ß-Signalweg dargestellt werden. Smurf1 und Smurf2 beeinflussen in CPCs in gleichem Maße den TGF-ß-Typ I-Rezeptor negativ. Ob die Proteine Smurf1 und Smurf2 oder der TGF-ß-Typ I-Rezeptor jedoch einen potenziellen Schlüssel für die therapeutische Intervention der Osteoarthrose spielen könnten, bedarf weiterer vergleichender Untersuchungen der Rolle dieser beiden Negativ-Regulatoren und des Rezeptors innerhalb der CPCs von gesundem und osteoarthritisch verändertem Knorpel.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

(Ausgenommen: SI-Einheiten und allgemein bekannte Abkürzungen)

β2M	*housekeeping gene*: beta 2 microglobulin
^{125}I	Iodine-125: Radioisotop
293T-Zellen	spezifische Variante der HEK-293-Zellen
ADAMTS	*A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domains*
AG	Arbeitsgruppe
ALK	Activin-Receptor-like Kinase
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	*Bone Morphogenetic Protein*, dt.: knochenmmorphogenetisches Protein
BSA	*bovine serum albumin*
C-	Carboxy-
C1	*calcified*
C2-Domäne	N-terminal gelegene Domäne des Smurf-Proteins
CCL-64	epitheliale Zelllinie aus der Lunge des Nerzes
CD	*cluster of differentiation*
c-DNA	*copy*-DNA
COS-1	Cercopithecus aethiops
COS7	Cercopithecus aethiops
Co-Smad	*common-mediator*-Smads
CPC	chondrogene Progenitorzellen
Ct	*cycle threshold*, dt.: Schwellenwert-Zyklus
D1	*deep*
DAPI	4´,6-Diamidin-2-phenylindol
DG	Deckgläschen

DH5α	Erstbeschreiber: Douglas Hanahan; Labornummer: 5 alpha
DMEM	*Dulbecco´s Modified Eagle Medium*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EEA1	*early endosome antigen 1*
ER	endoplasmatisches Retikulum
EZM	extrazelluläre Matrix
FBS	*fetal bovine serum*, dt.: fetales Kälber-Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HECT	Homologous to the E6-AP Carboxyl-Terminus
HECT-Domäne	C-terminal gelegene Domäne des Smurf-Proteins
HECT-Familie	Untergruppe der E3-Ligasen
HEK-293-Zellen	*human embryonic kidney*
HRP	*horseraddish*-peroxidase (Enzym)
hTERT	*human telomerase reverse transcriptase*
ICD	*intracellular domain*
IgG	Immunglobulin G
Im	interterritoriale Matrix
I-Smads	inhibitorische Smads
LB	*lysogeny broth*
M1	*middle*
MH1	Mad Homology 1
MH2	Mad Homology 2
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	*messenger* RNA
Mv1Lu	*mustela vison* (*mink*), *lung*, *fetal*
MW	*molecular weight*
N-	Amino-
NIAMS	National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases
OA	Osteoarthrose
p	Signifikanz
P_{45}, P_{47}, P_{50}	Passage 45, 47 bzw. 50
PBS	*phosphat buffered saline*, dt: phosphatgepufferte Salzlösung

PCR	*polymerase chain reaction*, dt.: Polymerasekettenreaktion
Pm	perizelluläre Matrix
pSmurf1-Myc-DDK	Plasmid für Smurf1
pSmurf2-Myc-DDK	Plasmid für Smurf2
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PY	PY-Motiv oder PPxY: P = proline, x = any amino acid, und Y = tyrosine
qRT PCR	quantitative Echtzeit (*Real-Time*)-PCR
RNase	Ribonuklease
rpm	*revolutions per minute*, dt: Umdrehungen pro Minute
R-Smads	Rezeptor-regulierte Smads
RT	Raumtemperatur
RT-Transkriptionspuffer	reverse Transkriptase-Transkriptionspuffer
S1	*superficial*
SDS	*sodium dodecyl sulfate*
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Smurf	Smad ubiquitination regulatory factor
SSXS	Serin-Reste
TBS-T	Puffer-Gemisch aus *Tris-Buffered Saline* und *Tween*
TEMED	Tetramethylethylendiamin: Polymerisationskatalysator
TEP	Totalendoprothese
TGFBR1	TGF-ß-Typ I-Rezeptor
TGF-ß	*Transforming Growth Factor-ß*, dt.: transformierender Wachstumsfaktor
Tm	territoriale Matrix
TRAF	*tumor-necrosis factor receptor-associated factor*
UV	ultraviolett
WW	zwei Tryptophanreste (abgekürzt mit `W`)

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histologie des Gelenkknorpels 5

Abbildung 2: OA-Gelenkknorpel im histologischen Schnitt (A) sowie im Elektronenmikroskop (B) 8

Abbildung 3: TGF-ß-Signalweg 10

Abbildung 4: Das Ubiquitin-Proteasom-System 13

Abbildung 5: Extrazellulärer TGF-ß-Rezeptorkomplex als strukturelles Modell 16

Abbildung 6: Smurf1-Smad7-Komplex unterdrückt den TGF-ß-Signalweg 18

Abbildung 7: Exemplarische Immunzytochemie - Nachweis sowie Lokalisation des TGF-ß-Typ I-Rezeptors in CPCs. 50

Abbildung 8: Immunzytochemie – Negativkontrolle des Versuchs in 3.1.1 51

Abbildung 9: Auswertung der RT-PCR 52

Abbildung 10: Nachweis der Überexpression von Smurf1 in CPCs 53

Abbildung 11: Western Blot-Analyse - Nachweis des TGF-ß-Typ I-Rezeptors in unbehandelten und mit Smurf1 transfizierten CPCs 54

Abbildung 12: Western Blot-Analyse - Überexpression von Smurf1 in CPCs (CPC241ht) bewirkt eine Abnahme des Rezeptors auf Proteinebene 55

Abbildung 13: Nachweis der Überexpression von Smurf2 in CPCs 56

Abbildung 14: Western Blot-Analyse - Nachweis des TGF-ß-Typ I-Rezeptors in unbehandelten und mit Smurf2 transfizierten CPCs 57

Abbildung 15: Western Blot-Analyse - Überexpression von Smurf2 in CPCs (CPC 241ht) bewirkt eine Abnahme des Rezeptors auf Proteinebene 58

Abbildung 16: Auswertung der Western Blots mittels Densitometrie 59

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Umschreibung mRNA in cDNA 31

Tabelle 2: Master-Mix-Ansatz 32

Tabelle 3: RT-PCR-Protokoll: 45 Zyklen 33

Tabelle 4: PCR: Verwendete Primer 33

Tabelle 5: Western Blot: Zusammensetzung eines Gels 38

Tabelle 6: WB: Verwendete Primärantikörper 44

Tabelle 7: WB: Verwendete Sekundärantikörper 45

Tabelle 8: ICC: Verwendete Primärantikörper 48

Tabelle 9: ICC: Verwendete Sekundärantikörper 48

7 Literaturverzeichnis

Abdollah S, Macías-Silva M, Tsukazaki T, Hayashi H, Attisano L, Wrana JL (1997): TβRI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling. J Biol Chem 272, 27678–27685

Anderson DD, Chubinskaya S, Guilak F, Martin JA, Oegema TR, Olson SA, Buckwalter JA (2011): Post-traumatic osteoarthritis: improved understanding and opportunities for early intervention. J Orthop Res 29, 802–809

Asano Y, Ihn H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K (2004): Impaired Smad7-Smurf–mediated negative regulation of TGF-β signaling in scleroderma fibroblasts. J Clin Invest 113, 253–264

Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB (1983): Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. J Biol Chem 258, 7155–7160

Attisano L, Wrana JL (2002): Signal transduction by the TGF-β superfamily. Science 296, 1646–1647

Bijlsma JWJ, Berenbaum F, Lafeber FPJG (2011): Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. Lancet 377, 2115–2126

Bizet AA, Tran-Khanh N, Saksena A, Liu K, Buschmann MD, Philip A (2012): CD109-mediated degradation of TGF-β receptors and inhibition of TGF-β responses involve regulation of SMAD7 and Smurf2 localization and function. J Cell Biochem 113, 238–246

Blaney Davidson EN, Scharstuhl A, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB (2005): Reduced transforming growth factor-beta signaling in cartilage of old mice: role in impaired repair capacity. Arthritis Res Ther 7, R1338–R1347

Blaney Davidson EN, van der Kraan PM, van den Berg WB (2007): TGF-beta and osteoarthritis. Osteoarthr cartil 15, 597–604

Boumediene K, Conrozier T, Mathieu P, Richard M, Marcelli C, Vignon E, Pujol J-P (1998): Decrease of cartilage transforming growth factor-β receptor II expression in the rabbit experimental osteoarthritis—potential role in cartilage breakdown. Osteoarthr Cartil 6, 146–149

Buckwalter JA, Mankin HJ (1998) Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. Instr Course Lect 47 477–486

Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ (2005): Articular cartilage and osteoarthritis. Instr Course Lect 54, 465–480

Centrella M, Ji C, Casinghino S, McCarthy TL (1996): Rapid flux in transforming growth factor-beta receptors on bone cells. J Biol Chem 271, 18616–18622

Cheifetz S, Like B, Massagué J (1986): Cellular distribution of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta. J Biol Chem 261, 9972–9978

Cheifetz S, Weatherbee JA, Tsang ML, Anderson JK, Mole JE, Lucas R, Massagué J (1987): The transforming growth factor-β system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. Cell 48, 409–415

Chen YG, Hata A, Lo RS, Wotton D, Shi Y, Pavletich N, Massagué J (1998): Determinants of specificity in TGF-β signal transduction. Genes Dev 12, 2144–2152

Derynck R, Feng XH (1997): TGF-beta receptor signaling. Biochim Biophy Acta 1333, F105–150

Deutsche Arthrose-Hilfe e.V. | Häufigkeit (Stand 2015), URL: http://www.arthrose.de/arthrose/haeufigkeit.html

Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL (2003): Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. Nat Cell Biol 5, 410–421

Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T, Miyazono K (2001) Smurf1 interacts with transforming growth factor-β type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. J Biol Chem 276, 12477–12480

Felson DT (2006): Osteoarthritis of the knee. N Engl J Med 354, 841–848

Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG, Jordan JM, Kington RS, Lane NE, Zhang Y et al. (2000): Osteoarthritis: new insights. Part 1: The disease and its risk factors. Ann Intern Med 133, 635–646

Fox AJS, Bedi A, Rodeo SA (2009): The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. Sports Health 1, 461–468

Franzén P, Heldin CH, Miyazono K (1995): The GS domain of the transforming growth factor-beta type I receptor is important in signal transduction. Biochem Biophys Res Commun 207, 682–689

Goldring MB (2012): Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. Ther Adv Musculoskelet Dis 4, 269–285

Goldring MB, Goldring SR (2007): Osteoarthritis. J Cell Physiol 213, 626–634

Goldring MB, Marcu KB (2009): Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. Arthritis Res Ther 11, 224

Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K (2006): The control of chondrogenesis. J Cell Biochem 97, 33–44

Hata A, Lagna G, Massagué J, Hemmati-Brivanlou A (1998): Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. Genes Dev 12, 186–197

Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA Jr, Wrana JL et al. (1997): The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. Cell 89, 1165–1173

Hershko A (1996): Lessons from the discovery of the ubiquitin system. Trends Biochem Sci 21, 445–449

Hershko A, Ciechanover A (1998): The ubiquitin system. Annu Rev Biochem 67, 425–479

Hicke L (1999): Gettin´ down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. Trends Cell Biol 9, 107–112

Hollander AP, Dickinson SC, Kafienah W (2010): Stem cells and cartilage development: complexities of a simple tissue. Stem Cells 28, 1992–1996

Huang F, Chen YG (2012): Regulation of TGF-β receptor activity. Cell Biosci 2, 9

Inoue Y, Imamura T (2008): Regulation of TGF-β family signaling by E3 ubiquitin ligases. Cancer Sci 99, 2107–2112

Itoh S, ten Dijke P (2007): Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. Curr Opin Cell Biol 19, 176–184

Itoh S, Landström M, Hermansson A, Itoh F, Heldin CH, Heldin NE, ten Dijke P (1998): Transforming growth factor beta1 induces nuclear export of inhibitory Smad7. J Biol Chem 273, 29195–29201

Kang JS, Liu C, Derynck R (2009): New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function. Trends Cell Biol 19, 385–394

Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, Wrana JL (2000): Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. Mol Cell 6, 1365–1375

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

Koli KM, Arteaga CL (1997): Processing of the transforming growth factor β type I and II receptors. Biosynthesis and ligand-induced regulation. J Biol Chem 272, 6423–6427

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

Lin X, Liang M, Feng XH (2000): Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-β signaling. J Biol Chem 275, 36818–36822

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

Lönn P, Morén A, Raja E, Dahl M, Moustakas A (2009): Regulating the stability of TGFβ receptors and Smads. Cell Res 19, 21–35

Luo K (2004): Ski and SnoN: negative regulators of TGF-beta signaling. Curr Opin Genet Dev 14, 65–70

Massagué J, Chen YG (2000): Controlling TGF-β signaling. Genes Dev 14, 627–644

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

Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K (2002): Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. Genes Cells 7, 1191–1204

Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H (2001): Divergence and convergence of TGF-β/BMP signaling. J Cell Physiol 187, 265–276

Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH (2001): Smad regulation in TGF-beta signal transduction. J Cell Sci 114, 4359–4369

Mu Y, Sundar R, Thakur N, Ekman M, Gudey SK, Yakymovych M, Hermansson A, Dimitriou H, Bengoechea-Alonso MT, Ericsson J et al. (2011): TRAF6 ubiquitinates TGFβ type I receptor to promote its cleavage and nuclear translocation in cancer. Nat Commun 2, 330

Nakao A, Afrakhte M, Morén A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH et al. (1997): Identification of Smad7, a TGFβ-inducible antagonist of TGF-β signalling. Nature 389, 631–635

NIAMS: Fast Facts About Osteoarthritis, (Stand: November 2014) URL: http://www.niams.nih.gov/Health_Info/Osteoarthritis/osteoarthritis_ff.pdf

Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29, e45

Poole CA (1997): Articular cartilage chondrons: form, function and failure. J Anat 191 (Pt 1), 1–13

Reginster JY (2002): The prevalence and burden of arthritis. Rheumatology (Oxford) 41 Supp 1, 3–6

Savage C, Das P, Finelli AL, Townsend SR, Sun CY, Baird SE, Padgett RW (1996): Caenorhabditis elegans genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. Proc Natl Acad Sci USA 93, 790–794

Schmierer B, Hill CS (2007): TGFβ–SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. Nat Rev Mol Cell Biol 8, 970–982

Sekelsky JJ, Newfeld SJ, Raftery LA, Chartoff EH, Gelbart WM (1995): Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in Drosophila melanogaster. Genetics 139, 1347–1358

Shen J, Li S, Chen D (2014): TGF-β signaling and the development of osteoarthritis. Bone Res 2, 14002

Shi Y, Massagué J (2003): Mechanisms of TGF-β signaling from cell membrane to the nucleus. Cell 113, 685–700

Shi W, Sun C, He B, Xiong W, Shi X, Yao D, Cao X (2004): GADD34–PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFβ type I receptor. J Cell Biol 164, 291–300

Suzuki C, Murakami G, Fukuchi M, Shimanuki T, Shikauchi Y, Imamura T, Miyazono K (2002): Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane. J Biol Chem 277, 39919–39925

Valdes AM, Spector TD, Tamm A, Kisand K, Doherty SA, Dennison EM, Mangino M, Tamm A, Kerna I, Hart DJ et al. (2010): Genetic variation in the SMAD3 gene is associated with hip and knee osteoarthritis. Arthritis Rheum 62, 2347–2352

van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, Blom A, van den Berg WB (2009): TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: modulation and

integration of signaling pathways through receptor-Smads. Osteoarthr cartil 17, 1539–1545

Van Manen MD, Nace J, Mont MA (2012): Management of primary knee osteoarthritis and indications for total knee arthroplasty for general practitioners. J Am Osteopath Assoc 112, 709–715

Verdier MP, Seité S, Guntzer K, Pujol JP, Boumédiène K (2005): Immunohistochemical analysis of transforming growth factor beta isoforms and their receptors in human cartilage from normal and osteoarthritic femoral heads. Rheumatol Int 25, 118–124

Willis MS, Townley-Tilson WHD, Kang EY, Homeister JW, Patterson C (2010): Sent to destroy: the ubiquitin proteasome system regulates cell signaling and protein quality control in cardiovascular development and disease. Circ Res 106, 463–478

Woolf AD, Pfleger B (2003): Burden of major musculoskeletal conditions. Bull World Health Organ 81, 646–656

Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J (1994): Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. Nature 370, 341–347

Wu Q, Kim KO, Sampson ER, Chen D, Awad H, O´Brien T, Puzas JE, Drissi H, Schwarz EM, O´Keefe RJ et al. (2008): Induction of an osteoarthritis-like phenotype and degradation of phosphorylated Smad3 by Smurf2 in transgenic mice. Arthritis Rheum 58, 3132–3144

Yamada Y, Okuizumi H, Miyauchi A, Takagi Y, Ikeda K, Harada A (2000): Association of transforming growth factor beta1 genotype with spinal osteophytosis in Japanese women. Arthritis Rheum 43, 452–460

Yamashita M, Ying SX, Zhang GM, Li C, Cheng SY, Deng CX, Zhang YE (2005): Ubiquitin Ligase Smurf1 Controls Osteoblast Activity and Bone Homeostasis by Targeting MEKK2 for Degradation. Cell 121, 101–113

Zhang Y, Chang C, Gehling DJ, Hemmati-Brivanlou A, Derynck R (2001): Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. Proc Natl Acad Sci USA 98, 974–979

Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL, Thomsen GH (1999): A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. Nature 400, 687–693

Zuscik MJ, Hilton MJ, Zhang X, Chen D, O´Keefe RJ (2008): Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress. J Clin Investi 118, 429–438

Zwaagstra JC, Kassam Z, O´Connor-McCourt MD (1999): Down-regulation of transforming growth factor-β receptors: cooperativity between the types I, II, and III receptors and modulation at the cell surface. Exp Cell Res 252: 352–362

Danksagung

Herr Prof. Dr. med. Miosge gab mir nach Beendigung meines Studiums die Möglichkeit, noch verspätet eine Doktorarbeit zu beginnen. Bei allen Problemen, Fragen und Unklarheiten unterstütze er mich, war immer spontan ansprechbar und diskussionsbereit. Hierfür gilt ihm mein besonderer Dank.

Danken möchte ich außerdem der gesamten Arbeitsgruppe „Orale Biologie ", allen voran Christa Bode, aber auch Andrea Bernhard, die mir stets mit Rat und Tat im Labor zur Seite standen.

Schließlich danke ich allen Mitdoktoranden, die mir die Zeit im Labor unvergesslich gemacht haben.

Lebenslauf

Am 19.02.1990 wurde ich als jüngste Tochter von drei Kindern meiner Eltern Ingrid Blume, geb. Effenberger, und Dr.-Ing. Franz Blume in Hildesheim geboren. Meine Mutter hat eine Ausbildung zur Fremdsprachenkorrespondentin abgeschlossen und ist seit der Geburt ihrer drei Kinder Hausfrau. Mein Vater ist am 29.08.2008 verstorben. Er war von Beruf Bauingenieur. Mein 32-jähriger Bruder Johannes arbeitet als Anwalt in Hannover und mein 29-jähriger Bruder Magnus ist als Ingenieur für Elektrotechnik in Hamburg tätig.

Aufgewachsen bin ich in Schulenburg an der Leine, einem Dorf im Landkreis Hannover, in dem ich von 1996-2000 die Grundschule besuchte.

Von 2000-2009 setzte ich meine Schullaufbahn am Bischöflichen Gymnasium Josephinum in Hildesheim fort und legte dort im Juli 2009 mein Abitur ab.

Anschließend absolvierte ich ein zweimonatiges Praktikum in einer Zahnarztpraxis in Duingen.

Durch die Teilnahme an einem Auswahlgespräch begann ich das Studium der Zahnmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen zum Wintersemester 2009. Am 1.12.2014 beendete ich mein Studium erfolgreich mit dem Staatsexamen.

Seit Februar 2015 bin ich Doktorandin im Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde in der Arbeitsgemeinschaft orale Biologie und Geweberegeneration unter der Leitung von Prof. Dr. med. Nicolai Miosge.

Seit dem 01.09.2015 arbeite ich als Assistenzzahnärztin in einer Zahnarztpraxis in Geldersheim.