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

Der Einfluss der Wachstumsfaktoren TGF-β3 und EGF sowie des Matrixmoleküls Biglycan auf die Gene SOX9 und RUNX2 in chondrogenen Progenitorzellen

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

vorgelegt von

Stefan Schimmel

aus Rinteln

Göttingen 2016

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
I. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. N. Miosge
II. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. med. dent. K. G. Wiese
III. Berichterstatter:	Prof. Dr. mult. T. Meyer
Tag der mündlichen Prüfung:	22.09.2016

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis **IV**

Tabellenverzeichnis **V**

Abkürzungsverzeichnis **VI**

1 Einleitung **1**

1.1 Das Knorpelgewebe . . . 1
1.2 Osteoarthritis . . . 5
1.2.1 Therapienmöglichkeiten von Osteoarthritis . . . 8
1.2.2 Die Rolle von chondrogenen Progenitorzellen . . . 11
1.3 SOX9 und RUNX2 als Meditoren der Osteochondrogenese . . . 14
1.3.1 SOX9 . . . 14
1.3.2 RUNX2 . . . 14
1.4 Der TGF-β-Rezeptor und sein Ligand TGF-β3 . . . 17
1.4.1 Der Rezeptor . . . 17
1.4.2 Die Liganden und Signalkaskaden . . . 17
1.4.3 Die Rolle im Knorpel . . . 17
1.5 Biglycan . . . 20
1.5.1 Aufbau, Funktion und Rolle im Knorpel . . . 20
1.6 Der EGF-Rezeptor und sein Ligand EGF . . . 22
1.6.1 Der Rezeptor . . . 22
1.6.2 Die Liganden und Signalkaskaden . . . 22
1.6.3 Die Rolle im Knorpel . . . 23
1.7 Fragestellung . . . 25

2 Material und Methoden **26**

2.1 Gewebeproben und Zellen . . . 26
2.2 Zellkultur . . . 26
2.2.1 Zellisolation . . . 27
2.2.2 Alginatkultur . . . 27
2.2.3 Stimulation mit Signalmolekülen . . . 28
2.3 siRNA-Knockdown . . . 29
2.4 Real-time PCR . . . 30
2.4.1 Primerdesign . . . 30
2.4.2 Primer . . . 33
2.4.3 cDNA-Synthese . . . 33
2.4.4 Durchführung der PCR . . . 34
2.4.5 Bestimmung des relativen mRNA-Gehaltes . . . 35

2.5 Proteinbestimmung 36
2.5.1 SDS-Page 36
2.5.2 Western Blot 38
2.5.3 Bestimmung des relativen Proteinniveaus 41
2.6 HE-Färbung 42
2.7 Immunhistochemie 43
2.8 Immuncytochemie 45

3 Ergebnisse **46**
3.1 Rezeptornachweis 46
3.1.1 TGF-β3-Rezeptor 46
3.1.2 EGF-Rezeptor 49
3.2 Nachweis der Signalmoleküle 51
3.2.1 TGF-β3 im gesunden und kranken Knorpel 51
3.2.2 Biglycan im gesunden und kranken Knorpel 52
3.2.3 EGF im gesunden und kranken Knorpel 53
3.3 TGF-β3 Einfluss die Synthese von Biglycan 54
3.3.1 Einfluss von TGF-β3 auf das Biglycan-mRNA-Level 54
3.3.2 Einfluss von TGF-β3 auf die Biglycan Proteinexpression 55
3.4 Biglycan Einfluss auf die EGF-Rezeptor Synthese 56
3.5 TGF-β3 und EGF Einfluss auf die Expression von SOX9 und RUNX2 57
3.5.1 Einfluss von TGF-β3 auf die SOX9- und RUNX2-mRNA 57
3.5.2 Einfluss von EGF auf die SOX9- und RUNX2-mRNA 58
3.5.3 Einfluss von TGF-β3 und EGF auf das Proteinniveau von SOX9 und RUNX2 60
3.6 Knockdown des EGF-Rezeptors 62

4 Diskussion **63**
4.1 Welchen Einfluss hat die Stimulation mit TGF-β3 auf die Expression von BGN? 63
4.1.1 Die Expression des TGF-β-Rezeptors 63
4.1.2 Die Expression von TGF-β3 64
4.1.3 Der Einfluss der Stimulation von CPCs durch TGF-β3 auf die BGN-Synthese 64
4.2 Welchen Einfluss haben Änderungen der BGN-Expression auf die des EGF-Rezeptors? 65
4.2.1 Die Expression von BGN 65
4.2.2 Die Expression des EGF-Rezeptors 65
4.2.3 Die Expression von EGF 66
4.2.4 Der Einfluss von BGN auf den EGF-Rezeptor 66
4.3 Wie wirkt sich eine Stimulation mit TGF-β3 und EGF auf die Expression von SOX9 und RUNX2 aus? 67

4.4 Fazit und Ausblick: Die Mediatoren TGF-β3, EGF und BGN als mögliche Kausalkette in der Regeneration von OA 68

5 Zusammenfassung 70

6 Literaturverzeichnis 71

Abbildungsverzeichnis

1 Der gesunde Knorpel 1
2 Schematische Darstellung des gesunden Gelenkes 2
3 Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix 4
4 Osteoarthritischer Knorpel 5
5 Schematische Darstellung der Veränderungen bei OA 7
6 Grundlegende therapeutische Optionen bei Osteoarthritis 8
7 Konzept der chondrogenen Progenitorzellen 11
8 OA Knorpel und chondrogene Progenitorzellen 13
9 Schematische Darstellung der SOX9 Regulation 15
10 Schematische Darstellung der RUNX2 Regulation 16
11 TGF-β-Liganden und Ziele 19
12 Interaktion von Biglycan mit der TGF-β-Familie 21
13 Übersicht des EGF-Signalweges 24
14 Schmelzkurve am Beispiel des TGF-Rezeptors 31
15 Beispiel für die Sequenzierung eines PCR Produktes 32
16 qPCR des TGF-β-Rezeptors 46
17 Immunhistochemischer und Immunfluoreszenz Nachweis des TGF-β-Rezeptors 48
18 qPCR des EGF-Rezeptors 49
19 Immunhistochemischer und Immunfluoreszenz Nachweis des EGF-Rezeptors 50
20 Immunhistochemischer Nachweis von TGF-β3 51
21 Immunhistochemischer Nachweis von Biglycan 52
22 Immunhistochemischer Nachweis von EGF 53
23 qPCR von BGN nach TGF-β3 Stimulation 54
24 WB von BGN nach TGF-β3 Stimulation 55
25 WB des EGF-Rezeptors nach BGN Knockdown 56
26 qPCR von SOX9 und RUNX2 nach TGF-β3 Stimulation 57
27 qPCR von SOX9 nach EGF Stimulation 58
28 qPCR von RUNX2 nach EGF Stimulation 58
29 Einfluss von TGF-β3 und EGF auf das Proteinniveau von SOX9 und RUNX2 60
30 Quantifizierung der Western Blot Ergebnisse für SOX9 61
31 Quantifizierung der Western Blot Ergebnisse für RUNX2 61
32 siRNA-Knockdown des EGF-Rezeptors 62
33 Die Mediatoren als mögliche Kausalkette in der Regeneration von OA . . . 69

Tabellenverzeichnis

1 Biologischer Prozesse und mögliche Therapieansätze von OA 10
2 TGF-β-Liganden und Ziele 19
3 Primer 33
4 Antikörper Western Blot 39
5 Antikörper Immunhistologie 44
6 Antikörper Immuncytochemie 45
7 qPCR des TGF-β-Rezeptors 47
8 qPCR des EGF-Rezeptors 49
9 Einfluss von EGF auf die SOX9-/ RUNX2-mRNA 59

Abkürzungsverzeichnis

ADAMTS	*A Disintegrin And Metalloproteinase With Thrombospondin Motifs*
Akt	Proteinkinase B
BGN	Biglycan
BMP	*Bone Morphogenetic Protein*
CCD	Cleidokraniale Dysplasie
CD	*Cluster of Differentiation*
CPC	chondrogene Progenitorzelle
CPC241ht	immortalisierte chondrogenene Progenitorzellen
DDR-2	*Discoidin Domain-Containing Receptor 2*
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	*Epidermal Growth Factor*
EGFR	EGF-Rezeptor
ERK	*Extracellular-signal Regulated Kinase*
EZM	extrazelluläre Matrix
FGF	*Fibroblast Growth Factor*
GDF	*Growth Differentiation Factor*
GRB2	*Growth Factor Receptor-bound Protein 2*
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
HGF	*Hepatocyte Growth Factor*
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HKG	Haushaltsgen
HMG	*High Mobility Group*
hTERT	*Human Telomerase Reverse Transcriptase*
ICC	Immuncytochemie
IHC	Immunhistochemie
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	*messenger RNA*
MSC	mesenchymale Progenitorzellen
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
OA	Osteoarthritis
p38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
p-ERK	phosphoryliertes ERK
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
p-SMAD	phosphoryliertes SMAD

PTH	Parathormon
qPCR	quantitative real-time PCR
RAS	*Rat Sarcoma Protoonkogen*
RNA	Ribonukleinsäure
RUNX2	*Runt-Related Transcription Factor 2*
SDS-Page	Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	*Small interfering RNA*
SLRP	*Small Leucine-rich Proteoglycan*
SMAD	*Small Body Size Mothers Against Decapentaplegic*
SOS	*Son of Sevenless*
SOX9	SRY *(Sex Determining Region Y)-Box 9*
TEP	Totalendoprothese
TGF	*Transforming Growth Factor*
TGFR	TGF-Rezeptor
TM	*Tidemark*
TNF	Tumornekrosefaktor
VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*

1 Einleitung

Osteoarthritis ist eine degenerative Erkrankung des Knorpels, deren Pathogenese und Behandlung nach wie vor Gegenstand der Forschung sind und deren Erforschung eine immer größere Relevanz bekommt. Es soll deshalb zunächst die physiologische Beschaffenheit des Knorpelgewebes beschrieben werden, um darauf die Mechanismen und pathologischen Ereignisse zu beschreiben, die zur Destruktion des Gewebes und letztendlich zum Krankheitsbild der Osteoarthritis führen. Darauf folgend werden die momentanen Behandlungsmöglichkeiten der Erkrankung und die potentielle Bedeutung von chondrogenen Progenitorzellen als regenerativer Ansatz skizziert. Es wird auf die Moleküle und Rezeptoren eingegangen, die für diese Arbeit relevant sind und die zu bearbeitende Fragestellung erläutert.

1.1 Das Knorpelgewebe

Der menschliche Knorpel ist gekennzeichnet durch seine geringe Anzahl an Zellen, die Chondrozyten, die eine vergleichsweise große extrazelluläre Matrix (EZM) bilden. In den Diathrosen des Menschen bildet hyaliner Knorpel die Gelenksflächen und sorgt mit Widerstandskraft und gleichzeitiger Verformbarkeit für eine fließende Bewegung der Extremitäten. Speziell im Kniegelenk, der Articulatio genus, müssen die Knochen enormen Druckkräften standhalten, die an den hyalinen Knorpel besondere Ansprüche stellen (Poole 1997).

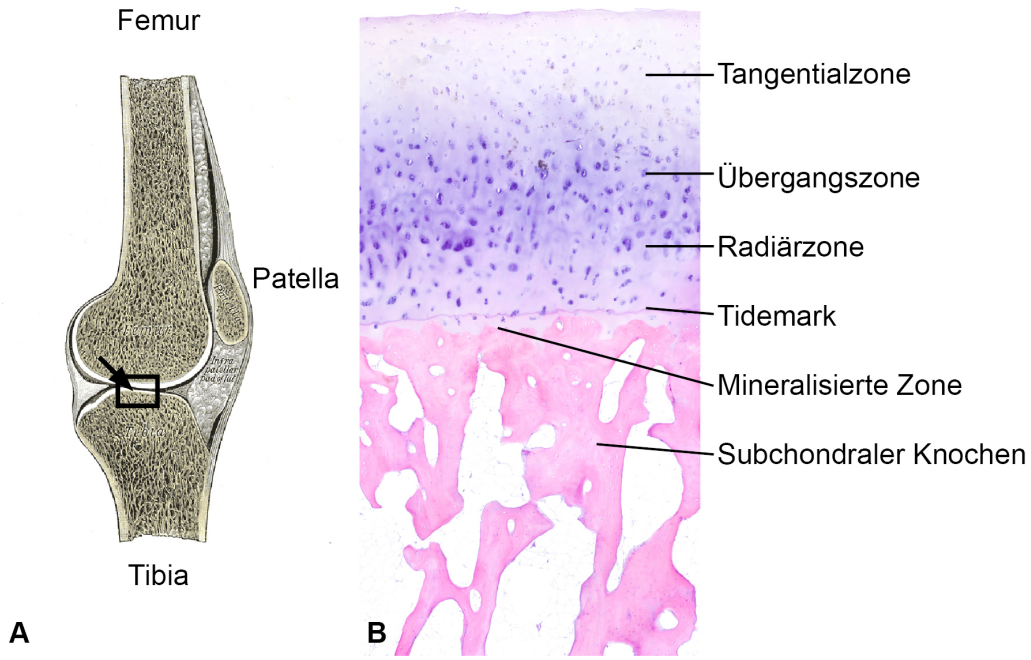

Abbildung 1: **Der gesunde Knorpel**

Makroskopie und Mikroskopie des Kniegelenks. A: Schematischer Schnitt durch das Kniegelenk; modifiziert nach Gray (1918), Abbildung von http://www.bartleby.com/107/93.html. Im Knie bilden das Femur und die Tibia den knöchernen Anteil des Gelenkes. Dieser wird durch einen Überzug aus hyalinem Knorpel geschützt. B: Übersicht zum mikroskopischen Aufbau des hyalinen Knorpels. HE-Färbung Tibiaplateu Mensch, 10×.

Die Articulatio genus besteht aus einem Gelenkspalt, der durch Tibia und Femur gebildet wird. Auf dem Knochen setzt der hyaline Knorpel als Überzug auf. Die Diathrosen werden durch Bindegewebsstrukturen, die die Gelenkkapsel bilden, gestützt und zusammengehalten. Diese wird von einer Membran, der Synovialmembran, ausgekleidet. Sie besteht aus einer Membrana synovialis, deren Funktion vor allem in der Bildung von Synovialflüssigkeit besteht, einem Dialysat des Blutplasmas, das den Knorpel ernährt und mit Sauerstoff versorgt. Außerdem wird sie aus einer Membrana fibrosa gebildet, die aus straffem Bindegewebe besteht und in den Knochen und die Sehnen des Gelenkknorpels einstrahlt, um eine zusätzliche Stabilität zu gewährleisten. Eine Besonderheit im Kniegelenk sind die beiden Menisken, die sich keilförmig zwischen das artikulierende Gelenk schieben, um die Druckkräfte zu verteilen, ein Gleiten der Gelenke zu ermöglichen und den Knorpel zu entlasten (Makris et al. 2011).

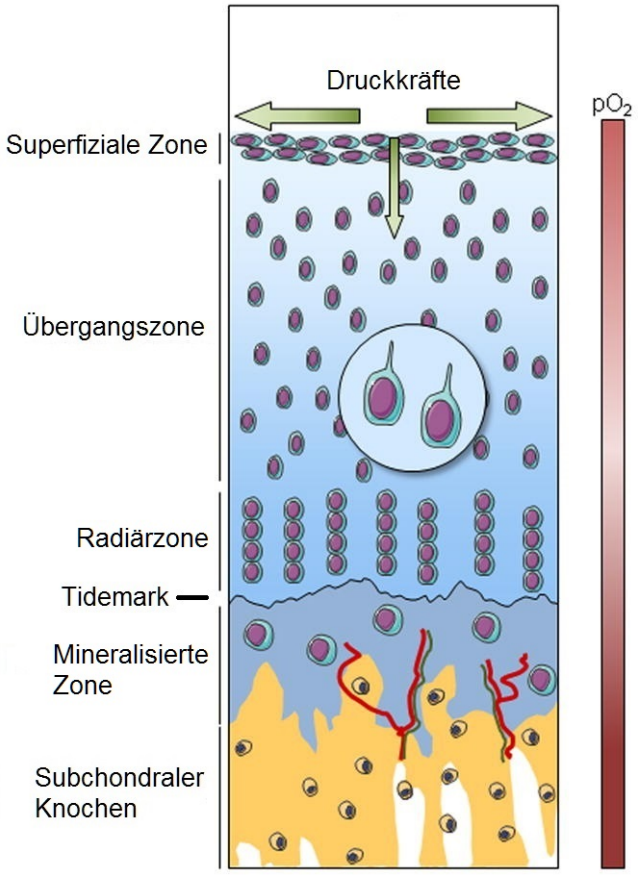

Abbildung 2: **Schematische Darstellung des gesunden Gelenkes**

Der hyaline Knorpel wird in verschiedene Schichten unterteilt. Die superfiziale Zone oder tangentiale Zone mit quer angeordneten Chondrozyten. Die Intermediärzone oder Übergangszone, in der die Chondrozyten eher spärlich und rundlich-sphärisch imponieren. Die Radiärzone mit säulenförmigen Chondrozyten und die darunter liegende mineralisierte Zone, getrennt vom oberen Bereich durch die TM. Durch die spezielle Anordnung können Druckkräfte effizient abgefedert werden. Die Chondrozyten leben in einer sauerstoffarmen Umgebung. Der O_2-Gehalt ist in den inneren Schichten des Knorpels am geringsten, versorgt werden die Chondrozyten durch die Blutgefäße (in rot), die in die kalzifizierte Zone einsprießen und durch die Synovialflüssigkeit per Diffusion. Nervenfasern sind erst unterhalb des hyalinen Knorpels zu finden (grün). Abbildung modifiziert nach Houard et al. (2013), S. 2.

Der hyaline Knorpel selbst entsteht während der Embryonalentwicklung als Derivat des Mesoderms. Er stellt die einzige Knorpelform dar, die während dieser Entwicklung entsteht und während des Alters bestehen bleibt. Mikroskopisch lässt sich der Knorpel in verschiedene Schichten einteilen: Eine oberflächliche Schicht, die Tangentialzone, die durch abgeflachte, diskusähnliche Chondrozyten gekennzeichnet ist. In dieser Schicht bilden Kollagenfassern dicht gepackte arkadenförmige Bündel. In der mittlere Schicht, der Überganszone, imponieren die Chondrozyten eher rundlich-sphärisch und die Kollagene bilden einen Übergang zwischen der oberflächlichen Schicht und der tiefen Schicht, der Radiärzone. In der Radiärzone ordnen sich die rundlichen Chondrozyten zu Säulen an und bilden mit dem strahlenförmig angeordneten Kollagen und der proteoglykanreichen EZM den Boden des Knorpels auf dem subchondralen Knochen. Der hyaline Knorpel beginnt zu kalzifizieren und geht in den Knochen über, wobei er lediglich durch eine dünne Membran, der Tidemark (TM), von dem darüberliegenden Gewebe getrennt wird (Abbildung 1, S. 1 und Abbildung 2, S. 2; Poole 1997).

Die Chondrozyten sind in eine avaskuläre, alymphatische und anervale Matrix eingebettet, die im adulten Knorpel vor allem aus Wasser (70 %), Kollagenen (50 % der Trockemasse), Proteoglykanen und nichtkollagenen Proteinen sowie Glykoproteinen besteht (Kuettner 1992). Haupt- und strukturbildendes Molekül der EZM ist mit 50 % das fribrilläre Kollagen II, das aus drei ineinander verdrehten Polypeptidketten als Prokollagen entsteht und sich nach Modifikation arkadenförmig im Knorpel ausbreitet. Es sorgt mit Untersützung der Kollagene IX, X, XI und VI sowie den proteoglykanähnlichen Molekülen Fibromodulin und Decorin, denen mehr eine Signal- und Verknüpfungsfunktion zugeordnet wird, für eine stabile Matrix und ist damit strukturbildendes und charakteristisches Merkmal für den gesunden Knorpel (Tesche und Miosge 2005). Eine weitere wichtige Gruppe neben den Kollagenen sind Proteoglykane wie Aggrecan und die Glykosaminoglykane wie Hyaluronsäure, die mit ihren Zucker- und negativen Seitenketten (u.a. Phosphatresten) für die hohe Wasserbindungsfähigkeit des Knorpels zuständig sind und wie eine Art Gelpolster dynamisch Druckbelastungen abfangen (Roughley 2006). In dieser Matrix eingebettet machen Chondrozyten mit ca. 5 % Anteil im Gewebe nur einen geringen Anteil aus. Im hyalinen Knorpel liegen sie vereinzelt oder in Gruppen (Chondrone) vor, die als funktionelle Einheiten für den Erhalt der EZM zuständig sind (Kuettner 1992).

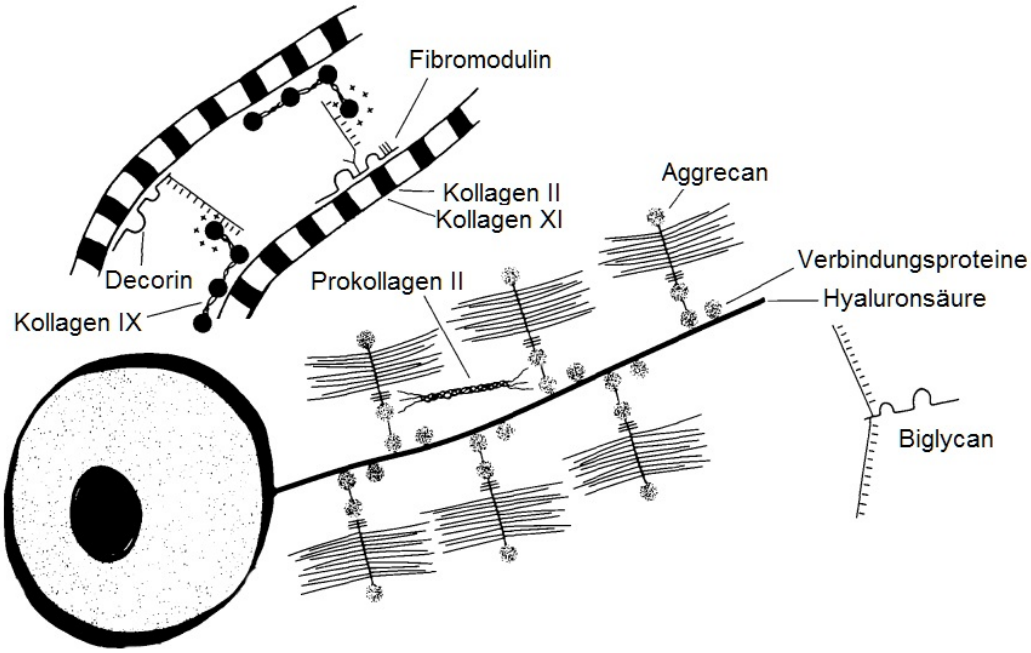

Abbildung 3: **Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix**

Die Hauptstrukturen der Knorpelmatrix. Die Stabilität wird vor alle durch Kollagen II und seine Hauptverbindungsproteine Kollagen IX/ XI, Decorin und Fibromodulin gegeben, die Flexibilität durch das wasserbindende Proteoglykan Aggrecan und Hyaluronsäuren sowie Biglycan. Modifiziert nach Kuettner (1992), S. 158.

1.2 Osteoarthritis

Osteoarthritis (OA) ist eine chronische Erkrankung, die durch entzündliche und degenerative Prozesse an menschlichen Gelenken gekennzeichnet ist. Typische Symptome der Patienten sind Schmerzen, Schwellungen und Motilitätsstörungen, einhergehend mit Veränderungen in der Gelenkbeschaffenheit. Einer der Hauptentstehungsorte für die OA ist das Kniegelenk. Es kommt dort zur Fibrillisierung des Knorpels, zum Verlust der hyalinen Knorpelschicht und zum Umbau der Matrix (Abbildung 4). OA stellt damit den Endpunkt verschiedener pathologischer Prozesse dar (Guilak et al. 2004).
Im Verlauf der Erkrankung verliert der Knorpel an Integrität, und es entstehen immer mehr Funktionseinschränkungen. Hierbei spielen mechanische Belastung, Alter sowie genetische Prädispositionen als typische Auslöser dieser Krankheit, deren genauer Mechanismus noch nicht vollständig aufgedeckt ist, eine entscheidene Rolle (Goldring und Goldring 2007; Loeser et al. 2012). Die OA ist eine der häufigsten Gelenkserkrankungen im Alter und könnte im Jahr 2020 die vierthäufigste Erkrankung sein, die den Menschen in seiner Bewegung einschränkt (Koelling et al. 2009).

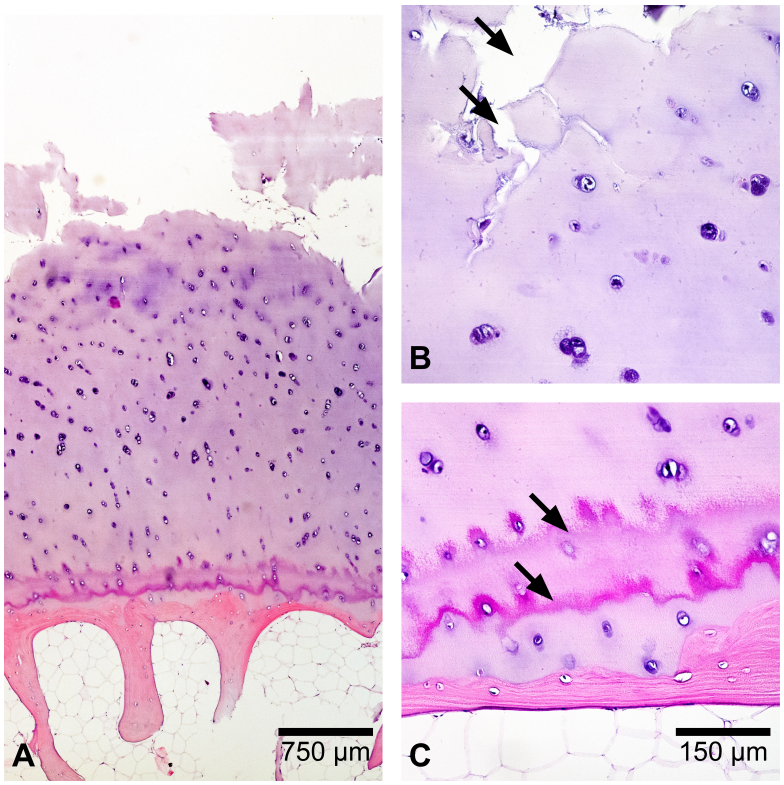

Abbildung 4: **Osteoarthritischer Knorpel**

Mikroskopie des Kniegelenks. A: Osteoarthritischer Knorpel, HE-Färbung Tibiaplateu Mensch, 10×. B: Ausschnitt aus der Tangentialzone des Knorpels. Stark degenerierte Oberfläche, HE-Färbung Tibiaplateu Mensch, 40×. C: Ausschnitt im Bereich um die TM. Hier fällt die für OA typische Verdopplung der TM mit starker Kalzifizierung des umliegenden Gewebes auf (Pfeile), HE-Färbung Tibiaplateu Mensch, 40×.

Im gesunden hyalinen Knorpel des Menschen zeigen sich Chondrozyten als ruhende und stoffwechselarme Zellen. Die ersten Veränderungen, die zur Degeneration der Knorpelmatrix führen, zeigen sich in einer Aktivierung der Chondrozyten, welche unter anderem durch Mechanorezeptoren ausgelöst wird. Diese fangen an zu proliferieren, Cluster zu bilden und steigern die Produktion von Enzymen, die die Matrix angreifen (Houard et al. 2013).
Dies geschieht in den frühen Phasen der OA zunächst an den Oberflächen an denen die Belastung am größten ist. Die aktivierten Chondrozyten beginnen Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und ADAMTS (*A Disintegrin And Metalloproteinase With Thrombospondin Motifs*) zu bilden. MMP-3 und ADAMTS-5 greifen als Aggrecanasen vor allem Aggrecan an. Es kommt zur Ausschüttung von MMP-13, welches sehr effizient Kollagen II angreift. Durch diese Mechanismen kann das native Kollagen II, welches normalerweise keinen Kontakt zu den Chondrozyten hat, mit diesen interagieren. Es bindet an den DDR-2-Rezeptor (*Discoidin Domain-Containing Receptor 2*) und es kommt zur weiteren MMP-13-Ausschüttung. Es entstehen viele Matrixdegenerationsprodukte, die in einer Feedbackreaktion die Desktruktion des Knorpels weiter eintreiben. Zusammen mit anderen ausgeschütteten Mediatoren wie z.B. HIF-2α (Hypoxie-induzierter Faktor-2α) oder TNFα (Tumornekrosefaktor α) kommt es zur vermehrten Ausschüttung von proinflammatorischen Substanzen, Chemokinen und zur weiteren Matrixdegeneration (Abbildung 5, S. 7; Goldring und Goldring 2007; Loeser et al. 2012).
In der frühen Phase der OA wird dies noch durch eine gesteigerte Sekretion von Kollagen II kompensiert. Die Chondrozyten unterliegen jedoch im Verlauf einem phänotypischen Wechsel und zeigen sich morphologisch in einer fibroblastenähnlichen Form bzw. stellen eine eigene Subpopulation von Zellen dar, die sich aus chondrogenen Vorläuferzellen entwickelt haben könnten (Tesche und Miosge 2005; Koelling et al. 2009). Andere Chondrozyten z.B. weisen einen eher runden Phänotyp auf und formen sich zu Clustern in der Matrix (Miosge et al. 1998). Es kommt in den späteren Phasen zu einer vermehrten Sekretion von Kollagen I und III, welche den Hauptstrukturbildner Kollagen II ablösen und die Desintegrität des Knorpels fördern (Poole 1999; Tesche und Miosge 2005). Außerdem kommt es zur Ausschüttung von proinflammatorischen und katabolen Enzymen wie Interleukinen, Prostaglandinen, Bone Morphogenic Proteinen (BMPs) und des *Transforming Growth Factor*-β (TGF-β) (Guilak et al. 2004; Goldring und Goldring 2007). Es zeigt sich eine Änderungen des Vorkommens der Proteoglykane Biglycan (BGN) und Perlecan. Diese Proteoglykane befinden sich hauptsächlich in der perizellulären Matrix der Chondrozyten (Tesche und Miosge 2005). Perlecan interagiert mit den Chondrozyten und ist dabei in die Regulation der Differenzierung beteiligt und interagiert mit verschiedensten Matrixmolekülen (Bock et al. 2001; Tesche und Miosge 2005). BGN befindet sich vor allem in der Radialzone des Knorpels und kann dort als Zeichen eines möglichen Regenerationsversuches gewertet werden. Das Molekül kann in den meisten Bindegeweben gefunden werden. Es ist dort als Strukturbildner bzw. auch als Signalmolekül vertreten und wird in einem der späteren Kapitel genauer beschrieben (Tesche und Miosge 2005; Nastase et al. 2012).

Zusammenfassend kommt es in der Initialphase der OA durch angeborene Faktoren, mechanische Verletzungen oder dem hohen Lebensalter zur Aktivierung von stressinduzierten Signalwegen. Durch wiederholte Einflüsse beginnt die frühe Phase der OA. Sie ist gekennzeichnet durch Proliferation und Clusterformation von Chondrozyten. Es kommt zu ersten Degenerationen und zu weiteren Zytokinausschüttungen. Im Verlauf entstehen dann in den späten Formen der OA erste Apoptosezeichen, es kommt zur Hypertrophie der Chondrozyten, die Kollagentypen verändern sich und es entstehen Osteophyten sowie erste Tidemarkduplikate (Loeser et al. 2012).

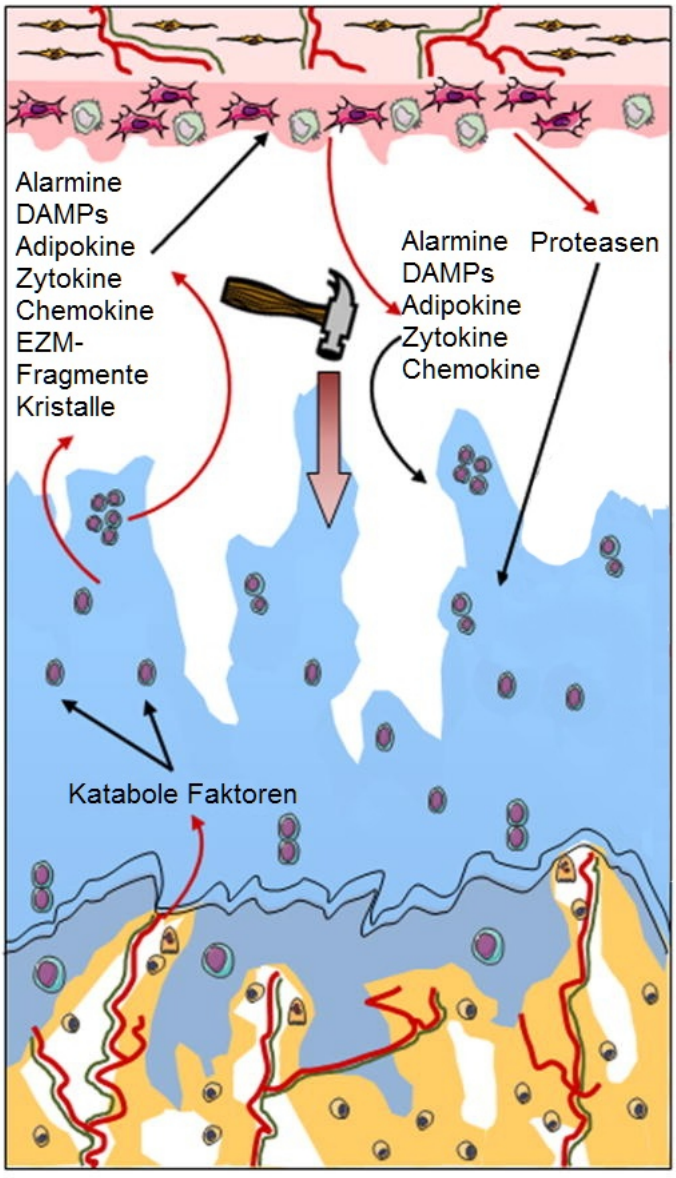

Abbildung 5: **Schematische Darstellung der Veränderungen bei OA**

Es kommt im OA-Knorpel zur Degeneration der Matrix. Die Chondrozyten unterliegen einem phänotypischen Wechsel und werden aktiv. Sie exprimieren verschiedene Faktoren und Rezeptoren wie Zytokine, Chemokine, Alarmine, DAMPs (*Damage-associated molecular pattern molecules*) und Adipokine. Außerdem kommt zu es Veränderungen im subchondralen Knochen und zur Gefäßeinsprießung (rot). Der Knorpel gelangt in einen Teufelskreis, der zusätzlich durch Inflammation in der Synovia und durch Makrophagen sowie Fibroblasten verstärkt wird. Abbildung modifiziert nach Houard et al. (2013), S. 4.

1.2.1 Therapienmöglichkeiten von Osteoarthritis

Die Therapie der OA ist, wie bei den meisten Erkrankungen, von dem Progress der Krankheit abhängig. Entscheidend für die therapeutischen Optionen ist, neben der klinischen Manifestation, die sich in den Symptomen äußert, auch die Konstitution des Patienten, die durch Komorbiditäten beeinflusst wird (Lohmander und Roos 2007).

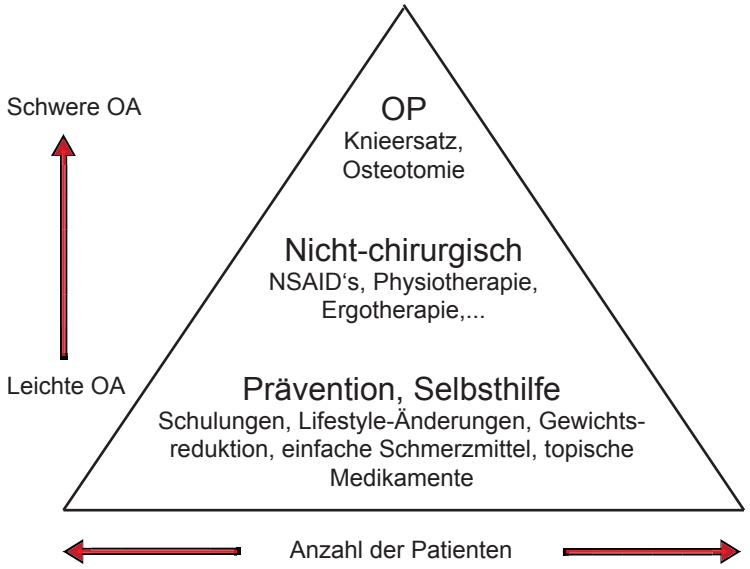

Abbildung 6: **Grundlegende therapeutische Optionen bei Osteoarthritis**
In Behandlung der OA steht zunächst die präventive Therapie im Vordergrund. Durch konservative Maßnahme können erste Leiden verhindert bzw. gebessert werden. Erst in den schwerern Phasen der OA soll mit spezifischeren Medikamenten eingegriffen werden bzw., als Ultima ratio, ein operatives Vorgehen eingeleitet werden. Abbildung modfiziert nach Lohmander und Roos (2007), S 2083.

Die heutige therapeutische Breite in der Behandlung erstreckt sich von präventiven Maßnahmen bzw. unterstützenden Maßnahmen wie Gewichtsreduktion und Lebensstiländerungen bis hin zur Operation als Ultima Ratio (Abbildung 6). Ein Großteil der OA-Patienten fällt mit starkem Übergewicht und mangelnder Bewegung auf. Natürlich ist es primäres Ziel der medizinischen Betreuung hier einzugreifen, gerade wenn die Symptome noch nicht sehr ausgeprägt sind und sich durch diese „Basis"-Maßnahmen ein Fortschreiten der Krankheit aufhalten bzw. verhindern lässt. Die Patienten müssen auf ihre Verhaltensweisen geschult werden und lernen sich, durch entsprechende Bewegungstherapie, wieder moderat in den Alltag zu integrieren (Roddy und Doherty 2006).
Unterstützt werden kann dies bei leichten Schmerzen durch leichte Analgetika wie z.B. Paracetamol. Erst in den schwereren Verlaufsformen sollte dann, durch z.B. nicht-steroidale Entzündungshemmer (NSAIDs), eingegriffen werden oder durch intraartikulare Injektionen versucht werden eine Schmerzlinderung zu erreichen. Ist der Prozess der Erkrankung nicht mehr aufzuhalten und sind die Symptome stark ausgeprägt, ist eine Operation des Kniegelenkes als Möglichkeit in Betracht zu ziehen. Hierbei spielen Alter, Komorbidität und vor allem der Leidensdruck des Patienten eine große Rolle in der Indikationsfindung. Minimalinva-

siv ist es z.B. möglich intraartikulär Läsionen zu setzen, um den Knorpel zur Proliferation und Differenzierung anzuregen. Dies ist meist nur bedingt von Erfolg gekrönt, da es lediglich zum Ersatz des hyalinen Knorpels durch fibrotisches Material kommt. Die bisher einzige Möglichkeit mit dauerhaftem Erfolg bei der Behandlung von OA ist deshalb die Totalendoprothese (TEP), bei der das Gelenk durch Prothesen ersetzt wird (Lohmander und Roos 2007; Muhammad et al. 2013).
Es ist deshalb von großem Interesse weitere Therapieoptionen zu entwickeln und neue Möglichkeiten zur Behandlung zu finden. Neben dem Nutzen von Zelltransplantationen und Differenzierung von Zellen mit regenerativer Kapazität (näheres im folgenden Kapitel), soll die nachfolgende Tabelle einen Überblick über mögliche Ziele einer zukünftigen Therapie geben.

Tabelle 1: **Biologischer Prozesse und mögliche Therapieansätze von OA**

Biologischer Prozess	Mögliche Mediatoren	Mögliche Therapieansätze
Matrixdegeneration	MMP 1,3,9 und 13; ADAMTS 4 und 5, Cathepsin K, Serin-Proteasen (HTRA-1) unter Einfluss von IL-1,6,7,8,17,18 und OSM; Chemokine (IL-8, GROα, GROγ, RANTESm MCP-1), S100 Proteine, TGF-α, Matrixfragmente, Leukotriene, Prostaglandine	Proteaseinhibitoren, TIMPs, Antizytokintherapie, TLR-Inhibition, MAP-Kinase-Inhibitoren, NF-κB-Inhibitoren, Lipoxygenase- und COX-Inhibitoren
Reduzierte Matrixreparatur und Zelltod	Reduzierte Aktivität von IGF-1, TGFβ, BMP7 (OP-1), FGF-18 sowie HMGB-2 und Autophagy; Reaktive Sauerstoff- und Nitrogenspezies	Wachstumsfaktoren, Caspase-Inhibitoren Antioxidantien, iNOS-Inhibitoren
Hypertrophie von Chondrozyten, Kalzifizierung, Sklerosierung des subchondralen Knochens	RUNX2, HIF-2α, Wnt/β-catenin, IL-8, Transglutaminase, nicht-organische Phosphate, TLRs, NLRP3, Reduktion von Sclerostin, BMPs und IGF-1	PTH, Calzitonin, Phosphozitrate, TLR- und NLRP3-Inhibitoren, Wnt- oder BMP-Antagonisten, Bisphosphonate oder Anti-RANKL
Osteophytenbildung	TGF-β, BMP2	Möglicherweise stabilisieren diese Mediatoren das Gelenk, deshalb sollte hier keine direkte Therapie erfolgen
Knochenveränderungen	RANKL, VEGF	Bisphosphonate und anti-RANKL
Synovitis	IL-1β, TNFα, IL-17, IL-15,IL-7, CCL19, MCP-1, MIP-1β	Antizytokine, TLR-Antagonisten, Komplement-Inhibitoren

MMPs = Matrix-Metalloproteinase; ILs = Interleukine; OSM = Oncostatin M; GRO = *Growth-Related Oncogene*; MCP-1 = *Monocyte Chemotactic Protein 1*; TGF = *Transforming Growth Factor*; TIMPs = *Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases*; TLR = Toll-Like-Rezeptor; IGF = *Insulin Like Growth Factor*; BMP = *Bone Morphogenic Protein*; OP-1 = *Steogenic Protein 1*; FGF-18 = *Fibroblast Growth Factor 18*; HMGB2 = *High Mobility Group Box Protein 2*; iNOS = *inducible Nitric Oxide Synthetase*; RUNX2 = *Runt-Related Transcription Factor 2*; HIF-2α = *Hypoxia-Inducible Factor 2α*; PTH = Parathormon; VEGF = *Vascular Endothelial Growth Factor*; TNFα = *Tumor Necrosis Factor α*; MIP-1β = *Macrophage Inflammatory Protein 1β*. Tabelle modifiziert Loeser et al. (2012), S. 1703.

1.2.2 Die Rolle von chondrogenen Progenitorzellen

Fasst man die bisherigen Aspekte der Behandlung der OA zusammen, stellt sich heraus, dass es möglich ist die Krankheit durch medikamentöse und therapeutische Behandlung in ihrem Progress zu verlangsamen. Es ist aber bisher noch nicht gelungen einen Ansatz zu finden, der abgesehen von Knieersatzoperationen, kurativ ist und die Destruktion des Knorpels stoppt bzw. sogar umkehren kann (Lohmander und Roos 2007).
Die wenigen Möglichkeiten des Gelenkes sich selbst zu regenerieren und vor allem bei der OA einen Reparaturmechanismus zu induzieren, werden häufig von den destruktiven Eigenschaften der Krankheit überschattet. Ein mögliches Ziel von zukünftigen Therapie ist es deshalb genau hier einzugreifen und dies zu ändern (Goldring et al. 2006).
Neben Chondrozyten existieren im hyalinen Knorpel verschiedene Subpopulationen von Zellen, die erst vor einigen Jahren beschrieben worden sind. Es konnte gezeigt werden, dass einige dieser Zellen pluripotente Eigenschaften besitzen und sich in verschiedenste Gewebetypen wie z.B. Myozyten, Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten differenzieren können. Es besteht also die Vermutung, dass diese Zellen möglicherweise physiologisch den Knorpel regenerieren. Diese Vorlauferzellen werden als mesenchymale Progenitorzellen (MSCs) bezeichnet (Alsalameh et al. 2004; Fickert et al. 2004; Koelling et al. 2009).

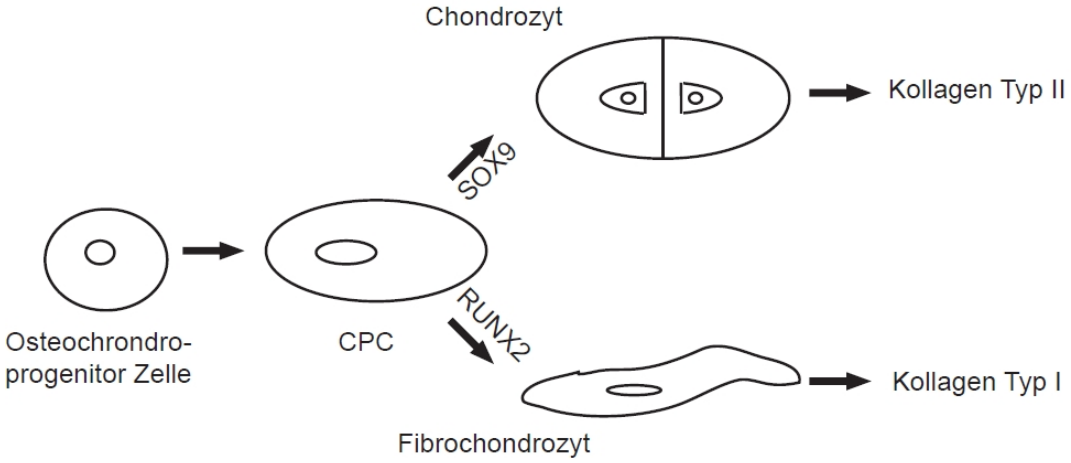

Abbildung 7: **Konzept der chondrogenen Progenitorzellen**
Durch entsprechende Stimmulation lassen sich CPCs, die selbst aus osteochrondrogenen Progenitorzellen hervorgehen, in Chrondrozyten (durch vermehrte Expression von SOX9) oder in fibrochondrozytäre Richtung differenzieren (durch vermehrte Expression von RUNX2). Modifiziert nach Muhammad et al. (2013), S. 5.

Die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Miosge an der Universitätsmedizin Göttingen konnte zeigen, dass neben den oben genannten MSCs noch eine weitere Population vom Knorpel beherbergt wird. Diese sogenannten chondrogenen Progenitorzellen (CPCs) haben ebenfalls multipotente Eigenschaften und lassen sich in chondrogene, adipozytäre und osteogene Richtung differenzieren, sind aber im Gegensatz zu den MSC auf die osteochondrogene Linie festgelegt. Im Vergleich zu den MSCs sind diese jedoch leichter zu kultivieren, leichter aus dem Knorpel zu gewinnen und ein vielversprechenderes Ziel einer möglichen Intervention (Koelling et al. 2009; Muhammad et al. 2013).

Eine entscheidene Rolle hierbei spielen die Gene SOX9 (SRY *(Sex Determining Region Y)-Box 9*) und RUNX2 (*Runt-Related Transcription Factor 2*). Erstmalig konnte durch die Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass diese Gene für die Differenzierung der CPCs notwendig sind und dass eine Überexpression von SOX9 dazu führen kann, dass sich diese zu Chondrozyten entwickeln können und Kollagen II bilden. Außerdem zeigte sich, dass eine Überexpression von RUNX2 dazu führt, dass sich die Zellen in eine fibrochondrozytäre Form differenzieren und Kollagen Typ I bilden (Abbildung 7, S. 11). Gerade bzw. auch noch in den späten Phasen der OA finden sich zwischen den fribrokartilären Knorpelstrukturen jene CPCs mit migratorischem Potential (Tesche und Miosge 2005; Sandell 2007; Koelling et al. 2009). Diese Zellen lassen sich durch Komponenten der EZM in eine chondrogene Richtung beeinflussen und sind in der Lage in defektes Knorpelgewebe einzuwandern. Sie tragen Oberflächenantigene, die typisch für mesenchymale Zellen sind (*Cluster of Differentiation* (CD): 44, 73, 105) und Marker, die für ihre Eigenschaft als Progenitorzellen sprechen (z.B. STRO-1). Es stellt sich die Frage, ob es möglich ist, genau diese im Knorpel verbleibenden Zellen, in vivo zu stimulieren und sie durch chondrogene Differenzierung zu einer Reparatur des Knorpels anzuregen (Koelling et al. 2009; Gerter et al. 2012).

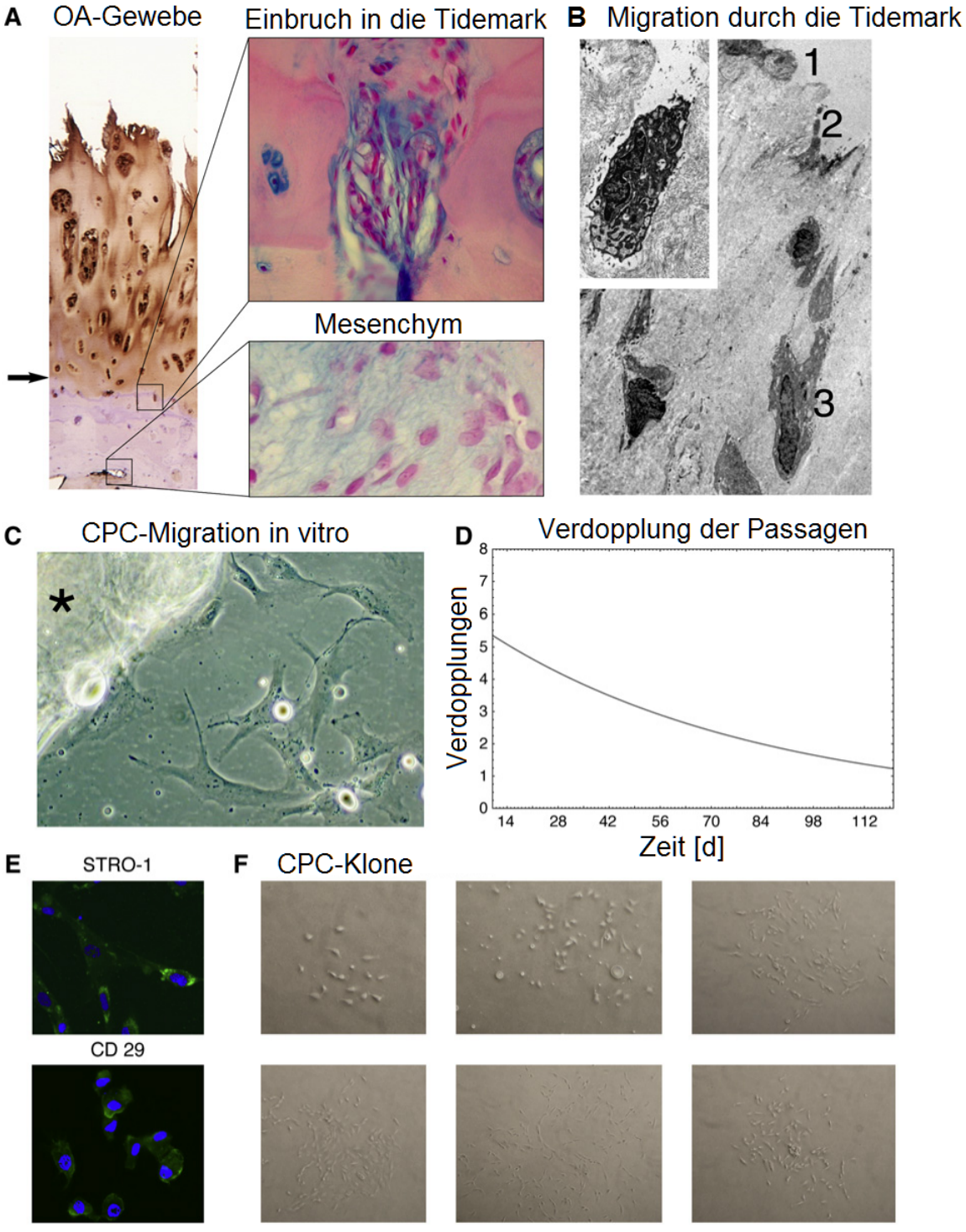

Abbildung 8: **OA Knorpel und chondrogene Progenitorzellen**

A: Gewebeprobe aus später Phase der OA. Zerstörte Oberfläche, der Pfeil markiert die TM. Es kommt zu Einbrüchen in der TM und zum Einsprießen von Blutgefäßen. B: Zellen, die die TM infiltrieren (1-3). C: Zellen, die aus einer Gewebeprobe ausmigrieren. D: Reduktion der Passagenverdopplung als Zeichen der Zellalterung E: STRO-1 und CD29 positive CPCs F: Verschiedene CPC Klone. Abbildung modifiziert nach Koelling et al. (2009), S.325.

1.3 SOX9 und RUNX2 als Meditoren der Osteochondrogenese

Das Verhältnis zwischen den Transkriptionsfaktoren SOX9 und RUNX2 spielt in der osteochondralen Entwicklung eine wichtige Rolle. Durch Erhöhung der SOX9-Aktivität lassen sich Zellen in eine chondrogene Richtigung differenzieren, die unter anderem die Steigerung der Kollagenexpression sowie verschiedener EZM-Produkte wie Aggrecan beinhaltet (Bernard et al. 2003; Eames et al. 2004; Muhammad et al. 2013). RUNX2 führt dagegen eher zu einer osteogenen Differenzierung, die den Abbau des Knorpels und dessen EZM-Produkten zu knöchernen Strukturen beinhaltet (Karsenty 2000).

1.3.1 SOX9

SOX9 ist ein Transkriptionsfaktor, der zur SOX (Sry-related high mobility group box)-Gruppe gehört. Er spielt eine wichtige Rolle in der frühen sexuellen Entwicklung von Säugetieren und ist außerdem ein entscheidender Akteur in der Chondrogenese (Bernard et al. 2003; Ikegami et al. 2011). Mutationen im SOX9 Gen führen z.B. zur Campomelen-Dysplasie, einer Erkrankung bei der es zu verschiedenen Dysfunktionen im Skelettsystem und zu Schäden am Knorpel kommt (Coustry et al. 2010).
Die verschiedenen Mitglieder der SOX-Familie werden durch ihre HMG (*High Mobility Group*)-Bindungsdomänen charakterisiert. Sie ist in der Lage DNA-Sequenzen zu binden und Zellfunktionen zu modulieren - unter anderem die Differenzierung von Zellen in eine chondrogene Richtung. Diese Differenzierung wird durch Wnt/ β-catenin-Signalwege und BMP/ TGF-β-Signalwege induziert und gesteuert. Im Mausmodel ist SOX9 in chondrogenen Zellen stärker exprimiert, während es in den osteogenen Zellen nicht zu finden ist. Es zeigt sich dort außerdem eine Verringerung der SOX9-Aktivität durch Inaktivierung der BMP-Rezeptoren. Im Huhn führt eine Stimulation mit TGF-β zu eine Induktion der Chondrogenese während der embryonalen Entwicklung (Kawakami et al. 2006).
Als DNA-Bindungsprotein ist SOX9 in der Lage als Enhancer, also Verstärker der Genexpression zu wirken. Durch SOX9 wird unter anderem die Expression verschiedener Kollagene (II, IX, XI, Col2a1, Col9 und Col11a2) gesteigert und es kommt zu einer erhöhten Expression von Aggrecan (Abbildung 9, S. 15; Bernard et al. 2003).

1.3.2 RUNX2

RUNX2 ist ein Transkriptionsfaktor, der ebenfalls an DNA-Sequenzen binden kann. Er ist essentiell für die mesenchymale Kondensation und für die osteogene Differenzierung der Zellen. In der embryonalen Entwicklung fungiert RUNX2 als Mediator der chondrogenen Hypertrophie, der Vaskularisierung und des Abbaus von Knorpel sowie der Umwandlung zum Knochen (Karsenty 2000).
Das Protein interagiert mit der EZM und kann durch Integrine über MAP-Kinasen (Mitogen Activated Protein Kinasen) stimuliert werden. Durch diese Stimulation tritt es in Interaktion

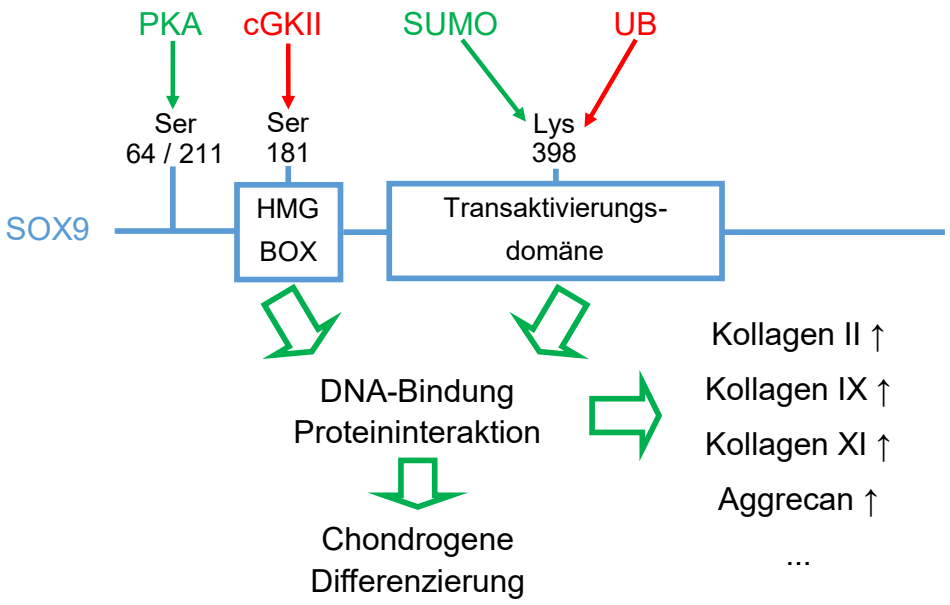

Abbildung 9: **Schematische Darstellung der SOX9 Regulation**

Darstellung der SOX9 Domänen und der ihrer Funktionen. In grün sind die positiven Regulatoren (PKA = Proteinkinase A; SUMO = *Small Ubiquitin-related Modifier*), in rot die negativen Regulatoren dargestellt (cGKII = *Cyclic GMP kinase* II; UB = Ubiquitin). Wichtige molekulare Domäne von SOX9 ist die HMG-Box und die Transaktivierungsdomänen. SOX9 bindet an verschiedenen DNA-Strukturen bzw. kann mit verschiedenen Proteinen interagieren und löst damit eine Differenzierung der Zellen sowie eine gesteigerte Produktion von Kollagenen und Aggrecan aus. Abbildung in Anlehnung an Kawakami et al. (2006), S. 726 und ergänzt nach Bernard et al. (2003).

mit Kollagenen und kann Osteoblasten beeinflußen (Xiao et al. 2000). Ein Funktionsverlust in diesem Protein zeigt sich unter anderem in skeletalen Fehlbildung und kann sich als Cleidokraniale Dysplasie (CCD) manifestieren (Quack et al. 1999).

Der Transkriptionsfaktor selbst ist nukläer positioniert und ist Ziel von verschiedenen Signalkaskaden. Es existieren über 12 verschiedene Isoformen, die durch zwei Promotorregionen und unterschiedliche Spleiß-Varianten entstehen. Es wird durch MAP-Kinasen, Acetyltransferasen und Ligasen posttranslational modifiziert. RUNX2 wird durch BMP/TGF-β-Signalwege, den *Fibroblast Growth Factor* (FGF), Parathormon (PTH), Integrinen und Steroidhormonen beeinflußt. Neben einer DNA-Bindungsregion trägt RUNX2 eine Aktivierungsregion und eine Supressionsregion, die unter anderem die Expression von SMAD (*Small Body Size Mothers Against Decapentaplegic*)-Proteinen reguliert.

SMAD-Proteine werden durch BMP und TGF-β phosphoryliert und binden zusammen mit dem Koaktivator SMAD4 an Rezeptorkomplexen. Es kommt zu einer Aktivierung von SMAD1, -5 und -8 durch BMP bzw. im Falle einer Stimulation durch TGF-β von SMAD2 und -3 (weiteres s. nächstes Kapitel). Die Auswirkungen auf die Zelle wird durch ihre genetische Ausstattung bestimmt. So ermöglicht RUNX2 eine gezielte Entwicklung und Differenzierung der Zelle, insbesondere in eine osteogene Richtung (Abbildung 10, S. 16; Schroeder et al. 2005).

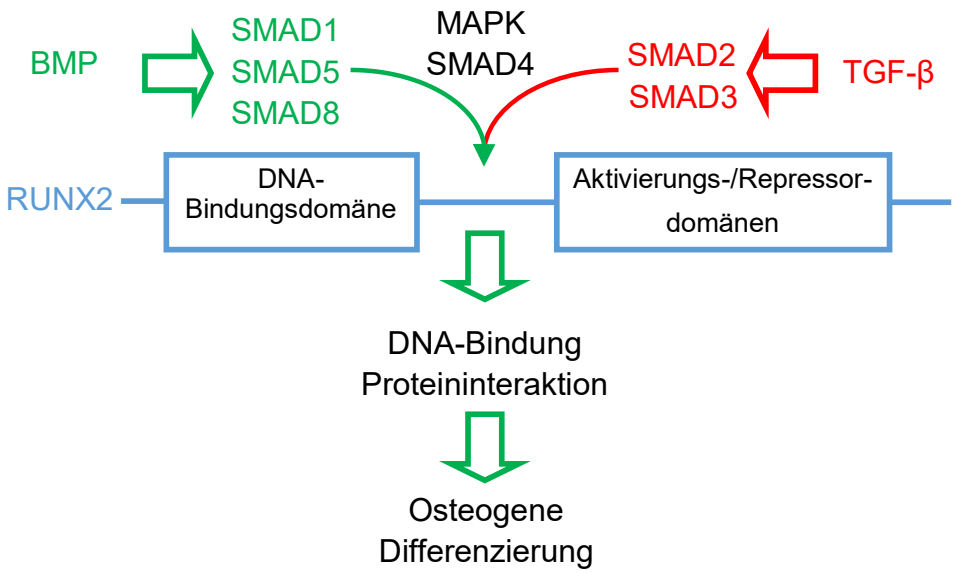

Abbildung 10: **Schematische Darstellung der RUNX2 Regulation**

Es existieren verschiedene funktionelle Domänen von RUNX2. Je nach Proteininteraktion, ist RUNX2 in der Lage an der DNA zu binden und durch seine Aktivierungsdomänen bzw. seine Repressordomänen die Genexpression und damit die Zellfunktion zu steuern. Bindet BMP an seinen Rezeptor, kommt es via SMAD1, -5, -8 zu einer osteogenen Differenzierung von z.B. mesenchymalen Zellen. TGF-β löst via SMAD2, -3 einen gegenteiligen Effekt aus. SMAD4 dient beiden Signalwegen als Kofaktor. Die MAPK phosphoryliert RUNX2 und ermöglicht damit erst die Bindung der SMAD-Proteine. Abbildung in Anlehnung an Schroeder et al. (2005), S. 214.

1.4 Der TGF-β-Rezeptor und sein Ligand TGF-β3

Die Liganden der TGF-β-Familie und ihre Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Differenzierung von Zellen, insbesondere in der Entwicklung von Chondrozyten und in der Strukturierung der EZM. Im Folgenden werden die Subtypen dieser Familie vorgestellt und ihre Relevanz sowie Rolle in der Pathogenese der OA erläutert.

1.4.1 Der Rezeptor

Die TGF-β-Rezeptorfamilie besteht aus zwei Subfamilien: Der TGF-β/ Activin/ Nodal-Familie und der BMP/ GDF-Familie. Sie unterscheiden sich jeweils durch ihre spezifische Sequenz und auch durch unterschiedliche Signalwege voneinander (Shi 2003). TGF-β-Liganden, die zur TGF-β/ Activin/ Nodal-Familie gehören, binden mit einer hohen Affinität an TGF-β-Rezeptoren vom Typ II und einer geringeren Affinität am Typ I. Es kommt bei Aktivierung zu einer Dimerisierung beider Rezeptoren, die mit ihren Serin-Threonin-Kinase-Domänen eine Phosphorylierung von u.a. SMAD-Proteinen, insbesondere SMAD 2,-3 und -4, auslösen. Diese können wiederum mit dem Zellkern interagieren und dort die Genexpression modulieren (Abbildung 11 und Tabelle 2, S. 19; Massague und Chen (2000); Shi (2003)).

1.4.2 Die Liganden und Signalkaskaden

Die TGF-β-Liganden spielen eine kritische Rolle bei Entwicklung, Proliferation, Migration, Apoptose sowie Matrixumbauprozessen. Speziell die drei Isoformen des TGF-β (TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3) ähneln sich zwar in ihrer Struktur, führen jedoch sehr spezifische Funktionen aus. TGF-β entsteht als homodimeres pro-TGF-β in der Zelle. Es wird im Golgi-Netzwerk modifziert und sezerniert. In der EZM wird es durch Transglutaminasen an Proteine gebunden, kann bei Bedarf dissoziieren und seine biologischen Funktionen erfüllen. Dieses „latente" TGF-β kann durch verschiedene Prozesse wie z.B. Hitze, Alkalisierung, Ansäuerung oder auch Proteolysen und Protein-Protein-Interaktionen aktiviert werden (z.B. durch MMP-2,-9,-13,-14). Es kommt über den Rezeptorkomplex zu einer Aktivierung von SMAD2 und -3, welche an SMAD4 binden und sich im Zellkern anreichern (Finnson et al. 2011).
Außerdem sind, neben diesem „klassischen" Signalweg, noch andere Signalwege bekannt, die entweder direkt oder im Sinne einer Kostimmulation aktiviert werden. So wird neben des SMAD-Signalweges auch die Aktivierung des MAP-Kinase Signalweges über ERK, p38 und JNK sowie des PI3K/ Akt Signalweges beschrieben, die teilweise durch Phosphorylierungen aktiviert oder inaktiviert werden (Mu et al. 2012).

1.4.3 Die Rolle im Knorpel

Im Knorpel aktiviert TGF-β vor allem die Signalwege, die mit Entwicklung und Differenzierung assoziiert sind. TGF-β stimuliert die Proliferation und die Differenzierung von Chon-

drozyten sowie die chondrogene Kondensation (Goldring et al. 2006).
Es konnte im Mausexperiment gezeigt werden, dass ein Blockade von TGF-β zu einem osteoarthritischen Phänotyp führen kann. Es zeigt sich parallel dazu, dass die Expression von TGF-β(1-3) in OA-induzierten Mäusen erniedrigt ist (Blaney Davidson et al. 2006). Im menschlichen OA-Knorpel wird je nach Quelle von einer Erhöhung der TGF-β-Expression (Pombo-Suarez et al. 2009) bzw. von einer Erniedrigung der Expression gesprochen (Shen et al. 2014). Es zeigt sich, dass die Änderungen des Niveaus einen möglich Beitrag zur abnormen Knorpelfunktion in der OA haben könnte und TGF-β eine mögliche Rolle in der Pathogenese spielt. Der Signalweg trägt mit seinen protektiven Funktionen zum einen zur Regeneration des Gewebes im menschlichen Organismus bei, zum anderen werden hier jedoch auch katabole Vorgänge aktiviert, die zu einer Destruktion führen können. So wird über den klassichen SMAD2-Weg eher ein Anstieg der Matrixproduktion beobachtet, aber auch gleichzeitig ein Progress von Fibrose und Osteophytenbildung. TGF-β und seine Subtypen spielen eine Rolle im Pathomechanismus der OA, es ist jedoch noch unklar, an welchem Punkt es zu einer Disregulation der protektiven Mechanismen kommt. Eine weitere Analyse seitens der Forschung steht hier noch offen und ein Nutzen in der möglichen Therapie ist noch nicht abzusehen (Loeser et al. 2012; Bush und Beier 2013). TGF-β ist in der Lage an verschiedenen Zelltypen die SOX9-Expression zu steigern und RUNX2 zu senken. Dadurch ist es auch in der Lage, die Expression von EZM-Produkten wie Kollagen II zu steigern. Eine Überexpression von TGF-β3 führte in dentalen Stammzellen zu einer vermehrten Kollagen II und SOX9 Expression. Ein Defizit im Rezeptor führt bei Chondrozyten zu einer Hochregulation von RUNX2, MMP13 und ADAMTS-5 durch einen Wechsel der pro-chondrogenen SMAD2/3 Signalwege zu SMAD1/5 (Miyanishi et al. 2006; Park et al. 2012; Rizk und Rabie 2013; Shen et al. 2013; Muhammad et al. 2014).
TGF-β3 ist außerdem ein potenter Aktivator der Proteoglykansynthese. Er modifiziert die Struktur der Proteine und hat Einfluss auf Elemente der Glykosaminoglykanketten des Moleküles BGN (Burch et al. 2010). Es konnte, unter anderem an Osteoblasten, gezeigt werden, dass die Stimulation mit Mediatoren der TGF-β-Familie einen Einfluss auf die Expression von BGN hat. Innerhalb der ersten 218 Basenpaare des BGN-Promotors gibt es eine TGF-β sensible Region, die verschiedene Bindungstellen für den *Specificity Protein 1* (Sp1) Transkriptionsfaktor trägt. So kommt es an einigen Zellen zu einer vermehrten BGN-Sekretion durch Simulation mit dem Wachstumsfaktor (Heegaard et al. 2004; Honardoust et al. 2008).

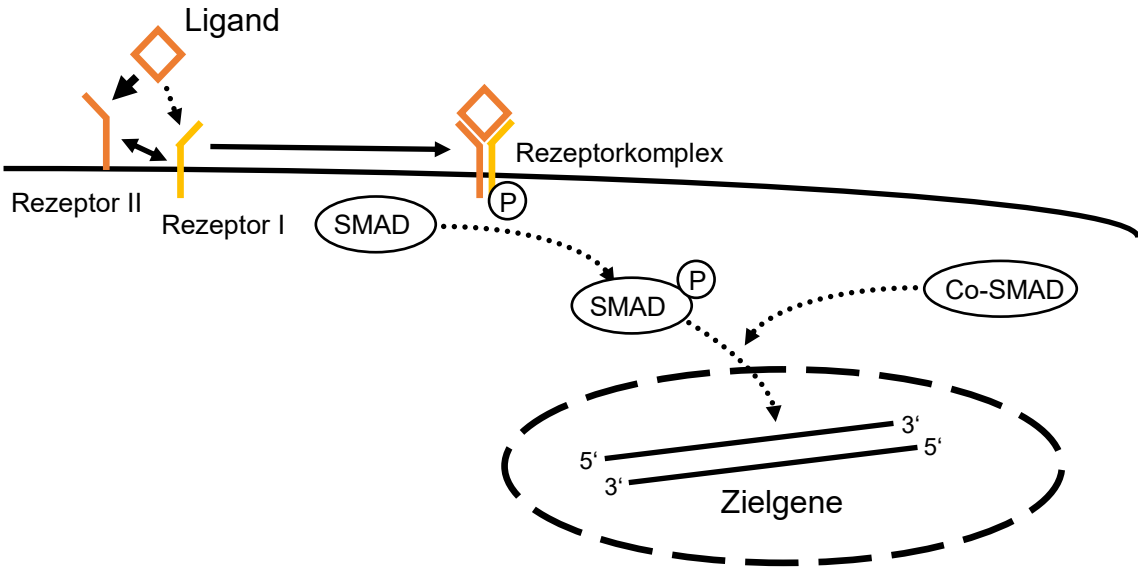

Abbildung 11: **TGF-β-Liganden und Ziele**

Allgemeine und vereinfachte Übersicht über die TGF-β-SMAD-Signalkaskade. Bindet ein Mitglied der TGF-β-Superfamilie an seinen Rezeptoren, kommt es, durch Heterodimerisierung, zur Rezeptorkomplexbildung. Durch diese können SMAD-Proteine phosphoryliert werden und ihre Funktion im Zellkern aufnehmen. Abbildung in Anlehnung an Massague und Chen (2000), S. 628.

Tabelle 2: **TGF-β-Liganden und Ziele**

Ligand	Rezeptor II	Rezeptor I	SMAD	Co-SMAD
TGF-β	TGFR Typ II	TGFR Typ I	SMAD2	SMAD4
Activin	ActR-II	ActR-IB	SMAD3	
Nodal	ActR-IIB	ALK7?		
BMP2	BMPR-II	BMPR-IA	SMAD1	SMAD4
BMP7	ActR-II II	BMPR-IB	SMAD5	
GDF5	ActR-IIB II	ALK1 I	SMAD8	

Die Tabelle gibt die verschiedenen Liganden der TGF-β-Superfamilie wieder, diese wird in eine TGF-β/ Activin/ Nodal-Familie und eine BMP/ GDF-Familie unterteilt. Die Liganden binden zunächst mit dem Rezeptor Typ II, welcher darauf mit dem Rezeptor Typ I einen Komplex bildet. Es folgt die Aktivierung der SMAD-Proteine durch Phosphorylierung und, zusammen mit den Co-SMAD-Proteinen, zu einer Interaktion mit dem Zellkern. TGFR = TGF-Rezeptor; ActR = Activinrezeptor; ALK7 = Activin-A-Rezeptor; ALK1 = *Activin Receptor-Like Kinase*; GDF = *Growth Differentiation Factor*. Abbildung in Anlehnung an Massague und Chen (2000), S. 628.

1.5 Biglycan

Biglycan (BGN) ist ein Proteoglykan, das ubiquitär in fast allen Bindegeweben vorkommt, und speziell im Knorpelgewebe verschiedensten Aufgaben nachkommt. In diesem Kapitel soll deshalb kurz über die Grundstuktur des Proteins gesprochen und darauf aufbauend die nähere Bedeutung im Knorpel skizziert werden.

1.5.1 Aufbau, Funktion und Rolle im Knorpel

Das Proteoglykan BGN besteht aus einem ca. 42 kDa großen Kernprotein mit einem hohen Leucin-Anteil (*Small Leucine-rich Proteoglycan*, SLRP) und wird, durch ein oder zwei Glykosaminoglykanketten, auf ein Gewicht von ca.180-200 kDa ergänzt. BGN wird als Vorläufermolekül von der Zelle synthetisiert und bekommt seine native Form durch Abspaltung eines N-Peptides über Signalkaskaden, die durch BMP1 aktiviert werden. In den Bindegeweben spielt es, neben der Interaktion mit matrixbildenden Komponenten, eine Rolle innerhalb des Immunsystems. BGN reguliert biologische Prozesse, wie die Funktionalität von Muskeln und die Stabilität von Synapsen, hat jedoch auch Auswirkungen auf die Regulation der Osteogenese (Nastase et al. 2012).
BGN interagiert mit den Komponenten der EZM. Es sind eine starke Assoziation mit Kollagen II und mit anderen Kollagenen, wie Kollagen I, VI, XII und XIV, sowie Fibronektin und Elastin beschrieben (Vynios et al. 2001; Roughley 2006).
Eine weitere wichtige Funktion, die SLRPs zugeschrieben wird, ist die Interaktion mit Mitgliedern der TGF-β-Familie (Embree et al. 2010) sowie verschiedenen anderen Mediatoren, wie dem *Epidermal Growth Factor* (EGF) und TNFα (Roughley 2006). Es ist in der Lage, die Aktivität der Substanzen zu steigern, indem es als eine Art molekulare Klammer fungiert, und so eine stärke Bindung zu dem Rezeptor ermöglicht bzw. selbst als Aktivator von Rezeptoren dienen kann (Abbildung 12, 21;Iacob und Cs-Szabo (2010); Nastase et al. (2012)).
Es ist bekannt, dass Proteoglykane in der Pathophysiologie der OA beteiligt sind. Durch den Matrixumbau und die degenerativen Prozesse kommt es in späten Phasen zu einem veränderten Gehalt an BGN und auch anderen Proteoglykanen, wie Decorin, in der EZM. So zeigen BGN und Fibromodulin defiziente Mäuse einen osteoarthrischen Phänotyp und einen Anstieg von kollagenen Abbauprodukten (Bock et al. 2001; Iacob und Cs-Szabo 2010).
In Chondrozyten konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit BGN die Expression des EGF-Rezeptors über ERK1/2- und PI3K-Signalkaskaden erhöhen kann (Iacob und Cs-Szabo 2010). Durch Autoregulation zeigt eine Stimulation mit EGF dagegen eine Erniedrigung der BGN Konzentration innerhalb der Chondrozyten. Beide Moleküle scheinen sich an dieser Stelle bestimmte Abschnitte der Signalkaskaden zu teilen, um sich gegenseitig zu regulieren und die Homöostase der EZM aufrecht zu erhalten (Iacob und Cs-Szabo 2010).
In Osteoblasten konnte diese Verknüpfung ebenfalls gezeigt werden, hier führt BGN in Assoziation mit BMP4 zu einer Steigerung der RUNX2-Konzentration und damit zu einer Os-

teoblastendifferenzierung, wodurch die Aufgabe des BGN, als Mediator, zwischen Wachstumsfaktor und Rezeptor unterstrichen wird (Chen et al. 2004). Änderungen in der BGN Konzentration führen im Mausmodel zur Osteoporose und es konnte gezeigt werden, dass SLRPs einen Einfluss auf die EGF-Rezeptorexpression haben. Insbesondere Decorin, ein weiteres Proteoglykan, das eng mit BGN assosziiert ist, hat hier eine Rolle in der Rezeptormodulation. Decorin wird in der OA vermehrt ausgeschüttet und führt zu einer gesteigerten EGF-Rezeptorproduktion (Moscatello et al. 1998; Iozzo et al. 1999; Bock et al. 2001; Gotte et al. 2004).

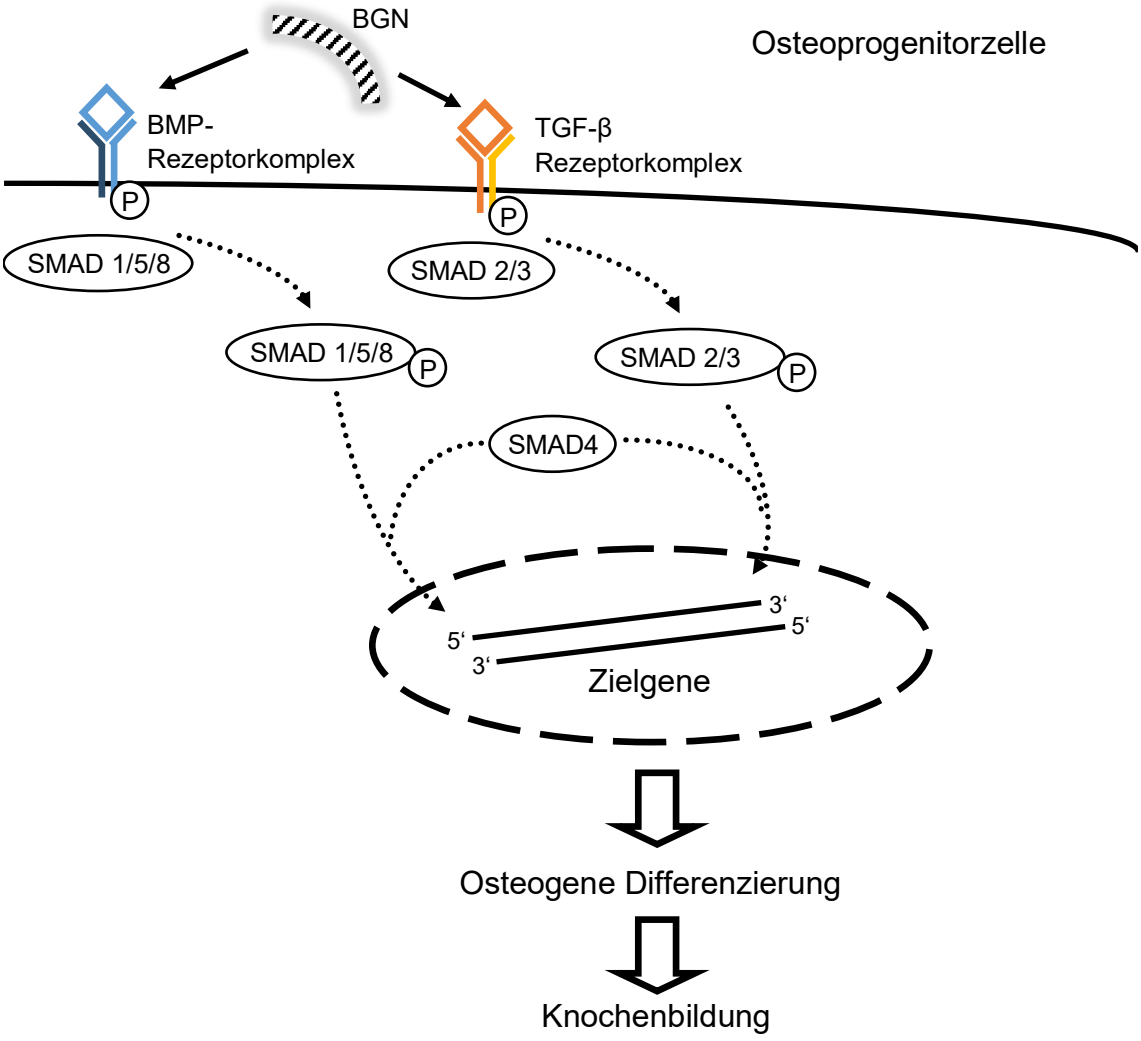

Abbildung 12: **Interaktion von Biglycan mit der TGF-β-Familie**

Die Interaktion ist hier am Beispiel der osteoprogenitor Zelle dargestellt. BGN ist in der Lage den BMP/ TGF-β-Signalweg zu verstärken. Es fungiert als eine Art "molekulare Klammeründ kann durch Interaktion mit den Rezeptoren z.B. die osteogene Differenzierung, vor allem über den BMP-Signalweg, unterstützen. Abbildung in Anlehnung an Nastase et al. (2012), S. 968.

1.6 Der EGF-Rezeptor und sein Ligand EGF

Der *Epidermal Growth Factor* (EGF) und sein Rezeptor spielen, ähnlich wie die Liganden und Rezeptoren der TGF-β-Familie, eine Rolle in der Proliferierung und Differenzierung von Zellen. Sie werden im OA-Knorpel bei inflammatorischen Prozessen freigesetzt und tragen ihren Teil zur Umstrukturierung der Matrix bei, weshalb hier im Nachfolgenden die Grundfunktionen, Signalwege und die Rolle im Knorpel dargestellt werden sollen.

1.6.1 Der Rezeptor

Der EGF-Rezeptor (EGFR oder auch HER-1 bzw. ErB-1) ist ein 170 kDa schweres transmembranes Glykoprotein. Er gehört zu der Klasse der Tyrosinkinasen, welche ihre intrazellulären Kaskaden durch Autophosphorylierung regulieren und eine Unterklasse der erbB-Familie bilden. Durch den EGF-Rezeptor werden das Zellproliferations-, Differenzierungs- sowie das Migrationsverhalten von Zellen gesteuert und moduliert. Seine übermäßige Aktivierung bzw. Expression wird, im medizinischen Kontext, eng mit der Entstehung von Tumoren assoziiert. So findet sich eine EGFR-Überexpression im Zusammenhang mit Brustkrebs, Bronchialkarzinomen, Nierenkrebs, Ovarialkrebs und Kolonkarzinomen, weshalb Tyrosinkinaseinhibitoren, wie z.B. das Erlotinib bei bestimmten Bronchialkarzinomen, ihren Einzug in deren medikamentöse Behandlung finden (Carpenter und Cohen 1979; Herbst 2004; Zeng und Harris 2014).

1.6.2 Die Liganden und Signalkaskaden

Bindet ein entsprechender Ligand an den Rezeptor, bilden sich dimere Rezeptorkomplexe und es kommt zu Autophosphorylierungen. Dabei wird über einen GRB2 (*Growth Factor Receptor-bound Protein 2*)/ SOS (*Son of Sevenless*)-Komplex das Adaptermolekül RAS (*Rat Sarcoma Protoonkogen*) aktiviert, ein kleines G-Protein, das durch Austausch von GDP mit GTP seine Funktion aufnimmt. Es kommt zu einer Signalkaskade über den MAPK-Signalweg, die letztendlich im Zellkern endet und dort - je nach Zelltyp - verschiedene Funktionen steuert, wie z.B. Reparaturmechanismen, Zellzyklus und Zelltod (Apoptose), Adhäsion von Zellen, Wachstum, Migration und Differenzierung (Abbildung 13, S. 24; Yarden und Slikowski 2001; Herbst 2004; Zeng und Harris 2014).
Einer der wichtigste Liganden des EGF-Rezeptors ist das gleichnamige EGF, ein 53 Aminosäuren großes Protein, mit ca. 6-8 kDa (Carpenter und Cohen 1979). Der Ligand kommt ubiquitär in verschiedenen Körperflüssigkeiten und Geweben vor. Er wird in akuten Wunden vermehrt sezerniert und sorgt dort für eine Revaskularisierung. EGF trägt im Epithelgewebe dazu bei, dass - möglicherweise über eine SOX9-Kaskade - die Regeneration des Gewebe gefördert wird und es zu einer Migration bzw. Differenzierung von MSCs kommt. Außerdem ist es in der Lage die Rekrutierung von anderen Wachstumsfaktoren, wie *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und *Hepatocyte Growth Factor* (HGF), zu fördern (Ling et al.

2011; Zeng und Harris 2014).
Eine Verbindung über den klassischen MAP-Kinase-Weg scheint einen möglichen gemeinsamen Signalweg, zwischen den Molekülen der EGF-Familie und der TGF-β-Familie, darzustellen (Stern et al. 2012). Eine Stimulation mit EGF führt über ERK1/2 zu einer erhöhten SOX9-Expression, die entsprechend der Grundfunktion von SOX9 zu einer chondrogenen Differenzierung führen könnte (Ling et al. 2011). In anderen Geweben wird ebenfalls ein positiver Einfluss des EGF-Rezeptors auf die SOX9-Expression beschrieben. Die Stimulation des Rezeptors erhöht die SOX9-Expression in den Pankreaszellen über NFATCI1-Proteine (Chen et al. 2015). Außerdem wird ein Zusammenhang zwischen der SOX9-Expression und der Intensität des EGF-Rezeptor-Signalweges durch Autoregulation beschrieben (Grimont et al. 2014). Ein hoher RUNX2-Level ist dagegen in der Lage, die Expression von EGF und der nachfolgenden Signalkaskaden wie ERK1/2 und Akt zu inaktivieren, während EGF wiederum in der Lage ist, die RUNX2-Expression zu senken, um damit die osteogene Differenzierung zu verhindern (Lee et al. 2014; Tandon et al. 2014). Abhängig von der Dosis führt EGF jedoch auch zu gegenteiligen Effekten: So wird es in Zusammenhang mit BMP4 als Gegenspieler der chondrogenen Differenzierung beschrieben und löst in der Knorpelentwicklung eine Reduktion von Kollagen II und SOX9 aus (Nonaka et al. 1999).

1.6.3 Die Rolle im Knorpel

EGF wird bei entzündlichen Prozessen im Knorpel durch die Synovia verstärkt freigesetzt und ist dort in die inflammatorischen Prozesse involviert. Es erhöht die Expression von Prostaglandin E_2 sowie der Cyclooxygenase-2 (Nah et al. 2009). In der osteogenen Differenzierung konnte gezeigt werden, dass über die Aktivierung des Rezeptors eine Inhibition der osteoblastären Transkriptionsfaktoren RUNX2 und Osterix ausgelöst wird (Zhu et al. 2011). Im Tiermodel zeigt sich im EGF-Rezeptor-Knockout eine deutlich stärkere Knorpelbildung über den Gelenken, die als regenerativer Ansatz aufgefasst werden kann (Shepard et al. 2013).

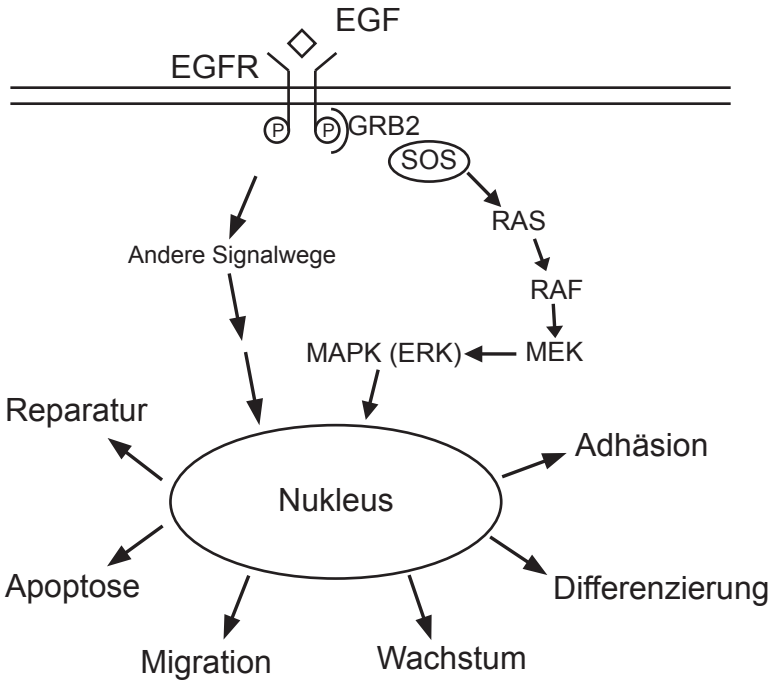

Abbildung 13: **Übersicht des EGF-Signalweges**

Bindet ein Ligand an den EGF-Rezeptor bildet sich ein homodimerer Komplex, der über einen MAPK-Kinaseweg eine Reaktion im Zellkern auslöst. Andere Signalwege sind bekannt, hier aber nicht dargestellt. Nach Yarden und Slikowski (2001); Herbst (2004); Ling et al. (2011).

1.7 Fragestellung

Die Bedeutung der regenerativen Methoden in der Medizin nimmt immer mehr zu. Die Manipulation von Rezeptoren und Signalmolekülen im menschlichen Körper ist ein wichtiger Schritt in diese Richtung. In dieser Arbeit soll der Schwerpunkt auf die Stimulation der CPCs durch die Signalmoleküle TGF-β3 und EGF gesetzt sowie eine Assoziation der Signalwege mit dem Matrixmolekül BGN gezeigt werden.
Die Forschungsgruppe Ling, S. et al. beschrieb 2011 eine EGFR-ERK-SOX9-Kaskade im Urogenitaltrakt, die eine mögliche Regenerationsquelle gegen Veränderungen im Gewebe darstellt. Durch Stimulation des EGF-Rezeptors konnte eine Steigerung der SOX9-Expression in den Zellen erreicht werden (Ling et al. 2011). Da eine Änderung der SOX9-Expression an CPCs deren chondrogene Differenzierung einleiten könnte (Muhammad et al. 2013), ist es ein Ziel der Arbeit zu zeigen, dass die von Ling, S. et al. beschriebene EGFR-SOX9-Kaskade auch bei den CPCs existiert. Es stellt sich die Frage, ob der EGF-Rezeptor an chondrogenen Progenitorzellen vorhanden ist und welche Faktoren Auswirkungen auf den EGF-Rezeptor an haben könnten. Wie von Iacob et al. 2010 bereits beschrieben, könnte die vermehrte BGN-Synthese nicht nur Chondrozyten dazu stimulieren den EGF-Rezeptor zu exprimieren (Iacob und Cs-Szabo 2010), sondern eine ähnliche Wirkung an den CPCs haben. Da es außerdem eine Verbindung zwischen BGN und TGF-β3 (Heegaard et al. 2004) sowie von TGF-β3 und SOX9 zu geben scheint (Kawakami et al. 2006), soll auch die Auswirkung dieser Moleküle auf die CPCs untersucht werden und möglicherweise ein Zusammenhang innerhalb der Pathogenese der OA hergestellt werden.

Zusammengefasst sollen in dieser Arbeit deshalb drei Teilfragestellungen bearbeiten werden:

1. Welchen Einfluss hat die Stimulation mit TGF-β3 auf die Expression von BGN?
2. Welchen Einfluss haben Änderungen der BGN Expression auf die des EGF-Rezeptors?
3. Wie wirkt sich eine Stimulation mit TGF-β3 und EGF auf die Expression von SOX9 und RUNX2 aus?

Um diese Fragestellungen zu beantworten, wurden zum einen histologische Präparate aus menschlichen Knorpelgeweben angefertigt sowie Stimulation bzw. Inhibitionsversuche mit den Mediatoren TGF-β3, BGN und EGF an Zellen durchgeführt. Diese wurden über klassische Methoden auf Ebene der Transkription über Polymerase-Ketten-Reaktion und auf Translationsebene über immunologische Methoden wie den Western Blot untersucht.

2 Material und Methoden

Im Nachfolgenden sind die Materialien und Methoden gelistet, die für diese Arbeit verwendet wurden. Es folgt nach einer kurzen Übersicht zu der Methode, eine Liste der verwendeten Materialien sowie Beschreibung der allgemeinen Vorgehensweise. Abweichungen und Besonderheiten bei einzelnen Versuchen finden sich in den jeweiligen Kapiteln im Ergebnisteil der Arbeit.

2.1 Gewebeproben und Zellen

Die verwendeten Gewebeproben entsprechen den Bestimmungen der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen (Antrag 25/12/10). Zur Gewinnung von Zellen aus dem menschlichen Knorpel wurden Resektate genutzt, die bei einer Operation am Kniegelenk entstanden sind und uns aus dem Krankenhaus Neu-Mariahilf (Humboldtalle 10-12, 37073 Göttingen) dankbarerweise zur Verfügung gestellt wurden. Die Patienten wurden einer totalen Kniegelenks-endoprothese-Operation unterzogen, bei der das Gelenk vollständig entfernt wird und durch ein künstliches Kniegelenk ersetzt wird. Die Patienten wurden über die Weiterverwendung des Materials aufgeklärt und haben ihre Einverständniserklärung abgegeben. Die Proben wurden bis zur Bearbeitung unter sterilen Bedingungen bei 4°C in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) maximal 1-2 Tage gelagert. Für die Stimulationsversuche in der Arbeit wurden immortalisierte chondrogenene Progenitorzellen (CPC241ht) verwendetet (Isolation s. unten). Die Zellen wurden mit einer humanen Telomerase reversen Transkriptase (hTERT) transfiziert und in verschiedenen Passagen (Teilungsraten) auf ihre CPC-spezifische Charakterisierung getestet (Koelling et al. 2009; Muhammad et al. 2014). Für die Immortalisierung wurde ein S2-Labor in der Abteilung Hämatologie und Onkologie der Universitätsmedizin Göttingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Gerald Wulf zur Verfügung gestellt. Die Immortalisierung wurde dankenswerterweise von Christa Bode aus der der AG orale Biologie und Geweberegeneration der Universität Göttingen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Miosge durchgeführt.

2.2 Zellkultur

Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO_2-Begasung im Brutschrank gehalten. Es wurden 75-cm^2-Zellkulturflaschen genutzt, die mit jeweils 10 ml DMEM gefüllt wurden. Das DMEM wurde zusätzlich mit einem Antibiotikum (Gentamycin) und 10 % fetalem Kälberserum (FCS) versetzt (in der Kombination im Folgenden als Medium bezeichnet). Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt, und es wurde ausschließlich unter einer Sterilbank gearbeitet, um mögliche Kontaminationen zu verhindern.

2.2.1 Zellisolation

Für die Isolation von Chondrozyten aus humanem Knorpel wurde verschiedene Kollagenasen genutzt, um diese aus ihrer Matrix zu lösen und kultivieren zu können.
Materialien:

- Kollagenase Typ I 160 units/ ml (Gibco Best.-Nr. 17100-017)
- Kollagenase Typ II 600 units/ ml (Sigma Best.-Nr. C6885-1G)

Die Knorpelproben wurden zunächst in makroskopisch gesunde und makroskopische kranke Bereiche unterteilt. Die gesunden Bereiche des Tibiaplateaus bzw. des Femurs imponierten durch eine milchig glatt glänzende, eher derbe Oberfläche, die keine Anzeichen einer Beschädigung aufwiesen. Als kranke Bereiche wurden die ausgewählt, die sich durch eine matte, raue und eher weiche Oberfläche zeigten und visuell schon beschädigt schienen. Aus den Knorpelstellen wurden mit einem Skalpell 5-10 mm^3 große Chips entfernt und in eine sterile 25 ml Flasche gegeben. Die Kollagenasen wurden in Zellmedium gelöst und über ein 0,2 µm Sieb steril filtriert. Zu den Proben wurden ca. 10 ml dieser Lösung hinzugeben und diese für ca. 6 Stunden im Brutschrank aufbewahrt bzw. verdaut. Dabei wurde die Suspension vorsichtig mit einem Magnetrührer in Bewegung gehalten. Dann wurde die Suspension über ein 40 µm Sieb abfiltriert, um grobe Partikel abzufangen und bei 1400 rpm Zentrifugiert (Eppendorf 5810). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in Medium resuspendiert und gezählt. Es wurden jeweils $5 \cdot 10^4$ Zellen in einer 75-cm^2-Kulturflasche weiter kultiviert. Für die Isolation der CPCs wurden ebenfalls 5-10 mm^3 große Chips aus dem Knorpelbereichen entfernt. Die Chips wurden direkt in den Kulturflaschen verteilt, ohne einen vorherigen Verdau durch Kollagenasen. Der Boden war dabei so bedeckt, dass pro 5-10 mm^2 ein Chip war. Die Proben wurden danach im Brutschrank belassen. Nach 10-14 Tagen waren genug CPCs aus den Proben auf den Boden der Kulturflasche gewandert und das Medium wurde gewechselt sowie die Chips entfernt.

2.2.2 Alginatkultur

Die Stimulationsversuche wurden in einer 3D-Alginat-Umgebung durchgeführt, um den Zellen eine möglichst physiologische Umgebung zu schaffen und eventuelle Einflüsse durch die Oberfläche der Kulturflaschen zu minimieren (De Ceuninck et al. 2004).
Materialien:

- 0,15 mol/l Natriumchlorid (NaCl)
- 102 mmol/l Calciumchlorid ($CaCl_2$)
- 1,2 % Alginat (Keltone LV FMC 8132419)

Das Alginat wurde in 0,15 mol/l NaCl bei 37°C im Wasserbad gelöst. Die Zellen wurden geerntet und abzentrifugiert (Eppendorfzentrifuge 5415R: 1800 rpm (300 g) 10 min). In einer

6-Well-Platte wurden je 3 ml der $CaCl_2$-Lösung vorgelegt und das Zellpellet in der Alginatlösung resuspendiert. Dann wurde die Zellsuspension aufgenommen und vorsichtig á 30 µl tropfenweise in die 6-Wellplatten gegeben, sodass sich kleine Kugeln bildeten. Diese Kugeln wurden zum auspolymerisieren 10 Minuten in der Lösung belassen, es wurden 8 Kugeln in jedes Well gegeben. Die $CaCl_2$-Lösung wurde entfernt, die Alginatkugeln einmal mit Medium gewaschen und dann mit je 3 ml Medium kultiviert. Um die Zellen für den Western Blot oder die RNA-Isolation (siehe unten) aufzubereiten, wurden diese aus dem Alginat gelöst und als Zellpellet bei -80°C eingefroren. Materialien:

- HEPES-EDTA-Puffer: 10 mM Hydroxyethylpiperazinylethan -sulfonsäure (HEPES)
  55 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
  pH 7,4

- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS): 137 mmol/l Natriumchlorid
  2,7 mmol/l Kaliumchlorid
  10 mmol/l Dinatriumhydrogenphosphat
  2 mmol/l Kaliumdihydrogenphosphat
  pH 7,4

Das Medium wurde von den Zellen entfernt, die Alginatkugeln mit PBS gereinigt und die Kugeln im HEPES-EDTA-Puffer vorsichtig geschwenkt, bis die Kugeln gelöst waren. Die Suspension wurde in der Eppendorfzentrifuge 5415R für 10 min bei 1800 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellett bei -80° eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

2.2.3 Stimulation mit Signalmolekülen

Die Stimulationsversuche wurden in 3D-Alginat-Kulturen durchgeführt (siehe oben). Wenn nicht anders angegeben, wurden die Versuche jeweils dreimal durchgeführt (n=3). Nachdem die Zellen 2 Tage zum Akklimatisieren unbehandelt in Kultur gehalten wurden, wurden sie entweder mit TGF-β3 oder EGF stimuliert.
Materialien:

- 2 ng/ ml TGF-β3 (Sigma, Best. Nr. T 5425)

- 10 ng/ ml hEGF (BD Science, Best.-Nr. 354052)

Zu den 6-Well-Platten wurden die entsprechenden Signalmoleküle, in den angegebenen Konzentrationen, in das Medium gegeben. Zum Ernten oder zur weiteren Stimulation der Zellen wurden diese vorher für ca. 5 Minuten mit PBS gewaschen und weiterverarbeitet (siehe oben).

2.3 siRNA-Knockdown

Sogenannte *small interfering RNA* (siRNA) ermöglicht es, bestimmte Moleküle oder Proteine in Zellen herunterzufahren (Knockdown). Die siRNA interkaliert mit der mRNA und sorgt für ihren Abbau, d.h. es wird weniger des Zielproteins synthetisiert. Die hier durchgeführten Transfektionen zählen zu den Transienten, da die siRNA mit der Zeit abgebaut wird und sich die Konzentration, z.B. durch Zellteilung, verringert (Fellmann und Lowe 2014). Die Versuche wurden jeweils dreimal durchgeführt (n=3).
Materialien:

- 10 µmol/ ml EGFR siRNA (Santa Cruz, Best. Nr. sc-29301)
- 10 µmol/ ml BGN siRNA (OriGENE, Best. Nr. SR300431) 1
- Human MSC Nucleofector Kit (Lonza, Best. Nr. VAPE-1001)
- Nucleofector^{TM} II (Amaxa Biosystems /Lonza)

Die siRNA wurde entsprechend den Herstellerangaben behandelt und aufbereitet. Die Zellen wurden für die Transfektion zu $5 \cdot 10^5$ Zelle in 1,5 ml E-Cups überführt und mit 90 µl Transfektionsreagenz und 20 µl Supplement I resuspendiert. Die siRNA wurde hinzugegeben, die Suspension eine Elektroporationsküvette überführt und mit dem Programm U-23 im Nucleofector II die eigentliche Transfektion durchgeführt. Die Zellen wurden in DMEM (mit 10 % FCS/ ohne Antibiotikum) aufgenommen und auf einer 6 Well Platte inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Wechsel mit Medium. Die Zellen wurden nach entsprechenden Zeiträumen geerntet und für weitere Experimente bei -80°C eingefroren.

2.4 Real-time PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, die es ermöglicht, spezifische Nukleotidsequenzen exponentiell zu vervielfältigen. Sie dient unter anderem als Nachweis für mRNA und kann zur Quantifizierung verschiedener Transkripte benutzt werden. Hierzu wird die mRNA zunächst in eine stabilere DNA-Form umgeschrieben (DNA) und mit einer Polymerase (z.B. der Taq-Polymerase) sowie komplementären Oligonukleotiden (Primern), die das Transkript des Interesses umschließen, durch mehrere Zyklen dupliziert. Während der Zyklen kann durch einen interkalierenden Farbstoff (z.B. SYBR-Green) ein Fluoreszenzsignal gemessen werden, welches Rückschlüsse auf die Konzentration der Replikate zulässt und durch ΔΔct-Normalisierung (Pfaffl 2001) eine Beurteilung des relativen mRNA-Levels von verschiedenen Proben ermöglicht. Die PCR-Zyklen besteht aus 3 Grundschritten: Dem Denaturieren, bei dem Doppelstränge aufgelöst werden, dem Anlagern der Primer an die DNA-Stränge (Annealing) und der Kettenverlängerung, bei der die Polymerase neue Stränge synthetisiert. Es entstehen dabei 2 n Produkte, wobei n der Anzahl der Zyklen entspricht (Heid et al. 1996).

2.4.1 Primerdesign

Alle Primer wurden mit Hilfe der Software Primer3web 4.0.0 (Untergasser et al. 2012; Koressaar und Remm 2007) designt und durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert. Dazu wurden die mRNA-Sequenzen der Proteine (Nachzulesen z.B. bei dem National Center for Biotechnologie and Information (NCBI) unter http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) in die Primer3web Software kopiert und die spezifischsten Sequenzen ausgewählt. Die Primer wurden in destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 5 pmol/ µl gelöst und mit Hilfe einer Gradienten-PCR die optimale Annealing-Temperatur bestimmt.

Materialien:

- Platinum SYBR qPCR SuperMIX UDG (Invitrogen, USA)
- Primer (Eurofins MWG GmbH, Deutschland), 5 pmol/ µl

Zur Messung am Eppendorf Realplex^2 S (Eppendorf, Deutschland) wurde die cDNA mit Platinum SYBR versetzt und der entsprechende Primer-Mix hinzugefügt.

Master-Mix für 1 Ansatz:	5 µl SYBR-green
	4 µl Primer-Mix
	1 µl cDNA

Der Ansatz wurde in eine 96-Well Platte á 10 µl und pro Primer á 5 Reihen pipettiert. Am Eppendorf Realplex wurde die SYBR-Green Intensität durch einen 520 nm Filter bestimmt. Das PCR-Programm lief 45 Zyklen und wurde durch eine Schmelzkurve verifiziert.

PCR Programm:

Initiale Denaturierung	95°C	3 min
Denaturierung	95°C	20 s
Anlagerung	Gradient von 45°C-63°C	15 s
Verlängerung	72°C	20 s

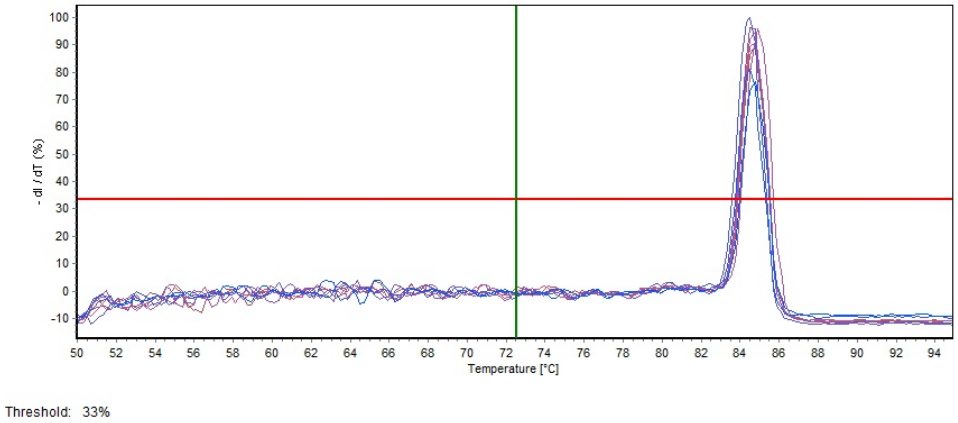

Abbildung 14: **Schmelzkurve am Beispiel des TGF-Rezeptors**

Die optimale Schmelztemperatur bzw. Annealing-Temperatur lag bei der Reihe in der die Intensität der Flureszenz am stärksten war. Die Reagenzien wurden entnommen und die Produkte bei der Firma SeqLab (Göttingen) analysiert und sequenziert. Es wurde außerdem darauf geachtet, dass sich nur ein Produkt bildet, das heißt jeweils nur eine spezifische Schmelzkurve zu erkennen ist.

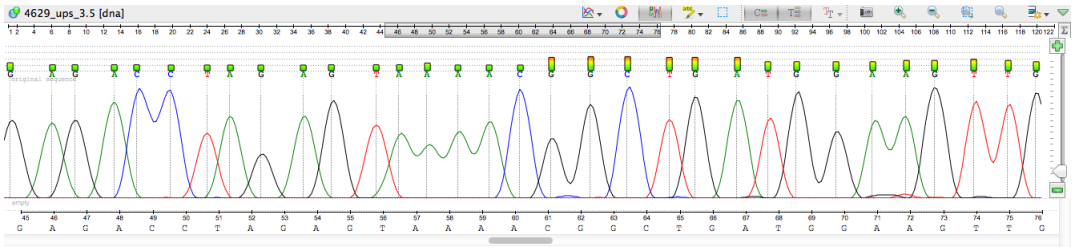

Abbildung 15: **Beispiel für die Sequenzierung eines PCR Produktes**

Die Sequenzierungen wurden mit dem Programm UGENE (Version 1.13 http://ugene.unipro.ru/) überprüft und die Sequenz in der NCBI-Bibliothek verifiziert.

Das Produkt der Primer für den TGF-Rezeptors ergab folgende Sequenz:

TGCAACGTGTCCTCCCCACAGCCGTTTGACTGAAGGCTGCTCTGGAGACCTAGAG TAAAACGGCTGATGGAAGTTGTG

Diese 78 Nukleotide stimmten zu 99 % mit den folgenden mRNA-Sequenzen überein:
Homo sapiens tgf, beta receptor 1 (TGFBR1), transcript variant 2 (NM_001130916.1)
Homo sapiens tgf, beta receptor 1 (TGFBR1), transcript variant 1 (NM_004612.2)

Das Produkt der Primer für Biglycan ergab folgende Sequenz:

ANGGCGTGAATGGAGGANTNCTTTGCTACTCCAAGCTGTACAGGCTGGGCCTAGG CCACAACCAGATCAGGATGATCGAGAACGGGAGCCTGAGCTTCCTGCCCACCCTC CGGGAGCTCCACTTGGACAACAACAAGTTGGCCAGGGTGCCCTCAGGGCTCCCA GACCTCAAGCTCCTCCAGGTGGTCTATCTGCACTCCAACAACATCATTA

Diese 213 Nukleotide stimmten zu 98 % mit den folgenden mRNA-Sequenzen überein:
Homo sapiens biglycan (BGN)(NM_001711.4)

2.4.2 Primer

Tabelle 3: **Primer**

Primer	Sequenzen (Vorwärts/ Rückwärts)	Annealing	Accesion
β2-Mikro-globulin	TGC TGT CTC CAT GTT TGA TGT ATC T TCT CTG CTC CCC ACC TCT AA	61 °C	NM_004048
TGF-β3-Rezeptor 1*	AAC CTG CTC TCC TGC TTG CT CTC CCT TCC ACC TCT AAT GAC TGA	60 °C	NM_004612.2
Biglycan*	AAT GAA CTC CAC CTA GAC CAC AA GAT GTT GTT GGA GTG CAG ATA GAC	53 °C	NM_001711
EGF-Rezeptor	CGA CAG CTA TGA GAT GGA GGA GAT CCA GAG GAG GAG TAT GTG TG	60 °C	NM_005228.3
SOX9	CAG GCT TTG CGA TTT AAG GA CCG TTT TAA GGC TCA AGG TG	60 °C	Z46629
RUNX2	TTC CAG ACC AGC AGC ACT C CAG CGT CAA CAC CAT CAT T	63 °C	NM_004348

Die mit einem Asterisk markierten Primer wurden im Rahmen dieser Arbeit angefertigt. Alle anderen Primer wurden von Mitarbeitern der AG orale Biologie und Geweberegeneration der Universität Göttingen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Miosge designt, das Produkt sequenziert und für diese Arbeit übernommen.

2.4.3 cDNA-Synthese

RNA-Isolation aus primären Zellen/ Gewebe
Materialien:

- QIAshredder (QIAGEN N.V, Niederlande)
- RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN N.V, Niederlande)

Zur Isolation von Zellen aus der Zellkultur wurden diese mit Trypsin abgelöst und bei 300 g zehn Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Zellpellet mit 350 µl RLT-Puffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol versetzt, kurz gevortext und bei Raumtemperatur zwei Minuten inkubiert. Die Probe wurde auf eine QIAshredder Säule geben und zwei Minuten bei voller Geschwindigkeit abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde zu gleichen Teilen mit 70 % Ethanol versetzt und in eine RNeasy-Säule überführt und bei 8000 g für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und zur Säule 700 µl RW1-Puffer gegeben, es erfolgte erneut eine Zentrifugation bei 8000 g für 30 Sekunden. Der Durchfluss wurde verworfen und insgesamt zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen, unter 8000 g 30 Sekunden abzentrifugiert und und eine Minute bei voller Geschwindigkeit getrocknet. Danach wurde die Säule in eine Biopur 1,5 ml Eppendorf-Cup gegeben und mit 30 µl RNase freiem Wasser versetzt. Nach fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde eine Minute bei voller Geschwindigkeit abzentrifugiert und der mRNA-Gehalt im Photometer (Nanodrop 1000, Thermo Scientific) gemessen.

Umschreiben von mRNA in cDNA
Materialien:

– Quanti Tect Reverse Transciption Kit (Quiagen)

Zum Umschreiben der mRNA in cDNA wurde das Quanti Tect Reverse Transciption Kit von Quiagen benutzt. 200 ng der mRNA wurden zu 2 µl gDNA wipe out Puffer gegeben und auf 14 µl mit RNAse freiem Wasser aufgefüllt. Es erfolgten eine Inkubation für zwei Minuten bei 42°C und danach der Zusatz von 4 µl RT-Transkriptionspuffer 5 ×, je 1 µl RT-Transkriptase sowie Primer-Mix. Die Probe wurde 15 Minuten bei 42°C inkubiert und dann drei Minuten bei 95°C. Geht man von einer Umschreibung der mRNA zu cDNA im Verhältnis eins zu eins aus, wurden durch Zugabe von 180 µl RNAse freiem Wasser eine Konzentration von 1 ng/ µl synthetisiert.

2.4.4 Durchführung der PCR

Materialien:

– Platinum SYBR qPCR SuperMIX UDG (Invitrogen, USA)

– Primer (Eurofins MWG GmbH, Deutschland), 5 pmol / µl

Zur Messung am Eppendorf Realplex^2 S (Eppendorf, Deutschland) wurde die cDNA mit Platinum SYBR versetzt und der entsprechende Primer-Mix hinzugefügt.

Master-Mix für 1 Ansatz:	5 µl SYBR-green
	4 µl Primer-Mix)
	1 µl cDNA

Der Ansatz wurde in eine 96-Well Platte á 10 µl und pro Primer á 3 Wells pipettiert. Am Eppendorf Realplex wurde die SYBR-Green Intensität durch einen 520 nm Filter bestimmt. Das PCR-Programm lief 40 Zyklen und wurde durch eine Schmelzkurve verifiziert.

PCR Programm:

Initiale Denaturierung	95°C	3 min
Denaturierung	95°C	20 s
Anlagerung	s. Primertabelle	20 s
Verlängerung	72°C	20 s

2.4.5 Bestimmung des relativen mRNA-Gehaltes

Zur Bestimmungen der mRNA-Expression in den Zellen wurde die relative Quantifizierung nach Pfaffl eingesetzt (Pfaffl 2001) und die entsprechenden Ct-Werte anhand von Haushaltsgene (HKG) normalisiert.
Diese Methode ist eine ΔΔct-Methode und es gilt:

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Effizienz (Zielgen)}^{\Delta\text{Ct Zielgen (HKG-Probe)}}}{\text{Effizienz (Kontrollgen)}^{\Delta\text{Ct Kontrolle (HKG-Probe)}}}$$

Um das relative mRNA-Level der Proben zu messen, wurde neben dem Ct-Werten des Gens, welches betrachtet werden sollte (Zielgen), auch ein Haushaltsgen bestimmt bzw. gemessen. Haushaltsgene sind Gene, von denen man annimmt, dass sie in den Zellen gleichmäßig und konstant produziert werden. Sie dienen in der Berechnung nach Pfaffl als Referenzpunkt für das Zielgen. Die Primereffizienz beschreibt, wie stark ein Primer in seiner Effektivität von der theoretischen Verdopplung in einem PCR-Zyklus abweicht. Die Primereffizienz des HKG wurde mit annähernd 2 bestimmt. Pro Zyklus sollte die mRNA also verdoppelt werden, deshalb wurde dieser Wert in den Berechnungen als n = 2 gesetzt. Es wurden pro Gen und Versuch dreimal drei Ct-Werte an verschiedenen Tagen gemessen und von den neun Werten maximal drei Werte verworfen, um die Standardabweichung der Ct-Werte unter 0,5 zu halten.

2.5 Proteinbestimmung

Zur Visualisierung der Proteinexpressionveränderungen in den Experimenten wurden SDS-Page und Western Blot verwendet. Die Hauptthese dieser Arbeit wurde zusätzlich durch Quantifizierung mit dem Analyseprogramm ImageJ unterstützt.
Die SDS-Page ist ein Verfahren bei dem die Proteine einer Probe via Natriumlaurylsulfat (SDS), einem anionischem Tensid, denaturiert und in ihrer Ladung angeglichen werden. Die denaturierten Proben werden auf ein Gel aufgetragen und, unter Anlegen einer Gleichspannung, in ihre molekularen Größen aufgetrennt. Im Western Blot werden diese Proteine auf eine Membran übertragen und dann durch eine proteinspezifische Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar gemacht (Blancher und Jones 2001).

2.5.1 SDS-Page

Materialien:
Polyacrylamid-Gel:

- Trenngelpuffer: 1,5 mol/l Trisaminomethan (TRIS), pH 8,9
- Sammelgelpuffer: 0,5 mol/l Trisaminomethan (TRIS), pH 6,8
- SDS: 10 % Natriumdodecylsulfat
- Rotiphorese® Gel 30 (ROTH): Acrylamid (30 %), Bisacrylamid (0,8 %)
- APS: Ammonium peroxodisulfat (10 %)
- Tetramethylethylendiamin (TEMED)

Elektrophorese:

- Laufpuffer: 0,5 mol/l TRIS, 0,38 mol/l Glycerin, 0,1 % Natriumdodecylsulfat, pH 8,7
- Probenpuffer (3 ×): 0,3 mol/l TRIS, 0,24 mol/l Glycerin, 9 % Natriumdodecylsulfat
- Sammelgel (5 %): 1,25 ml Sammelgelpuffer, 50 µl 10 % SDS, 0,8 ml Acrylamid

2,7 ml H_2O
0,2 ml APS

– Laufpuffer:
0,5 mol/l TRIS
0,38 mol/l Glycerin
0,1 % Natriumdodecylsulfat
pH 8,7

– Probenpuffer (3x):
0,3 mol/l TRIS
0,24 mol/l Glycerin
9 % Natriumdodecylsulfat

– Sammelgel (5 %):
1,25 ml Sammelgelpuffer
50 µl 10 % SDS
5 µl TEMED
0,8 ml Acrylamid
2,7 ml H_2O
0,2 ml APS

– Trenngel (8 %):
1,4 ml Trenngelpuffer
55 µl 10 % SDS
5 µl TEMED
1,48 ml Acrylamid
2,36 ml H_2O
0,25 ml APS

Zur Herstellung der Polyacrylamid-Gele wurde zunächst das Trenngel zusammenpipettiert, es wurden achtprozentige und zehnprozentige Gele benutzt. Das Trenngel wurde zwischen die gereinigten Glasplatten (Ohrenplatte und Platte mit Spacer) auf eine Höhe von 6 cm gegossen und vorsichtig mit 100 % Ethanol überschichtet, um eine gleichmäßige Oberfläche zu erhalten und die Polymerisation zu gewährleisten. Danach wurde das Sammelgel hergestellt und über das Trenngel gegossen, nachdem der Ethanol entfernt wurde. Es wurde ein 10 zackiger Kamm für die Probentaschen eingesetzt und das Gel für mindestens 2 Stunden auspolymerisiert. Die Platten wurden in eine Elektrophoresekammer (Nachbau Biometra Kammer) gesetzt und diese mit Laufpuffer aufgefüllt. Die Proben wurden mit dem Probenpuffer (3 ×) versetzt, kräftig gevortext und bei 95°C mindestens fünf Minuten denaturiert. Danach wurden sie direkt auf das Elektrophoresegel aufgetragen. Als Proteinleiter wurde die Thermo Pierce #26616 (SM0671) Fermentas PageRuler Prestained Protein Ladder benutzt. Die

Proteine wurden bei 10-15 mA im Sammelgel konzentriert und danach bei 20-30 mA im Trenngel aufgetrennt.

2.5.2 Western Blot

Materialien:
Blot:

– Transferpuffer:	0,25 mol/l TRIS 0,192 mol/l Glycerin 20 % Methanol pH 8,3
– Transfermembran	PVDF Immobilon-P bzw. Millipore
– Filterpapier	GB 40 Blotting-Papier B004, 580 x 600 mm

Färbung der Transfermembran:

– Färbelösung:	0,1 % Coomassie brillant blue R 50 % Methanol 7 %Essigsäure
Entfärber I:	50 % Methanol 7 %Essigsäure
Entfärber II:	90 % Methanol 10 %Essigsäure

Immunreaktion:

– TBS-T:	0,02 mol/l TRIS 0,15 mol/l NaCl 0,5 % Tween 20 pH 7,4
– Blocklösung:	5 % Magermilchpulver in TBS-T

– Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent

Tabelle 4: **Antikörper Western Blot**

Epitop	Art	Verdünnung	Firma/ Best.-Nr.
SOX9 AS 400-509	Monoklonal IgG aus Maus	1:2000	Abnova/ BGN (H-150):sc-33788
RUNX2 AS 300-400	Polyklonal IgG aus Kaninchen	1:2000	Abcam/ ab23981
p-ERK Region p-Tyr 204	Monoklonal IgG aus Maus	1:500	Santa Cruz/ p-ERK (E-4):sc-7383
BGN AS 131-280	Polyklonal IgG aus Kaninchen	1:1000	Santa Cruz/ BGN (H-150):sc-33788
P-SMAD2 C-Terminus	Polyklonal IgG aus Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology/ #3101
EGFR C-Terminus	Polyklonal IgG aus Kaninchen	1:1000	Santa Cruz/ EGFR (1005):sc-03

Das Polyacrylamid-Gel wurde aus der Elektrophoresekammer vorsichtig entfernt und zwischen je 3 Filterpapieren bzw. 3 Filterpapieren und der Transfermembran in der Western Blot Kassette fixiert. Die Transfermembran wurde mit 100 % Methanol für 15 Sekunden aktiviert, Transfermembran und Filterpapier wurden dann für mindesten 15 Minuten in Transferpuffer eingeweicht. Die Blot Kassette wurde in die Blotkammer gesteckt und das Gel unter Wasserkühlung für 90-120 Minuten bei 350 mA geblottet. Die Transfermembran wurde nach dem Blotten zur Kontrolle mit Coomasie gefärbt und die Proteine durch Entfärbung (Entfärber I/II unter Sicht) sichtbar gemacht. Die Membran wurde einmal mit TBS-T gewaschen und danach eine Stunde mit 5 % Milchpulver/ TBS-T geblockt. Nach einer Stunde wurde die Blocklösung entsprechend der Herstellerangaben mit dem primären Antikörper in 5 % Milchpulver/TBS-T ersetzt. Die Membran wurde dann über Nacht bei 4°C im Kühlraum geschwenkt (mit Ausnahme von α-Tubulin, hier wurde die Reaktion eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt). Am nächsten Tag wurde die Membran fünfmal fünf Minuten mit TBS-T gewaschen und der sekundäre Antikörper auf die Membran gegeben.
Sekundär Antikörper in 5 % Milchpulver/ TBS-T:

- Anti-Rabbit IgG-Peroxidase (Sigma A0545) Verdünnung 1:100 000
- Anti-Mouse IgG-Peroxidase (Sigma A9917) Verdünnung 1:40 000
- Anti-Goat IgG-Peroxidase (DAKO P044801-2) Verdünnung 1:3000

Nach einer Stunde Inkubation wurde die Blotmembran wieder fünfmal fünf Minuten mit TBS-T gewaschen und danach der Antikörper mit einer Detektionslösung nachgewiesen. Bei

starken Reaktionen wurde das ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Amersham, England) benutzt. Nach fünf Minuten wurde die Membran vorsichtig in eine Röntgenkassette gelegt und in einer Dunkelkammer unter Rotlicht entwickelt.

2.5.3 Bestimmung des relativen Proteinniveaus

Zur Bestimmung des relativen Proteinniveaus wurde das Programm ImageJ (Ver. 1.07) benutzt. Die Western Blots wurden anhand ihrer Grauwerte ausgemessen und mit Hilfe von α-Tubulin als Ladungskontrolle quantifiziert (Tan und Ng 2008; Gassmann et al. 2009). Es wurde darauf geachtet, dass die Blots eine möglichst geringe Belichtungszeit hatten, damit ein möglicher Unterschied deutlich wird. Die Western Blot Filme wurden mit einem Durchlichtscanner (mit 600 dpi) aufgenommen und die einzelnen Banden in ImageJ markiert. Das Programm stellt eine Kurve der Grauwerte in Relation zur Hintergrund dar. Die absoluten Werte des Integrals unter dieser Kurve dienten zum Berechnen der relativen Proteinniveaus. Es gilt:

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Grauwert der Probe}}{\text{Grauwert } \alpha\text{-Tubulin der Probe}} : \frac{\text{Grauwert der Kontrolle}}{\text{Grauwert } \alpha\text{-Tubulin der Kontrolle}}$$

2.6 HE-Färbung

Die in Paraffin eingebetteten Präparate wurden dankbarerweise von der AG Orale Biologie und Geweberegeneration der Universität Göttingen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Miosge zur Verfügung gestellt. Sie wurden in einer stärke von 5-7 µm geschnitten und über Nacht auf einem Objektträger bei 37°C getrocknet. Von jeweils drei Proben wurde ein repräsentativer Schnitt für diese Arbeit als Abbildung aufbereitet (n=3).
Materialien:

- Hämalaun (nach Meyer) (Merck, Best. Nr.: 1.09249)
- Eosin Y 0,01 % (ApplChem, Best. Nr.: A0822.0025)

Durchführung:

– Entparaffinieren:	2 ·10 Minuten in Xylol 5 Minuten 100 % Ethanol 5 Minuten 90 % Ethanol 5 Minuten 80 % Ethanol 5 Minuten 60 % Ethanol 5 Minuten 50 % Ethanol 5 Minuten Aqua Dest.
– Hämalaun-Färbung:	6 Minuten in Hämalaun (1:4 verdünnt) 10 Minuten unter fließendem Wasser bläuen
– Eosin-Färbung:	5 Minuten in Eosin (0,1 %, mit einigen Tropfen Essigsäure versetzt)
– Dehydrieren:	5 Minuten Aqua Dest. 5 Minuten 50 % Ethanol 5 Minuten 60 % Ethanol 5 Minuten 80 % Ethanol 5 Minuten 90 % Ethanol 5 Minuten 100 % Ethanol 2 · 10 Minuten in Xylol

Die Schnitte wurden wie oben Aufgezählt in die verschiedenen Substanzen gegeben und dann mit einem Deckgläschen unter Verwendung von Eukitt-Kleber eingedeckelt.

2.7 Immunhistochemie

Mit Hilfe der Immunhistochemie (IHC) können Antigene auf histologischen Schnitten nachgewiesen werden. Die Antigenen werden durch enzymatische Vorbehandlung freigelegt und können dann durch eine Antigen-Antikörper-Enzym-Reaktion farblich dargestellt werden. In dieser Arbeit wurde ein alkalische Phosphatase Polymersystem genutzt, dass einen rötlichen Farbumschlag an gebundenen Antikörpern auslöst. In der Immuncytochemie (ICC) wird ein ähnliches Verfahren genutzt. Hier ist der sekundäre Antikörper in der Lage durch ein Fluoreszenssignal sichtbar gemacht zu werden (Ramos-Vara und Miller 2014). Von jeweils drei Proben wurde eine IHC für diese Arbeit als Abbildung aufbereitet (n=3).
Die in Paraffin eingebetteten Präparate wurden dankbarerweise von der AG Orale Biologie und Geweberegeneration der Universität Göttingen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Miosge zur Verfügung gestellt. Sie wurden in einer Stärke von 5-7 µm geschnitten und für mindestens drei Tage auf einem Objektträger bei 37°C getrocknet.
Materialen:

- TBS-T: 0,20 mol/l TRIS
  0,15 mol/l NaCl
  0,5 % Tween 20
  pH 7,4
- Universal-Block (Diag. BioSystems, Best.Nr.: K049B AUTO)
- ProTaq Antigen-Enhancer (BioCyc, Best.-Nr.: 401602092)
- Protease 24
- Hyaluronidase (Sigma, Best.-Nr.: H-3506)
- Chondroitinase (Sigma, Best.-Nr.: C2905-10UN)
- HiDef Amplifier for Mouse and Rabbit (CellMarque, Best.-Nr.: K0679)
- HiDef Polymer Detector (CellMarque, Best. Nr.: 9620-21)

Die Schnitte wurden zunächst wie in dem Kapitel HE-Färbung beschrieben entparaffiniert. Dann wurden sie 10 min in TBS-Puffer gewaschsen und vorsichtig um das Präparat herum getrocknet. Auf das Präparat wurden ca. 50 µl Universalblock gegeben und dieses für 30 min in einer feuchten Kammer belassen. Es wurde drei mal drei Minuten mit TBS-T gewaschen. Dann wurden die Antigene mit einer 60°C warmen ProTaq-Lösung demaskiert und die Schnitte noch einmal wie zuvor gewaschen. Darauf wurden die Schnitte für 3 Minuten mit Protease24 behandelt, gewaschen und für 10 Minuten mit BSA/ TBS versetzt. Dann wurde der primäre Antikörper (1:100) auf den Schnitt gegeben und dieser über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte drei mal drei Minuten mit TBS-T gewaschen. Der sekundäre Antiköper (HiDef Amplifier) wurde für je 10 Minuten á 50 µl hinzugefügt. Wieder

wurde wie oben gewaschen. Dann kam die HiDef-Polymer-Lösung auf den Schnitt. Waschschritt. Es wurde mit ca. 100µl Chromogen für ca. 6 Minuten gefärbt. Dann noch einmal für 10 Minuten in TBS-T gewaschen und wie oben in der HE-Färbung ab Bläuen bis Eindeckeln vorgegangen. Es wurde von jeweils drei Proben eine ICC als Abbildung für die Arbeit aufbereitet.

Tabelle 5: **Antikörper Immunhistologie**

Epitop	Art	Verdünnung	Firma/ Best.-Nr.
EGFR C-Terminus	Polyklonal IgG aus Kaninchen	1:100	Santa Cruz/ EGFR (1005):sc-03
TGFBR1 C-terminale Domäne	Polyklonal IgG aus Kaninchen	1:100	Santa Cruz TGFBR1 (V-22):sc-398
EGF Aminosäuren 971-1023	Polyklonal IgG aus Kaninchen	1:100	Santa Cruz EGF (Z-12):sc-275
TGF-β3 C-Terminus	Polyklonal IgG aus Kaninchen	1:100	Santa Cruz TGFb3 (V):sc-82
BGN Aminosäuren 131-280	Polyklonal IgG aus Kaninchen	1:100	Santa Cruz BGN (H-150):sc-33788

2.8 Immuncytochemie

Materialien:

- Paraformaldehyd — 2 % Paraformaldehyd bei 70°C in PBS gelöst
- Triton X-100 — 0,25 % Triton X-100 in PBS gelöst
- Bovine Serum Albumin (BSA) — 1 % BSA in PBS gelöst

Tabelle 6: **Antikörper Immuncytochemie**

Epitop	Art	Verdünnung	Firma
EGFR C-Terminus	Polyklonal IgG aus Kaninchen	1:100	Santa Cruz/ EGFR (1005):sc-03
TGFBR1 C-terminale Domäne	Polyklonal IgG aus Kaninchen	1:100	Santa Cruz TGFBR1 (V-22):sc-398

Die Zellen wurden am Vortag auf ein steriles Deckgläschen in einer 12-Wellplatte ausgesät. Das Deckgläschen wurde entfernt und auf einer mit Parafilm überzogenen Box gelegt und die Zellen auf dem Glas mit PBS gewaschen. Nach Entfernung des Waschmediums wurden die Zellen mit Paraformaldehyd/ PBS 15 Minuten fixiert. Es wurde zweimal mit PBS gewaschen und die Zellmembran durch Triton X-100 permeabilisiert, um danach für 15 Minuten mit BSA/ PBS zu blocken. Nach hinzufügen des primären Antikörper in BSA/ PBS in der Verdünnung entsprechend der Herstellerangaben wurden die Zellen auf den Deckgläschen bei 37°C in einer feuchten Kammer für 60 Minuten inkubiert. Es wurde zweimal mit PBS gewaschen und dann der sekundäre Antikörper in BSA/ PBS gelöst und mit DAPI (1:1000) bei 37°C 30-60 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert.

- Sekundärantikörper (DAKO, Flourescenz Mounting Medium, Best.-Nr.: 830232)

Es wurde erneut zweimal mit PBS gewaschen und das Deckgläschen mit Fluorescens Mounting Medium (DAKO) eingedeckelt. Die Präparate wurden unter UV-Licht abfotografiert. Die DAPI Kernfärbung und die Antikörperfärbung wurden mit Photoshop (Adobe, CS6) übereinander gelegt. Von jeweils drei Proben wurde eine ICC für diese Arbeit als Abbildung aufbereitet (n=3).

3 Ergebnisse

Die hier folgenden Ergebnisse sollen eine Verbindung zwischen dem TGF-β3 und dem EGF sowie dem Matrixmolekül BGN zeigen. Deshalb werden zunächst die Nachweise der zugehörigen Rezeptoren sowie Mediatoren innerhalb des Systems und anschließend Ergebnisse der Stimulations- bzw. Inhibitionsversuche dargestellt.

3.1 Rezeptornachweis

Um zu untersuchen, ob die Wachstumsfaktoren TGF-β3 und EGF an CPCs eine Rolle spielen und dort binden können, wurden CPCs und Chondrozyten für die quantitative real-time PCR (qPCR) aufgearbeitet. Es wurden histologische Präparate angefertigt, die die entsprechenden Rezeptoren im Knorpelgewebe nachweisen und es wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenzen gezeigt, dass diese auch an den chondrogenen Vorläuferzellen vorhanden sind.

3.1.1 TGF-β3-Rezeptor

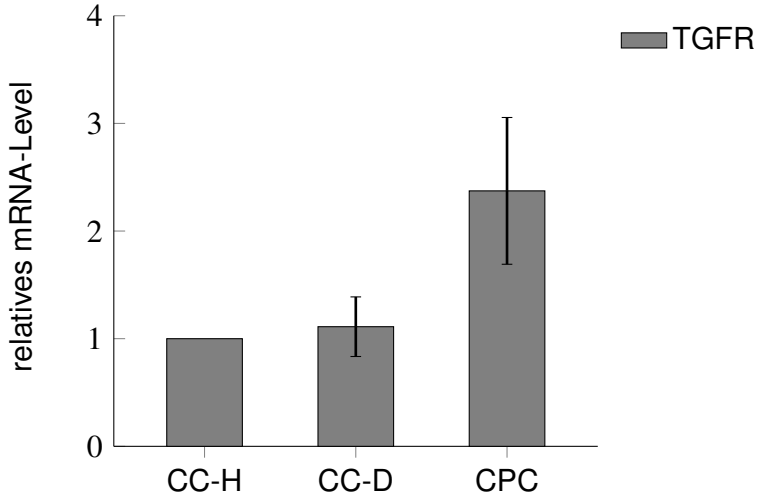

Abbildung 16: **qPCR des TGF-β-Rezeptors**

Es wurden Verschiedene Zelltypen aus dem Kniegelenk kultiviert und für die qPCR aufbereitet. CC-H: Chondrozyten aus makroskopisch gesunden Bereichen; CC-D: Chondrozyten aus makroskopisch geschädigten Bereichen; CPC: Chondrogene Vorläuferzellen. Die Daten wurden nach Pfaffl (2001) normalisiert, als HKG diente β2-Mikroglobulin. Die Fehlerbalken bedeuten ± Standardabweichung aus n=3.

In der qPCR wurden Chondrozyten aus geschädigten Knorpelbereichen und den CPCs in Bezug zu Chondrozyten aus makroskopisch gesunden gesetzt. Die Chondrozyten aus den gesunden Bereichen wurden als Referenzpunkt mit 1 gleichgesetzt. Die hier folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Normalisierung der qPCR nach Pfaffl (2001).

Tabelle 7: **qPCR des TGF-β-Rezeptors**

Zelltyp	relatives mRNA-Level	Standardabweichung
CC-H	1	-
CC-D	1,11	± 0,28
CPC	2,37	± 0,68

Es wurden Verschiedene Zelltypen aus dem Kniegelenk kultiviert und für die qPCR aufbereitet. CC-H: Chondrozyten aus makroskopisch gesunden Bereichen; CC-D: Chondrozyten aus makroskopisch geschädigten Bereichen; CPC: Chondrogene Vorläuferzellen. Die Daten wurden nach Pfaffl (2001) normalisiert, als HKG diente β2-Mikroglobulin. Standardabweichung aus n=3.

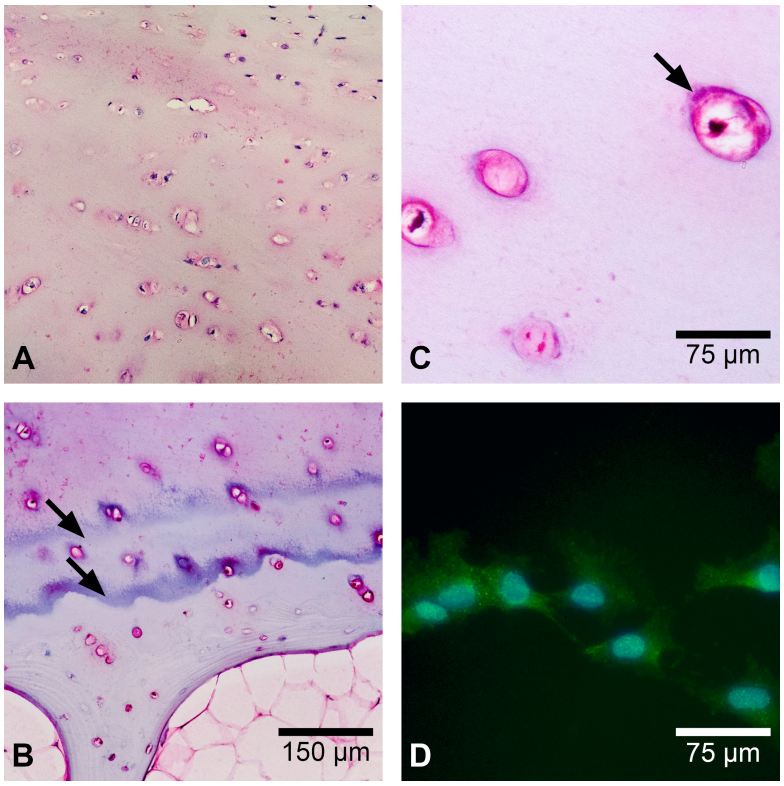

Abbildung 17: **Immunhistochemischer und Immunfluoreszenz Nachweis des TGF-β-Rezeptors**

A-C: Immunhistochemie des TGF-β-Rezeptors auf defektem Knorpelgewebe mit Hämalaun-Gegenfärbung; A: Bereich aus der Knorpeloberfläche, 40×; B: Bereich aus der Knorpelknochengrenze mit charakteristischer Verdopplung der Grenzmark (Pfeil), 40×; C: Einzelne Chondrozyten. Es fällt die für Oberflächenrezeptoren typische ringförmige Färbung der Zellen auf (Pfeil), 100×; D: Immunfluoreszenz an chondrogenen Vorläuferzellen. Die Kerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt, die Rezeptoren zeigen sich hier grün, 60×.

Sowohl die Schnitte aus makroskopisch gesunden Bereichen des Knorpels (hier nicht gezeigt) als auch die aus den kranken Bereichen zeigten sich positiv für den TGF-β-Rezeptor (Abbildung 17 A-C). Im Fluoreszenzmikroskop war eine deutliche und homogene Anfärbung an der Zellmembran der CPCs und damit eine positive Reaktion für den TGF-β-Rezeptor zu erkennen (Abbildung 17 D).

3.1.2 EGF-Rezeptor

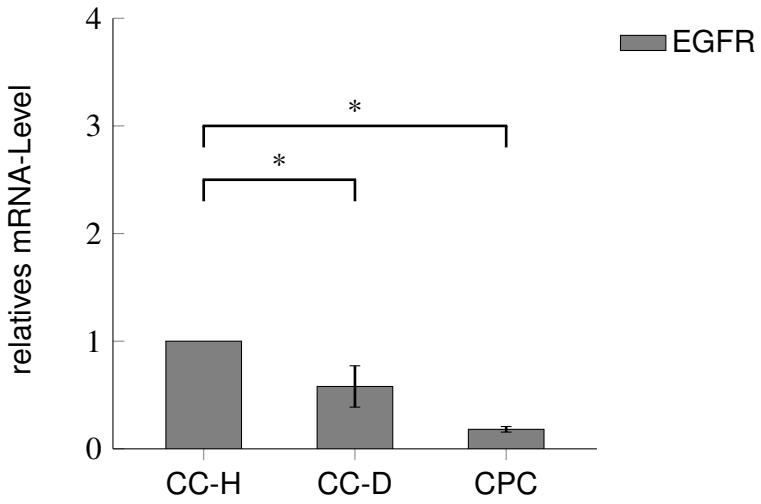

Abbildung 18: **qPCR des EGF-Rezeptors**

Es wurden Verschiedene Zelltypen aus dem Kniegelenk kultiviert und für die qPCR aufbereitet. CC-H: Chondrozyten aus makroskopisch gesunden Bereichen; CC-D: Chondrozyten aus makroskopisch geschädigten Bereichen; CPC: Chondrogene Vorläuferzellen. Die Daten wurden nach Pfaffl (2001) normalisiert, als HKG diente β2-Mikroglobulin. Die Fehlerbalken bedeuten ± Standardabweichung aus n=3.*P≤0,05.

In der qPCR wurden Chondrozyten aus geschädigten Knorpelbereichen und den CPCs in Bezug zu Chondrozyten aus makroskopisch gesunden gesetzt. Die Chondrozyten aus den gesunden Bereichen wurden als Referenzpunkt mit 1 gleichgesetzt. Die hier folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Normalisierung der qPCR nach Pfaffl (2001).

Tabelle 8: **qPCR des EGF-Rezeptors**

Zelltyp	relatives mRNA-Level	Standardabweichung
CC-H	1	-
CC-D	0,57	± 0,19
CPC	0,18	± 0,02

Es wurden Verschiedene Zelltypen aus dem Kniegelenk kultiviert und für die qPCR aufbereitet. CC-H: Chondrozyten aus makroskopisch gesunden Bereichen; CC-D: Chondrozyten aus makroskopisch geschädigten Bereichen; CPC: Chondrogene Vorläuferzellen. Die Daten wurden nach Pfaffl (2001) normalisiert, als HKG diente β2-Mikroglobulin. Standardabweichung aus n=3.

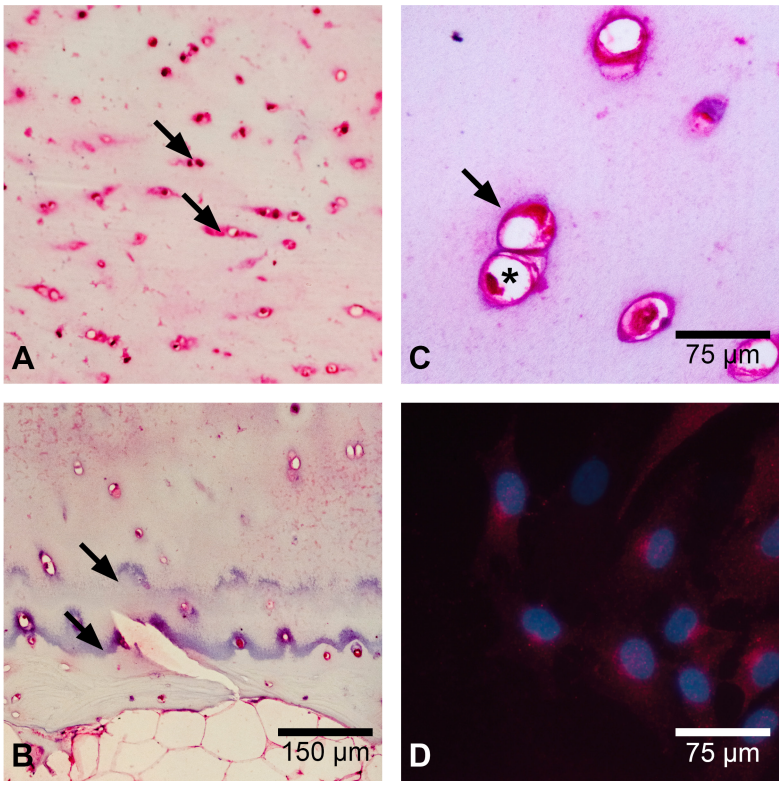

Abbildung 19: **Immunhistochemischer und Immunfluoreszenz Nachweis des EGF-Rezeptors**

Immunhistochemie des EGF-Rezeptors auf defektem Knorpelgewebe; A: Oberflächlicher Bereich. Die Rezeptor positiven Zellen (Pfeil) zeigen einen auffallend roten Saum, 40×; B: Knorpelknochengrenze mit charakteristischer Verdopplung der Grenzmark (Pfeil); C: Einzelne Chondrozyten. Es fällt die für Oberflächenrezeptoren typische ringförmige Färbung der Zellen auf (Pfeil). Chondron gebildet aus zwei Chondrozyten (Asterisk), 100×; D: Immunfluoreszenz an CPCs. Die Kerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt, die Rezeptoren zeigen sich hier rot, 60×

Wie auch beim Nachweis des TGF-β-Rezeptors waren die Immunhistochemien für den EGF-Rezeptor positiv (Abbildung 19 A-C). Im Fluoreszenzmikroskop war eine deutliche Reaktion der CPCs zu erkennen, die sich in paranukleären Bereichen zu konzentrieren scheint (Abbildung 19 D).

3.2 Nachweis der Signalmoleküle

Im nächsten Schritt wurde durch histologische Methoden untersucht, ob die Mediatoren TGF-β3, BGN und EGF im Knorpelgewebe vorhanden sind. Sie wurden zwischen makroskopisch gesunden Knorpelproben und Proben aus geschädigten Bereichen verglichen.

3.2.1 TGF-β3 im gesunden und kranken Knorpel

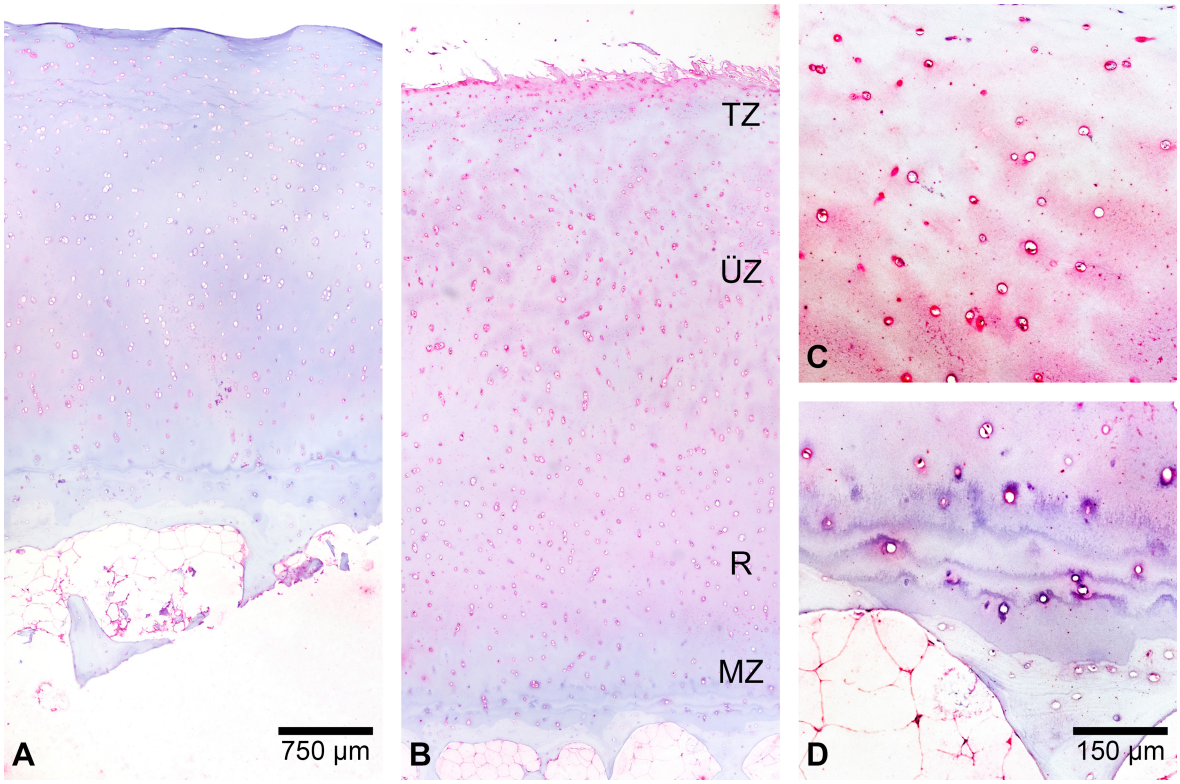

Abbildung 20: **Immunhistochemischer Nachweis von TGF-β3**

A: Knorpelprobe aus einem makroskopisch gesunden Bereich, 10×; B: Probe aus einem makroskopisch kranken Bereich, 10×; C: Probe aus der Tangentialzone im krankem Bereich, 40×; D: Probe aus der Knorpelknochengrenzen im kranken Bereich, 40×. TZ: Tangentialzone, ÜZ: Übergangzone, R: Radiärzone, MZ: Mineralisierte Zone.

Im Vergleich zwischen den makroskopisch gesunden und kranken Bereichen zeigte sich im Falle von TGF-β3, dass die Immunreaktion vor allem in den makroskopisch kranken Bereichen stärker positiv war. Die Reaktionen waren für den Wachstumsfaktor in der zentralen Zone des kranken Knorpels am deutlichsten, während die tangentiale Schicht und der Bereich um die Grenzmark in beiden Präparaten schwächere Reaktionen zeigten (Abbildung 20 A und B). Des Weiteren konnte man in den histologischen Schnitten erkennen, dass TGF-β3 sowohl außerhalb der Zellen als auch in bzw. an den Zellen selbst deutlich positiv war (Abbildung 20 C und D).

3.2.2 Biglycan im gesunden und kranken Knorpel

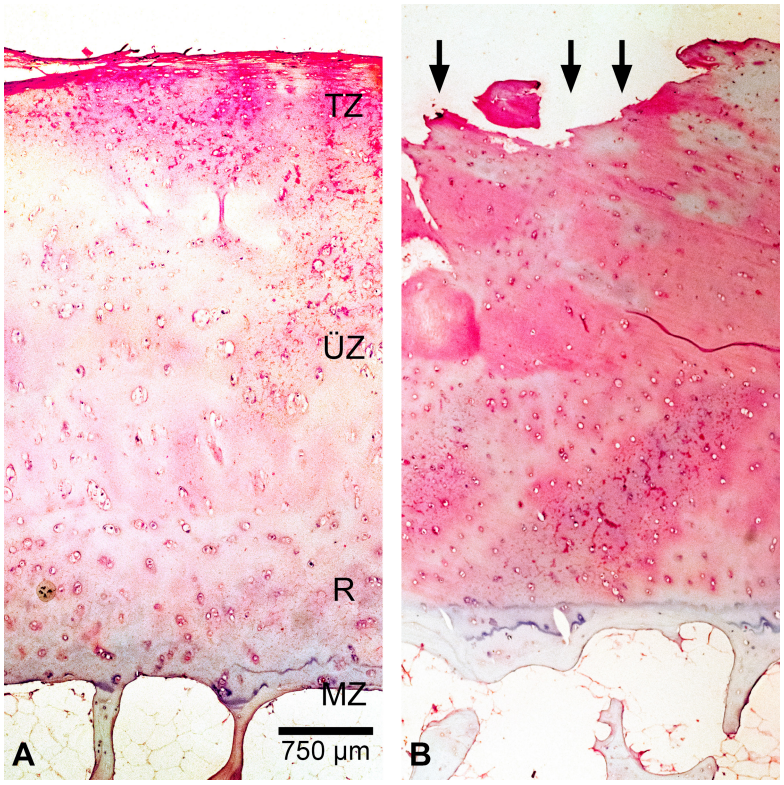

Abbildung 21: **Immunhistochemischer Nachweis von Biglycan**

A: Knorpelprobe aus einem makroskopisch gesunden Bereich, 10×; B: Probe aus krankem Bereich, 10×. A: Starke Färbung innerhalb der Tangentialzone bis zur Übergangszone, schwache Immunreaktion an der Superfizialschicht (Pfeil). B: Inhomogene Bereiche (Asterisk) und stark degenerierter Oberfläche (Pfeil). TZ: Tangentialzone, ÜZ: Übergangzone, R: Radiärzone, MZ: Mineralisierte Zone.

In der Immunhistochemie zeigte sich im Vergleich zum makroskopisch kranken Knorpel eine starke positive Farbreaktion zwischen der Tangentialzone und der Übergangszone. Die Knorpelproben aus dem erkrankten Bereich stellten sich sehr heterogen dar.

3.2.3 EGF im gesunden und kranken Knorpel

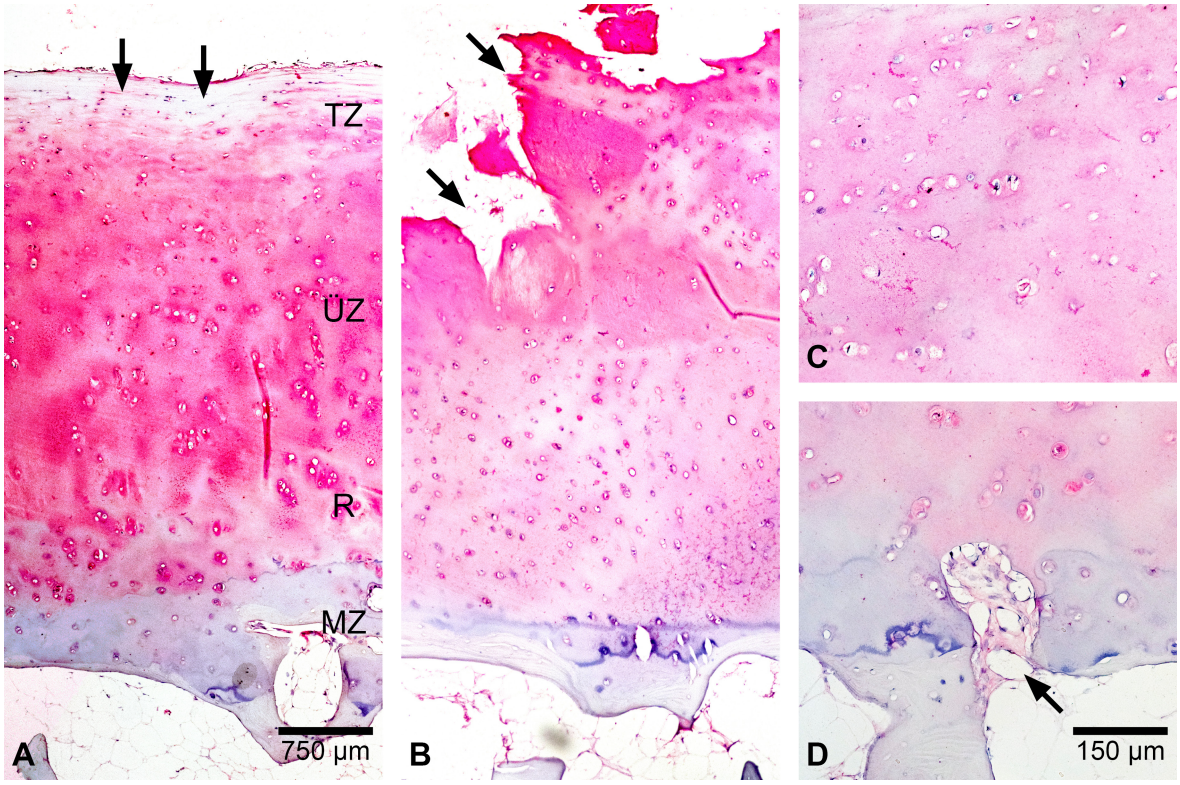

Abbildung 22: **Immunhistochemischer Nachweis von EGF**

A: Knorpelprobe aus einem makroskopisch gesunden Bereich, 10×; B: Probe aus krankem Bereich, 10×; C: Probe aus krankem Bereich, Tangentialzone, 40×; D: Probe aus krankem Bereich, Knorpelknochengrenze, 40x. A: Stark positive Färbung innerhalb der Tangentialzone bis zur Übergangszone, schwache positive Färbung an der Superfizialschicht (Pfeil). B: Schwächere positive Färbung des Präparates zwischen Übergangzone und mineralisierter Zone. Stark degenerierter, jedoch stark angefärbte positive Oberfläche (Pfeil). In D Gefäßeinsprossung (Pfeil).TA: Tangentialzone, TR: Übergangzone, R: Radiärzone, MZ: Mineralisierte Zone

In den Immunhistochemien für EGF zeigte sich im Vergleich am gesunden Knorpel eine schwache Reaktion im superfizialen Bereich (Abbildung 22 A Pfeil) und eine starke Reaktion zwischen der Tangentialzone und der Übergangszone. Die Knorpelproben aus den erkrankten Bereichen stellten sich sehr heterogen dar. Neben der degenerierten Oberfläche, die stark positiv war, wies der Knorpel in der Übergangszone schwach positive Bereiche auf. Vor allem in der Radiärzone war die Immunreaktion nur schwach ausgeprägt.

3.3 TGF-β3 Einfluss die Synthese von Biglycan

Um zu untersuchen, ob der Wachstumsfaktor TGF-β3 einen Einfluss auf die Synthese des Matrixmoleküls BGN hat, wurden immortalisierte CPC241ht zunächst von der 2D-Kultur in eine 3D-Alginat-Kultur überführt. Die Alginatkultur dient dazu den Zellen eine Umgebung zu schaffen, die dem Physiologischen eher entspricht und die Einflüsse durch Adhäsion am Boden der Zellkulturflaschen verhindert. Die Zellen wurden für mindestens drei Tage unbehandelt in der 3D-Kultur gehalten, um den Zellen die Möglichkeit zu geben sich an die Umgebung zu akklimatisieren, und wurden dann mit dem Wachstumsfaktor stimuliert.

3.3.1 Einfluss von TGF-β3 auf das Biglycan-mRNA-Level

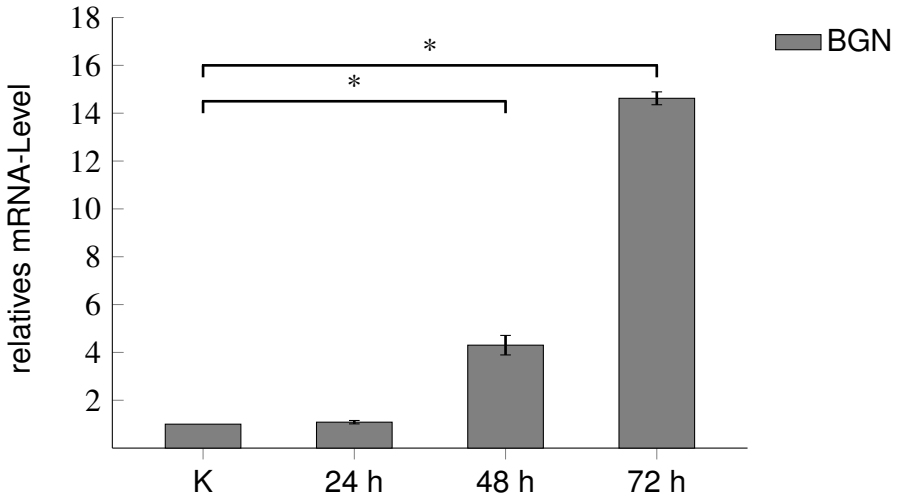

Abbildung 23: **qPCR von BGN nach TGF-β3 Stimulation**

Die CPC241ht wurden mit 2ng TGF-β3 /ml pro Tag über 3 Tage stimuliert. Diese wurden nach 24, 48 bzw. 72 Stunden geerntet und für die PCR aufbereitet. Die Daten wurden nach Pfaffl (2001) normalisiert, als HKG diente β2-Mikroglobulin. Die Fehlerbalken bedeuten ± Standardabweichung aus n=3.*P≤0,05.

Die Zellen wurden mit 2 ng TGF-β3/ ml pro Tag stimuliert und zusammen mit der jeweiligen Kontrolle nach 24, 48 bzw. 72 Stunden geerntet. Aus dem Zellpellet wurde die mRNA isoliert und zur Quantifizierung in der PCR zu cDNA umgeschrieben. Es stellte sich heraus, dass im Vergleich zur Kontrolle die BGN-mRNA nach 24 h mit dem 1,08 (SD ± 0,07) fachen Niveau annähernd gleich geblieben war. Nach 48 h konnte ein 4,3 (SD ± 0,41) faches mRNA-Level und nach 72 h sogar ein 14,62 (SD ± 0,27) faches Level gemessen werden.

3.3.2 Einfluss von TGF-β3 auf die Biglycan Proteinexpression

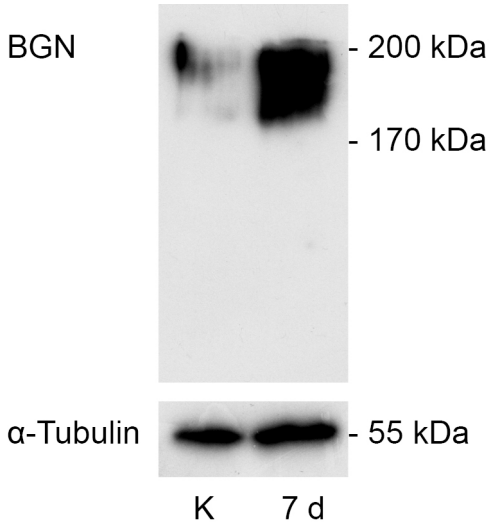

Abbildung 24: **WB von BGN nach TGF-β3 Stimulation**

Die CPC241ht wurden für 4 Wochen unbehandelt in Alginat kultiviert. Danach wurden sie für 7 Tage mit 2 ng TGF-β3 ml behandelt. Im Western Blot wurde die Kontrolle (K) im Vergleich zu den behandelten Zellen (7 d) aufgetragen. Als Ladungskontrolle wurde α-Tubulin benutzt. Das Experiment wurde mit n=1 durchgeführt.

Um das erhöhte BGN-mRNA-Level auch auf Proteinebene zu zeigen, wurden die CPC241ht in eine Alginatkultur überführt und 4 Wochen unbehandelt kultiviert. Danach wurde das Medium für eine Woche jeweils mit 2 ng TGF-β3/ ml pro Tag versetzt. Die Zellen wurden daraufhin geerntet und für den Western Blot aufbereitet. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich in der behandelten Zelllinie eine deutliche Erhöhung der Proteinexpression des BGN im Bereich von 180 bis 200 kDa. Der Western Blot zeigt in Abbildung 24 das typische „verschmierte“ Bild eines Glykosaminoglykans .

3.4 Biglycan Einfluss auf die EGF-Rezeptor Synthese

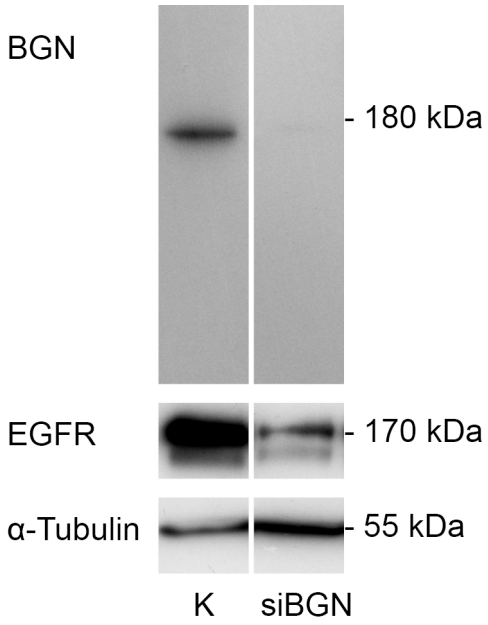

Abbildung 25: **WB des EGF-Rezeptors nach BGN Knockdown**

Die Zellen wurden mit BGN siRNA transfiziert und für 3 Tage in 2D-Kultur gehalten. Am Wirkungsvollsten war im Western Blot die siRNA-Variante B (In der Abbildung dargestellt). BGN war nicht mehr nachweisbar und es zeigte sich eine deutliche Reduktion des EGF-Rezeptors. Ladungskontrolle war α-Tubulin. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot aus n=3.

Der Einfluss von BGN auf die Synthese des EGF-Rezeptors konnte durch einen siRNA-Knockdown gezeigt werden. Die CPC241ht wurden mit verschiedenen siRNA-Varianten transfiziert und für 3 Tage in Kultur gehalten. Als Kontrolle dienten die unbehandelten Zellen. Zusätzlich wurde mit einem GFP-Label die Effektivität der Transfektion überprüft (diese Zellen wurden jedoch nicht weiter verwendet). Danach wurden die Zellen geerntet und für den Western Blot aufbereitet. Dort zeigte sich, dass die Variante B der siRNA die Expression von BGN am Wirkungsvollsten verhindert und dass in dieser Zelllinie auch die Expression des EGF-Rezeptors im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle deutlich erniedrigt war (Abbildung 25).

3.5 TGF-β3 und EGF Einfluss auf die Expression von SOX9 und RUNX2

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob der Wachstumsfaktor TGF-β3 und der Wachstumsfaktor EGF einen Einfluss auf die Expression der chondrogenen bzw. osteogenen Differenzierungsgene SOX9 und RUNX2 hat. Dafür wurden die CPC241ht in eine 3D-Kultur überführt und für qPCR und Western Blot aufbereitet.

3.5.1 Einfluss von TGF-β3 auf die SOX9- und RUNX2-mRNA

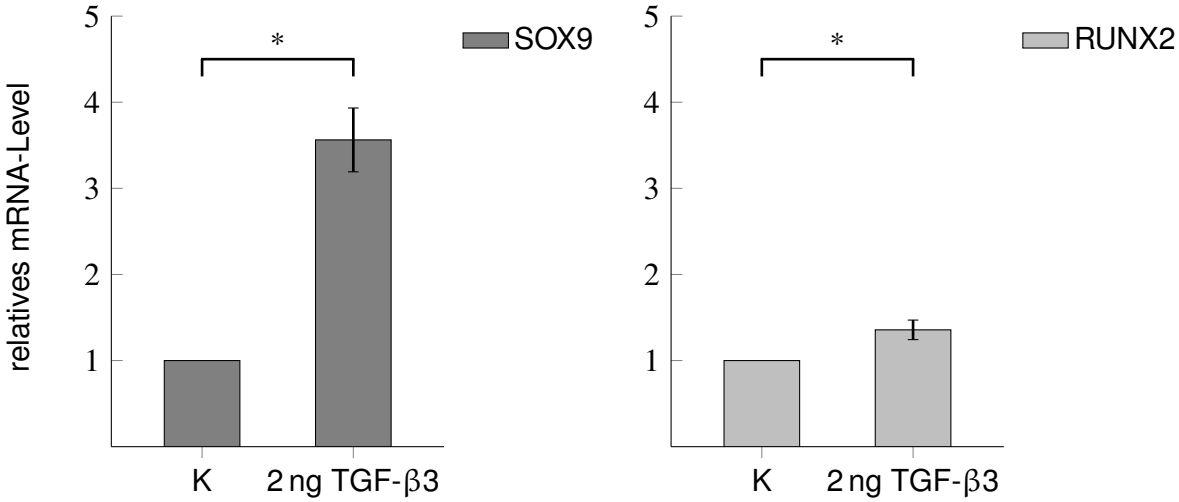

Abbildung 26: **qPCR von SOX9 und RUNX2 nach TGF-β3 Stimulation**

Die Zellen für 3 Tage in 3D-Kultur gehalten und dann mit 2 ng TGF-β3/ ml behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und für die qPCR aufbereitet. Die Daten wurden nach Pfaffl (2001) normalisiert, als HKG diente β2-Mikroglobulin. Die Fehlerbalken bedeuten ± Standardabweichung aus n=3.*P≤0,05.

24 Stunden nach Stimulation mit TGF-β3 wurden die Zellen geerntet und für die qPCR aufbereitet. Es zeigte sich in der stimulierten Zellreihe eine Erhöhung des relativen SOX9-mRNA-Levels um 3,56 (SD ± 0,37) und des RUNX2-Levels um 1,36 (SD ± 0,11).

3.5.2 Einfluss von EGF auf die SOX9- und RUNX2-mRNA

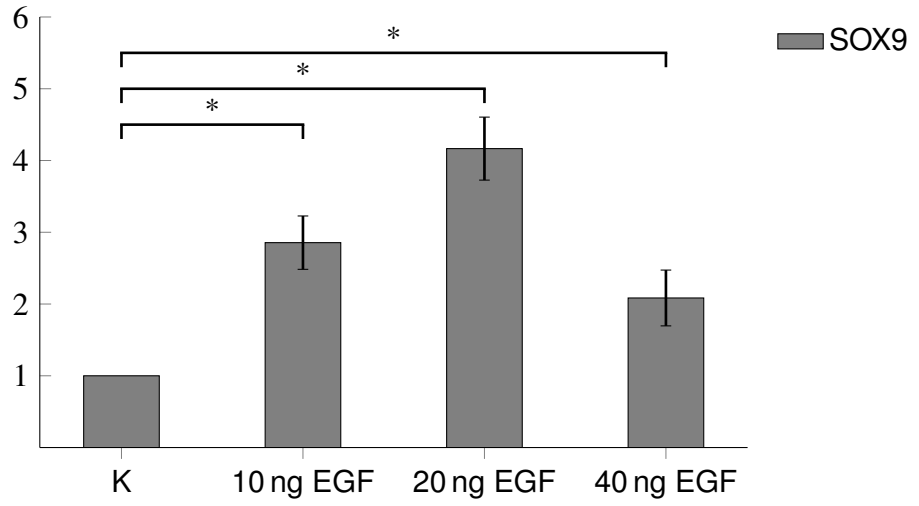

Abbildung 27: **qPCR von SOX9 nach EGF Stimulation**

Die Zellen für 3 Tage in 3D-Kultur gehalten und dann mit 10, 20 und 40 ng EGF/ ml behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und für die qPCR aufbereitet. Die Daten wurden nach Pfaffl (2001) normalisiert, als HKG diente β2-Mikroglobulin. Die Fehlerbalken bedeuten ± Standardabweichung aus n=3. *P≤0,05.

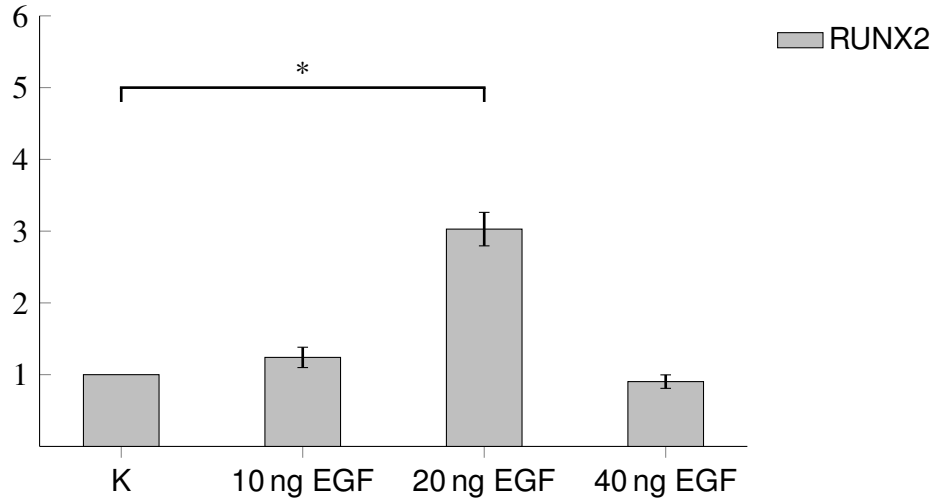

Abbildung 28: **qPCR von RUNX2 nach EGF Stimulation**

Die Zellen für 3 Tage in 3D-Kultur gehalten und dann mit 10, 20 und 40 ng EGF/ ml behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und für die qPCR aufbereitet. Die Daten wurden nach Pfaffl (2001) normalisiert, als HKG diente β2-Mikroglobulin. Die Fehlerbalken bedeuten ± Standardabweichung aus n=3. *P≤0,05.

24 Stunden nach Stimulation wurden die Zellen geerntet und für die qPCR aufbereitet. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Resultate der qPCR. Um die optimale Konzentration zu finden wurde der Quotient aus SOX9 und RUNX2 gebildet, um so die stärkste Erhöhung von SOX9 im Verhältnis zur stärksten RUNX2-Verminderung zu finden.

Tabelle 9: **Einfluss von EGF auf die SOX9-/ RUNX2-mRNA**

EGF [ng /ml]	rel. SOX9-Level	SD	rel. RUNX2-Level	SD	SOX9:RUNX2
10	2,86	± 0,37	1,24	± 0,14	2,30
20	4,17	± 0,44	3,02	± 0,23	1,38
40	2,08	± 0,39	0,90	± 0.09	2,31

Die Zellen für 3 Tage in 3D-Kultur gehalten und dann mit 10, 20 und 40 ng EGF/ ml behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und für die qPCR aufbereitet. Die Daten wurden nach Pfaffl (2001) normalisiert, als HKG diente β2-Mikroglobulin. SD: Standardabweichung aus n=3. Es wurde der Quotient aus SOX9- und RUNX2-Expression gebildet.

Da die optimale Konzentration einmal bei 10 ng EGF (SOX9 : RUNX2 Quotient = 2,3) und bei 40 ng (SOX9 : RUNX2 Quotient = 2,31) annähernd gleich lag, wurde mit 10 ng EGF/ ml weitergearbeitet.

3.5.3 Einfluss von TGF-β3 und EGF auf das Proteinniveau von SOX9 und RUNX2

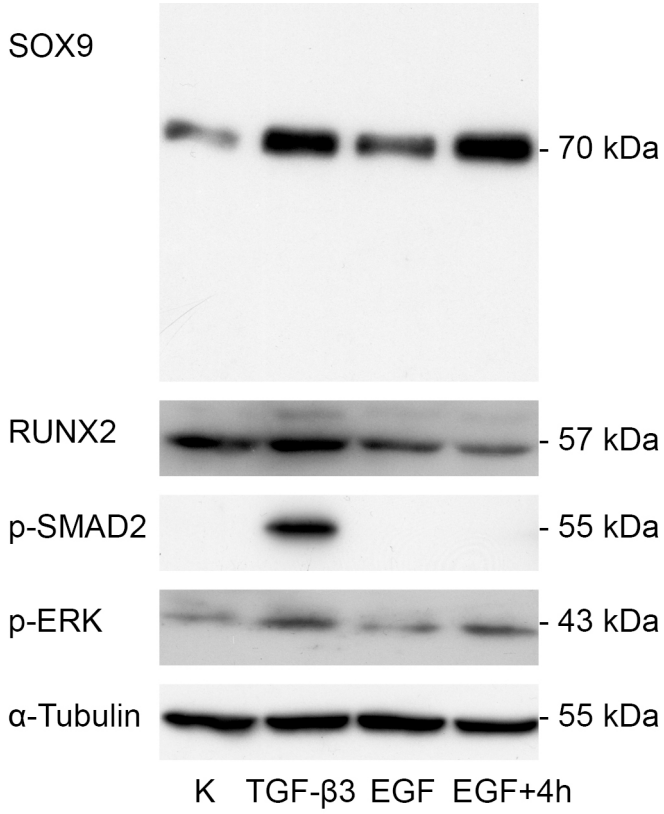

Abbildung 29: **Einfluss von TGF-β3 und EGF auf das Proteinniveau von SOX9 und RUNX2**
Die CPC241ht wurden 3 Tage in Alginat kultiviert. Danach wurden sie mit 2 ng TGF-β3/ ml oder 10 ng EGF behandelt. Die mit TGF-β3 und EGF stimulierten Zellen wurden nach 24 Stunden geerntet. Außerdem wurden einige der EGF stimulierten Zellen zusätzliche mit 10 ng EGF versetzt und 4 Stunden später geerntet (EGF+4h). Im Western Blot wurde die Kontrolle (K) im Vergleich zu den behandelten Zellen (TGF-β3, EGF und EGF+4 h) aufgetragen. Es wurden die Proteine SOX9, RUNX2, p-SMAD2 und p-ERK nachgewiesen. Als Ladungskontrolle wurde α-Tubulin benutzt. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot aus n=3.

Die CPC241ht wurden 3 Tage in Alginat kultiviert. Danach wurden sie mit 2 ng TGF-β3/ ml oder 10 ng EGF behandelt. Die mit TGF-β3 und EGF stimulierten Zellen wurden nach 24 Stunden geerntet. Außerdem wurden einige der EGF-stimulierten Zellen zusätzliche mit 10 ng EGF versetzt und 4 Stunden später geerntet (EGF+4h)
Im Western Blot zeigte sich, dass durch Stimulation mit 2 ng TGF-β/ ml zu einer stärkeren SOX9-Expression kam. Die RUNX2-Expression blieb unverändert. Außerdem stieg sowohl die phosphorylierte Form der Extracellular-signal Regulated Kinase (p-ERK) als auch die der SMAD-Proteine (p-SMAD) in ihrer Expression an.
In der EGF stimulierten Reihe konnte ebenfalls ein (etwas schwächerer Anstieg) von SOX9 gezeigt werden. p-ERK und RUNX2 sind unverändert. Es zeigte sich kein Einfluss von EGF auf das p-SMAD. Den stärksten Anstieg von SOX9 und die größte Verminderung der RUNX2-Expression stellte sich in den EGF-stimulierten Zellen dar, die noch zusätzliche 4 Stunden stimuliert wurden (EGF+4h). p-SMAD war nicht nachzuweisen, dafür aber war das Protein p-ERK im Vergleich zu den anderen Gruppen stärker vertreten (Abbildung 29).

Für die SOX9- und RUNX2-Expression der TGF-β3 und EGF+ Versuchsreihen wurde daraufhin noch eine Densitometrie durchgeführt, das heißt die Schwärzung der Fotomembran im Western Blot wurde anhand ihrer Grauwerte ausgemessen und zur Quantifizierung benutzt. Dafür wurden die Versuche zusätzlich dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. In der TGF-β3-Reihe wurde dabei eine 2,22 (SD ± 0,41) fach höhere SOX9 Intensität und ein mit 0,97 (SD ± 0,048) annähernd gleiches RUNX2-Niveau gemessen. In der EGF+-Reihe konnte sogar eine 3,01 (SD ± 0,44) fache SOX9 Intensität und eine auf 0,53 (SD ± 0,06) gefallene RUNX2 Intensität gemessen werden (Abbildung 30 und Abbildung 31).

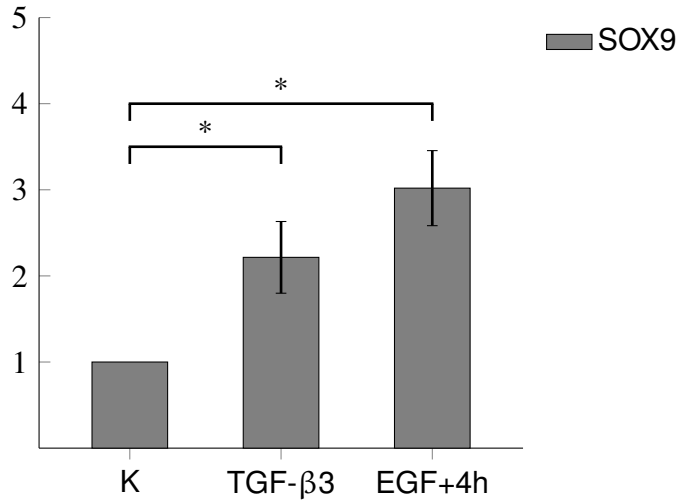

Abbildung 30: **Quantifizierung der Western Blot Ergebnisse für SOX9**

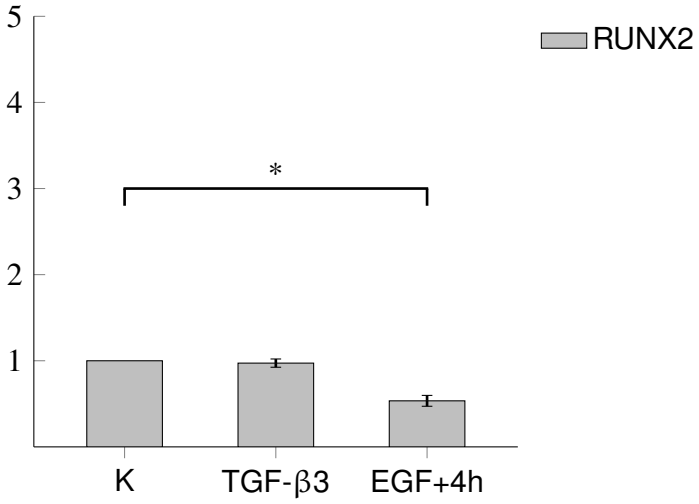

Abbildung 31: **Quantifizierung der Western Blot Ergebnisse für RUNX2**

Die Abbildung 30 und Abbildung 31 zeigen die Ergebnisse der Quantifizierung mit ImageJ. Die Kontrolle wurde gleich eins gesetzt. Es wurden die SOX9- und RUNX2-Expressionen aus drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Gezeigt ist das Ergebnis für die Zellen, die für 24 Stunden mit 2 ng TGF-β3 und für 24 Stunden und noch einmal zusätzlich für 4 Stunden mit 10 ng EGF stimuliert wurden (EGF+4h). Die Fehlerbalken bedeuten ± Standardabweichung aus n=3.*P≤0,05.

3.6 Knockdown des EGF-Rezeptors

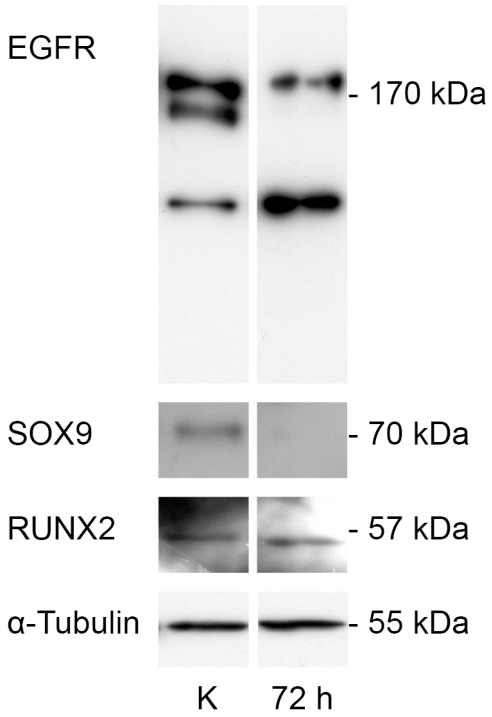

Abbildung 32: **siRNA-Knockdown des EGF-Rezeptors**

Die Zellen wurden mit einer EGF-Rezeptor siRNA transfiziert und für 3 Tage in 2D-Kultur gehalten. Diese wurden daraufhin nach 24, 48 und 72 Stunden geerntet und für den Western Blot aufbereitet. Die Abbildung zeigt das Ergebnis nach 72 Stunden. Es wurde der EGF-Rezeptor und die Proteine SOX9 und RUNX2 nachgewiesen. Als Ladungskontrolle wurde α-Tubulin. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot aus n=3.

Um den Einfluss des EGF-Rezeptors auf die Proteine SOX9 und RUNX2 zu untersuchen, wurde dieser via siRNA an den CPC241ht in seiner Expression gehemmt. Im Western Blot zeigte sich, dass das Proteinniveau des EGF-Rezeptors für 72 Stunden stark vermindert war. Es war nach 72 Stunden kein SOX9 mehr nachweisbar, wobei das RUNX2-Niveau im Experiment konstant blieb.

4 Diskussion

Der erste Teil der Diskussion soll sich mit der Frage beschäftigen, wie die Verteilung des TGF-β-Rezeptors und des TGF-β3 in der OA und an den CPCs sein könnte. Außerdem soll der Einfluss der Stimulation von CPCs mit TGF-β3 auf die Expression von BGN erläutert. Im zweiten Teil soll daraufhin die Frage nach einer Verknüpfung zwischen BGN und der Expression des EGF-Rezeptors bearbeitet werden. Im dritten Teil soll der Einfluss der Wachstumsfaktoren TGF-β3 und EGF auf die Transkriptionsfaktoren SOX9 und RUNX2 diskutiert werden. Abschließend sollen die Teilergebnisse zu einer gemeinsamen Hypothese zusammengefasst und ein Ausblick für deren klinische Relevanz gegeben werden.

4.1 Welchen Einfluss hat die Stimulation mit TGF-β3 auf die Expression von BGN?

4.1.1 Die Expression des TGF-β-Rezeptors

Der TGF-β-Rezeptor wird in der OA, sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene, vermindert exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass ein Defizit in der Rezeptorexpression in vivo an Mäusen zu einem OA-Phänotyp führt (Goldring et al. 2006; Finnson et al. 2011). In der qPCR (Abbildung 16, S. 46 und Abbildung 17 A-C, S. 48) zeigte sich, dass die TGF-β-Rezeptor-mRNA in Chondrozyten der gesunden sowie makroskopisch kranken Proben gebildet wird, obwohl hier, im Gegensatz zu Goldring et al. (2006) und Finnson et al. (2011), kein signifikanter Unterschied festzustellen war. Dies könnte daran gelegen haben, dass es in der Zellkultur nach einiger Zeit wieder zum Angleichen der Expressionsaktivität gekommen sein könnte, da die Zellen aus dem osteoarthritischen Umfeld genommen wurden. In der IHC konnte der Rezeptor am Knorpelgewebe nachgewiesen werden, speziell die Chondrozyten zeigten sich deutlich positiv für den Rezeptor an der Zellmembran (Abbildung 17 D, S. 48). Es fällt auf, dass sich auch Zellen im Zwischenraum, der für Osteoarthritis typischen Tidemarkdublikation, positiv für den TGF-β-Rezeptor zeigten (Abbildung 17 B, S. 48). Dies könnte dafür sprechen, dass diese Zellen möglicherweise einmigriert sein könnten. Der Hypothese folgend, dass chondrogene Progenitorzellen ebenfalls Migrationspotential zeigen, könnten es die CPCs sein, die sich in den defekten Knorpel vorarbeiten. Dies würde dazu passen, dass sich in den CPCs eine tendenziell erhöhte TGF-β-Rezeptorexpression auf mRNA-Ebene, im Vergleich zum gesunden und kranken Knorpel, zeigte. Außerdem konnte in der ICC erstmalig gezeigt werden, dass auch die CPCs positiv für den Rezeptor sind, dieser auf Proteinebene in den Zellen gebildet und exprimiert wird (Abbildung 16, S. 46; Abbildung 17 D, S. 48).
An dieser Stelle müsste jedoch parallel eine weitere Bestimmung der Progenitorcharakteristika durch z.B. CD44, CD73, CD105 und STRO-1 in der IHC erfolgen, um sicherzustellen, dass es sich bei diese Zellen tatsächlich um CPCs handelt und um diese sicher von den Chondrozyten zu differenzieren (Koelling et al. (2009)).

4.1.2 Die Expression von TGF-β3

In den IHC für TGF-β3 zeigte sich, im Vergleich zwischen den Knorpelproben aus gesunden und kranken Bereichen, dass TGF-β3 im kranken Knorpel vermehrt gebildet wird und sich im Bereich der zerstörten Knorpeloberfläche zu sammeln scheint (Abbildung 20, S. 51). Die Sekretion von TGF-β3 wird, je nach Autor, in der OA als reduziert oder vermehrt beschrieben. Je nach Stadium der OA und nach Betrachtungsweise, werden diesem Molekül katabole sowie anabole Vorgänge zugeschrieben, sodass die Rolle und Verteilung von TGF-β3 im Pathomechanismus der OA noch zur Diskussion steht (Goldring et al. 2006; Finnson et al. 2011; Bush und Beier 2013; Shen et al. 2014). So konnte im Mausmodel gezeigt werden, dass die Expression von TGF-β3 in der OA reduziert ist (Blaney Davidson et al. 2006), in einigen anderen Studien jedoch gezeigt werden, dass die TGF-β3-Expression in der menschlichen OA sowie in einigen Mausmodellen erhöht ist (Pombo-Suarez et al. 2009). Die Ergebnisse in der IHC sprechen in dieser Arbeit eher für eine vermehrte Bildung von TGF-β3 im kranken Knorpel. Eine Beurteilung über eine stärke oder schwächere Expression ist durch die IHC jedoch nur eingeschränkt möglich. Durch minimale Unterschiede in der Expositionsdauer der Substanzen, insbesondere der Chromogenfärbung, kann in der durchgeführten Form nur eine qualitative Aussage gemacht werden (Taylor 2015).
Bedingt durch die eingeschränkte quantitative Aussagekraft der IHC, ist die wichtige Quintessenz der diskutierten TGF-β-Rezeptor-Expression aus 4.1.1 und der TGF-β3-Expression aus diesem Abschnitt deshalb eher, dass der TGF-β-Rezeptor an den CPCs vorhanden ist und TGF-β3 eine Rolle in der Interaktion mit dem Rezeptor im Knorpel spielt. Es besteht deshalb die Möglichkeit die CPCs durch diesen zu stimulieren. Sowohl Rezeptor als auch Mediator sind in den betrachteten Geweben vorhanden und es konnte erstmalig ein Rezeptornachweis an den CPCs gezeigt werden, sodass die weiteren in vitro Ergebnisse auch in vivo eine Relevanz haben könnten.

4.1.3 Der Einfluss der Stimulation von CPCs durch TGF-β3 auf die BGN-Synthese

Durch Stimulation der CPCs mit TGF-β3 konnte in der qPCR erstmalig gezeigt werden, dass auch CPCs mit einem Anstieg der BGN-mRNA reagieren (Osman et al. 2013). Die CPCs zeigten nach drei Tagen Stimulation ein 4,3 fach erhöhtes und damit deutlich höheres BGN-mRNA-Niveau im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 23, S. 54).
Problematisch an der qPCR ist, dass diese selbst nur bedingt Rückschlüsse auf das endgültige Proteinniveau der Zellen zulässt. Durch siRNA kann es innerhalb der Translation des Proteins zu Interferenzen kommen, da die Zelle in der Lage ist, die Produktion auf letzter Ebene zu stoppen (Siomi und Siomi 2009). Deshalb wurde zusätzlich zur qPCR der Western Blot als Methode genutzt, um zu zeigen, dass es auch zur Bildung von des fertigen BGN Moleküls kommt. Es zeigte sich, dass nach sieben Tagen Stimulation der CPCs mit TGF-β3 eine deutlich breitere Bande im Western Blot zu erkennen war und es dementsprechend mehr BGN produziert wurde (Abbildung 24, S. 55).

4.2 Welchen Einfluss haben Änderungen der BGN-Expression auf die des EGF-Rezeptors?

4.2.1 Die Expression von BGN

BGN wird in den späten Phasen der OA vermehrt produziert. Es zeigt sich, dass es vor allem im menschlichen Knie vermehrt gebildet wird und es sich hauptsächlich in der EZM der Chondrozyten nachweisen lässt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass BGN-defiziente-Mäuse einen OA-Phänotyp ausbilden (Bock et al. 2001; Iacob und Cs-Szabo 2010). In der IHC-Färbung konnte gezeigt werden, dass es im stark deformierten Knorpel zumindest zu einer Umverteilung von BGN kam, eine quantitative Aussage war auch hier nicht möglich. Während BGN im gesunden Knorpel eher in der Tangentialzone zu finden war, stellte sich im kranken Knorpel ein eher heterogenes Bild dar, bei dem sich BGN in allen Zonen des Knorpels nachweisen lies (Abbildung 21, S. 52).

4.2.2 Die Expression des EGF-Rezeptors

Der EGF-Rezeptor wird an Chondrozyten gebildet und scheint, zumindest in Fibroblasten, die Tendenz zu zeigen, altersabhängig, vermindert exprimiert zu werden (Iacob und Cs-Szabo 2010). In der IHC zeigte sich ebenfalls, dass Chondrozyten für den EGF-Rezeptor positiv sind. Die Chondrone sind an der Zellmembran für den Rezeptor positiv. Außerdem tragen ebenfalls Zellen im Zwischenbereich der Tidemarkdublikation den Rezeptor (Abbildung 19 A-C, S. 50). Entsprechen der Angabe von Iacob und Cs-Szabo (2010), zeigten die Chondozyten aus dem kranken Bereichen, im Vergleich zu denen aus den gesunden Bereichen, eine tendenziell erniedrigte Rezeptorexpression auf mRNA-Ebene. In den CPCs konnte ein noch schwächeres mRNA-Niveau nachgewiesen werden (Abbildung 18, S. 49).
Interessanterweise zeigte es sich, dass sich der EGF-Rezeptor in der ICC an bestimmten Bereichen der Zellmembran zu konzentrieren scheint (Abbildung 19 D, S. 50). Wichtig an dieser Stelle ist, dass der EGF-Rezeptor in der Lage ist, durch verschiedene Stimulanzen wie EGF, TGF-α, Amphiregulin, Epiregulin oder Neuregulin2, internalisiert zu werden. Dies bedeutet, dass der Rezeptor endosomal abgebaut werden kann, um dessen Aktivität zu vermindern. Der so in Vesikel gepackte Rezeptor kann entweder erneut an die Zellmembran geschleust zu werden, um seine Funktion wieder aufzunehmen, oder kann auch ubiqutiniert und über das Lysosom abgebaut werden. In einigen Fällen werden dadurch bestimmte Signalwege erst aktiviert, da z.B. die Abbauprodukte des Rezeptors ebenfalls intrazelluläre Kaskaden auslösen können. Während z.B. EGF Konzentrations- und pH-Abhängig die Aktivität des Rezeptors im Sinne einer negativen Feedbackschleife reduzieren kann, können durch z.B. TGF-α die endosomal verpackten Rezeptoren mobilisieren werden und ihre Aktivität wieder aufnehmen (Roepstorff et al. (2009); Sorkin und Duex (2010); Henriksen et al. (2013); Sangrar et al. (2014)). Dies könnte zum einen das Bild in der ICC erklären, zum anderen jedoch auch dafür sprechen, dass sich der Rezeptor an den CPCs eher in einem Ru-

hestadium befindet. Er könnte internalisiert sein und dadurch das niedrige mRNA-Niveau erklären.

4.2.3 Die Expression von EGF

In der IHC für EGF zeigte sich, im Vergleich zwischen Knorpelproben aus gesunden und kranken Bereichen, dass der Mediator im kranken Knorpel, im Bereich der Übergangszone, eher schwächer nachgewiesen werden konnte und er sich im Bereich der zerstörten Knorpeloberfläche zu sammeln schien (Abbildung 22A-B, S. 53). Dies passt zu der Annahme, dass ein Defizit im Rezeptor zu einem OA-Phänotyp im Mausmodel führen kann (Zhang et al. 2014). In der rheumatoiden Arthritis wird dagegen vermehrt EGF freigesetzt und dort als Triggerfaktor für die entzündlichen Prozesse bezeichnet (Nah et al. 2009). Zum einen lassen sich die beiden Erkrankungen jedoch nur bedingt vergleichen, zum anderen lassen sich auch hier die Schwierigkeiten in der Quantifizierung von IHC-Färbungen anführen. Genau wie im Fall des TGF-β-Rezeptors und des TGF-β, ist auch eher die qualitativen Aussagen der IHC wichtiger. Der EGF-Rezeptor ist an den CPCs vorhanden und eine Stimulation mit EGF ist möglich.

4.2.4 Der Einfluss von BGN auf den EGF-Rezeptor

Durch siRNA-Interferenz konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine Verbindung zwischen BGN und dem EGF-Rezeptor an CPCs besteht. Durch Knockout des BGN-Moleküls in CPCs konnte gezeigt werden, dass es zu einer Herunterregulation des EGF-Rezeptors kommt (Abbildung 25, S. 56). Der durch Iacob und Cs-Szabo (2010) beschriebene Einfluss des EGF auf die BGN-Synthese, scheint auch bei den CPCs zu bestehen. Etwas eingeschränkt sind die Ergebnisse jedoch dadurch, dass durch den Einsatz von siRNA keine Unterscheidung zwischen internen und externen Prozessen gemacht werden kann. Die erniedrigte Expression des EGF-Rezeptors könnte durch geringere BGN-Konzentration im Medium der Knockout-Zellen hervorgerufen worden sein. Die BGN-mRNA oder BGN-Vorstufen könnten - im Sinne einer Crosstalk-Interaktionen zwischen verschieden Signalwegen - aber auch, ohne dass es zum fertigen Protein gekommen ist, Prozesse innerhalb der Zelle selbst beeinflussen. Ein Gegenversuch durch Stimulation mit BGN in der Zellkultur wie es bei Iacob und Cs-Szabo (2010) durchgeführt wurde bzw. eine Konzentrationsmessung im Medium steht an dieser Stelle noch aus.

4.3 Wie wirkt sich eine Stimulation mit TGF-β3 und EGF auf die Expression von SOX9 und RUNX2 aus?

TGF-β3 ist in der Lage an verschiedenen Zelltypen die SOX9-Expression zu steigern und die RUNX2-Expression zu senken (Park et al. 2012; Rizk und Rabie 2013; Muhammad et al. 2014). In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass es an CPCs durch Stimulation mit TGF-β3 ebenfalls zu einer Erhöhung der SOX9-Expression kommt, die mit einer erhöhten p-SMAD2- und p-ERK1/2-Expression verbunden ist (Finnson et al. 2011; Mu et al. 2012). In der qPCR zeigte sich durch Stimulation mit TGF-β, dass es zu einem starken Anstieg der SOX9-mRNA-Expression bei leichtem Anstieg der RUNX2-mRNA-Expression kam (Abbildung 26, S. 57). Wie bereits erwähnt, lässt dies nur bedingt Rückschlüsse auf das Proteinniveau in der Zelle zu, es wurden deshalb auch hier die Ergebnisse im Western Blot verifiziert. Die durch TGF-β stimulierten Zellen zeigten eine mehr als zweifach höhere SOX9-Expression, bei unverändertem RUNX2-Niveau, im Western Blot. Es zeigte sich außerdem, dass es zu einer Aktivierung der p-SMAD2- und p-ERK1/2-Signalwege kam und damit eine Assoziation zwischen TGF-β3 und diesen auch an den CPCs bestehen könnte (Abbildung 29, S. 60; Abbildung 30 und Abbildung 31, S. 61).
Durch Stimulation mit EGF kam es an den CPCs ebenfalls zum Anstieg des SOX9-Niveaus. In der qPCR zeigte sich eine optimale EGF-Konzentration zur Stimulation bei 10 ng/ µl. Hier zeigte sich ein Anstieg der SOX9-mRNA-Expression, bei leicht erhöhter, jedoch nicht signifikanter, RUNX2-mRNA-Expression. Interessanterweise lösten höhere Konzentration auch ein Anstieg von RUNX2 aus. Es kam ab 40 ng/ µl zu einem Abfall der mRNA-Expression beider Moleküle, welcher sich am ehesten im Sinne eines negativen Feedbacks erklären lässt (Abbildung 27, S. 58). Im Western Blot kam es zu einer fast dreifach höheren Expression in den Versuchsgruppen, die zweimal mit EGF stimuliert und nach 28 Stunden geerntet wurden. Das RUNX2-Niveau sank ab und es kam zum Anstieg des p-ERK1/2. Es war kein Einfluss auf p-SMAD2 zu erkennen (Abbildung 29, S. 60; Abbildung 30 und Abbildung 31, S. 61). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die von Ling et al. (2011) beschriebene EGFR-ERK-SOX9-Achse auch an den CPCs besteht und die Aussage bestätigen, dass die RUNX2-Expression durch die von SOX9 beeinflusst wird (Ling et al. 2011; Cheng und Genever 2010). Zusätzlich konnte an den CPCs gezeigt werden, dass es durch Knockdown des EGF-Rezeptors zu einem Abfall der SOX9-Expression kam, wobei hier das RUNX2-Niveau unverändert zu bleiben schien. (Abbildung 32, S. 62).
Nimmt man die in der Literatur bisher beschriebenen Verbindungen der Signalwege von TGF-β3 und EGF und ihren Rezeptoren zur Hilfe, dann lässt sich so die Hypothese formen, dass beide Wachstumsfaktoren an den CPCs in der Lage sind die SOX9-Expression zu erhöhen und die von RUNX2 zu verringern. Da in beiden Signalwegen eine ERK1/2-Kaskade beschrieben ist, lässt dies die Vermutung zu, dass hier eine Konvergenz der beiden Wege besteht. Damit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die CPCs, wie sie von Koelling et al. (2009) beschrieben wurde, nicht nur für TGF-β3 und EGF sensibel sind, sondern diese auch

in der Lage sein könnten die Transkriptionsfaktoren SOX9 und RUNX2 zu beeinflussen.

4.4 Fazit und Ausblick: Die Mediatoren TGF-β3, EGF und BGN als mögliche Kausalkette in der Regeneration von OA

Fasst man die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen, lässt sich folgende Gesamthypothese herleiten: Durch Stress am Knorpelgewebe, speziell an den Chondrozyten, werden diese aus ihrer Ruhephase gebracht und werden aktiv. Die Zellen selbst versuchen die Homöostase innerhalb ihrer Matrix aufrecht zu erhalten und produzieren Wachstumsfaktoren wie TGF-β3 und EGF sowie EZM Komponenten wie BGN. Dadurch sind sie in der Lage, zum einen die Struktur des Gewebes aufrecht zu erhalten und zum anderen Zellen zu rekrutieren, die mögliche Defekte reparieren können. Eine Zellpopulation, die dieses leisten könnte, wären die CPCs. Diese könnten durch ihr Migrationspotential in das Gewebe einwandern und dort durch endogene oder exogene Mediatoren, wie die in der Arbeit beschrieben Moleküle TGF-β3, EGF und BGN, angeregt werden sich in Chondrozyten zu differenzieren, die die EZM aufrechterhalten. Kommt es zur Stimulation der Zelle mit TGF-β3, wird der erste Schritt in Richtung chondrogene Differenzierung gesetzt, der zusätzlich durch die besonderen Eigenschaften des Moleküles BGN ergänzt wird. Dieses könnte, als molekulare Klammer, die Funktion des TGF-β3 verstärken und zusätzlich einen weiteren Rezeptor rekrutieren, den EGF-Rezeptor. Wird dieser durch EGF oder auch BGN aktiviert, kommt es zu einer gemeinsamen Aktivierung von p-ERK durch den TGF-β-Rezeptor und dem EGF-Rezeptor. Diese sorgen für eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors SOX9 sowie eine Supression des Transkriptionsfaktors RUNX2 und leiten somit die weitere chondrogene Differenzierung der Zelle ein. Da OA das Produkt einer Störung der Homöostase darstellt, liegt die Vermutung nahe, dass innerhalb dieses hypothetischen Signalweges bzw. Reparaturweges eine mögliche Ursache für deren Entstehung liegen könnte. Betrachtet man z.B. die unterschiedlichen Expressionsmuster des Moleküls TGF-β in der OA, lässt dies die Überlegung zu, dass die Chondrozyten, eventuell aufgrund von Umwelteinflüssen bzw. genetischen Defekten, nicht mehr in der Lage sind TGF-β ausreichend zu produzieren, oder Zellen durch einen Rezeptordefekt nicht mehr auf das TGF-β reagieren, weil diesen die entsprechende Rezeptordichte fehlt. Es kommt so zu einen Einbruch innerhalb des potentiellen Reparaturmechanismus und somit zur Degeneration des Knorpels. Dem entsprechend lassen sich alle Etappen dieser Kausalkette abfahren, da jegliche Störung in der Gewebshomöostase und dessen Reparatur einen Schritt in Richtung OA darstellt, jedoch auch ein mögliches Ziel einer potentiellen Therapie seien könnte.

Letztendlich steht bis zur kausalen Therapie der OA jedoch noch ein weiter Weg an. Natürlich müssen die Ergebnisse dieser Arbeit noch weiter verifiziert werden. Ein endgültiger Nachweis der Differenzierung der CPCs steht noch aus. Es könnte noch der Nachweis weiterer Marker wie z.B. Kollagen II als Zeichen des chondrogenen Charakters erfolgen. Falls es tatsächlich möglich ist, über die beschrieben Kaskaden, die Zellen zu Differenzierung,

müssen vor allem die Signalwege und deren Konvergenz noch weiter entschlüsselt werden. Da zwar die Moleküle, die in der dieser Arbeit Verwendung fanden, in gewisser Weise sehr spezifisch sind, Wachstumsfaktoren jedoch ubiquitär in den Geweben vorkommen, hätte eine Therapie mit den nativen Molekülen wohl eher ein hohes Nebenwirkungs- bzw. Risikoprofil. Trotzdem könnte der hier beschriebene Ansatz einen möglichen Hinweis auf eine medikamentöse Therapie bieten. Wenn spezifisch in die Signalwegen eingegriffen werden kann, könnte es in Zukunft möglich sein den Patienten eine Operation zu ersparen und die Regeneration des Knorpels zu verstärken.

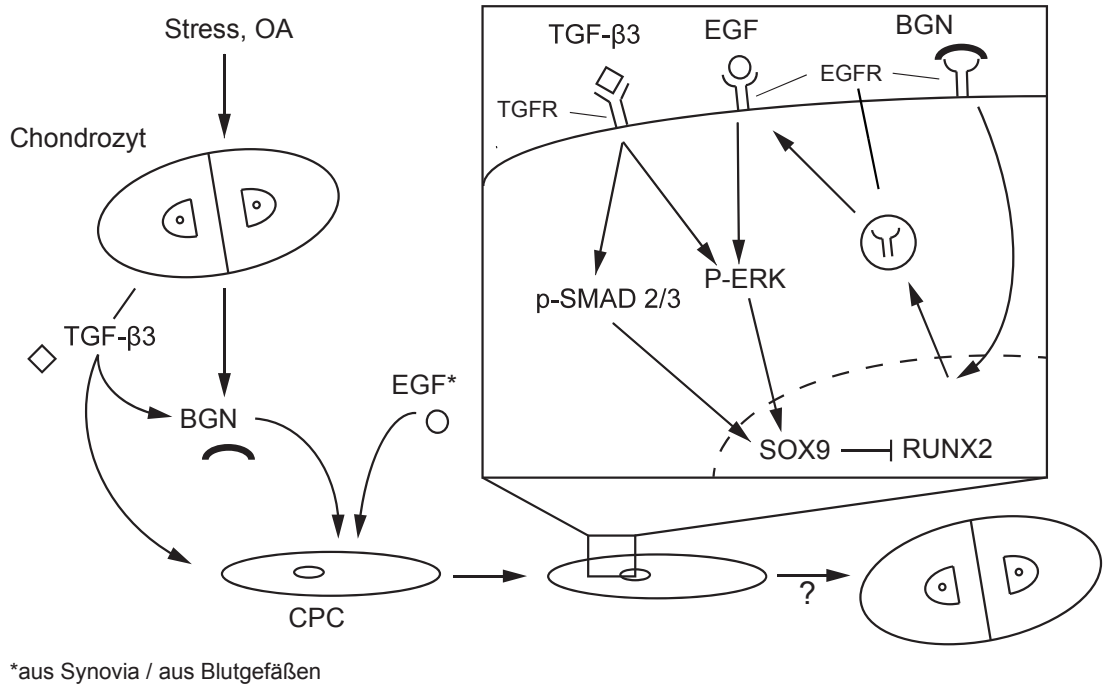

Abbildung 33: **Die Mediatoren als mögliche Kausalkette in der Regeneration von OA**

Hypothetischer Reparaturmechanismus im Knorpelgewebe. Durch äußere Einflüsse werden die Chondrozyten aktiv und zur Produktion von Wachstumsfaktoren und EZM-Elementen angeregt. Diese können einwandernde CPCs stimulieren und haben eventuell einen Einfluss auf deren Differenzierung in eine chondrogene Richtung. Durch eine potentielle Konvergenz der beiden Signalwege des TGF-β und des EGF-Rezeptors kommt es so zu einer Änderung der SOX9- und RUNX2-Expression. BGN könnte hierbei, zum einen die Rolle als molekulare Klammer zur Festigung der Rezeptor-Mediator-Bindung dienen, könnte zum anderen aber auch selbst als Mediator aktiv werden, und z.B. das Expressionsniveau des EGF-Rezeptors erhöhen, um die Differenzierung der Zellen zu verstärken.

5 Zusammenfassung

Die Pathogenese der Osteoarthritis (OA) ist immer noch Gegenstand der aktuellen Forschung, die schon einige Details in der Entstehung des Krankheitsbildes aufgedeckt hat, bei vielen Aspekten jedoch noch in den Anfängen steckt. So besteht auch heutzutage der Endpunkt der OA-Therapie meist in der Entfernung des Gelenkes mit anschließendem Einsatz von künstlichen Prothesen. Moderne Forschungsmethoden und Ansätze verlassen dieses Feld jedoch immer mehr. Der Fokus der zukünftigen Medizin geht in Richtung personalisierter und damit spezifischerer Therapie des Patienten. Einen möglichen Ansatz bieten Zellen, die Gewebe im regenerative Potentiale entfalten können. Eine dieser Zellgruppen wurden als chondrogene Progenitorzellen (CPCs) identifiziert. Diese Vorläuferzellen sind möglicherweise in der Lage, in das Gewebe zu migrieren und sich dort zu knorpeleigenen Zellen zu differenzieren, den Chondrozyten. Gesteuert wird dieser Vorgang durch die Transkriptionsfaktoren SOX9 und RUNX2. Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, dass CPCs durch den Wachstumsfaktor EGF in eine chondrogene Richtung differenzieren lassen, indem sie die Expression des Faktors SOX9 erhöhen und die des Faktors RUNX2 erniedrigen. Außerdem sollte die Assoziation des Matrixmoleküles BGN mit dem Wachstumsfaktor EGF gezeigt werden und zusätzlich der Einfluss des Wachstumsfaktors TGF-β3 auf dieses System. Mit Hilfe von IHC, qPCR und Western Blot wurde nicht nur gezeigt, dass TGF-β3, EGF und BGN eine Rolle in der Pathogenese der OA haben und eine Rolle im degenerativen Knorpel spielen, sondern es wurde auch erstmalig gezeigt, dass sowohl EGF als auch TGF-β3 dazu in der Lage sein könnten, die chondrogene Differenzierung der CPCs einzuleiten. Durch Stimulation der CPCs mit EGF oder TGF-β3 kam es an den Zellen zu einer erhöhten SOX9-Expression bei gleichbleibender bzw. erniedrigter RUNX2-Expression. Es zeigte sich, dass TGF-β3 die BGN-Expression an CPCs steigern kann und BGN wiederum einen Einfluss auf die Expression des EGF-Rezeptors an CPCs hat. Durch Knockout von BGN kam es zu einer heruntergesetzten Expression des EGF-Rezeptors an CPCs. Dadurch konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass die Verbindung der Moleküle TGF-β3, BGN und EGF möglicherweise einen Mechanismus zur Differenzierung der CPCs und somit einen potentiellen Reparaturmechanismus am Knorpel darstellen. Durch den OA-induzierten Stress könnte es zur Ausschüttung von TGF-β3 kommen, welches wiederum die Induktion des Matrixmoleküls BGN auslöst. BGN ist in der Lage, die Expression des EGF-Rezeptors zu erhöhen, um damit die Empfindlichkeit für das Molekül EGF zu steigern. Zusammen mit TGF-β3 könnten beide Moleküle die chondrogene Differenzierung einleiten. Den Molekülen scheint damit eine besondere Rolle zuzukommen, die über die Entwicklung des Knorpels bzw. dessen reine Homöostase hinausgeht und diese somit zu einem Thema weiterer Forschungen gemacht werden sollten.

6 Literaturverzeichnis

Literatur

Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M (2004): Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. Arthritis Rheum 50, 1522-1532

Bernard P, Tang P, Liu S, Dewing P, Harley VR, Vilain E (2003): Dimerization of sox9 is required for chondrogenesis, but not for sex determination. Hum Mol Gen 12, 1755-1765

Blancher C, Jones A (2001): SDS-page and western blotting techniques. Methods Mol Med 57, 145-162

Blaney Davidson EN, Vitters EL, Van Der Kraan PM, Van Den Berg WB (2006): Expression of transforming growth factor-β (tgfβ) and the tgfβ signalling molecule smad-2p in spontaneous and instability-induced osteoarthritis: Role in cartilage degradation, chondrogenesis and osteophyte formation. Ann Rheum Dis 65, 1414-1421

Bock HC, Michaeli P, Bode C, Schultz W, Kresse H, Herken R, Miosge N (2001): The small proteoglycans decorin and biglycan in human articular cartilage of late-stage osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage 9, 654-663

Burch ML, Ballinger ML, Yang SNY, Getachew R, Itman C, Loveland K, Osman N, Little PJ (2010): Thrombin stimulation of proteoglycan synthesis in vascular smooth muscle is mediated by protease-activated receptor-1 transactivation of the transforming growth factor β type i receptor. J Biol Chem 285, 26798-26805

Bush JR, Beier F (2013): Tgf-β and osteoarthritis: The good and the bad. Nat Med 19, 667-669

Carpenter G, Cohen S (1979): Epidermal growth factor. Annu Rev Biochem 48, 193-216

Chen NM, Singh G, Koenig A, Liou GY, Storz P, Zhang JS, Regul L, Nagarajan S, Kuenemuth B, Johnsen SA (2015): Nfatc1 links egfr signaling to induction of sox9 transcription and acinar-ductal transdifferentiation in the pancreas. Gastroenterology 148, 1024-1034

Chen XD, Fisher LW, Robey PG, Young MF (2004): The small leucine-rich proteoglycan biglycan modulates bmp-4-induced osteoblast differentiation. FASEB J 18, 948-958

Cheng A, Genever PG (2010): Sox9 determines runx2 transactivity by directing intracellular degradation. J Bone Miner Res 25, 2680-2689

Coustry F, Oh CD, Hattori T, Maity SN, De Crombrugghe B, Yasuda H (2010): The dimerization domain of sox9 is required for transcription activation of a chondrocyte-specific chromatin dna template. Nucleic Acids Res 38, 6018-6028

De Ceuninck F, Lesur C, Pastoureau P, Caliez A, Sabatini M (2004): Culture of chondrocytes in alginate beads. Methods Mol Med 100, 15-22

Eames BF, Sharpe PT, Helms JA (2004): Hierarchy revealed in the specification of three skeletal fates by sox9 and runx2. Dev Biol 274, 188-200

Embree MC, Kilts TM, Ono M, Inkson CA, Syed-Picard F, Karsdal MA, Oldberg A, Bi Y, Young MF (2010): Biglycan and fibromodulin have essential roles in regulating chondrogenesis and extracellular matrix turnover in temporomandibular joint osteoarthritis. Am J Pathol 176, 812-826

Fellmann C, Lowe SW (2014): Stable rna interference rules for silencing. Nat Cell Biol 16, 10-18

Fickert S, Fiedler J, Brenner RE (2004): Identification of subpopulations with characteristics of mesenchymal progenitor cells from human osteoarthritic cartilage using triple staining for cell surface markers. Arthritis Res Ther 6, 422-432

Finnson KW, Chi Y, Bou-Gharios G, Leask A, Philip A (2011): Tgf-b signaling in cartilage homeostasis and osteoarthritis. Front Biosci 4, 251-268

Gassmann M, Grenacher B, Rohde B, Vogel J (2009): Quantifying western blots: Pitfalls of densitometry. Electrophoresis 30, 1845-1855

Gerter R, Kruegel J, Miosge N (2012): New insights into cartilage repair-the role of migratory progenitor cells in osteoarthritis. Matrix Biol 31, 206-213

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

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

Gotte M, Feugaing DS, Kresse H (2004): Biglycan is internalized via a chlorpromazine-sensitive route. Cell Mol Biol Lett 9, 475-482

Gray H (1918): Anatomy of the human body. Lea & Febiger, http://www.bartleby.com/107/93.html; Zugriff am 03.03.2015

Grimont A, Pinho AV, Cowley MJ, Augereau C, Mawson A, Giry-Laterrière M, Van Den Steen G, Waddell N, Pajic M, Sempoux C (2014): Sox9 regulates erbb signalling in pancreatic cancer development. Gut, 64, 1790-1799

Guilak F, Fermor B, Keefe FJ, Kraus VB, Olson SA, Pisetsky DS, Setton LA, Weinberg JB (2004): The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair. Clin Orthop 423, 17-26

Heegaard A, Xie Z, Young MF, Nielsen KL (2004): Transforming growth factor beta stimulation of biglycan gene expression is potentially mediated by sp1 binding factors. J Cell Biochem 93, 463-475

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996): Real time quantitative pcr. Genome Res 6, 986-994

Henriksen L, Grandal MV, Knudsen SLJ, Van Deurs B, Grøvdal LM (2013): Internalization mechanisms of the epidermal growth factor receptor after activation with different ligands. PLOS 8, E58148

Herbst RS (2004): Review of epidermal growth factor receptor biology. Int J Radiat Oncol Biol Phys 59, 21-26

Honardoust D, Eslami A, Larjava H, Häkkinen L (2008): Localization of small leucine-rich proteoglycans and transforming growth factor-β in human oral mucosal wound healing. Wound Repair Regen 16, 814-823

Houard X, Goldring MB, Berenbaum F (2013): Homeostatic mechanisms in articular cartilage and role of inflammation in osteoarthritis. Curr Rheumatol Rep 15, 1-10

Iacob S, Cs-Szabo G (2010): Biglycan regulates the expression of egf receptors through egf signaling pathways in human articular chondrocytes. Connect Tissue Res 51, 347-358

Ikegami D, Akiyama H, Suzuki A, Nakamura T, Nakano T, Yoshikawa H, Tsumaki N (2011): Sox9 sustains chondrocyte survival and hypertrophy in part through pik3ca-akt pathways. Development 138, 1507-1519

Iozzo RV, Moscatello DK, Mcquillan DJ, Eichstetter I (1999): Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor. J Biol Chem 274, 4489-4492

Karsenty G (2000): Role of cbfa1 in osteoblast differentiation and function. Semin Cell Dev Biol 11, 343-346

Kawakami Y, Rodriguez-León J, Belmonte JC (2006): The role of tgfβs and sox9 during limb chondrogenesis. Curr Opin Cell Biol 18, 723-729

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

Koressaar T, Remm M (2007): Enhancements and modifications of primer design program primer3. Bioinformatics 23, 1289-1291

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

Lee H, Park H, Kwon A, Baek K, Woo KM, Ryoo H, Kim G, Baek J (2014): Smurf1 plays a role in egf inhibition of bmp2-induced osteogenic differentiation. Exp Cell Res 323, 276-287

Ling S, Chang X, Schultz L, Lee TK, Chaux A, Marchionni L, Netto GJ, Sidransky D, Berman DM (2011): An egfr-erk-sox9 signaling cascade links urothelial development and regeneration to cancer. Cancer Res 71, 3812-3821

Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB (2012): Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. Arthritis Rheum 64, 1697-1707

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

Makris EA, Hadidi P, Athanasiou KA (2011): The knee meniscus: Structure-function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration. Biomaterials 32, 7411-7431

Massague J, Chen Y (2000): Controlling tgf-β signaling. Genes Dev 14, 627-644

Miosge N, Waletzko K, Bode C, Quondamatteo F, Schultz W, Herken R (1998): Light and electron microscopic in situ hybridization of collagen type i and type ii mrna in the fibrocartilaginous tissue of late-stage osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage 6, 278-285

Miyanishi K, Trindade MCD, Lindsey DP, Beaupré GS, Carter DR, Goodman SB, Schurman DJ, Smith RL (2006): Effects of hydrostatic pressure and transforming growth factor-β 3 on adult human mesenchymal stem cell chondrogenesis in vitro. Tissue Eng 12, 1419-1428

Moscatello DK, Santra M, Mann DM, Mcquillan DJ, Wong AJ, Iozzo RV (1998): Decorin suppresses tumor cell growth by activating the epidermal growth factor receptor. J Clin Invest 101, 406-412

Mu Y, Gudey SK, Landström M (2012): Non-smad signaling pathways. Cell Tissue Res 347, 11-20

Muhammad H, Schminke B, Bode C, Roth M, Albert J, Von Der Heyde S, Rosen V, Miosge N (2014): Human migratory meniscus progenitor cells are controlled via the tgf-β pathway. Stem Cell Reports 3, 789-803

Muhammad H, Schminke B, Miosge N (2013): Current concepts in stem cell therapy for articular cartilage repair. Expert Opin Biol Ther 13, 541-548

Nah SS, Won HJ, Ha E, Kang I, Cho HY, Hur SJ., Lee SH, Baik HH (2009): Epidermal growth factor increases prostaglandin e2 production via erk1/2 mapk and nf-kappab pathway in fibroblast like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. Rheumatol Int 30, 443-449

Nastase MV, Young MF, Schaefer L (2012): Biglycan a multivalent proteoglycan providing structure and signals. J Histochem Cytochem 60, 963-975

Nonaka K, Shum L, Takahashi I, Takahashi K, Ikura T, Dashner R, Nuckolls G, Slavkin HC (1999): Convergence of the bmp and egf signaling pathways on smad1 in the regulation of chondrogenesis. Int J Dev Biol 43, 795-808

Osman N, Getachew R, Burch M, Lancaster G, Wang R, Wang H, Zheng W, Little PJ (2013): Tgf-beta stimulates biglycan core protein synthesis but not glycosaminoglycan chain elongation via akt phosphorylation in vascular smooth muscle. Growth Factors 29, 203-210

Park JS, Yang HN, Woo DG, Jeon SY, Park K (2012): Sox9 gene plus heparinized tgf-β 3 coated dexamethasone loaded plga microspheres for inducement of chondrogenesis of hmscs. Biomaterials 33, 7151-7163

Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time rt-pcr. Nucleic Acids Res 29, E45

Pombo-Suarez M, Castaño-Oreja MT, Calaza M, Gomez-Reino J, Gonzalez A (2009): Differential upregulation of the three transforming growth factor beta isoforms in human osteoarthritic cartilage. Ann Rheum Dis 68, 568-571

Poole AR (1999): An introduction to the pathophysiology of osteoarthritis. Front Biosci 4, 662-670

Poole CA (1997): Articular cartilage chondrons: Form, function and failure. J Anat 191, 1-13

Quack I, Vonderstrass B, Stock M, Aylsworth AS, Becker A, Brueton L, Lee PJ, Majewski F, Mulliken JB, Suri M (1999): Mutation analysis of core binding factor a1 in patients with cleidocranial dysplasia. Am J Hum Genet 65, 1268-1278

Ramos-Vara JA, Miller MA (2014): When tissue antigens and antibodies get along revisiting the technical aspects of immunohistochemistry-the red, brown, and blue technique. Vet Pathol 51, 42-87

Rizk A, Rabie ABM (2013): Human dental pulp stem cells expressing transforming growth factor β3 transgene for cartilage-like tissue engineering. Cytotherapy 15, 712-725

Roddy E, Doherty M (2006): Changing life-styles and osteoarthritis: What is the evidence? Best Pract Res Cl Rh 20, 81-97

Roepstorff K, Grandal MV, Henriksen L, Knudsen SLJ, Lerdrup M, Grøvdal L, Willumsen BM, Van Deurs B (2009): Differential effects of egfr ligands on endocytic sorting of the receptor. Traffic 10, 1115-1127

Roughley PJ (2006): The structure and function of cartilage proteoglycans. Eur Cell Mater 12, 92-101

Sandell LJ (2007): Modern molecular analysis of a traditional disease: Progression in osteoarthritis. Arthritis Rheum 56, 2474-2477

Sangrar W, Shi C, Mullins G, Lebrun D, Ingalls B, Greer PA (2014): Amplified ras-mapk signal states correlate with accelerated egfr internalization, cytostasis and delayed her2 tumor onset in fer-deficient model systems. Oncogene 34, 4109-4117

Schroeder TM, Jensen ED, Westendorf J (2005): Runx2: A master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. Birth Defects Res C Embryo Today 75, 213-225

Shen J, Li J, Wang B, Jin H, Wang M, Zhang Y, Yang Y, Im H, O'Keefe R, Chen D (2013): Deletion of the transforming growth factor β receptor type ii gene in articular chondrocytes leads to a progressive osteoarthritis-like phenotype in mice. Arthritis Rheum 65, 3107-3119

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

Shepard JB, Jeong J, Maihle NJ, O'Brien S, Dealy CN (2013): Transient anabolic effects accompany epidermal growth factor receptor signal activation in articular cartilage in vivo. Arthritis Res Ther 15, R60

Shi Y (2003): Mechanisms of tgf-beta signaling from cell membrane to the nucleus. Cell Press 113, 685-700

Siomi H, Siomi MC (2009): On the road to reading the rna-interference code. Nature 457, 396-404

Sorkin A, Duex JE (2010): Quantitative analysis of endocytosis and turnover of epidermal growth factor (egf) and egf receptor. Curr Protoc Cell Biol 46, 15-20

Stern JR, Christley S, Zaborina O, Alverdy JC, An G (2012): Integration of tgf-β-and egfr-based signaling pathways using an agent-based model of epithelial restitution. Wound Repair Regen 20, 862-863(6)

Tan HY, Ng TW (2008): Accurate step wedge calibration for densitometry of electrophoresis gels. Opt Commun 281, 3013-3017

Tandon M, Chen Z, Pratap J (2014): Role of runx2 in crosstalk between mek/erk and pi3k/akt signaling in mcf-10a cells. J Cell Biochem 115, 2208-2217

Taylor CR (2015): Quantitative in situ proteomics; a proposed pathway for quantification of immunohistochemistry at the light-microscopic level. Cell Tissue Res, 360, 109-120

Tesche F, Miosge N (2005): New aspects of the pathogenesis of osteoarthritis: The role of fibroblast-like chondrocytes in late stages of the disease. Histol Histopathol 20, 329-337

Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012): Primer3-new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res 40, E115

Vynios DH, Papageorgakopoulou N, Sazakli H, Tsiganos CP (2001): The interactions of cartilage proteoglycans with collagens are determined by their structures. Biochimie 83, 899-906

Xiao G, Jiang D, Thomas P, Benson MD, Guan K, Karsenty G, Franceschi RT (2000): Mapk pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, cbfa1. J Biol Chem 275, 4453-4459

Yarden Y, Slikowski MX (2001): Untangling the erbb signalling networt. Mol Cell Biol 2, 127-137

Zeng F, Harris RC (2014): Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. Semin Cell Dev Biol 28, 2-11

Zhang X, Zhu J, Liu F, Li Y, Chandra A, Levin LS, Beier F, Enomoto-Iwamoto M, Qin L (2014): Reduced egfr signaling enhances cartilage destruction in a mouse osteoarthritis model. Bone Res 2, 14015

Zhu J, Shimizu E, Zhang X, Partridge NC, Qin L (2011): Egfr signaling suppresses osteoblast differentiation and inhibits expression of master osteoblastic transcription factors runx2 and osterix. J Cell Biochem 112, 1749-1760

Danksagung

In erster Linie möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Nicolai Miosge danken, der mich dazu ermutigt und mir dabei geholfen hat, die Thematik meiner Dissertation zu erarbeiten und mir durch Impulse und Diskussion jederzeit zur Seite stand.

Des Weiteren Danke ich Herrn Dr. med. dent. Boris Schminke, der mich auf die Arbeitsgruppe aufmerksam machte und mich mit Rat und Tat bei meinem Forschungsvorhaben unterstützte.

Frau Elke Henze danke ich für ihr offenes Ohr, die lieben Postkarten und für ihre warme Art, die dafür sorgte, dass ich mich in der Arbeitsgruppe stets willkommen fühlte.

Ich möchte mich bei Frau Christa Bode und Andrea Bernhard für ihre Geduld und Zeit bedanken, die sie für mich aufgebracht haben, um mir die Grundlagen der wissenschaftlichen Methoden und Experimentiertechniken beizubringen und mir immerzu bei Problemen zur Seite standen.

Außerdem möchte allen anderen Mitdoktoranden und Mitarbeiten danken, die mit mir die schöne Zeit im Labor geteilt haben.

Lebenslauf

Am 04.08.1989 wurde ich in der Stadt Rinteln im Landkreis Schaumburg als Sohn von Barbara Schimmel, vom Beruf Krankenschwester, und von Heinz Schimmel, vom Beruf Kfz-Meister, geboren und bin dort aufgewachsen. Ich besuchte das Gymnasium Ernestinum in Rinteln, welches ich mit dem Abitur 2009 in den Schwerpunktfächern Mathematik, Biologie und Chemie abschloss.
Während meiner Schulzeit war ich von 1995-2009 Mitglied der Deutschen Lebensrettungsgesellschaft, in der ich als ausgebildeter Rettungsschwimmer Freiwilligenarbeit an verschiedenen Gewässern ableistete. Außerdem war ich künstlerisch und musisch durch mein Klavier- und Gitarrenspiel in verschiedenen Gruppen innerhalb des Schullebens aktiv.
Nach meinem Abitur absolvierte ich meinen neunmonatigen Zivildienst am Kreiskrankenhaus Stadthagen. Diesen begann ich zunächst im handwerklichen Dienst des Krankenhauses. Dort konnte ich etwas über das Wirken hinter den Kulissen und über technische Grundlagen lernen. Nach etwa der Hälfte der Zeit wechselte ich in den Bereich der Krankenpflege. Die Zeit dort und vor allem der direkte Kontakt zu den Patienten gaben mir die Impulse, mich für ein Studium der Humanmedizin zu entscheiden.
Direkt nach meinen Zivildienst bekam ich die Zulassung zum Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen im Sommersemester 2010. Dort engagierte ich mich im als studentischer Tutor für das Fach Biochemie im Sommersemester 2012 und im Wintersemester 2012/ 2013 und arbeitete ab dem Sommersemester 2014 als Hilfswissenschaftler im Schulungszentrum der Interdisziplinären Adipositas-Ambulanz der Klinik für Gastroenterologie und gastrointestinale Onkologie bis zum Ende des Sommersemesters 2015.
Meine Arbeit für die Dissertation begann ich Anfang 2013 im Zentrum ZMK in der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik der AG Orale Biologie und Geweberegeneration und setzte dafür das Sommersemester 2013 aus. Mein Studium der Humanmedizin werde ich voraussichtlich im Jahre 2016 abschließen und hoffe - inspiriert von der wissenschaftlichen Arbeit - eine Berufslaufbahn an der Universität und in der Forschung beginnen zu können.