

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

Evaluation des Immunophilins FKBP51 als therapeutisches Ziel in der Therapie der Osteoarthritis

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Ruben Sonnenbrodt

aus

Helmstedt

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in Prof. Dr. med. N. Miosge

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. mult. T. Meyer

Prüfungskommission

Referent/in Prof. Dr. med. A. F. Schilling

Ko-Referent/in: Prof. Dr. mult. T. Meyer

Drittreferent/in: Prof. Dr. med. R. Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 02.05.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Evaluation des Immunophilins FKBP51 als therapeutisches Ziel in der Therapie der Osteoarthritis" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 06.06.2022

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Abbildungsverzeichnis | III |
| Tabellenverzeichnis | IV |
| Abkürzungsverzeichnis | V |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Allgemeiner Aufbau und Funktion von Gelenken | 1 |
| 1.1.1 Definition, Arten und Zusammensetzung | 1 |
| 1.1.2 Hyaliner Knorpel als Grundsubstanz des Gelenkknorpels | 1 |
| 1.1.3 Zonale und regionale Gliederung des Gelenkknorpels | 2 |
| 1.1.4 Zusammensetzung und Homöostase der EZM im gesunden Knorpelgewebe | 3 |
| 1.2 Die Osteoarthrose | 6 |
| 1.2.1 Definition und gesellschaftliche Relevanz..... | 6 |
| 1.2.2 Ätiologie und molekulare Ursachen | 6 |
| 1.2.3 Histologische Veränderungen des Knorpelgewebes im Verlauf der OA..... | 8 |
| 1.2.4 Rolle und Funktion des NF- κ B-Signalweges in der Pathophysiologie der OA | 8 |
| 1.3 Das Immunophilin FKBP51 und seine Rolle im NF- κ B-Signalweg..... | 10 |
| 1.3.1 Molekularer Aufbau | 10 |
| 1.3.2 Zelluläre Funktionen und Rolle im NF- κ B-Signalweg | 11 |
| 1.4 Chondrogene Progenitorzellen und ihr therapeutisches Potential..... | 12 |
| 1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit | 13 |
| 2 Material und Methoden | 14 |
| 2.1 Ethikantrag | 14 |
| 2.2 Zellkulturtechniken | 14 |
| 2.2.1 Herkunft und Isolierung chondrogener Progenitorzellen | 14 |
| 2.2.2 Kultivierung, Passagierung und Zellgewinnung | 14 |
| 2.3 Expressionsanalyse mittels reverse Transkription-gekoppelter qPCR | 15 |
| 2.3.1 Allgemeines | 15 |
| 2.3.2 Isolierung von mRNA | 16 |
| 2.3.3 Umschreiben der mRNA in cDNA | 16 |
| 2.3.4 Durchführung der qPCR..... | 16 |
| 2.3.5 Normalisierung der Messwerte und statistische Auswertung..... | 17 |
| 2.3.6 Design neuer Primer und Gradienten-PCR..... | 17 |
| 2.3.7 Verwendete Primer | 18 |
| 2.4 Qualitativer und semiquantitativer Proteinnachweis mittels Western-Blot | 18 |
| 2.4.1 Allgemeines | 18 |
| 2.4.2 Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE..... | 19 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.4.3 | SDS-PAGE | 19 |
| 2.4.4 | Western-Blot | 20 |
| 2.4.5 | Unspezifischer Proteinnachweis durch Coomassie-Blau-Färbung..... | 21 |
| 2.4.6 | Spezifischer Proteinnachweis mittels Antikörper-Antigenreaktion | 21 |
| 2.4.7 | Strippen und Wiederverwendung der Membranen..... | 22 |
| 2.4.8 | Semiquantitativer Proteinnachweis..... | 23 |
| 2.5 | Anwendung des CRISPR/Cas9-System in CPCs | 23 |
| 2.5.1 | Allgemeines | 23 |
| 2.5.2 | Restriktion von pSpCas9(BB)-2A-GFP und Ligation mit der gRNA | 23 |
| 2.5.3 | Amplifizierung von pSpCas9(FKBP51)-2A-GFP in <i>E. coli DH5a</i> | 24 |
| 2.5.4 | Transfektion der CPCs mit pSpCas9(FKBP5)-2A-GFP | 25 |
| 2.5.5 | Klonale Isolation, Expansion und Phänotypisierung der Zellen..... | 26 |
| 2.6 | Transienter FKBP51-Knockdown in CPCs..... | 27 |
| 3 | Ergebnisse..... | 28 |
| 3.1 | Nachweis von <i>FKBP5</i> in CPCs | 28 |
| 3.2 | Anwendung des CRISPR-Cas9-Systems in chondrogenen Progenitorzellen zur Etablierung eines FKBP51-Knockouts | 29 |
| 3.2.1 | Design der gRNA..... | 29 |
| 3.2.2 | Sequenzierung des Plasmides pSpCas9(<i>FKBP5</i>)-2A-GFP..... | 30 |
| 3.2.3 | Transfektion der CPCs mit pSpCas9(<i>FKBP5</i>)-2A-GFP | 31 |
| 3.2.4 | Sortierung der transfizierten Zellen durch FACS | 32 |
| 3.2.5 | Klonale Expansion und Phänotypisierung der erfolgreich mit pSpCas9(<i>FKBP5</i>)-2A-GFP transfizierten CPCs..... | 33 |
| 3.3 | Transfektion von CPCs mit FKBP51-spezifischer siRNA..... | 35 |
| 4 | Diskussion..... | 38 |
| 4.1 | Nachweises der Expression von <i>FKBP5</i> in CPCs..... | 38 |
| 4.2 | Anwendung des CRISPR-Cas9-Systems mit einer <i>FKBP5</i> spezifischen gRNA in CPCs..... | 39 |
| 4.3 | <i>FKBP5</i> -Knockdown durch RNAi..... | 42 |
| 4.4 | Evaluation des Immunophilins FKBP51 als therapeutisches Ziel in der Therapie der Osteoarthritis..... | 43 |
| 5 | Zusammenfassung..... | 46 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 47 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Proteinnachweis von FKBP51 in CPC241hT..... | 29 |
| Abbildung 2: Design der <i>FKBP5</i> -spezifischen gRNA..... | 30 |
| Abbildung 3: Sequenzierung des Plasmides pSP-Cas9(<i>FKBP5</i>)-2A-GFP..... | 31 |
| Abbildung 4: Zellmorphologie 24 h nach erfolgter Transfektion..... | 32 |
| Abbildung 5: Klonales Wachstum der pSPCas9(<i>FKBP5</i>)-2A-GFP transfizierten Zellen..... | 33 |
| Abbildung 6: Überblick über die klonale Expansion und Phänotypisierung der mit pSpCas9- (<i>FKBP5</i>)-2A-GFP transfizierten CPC241hT..... | 34 |
| Abbildung 7: Lichtmikroskopische Ansicht der transfizierten CPC241hT nach 48 h..... | 35 |
| Abbildung 8: Auswirkungen der RNA-Interferenz auf den <i>FKBP5</i> -mRNA-Level in CPC241hT nach 48 h..... | 36 |
| Abbildung 9: Auswirkungen der RNA-Interferenz auf den FKBP51-Proteinlevel in CPC241hT nach 96 h..... | 37 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Zusammensetzung des Standardnährmediums..... | 15 |
| Tabelle 2: Pipettierschema qPCR..... | 17 |
| Tabelle 3: qPCR-Protokoll..... | 17 |
| Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Primer..... | 18 |
| Tabelle 5: Zusammensetzung des dreifach konzentrierten-SDS Probenpuffers..... | 19 |
| Tabelle 6: Pipettierschema für Trenn- und Sammelgel..... | 20 |
| Tabelle 7: Zusammensetzung von Färber und Entfärber..... | 21 |
| Tabelle 8: Verwendete Antikörper..... | 22 |
| Tabelle 9: Schema der klonalen Isolation..... | 26 |
| Tabelle 10: Ergebnisse der FACS-Sortierung der mit pSPCas9(<i>FKBP5</i>)-2A-GFP transfizierten CPC241hT im Vergleich zur Negativkontrolle..... | 32 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| ADAMTS | <i>a disintegrin-metalloproteinases with thrombospondin-motifs</i> |
| AS | Aminosäure |
| BMP | <i>bone morphogenetic protein</i> |
| B2M | <i>beta 2-microglobulin</i> |
| Cas9 | <i>CRISPR-associated endonuclease 9</i> |
| CPC | chondrogene Progenitorzelle |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CRISPR | <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> |
| Ct-Wert | <i>cycle threshold-value</i> |
| DAMP | <i>damage-associated molecular patterns</i> |
| DMD | <i>disease-modifying drug</i> |
| DNA | <i>deoxyribonucleic acid</i> |
| EZM | extrazelluläre Matrix |
| FACS | <i>fluorescence-activated cell sorting</i> |
| FKBP | <i>FK506-binding protein</i> |
| FKBP51 | <i>FK506-binding protein 51</i> |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein |
| GR | Glukokortikoidrezeptor |
| gRNA | <i>guide-RNA</i> |
| HMGB-1 | <i>high mobility group protein-1</i> |
| HKG | <i>housekeeping gene</i> |
| HSP90 | <i>heat-shock protein 90</i> |
| IKK | I κ B α -Kinase-Komplex |
| IL-1 β | Interleukin-1 β |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| MMP | Matrixmetalloproteinase |
| mRNA | <i>messenger-RNA</i> |
| MSC | mesenchymale Stammzelle |
| NF- κ B | <i>nuclear factor-kappaB</i> |
| NIK | <i>NF-κB-inducing kinase</i> |
| OA | Osteoarthrose |
| OARSI | Osteoarthritis Research Society International |

| | |
|---------------|--|
| PAM | <i>protospacer adjacent motif</i> |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PPIase | <i>peptidyl-prolyl cis-trans isomerase</i> |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAi | RNA-Interferenz |
| RT-qPCR | reverse Transkription-gekoppelte quantitative-PCR |
| RUNX2 | <i>runt-related transcription factor 2</i> |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese |
| shRNA | <i>short hairpin-RNA</i> |
| siRNA | <i>small interfering-RNA</i> |
| SOX9 | <i>SRY(sex determining region y)-Box 9 Protein</i> |
| TF | Transkriptionsfaktor |
| TGF- β | <i>transforming growth factor-beta</i> |
| TLR | Toll-Like-Rezeptor |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor alpha |
| TPR | <i>tetratricopeptide repeat</i> |

1 Einleitung

1.1 Allgemeiner Aufbau und Funktion von Gelenken

1.1.1 Definition, Arten und Zusammensetzung

Gelenke (lat.: *Articulatio, -nes*) sind Teil des Bewegungsapparates des Menschen und als Kontaktstelle zwischen verschiedenen Skelettelementen definiert, die Beweglichkeit der Skelettelemente untereinander und damit komplexe Bewegungen ermöglichen. Es lassen sich Synarthrosen, sog. unechte Gelenke, von Diarthrosen, sog. echten Gelenken, unterscheiden. Die einzelnen Skelettelemente artikulieren bei den Synarthrosen über straffes Bindegewebe (Syndesmose) oder Knorpel (Synchondrose). Bei den Diarthrosen sind die Gelenkflächen (lat. *Facies articularis*) durch einen Gelenkspalt voneinander getrennt, welcher Bestandteil der Gelenkhöhle (lat. *Cavitas articularis*) ist. Das Gelenk wird hierbei von der Gelenkkapsel (lat. *Capsula articularis*) umschlossen, welche sich in eine äußere Faserschicht (lat. *Membrana fibrosa*) und die innen gelegene Synovialmembran (lat. *Membrana synovialis*) unterteilt. Die Zellen der äußeren Faserschicht produzieren die Gelenkflüssigkeit (Synovia), die für eine Schmierung der Gelenkflächen, Dämpfung von Stößen und Nährstoffversorgung des Gelenkknorpels sorgt. In den meisten Fällen sind die Gelenkflächen von hyalinem Knorpel überzogen (abgeleitet vom griechischen Wort *Hyalos* für Glas). Nur selten liegt Faserknorpel vor, wie beispielsweise im Kiefer- oder Sternoklavikulargelenk (Benninghoff und Drenckhahn 2002). Der Knorpel ist essenziell für eine Verminderung der Reibung zwischen den artikulierenden Skelettelementen und sorgt für eine gleichmäßige Verteilung der bei Bewegung entstehenden Kräfte (Kuettner 1992). Um eine bessere Druckverteilung auf die Gelenkflächen zu erreichen, existieren bei Gelenken mit inkongruent geformten Gelenkflächen, wie im Knie- oder Kiefergelenk, in den Gelenkspalt hineinreichende intraartikuläre Strukturen, die als Diskus oder Meniskus bezeichnet werden (Benninghoff und Drenckhahn 2002).

1.1.2 Hyaliner Knorpel als Grundsubstanz des Gelenkknorpels

Hyaliner Knorpel ist neben dem ebenfalls vorkommenden elastischen Knorpel und Faserknorpel die am häufigsten vorkommende Knorpelart des menschlichen Körpers und imponiert optisch durch seine bläulich-weiße Farbe und Transparenz. Es handelt sich um ein avaskuläres, nicht innerviertes Bindegewebe, zusammengesetzt aus einer dichten extrazellulären Matrix (EZM) und darin verteilten hochspezialisierten Zellen, die Chondrozyten genannt werden. Die EZM besteht zum größten Teil aus Wasser, Kollagen, Proteoglykanen, nicht kollagenösen Proteinen und Glykoproteinen (Buckwalter und Mankin 1998; Morris et al. 2002). Hyaliner Knorpel besteht per definitionem zum größten Teil aus Kollagen II und

weist einen hohen Anteil des Proteoglykans Aggrecan auf. Dies unterscheidet ihn wesentlich vom z. B. im Meniskus vorkommenden fibrokartiliginären Knorpel, welcher hauptsächlich aus Kollagen I besteht und einen geringen Proteoglykan-Anteil besitzt (Poole et al. 2001). Bedeckt hyaliner Knorpel den subchondralen Knochen in Diarthrosen wird er als Gelenkknorpel bezeichnet. Das Vorkommen von hyalinem Knorpel beschränkt sich dabei nicht nur auf die Flächen der Gelenke, ebenfalls erfüllt er vielfältige Bau- und Stützfunktionen als Bestandteil von Trachea, Bronchien, Nase, Larynx und Rippen. In den Epiphysenfugen sorgt er für das Längenwachstum des Knochens. Während der Entwicklung liefert er die Grundsubstanz für das Skelett im Rahmen der chondralen Osteogenese (Junqueira et al. 2002).

1.1.3 Zonale und regionale Gliederung des Gelenkknorpels

Defekte des 2-4 mm dicken Gelenkknorpels sind ein wichtiger Grund für muskuloskeletale Morbidität. Gelenkknorpel verfügt dabei über eine komplexe und hochorganisierte Struktur, deren Erhalt für die Gelenkfunktion von enormer Wichtigkeit ist. Dabei lassen sich mikroskopisch sowohl eine zonale, in Schichten aufgeteilte, als auch eine regionale, an den Chondrozyten orientierte Gliederung erkennen (Fox et al. 2009).

1.1.3.1 Zonale Gliederung

Die zonale Gliederung des Gelenkknorpels in mehrere strukturell unterschiedliche Schichten wurde erstmals durch Benninghoff (1925) beschrieben. Die Zonen unterscheiden sich in der qualitativen und quantitativen Komposition ihrer EZM, der Ultrastruktur der Kollagene, der Anzahl und dem Phänotyp der Chondrozyten, um funktionell unterschiedlich mechanische Belastungen auszuhalten. Vier Zonen werden im hyalinen Gelenkknorpel unterschieden:

Die etwa 100 µm durchmessende Tangentialfaserzone (Zone I) schützt die tieferen Schichten vor Scherkräften, besteht größtenteils aus Kollagen II und IX und hat direkten Kontakt mit der Synovialflüssigkeit (Fox et al. 2009). Die Oberfläche besitzt einen hohen Anteil an Lubricin (Schumacher et al. 1994). Dieses sorgt im Zusammenspiel mit Hyaluronsäure für eine Gleitschicht auf der Knorpeloberfläche und einen geringen Reibungskoeffizienten (Greene et al. 2011).

Die Übergangzone (Zone II) bildet 40 bis 60 Prozent des Gesamtknorpels. Durch ihren hohen Anteil des Proteoglykans Aggrecan fungiert sie als Polster des bei Bewegungen entstehenden Drucks (Poole et al. 2001).

Die Radiärfaserzone (Zone III) weist den höchsten Proteoglykananteil und niedrigsten Wasseranteil auf und liefert damit Schutz vor Druck. Ihr Volumen beträgt etwa 30 Prozent des Gesamtvolumens. (Poole et al. 2001)

Der Durchmesser der Mineralisierungszone (Zone IV) beträgt etwa 100 μm . Sie liegt dem subchondralen Knochen direkt auf und ist mit diesem durch kleine Einbuchtungen fest verzahnt. Ihre EZM hat einen hohen Anteil anorganischer Salze, wie z.B. Calciumphosphat (Benninghoff und Drenckhahn 2002). In ihr lässt sich der Hypertrophiemarker Kollagen X nachweisen (Goldring 2012). Die Kalzifizierungsfront zur Zone III wird durch die im Hämatotoxilin-Eisenpräparat erkennbare *tidemark* gebildet (Fawns und Landells 1953).

Die Kollagene sind in Zone I trajektorieell zur Oberfläche angeordnet, um auftretende Druckkräfte gleichmäßig zu verteilen. In den Zonen II und III liegt eine eher zufällige Anordnung vor, wohingegen die Fasern in Zone IV radiär verlaufen, um Kompressionskräften Stand zu halten (Goldring 2012). Die Verankerung der Fasern erfolgt innerhalb der Zone IV im nahen Kontakt zum subchondralen Knochen, wodurch die auf den Knorpel ausgeübten Scherkräfte als Zugkräfte auf den Knochen weitergeleitet werden (Radin et al. 1984).

Die Chondrozyten verändern ihre Morphologie von einem abgeflachten Phänotyp in den oberflächlichen Schichten zu einem eher runden, hypertrophen Phänotyp in der Mineralisierungszone. In der Tangentialfaserzone liegen sie je nach Gelenktyp in unterschiedlichen räumlichen Mustern, einzeln, paarweise oder in Haufen, vor (Rolauffs et al. 2010). Die Übergangszone hat einen niedrigen Chondrozytenanteil. In den tiefen Schichten erfolgt eine Anordnung in Säulen parallel zu den radiär verlaufenden Kollagenfasern (Fox et al. 2009).

1.1.3.2 Regionale Gliederung

Neben der zonalen erfolgt eine regionale Gliederung, die sich nicht an der Schichttiefe, sondern an den Chondrozyten orientiert, in eine perizelluläre, territoriale und interterritoriale Region. Die Matrix der perizellulären Region ist ca. 2 μm dick (Poole et al. 2001), reich an Aggrecan (Poole et al. 1980), Kollagen VI (Hagiwara et al. 1993) und dem Zellmembran-assoziierten Anchorin-CII (Mollenhauer et al. 1984). Der perizellulären Region wird eine funktionelle Rolle in der Signaltransduktion bei Belastung des Knorpels zu geschrieben (Eggli et al. 1985). Die perizelluläre Matrix wird von der territorialen Region umhüllt, die mit ihren feinen Kollagenfibrillen eine korbähnliche Struktur bildet und die Chondrozyten vor einwirkenden Kräften schützt (Szirmai 1974). In den tiefen Schichten existiert die interterritoriale Region, die größte aller drei Regionen, welche durch ihr dichtes Kollagenetzwerk am meisten zu den biomechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels beiträgt (Mow und Guo 2002).

1.1.4 Zusammensetzung und Homöostase der EZM im gesunden Knorpelgewebe

1.1.4.1 Bestandteile der EZM

Die Hauptkomponenten der EZM sind Wasser, Kollagene, Proteoglykane und nicht-kollagenöse Proteine. Dabei macht Wasser zwischen 65 und 80 Prozent des Gesamtge-

wichts aus und sorgt durch seinen Fluss durch die Poren der Matrix für eine gleichmäßige Verteilung von Nährstoffen und Ionen innerhalb des Knorpelgewebes (Mow et al. 1992). Die Kollagene machen den größten Anteil des Trockengewichts aus; knorpelspezifisch sind die Kollagene II, IX und XI (Heinegård und Saxne 2011). Kollagen II wurde als die mengenmäßig am häufigsten vorkommende Komponente identifiziert (Strawich und Nimni 1971). Alle Mitglieder der Kollagen-Familie bestehen aus drei Polypeptidketten mit einem hohen Anteil der Aminosäuren (ASs) Glycin und Prolin, die zu einer dreifachen Helix verdreht sind. Diese molekulare Bauweise verleiht dem Gelenkknorpel die notwendige Eigenschaft, hohen Zugspannungen stand zu halten (Kühn 1974).

Neben den Faserproteinen sind Proteoglykane mengenmäßig die zweithäufigste Komponente der EZM und verleihen dem Knorpelgewebe hohe Widerstandskräfte gegenüber Kompressionskräften (Fox et al. 2009). Zu ihnen gehören die Proteine Aggrecan, Decorin, Biglycan und Fibromodulin (Chen et al. 2017). Proteoglykane bestehen aus einem Proteinkern an den kovalent lange unverzweigte Polysaccharidketten, die Glykosaminoglykane (GAGs), gebunden sind (Iozzo und Schaefer 2015). Die GAGs bestehen aus repetitiven Disaccharideinheiten, typischerweise aus einem Aminozucker (N-Acetylglucosamin oder N-Acetylgalactosamin) und einer Uronsäure, deren Zuckerreste durch negativ geladenen Carboxyl- und Sulfatgruppen substituiert sind (Gandhi und Mancera 2008). Durch ihre hohe negative Ladungsdichte binden Proteoglykane Kationen mit deren voluminösen Wasserhüllen und bilden so die gelartige Grundsubstanz der EZM und sorgen für eine hohe Elastizität (Müller-Esterl 2011).

Die dritte Gruppe der Matrixbestandteile wird durch nicht-kollagenöse Proteine und Glykoproteine gebildet, die hier auf Grund ihrer großen Heterogenität nicht in aller Ausführlichkeit dargestellt werden können. Als exemplarische Vertreter seien das *cartilage oligomeric protein*, Fibronectin, Laminin und das *hyaluronan and proteoglycan link protein 1* genannt (Keiser 1975; Acharya et al. 2014; Halper und Kjaer 2014).

1.1.4.2 Der Chondrozyt als Regulator der Knorpelhomöostase

Die Fähigkeit des Gelenkknorpels, hohen mechanischen Belastungen, standzuhalten beruht auf der funktionalen Zusammensetzung seiner EZM und dessen Integrität, die durch ein Gleichgewicht parallel ablaufender kataboler und anaboler Prozesse erhalten wird (Goldring 2000). Eine Schlüsselrolle in der Homöostase wird dabei dem Chondrozyten zugeschrieben, dessen metabolische Aktivität durch Mankin und Lippiello (1969) beschrieben wurde. Es handelt sich um terminal-differenzierte Zellen, die von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) abstammen und ungefähr zwei Prozent des Knorpelvolumens ausmachen (Alford und Cole 2005). Gesunde Chondrozyten befinden sich in einem postmitotischen Ruhezustand (Martin et al. 2004) und werden mit Sauerstoff und Nährstoffen via Diffusion aus der Synovialflüssigkeit (Levick 1995) sowie den Gefäßen des subchondralen Knochens versorgt (Imhof et al. 2000). Auf Grund der langen Diffusionsstrecke existieren sie in ei-

nem hypoxischen, bradytrophen Milieu und haben ihren Stoffwechsel an anaerobe Bedingungen angepasst (Lafont 2010).

Chondrozyten sind für die Synthese, Erneuerung und Reparatur der EZM in ihrer unmittelbaren Umgebung verantwortlich. Dazu sezernieren sie die Makromoleküle der EZM und sorgen durch die Produktion matrixdegradierender Enzyme vom Typ der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und Cathepsine für den Abbau beschädigter Matrixbestandteile. MMPs werden als extrazellulär aktivierte Proenzyme sezerniert und können mit Hilfe eines zentralen Zinkions Bestandteile der EZM lysieren (Fox et al. 2009). Bislang wurde die Expression sieben verschiedener MMPs im Gelenkknorpel nachgewiesen, die sich in ihrer jeweiligen Spezifität für verschiedene Kollagene und Matrixbestandteile unterscheiden (Rose und Kooyman 2016). Die MMPs 1, 2, 13 und 14 scheinen dabei für den unter physiologischen Bedingungen erforderlichen Matrixumsatz verantwortlich zu sein, da sie in gesunden Knorpelgewebe konstitutiv exprimiert sind. Die MMPs 3, 8 und 9 lassen sich nur in osteoarthrotisch verändertem Knorpel nachweisen (Chubinskaya et al. 1999). Die enzymatische Aktivität der MMPs wird durch den *tissue inhibitor of metalloproteinases* reguliert (Dean und Woessner 1984).

Um die auf- und abbauenden Prozesse auf die jeweilige Situation anzupassen, besitzen Chondrozyten die Fähigkeit, Veränderungen in ihrem Mikromilieu wahrzunehmen und über eine Vielzahl involvierter Signalwege in eine Anpassung ihrer metabolischen Aktivität umzusetzen. Dieser Prozess unterliegt der Steuerung einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, wie *insuline-like growth factor* (Asanbaeva et al. 2008), Faktoren der *transforming growth factor-beta* (TGF- β)-Familie (Finsson et al. 2012), Faktoren der *bone morphogenetic protein* (BMP)-Familie (Thielen et al. 2019) und Interleukinen (Buckwalter et al. 2005). Eine Zell-Matrix-Interaktion erfolgt durch Integrine. Diese sorgen mechanisch für eine Verankerung der Chondrozyten in der EZM, vermitteln aber auch via Signaltransduktion Informationen über den Zustand der EZM (Loeser 2014).

Mit zunehmendem Alter nehmen die Fähigkeiten der Chondrozyten zur Aufrechterhaltung der EZM und ihre Reaktion auf anabole Stimuli physiologisch ab, und das fein eingestellte Gleichgewicht aus Auf- und Abbau verschiebt sich zugunsten einer negativen Bilanz (Guerne et al. 1995; Musumeci et al. 2015). Als protektiver Faktor zur Aufrechterhaltung der Homöostase und zellulären Viabilität gilt eine regelmäßige, gleichmäßige Belastung des Gelenkes bei nicht zu hohen Drücken, welche für eine bessere Verteilung der Nährstoffe im Gewebe sorgt (Torzilli et al. 1999).

Zusammengefasst beruht die ausgeklügelte, funktionelle Integrität des Gelenkknorpels auf einer gegliederten, aufeinander abgestimmten EZM, deren Erhalt durch ein komplex reguliertes Gleichgewicht auf- und abbauender Prozesse bestimmt ist. Kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes oder einer Schädigung der EZM, folgt zwangsläufig ein Funktionsverlust.

1.2 Die Osteoarthrose

1.2.1 Definiton und gesellschaftliche Relevanz

Im Jahre 2007 trat die United States Food and Drug Administration, mit dem Ziel eine klinische, einheitliche Definition der Osteoarthrose (OA) zur Vereinheitlichung von Standards in der Diagnosestellung, bei klinischen Studien und der Medikamentenentwicklung zu schaffen, an die Osteoarthritis Research Society International (OARSI) heran. Die OARSI bildete daraufhin acht Arbeitsgruppen, die sich mit der Beantwortung dieser Fragen auseinandersetzten (Lane et al. 2011). Sie kam dabei zu folgender im Jahre 2015 überarbeiteter Definition:

„Osteoarthritis is a disorder involving movable joints characterized by cell stress and extracellular matrix degradation initiated by micro- and macro-injury that activates maladaptive repair responses including pro-inflammatory pathways of innate immunity. The disease manifests first as a molecular derangement (abnormal joint tissue metabolism) followed by anatomic, and/or physiologic derangements (characterized by cartilage degradation, bone remodeling, osteophyte formation, joint inflammation and loss of normal joint function), that can culminate in illness.“ (Kraus et al. 2015)

Die OA besitzt, im Angesicht einer steigenden Lebenserwartung, eine hohe Relevanz, sowohl bezogen auf das Individuum, da sie zu chronischen Schmerzen, Invalidität und der damit verbundenen Einschränkungen der Lebensqualität führt, als auch für die Gesellschaft, da sie in einem unter ständigen Kosten und Leistungsdruck stehenden Gesundheitssystem auf Grund ihrer Chronizität einen großen Belastungsfaktor darstellt (Hunter et al. 2014).

Die geschätzte Prävalenz liegt bei einem Betroffenen pro acht Erwachsenen (Dunlop et al. 2001). Die für die Behandlung der OA in den USA jährlich benötigten Versicherungsausgaben werden auf 185,5 Billionen US-Dollar geschätzt (Kotlarz et al. 2009). Die Kosten, die für Forschungszwecke aufgewendet werden, sind verglichen mit den gesamten direkten Ausgaben niedrig. In Australien betragen sie nur ein Prozent der Gesamtausgaben. (Arthritis and Osteoporosis Victoria 2013) Auf Grund der hohen Relevanz der OA haben die Vereinten Nationen und die World Health Organization die erste Dekade des neuen Jahrtausends zur „Bone and Joint Decade“ deklariert (Woolf und Pfleger 2003).

1.2.2 Ätiologie und molekulare Ursachen

Das Risiko eine OA zu entwickeln ist von diversen Faktoren abhängig, die in einer Vielzahl epidemiologischer Studien nachgewiesen werden konnten. Hierzu zählen ein erhöhter Body-Mass-Index, weibliches Geschlecht, vorangegangene Gelenkoperationen, intensive körperliche Aktivität und Tabakkonsum (Blagojevic et al. 2010). Eine zusätzliche genetische Veranlagung konnte durch den Nachweis von Polymorphismen in Genen, die sowohl Be-

standteile der EZM wie *ACAN*, *COL2A1* und *COMP*, als auch Signalmoleküle codieren, in osteoarthrotisch erkrankten Gewebe gezeigt werden (Loughlin 2005; Valdes et al. 2007).

Das Vorliegen genetischer und nicht-genetischer Faktoren ebnet den Weg in einen Zustand, bei dem der gestörte, durch Chondrozyten geregelte Metabolismus des Gelenkknorpels und seiner Bestandteile am Anfang einer, in progressiver Destruktion der funktionellen Anatomie des Gelenkes endenden Kaskade steht. Es kommt durch eine Aktivierung der sich in einem postmitotischen Ruhezustand befindenden Chondrozyten zu einer veränderten Expression von Bestandteilen der EZM und matrixdegradierender Enzyme, die zusätzlich durch eine Entzündungsreaktion angetrieben wird (Houard et al. 2013).

„Motor“ der Matrixdegradation ist die verstärkte Expression der MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-13 und MMP-14 sowie der *a disintegrin-metalloproteinases with thrombospondin-motifs* (ADAMTSs). Besondere Bedeutung für den Funktionsverlust des Knorpels haben die MMP-13, bedingt durch ihre Fähigkeit das knorpelspezifische Kollagen II zu spalten (Troeborg und Nagase 2012), sowie ADAMTS-4 und ADAMTS-5 durch ihre Funktion als Aggrecanase (Arner 2002). Kompensatorisch um den Matrix-Zerfall entgegen zu wirken, kommt es in den frühen Stadien der OA zu einer verstärkten Expression und Biosynthese von Aggrecan und Kollagen II durch den Chondrozyten (Hermansson et al. 2004). Dieser Kompensationsmechanismus sistiert jedoch in den späten Stadien und es kommt stattdessen zur Bildung eines biomechanisch insuffizienten, fibroartiliginären Ersatzgewebes aus Kollagen I und Kollagen III (Miosge et al. 1998; Sandell und Aigner 2001).

Im Verlauf der OA durchlaufen die Chondrozyten phänotypische Veränderungen und beginnen zu hypertrophieren, ein Phänomen, welches auch in der hypertrophen Schicht der Wachstumsplatten der langen Röhrenknochen beobachtet werden kann (Kraan und Berg 2012). Marker dieses Prozesses sind Kollagen X (Kirsch und von der Mark 1992), MMP-13 (Nurminskaya und Linsenmayer 1996) und der Transkriptionsfaktor (TF) *runt-related transcription factor 2* (RUNX2), einem TF der osteogenen Differenzierung (Solomon et al. 2008). Die Aktivierungsschritte dieser Kaskade sind vielfältig und noch nicht vollständig verstanden. Mögliche Auslöser sind altersbedingte Veränderungen des Chondrozyten, vermehrte Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress, übermäßige mechanische Belastungen sowie eine Veränderung der EZM durch Mikroverletzungen mit dem Freiliegen von Kollagen II-Fibrillen (Kraan und Berg 2012).

Ein wichtiger Faktor für die Krankheitsprogression ist das Vorliegen eines inflammatorischen Milieus mit einer erhöhten Konzentration löslicher proinflammatorischer Mediatoren, wie z. B. dem Interleukin-1 β (IL-1 β), dem Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) und einer Vielzahl anderer Zytokine und Chemokine, in der Synovialflüssigkeit, die frei in den Gelenkknorpel diffundieren und den chondrozytären Metabolismus beeinflussen. Quelle dieser Zytokine sind Synoviozyten sowie in die Synovia eingewanderte Makrophagen, die durch eine Ligandenbindung von Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr, den Toll-Like-Rezeptoren (TLRs), aktiviert werden (Scanzello und Goldring 2012). Die TLR-

Aktivierung erfolgt dabei im Gegensatz zur angeborenen Immunität nicht durch exogene Liganden, wie bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS), sondern durch endogene Liganden mittels *damage-associated molecular patterns* (DAMPs). Zu diesen gehören Fragmente der EZM oder streng intrazelluläre Moleküle, die durch Nekrose in den Extrazellularraum gelangen können (Piccinini und Midwood 2010).

Im Rahmen der persistierenden subklinischen Inflammation kommt es im weiteren Verlauf zu epigenetischen Veränderungen, die eine weitere Progression fördern und inflammatorische Signalkaskaden verstärken. Epigenetische Mechanismen laufen hierbei auf transkriptioneller und post-transkriptioneller Ebene ab. Zu ihnen gehören Methylierung der Desoxyribonukleinsäure (DNA), Histonmodifikationen und Micro-Ribonukleinsäuren (RNAs) (Reynard 2016). Studien auf diesem Gebiet sind Gegenstand neuester Forschungen und versprechen die Identifizierung möglicher potenzieller Ziele für die Entwicklung neuer pharmakologischer Substanzen (Yu et al. 2015).

1.2.3 Histologische Veränderungen des Knorpelgewebes im Verlauf der OA

Die molekularen Pathomechanismen, deren gemeinsame Endstrecke der Verlust der natürlichen Homöostase des Gelenkknorpels ist, führen zu morphologischen, initial histologisch erkennbaren Veränderungen. Ein pathologisches Grading-System dieser Veränderungen wurde 1971 durch Mankin etabliert, basierend auf einem Score, der die Faktoren Strukturabnormalien, den Proteoglykananteil, zelluläres Wachstum und die Integrität der *tidemark* berücksichtigt (Mankin et al. 1971).

Anfänglich kommt es zu dem Auftreten von oberflächlichen Fibrillen und der Bildung von Chondrozyten-Clustern als Ergebnis einer erhöhten Proliferation, im weiteren Verlauf durch den Verlust von Proteoglykanen zum Freiliegen von Kollagenfibrillen. Diese Knorpeldefekte werden durch ein fibrokartiliginäres Ersatzgewebe mit einem hohen Anteil an Kollagen I und fibrozytären Zellen aufgefüllt. Insgesamt kommt es zu einer durch Apoptose bedingten verminderten Zellzahl zu einem vermehrten Auftreten zellulärer Cluster in den tiefen Fissuren. Eine Duplikatur der *tidemark* und eine Vergrößerung der Mineralisierungszone mit dem Einwachsen von Gefäßen aus dem subchondralen Knochen kann beobachtet werden. Als Folge der erhöhten Belastung des Knochens kommt es zu dessen Sklerosierung und der Bildung von Osteophyten (Sulzbacher 2012).

1.2.4 Rolle und Funktion des NF- κ B-Signalweges in der Pathophysiologie der OA

Die OA wurde lange Zeit als reine Abnutzungserscheinung des Gelenkknorpels betrachtet, die durch sich im Laufe eines Lebens summierende, mechanische Belastungen bedingt ist. Erst mit Fortschritten in der Molekularbiologie konnte dieses Paradigma geändert werden, so dass es heute gemeinhin als erwiesen gilt, dass der Knorpeldegeneration ein proinflammatorischer Prozess mit zu Grunde liegt (Berenbaum 2013). Insbesondere die Erforschung des NF- κ B-Signalweges, der über zahlreiche Funktionen im Rahmen der angebore-

nen Immunität, der Zelldifferenzierung und dem Zellüberleben verfügt, bildete in den letzten Jahren das Fundament für neue und innovative Behandlungsansätze in der OA-Therapie (Roman-Blas und Jimenez 2006; Marcu et al. 2010).

Um eine differenzierte Antwort der Genexpression auf externe Stimuli zu gewährleisten, verfügt der Signalweg über ein großes Repertoire positiver und negativer regulatorischer Elemente und verschiedener Funktionsweisen. In einer vereinfachten Darstellung führen Liganden, wie z. B. LPS, IL-1 β und TNF- α , über eine Rezeptorinteraktion zur Aktivierung des I κ B α -Kinase-Komplexes (IKK), welcher über eine Phosphorylierung die Ubiquitinierung und anschließende proteasomale Degradation von *inhibitor of NF- κ B*, welche die TFs der NF- κ B-Familie in einem cytosolischem Arrest halten, einleitet. Freigesetzte NF- κ B-Dimere werden durch eine Reihe posttranslationaler Modifikationen aktiviert und translokieren in den Nukleus, wo sie spezifische DNA-Sequenzen binden und an Promotoren ihrer proinflammatorischen Zielgene wirken (Hayden und Ghosh 2008).

Funktionell hat der Signalweg in der OA eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung einer proinflammatorischen Antwort und einem veränderten chondrozytären Metabolismus mit einhergehender Matrixdegeneration (Marcu et al. 2010; Olivotto et al. 2015).

In der Synovialflüssigkeit osteoarthritisch erkrankter Gelenke finden sich erhöhte Konzentrationen „konventioneller“ proinflammatorischer Mediatoren, darunter IL1- β und TNF- α , und „unkonventioneller“ proinflammatorischer Mediatoren, wie den Alarminen S100A8, S100A9 und *high mobility group protein-1* (HMGB-1), sowie DAMPs. Gemeinsam münden diese über ihre verschiedenen Rezeptoren in den NF- κ B-Signalweg (Kapoor et al. 2011; Liu-Bryan 2015). Durch die inflammatorischen Stimuli beginnen die Chondrozyten vermehrt inflammatorische Gene zu exprimieren. Dies führt durch weitere Zytokinproduktion von Interleukin-6 (IL-6), IL-1 β und TNF- α zur Aufrechterhaltung des inflammatorischen Milieus (Sandell et al. 2008) und zu einer veränderten Expression den chondrozytären Metabolismus regulierender TFs, wie z. B. einer Herunterregulierung von *SRY*(*sex determining region y*)-*Box 9 Protein* (SOX9), dem wichtigsten Regulator der Chondrogenese, der entscheidend ist für die Transkription chondrozyten-spezifischer Gene, wie *ACAN* und *COL2A1* (Goldring et al. 2006).

1.2.4.1 Der NF- κ B Signalweg als therapeutisches Target in der OA

Zum aktuellen Zeitpunkt existiert keine die Krankheitsprogression beeinflussende, medikamentöse Therapie der OA. Der in den aktuellen Leitlinien für die nicht-operative Behandlung der OA des Knies der OARSI empfohlene Einsatz nicht-steroidaler Antiphlogistika dient lediglich zur Symptomkontrolle von Schmerzen, vermag es aber nicht die krankheitsauslösenden biochemischen Prozesse zu modifizieren und hat ein breites Spektrum an Nebenwirkungen mit einem hohen Risikoprofil (Crofford 2013; McAlindon et al. 2014). Neben der Entwicklung stammzell-basierter regenerativer Therapieansätze zielen aktuelle Forschungen auf die Entwicklung von *disease-modifying drugs* (DMDs), die den Krankheits-

prozess verlangsamen und für die eine Vielzahl möglicher pharmakologischer Zielstrukturen existiert (Tonge et al. 2014; Goldring und Berenbaum 2015).

Die Versuche, effiziente DMDs, die auf Proteine des NF- κ B Signalweges zielen, zu entwickeln, erstrecken sich von *in vitro*-Versuchen bis zu klinischen Studien an Patienten. Die pharmakologischen Zielstrukturen bilden dabei ein breites Spektrum ab, beginnend bei den Liganden und endend bei den Genprodukten der NF- κ B-Zielgene (Roman-Blas und Jimenez 2006; Marcu et al. 2010).

1.3 Das Immunophilin FKBP51 und seine Rolle im NF- κ B-Signalweg

Das *FK506-binding protein 51* (FKBP51), benannt nach seiner Fähigkeit das Immunsuppressivum FK506 (Tacrolimus) zu binden (Wiederrecht et al. 1992), wurde erstmalig im Komplex mit Steroidrezeptoren entdeckt (Smith et al. 1990) und erfüllt wichtige Funktionen bei der Adaption der Zelle an Stress und wechselnde Umweltbedingungen, wobei es Funktionen in der Regulation verschiedener Signalwege besitzt (Rein 2016). Seine Relevanz für die Medizin erfüllt es durch seine Rolle in einer Vielzahl von Krebsarten, metabolischen Erkrankungen, Proteinfehlfaltungserkrankungen und psychiatrischen Erkrankungen (Storer et al. 2011). Die Entwicklung hochselektiver Liganden, wie z. B. den *small molecules* SAFit1 und SAFit2, ermöglicht neue therapeutische Einflussmöglichkeiten (Feng et al. 2015).

1.3.1 Molekularer Aufbau

FKBP51, codiert durch das *FKBP5*-Gen, gehört zur Familie der *FK506-binding proteins* (FKBP), einer Subgruppe der Immunophilin-Familie. Das bekannteste Mitglied dieser Familie ist FKBP12, welches den therapeutischen Effekt von FK506 vermittelt (Harding et al. 1989; Siekierka et al. 1989). Bei den Mitgliedern der FKBP-Subgruppe handelt es sich um multifunktionelle Proteine, die untereinander starke Strukturhomologien aufweisen. Die Primärstruktur von FKBP51 ist 457 ASs lang und während der Proteinfaltung bilden sich mehrere funktionelle Domänen aus. Die ersten beiden Domänen gebildet durch die ASs 33-138 und 147-251 sind typische FKBP-Domänen, wie sie auch in anderen Mitgliedern der Subgruppe vorkommen, bestehend aus fünf antiparallelen β -Faltblattstrukturen um eine α -Helix angeordnet. Sie werden als FK1 und FK2 bezeichnet, wobei FK1 die Bindetasche für FK506 bildet und *peptidyl-prolyl cis-trans isomerase* (PPIase) Aktivität aufweist (Sinars et al. 2003). PPIasen sind Enzyme, die die *cis-trans*-Isomerisation in Prolin-Peptidbindungen (Xaa-Pro) katalysieren und so eine Funktion in der Proteinfaltung erfüllen (Lang et al. 1987). Die ASs 261-400 bilden die dritte Domäne aus, die durch das dreifache Vorkommen des *tetratricopeptide repeat* (TPR)-Strukturmotivs gekennzeichnet ist (Sinars et al. 2003). TPR-Struktur motive sind zwei- bis 16-fache Wiederholungen einer konservierten 34 AS-Sequenz und formen molekulare „Schablonen“ für die Interaktion großer Proteinkomplexe. Funktionell wird so die Bindung zum *heat-shock protein 90* (HSP90) vermittelt (Das et al. 1998).

1.3.2 Zelluläre Funktionen und Rolle im NF- κ B-Signalweg

Das Immunophilin ist in einer Vielzahl von Signalwegen integriert und fungiert dabei durch seine Fähigkeit, Proteinkomplexe zu stabilisieren, als ein modulierendes Element der Signaltransduktion (Storer et al. 2011). Seine wohl bekannteste Funktion besitzt es im Glukokortikoid-Signalweg, wo es im Komplex mit dem GR, dem Motorprotein Dynein und HSP90, ein Inhibitor der Glukokortikoid-induzierten nukleären Translokation des GR ist, wobei das strukturhomologe FKBP52 eine entgegengesetzte Wirkung zeigt (Wochnik et al. 2005). Ähnliche Effekte für andere Mitglieder der Steroidrezeptorfamilie sind beschrieben worden (Sanchez 2012). In Melanom-Zelllinien konnte durch Immunopräzipitation eine Interaktion mit Mitgliedern der TGF- β -Familie nachgewiesen werden, die einen positiven Einfluss auf das metastatische Potential von Melanomzellen im Mausmodell zeigte (Romano et al. 2013; Romano et al. 2014).

Eine mögliche Rolle von FKBP51 als Aktivator im NF- κ B-Signalweg konnte erstmalig in einem Experiment gezeigt werden, welches das Ziel hatte, mittels proteomischer Analysen neue funktionelle Interaktionspartner von Molekülen des Signalwegs zu finden. Dabei zeigten sich Protein-Protein-Interaktionen mit den Kinasen IKK α , IKK ϵ , TAK1 und MEKK1. Durch ergänzende RNA-Interferenz (RNAi) und NF- κ B-Luciferase-Assay-Experimente konnte eine wichtige Rolle für FKBP51 als Kinase-Kofaktor und als aktivierender Modulator des gesamten Signalprozesses gezeigt werden (Bouwmeester et al. 2004). Protein-Protein-Interaktionen mit dem TNF α -Rezeptor assoziierten Adapterproteinen TRAF3 und TRAF6 konnten nachgewiesen werden. In derselben Arbeit konnte ein aktivierender Effekt von FKBP51 auf die durch Doppelstrang-RNA initiierte, NF- κ B vermittelte Expression von antiviralem Typ I Interferon gezeigt werden (Akiyama et al. 2014). Die Funktion von FKBP51 als positiver Modulator des NF- κ B-Weges konnte in einer Vielzahl weiterer Arbeiten demonstriert werden (Romano et al. 2004; Avellino et al. 2005; Jiang et al. 2008; Romano et al. 2010). Erlejman et al. (2014) zeigten einen gegenteiligen Effekt und sprechen FKBP51 eine inhibitorische Rolle bei der Translokation von NF- κ B-Dimeren in den Nukleus zu, die abhängig von der TPR-Domäne ist.

Die genauen molekularen Zusammenhänge, insbesondere die differentiellen Funktionen der Proteindomänen, wurden durch Romano et al. (2015) untersucht. In einem Zellmodell, welches in funktionellen Domänen punktmutiertes FKBP51 exprimiert, wurden mittels Koimmunopräzipitation die TPR- und PPIase-Domänen als Vermittler der Interaktion mit dem *NF- κ B-essential modulator*, einem Bestandteil des IKK identifiziert. Die TPR-Domäne alleinig interagiert mit IKK α , IKK β , den Kinasen des IKK, und dem neu entdecktem Interaktionspartner TRAF2. In derselben Arbeit konnte die Kinaseaktivität des IKK-Komplexes durch Applikation der Inhibitoren FK506 und Rapamycin gesenkt werden.

1.4 Chondrogene Progenitorzellen und ihr therapeutisches Potential

In den letzten Jahren sind vermehrt zell-basierte Therapieansätze in den Fokus der gesamten Medizin gerückt, die das Bestreben haben, sich die biologischen Eigenschaften von Stammzellen zu Nutze zu machen und so erlittene Gewebsdefekte, nach zum Beispiel Schlaganfällen oder Myokardinfarkt, zu einer *restitutio ad integrum* zu führen (Bianco et al. 2013). Stammzellen zeichnen sich durch ihre hohe Selbsterneuerungskapazität und die Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Zelltypen aus. Embryonal gewonnene Stammzellen sind pluripotent, was bedeutet, dass sie sich in Gewebe aller drei Keimblätter differenzieren können. Im Lauf der Entwicklung verlieren sie diese Eigenschaft und es wird allgemein angenommen, dass sie in einem Ruhezustand als Progenitorzellen in bestimmten Geweben residieren, um als Ressource für die Gewebsregeneration zu dienen (Morrison et al. 1997).

In den späten Phasen der OA findet sich eine in Clustern organisierte Zellpopulation in den tiefen Schichten des Gelenkknorpels, die extrazelluläre Matrixbestandteile, wie Kollagen I, Perlecan, Biglycan und Decorin exprimiert und so ein fibrocartiliginäres Ersatzgewebe bildet, was als Reparaturversuch, die biomechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels zu erhalten, gedeutet werden kann (Tesche und Miosge 2005). Aus den OP-Resektaten endgradig osteoarthritisch veränderter Kniegelenke konnten diese als chondrogene Progenitorzellen (CPCs) bezeichneten Zellen isoliert, kultiviert und charakterisiert werden. CPCs zeichnen sich durch die Expression von Stammzellmarkern, Multipotenz und ihr migratorisches Potential aus. Auf der Oberfläche dieser Zellen ließen sich die Stammzellmarker STRO-1, CD29, CD44, CD73 und CD90 nachweisen. Ihr migratorisches Potential zeigen sie durch ihre Fähigkeit im *ex vivo*-Migrationsversuch tief in geschädigtes Gewebe einzudringen. Unter geeigneten Kulturbedingungen unter Zusatz von Wachstumsfaktoren besitzen sie die Fähigkeit zur adipogenen, chondrogenen sowie osteogenen Differenzierung und zeigen so ihren Stammzellcharakter, wobei insbesondere ihre chondrogenen Eigenschaften sie zu geeigneten Mediatoren regenerativer *in vivo* Therapien machen. Als molekulare „Schalter“ ihres chondrogenen Potentials konnten die sich reziprok zueinander verhaltenen TFs SOX9 und RUNX2 mittels RNAi und Überexpression identifiziert werden, wobei es im Detail durch einen Knockdown von RUNX2 zu einer verstärkten Expression von SOX9 und den gelenkknorpelspezifischer EZM-Proteinen Kollagen II und Aggrecan kommt (Koelling et al. 2009). In Abgrenzung zu ebenfalls in regenerativen Therapieansätzen eingesetzten MSCs sind CPCs auf die osteochondrogene Linie festgelegt, weisen aber kein Risiko zur Ausbildung von Teratomen auf und lassen sich einfacher kultivieren (Muhammad et al. 2013).

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Für die Entwicklung klinischer Einsatzmöglichkeiten von CPCs ist das Verständnis der molekularen, die Chondrogenese beeinflussenden Mechanismen von entscheidender Bedeutung. In naher Zukunft könnte es möglich sein, durch Applikation von *small molecules* und Wachstumsfaktoren CPCs *in situ* so zu manipulieren, dass sie an Stelle eines insuffizienten fibrokartiliginären Ersatzgewebes eine biomechanisch stabile EZM produzieren und so die Gelenkfunktion erhalten. Dabei stellt insbesondere das Bestehen und der Einfluss eines in der OA existenten inflammatorischen Milieus eine Limitation dar, so dass eine antiinflammatorische Therapie essentiell ist (Schminke und Miosge 2014).

Durch zahlreiche Untersuchungen konnte eine Rolle für FKBP51 als positiven Modulator im NF- κ B-Signalweg angenommen werden, einem der wichtigsten Signalwege bei der Vermittlung einer inflammatorischen Antwort im Rahmen der OA. Die Entwicklung neuer hochselektiver FKBP51-Inhibitoren öffnet den Horizont möglicher pharmakologischer Interventionen. Zielsetzung dieser Arbeit ist es deshalb, die Expression von FKBP51 und seine Rolle in CPCs aus osteoarthritisch verändertem Gewebe zu untersuchen, um so die prinzipielle Möglichkeit einer pharmakologischen Therapie zu evaluieren.

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Expression von *FKBP5* in CPCs nachgewiesen werden. Zur Untersuchung der Proteinfunktion soll das CRISPR/Cas9-System eingesetzt werden, um einen *FKBP5*-Knockout zu generieren, der es ermöglicht, Erkenntnisse über die Proteinfunktion in CPCs zu gewinnen und so eine etwaige pharmakologische Beeinflussung von FKBP51 zu bewerten.

2 Material und Methoden

2.1 Ethikantrag

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden von der Ethik-Kommission der Universitätsmedizin Göttingen nach erfolgter Antragsstellung unter der Antragsnummer DOK_6_2016 als bedenkenlos eingestuft.

2.2 Zellkulturtechniken

2.2.1 Herkunft und Isolierung chondrogener Progenitorzellen

Die Versuche dieser Arbeit wurden an der in unserem Labor etablierten Zelllinie CPC241hT durchgeführt, welche freundlicherweise durch Frau Christa Bode zur Verfügung gestellt wurde, und im Vorfeld aus dem intraoperativ gewonnenen, endgradig arthrotisch veränderten Knorpel einer 61-jährigen Patientin isoliert und mittels plasmid-induzierter Überexpression des Enzymes humane Telomerase-reverse Transkriptase immortalisiert wurde.

2.2.2 Kultivierung, Passagierung und Zellgewinnung

Die Zellen wurden unter Umgebungsbedingungen von 37 °C und 5% CO₂ in Tissue Culture Flask T75 (Sarstedt, Nümbrecht, DEU) mit 10 ml Standardnährmedium (Tabelle 1) kultiviert, welches alle zwei Tage zur Sicherstellung der Nährstoffversorgung vollständig erneuert wurde. Sämtliche Zellkulturtechniken wurden unter sterilen Kautelen an einer Sterilbank (Herasafe KS 12, Thermo Fisher, Wilmington, USA) durchgeführt.

Um eine etwaige Differenzierung der Zellen zu verhindern, wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 80 Prozent, welche mit dem Lichtmikroskop (Axiovert 40 CFL, Zeiss Göttingen, DEU) geprüft wurde, passagiert. Hierzu wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen wurden zweifach mit 5 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, Sigma Aldrich, Steinheim, DEU) gewaschen, für zwei Minuten mit 2 ml Trypsin (PAN Biotech, Aidenbach, DEU) unter abschließendem leichten lateralen Beklopfen der Flaschen gelöst und in ein mit 2 ml Standardnährmedium vorbereitetes 50 ml Zentrifugenröhrchen (Thermo Fisher, Wilmington, USA) überführt. Die Kulturflasche wurde abschließend zweifach mit 2 ml Standardnährmedium gespült, wobei die verwendete Spülflüssigkeit ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt wurde. Daraufhin wurden die Zentrifugenröhrchen in eine Zentrifuge geladen (Zentrifuge 5810, Eppendorf, Hamburg, DEU) und es erfolgte die Zentrifugation bei 1200 rpm für 10 min. Das überstehende Kulturmedium wurde dekantiert und das gewonnene Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Die Zellkonzentration wurde

mittels Zellometer (Cellometer Auto T4 Cellcounter, Nexcelcom Bioscience, Lawrence, USA) bestimmt. Anschließend wurden mit Nährmedium vorbereitete Zellkulturflaschen mit $4 \cdot 10^4$ Zellen zur weiteren Kultivierung erneut beimpft oder die gewünschte Zellzahl zur Probengewinnung in ein 1,5 ml fassendes Safe-Lock-Tube (Eppendorf, Hamburg, DEU) pipettiert und erneut zentrifugiert mit anschließendem Verwerfen des Überstandes. Das so entstandene Pellet wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei $-81\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder direkt in weiterführenden Experimenten verwendet.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Standardnährmediums

| Substanz | Menge [ml] |
|---|------------|
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco, Carlsbad, USA) | 500 ml |
| Fetale Bovine Serum (Gibco, Carlsbad, USA) | 50 ml |
| Gentamycin (PromoCell, Heidelberg, DEU) | 5 ml |

2.3 Expressionsanalyse mittels reverse Transkription-gekoppelter qPCR

2.3.1 Allgemeines

Mit Hilfe der reverser Transkription-gekoppelten quantitativen-Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) ist es möglich, den relativen *messenger-RNA* (mRNA) Gehalt verschiedener Ausgangsproben zu bestimmen und Aussagen über die Genexpression zu treffen.

Im Detail wird nach erfolgter Aufreinigung der mRNA diese mit Hilfe des Enzymes reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die gewünschte Sequenz kann durch einen spezifischen Primer im Rahmen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden. Die PCR findet hierbei unter Zusatz der thermostabilen Taq-Polymerase, Oligonukleotiden und des spezifischem Primerpaares im *thermocycler* unter zyklischen Wiederholungen statt. Dabei werden die Schritte aus Denaturierung des Doppelstranges in Einzelstränge, Annealing mit dem jeweiligen Primer und Elongation der DNA durch die Taq-Polymerase 45-fach wiederholt, wobei es zu einem exponentiellen Anstieg der DNA kommt, welcher mittels des mit der DNA interkalierenden Farbstoffes SYBR-Green, der bevorzugt bei Bindung an einen DNA-Doppelstrang fluoresziert, detektiert wird. Der Zeitpunkt, an dem die gemessene Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz übersteigt, wird als *cycle threshold-value* (Ct-Wert) definiert, welcher sich entgegengesetzt zur Ausgangskonzentration der zu untersuchenden mRNA verhält.

Um semiquantitative Aussagen über die Genexpression verschieden behandelter Proben zu treffen, ist in einem letzten Schritt die Normalisierung mit den Ct-Werten eines *housekeeping gene* (HKG) notwendig, welches von der Zelle unter verschiedenen Umweltbedingungen unabhängig von Regulationsmechanismen in konstanter Menge exprimiert wird.

2.3.2 Isolierung von mRNA

Zur Isolierung von mRNA wurden die bei -81 °C gelagerten Zellpellets auf Eis aufgetaut und anschließend entsprechend den Herstellerempfehlungen mit dem Total RNA Kit PEQGold (PEQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DEU) weiterverarbeitet. Zur Bestimmung der Konzentration wurde die gewonnene mRNA abschließend mit dem Spektralphotometer NanoDrop 1000 (Thermo Fisher, Wilmington, USA) untersucht.

2.3.3 Umschreiben der mRNA in cDNA

Das Umschreiben der mRNA in cDNA erfolgte mit dem QuantiTect Reverse TranscriptionKit (Qiagen, Venlo, NLD) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers unter Zuhilfenahme des Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg, DEU). Abschließend wurde die Probe in Abhängigkeit der zuvor im Spektralphotometer bestimmten mRNA Konzentration mit RNase-freien Wasser so weit verdünnt, dass eine cDNA-Konzentration von 1 ng/ μ l vorlag. Dies geschah unter der Annahme einer reversen Transkription von 100 % der Ausgangs-mRNA.

2.3.4 Durchführung der qPCR

Zur Durchführung der qPCR wurde der in Tabelle 2 dargestellte Master-Mix vorbereitet. Der Reaktionsansatz bestand aus 9 μ l Master-Mix und 1 μ l cDNA, welche nacheinander in das Well einer 96-Well-Platte (Biozym, Hessisch Oldendorf, DEU) pipettiert, mit den dazugehörigen Flachdeckeln verschlossen und für wenige Sekunden bei 1000 rpm zentrifugiert wurden. Daraufhin erfolgte die qPCR im Mastercycler ep gradient S realplex² (Eppendorf, Hamburg, DEU) entsprechend des in Tabelle 3 dargestellten Protokolls.

Tabelle 2: Pipettierschema qPCR

| Substanz | Menge [μ l] |
|--|---------------------|
| PlatinumR SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (PEQLab, Erlangen, DEU) | 5 |
| <u>Primer Mix:</u> | 2 |
| Forward primer (100 pmol/ μ l) 20 μ l | |
| Reverse primer (100 pmol/ μ l) 20 μ l | |
| RNase-freies Wasser 160 μ l | |
| RNase-freies Wasser | 2 |

Tabelle 3: qPCR-Protokoll

| Reaktionsschritt | Temperatur [C°] | Zeit [s] |
|------------------------|------------------|----------|
| Initiale Denaturierung | 95 | 120 |
| Denaturierung | 95 | 15 |
| Annealing | primerspezifisch | 15 |
| Extension | 72 | 20 |
| Finale Extension | 72 | 600 |

2.3.5 Normalisierung der Messwerte und statistische Auswertung

Die Auswertung der Werte erfolgte nach der von Pfaffl beschriebenen Methode, bei der die ermittelten Ct-Werte mit den Messwerten eines konstitutiv in der Zelle exprimierten HKG normalisiert wurden, um so Einflüsse bei der Verarbeitung der Proben zu eliminieren (Pfaffl 2001). Als HKG wurde in den durchgeführten Versuchen das *beta 2-microglobulin (B2M)* verwendet. HKGs weisen die Eigenschaft auf, dass sie in Unabhängigkeit von Umgebungseinflüssen konstitutiv in der Zelle exprimiert werden und keiner Regulation unterliegen. Ziel der Normierung mit dem Housekeeping Gen ist es, etwaige Verzerrungen durch Pipettierfehler und Umwelteinflüsse zu vermeiden.

2.3.6 Design neuer Primer und Gradienten-PCR

Ein *B2M*-Primer wurden von Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe erstellt und freundlicherweise zur weiteren Verwendung zur Verfügung gestellt. Die Sequenzen des Primers für *FKBP5* wurden mit dem frei verfügbaren webbasierten Programm Primer-BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA) entworfen.

Zur Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur erfolgte eine Gradienten-PCR mit dem in Tabelle 2 dargestellten Reaktionsansatz bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen (50,7 °C, 53,1 °C, 55,5 °C, 57,9 °C, 60 °C, 61,6 °C, 62,7 °C, 63 °C). Die Annealing-Temperatur, bei der sich in der Schmelzkurvenanalyse ein singulärer deutlicher Peak zeigte, wurde gewählt. Zur Überprüfung der Spezifität des entworfenen Primers wurde das PCR-Produkt mit dem Wizard PCR Clean Up-Kit (Promega, Fitchburg, USA) aufgereinigt und durch SeqLab (Göttingen, DEU) sequenziert. Es erfolgte ein Abgleich der verwendeten Gensequenz mit dem Ergebnis der Sequenzierung.

2.3.7 Verwendete Primer

Die verwendeten Primer sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Primer

| Gen | Forward-Primer | Reward-Primer | Annealing-Temperatur [°C] |
|--------------|---------------------------|----------------------|---------------------------|
| <i>FKBP5</i> | GGCAAAGGCCAAGTCATCAAG | AAGAGAGTTGCATTCGAG | 63 |
| <i>B2M</i> | TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT | TCTCTGCTCCCCACCTCTAA | 61 |

2.4 Qualitativer und semiquantitativer Proteinnachweis mittels Western-Blot

2.4.1 Allgemeines

Der Western-Blot ist in der Lage ein Protein gezielt durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion qualitativ nachzuweisen. Ergänzend kann eine densitometrische Analyse erfolgen, um so Aussagen über den relativen Proteingehalt einer Probe im Vergleich zu einer Kontrollprobe zu treffen.

Vorbereitend ist es nötig, die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes in einem Gel durch die Spannung eines elektrischen Feldes aufzutrennen. Dies geschieht durch die Sodi-umdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE). Durch die Anlagerung des Sodi-umdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine in ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur aufgefaltet. Disulfidbrücken werden durch das Reduktionsmittel 2-Mercaptoethanol gespalten. Die Eigenladung der Primärstruktur wird durch das SDS neutralisiert, so dass die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Polyacrylamidgel nur von ihrer Kettenlänge bestimmt wird und eine Auftrennung nach Molekulargewicht erfolgt.

Im anschließenden Western-Blot werden die Proteine durch eine senkrecht angelegte Spannung auf eine Polyvinylidenfluorid(PVDF)-Membran übertragen, auf welcher sie über hydrophobe Wechselwirkungen gebunden sind. Nun wird ein unspezifischer Proteinnachweis mit Färbung durch Coomassie-Blau durchgeführt, um den Erfolg der vorangegangenen Schritte zu verifizieren. Anschließend erfolgt die Antigen-Antikörper-Reaktion mit einem Primärantikörper, dessen Bindung durch einen Chemilumineszenz erzeugenden Sekundärantikörper nachgewiesen werden kann. Diese wird mit einem Röntgenfilm in der Dunkelkammer detektiert und via Bildanalyse ausgewertet.

2.4.2 Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE

Die bei $-81\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Zellpellets wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und je 10^5 Zellen wurden in $10\ \mu\text{l}$ eines Gemisches (Verhältnis 10:1) aus dem in Tabelle 5 dargestellten dreifach konzentrierten SDS-Probenpuffer und 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, DEU) suspendiert, daraufhin kurz gevortext und bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 5 min im Heizblock inkubiert.

Tabelle 5: Zusammensetzung des dreifach konzentrierten SDS Probenpuffers

| Substanz | Menge [g] |
|--|-----------|
| 0,3 M Tris (Roth, Karlsruhe, DEU) | 3,6 |
| SDS 9 % (Roth, Karlsruhe, DEU) | 9 |
| Glycerin 22,5 % (Roth, Karlsruhe, DEU) | 22,5 |
| Bromphenolblau (Roth, Karlsruhe, DEU) | 0,1 |
| Vor Zugabe des SDS auf 100 ml mit Aqua destillata auffüllen, pH auf 6,7 kalibrieren. | |

2.4.3 SDS-PAGE

Als erster vorbereitender Schritt wurde das zur Auftrennung des Proteingemisches benötigte Polyacrylamidgel in zwei aufeinanderliegenden Glasplatten hergestellt, die durch zwei seitlich aufgebrachte dünne Platzhalter getrennt sind, so dass ein Spalt zum Eingießen des vor der Zugabe des Ammonium-Peroxiddisulfat (APS, Roth, Karlsruhe, DEU) noch flüssigen Gels entstand. Um ein Auslaufen des Gels während des Polymerisationsvorganges zu verhindern, wurden die seitlichen und der untere Plattenrand mit einer Gummidichtung versehen, die durch zwei seitlich angebrachte Klemmen fixiert wurde. Das Pipettierschema für das Trenngel ist in Tabelle 6 dargestellt. Nach Zugabe des APS und Beginn der Polymerisation wurde der entstandene Hohlraum bis zu einer 6 cm vom unteren Plattenrand entfernten Höhe mit Trenngel gefüllt. Eventuell gebildete Luftblasen wurden durch leichtes Beklopfen der Glasplatten entfernt. Während des Polymerisationsvorganges wurde die

Gelschicht mit einer geringen Menge reinem Ethanol bedeckt, so dass sich ein gerader Abschluss der oberen Gelschicht bilden konnte. Während der Polymerisation erfolgte das Pipettieren der Komponenten für das Sammelgel, wie in Tabelle 6 dargestellt, welches dann auf das polymerisierte Sammelgel gegossen wurde. Um einzelne Taschen für die Proben zu schaffen, wurde ein Kamm in das noch flüssige Sammelgel eingeführt. Nach Abschluss der Polymerisation wurden Gummidichtung, Kamm und Klemmen entfernt. Die fertigen Gele wurden bis zu einer Woche im Kühlschrank aufbewahrt.

Das Polyacrylamidgel wurde in dem Nachbau einer Biometra Gelelektrophoresekammer mit Klammern befestigt, die zuvor mit Laufpuffer, welcher sich in seiner fünffach konzentrierten Stammlösung aus 1,9 M Glycin (AppliChem, Darmstadt, DEU), 0,5% SDS und 0,25 M Tris-HCl (Roth, Karlsruhe, DEU), mit Aqua destillata auf einen Liter aufgefüllt, zusammensetzte, befüllt wurde. Die einzelnen Geltaschen wurden mit je 25 µl der vorbereiteten Proben befüllt. Um eine spätere Aussage über das ungefähre Molekulargewicht des dargestellten Proteins treffen zu können, wurde in jeweils eine Proben tasche 4 µl Page Ruler (Thermo-Fisher, Bremen, DEU) pipettiert. Nach dem Befüllen der Proben taschen wurde das Proteingemisch mit einer Stromstärke von 10-15 mA bis zum Erreichen des Sammelgel-Unterrandes konzentriert. Daraufhin erfolgte die Auftrennung der Proteine mit einer Stromstärke von 20-25 mA, bis diese den Unterrand des Trenngels erreicht hatten.

Tabelle 6: Pipettierschema für Trenn- und Sammelgel

| Lösung | Trenngel | Sammelgel |
|--|----------|-----------|
| Aqua destillata | 2 ml | 1,35 ml |
| Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, 150 ml Aqua destillata, pH 8,9) | 1,4 ml | |
| Sammelgelpuffer (0,50 M Tris-HCl, 250 ml Aqua destillata pH 6,8) | | 625 µl |
| Acrylamid (Roth, Karlsruhe, DEU) | 1,85 ml | 400 µl |
| SDS 10 % (Roth, Karlsruhe, DEU) | 55 µl | 25 µl |
| TEMED (Roth, Karlsruhe, DEU) | 5 µl | 2,5 µl |
| APS 10 % (Roth, Karlsruhe, DEU) | 250 µl | 200 µl |

2.4.4 Western-Blot

Im nächsten Schritt, dem sogenannten Western-Blot, erfolgt die Übertragung der zuvor in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durch eine angelegte Spannung auf eine PVDF-Membran (Milipore, Darmstadt, DEU). Diese wurde für ca. 10-15 sec mit Methanol (Roth,

Karlsruhe, DEU) aktiviert. Die folgenden Schritte erfolgten, um eine Blasenbildung zu vermeiden, unter Transferpuffer: Auf die Anodenseite der Western-Blot-Kassette wurde ein Schwamm und drei zuvor in Transferpuffer getränkte Filterpapiere gelegt, auf die dann die PVDF-Membran gelegt wurde. Vorsichtig wurde das Polyacrylamidgel aus den Glasplatten herausgetrennt und auf die PVDF-Membran gelegt. Auf diese Konstruktion wurden drei weitere Filterpapiere und ein weiterer Schwamm gelegt, die Kassette mit Gummibändern verschlossen und letztlich in den mit Transferpuffer gefüllten Reaktionstank gelegt.

Zur Durchführung des Proteintransfers wurde für 120 min eine Stromstärke von 350 mA angelegt, wobei eine Kühlung durch kontinuierlichen Wasserfluss erfolgte. Der verwendete Transferpuffer setzte sich aus 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin und 400 ml Methanol (20 %) zusammen, die mit Aqua destillata auf 2 l aufgefüllt und auf einen pH-Wert von 8,3 eingestellt wurden.

2.4.5 Unspezifischer Proteinnachweis durch Coomassie-Blau-Färbung

Der folgende Schritt diente dem unspezifischen Proteinnachweis durch Coomassie-Blau-Färbung. Hierzu wurde die PVDF-Membran in einer mit Färbelösung gefüllten Reaktionskammer geschwenkt, bis sich die Proteinbanden darstellten. Anschließend wurde die Hintergrundfärbung durch Schwenken in Entfärber eliminiert. Das so entstandene Bandenmuster wurde mittels Flachbrettscanner dokumentiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen der Membran mit TBS-T. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Zusammensetzung von Färber und Entfärber

| | Färber | Entfärber |
|--|-----------------------|-----------------------|
| BrilliantBlauR250 (Roth, Karlsruhe, DEU) | 0,1 g | / |
| Methanol 50 % (Roth, Karlsruhe, DEU) | 50 ml | 50 ml |
| Essigsäure 7 % (AppliChem, Darmstadt, DEU) | 70 ml | 7 ml |
| Aqua destillata | Auf 100 ml auffüllen. | Auf 100 ml auffüllen. |

2.4.6 Spezifischer Proteinnachweis mittels Antikörper-Antigenreaktion

Der spezifische Proteinnachweis erfolgte indirekt über einen Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper, der nach Zugabe von Substrat Chemilumineszenz erzeugt, welche auf einem Röntgenfilm nachgewiesen wurde.

Zur Vorbereitung wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Lösung bestehend aus 2,5 g Milchpulver (Roth, Karlsruhe, DEU) und 100 ml TBS-T inkubiert, wodurch freie Bindungsstellen blockiert wurden. Die verwendeten Primärantikörper wurden anhand der Herstellerangaben in der oben beschriebenen Lösung in der jeweiligen Konzentration verdünnt auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C auf einer Wippe über Nacht. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Antikörper entfernt und die Membran wurde fünfmal für je 5 min mit TBS-T gewaschen. Nun erfolgte die Zugabe des Chemilumineszenz-erzeugenden Substrates Western Bright™ Sirius (Advansta, Menlo Park, USA) oder Western Bright™ ECL (Advansta Menlo Park, USA), welches jeweils entsprechend den Herstellervorgaben vorbereitet wurde. Die Inkubationszeit betrug bei Lichtschutz unter Raumtemperatur 5 min. Die mit Substrat versehene PVDF-Membran wurde blasenfrei in einer Klarsichtfolie verpackt in eine Röntgenkassette gelegt. Die folgenden Schritte erfolgten unter Rotlicht in der Dunkelkammer. Die Membran wurde mit dem Amersham ECL Röntgenfilm (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) bedeckt und die Kassette fest verschlossen. Die Belichtungszeit richtete sich nach der Intensität der Chemilumineszenz und wurde so kurz wie möglich gewählt, um die Detektion von Unterschieden zwischen den Proben zu ermöglichen. Nach erfolgter Beleuchtung wurde der Röntgenfilm für 1 min im Entwickler (Kodak, Rochester, USA) und für etwa 5 min im Fixierer (Kodak, Rochester, USA) inkubiert. Die abschließende elektronische Dokumentation des Bandenmusters erfolgte per Durchlichtscanner. Die Tabelle zeigt die verwendeten Antikörper.

Tabelle 8: Verwendete Antikörper

| Name | Firma/Nummer | Herkunft/Typ | Verdünnung |
|-------------------|--|----------------------------|------------|
| FKBP51 (D-4) | Santa Cruz (Heidelberg, DEU)/sc-271547 | Maus/monoklonal | 1:700 |
| α -Tubulin | Sigma Aldrich (Steinheim, DEU)/T6199 | Maus/monoklonal | 1:5000 |
| Anti-Mouse, IgG | Sigma Aldrich (Steinheim, DEU)/A9917 | Ziege/Peroxidase gekoppelt | 1:40000 |

2.4.7 Strippen und Wiederverwendung der Membranen

Damit eine Wiederverwendung der Membran zum erneuten Proteinnachweis möglich war, wurde die Membran für 15 min bei 65 °C in Strippingpuffer (62,5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 150 mM 2-Mercaptoethanol, pH 6,7) inkubiert. Hierdurch erfolgte ein Ablösen der in Schritt 2.4.6 gebundenen Antikörper. Daraufhin wurde die Membran zweimal für je 10 min mit TBS-T gewaschen. Die so behandelte Membran konnte nun für einen erneuten spezifi-

schen Proteinnachweis verwendet oder nach dem Trocknen mit reinem Methanol bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

2.4.8 Semiquantitativer Proteinnachweis

Um das Verhältnis der pro Bahn aufgetragenen Proteinmenge zwischen verschiedenen Proben zu erfassen, wurden die Werte anhand einer Ladungskontrolle (α -Tubulin) normalisiert. Hierzu wurde der Quotient des Grauwertes der Probe und des Grauwertes des α -Tubulin der Probe gebildet und die Ratio zum Quotienten zwischen Grauwert der Kontrolle und Grauwert des α -Tubulins der Kontrolle berechnet. Die Grauwerte der Proteinbanden wurden mit Hilfe des frei verfügbaren Programmes Image J (Wayne Rasband, USA) bestimmt.

2.5 Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems in CPCs

2.5.1 Allgemeines

Das Ziel der von dem amerikanischen Neurobiologen Feng Zhang beschriebenen und mitentwickelten Methode, die auf dem in Bakterien entdeckten *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)-adaptiven Immunsystem beruht, ist es in genomische DNA von Zellen mit einer Endonuklease, der *CRISPR-associated endonuclease 9* (Cas9), und einer spezifischen *guide-RNA* (gRNA) gezielt Doppelstrangbrüche zu induzieren. Auf Grund der hohen Fehlerrate bei der DNA-Reparatur mittels nicht-homologer Endverbindung kommt es zu Insertionen und Deletionen von Basen, die zu Frameshift-Mutationen und dem vorzeitigen Einbau eines Stopp-Codons führen können. Hierdurch bietet sich die Möglichkeit die Funktion eines Proteins durch einen gezielten Knockout des codierenden Gens zu untersuchen.

Die gRNA besteht aus einer Sequenz von 20 Nukleotiden, die möglichst spezifisch für die das adressierte Protein codierende Gensequenz sein soll. Die Zielsequenz der gRNA wird an ihrem 3'-Ende durch das *protospacer adjacent motif* (PAM) flankiert, welches essenziell für die Bindung von Cas9 an die DNA ist. Die Expression des Systems erfolgt über ein Plasmid, welches alle notwendigen Komponenten des Systems codiert und über die benötigten Sequenzen zur Restriktion und Ligation der gRNA verfügt. Durch Klonierung einzelner Zellen ist es möglich, stabile Knockout-Zelllinien zu generieren.

2.5.2 Restriktion von pSpCas9(BB)-2A-GFP und Ligation mit der gRNA

Das Design der gRNA erfolgte mit dem frei verfügbaren, webbasierten von Feng Zhang veröffentlichten CRISPR Design Tool (<http://tools.genome-engineering.org>). Die benötigten Oligonukleotide wurden mit 3' phosphoryliertem Ende durch die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, DEU) synthetisiert.

Um die gRNA in das verwendete Plasmid pSpCas9(BB)-2A-GFP (Addgene, Watertown, USA) zu integrieren, musste in einem ersten Schritt das Annealing der komplementären Sequenzen erfolgen. Hierzu wurden je 100 pmol des Oligonukleotides, 1 μ l *Annealing Buffer* (Promega, Mannheim, DEU) und 7 μ l RNase-freien Wassers in ein 0,5 ml fassendes Safe Lock Tube (Eppendorf, Hamburg, DEU) pipettiert, im Wasserbad für 5 min auf 80 °C erhitzt und langsam auf einer Thermomatte auf Raumtemperatur abgekühlt.

Das Schneiden des Plasmides pSpCas9(BB)-2A-GFP erfolgte an vordefinierten Stellen durch das Restriktionsenzym Fast Digest BpiI (Thermo Fisher, Bremen, DEU). Hierzu wurde ein Ansatz aus 6 μ l Fast Digest Buffer 10* (Thermo Fisher, Bremen, DEU), 3 μ l Fast Digest BpiI, 1 μ l pSpCas9(BB)-2A-GFP und 50 μ l Aqua in ein Reaktionsgefäß pipettiert, für 15 min bei 37 °C im Wasserbad und abschließend für 5 min bei 65 °C im Thermoblock inkubiert.

Für die abschließende Ligation wurde ein Ansatz aus 2 μ l des gespaltenen Plasmids, 2 μ l der FKBP51-spezifischen gRNA, 10 μ l 2* Rapid Ligation Buffer (Thermo Fisher, Bremen, DEU), 0,5 μ l T7-Ligase (Biolabs, Ipswich, USA) und 5,5 μ l Aqua vorbereitet, welcher für 30 min bei 23 °C inkubiert wurde. Das so entstandene Plasmid wird jetzt als pSpCas9(FKBP51)-2A-GFP bezeichnet.

2.5.3 Amplifizierung von pSpCas9(FKBP51)-2A-GFP in *E. coli DH5 α*

Um die für die Transfektion der CPC241hT benötigte Menge des Plasmides pSpCas9(FKBP5)-2A-GFP zu erhalten, war es notwendig, dieses in chemisch kompetenten *Escherichia. coli DH5 α* nach dem High Efficiency Transformation Protocol (C2987H/C2987I) von New England Biolabs (Ipswich, USA) zu amplifizieren. Im Anschluss waren eine Aufreinigung und Sequenzierung des Plasmides zur weiteren Verwendung notwendig.

Die *One Shot® Stbl3™ Chemically Competent E. coli* (Thermo Fisher, Bremen, DEU) wurden auf Eis aufgetaut und mit 5 μ l pSpCas9(FKBP5)-2A-GFP für 30 min auf Eis inkubiert, anschließend einem Hitzeschock von 42 °C für 30 s ausgeliefert und für weitere 2 min auf Eis inkubiert. Die so behandelten Bakterien wurden nach der Zugabe von 250 μ l S.O.C. Outgrowth Medium (Thermo Fisher, Bremen, DEU) bei 37 °C und 220 rpm für 60 min auf dem Thermoblock inkubiert.

Zur Selektion der, mit dem ein Ampicillin-Resistenzgen codierenden Plasmid transfizierten, Bakterien wurden 100 μ l der Suspension auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten mit einem Spatel ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Herstellung der LB-Agarplatten wurden 20 g LB-Agar (AppliChem, Darmstadt, DEU), 500 ml Aqua und Ampicillin (Sigma Aldrich, Steinheim, DEU) mit einer Endkonzentration von 100 μ g *ml⁻¹ verwendet.

Die LB-Agarplatten wurden am nächsten Morgen auf das Wachstum von Kolonien überprüft. Von mehreren Kolonien wurden Bakterien mit sterilisierten Zahnstochern gepickt und in auf 37 °C vorgewärmte, mit 5 ml LB-Medium (AppliChem, Darmstadt, DEU) und 500 µg Ampicillin versetzte, 15 ml Zentrifugenröhrchen (Thermo Fisher, Bremen, DEU) transferiert, welche über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert wurden. Je 1,5 ml der Suspension wurde aus den Zentrifugenröhrchen abpipettiert und mit dem PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, Mannheim, DEU) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers aufbereitet. Die Konzentration der so erhaltenen Plasmide wurde mit Hilfe des Spektralphotometers und Konzentrators auf 60-100 ng/µl eingestellt.

Die Proben wurde zur Verifikation der vorhergehenden Schritte durch die Firma SeqLab (Göttingen, DEU) mit dem U6-Forward-Primer (GAGGGCCTATTTCATGATTCC) sequenziert und auf die korrekte Insertion der gRNA mit dem von Florence Corpet veröffentlichten webbasierten Multalin-Tool (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) überprüft.

Die positiv getestete Bakterienkultur wurde für weitere Schritte in einer Glycerinkultur, bestehend aus 800 µl Bakteriensuspension und 800 µl Glycerin (Roth, Karlsruhe, DEU) bei -80 °C gelagert.

Um größere Mengen des Plasmides zu erhalten, wurde eine kleine Menge der Glycerinkultur mit einem sterilen Zahnstocher abgekratzt und in einem Erlenmeyerkolben mit 100 ml des Ampicillin-versetzten LB-Medium über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die erneute Plasmidpräparation erfolgte mit dem PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega, Mannheim, DEU). Das Plasmid wurde bei -20 °C gelagert.

2.5.4 Transfektion der CPCs mit pSpCas9(FKBP5)-2A-GFP

Ziel dieses Schrittes ist es, die CPCs mit dem in Abschnitt 2.5.3 gewonnenen Plasmid zu transfizieren, damit das auf ihm codierte Cas9 und die gRNA durch die Transkriptions- und Translationsmechanismen der Zelle exprimiert werden und so ihre Wirkung auf die genomische DNA der Wirtszelle entfalten können.

Die Transfektion, also das Einbringen des Plasmids, geschieht dabei durch das physikalische Verfahren der Elektroporation, bei welcher es durch eine auf die Zellmembran angelegte Spannung zu einer temporären hydrophilen Porenbildung mit Erhöhung der Permeabilität kommt.

Zur Transfektion wurde das Amaxa™ Human MSC Nucleofactor Transfection-Kit (Lonza, Basel, CH) verwendet. Es wurden 10⁶ Zellen geerntet, in einem 1,5 ml fassenden Safe-Lock-Tube (Eppendorf, Hamburg, DEU) bei 300 g zu einem Pellet zentrifugiert, in 100 µl der nach Angaben des Herstellers präparierten Transfektionslösung resuspendiert, mit 2 µg pSpCas9(FKBP5)-2A-GFP versetzt und in Küvetten überführt. Die Elektroporation erfolgte im Amaxa™ Nucleofactor®II (Lonza, Basel, CH) unter Verwendung des

Programmes U-23. Die Zellen wurden mit 500 μ l Nährmedium in mit 1 ml Nährmedium vorbereitete 6-Well-Platten (Sarstedt, Nümbrecht, DEU) geschwemmt. Nach 24 h erfolgte ein Wechsel des Nährmediums und eine optische Kontrolle der Zellen mit dem Lichtmikroskop.

2.5.5 Klonale Isolation, Expansion und Phänotypisierung der Zellen

Damit die Etablierung einer CPC241hT-FKBP51-Knockout-Zelllinie gelingt, ist es notwendig die Zellen klonal zu isolieren und weiter in der Zellkultur zu expandieren, so dass alle Zellen die genetischen Merkmale der Ursprungszelle besitzen.

Zur klonalen Isolierung der Zellen wurde das *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) verwendet. Hierzu wurden die Zellen 48 h nach erfolgter Transfektion geerntet, in 500 μ l PBS suspendiert und gezählt. Das FACS erfolgte mit dem Gerät FACScan (Becton, Dickinson, USA) und wurde freundlicherweise durch Frau Sabrina Becker, Klinik für Hämatologie und medizinischer Onkologie der Universitätsmedizin Göttingen, durchgeführt. Die Zellen wurden dabei durch die plasmid-basierte Expression des GFP sortiert und die GFP-positiven CPCs in die mit 100 μ l Nährmedium versetzten Wells einer 96-Well-Platte (Sarstedt, Nümbrecht, DEU) transportiert.

Bei der folgenden Expansion der Zelllinien erfolgte ein Wechsel des Nährmediums alle drei bis vier Tage. Ab dem 5. Tag wurden die Zellen regelmäßig alle zwei Tage auf klonales Wachstum unter dem Durchlichtmikroskop untersucht. Zelllinien, die ein klonales Wachstum aufwiesen, wurden anhand des in Tabelle 9 gezeigten Schemas auf 24-Well-Platten, 6-Well-Platten und in Tissue Culture Flasks T75 (Sarstedt, Nümbrecht, DEU) transferiert.

Tabelle 9: Schema der klonalen Isolation

| Arbeitsschritt | Anzahl der Wells | | |
|--------------------------------------|------------------------------|---------------|-----------|
| | Aspiration des Kulturmediums | 96 | 24 |
| | Menge [μ l] | | |
| Waschen mit PBS | 50 | 150 | 1000 |
| Lösen mit Trypsin (2 min/37 ° C) | 50 | 150 | 500 |
| Trypsin-Blockierung mit Kulturmedium | 100 | 300 | 1000 |
| Transport in ... | 24-Well-Platte | 6-Well-Platte | T75-Flask |

Der zur Phänotypisierung der Zellen notwendige Proteinnachweis von FKBP51 erfolgte mit dem in Abschnitt 2.3 beschriebenen Western-Blot.

2.6 Transienter FKBP51-Knockdown in CPCs

Im Gegensatz zum im Abschnitt 2.4 beschriebenen Knockout erreicht man beim Knockdown eines Genes durch *small interfering-RNA* (siRNA) nur einen vorübergehenden Effekt, da die siRNA nicht in das Genom integriert wird, natürlichen Abbauprozessen unterliegt und sich bei jeder Zellteilung halbiert. Wirkmechanismus der siRNA ist ein posttranskriptioneller Abbau der mRNA, der zu einer verminderten Translation des Gens in der Zelle führt.

Zur Transfektion wurde das Amaxa™ Human MSC Nucleofactor Transfection-Kit (Lonza, Basel, CH) verwendet. Es wurden $5 \cdot 10^5$ Zellen geerntet, in einem 1,5 ml fassenden Safe-Lock-Tube (Eppendorf, Hamburg, DEU) bei 300 g zu einem Pellet zentrifugiert, in 100 μ l der nach Angaben des Herstellers vorbereiteten Transfektionslösung resuspendiert, mit jeweils 0,2 nmol der siRNA versetzt und in Küvetten überführt. Zur Durchführung der Experimente wurde die FlexiTube-siRNA (Qiagen, Venlo, NL) mit den Bezeichnungen Hs_FKBP5_5, Hs_FKBP5_6, Hs_FKBP_11 und Hs_FKBP_12 verwendet. Die Sequenzen wurden durch den Hersteller nicht zur Verfügung gestellt. Zur Kontrolle des Transfektionsergebnisses fungierte eine mit dem pmaxGFP (Lonza, Basel, CH), einem GFP-kodierenden Plasmid, versetzte Probe. Die Elektroporation erfolgte im Amaxa™ Nucleofector®II (Lonza, Basel, CH) unter Verwendung des Programmes U-23. Die Zellen wurden mit 500 μ l Nährmedium in mit 1 ml Nährmedium vorbereitete 6-Well-Platten (Sarstedt, Nümbecht, DEU) geschwemmt. Nach 24 h erfolgte ein Wechsel des Nährmediums und eine Prüfung des Erfolges der Transfektion durch den Nachweis der grünen Fluoreszenz von GFP mit dem Lichtmikroskop bei der Bestrahlung von Licht mit einer Wellenlänge von 395 nm. Die Zellen wurden nach 48 Stunden geerntet und mittels qPCR und Western-Blot untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis von *FKBP5* in CPCs

Der Proteinnachweis von FKBP51 in CPC241hT erfolgte, nach der vorgeschalteten erfolgreichen Amplifizierung des Transkripts von *FKBP5* in der qPCR, durch spezifische Antigen-Antikörperreaktion. Hierzu wurde das aufbereitete Proteinlysat initial in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot auf die PVDF-Membran übertragen. Es folgte ein unspezifischer Proteinnachweis mit Coomassie-Blau. Abschließend erfolgte der spezifische Antigennachweis mittels Antigen-Antikörperreaktion. Die Antikörperverdünnung des Primärantikörpers FKBP-51 (D-4) betrug 1:700. Die Röntgenfilme wurden für 1 min belichtet. Es erfolgten drei unabhängige Versuche. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 dargestellt.

In den durchgeführten Versuchen gelang der erstmalige Nachweis der *FKBP5*-Expression in CPCs auf mRNA- und Proteinebene.

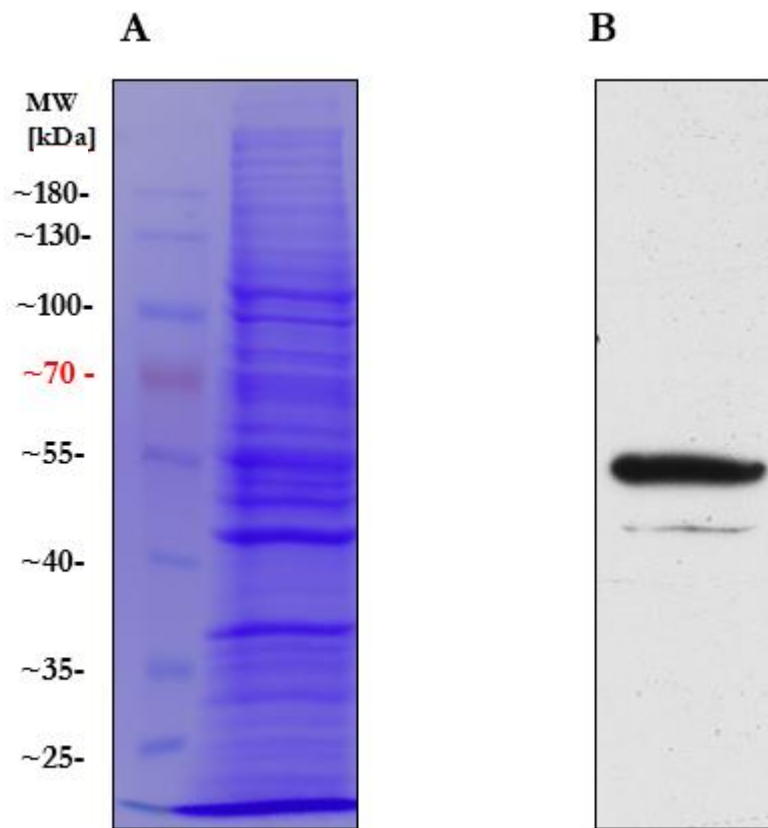


Abbildung 1: Proteinnachweis von FKBP51 in CPC241hT. A: Unspezifischer Proteinnachweis durch Coomassie-Blau-Färbung der nach ihrer molekularen Masse aufgetrennten und auf eine PVDF-Membran transferierten Proteine. Links davon zeigt sich das gefärbte Proteinmarkergemisch mit den Größenangaben des Herstellers zur ungefähren Ermittlung der molekularen Masse. B: Positiver Proteinnachweis von FKBP51 auf dem Röntgenfilm. Die obere Bande stellt sich ungefähr auf Höhe des Markers für 55 kDa dar und die untere etwas schwächer ausgeprägte Bande stellt sich zwischen 55 kDa und 40 kDa dar. Das Doppelbandenmuster entspricht den Angaben des Herstellers im mitgelieferten technischen Datenblatt des Antikörpers. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

3.2 Anwendung des CRISPR-Cas9-Systems in chondrogenen Progenitorzellen zur Etablierung eines FKBP51-Knockouts

Ziel des durchgeführten Versuches mit dem CRISPR-Cas9-System war es, einen Knockout des *FKBP5*-Genes in CPCs zu etablieren, um so Erkenntnisse über die Funktion des FKBP51-Proteins zu erlangen.

3.2.1 Design der gRNA

Strategisch wurde die gRNA mit Unterstützung des CRISPR Design Tools so konzipiert, dass sie eine Indel-Mutation im für die PPI-Domäne codierenden Exon 5 des für FKBP51 codierenden Gens *FKBP5* erzeugt. Hierzu wurde die Sequenz NG_012645.2 der Referenzsequenzdatenbank des National Center for Biotechnology Information (Bethesda, Maryland, USA) verwendet, welche für das Exon 5 codiert. Es wurde eine gRNA der höchsten

Bewertungsklasse ohne Off-Target-Effekte für den nachfolgenden Versuch ausgewählt. Die verwendete Gensequenz und Sequenz der gRNA sind in Abbildung 2 dargestellt.

A

NG_012645.2

```
5' -
gccaaagtcatcaaggcatgggacattgggggtggctaccatgaagaaaggagagatatgccat
ttactgtgcaaaccagaatatgcatatggctcggtggcagtcctcctaaaattccctcgaa
tgcaactctcttttttgag-3'      ↑
```

B

Oligo top

5' - CACCGAATATGCATATGGCTCGGC - 3'

Oligo bottom

3' - CTTATACGTATACCGAGCCGCAAA - 5'

Abbildung 2: Design der *FKBP5*-spezifischen gRNA. A. Es wurde die Sequenz NG_012645.2 des NCBI verwendet. Gelb hinterlegt ist die Zielsequenz. Grün hinterlegt ist die für die Bindung der Nuklease Cas9 essenzielle PAM-Sequenz. Die Schnittstelle der Nuklease ist ca. drei Basenpaare in 5' Richtung von der PAM-Sequenz entfernt gelegen mit einem Pfeil markiert. B. Dargestellt sind die durch die Firma Eurofins Genomics synthetisierten Oligonukleotide, welche neben der gRNA (gelb) Überhänge (magentafarben) erhalten, die komplementär zu den Schnittstellen des Restriktionsenzymes BbsI im Plasmid von pSpCas9(BB)-2A-GFP sind.

3.2.2 Sequenzierung des Plasmides pSpCas9(*FKBP5*)-2A-GFP

Nach Synthetisierung der Oligonukleotide und dem Durchführen des Annealings erfolgte die Ligation in den Vektor pSpCas9(BB)2A-GFP, der von nun an als pSpCas9(*FKBP5*)-2A-GFP bezeichnet wird. Dieser wurde in chemisch kompetenten *E. coli* amplifiziert. Hierbei wurden acht Kulturen angelegt. Nach Aufreinigung der Plasmide wurden diese zur Verifikation des korrekten Einbaus mit dem U6-Forward-Primer sequenziert. Hierbei wies nur eines der acht Plasmide eine korrekte Ligation der gRNA auf. Abbildung 3 zeigt das Ergebnis der Sequenzierung des Plasmides mit der korrekten gRNA. Dieses wurde in größeren Mengen produziert und für die nachfolgende Transfektion der Zellen verwendet.



Abbildung 3: Sequenzierung des Plasmides pSP-Cas9(FKBP5)-2A-GFP. Die mit dem MultAlin-Tool durchgeführte Analyse der durch SeqLab übermittelten Sequenzierungsdaten der Probe 8 zeigt eine korrekte Insertion des Oligonukleotides in das verwendete Plasmid.

3.2.3 Transfektion der CPCs mit pSpCas9(FKBP5)-2A-GFP

Nach Verifikation der vorherigen Schritte erfolgte die Transfektion der Zellen mit dem Plasmid pSpCas9(FKBP5)-2A-GFP. Hierzu wurden 10^6 CPC241hT der Passage 49 verwendet und mit 4 μ g Plasmid transfiziert. Die Transfektion erfolgte durch Elektroporation. Nach 24 h erfolgte eine Kontrolle der Zellviabilität und Morphologie mit dem Durchlichtmikroskop nach Abpipettieren des durch die Elektroporation bedingten Zelldetritus. Die Zellen wiesen dabei den für CPCs typischen Phänotyp mit spindelförmigen zytoplasmatischen Fortsätze auf, so dass sie für die folgenden Schritte weiterverwendet werden konnten. Abbildung 4 zeigt die Zellen 24 h nach der Transfektion. Auf Grund eines technischen Defektes des Lichtmikroskops, konnte die Transfektion der Zellen mit dem Plasmid durch die Fluoreszenz des GFP nicht nachgewiesen werden und erst durch die FACS-Analyse bestätigt werden.

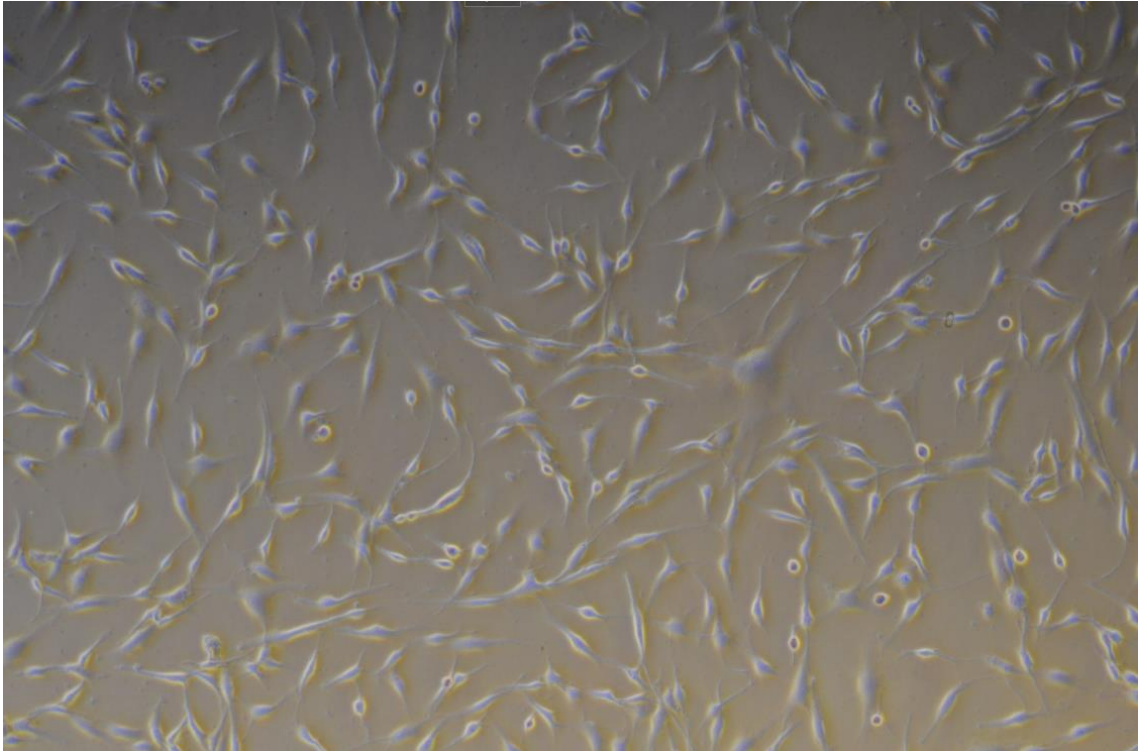


Abbildung 4: Zellmorphologie 24 h nach erfolgter Transfektion. Die Abbildung zeigt die lichtmikroskopische Ansicht der CPC241hT mit einem Vergrößerungsfaktor 40. Es zeigen sich die für CPCs typischen spindelförmigen Ausläufer.

3.2.4 Sortierung der transfizierten Zellen durch FACS

Die Sortierung der Zellen zur weiteren Klonierung erfolgte nach 48 h mittels FACS. Hierbei wurden die GFP-positiven Zellen in die Wells mehrerer 96-Well-Platten transferiert. Da sich in Vorversuchen zeigte, dass die CPCs ein schlechtes Anwachsverhalten nach erfolgtem FACS besaßen, wurden insgesamt sechs Platten, wovon je drei Platten mit einer Zelle und je eine Platte mit zwei, vier und sechs Zellen besetzt wurden, verwendet. Zur Kalibrierung des FACScan und als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte CPC241hT benutzt. Die Ergebnisse des FACS sind in Tabelle 10 dargestellt. Es waren 3,2 Prozent der transfizierten Zellen GFP positiv. Hierdurch konnte eine erfolgreiche Transfektion nachgewiesen werden.

Tabelle 10: Ergebnisse der FACS-Sortierung der mit pSpCas9(*FKBP5*)-2A-GFP transfizierten CPC241hT im Vergleich zur Negativkontrolle.

| | GFP positiv [%] |
|---|-----------------|
| CPC241hT, transfiziert mit pSpCas9(<i>FKBP5</i>)-2A-GFP | 3,2 |
| CPC241hT, Negativkontrolle | 0 |

3.2.5 Klonale Expansion und Phänotypisierung der erfolgreich mit pSpCas9(*FKBP5*)-2A-GFP transfizierten CPCs

Zur Erstellung einer CPC241hT-*FKBP5*-KO-Zelllinie wurden die durch FACS separierten Zellen regelmäßig lichtmikroskopisch auf klonales Wachstum, definiert als kreisrundes Wachstum ausgehend von einer Einzelzelle, gescreent. Es wurden nur die Zelllinien weiter passagiert und phänotypisiert, die klonales Wachstum aufwiesen. Abbildung 5 zeigt die lichtmikroskopische Abbildung einer repräsentativ für klonales Wachstum stehenden Zelllinie.

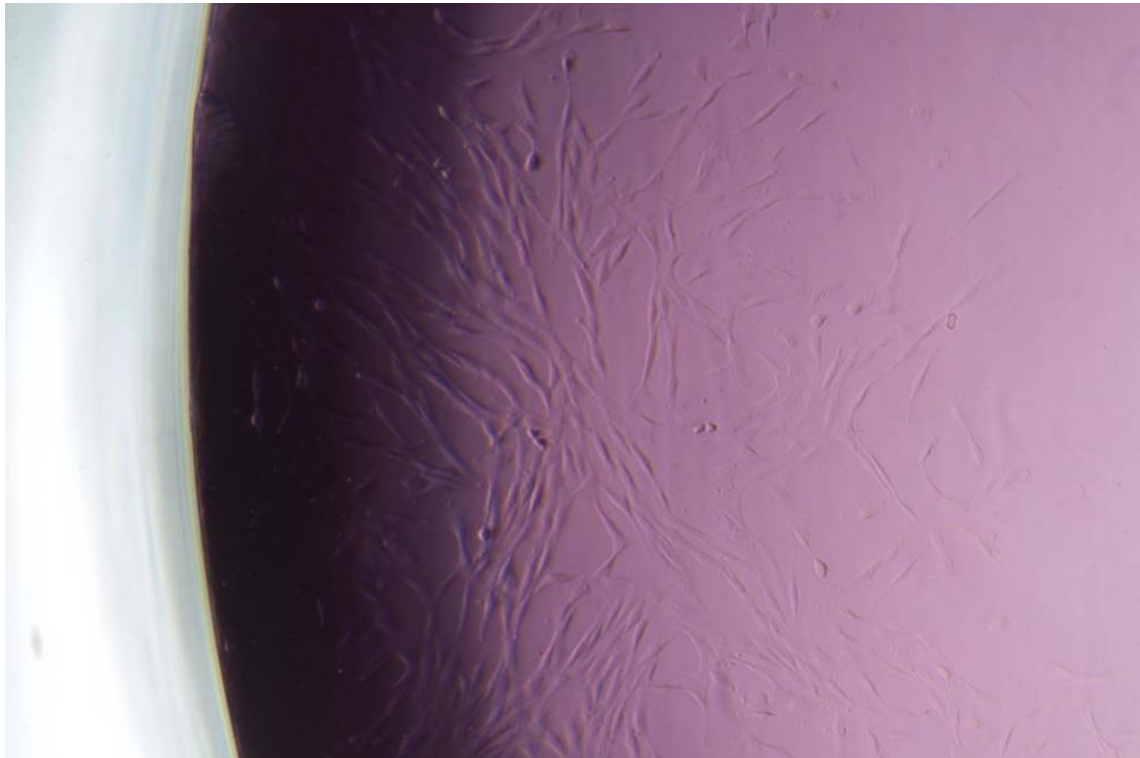


Abbildung 5: Klonales Wachstum der pSpCas9(*FKBP5*)-2A-GFP transfizierten Zellen. Die lichtmikroskopische Aufnahme (Vergrößerungsfaktor: 40) zeigt klonales Wachstum ausgehend von einer Einzelzelle am Rande eines Wells einer 96-Well-Platte.

Insgesamt wiesen 57 der 576 initial belegten Wells klonales Wachstum auf. Dabei zeigte sich eine unterschiedliche Anzahl an Klonen in den mit verschiedenen Zellzahlen sortierten 96-Well-Platten, dargestellt in Abbildung 6. Die Überprüfung der statistischen Signifikanz ist bei einmaliger Versuchsdurchführung nicht möglich. Von den 57 initialen Zelllinien konnten 45 durch Western-Blot phänotypisiert werden. Zwölf wiesen nach der Passage in das nächstgrößere Well eine Stagnation des Wachstums auf und konnten nicht weiter passagiert werden, so dass die zum Western-Blot erforderlichen Zellzahlen nicht erreicht wurden.

Zum Proteinnachweis wurde der zuvor getestete FKBP51-(D-4)-Antikörper mit einer Konzentration von 1:700 verwendet. Als Chemilumineszenzreagenz diente ECL-Sirius. Die Belichtungszeit des Röntgenfilmes betrug 1 min. Alle 45 Zelllinien zeigten sich FKBP51 positiv. Abbildung 6 zeigt die für FKBP51 typischen Doppelbanden mehrerer Proben, die

zur Vereinfachung der Dokumentation mit einer Nummer nummeriert wurden, auf dem Röntgenfilm. Das Proteingewicht wurde mit einer gefärbten Proteinleiter geschätzt. Die obere Bande präsentiert sich ungefähr auf Höhe des Markers für 55 kDa und die untere Bande knapp unterhalb des Markers von 55 kDa. Auf eine densitometrische Auswertung der PVDF-Membranen mittels Ladungskontrolle wurde bei eindeutigem Nachweis der Synthese von FKBP51 verzichtet. FKBP51 konnten in allen phänotypisierten Zelllinien mittels Western-Blot nachgewiesen werden.

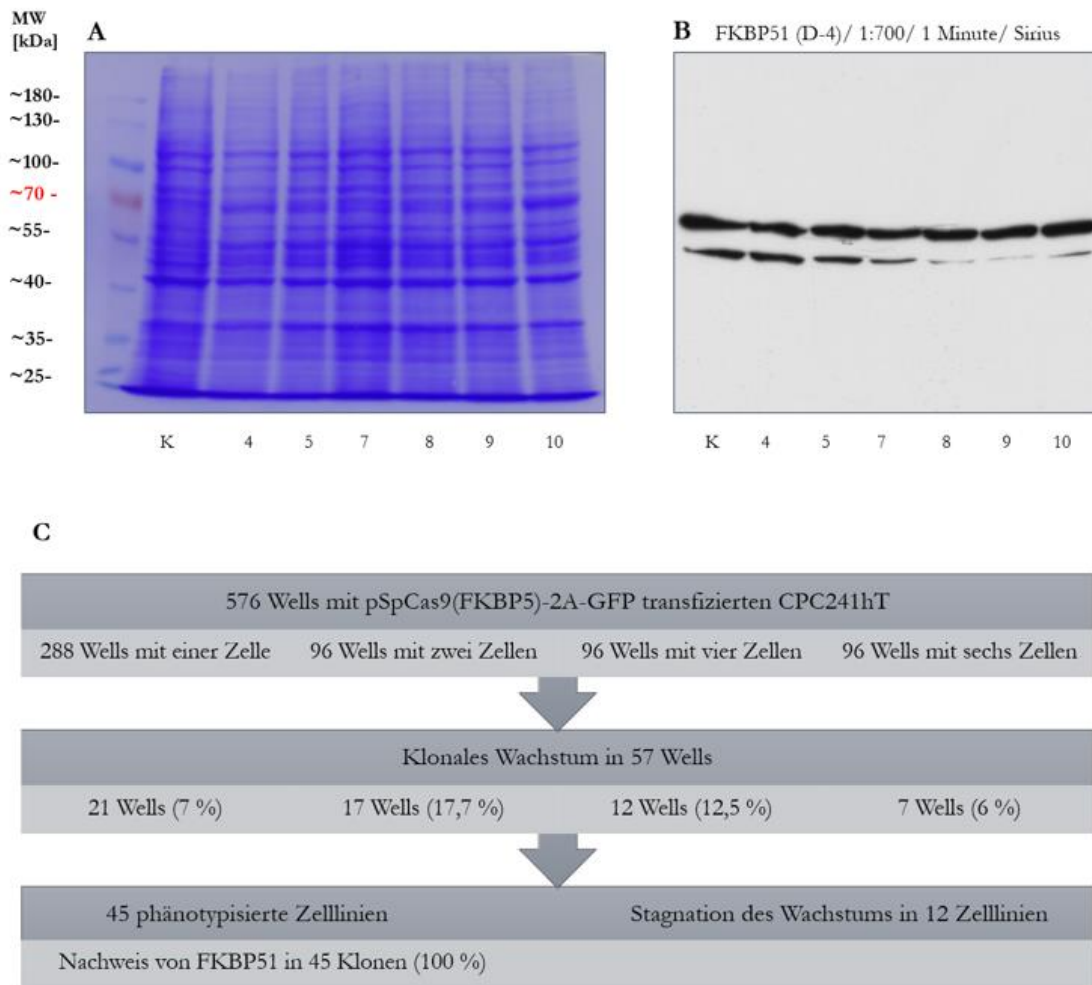


Abbildung 6: Überblick über die klonale Expansion und Phänotypisierung der mit pSpCas9-(FKBP5)-2A-GFP transfizierten CPC241hT. A: Coomassie-Färbung der PVDF-Membran. In der linken Tasche wurde die aus nicht-transfizierten CPC241hT bestehende Negativkontrolle (K) aufgetragen. Die Zelllinien wurden während der klonalen Expansion durchnummeriert. B: Spezifischer Nachweis mittels Antigen-Antikörperreaktion von FKBP51 in transfizierten CPC241hT und in der Kontrolle auf einem exemplarischen Röntgenfilm. Alle Proben liefen in einem Gel. C: Graphische Darstellung der Ergebnisse der klonalen Expansion und anschließenden Phänotypisierung.

3.3 Transfektion von CPCs mit FKBP51-spezifischer siRNA

Ziel dieses Versuches war es, einen transienten Knockdown von *FKBP5* auf Transkript- und Proteinebene zu erreichen, um Erkenntnisse über die Funktion von FKBP51 in CPCs zu erlangen. Hierzu wurden in einem vorbereitenden Versuch CPC241hT mit mehreren siRNAs, die spezifisch für FKBP5 sind, transfiziert. Als Negativkontrolle dienten CPC241hT derselben Passage ohne den Zusatz der siRNA im Transfektionsreagenz, um so mögliche zytotoxische Einflüsse der Elektroporation auf die Genexpression auszuschließen. Zur Verifikation einer erfolgreichen Transfektion wurde eine unabhängige Zellprobe mit dem pmaxGFP-Plasmid transfiziert, dessen Genprodukt GFP sich fluoreszenzmikroskopisch nachweisen lässt. Die lichtmikroskopische Ansicht der transfizierten Zellen ist dargestellt in Abbildung 7.

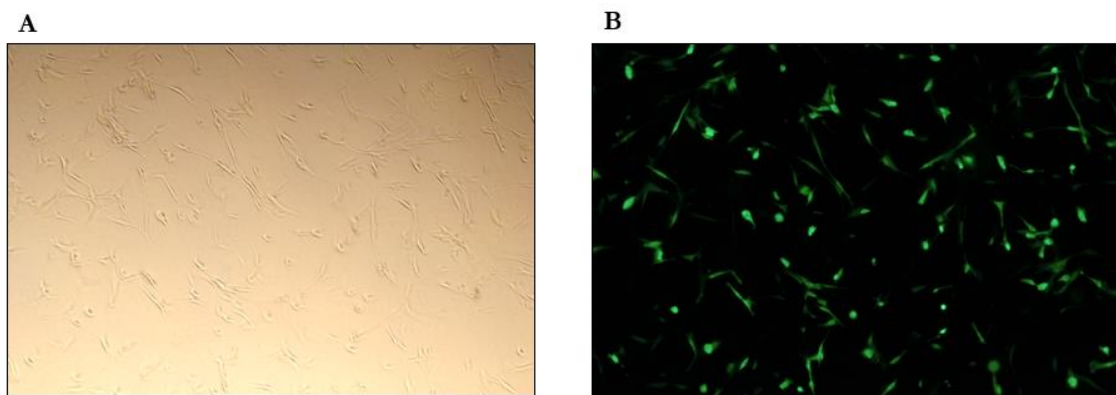


Abbildung 7: Lichtmikroskopische Ansicht der transfizierten CPC241hT nach 48 h. A: Die transfizierten CPC241hT in der lichtmikroskopischen Darstellung. B: Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis von GFP belegt eine erfolgreiche Transfektion. Vergrößerungsfaktor: 40.

Die abschließende Auswertung der Effektivität der siRNAs auf mRNA-Ebene erfolgte nach Aufbereitung der Proben in der RT-qPCR. Zur Verhinderung etwaiger Pipettierfehler wurde jeder PCR-Ansatz neunfach pipettiert und amplifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt. Ein Knockdown war mit allen vier siRNAs nach 48 h auf Ebene der mRNA nachweisbar. Die siRNA Hs_FKBP5_12 zeigte die höchste Effizienz. Sie wurde im nächsten Versuch weiterverwendet.

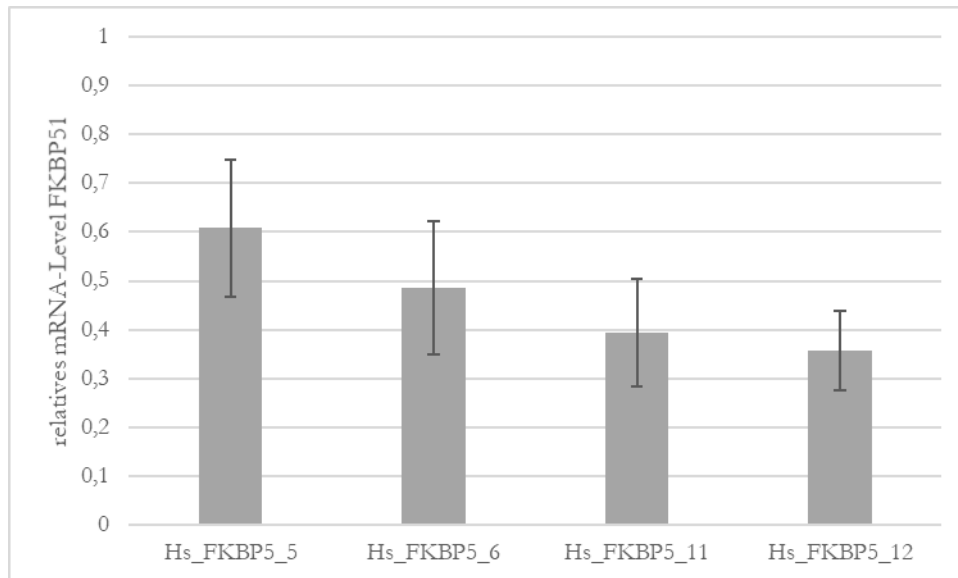


Abbildung 8: Auswirkungen der RNA-Interferenz auf den *FKBP5*-mRNA-Level in CPC241hT nach 48 h. Der Mittelwert der relativen Expression der amplifizierten PCR-Ansätze ist als Balkendiagramm dargestellt (n=9). Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichungen.

Zum Nachweis eines Knockdowns auf Proteinebene wurden CPC241hT derselben Passage in drei unabhängigen Experimenten mit der siRNA HS_FKBP5_12 transfiziert, nach 96 h geerntet und mittels Western-Blot analysiert. Die Verdünnung des Antikörpers FKBP51 (D-4) betrug 1:700. Die Belichtungszeit des Röntgenfilmes 30 s. Als Chemilumineszenzsubstrat wurde Westernbright Sirius verwendet. α -Tubulin diente mit einer Verdünnung von 1:5000 sowie einer Belichtungszeit von 15 s als Ladungskontrolle. Westernbright ECL diente als Substrat. Es zeigte sich ein verminderter Level des FKBP51-Proteins von $0,86^+/-0,26$. Der Effekt ist statistisch nicht-signifikant ($p=0,60$). Die Ergebnisse des Western-Blots sind in Abbildung 9 dargestellt.

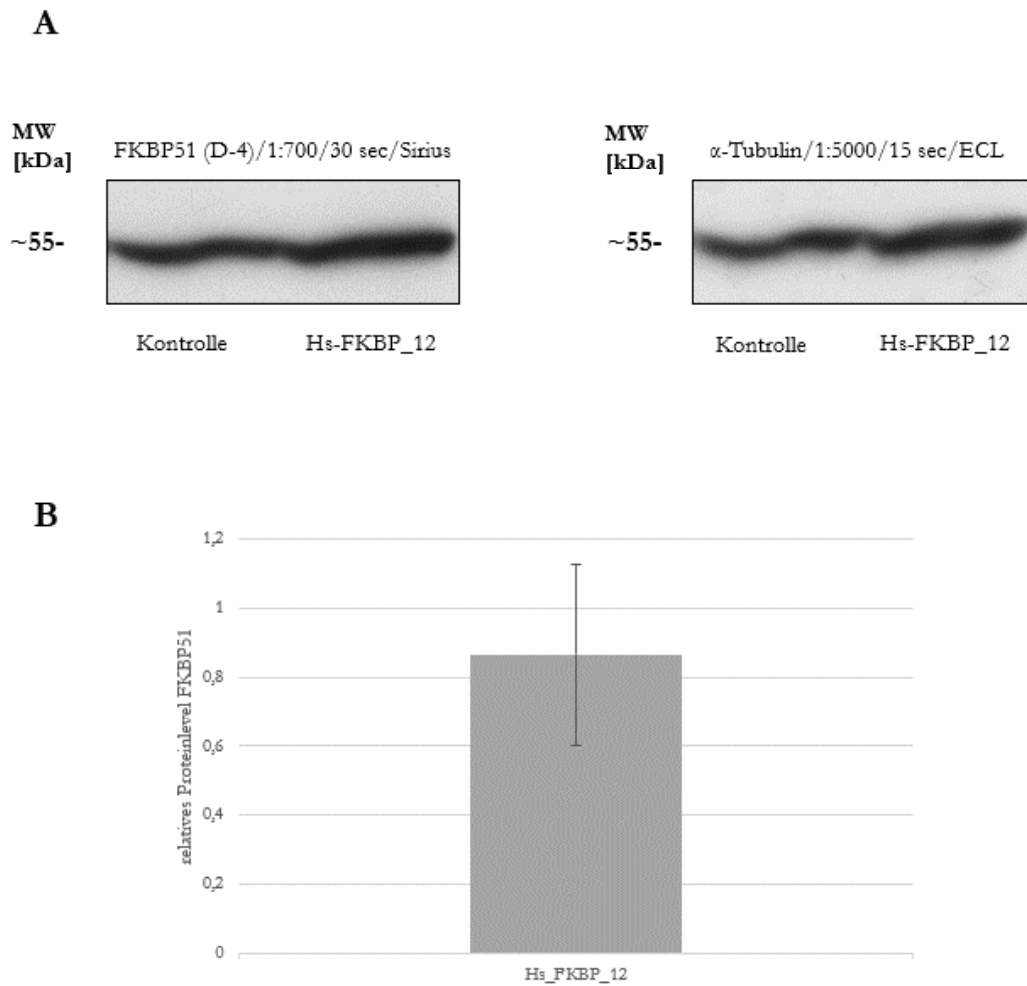


Abbildung 9: Auswirkungen der RNA-Interferenz auf den FKBP51-Proteinlevel in CPC241hT nach 96 h. A zeigt die Schwärzung des Röntgenfilmes der Kontrolle und mit Hs_FKBP_12 transfizierten Zellen, jeweils für FKBP51 und α -Tubulin als Ladungskontrolle. Das ungefähre Molekulargewicht wurde mit einer Proteinleiter geschätzt. B zeigt den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente als Balkendiagramm ($n=3$). Der Fehlerindikator zeigt die Standardabweichung. Das Ergebnis ist statistisch nicht signifikant ($p=0,60$).

4 Diskussion

4.1 Nachweises der Expression von FKBP5 in CPCs

Ein Teil der Aufgabenstellung dieser Arbeit war es, die Expression von *FKBP5* in CPCs nachzuweisen, da durch die Entwicklung neuer hochselektiver Inhibitoren des dazugehörigen Genproduktes FKBP51, dieses eine neue potenzielle pharmakologische Wirkstruktur darstellt, und so eine *in-vivo*-Beeinflussung der CPCs zur Steigerung ihres regenerativen Potentials möglich erscheint.

Erstmalig konnte im Rahmen der durchgeführten Versuche *FKBP5* auf mRNA- und Proteinebene in CPCs nachgewiesen werden.

Im Western-Blot zeigten sich auf dem Röntgenfilm mehrere Banden. Ein kräftiges Signal zeigte sich auf ungefähre Höhe des Proteinmarkers von 55 kDa und ein weniger intensives Signal mit niedrigerem Molekulargewicht. Dies entspricht den Ergebnissen von D'Arrigo et al. (2019), deren Western-Blot-Ergebnisse ein ähnliches Bandenmuster bei Untersuchungen über die Funktion von FKBP51 in humanen Glioblastomzellen zeigten. Jedoch erfolgte der Proteinnachweis mit dem polyklonalen Antikörper eines anderen Herstellers. Posttranslationale Modifikationen, das Vorhandensein mehrerer Isoformen und Degradationsprodukte, welche alle zu einer veränderten Laufgeschwindigkeit in der SDS-PAGE führen können, sind eine potenzielle Erklärung für das Auftreten multipler Banden auf dem Röntgenfilm (Bass et al. 2017). Das *FKBP5*-Gen verfügt laut UniProt-Datenbank über vier verschiedene Transkripte sowie zwei durch Phosphorylierung modifizierbare Serinreste (Position 13 und 445) und einen durch Acetylierung modifizierbaren Methioninrest in Position 1 (The UniProt Consortium 2019), was einen möglichen Erklärungsansatz für das beobachtete Bandenmuster darstellt.

In einer groß angelegten durchgeführten Untersuchung zum Verständnis des menschlichen Proteoms mittels Expressionsuntersuchungen von 32 Gewebetypen und 65 Zelllinien auf mRNA- und Proteinebene zeigte *FKBP5* eine starke Expression auf zellulärer Ebene in *differentiated immortalized adipose-derived mesenchymal stem cells*, einer aus dem Fettgewebe stammenden Zellpopulation mit Stammzelleigenschaften, und auf histologischer Ebene in der quergestreiften Skelettmuskulatur. Ein Nachweis von FKBP51 im hyalinen Gelenkknorpel und in Chondrozyten ist im Rahmen der Untersuchungen nicht erfolgt (Uhlén et al. 2015; Thul et al. 2017). Eine Literaturrecherche über die Metadatenbank PubMed mit den Suchkombinationen „FKBP51, chondrocyte“ und „FKBP51, cartilage“ erbrachte keine Treffer, so dass mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen ist, dass im Rahmen dieser Arbeit der erstmalige Nachweis von FKBP51 in Zellen des hyalinen Gelenkknorpels erfolgt ist.

4.2 Anwendung des CRISPR-Cas9-Systems mit einer *FKBP5* spezifischen gRNA in CPCs

Um das Wissen über die intrazellulären Vorgänge in den CPCs im Rahmen der OA zu vertiefen und erweitern sowie herauszufinden, welche Rolle das Protein FKBP51 bei der Pathogenese spielt und ob es einen therapeutischen Ansatzpunkt bildet, wurde versucht unter Zuhilfenahme des CRISPR-Cas9-Systems einen *FKBP5*-Knockout zu etablieren. Nach Anwendung und Verifizierung der einzelnen experimentellen Schritte konnte das Protein durch eine spezifische Antigen-Antikörperreaktion in allen klonal expandierten Zelllinien nachgewiesen werden. Hierfür bieten sich mehrere Erklärungsansätze, zum einen Interpretationen, die auf den funktionellen Eigenschaften von FKBP51 beruhen, zum anderen spielen methodische Überlegungen eine Rolle.

Im Rahmen der Transfektion durch Nukleofektion und der anschließenden FACS-vermittelten klonalen Isolation waren die CPCs elektrischen und mechanischen Umweltbedingungen ausgeliefert, die mit Zellstress, einer inflammatorischen Antwort und der Freisetzung proapoptotischer Signalmoleküle assoziiert sind. Mellott et al. (2014) wiesen in FACS-Analysen durch Nukleofektion behandelte *human umbilical cord mesenchymal stromal cells* eine verminderte Zellviabilität und reduzierte Expression des in die Zellen transfizierten, für GFP codierenden Plasmides nach, welche durch die Vorbehandlung mit einem Inhibitor der *Rho-associated coiled-coil kinase* im Kulturmedium partiell antagonisiert werden konnte. Ähnliche Beobachtungen konnten auch in den transfizierten CPCs gemacht werden, die sich im FACS nur zu 3,2 % GFP-positiv zeigten, was zum einen durch eine verminderte Genexpression, aber auch durch eine geringe Effizienz der Transfektion zu erklären ist. Binek et al. (2019) wiesen in massenspektroskopischen Untersuchungen FACS-sortierter, muriner Makrophagen, mit der Zielsetzung, die Einflüsse auf das Metabolom zu untersuchen, eine verringerte Expression antioxidativer Moleküle und einen verringerten Gehalt an Adenosintriphosphat und Adenosindiphosphat, den zellulären Energieträgern, nach. Zudem kam es zur intrazellulären Akkumulation von Ceramiden und Phytosphingosin. Diese beiden Botenstoffe sind Mediatoren der Apoptose (Tomiuk et al. 1998; Park et al. 2003).

Mehrere experimentelle Studien liefern Hinweise darauf, dass FKBP51 über antiapoptotische Eigenschaften verfügt. Daudt und Yorio (2011) zeigten in neuronalen 661w-Zellen eine Hemmung der durch Stauroporin induzierten Apoptose. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Romano et al. (2010). In mit *FKBP5*-spezifischer siRNA behandelten Melanomzellen zeigte sich nach Bestrahlung ein vermehrter Nachweis der als Marker der Apoptose geltenden geschnittenen Caspase-3 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Sun et al. (2014) identifizierten FKBP51 als wichtigen Resistenzfaktor gegenüber dem Chemotherapeutikum Taxol in den aus einem Ovarialkarzinom gewonnenen Zellen. Der relative mRNA-Level zeigte sich in chemoresistenten Zellen im Vergleich zu Taxol-sensiblen Zellen um den Faktor 100 erhöht. Zudem konnte durch die Transfektion der Zellen mit einer

FKBP5-spezifischen *short hairpin-RNA* (shRNA) auf eine Reduktion der Taxol-induzierten Apoptose mittels der verminderten Expression der geschnittenen Caspase-3 geschlossen werden. Diese Ergebnisse legen die Annahme nahe, dass *FKBP51* ein Überlebensfaktor in verschiedenen Zellarten sein kann, der durch seine antiapoptotische Wirkung Schutz vor „zellfeindlichen“ Umweltbedingungen bietet. Um herauszufinden, ob *FKBP51* einen antiapoptotischen Effekt in CPCs besitzt, müssen weiterführende Experimente durchgeführt werden. Hierzu kämen Apoptose-Assays in Betracht, bei denen Marker der Apoptose, beispielsweise Annexin V, mittels FACS analysiert werden.

Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für die vorliegenden Ergebnisse ist, dass es im Rahmen der experimentellen Behandlung der CPCs durch Elektroporation und FACS zu vermehrten „Zellstress“ gekommen ist, der möglicherweise auf Grund der durch den Knockout bedingten fehlenden antiapoptotischen Eigenschaften des *FKBP51*, in der Apoptose der klonal-isolierten Zellen mündete, die einen erfolgreichen Knockout aufwiesen. Dies liefert einen Hinweis darauf, dass *FKBP51* eine Rolle für die Zellviabilität der CPCs in kontextabhängigen Situationen besitzen könnte. Dies entspricht dem durch Hart et al. (2014) sowie Hart et al. (2015) beschriebenen Daisy-Model der Gen-Essentialität, bei dem die von Kontext- und Umweltbedingungen abhängigen Gene mit den Blütenblättern einer Blume verglichen werden, welche sich zum Teil überlappen, aber einen festen Kern besitzen, der die für das zelluläre Überleben notwendigen Gene einer Zelle repräsentiert. Hierzu zählen vor allem Gene, die für Proteine codieren, welche für den intrazellulären Stoffwechsel und grundlegende biochemische Reaktionen, wie z. B. die Transkription und Translation, katalysieren. Insgesamt konnte die Arbeitsgruppe 1580 dieser *core fitness genes* in fünf verschiedenen Zelllinien identifizieren. Methodisch verwendete man einen ausgedehnten Screen durch Transfektion der Zellen mit einer gRNA-Bibliothek, bestehend aus 176.500 Sequenzen, die 17.661 Gene adressierten. Durch die Kalkulation von aus Sequenzierungen und Zellviabilitäts-Analysen gewonnenen Daten, wurden die entsprechenden Gene ermittelt. *FKBP5* konnte hierbei in den fünf Zelllinien nicht als *core fitness gene* identifiziert werden. Jedoch unterscheiden sich die ermittelten Messwerte zwischen den Zelllinien teilweise stark untereinander, so dass eine Funktion als kontextabhängiges Zellviabilitäts-Gen in CPCs insbesondere unter Beachtung der gemachten Beobachtungen nicht ausgeschlossen ist. Zur weiteren Untersuchung der Funktion von *FKBP5* als Zellviabilitäts-Gen in CPCs sollten ähnliche Viabilitätsassays durchgeführt werden.

Um eine adäquate Interpretation der Ergebnisse zu gewährleisten, dürfen auch methodische Überlegungen nicht außer Acht gelassen werden. Das CRISPR/Cas9-System befindet sich in einer ständigen Entwicklung und durchläuft einen steten Wandel zur Optimierung im Vergleich zu etablierten Methoden zur Erforschung der Gen- und Proteinfunktion, wie zum Beispiel der RNA-Interferenz. Insbesondere Untersuchungen zur Effizienz und Funktionsweise der verwendeten gRNAs sind Gegenstand aktueller Forschungen (Zhang et al. 2016; Campenhout et al. 2019). Thyme et al. (2016) konnten zeigen, dass gRNAs deren Sekundärstrukturen *hairpin*-Motive aufweisen über eine niedrigere Effizienz verfügen. In

Untersuchungen bezüglich der optimalen Sequenz der gRNA konnte eine zehnfache Abnahme der Effizienz bei TT- und GCC-Motiven, welche sich innerhalb der ersten vier Basenpaare in 5'-Richtung der PAM-Sequenz befinden, nachgewiesen werden (Graf et al. 2019). Zudem sollten sich hier keine Pyrimidine befinden (Wang et al. 2014). Für die im Rahmen des Versuches verwendete gRNA wurden diese beiden Vorgaben eingehalten. Ein weiterer Faktor ist der relative Gehalt der beiden Basen G und C. Dieser sollte zwischen 35 und 85 % liegen (Wang et al. 2014). Die verwendete gRNA liegt mit einem GC Gehalt von 50 % innerhalb dieses Bereiches.

Canver et al. (2014) führten Untersuchungen zur Effizienz des *genome editing* in hämatopoetischen Stammzellen durch. Hierbei verwendeten sie ein für zwei gRNA codierendes chimaeres Plasmid mit dem Ziel, größere Deletionen in den Allelen hämatopoetischer Stammzellen zu induzieren. Durch PCR-Untersuchungen und Sanger-Sequenzierungen zeigte sich eine größere gemessene Anzahl an Deletionen als erwartet. Insgesamt wurden 556 Allele in 228 Klonen untersucht. Größere Deletionen zeigten sich in 26,8 % und Inversionen in 12,9 % der untersuchten Allele. Untersuchung zur Häufigkeit des Auftretens von Indels erfolgte in den Zellen mit nachgewiesener monoallelischer Deletion. Hier zeigten sich Indels in 99 % der korrespondierenden Allele. Die Länge der beobachteten Indels betrug durchschnittlich zwischen -10 und -1 Basenpaaren. Die Effizienzen der verschiedenen getesteten gRNAs unterschieden sich nur unwesentlich voneinander. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die Anzahl der beobachteten Indels zwar hoch ist, jedoch ein System mit zwei gRNAs zur Deletion größerer Genabschnitte zu bevorzugen ist, da nur etwa zwei Drittel der Indels eine Frameshift-Mutation bewirken. Als limitierend für die berichteten Ergebnisse zu bewerten ist, dass eine phänotypische Untersuchung der behandelten Zellen durch Western-Blot nicht erfolgt ist, so dass keine Aussagen über die Expression auf Proteinebene getroffen werden können. Zudem steigt die Anzahl potenzieller Off-Target-Effekte mit der Anzahl der verwendeten gRNAs. Diese könnten durch Editierung Protein-codierender Abschnitte zu einer möglichen Bias der phänotypischen Beobachtungen führen (Fu et al. 2013), so dass es bei der Untersuchung der Proteinfunktion sinnvoll erscheint, eine singuläre gRNA zu verwenden. Potenziell käme ein Versagen der verwendeten gRNA als Erklärungsansatz für den gescheiterten Knockout von *FKBP5* in CPCs in Betracht. Diese Vermutung ließe sich durch ergänzende Versuche, beispielsweise den fehlenden Nachweis von Mutationen in *FKBP5* in der Sequenzierung der transfizierten Zellen, beweisen.

Zusammengefasst lässt sich auf Grundlage der vorhandenen Daten keine definitive Aussage darüber treffen, ob beim Versagen des verwendeten Knockoutansatzes Zellstress und die mögliche Aktivierung proapoptotischer Signalwege durch das Fehlen von FKBP51 eine Rolle gespielt haben oder eine insuffiziente gRNA-Anwendung vorlag. Um Schlüsse zu ziehen, erscheinen Knockout-Versuche mit mehreren gRNAs sinnvoll, die durch Apoptose- und Viabilitätsassays ergänzt werden sollten.

4.3 *FKBP5*-Knockdown durch RNAi

Durch die Transfektion der CPC mit einer *FKBP5*-spezifischen siRNA wurde versucht, die Expression auf mRNA und Proteinebene herunter zu regulieren, um so durch die Analyse der phänotypischen Auswirkungen Erkenntnisse über die Funktion des Proteins zu erlangen. Hierbei konnte in einem einmalig erfolgten Vorversuch eine Herabregulation auf mRNA-Ebene mit allen vier verwendeten siRNAs nachgewiesen werden. Bei der Analyse der Proteinexpression im nachfolgenden, dreimalig durchgeführten Hauptversuch zeigte sich eine verminderte Expression von FKBP51 mit 86 %. Eine statistische Signifikanz konnte nicht nachgewiesen werden.

Takaoka et al. (2017) konnten einen statistisch-signifikanten *FKBP5*-Knockdown in Osteosarkomzellen durch Transfektion mit siRNA erreichen. Romano et al. (2013) etablierten einen erfolgreichen *FKBP5*-Knockdown in Melanomzellen. Die Ergebnisse zeigten eine relative Expression auf mRNA-Ebene von 10 %. Ein Western-Blot ist von den Autoren durchgeführt wurden, jedoch wurde auf eine densitometrische Auswertung verzichtet. Prinzipiell scheint ein siRNA-basierter FKBP51-Knockdown möglich zu sein. Die erfolgreiche Anwendung der RNA-Interferenz in CPCs durch die Transfektion der Zellen mit siRNA konnte bereits demonstriert werden. Janssen et al. (2019) erreichten durch Transfektion der Zellen mit Biglykan-adressierender siRNA einen im Western-Blot statistisch signifikanten Knockdown. Eine verminderte siRNA-basierte Expression der TFs RUNX2 und SOX9 ist ebenfalls beschrieben worden (Koelling et al. 2009).

Munkácsy et al. (2016) führten Untersuchungen zur allgemeinen Effizienz der RNAi in über 429 unabhängigen Experimenten durch. Hierbei ermittelten sie eine Versagensquote von 18,5 %. Insgesamt 6% der Experimente zeigten einen gegenteiligen Effekt mit einer Überexpression. Interessanterweise unterschieden sich die Effizienzen in verschiedenen Zelllinien stark untereinander. Zudem bestand auch eine Differenz zwischen den Ergebnissen der RT-qPCR und des Western-Blot, mit einer höheren Effizienz im Western-Blot, was auch unserem Ergebnis entspricht.

In diversen Studien wurden Faktoren untersucht, welche die Effizienz der verwendeten siRNAs beeinflussen. Arvey et al. (2010) kamen auf Grund der Beobachtung, dass siRNAs mit vielen *off targets* einen geringeren Knockdown des adressierten Transkriptes aufwiesen, zu der Schlussfolgerung, dass es auf Grund einer höheren *off target*-Aktivität zu einer verminderten Effizienz kommt. Darüber ob ein solcher Effekt in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten eine Relevanz hat, kann auf Grund der Tatsache, dass die Sequenzen der verwendeten siRNAs vom Hersteller nicht veröffentlicht wurden, keine definitive Aussage getroffen werden, jedoch bietet er eine plausible Erklärung für die beobachtete geringe Effizienz des Knockdowns von *FKBP5*.

Eine Korrelation der Effizienz der RNAi mit einem höheren Expressionslevel des Zielgens auf mRNA-Ebene konnte in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden (Hong et al. 2014). Dies steht im Einklang mit der von Hu et al. (2004) gemachten Beobachtung, dass

Transkripte mit einer geringen Expression weniger empfänglich für einen RNAi-vermittelten Knockdown sind. Überträgt man diese Beobachtungen auf die durchgeführten Experimente, ist die Annahme gerechtfertigt, dass die beobachtete geringe Knockdown-Effizienz von *FKBP5* an einer geringen basalen Expression auf mRNA-Ebene liegen könnte. Es existieren noch weitere wichtige Einflussfaktoren. So konnten Larsson et al. (2010) die Beobachtung machen, dass mRNAs mit einer höheren Umsatzrate resistenter gegenüber RNAi sind. Zudem besitzen, ähnlich wie bei dem CRISPR-Cas9-System, strukturelle Faktoren der Zielsequenz einen Einfluss auf die Effizienz (Overhoff et al. 2005).

Als mögliche Konsequenz der vorliegenden Ergebnisse, scheint ein Knockdown mittels shRNA eine erfolgsversprechende Möglichkeit, eine verminderte Genexpression von *FKBP5* zu erreichen. Hierbei wird durch die Transfektion der Zellen mit einem shRNA-codierenden Plasmid eine längere Halbwertszeit im Gegensatz zur der aus Oligonukleotiden bestehenden siRNA erreicht. Alternativ könnte auch eine feste Integration in das Genom durch einen lentiviralen Vektor erreicht werden (Moore et al. 2010). Eine verminderte *FKBP51*-Expression durch shRNA in Melanomzellen konnte durch Romano et al. (2015) in humanen Melanomzellen nachgewiesen werden. Einen ebenfalls erfolgreichen Knockdown konnten Gao et al. (2018) in Zellen des papillären Thyroideakarzinoms erreichen.

4.4 Evaluation des Immunophilins FKBP51 als therapeutisches Ziel in der Therapie der Osteoarthritis

In den letzten Jahren sind vermehrt zellbasierte Ansätze in den Fokus der Medizin gerückt. Durch die Erforschung stammzellbasierter Therapieansätze verspricht man sich, geschädigtes Gewebe zu regenerieren und eine Heilung „von innen heraus“ zu erreichen. Durch ihr chondrogenes Potential sind CPCs Kandidaten für einen solchen regenerativen Therapieansatz (Schminke und Miosge 2014). Neben der Erforschung stammzellbasierter Therapien stellen die DMDs eine zweite wichtige Säule dar. Diese haben das Ziel, den Krankheitsprogress zu verlangsamen und eine Symptomverbesserung zu erreichen (Ghouri und Conaghan 2019). Durch den Nachweis der Expression von *FKBP5* auf mRNA- und Proteinebene in CPCs bieten sich potenzielle neue Möglichkeiten, die stammzellbasierten und pharmakologischen Therapieansätze miteinander zu vereinen. Dieses Versprechen wurde vor allem durch die Entdeckung neuer hochselektiver *FKBP51*-Inhibitoren angetrieben, die „Blaupause“ für die Entwicklung neuer pharmakologischer Substanzen sind (Gaalı et al. 2015). Ziel muss es dabei sein, CPCs im inflammatorischen Milieu der OA so zu manipulieren, dass sie ihr chondrogenes Potential entfalten.

Schminke et al. (2016) konnten bereits in aus Patienten mit einer rheumatoiden Arthritis isolierten CPCs *in vitro* eine pharmakologische Beeinflussung durch den TNF- α -Antikörper Adalimumab nachweisen. Hier zeigte sich unter Stimulation mit Interleukin-17 eine verminderte Expression von IL-6, einem inflammatorischen Marker, und RUNX2, als Zeichen einer vermehrten Chondrogenese im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

In verschiedenen Zelllinien konnte durch die Inhibition oder einen Knockdown von FKBP51 eine verminderte Expression von Zielproteinen des NF- κ B-Signalweges gezeigt werden, welche eine wichtige Rolle für die inflammatorische Komponente der OA spielen könnte (Marcu et al. 2010). In den Untersuchungen von Yu et al. (2017) zeigte sich eine verminderte Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1 β , TNF- α , *brain-derived neurotrophic factor* und *nerve growth factor* in aus Ratten gewonnenen Hinterhornganglionzellen nach Inhibition mit dem FKBP51-Inhibitor SAFit2. Kästle et al. (2018) wiesen durch einen Knockdown von FKBP51 eine verminderte Translokation des Transkriptionsfaktors p50/p65 nach Stimulation mit IL-1 β in bronchialen Epithelzellen nach. Zudem erhöhte sich die Sensitivität für das Kortikosteroid Dexamethason um den Faktor zehn. Injizierbare Steroide bilden einen wichtigen etablierten Behandlungspfeiler der OA, besitzen jedoch eine niedrige Evidenz (da Costa et al. 2016). Hier zeigt sich ein möglicher Ansatzpunkt zur Verbesserung ihrer Therapieeffizienz durch zusätzliche Inhibition von FKBP51.

Durch den Nachweis von FKBP51 scheint eine pharmakologische Inhibition mit dem Ziel einer verminderten NF- κ B-vermittelten Inflammation in CPCs theoretisch möglich zu sein. Als sich limitierend auf den therapeutischen Einsatz auswirkend sind die Hinweise darauf, dass FKBP51 antiapoptotische Eigenschaften besitzt (Romano et al. 2010). Inwieweit dies auf CPCs zutrifft, muss in weiterführenden Untersuchungen gezeigt werden. Jedoch scheinen hier mögliche Einschränkungen zu existieren, da bis zu 20 % apoptotische Chondrozyten im erkranktem Knorpelgewebe beschrieben worden sind (Héraud et al. 2000) und es durch die Inhibition antiapoptotischer Signalwege zu einem vermehrtem Zelltod kommen könnte.

Zudem ist FKBP51 ein Protein, welches Interaktionspartner in verschiedenen Signalwegen besitzt und über vielfältige biologische Funktionen verfügt (Hähle et al. 2019). Dies könnte zu einer Erhöhung der Wahrscheinlichkeit für unerwünschte Wirkungen führen. Etwa sind Interaktionen zwischen FKBP51 und dem Androgenrezeptor, Östrogenrezeptor- α sowie Östrogenrezeptor- β nachgewiesen (Zgajnar et al. 2019). Diese gehören zur Familie der Steroidrezeptoren und werden in CPCs exprimiert, wobei sie jeweils über eine geschlechtsspezifische Wirkung verfügen. Die Anwesenheit von 17 β -Estradiol im Kulturmedium von 3D-Kulturen führte in den CPCs männlicher Patienten zu einer verminderten Kollagen II-Produktion und in den CPCs weiblicher Patienten zu einer erhöhten SOX9-Expression (Koelling und Miosge 2010). Wirkunterschiede zwischen den Geschlechtern bei der Inhibition von FKBP51 scheinen also potenziell vorhanden zu sein. Untersuchungen an Melanomzellen liefern Hinweise darauf, dass FKBP51 ein wichtiger aktivierender Kofaktor des TGF- β -Signalweges ist (Romano et al. 2014). *In vitro*-Experimente konnten zeigen, dass dieser auch eine Funktion bei der Regulation von SOX9 und RUNX2 in CPCs besitzt (Janssen et al. 2019).

Eine weitere mögliche Einschränkung der pharmakologischen Nutzbarkeit besteht auf Grund der von Takaoka et al. (2017) gemachten Beobachtungen zur Zellmotilität in aus einem Osteosarkom gewonnenen Zellen. Durch den siRNA-basierten Knockdown von *FKBP5* kam es zu einer verminderten Zellmotilität im *scratch assay*, wohingegen eine Überexpression eine Erhöhung der Zellmotilität zeigte. Um ihre chondrogene Wirkung entfalten zu können ist es jedoch entscheidend, dass CPCs in die geschädigten Knorpelanteile migrieren. Wagner et al. (2019) konnten zeigen, dass die Chemotaxis von CPCs hierbei durch das HMGB-1 getriggert wird.

Inwieweit eine pharmakologische Beeinflussung von FKBP51 in CPCs möglich erscheint, konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht abschließend geklärt werden, jedoch bildet der in dieser Arbeit erstmalig durchgeführte Nachweis von FKBP51 in CPCs das Fundament für weitere Untersuchungen zur Proteinfunktion. Hierbei müssen zur weiteren Klärung des Potentials von FKBP51 als eines Zielproteins in der OA weitere Untersuchungen das Zusammenspiel der mit FKBP51 assoziierten Signalwege beleuchten. Da die in dieser Arbeit verwendeten methodischen Ansätze nicht zu einem suffizienten Knockout beziehungsweise Knockdown geführt haben, stellt die Inhibition der Zellen mit einem selektiven Inhibitor, beispielsweise SAFit1 oder SAFit2, eine mögliche Alternative dar. Zudem besteht in der Anwendung von shRNA eine sinnvolle Möglichkeit, Erkenntnisse über die Proteinfunktion zu erlangen. Insbesondere sollten die Auswirkungen auf die Transkriptionsfaktoren RUNX2 und SOX9 untersucht werden. Diese Untersuchungen sollten durch Untersuchungen zur Zellviabilität, wie z. B. Zellviabilitäts-Assays, und zur migratorischen Fähigkeit, wie z. B. *scratch assays*, ergänzt werden, um Auswirkungen, die zu einem verminderten regenerativen Potential der CPCs führen, zu erkennen.

5 Zusammenfassung

Die Osteoarthritis (OA) ist eine degenerative Erkrankung, die zu einem progredienten Verlust der Funktionsfähigkeit der Gelenke und insbesondere des hyalinen Gelenkknorpels führt und letztlich in einem Funktionsverlust der betroffenen Gelenke endet. Sie besitzt eine hohe Prävalenz im fortgeschrittenen Lebensalter und bedeutet für die betroffenen Patienten chronische Schmerzen und eine Immobilisation. Die Ätiologie und pathophysiologischen Hintergründe der OA sind noch nicht vollständig geklärt, jedoch spielen inflammatorische Prozesse eine entscheidende Rolle bei der Gelenkdestruktion. Die aktuellen etablierten Therapien bestehen aus symptomatische Therapieansätzen oder einen operativen Ersatz des Gelenkes. Eine kausale Therapie ist aktuell nicht verfügbar. Im Rahmen der Erforschung neuer Therapieansätze versprechen stammzellbasierte Verfahren eine Regeneration des Knorpels mit dem Ziel eines Funktionserhalt. Chondrogene Progenitorzellen (CPCs), die im fibrocartilaginären Ersatzgewebe osteoarthrotisch veränderter Gelenke nachgewiesen wurden und über chondrogenes Potential verfügen, stellen eine mögliche Basis neuer Therapieansätze dar. Ein Ziel ist es, CPCs medikamentös so zu manipulieren, dass ihre chondrogenen Fähigkeiten gesteigert werden.

Das zur Gruppe der Immunophilinen gehörende, durch das *FKBP5*-Gen codierte FKBP51 ist ein Aktivator des die inflammatorischen Prozesse der OA vermittelnden NF- κ B-Signalweges. Durch die Entwicklung neuer selektiver Inhibitoren sind neue pharmakologische Einflussmöglichkeiten entstanden. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, Erkenntnisse über das therapeutische Potential von FKBP51 im Rahmen der OA zu erlangen. Hierzu gelang der erstmalige Nachweis der Expression von FKBP51 in CPCs auf mRNA- und Proteinebene, was eine potenzielle pharmakologische Inhibition möglich erscheinen lässt. Im Rahmen der Anwendung des CRISPR-Cas9-Systemes zur Generierung eines *FKBP5*-Knockouts zeigte sich im Western-Blot ein positiver Proteinnachweis in allen klonalen Zelllinien. In RNA-Interferenzexperimenten mit Transfektion der CPCs mit *FKBP5*-spezifischer *small interfering-RNA* zeigte das Protein eine verringerte Expression im Western-Blot ohne den Nachweis einer statistischen Signifikanz.

In den durchgeführten Untersuchungen konnte durch den erstmaligen Nachweis von FKBP51 in CPCs die Basis für weitere Untersuchungen der Proteinfunktion geschaffen werden. Zukünftige Untersuchungen sollten das Ziel haben, FKBP51 durch einen selektiven Liganden zu inhibieren, um Aussagen über die Auswirkungen auf die chondrogenen Fähigkeiten treffen zu können.

6 Literaturverzeichnis

- Acharya C, Yik JHN, Kishore A, Van Dinh V, Di Cesare PE, Haudenschild DR (2014): Cartilage oligomeric matrix protein and its binding partners in the cartilage extracellular matrix: interaction, regulation and role in chondrogenesis. *Matrix Biol* 37, 102–111
- Akiyama T, Shiraishi T, Qin J, Konno H, Akiyama N, Shinzawa M, Miyauchi M, Takizawa N, Yanai H, Ohashi H et al. (2014): Mitochondria–Nucleus Shuttling FK506-Binding Protein 51 Interacts with TRAF Proteins and Facilitates the RIG-I-Like Receptor-Mediated Expression of Type I IFN. *PLOS ONE* 9, e95992
- Alford JW, Cole BJ (2005): Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. *Am J Sports Med* 33, 295–306
- Arner EC (2002): Aggrecanase-mediated cartilage degradation. *Curr Opin Pharmacol* 2, 322–329
- Arthritis and Osteoporosis Victoria.: A problem worth solving: the rising cost of musculoskeletal conditions in Australia. *Arthritis and Osteoporosis Victoria*, Elsternwick 2013
- Arvey A, Larsson E, Sander C, Leslie CS, Marks DS (2010): Target mRNA abundance dilutes microRNA and siRNA activity. *Mol Syst Biol* 6, 363
- Asanbaeva A, Masuda K, Thonar EJMA, Klisch SM, Sah RL (2008): Regulation of immature cartilage growth by IGF-I, TGF-beta1, BMP-7, and PDGF-AB: role of metabolic balance between fixed charge and collagen network. *Biomech Model Mechanobiol* 7, 263–276
- Avellino R, Romano S, Parasole R, Bisogni R, Lamberti A, Poggi V, Venuta S, Romano MF (2005): Rapamycin stimulates apoptosis of childhood acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 106, 1400–1406
- Bass J, Wilkinson D, Rankin D, Phillips B, Szewczyk N, Smith K, Atherton P (2017): An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports* 27, 4–25
- Benninghoff A (1925): Light microscopic demonstration that articular cartilage has three layers according to the orientation of collagen fibers and distribution of chondrocytes. *Z für Zellforsch Mikrosk Anat* 8, 783–862
- Benninghoff A, Drenckhahn D: *Anatomie*. Band 1; 16. Auflage; Urban & Fischer, München, Jena 2002
- Berenbaum F (2013): Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis Cartilage* 21, 16–21
- Bianco P, Cao X, Frenette PS, Mao JJ, Robey PG, Simmons PJ, Wang CY (2013): The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med* 19, 35–42
- Binek A, Rojo D, Godzien J, Rupérez FJ, Nuñez V, Jorge I, Ricote M, Vázquez J, Barbas C (2019): Flow cytometry has a significant impact on the cellular metabolome. *J Proteome Res* 18, 169–181

- Blagojevic M, Jinks C, Jeffery A, Jordan KP (2010): Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* 18, 24–33
- Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G, Croughton K, Cruciat C, Eberhard D, Gagneur J, Ghidelli S et al. (2004): A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol* 6, 97–105
- Buckwalter JA, Mankin HJ (1998): Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* 47, 477–486
- Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ (2005): Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect* 54, 465–480
- Campenhout CV, Cabochette P, Veillard AC, Laczik M, Zelisko-Schmidt A, Sabatel C, Dhainaut M, Vanhollebeke B, Gueydan C, Krusys V (2019): Guidelines for optimized gene knockout using CRISPR/Cas9. *Biotechniques* 66, 295–302
- Canver MC, Bauer DE, Dass A, Yien YY, Chung J, Masuda T, Maeda T, Paw BH, Orkin SH (2014): Characterization of genomic deletion efficiency mediated by clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 nuclease system in mammalian cells. *J Biol Chem* 289, 21312–21324
- Chen S, Fu P, Wu H, Pei M (2017): Meniscus, articular cartilage, and nucleus pulposus: a comparative review of cartilage-like tissues in anatomy, development, and function. *Cell Tissue Res* 370, 53–70
- Chubinskaya S, Kuettner KE, Cole AA (1999): Expression of matrix metalloproteinases in normal and damaged articular cartilage from human knee and ankle joints. *Lab Invest* 79, 1669–1677
- Crofford LJ (2013): Use of NSAIDs in treating patients with arthritis. *Arthritis Res Ther* 15, 2
- da Costa BR, Hari R, Jüni P (2016): Intra-articular Corticosteroids for Osteoarthritis of the Knee. *JAMA* 316, 2671–2672
- D'Arrigo P, Digregorio M, Romano S, Tufano M, Rea A, Hausch F, Dedobbeleer M, Vigorito V, Russo S, Bauder M, et al. (2019): The splicing FK506-binding protein-51 isoform plays a role in glioblastoma resistance through programmed cell death ligand-1 expression regulation. *Cell Death Discov* 5, 1–12
- Das AK, Cohen PW, Barford D (1998): The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J* 17, 1192–1199
- Daudt DR, Yorio T (2011): FKBP51 protects 661w cell culture from staurosporine-induced apoptosis. *Mol Vis* 17, 1172–1181
- Dean DD, Woessner JF (1984): Extracts of human articular cartilage contain an inhibitor of tissue metalloproteinases. *Biochem J* 218, 277–280
- Dunlop DD, Manheim LM, Song J, Chang RW (2001): Arthritis prevalence and activity limitations in older adults. *Arthritis Rheum* 44, 212–221
- Eggl PS, Herrmann W, Hunziker EB, Schenk RK (1985): Matrix compartments in the growth plate of the proximal tibia of rats. *Anat Rec* 211, 246–257

- Erlejman AG, De Leo SA, Mazaira GI, Molinari AM, Camisay MF, Fontana V, Cox MB, Piwien-Pilipuk G, Galigniana MD (2014): NF- κ B transcriptional activity is modulated by FK506-binding Proteins FKBP51 and FKBP52. *J Biol Chem* 289, 26263–26276
- Fawns HT, Landells JW (1953): Histochemical studies of rheumatic conditions. *Ann Rheum Dis* 12, 105–113
- Feng X, Pomplun S, Hausch F (2015): Recent progress in FKBP ligand development. *Curr Mol Pharmacol* 2, 27–36
- Finsson KW, Chi Y, Bou-Gharios G, Leask A, Philip A (2012): TGF- β signaling in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Front Biosci (Sch Ed)* 4, 251–268
- Fox S, AJ, Bedi A, Rodeo SA (2009): The basic science of articular cartilage. *Sports Health* 1, 461–468
- Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD (2013): High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* 31, 822–826
- Gaali S, Kirschner A, Cuboni S, Hartmann J, Kozany C, Balsevich G, Namendorf C, Fernandez-Vizarra P, Sippel C, Zannas AS, et al. (2015): Selective inhibitors of the FK506-binding protein 51 by induced fit. *Nat Chem Biol* 11, 33–37
- Gandhi NS, Mancera RL (2008): The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des* 72, 455–482
- Gao Y, Elamin E, Zhou R, Yan H, Liu S, Hu S, Dong J, Wei M, Sun L, Zhao Y (2018): FKBP51 promotes migration and invasion of papillary thyroid carcinoma through NF- κ B-dependent epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncol Lett* 16, 7020–7028
- Ghouri A, Conaghan PG (2019): Update on novel pharmacological therapies for osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 11, 1759720X19864492
- Goldring MB (2000): The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 43, 1916–1926
- Goldring MB (2012): Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 4, 269–285
- Goldring MB, Berenbaum F (2015): Emerging Targets in Osteoarthritis Therapy. *Curr Opin Pharmacol* 22, 51–63
- Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K (2006): The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97, 33–44
- Graf R, Li X, Chu VT, Rajewsky K (2019): sgRNA sequence motifs blocking efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing. *Cell Rep* 26, 1098–1103
- Greene GW, Banquy X, Lee DW, Lowrey DD, Yu J, Israelachvili JN (2011): Adaptive mechanically controlled lubrication mechanism found in articular joints. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 5255–5259
- Guerne P, Blanco F, Kaelin A, Desgeorges A, Lotz M (1995): Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes in aging and development. *Arthritis Rheum* 38, 960–968
- Hagiwara H, Schröter-Kermani C, Merker HJ (1993): Localization of collagen type VI in articular cartilage of young and adult mice. *Cell Tissue Res* 272, 155–160

- Hähle A, Merz S, Meyners C, Hausch F (2019): The many faces of FKBP51. *Biomolecules* **9**, 21-9
- Halper J, Kjaer M (2014): Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv Exp Med Biol* **802**, 31–47
- Harding MW, Galat A, Uehling DE, Schreiber SL (1989): A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* **341**, 758–760
- Hart T, Brown KR, Sircoulomb F, Rottapel R, Moffat J (2014): Measuring error rates in genomic perturbation screens: gold standards for human functional genomics. *Mol Syst Biol* **10**, 733
- Hart T, Chandrashekar M, Aregger M, Steinhart Z, Brown KR, MacLeod G, Mis M, Zimmermann M, Fradet-Turcotte A, Sun S et al. (2015): High-resolution CRISPR screens reveal fitness genes and genotype-specific cancer liabilities. *Cell* **163**, 1515–1526
- Hayden MS, Ghosh S (2008): Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**, 344–362
- Heinegård D, Saxne T (2011): The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **7**, 50–56
- Héraud F, Héraud A, Harmand MF (2000): Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Ann Rheum Dis* **59**, 959–965
- Hermansson M, Sawaji Y, Bolton M, Alexander S, Wallace A, Begum S, Wait R, Saklatvala J (2004): Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin betaA (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes. *J Biol Chem* **279**, 43514–43521
- Hong SW, Jiang Y, Kim S, Li CJ, Lee D (2014): Target gene abundance contributes to the efficiency of siRNA-mediated gene silencing. *Nucleic Acid Ther* **24**, 192–198
- Houard X, Goldring MB, Berenbaum F (2013): Homeostatic mechanisms in articular cartilage and role of inflammation in osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* **15**, 375
- Hu X, Hipolito S, Lynn R, Abraham V, Ramos S, Wong-Staal F (2004): Relative gene-silencing efficiencies of small interfering RNAs targeting sense and antisense transcripts from the same genetic locus. *Nucleic Acids Res* **32**, 4609–4617
- Hunter DJ, Schofield D, Callander E (2014): The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **10**, 437–441
- Imhof H, Sulzbacher I, Grampp S, Czerny C, Youssefzadeh S, Kainberger F (2000): Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. *Invest Radiol* **35**, 581–588
- Iozzo RV, Schaefer L (2015): Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol* **42**, 11–55
- Janssen JN, Batschkus S, Schimmel S, Bode C, Schminke B, Miosge N (2019): The influence of TGF-β3, EGF, and BGN on SOX9 and RUNX2 expression in human chondrogenic progenitor cells. *J Histochem Cytochem* **67**, 117–127
- Jiang W, Cazacu S, Xiang C, Zenklusen JC, Fine HA, Berens M, Armstrong B, Brodie C, Mikkelsen T (2008): FK506 binding protein mediates glioma cell growth and sensitivity to rapamycin treatment by regulating NF-kappaB signaling pathway. *Neoplasia* **10**, 235–243
- Junqueira LCU, Carneiro J, O.Kelley R: *Histologie*. 5. Auflage; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 2002

- Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier J-P, Fahmi H (2011): Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 7, 33–42
- Kästle M, Kistler B, Lamla T, Bretschneider T, Lamb D, Nicklin P, Wyatt D (2018): FKBP51 modulates steroid sensitivity and NF κ B signalling: A novel anti-inflammatory drug target. *Eur J Immunol* 48, 1904–1914
- Keiser H (1975): Immunological studies of bovine nasal cartilage proteoglycan „link proteins“. *Biochemistry* 14, 5304–5307
- Koelling S, Miosge N (2010): Sex differences of chondrogenic progenitor cells in late stages of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 62, 1077–1087
- Koelling S, Kruegel J, Irmer M, Path JR, Sadowski B, Miro X, Miosge N (2009): Migratory chondrogenic progenitor cells from Repair Tissue during the later stages of human osteoarthritis. *Cell Stem Cell* 4, 324–335
- Kotlarz H, Gunnarsson CL, Fang H, Rizzo JA (2009): Insurer and out-of-pocket costs of osteoarthritis in the US: Evidence from national survey data. *Arthritis Rheum* 60, 3546–3553
- Kraan PM van der, Berg WB van den (2012): Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthritis Cartilage* 20, 223–232
- Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Karsdal MA, Lohmander LS (2015): Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthritis Cartilage* 23, 1233–1241
- Kuettner KE (1992): Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem* 25, 155–163
- Kühn K (1974): Struktur und Biochemie des Kollagens. *Chem Unserer Zeit* 8, 97–103
- Lafont JE (2010): Lack of oxygen in articular cartilage: consequences for chondrocyte biology. *Int J Exp Pathol* 91, 99–106
- Lane NE, Brandt K, Hawker G, Peeva E, Schreyer E, Tsuji W, Hochberg MC (2011): OARSI-FDA initiative: defining the disease state of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 19, 478–482
- Lang K, Schmid FX, Fischer G (1987): Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature* 329, 268–270
- Larsson E, Sander C, Marks D (2010): mRNA turnover rate limits siRNA and microRNA efficacy. *Mol Syst Biol* 6, 433
- Levick JR (1995): Microvascular architecture and exchange in synovial joints. *Microcirculation* 2, 217–233
- Liu-Bryan R (2015): Inflammation and intracellular metabolism: new targets in OA. *Osteoarthritis Cartilage* 23, 1835–1842
- Loeser RF (2014): Integrins and chondrocyte–matrix interactions in articular cartilage. *Matrix Biol* 39, 11–16
- Loughlin J (2005): Polymorphism in signal transduction is a major route through which osteoarthritis susceptibility is acting. *Curr Opin Rheumatol* 17, 629–633
- Mankin HJ, Lippiello L (1969): The turnover of adult rabbit articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 51, 1591–1600

- Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A (1971): Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* 53, 523–537
- Marcu KB, Otero M, Olivotto E, Borzi RM, Goldring MB (2010): NF-kappaB signaling: multiple angles to target OA. *Curr Drug Targets* 11, 599–613
- Martin JA, Brown TD, Heiner AD, Buckwalter JA (2004): Chondrocyte senescence, joint loading and osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* 427,96-103
- McAlindon TE, Bannuru RR, Sullivan MC, Arden NK, Berenbaum F, Bierma-Zeinstra SM, Hawker GA, Henrotin Y, Hunter DJ, Kawaguchi H, et al. (2014): OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 22, 363–388
- Mellott AJ, Godsey ME, Shinogle HE, Moore DS, Forrest ML, Detamore MS (2014): Improving viability and transfection efficiency with human umbilical cord wharton’s jelly cells through use of a ROCK inhibitor. *Cell Reprogram* 16, 91–97
- 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
- Mollenhauer J, Bee JA, Lizarbe MA, von der Mark K (1984): Role of anchorin CII, a 31,000-mol-wt membrane protein, in the interaction of chondrocytes with type II collagen. *J Cell Biol* 98, 1572–1579
- Moore CB, Guthrie EH, Huang MT-H, Taxman DJ (2010): Short hairpin RNA (shRNA): Design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods Mol Biol* 629, 141–158
- Morris NP, Keene DR, Horton WA: Morphology and chemical composition of connective tissue: cartilage. In: Royce PM, Steinmann B (Hrsg.): *Connective tissue and its heritable disorders*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA 2002, 41–65
- Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ (1997): Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 88, 287–298
- Mow VC, Guo XE (2002): Mechano-electrochemical properties of articular cartilage: their inhomogeneities and anisotropies. *Annu Rev Biomed Eng* 4, 175–209
- Mow VC, Ratcliffe A, Poole AR (1992): Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials* 13, 67–97
- Muhammad H, Schminke B, Miosge N (2013): Current concepts in stem cell therapy for articular cartilage repair. *Expert Opin Biol Ther* 13, 541–548
- Müller-Esterl W: *Biochemie - Eine Einführung für Mediziner*. 2. Auflage; Spektrum, Heidelberg 2011
- Munkácsy G, Sztupinszki Z, Herman P, Bán B, Pényváltó Z, Szarvas N, Gyórfy B (2016): Validation of RNAi silencing efficiency using gene array data shows 18.5% failure rate across 429 Independent Experiments. *Mol Ther Nucleic Acids* 5, e366
- Musumeci G, Szychlinska MA, Mobasher A (2015): Age-related degeneration of articular cartilage in the pathogenesis of osteoarthritis: molecular markers of senescent chondrocytes. *Histol Histopathol* 30, 1–12
- Nurminskaya M, Linsenmayer TF (1996): Identification and characterization of up-regulated genes during chondrocyte hypertrophy. *Dev Dyn* 206, 260–271

- Olivotto E, Otero M, Marcu KB, Goldring MB (2015): Pathophysiology of osteoarthritis: canonical NF- κ B/IKK β -dependent and kinase-independent effects of IKK α in cartilage degradation and chondrocyte differentiation. *RMD Open* 1, e000061
- Overhoff M, Alken M, Far RK-K, Lemaitre M, Lebleu B, Sczakiel G, Robbins I (2005): Local RNA target structure influences siRNA efficacy: a systematic global analysis. *J Mol Biol* 348, 871–881
- Park M-T, Kang JA, Choi J-A, Kang C-M, Kim T-H, Bae S, Kang S, Kim S, Choi W-I, Cho C-K et al. (2003): Phytosphingosine induces apoptotic cell death via caspase 8 activation and Bax translocation in human cancer cells. *Clin Cancer Res* 9, 878–885
- Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45
- Piccinini AM, Midwood KS (2010): DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm* 2010
- Poole AR, Pidoux I, Reiner A, Tang LH, Choi H, Rosenberg L (1980): Localization of proteoglycan monomer and link protein in the matrix of bovine articular cartilage: An immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem* 28, 621–635
- Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Laverty S (2001): Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop* 391, 26-33
- Radin EL, Martin RB, Burr DB, Caterson B, Boyd RD, Goodwin C (1984): Effects of mechanical loading on the tissues of the rabbit knee. *J Orthop Res* 2, 221–234
- Rein T (2016): FK506 binding protein 51 integrates pathways of adaptation: FKBP51 shapes the reactivity to environmental change. *Bioessays* 38, 894–902
- Reynard LN (2016): Analysis of genetics and DNA methylation in osteoarthritis: What have we learnt about the disease? *Semin Cell Dev Biol* 62, 57-66
- Rolauffs B, Williams JM, Aurich M, Grodzinsky AJ, Kuettner KE, Cole AA (2010): Proliferative remodeling of the spatial organization of human superficial chondrocytes distant to focal early osteoarthritis (OA). *Arthritis Rheum* 62, 489–498
- Roman-Blas JA, Jimenez SA (2006): NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 839–848
- Romano MF, Avellino R, Petrella A, Bisogni R, Romano S, Venuta S (2004): Rapamycin inhibits doxorubicin-induced NF-kappaB/Rel nuclear activity and enhances the apoptosis of melanoma cells. *Eur J Cancer* 40, 2829–2836
- Romano S, D'Angelillo A, Pacelli R, Staibano S, De Luna E, Bisogni R, Eskelinen E-L, Mascolo M, Cali G, Arra C, Romano MF (2010): Role of FK506-binding protein 51 in the control of apoptosis of irradiated melanoma cells. *Cell Death Differ* 17, 145–157
- Romano S, Staibano S, Greco A, Brunetti A, Nappo G, Ilardi G, Martinelli R, Sorrentino A, Di Pace A, Mascolo M, et al. (2013): FK506 binding protein 51 positively regulates melanoma stemness and metastatic potential. *Cell Death Dis* 4, e578
- Romano S, D'Angelillo A, D'Arrigo P, Staibano S, Greco A, Brunetti A, Scalvenzi M, Bisogni R, Scala I, Romano MF (2014): FKBP51 increases the tumour-promoter potential of TGF-beta. *Clin Transl Med* 3, 1

- Romano S, Xiao Y, Nakaya M, D'Angelillo A, Chang M, Jin J, Hausch F, Masullo M, Feng X, Romano MF, Sun S-C (2015): FKBP51 employs both scaffold and isomerase functions to promote NF- κ B activation in melanoma. *Nucleic Acids Res* 43, 6983–6993
- Rose BJ, Kooyman DL (2016): A Tale of Two Joints: The Role of Matrix Metalloproteases in Cartilage Biology. *Dis Markers* 2016, e4895050
- Sanchez ER (2012): Chaperoning steroidal physiology: Lessons from mouse genetic models of Hsp90 and its cochaperones. *Mol Cell Res* 1823, 722–729
- Sandell LJ, Aigner T (2001): Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 3, 107–113
- Sandell LJ, Xing X, Franz C, Davies S, Chang L-W, Patra D (2008): Exuberant expression of chemokine genes by adult human articular chondrocytes in response to IL-1 β . *Osteoarthritis Cartilage* 16, 1560–1571
- Scanzello CR, Goldring SR (2012): The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone* 51, 249–257
- Schminke B, Miosge N (2014): Cartilage repair in vivo: the role of migratory progenitor cells. *Curr Rheumatol Rep* 16, 461
- Schminke B, Trautmann S, Mai B, Miosge N, Blaschke S (2016): Interleukin 17 inhibits progenitor cells in rheumatoid arthritis cartilage. *Eur J Immunol* 46, 440–445
- Schumacher BL, Block JA, Schmid TM, Aydelotte MB, Kuettner KE (1994): A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage. *Arch Biochem Biophys* 311, 144–152
- Siekierka JJ, Hung SH, Poe M, Lin CS, Sigal NH (1989): A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature* 341, 755–757
- Sinars CR, Cheung-Flynn J, Rimerman RA, Scammell JG, Smith DF, Clardy J (2003): Structure of the large FK506-binding protein FKBP51, an Hsp90-binding protein and a component of steroid receptor complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 868–873
- Smith DF, Faber LE, Toft DO (1990): Purification of unactivated progesterone receptor and identification of novel receptor-associated proteins. *J Biol Chem* 265, 3996–4003
- Solomon LA, Bérubé NG, Beier F (2008): Transcriptional regulators of chondrocyte hypertrophy. *Birth Defects Res C Embryo Today* 84, 123–130
- Storer CL, Dickey CA, Galigniana MD, Rein T, Cox MB (2011): FKBP51 and FKBP52 in signaling and disease. *Trends Endocrinol Metab* 22, 481–490
- Strawich E, Nimni ME (1971): Properties of a collagen molecule containing three identical components extracted from bovine articular cartilage. *Biochemistry* 10, 3905–3911
- Sulzbacher I (2012): Osteoarthritis: histology and pathogenesis. *Wien Med Wochenschr* 163, 212–219
- Sun N-K, Huang S-L, Chang P-Y, Lu H-P, Chao CC-K (2014): Transcriptomic profiling of taxol-resistant ovarian cancer cells identifies FKBP5 and the androgen receptor as critical markers of chemotherapeutic response. *Oncotarget* 5, 11939–11956

- Szirmai JA: The concept of the chondron as a biomechanical unit. In: Hartmann PD med F (Hrsg.): Biopolymere und Biomechanik von Bindegewebsystemen. Springer Berlin Heidelberg 1974, 87–91
- Takaoka M, Ito S, Miki Y, Nakanishi A (2017): FKBP51 regulates cell motility and invasion via RhoA signaling. *Cancer Sci* 108, 380–389
- 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
- The UniProt Consortium (2019): UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res* 47, 506–515
- Thielen NGM, van der Kraan PM, van Caam APM (2019): TGF β /BMP Signaling Pathway in Cartilage Homeostasis. *Cells* 8, 969
- Thul PJ, Åkesson L, Wiking M, Mahdessian D, Geladaki A, Ait Blal H, Alm T, Asplund A, Björk L, Breckels LM et al. (2017): A subcellular map of the human proteome. *Science* 356, 3321
- Thyme SB, Akhmetova L, Montague TG, Valen E, Schier AF (2016): Internal guide RNA interactions interfere with Cas9-mediated cleavage. *Nat Commun* 7, 11750
- Tomiuk S, Hofmann K, Nix M, Zumbansen M, Stoffel W (1998): Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling? *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3638–3643
- Tonge DP, Pearson MJ, Jones SW (2014): The hallmarks of osteoarthritis and the potential to develop personalised disease-modifying pharmacological therapeutics. *Osteoarthritis Cartilage* 22, 609–621
- Torzilli PA, Grigiene R, Borrelli J, Helfet DL (1999): Effect of impact load on articular cartilage: cell metabolism and viability, and matrix water content. *J Biomech Eng* 121, 433–441
- Troeberg L, Nagase H (2012): Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta* 1824, 133–145
- Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A, et al. (2015): Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347, 1260419
- Valdes AM, Loughlin J, Oene MV, Chapman K, Surdulescu GL, Doherty M, Spector TD (2007): Sex and ethnic differences in the association of ASPN, CALM1, COL2A1, COMP, and FRZB with genetic susceptibility to osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 56, 137–146
- Wagner G, Lehmann C, Bode C, Miosge N, Schubert A (2019): High mobility group box 1 protein in osteoarthritic knee tissue and chondrogenic progenitor cells: An ex vivo and in vitro study. *Cartilage* e1947603519835897
- Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES (2014): Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* 343, 80–84
- Wiederrecht G, Hung S, Chan HK, Marcy A, Martin M, Calaycay J, Boulton D, Sigal N, Kincaid RL, Siekierka JJ (1992): Characterization of high molecular weight FK-506 binding activities reveals a novel FK-506-binding protein as well as a protein complex. *J Biol Chem* 267, 21753–21760

- Wochnik GM, Rüegg J, Abel GA, Schmidt U, Holsboer F, Rein T (2005): FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells. *J Biol Chem* 280, 4609–4616
- Woolf AD, Pfleger B (2003): Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ* 81, 646–656
- Yu H-M, Wang Q, Sun W-B (2017): Silencing of FKBP51 alleviates the mechanical pain threshold, inhibits DRG inflammatory factors and pain mediators through the NF-kappaB signaling pathway. *Gene* 627, 169–175
- Yu X-M, Meng H-Y, Yuan X-L, Wang Y, Guo Q-Y, Peng J, Wang A-Y, Lu S-B (2015): MicroRNAs' involvement in osteoarthritis and the prospects for treatments. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015, 236179
- Zgajnar NR, De Leo SA, Lotufo CM, Erlejman AG, Piwien-Pilipuk G, Galigniana MD (2019): Biological actions of the Hsp90-binding immunophilins FKBP51 and FKBP52. *Biomolecules* 9, 52
- Zhang J-H, Adikaram P, Pandey M, Genis A, Simonds WF (2016): Optimization of genome editing through CRISPR-Cas9 engineering. *Bioengineered* 7, 166–174

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Professor Dr. med. N. Miosge, der mir die Möglichkeit gab, die vorliegende Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen und mich insbesondere bei der Konzeptualisierung und Durchführung der Versuche motiviert und unterstützt hat.

Besonderen Dank und Anerkennung verdient Frau Christa Bode, die mir mit viel Geduld die Grundlagen und Ausführung der experimentellen Methoden beigebracht hat und auf deren Rat man sich bei technischen Fragestellungen immer verlassen konnte.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitgliedern der AG Orale Biologie und Geweberegeneration für die angenehme Arbeitsatmosphäre, gegenseitige Unterstützung und die schöne Zeit im Labor bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei allen weiteren Unterstützern bedanken, die mich immer wieder motiviert haben, mein Vorhaben durchzubringen.