

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

**Nachweis und Lokalisation der regulatorischen Proteine RGS4 und
RGS10 innerhalb osteoarthrotischen Knorpels und chondrogener
Progenitorzellen**

INAUGURAL - DISSERTATION

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

vorgelegt von

Vanessa Kolan

aus

Hildesheim

Göttingen 2018

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Brück

Referent:

Prof. Dr. Nicolai Miosge

Ko-Referentin:

Prof. Dr. Susanne Lutz

Drittreferentin:

Prof. Dr. Margarete Schön

Tag der mündlichen Prüfung:

29.01.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Nachweis und Lokalisation der regulatorischen Proteine RGS4 und RGS10 innerhalb osteoarthrotischen Knorpels und chondrogener Progenitorzellen“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis:

Abbildungsverzeichnis:	IV
Tabellenverzeichnis:	V
Abkürzungsverzeichnis:	VI
1 Einleitung	1
1.1 Aufbau und Funktion des Gelenkknorpels	1
1.1.1 Aufbau des Gelenkknorpels	1
1.1.2 Der Chondrozyt	1
1.1.3 Die extrazelluläre Matrix	2
1.1.4 Die verschiedenen Zonen des Gelenkknorpels	4
1.2 Osteoarthrose	6
1.2.1 Kennzeichen der Osteoarthrose	6
1.2.2 Pathogenese der Osteoarthrose	6
1.2.3 Chondrogene Progenitorzellen und Osteoarthrose	9
1.3 G-Protein-signaling	10
1.3.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren: Aufbau und Funktion	10
1.3.2 G-Proteine: Aufbau und Funktion	11
1.3.3 RGS-Proteine: Aufbau und Funktion	14
1.3.4 Signaltransduktion der G-Proteine und die Termination durch die RGS-Moleküle	14
1.3.5 RGS4	15
1.3.6 RGS10	17
1.3.7 Beeinflussung der Chondrozytendifferenzierung durch RGS4 und RGS10	17
1.4 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Probengewinnung	19
2.2. Zellkultur	20
2.3 Immunhistochemie	21

Inhaltsverzeichnis

2.3.1 Präparation des Gewebes für die Immunhistochemie: Fixierung, Entkalkifizierung, Dehydrierung, Einbettung, Schneiden	21
2.3.2 HE-Färbung von Gewebeschnitten	24
2.3.3 Nachweis der RGS-Proteine mittels Immunhistochemie	24
2.4 Lichtmikroskopische Immunfluoreszenz	28
2.5 Real-time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	31
2.5.1 Vorbereitende Methoden: mRNA-Isolierung aus primären Zellen	31
2.5.2 cDNA-Synthetisierung	32
2.5.3 Primerdesign	33
2.5.4 Sequenzierung der PCR-Produkte (Methode nach Sanger)	34
2.5.5 Durchführung der quantitativen Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	34
2.5.6 Gradienten-PCR	37
2.5.7 Statistik	38
2.6 Western Blot	40
2.6.1 Probenvorbereitung	41
2.6.2 SDS-Page (Gelelektrophorese)	42
2.6.3 Western Blot	44
2.6.4 Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung als unspezifischer Proteinnachweis	45
2.6.5 Immunreaktion	46
2.6.6 Verwendete Antikörper	47
3. Ergebnisse	48
3.1 Nachweis auf Gewebeebene: Immunhistochemie	48
3.1.1 Beispiel einer HE-Färbung von osteoarthrotischem Knorpel	48
3.1.2 Nachweis des RGS4 auf Gewebeebene: Immunhistochemie	49
3.1.3 Nachweis des RGS 10 auf Gewebeebene: Immunhistochemie	51
3.2 Nachweis der RGS-Moleküle auf Zellebene: Immunzytochemie	53
3.2.1 Nachweis des RGS4 auf Zellebene	53
3.2.2 Nachweis des RGS10 auf Zellebene	54
3.3 Nachweis der RGS-Moleküle auf Genebene: RT-PCR	55
3.3.1 Genexpressionsanalyse des RGS4	55

Inhaltsverzeichnis

3.3.2 Genexpressionsanalyse des RGS10	56
3.4 Nachweis der RGS-Moleküle auf Proteinebene: Western Blot der CPCs	57
3.4.1 Nachweis des RGS4 mittels Western Blot	57
3.4.2 Nachweis des RGS10 mittels Western Blot	59
4. Diskussion	60
4.1 Diskussion der CPCs innerhalb osteoarthrotisch veränderten Knorpelgewebes	60
4.2 Diskussion der Ergebnisse auf Gewebeebene: Immunhistochemie	61
4.3 Diskussion der Ergebnisse auf Zellebene: Immunzytochemie	62
4.4 Diskussion der Ergebnisse auf Genebene: RT-PCR	63
4.5 Diskussion der Ergebnisse auf Proteinebene: Western Blot	65
4.6 Diskussion des Nachweises von RGS4 und RGS10 innerhalb der CPCs	67
4.7 Diskussion der Wachstums- und Differenzierungsfaktoren innerhalb der Pathogenese der Osteoarthrose und des Zusammenhanges mit RGS4 und RGS10	69
4.8 Klinische Relevanz und therapeutischer Ausblick	74
5. Zusammenfassung	76
6. Literaturverzeichnis	77

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Hyaluronsäure (entnommen aus Mow et al. 1992)	3
Abbildung 2: Das kollagene Netzwerk des Knorpels (modifiziert nach Mow et al. 1992)	4
Abbildung 3: Lichtmikroskopische Übersicht des Knorpels (modifiziert nach Hunziker et al. 2002)	5
Abbildung 4: GPCR (modifiziert nach Luttrell 2008)	11
Abbildung 5: Schema GPCR und G-Protein (modifiziert nach Luttrell 2008)	12
Abbildung 6: Signalkaskaden der α -Untereinheiten (entnommen aus Dorsam und Gutkind 2007)	13
Abbildung 7: Zyklus eines GPCR (entnommen aus Neubig und Siderovski 2002)	15
Abbildung 8: RGS4 (entnommen aus Tesmer et al. 1997)	16
Abbildung 9: Transkriptionsvarianten des RGS10 (entnommen aus Ali et al. 2013)	17
Abbildung 10: HE-Färbung von OA-Knorpel	48
Abbildung 11: Immunhistochemie des RGS4	50
Abbildung 12: Immunhistochemie des RGS10	52
Abbildung 13: Immunzytochemie des RGS4	53
Abbildung 14: Immunzytochemie des RGS10	54
Abbildung 15: Auswertung der RT-PCR-Analyse des RGS4	55
Abbildung 16: Auswertung der RT-PCR-Analyse des RGS10	56
Abbildung 17: Nachweis des RGS4 auf Proteinebene mittels Western Blot	57
Abbildung 18: Konzentrationstestung zweier verschiedener RGS4-Antikörper	58
Abbildung 19: Nachweis des RGS10 auf Proteinebene mittels Western Blot	59

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 01: Zusammensetzung PBS 10%	19
Tabelle 02: Zusammensetzung des Inkubationsmediums	20
Tabelle 03: Zusammensetzung des Sörensen-Puffers	22
Tabelle 04: Zusammensetzung des Formalinpuffers nach Lillie	22
Tabelle 05: Zusammensetzung der Entkalkerlösung (20%EDTA)	22
Tabelle 06: Protokoll des Einbettautomaten	23
Tabelle 07: Protokoll der HE-Färbung mittels Färbautomaten	24
Tabelle 08: Zusammensetzung TBS-T (10fach)	25
Tabelle 09: Zusammensetzung Protease 24	26
Tabelle 10: Antikörperliste	26
Tabelle 11: Zusammensetzung 2%Paraformaldehyd in PBS	28
Tabelle 12: Zusammensetzung 0,25% Triton X-100 in PBS	29
Tabelle 13: Zusammensetzung 1%BSA in PBS	29
Tabelle 14: Verwendete Primärantikörper	30
Tabelle 15: Verwendete Sekundärantikörper	30
Tabelle 16: Primersequenz	34
Tabelle 17: Primer-Ansatz (10 pmol/µl/Primer)	36
Tabelle 18: Master-Mix für einen Ansatz	36
Tabelle 19: Protokoll der qRT-PCR	37
Tabelle 20: Ansatz Gradienten-PCR	38
Tabelle 21: Protokoll der Gradienten-PCR	38
Tabelle 22: Zusammensetzung des SDS-Probenpuffers (3fach)	41
Tabelle 23: Zusammensetzung der Western Blot-Gele	42
Tabelle 24: Zusammensetzung des Sammelgel-Puffers	43
Tabelle 25: Zusammensetzung des Trenngel-Puffers	43
Tabelle 26: Zusammensetzung des SDS-Laufpuffers (5fach)	43
Tabelle 27: Zusammensetzung des Transferpuffers (10fach)	44
Tabelle 28: Zusammensetzung Coomassie-Brilliant-Blue	45
Tabelle 29: Zusammensetzung der Entfärberlösung 1	45
Tabelle 30: Zusammensetzung der Blocklösung	46
Tabelle 31: Verwendete Primärantikörper	47
Tabelle 32: Verwendete Sekundärantikörper	47

Abkürzungsverzeichnis:

ADAMTS	Disintegrin und Metalloproteinase mit Thrombospondin- Motiv
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C	Cytosin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
Cys	Cystein
DAG	Diacylglycerol
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CPC	<i>chondrogenic progenitor cell</i>
ct	<i>threshold cycle</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DKK-1	Dickkopf-1
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FrzB-3	<i>frizzled-related-protein-3</i>
G	Guanin
GAG	Glykosaminoglykan
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
gDNA	genomische DNA
GDF	<i>growth differentiation factor</i>
GDP	Guanosin-Di-Phosphat
GP	Glykoprotein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindende Proteine
Grem1	<i>gremlin 1</i>
GTP	Guanosin-Tri-Phosphat
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin- Eosin
HKG	Housekeeping-Gen
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
HWZ	Halbwertszeit
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IgG	Immunglobulin G
Ihh	<i>indian hedgehog</i>
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP3	Inositoltriphosphat
kDa	Kilodalton
LIF	<i>leucemia inhibitory factor</i>
M	Mol

Abkürzungsverzeichnis

ME	Mercapto-Ethanol
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MPC	<i>meniscus progenitor cell</i>
mRNA	messenger- Ribonukleinsäure
MSC	mesenchymale Stammzellen
n	Anzahl
NaCl ₂	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NO	Stickstoffmonoxid
OA	Osteoarthrose
oligo-dT	Oligo-Desoxythymidine
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase- Kettenreaktion)
PD	<i>population doubling</i>
PG	Proteoglykan
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PI3K	Phosphoinositide-3-Kinase
PLCβ	Phospholipase Cβ
PPI	Peptidylpropylisomerase
PTH	Parathormon
PTHrP	<i>parathyroid related peptide</i>
PVDF	Polyvinylidenflourid
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RGS	<i>regulator of G-Protein signaling</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale RNA
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
sc	Santa Cruz
SFRP	<i>secreted frizzled- related protein</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SOX9	<i>SRY (sex determining region Y)-box 9</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBS-T	<i>tris buffered saline Tween</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF-β	<i>transforming growth factor β</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor metalloproteinase</i>
TNFα	Tumornekrosefaktor- Alpha
tRNA	Transfer-RNA
TRIS	TRIS- (Hydroxymethyl)- Aminomethan
üN	über Nacht
Wnt	<i>wingless-Int1</i>

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion des Gelenkknorpels

1.1.1 Aufbau des Gelenkknorpels

Die Gelenke bilden die artikulierenden Verbindungen zwischen den Knochen und ermöglichen je nach Aufbau des Gelenkes Bewegungen der Knochen unterschiedlichen Ausmaßes gegeneinander (Mow et al. 1992). Ob eine Bewegung schmerzfrei ablaufen kann, ist von den Eigenschaften des Knorpels der Gelenkoberfläche abhängig (Buckwalter 1998). Weiterhin ermöglicht dieser eine Kraftausübung auf die Gelenke und verringert die mechanische Beanspruchung auf den darunter befindlichen Knochen (Kuettner 1992).

Es handelt sich bei Knorpel um ein spezialisiertes Bindegewebe, welches in vier verschiedene Formen unterteilt werden kann: Fetaler Knorpel, elastischer Knorpel, fibrocartilaginärer und hyaliner Knorpel. Die Unterteilung erfolgt anhand morphologischer Kriterien und des jeweiligen Anteils der unterschiedlichen Kollagen-Typen und elastischen Fasern (Naumann et al. 2002). Der Gelenkknorpel gehört mit wenigen Ausnahmen dem hyalinen Knorpel an. Im Folgenden wird daher aus Gründen der Übersichtlichkeit nur noch auf den hyalinen Knorpel eingegangen.

Der hyaline Knorpel ist in jedem Gelenk aus denselben Bestandteilen aufgebaut: dem Chondrozyten und der extrazellulären Matrix (EZM). Jedoch variieren die Dicke, Zelldichte und Matrixzusammensetzung innerhalb des Gelenkes, zwischen den verschiedenen Gelenken und den verschiedenen Spezies (Buckwalter et al. 2005). Der Aufbau des hyalinen Knorpels ist einzigartig, da er keine Basalmembran und weder Blut- noch Lymphgefäße oder Nerven enthält (Kuettner 1992). Damit der Gelenkknorpel seine Funktionen während der Artikulation erfüllen kann, müssen mehrere Eigenschaften gegeben sein: Der Knorpel muss über eine glatte Oberfläche verfügen, das Gewebe muss viskoelastisch sein und eine hohe Druckbelastbarkeit und Widerstandskraft gegenüber Scherkräften aufweisen (Kuettner 1992). Während die Kollagene durch den Aufbau eines kollagenen Netzwerkes dem Knorpel seine Zugfestigkeit und seine Form verleihen, sind die Proteoglykane (PG) ausschlaggebend für die Elastizität und die reversible Verformung unter Belastung (Buckwalter und Rosenberg 1988). Im Folgenden wird genauer auf die Eigenschaften der Chondrozyten und EZM eingegangen.

1.1.2 Der Chondrozyt

Der Chondrozyt bildet die einzige zelluläre Komponente des adulten Knorpels und nimmt nur ca. 5% des Volumens ein (Kuettner 1992, Mow et al. 1992). In den unterschiedlichen Schichten des Knorpels liegt er dabei entweder einzeln oder in Gruppen angeordnet vor. Chondrozyten sind von einer spezialisierten perizellulären Matrix umgeben, welche in der

Einleitung

transitionalen und mittleren Zone zusätzlich durch eine perizelluläre Kapsel separiert wird (Poole et al. 1987).

Der Chondrozyt, seine perizelluläre Matrix und die perizelluläre Kapsel bilden die strukturelle, funktionelle und metabolische Basiseinheit und werden als Chondron bezeichnet (Poole et al. 1987, Poole 1997). Die Aufgabe des Chondrons besteht darin, den Chondrozyten vor der mechanischen Belastung zu schützen und die Interaktion mit der EZM zu vermitteln (Poole et al. 1992, Muir 1995). Die Aufgaben des Chondrozyten bestehen unter anderem in der Produktion und Organisation der EZM. Sie erhalten unter physiologischen Bedingungen ein Gleichgewicht zwischen den anabolen Matrixmolekülen und den katabolen (matrixabbauenden) Enzymen (Kuettner 1992). Da es zwischen den Chondrozyten keine Zell-Zell-Kontakte gibt, erfolgt eine interzelluläre Kommunikation per Diffusion, wodurch sie auf eine Zell-Matrix-Interaktion angewiesen sind. Auch die Ernährung der Chondrozyten und der Abtransport von Stoffwechselendprodukten geschieht hierbei durch Diffusion (Kuettner 1992). Da es sich bei dem Knorpel um ein avaskuläres Gewebe handelt, ist die Sauerstoffkonzentration im Gewebe stark erniedrigt. Daher greift der Chondrozyt auf anaerobe Stoffwechselprozesse, wie beispielsweise Glykolyse, zurück. Bisher konnte noch kein chondrozytenspezifischer Oberflächenmarker etabliert werden (Muir 1995).

Chondrozyten sind nur im unausgereiften Knorpel teilungsfähig. Diese Teilungsfähigkeit verlieren sie im Laufe ihrer Differenzierung, was eine gewisse Langlebigkeit impliziert. Kommt es jedoch zu Schäden der EZM, wie beispielsweise im Rahmen einer Osteoarthrose, beginnen die Chondrozyten sich erneut zu teilen (Muir 1995).

1.1.3 Die extrazelluläre Matrix

Die Eigenschaften des Knorpels ergeben sich durch die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix. Diese besteht zu 60-80% aus Wasser, welches in einem komplexen Netzwerk aus verschiedenen Kollagenen und den dort befindlichen PG und Glykoproteinen gebunden wird (Buckwalter und Rosenberg 1988). Charakteristisch für den hyalinen Knorpel ist der hohe Kollagen-Typ-II- und der geringe Kollagen-Typ-I-Gehalt (Naumann et al. 2002). Dabei handelt es sich bei den Kollagenen zu 90% um das Kollagen Typ II und zu 10% um die Kollagene Typ VI, IX, X und XI, welche zusammen ein dreidimensionales Netzwerk bilden. Dieses kollagene Netzwerk bewirkt zum einen die Widerstandskraft gegen Scher- und Zugkräfte, zum anderen ist es essentiell für die Form des Knorpels (Kuettner 1992, Mow et al. 1992).

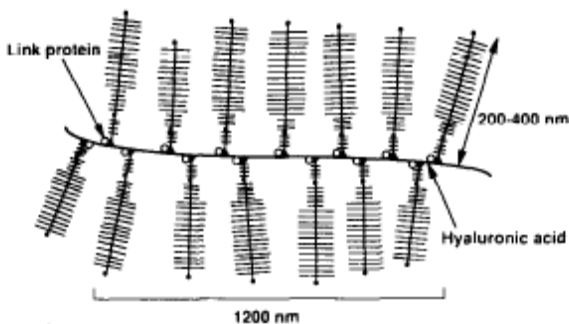
Bei dem Kollagen Typ II handelt es sich um ein fibrilläres Kollagen, welches als typischer Bestandteil des Knorpels und auch als Marker der Chondrozytendifferenzierung gilt (Muir 1995). Dabei bilden die Kollagenfibrillen ein feines Netzwerk, indem sie durch das Kollagen

Einleitung

Typ IX kovalent miteinander verbunden werden. Innerhalb der Fibrillen bildet das Kollagen Typ XI einen zentralen Kern (Muir 1995). Das Kollagen Typ VI ist ein essentieller Bestandteil des Chondrons (Poole et al. 1992). Seine Aufgaben bestehen darin, die Chondrozyten bei mechanischer Beanspruchung zu schützen. Dagegen kommt Kollagen Typ X im gesunden Knorpel ausschließlich in der hypertrophen Zone der Wachstumsfuge und in der Nähe der Tidemark vor (Naumann et al. 2002). Es gilt als Marker der hypertrophen Chondrozyten (Buckwalter et al. 2005).

In die kollagenen Fasern eingebettet liegen PG und Glykoproteine (GP), außerdem nicht-kollagene Matrixproteine (Kuettner 1992). Bei den PG handelt es sich um komplexe Makromoleküle, bestehend aus einem Proteinkern, an welche kovalent unterschiedliche Glykosaminoglykanketten (GAG) gebunden sind. Durch die vielfach negative Ladung der Seitenketten sind PG stark hydrophil und binden so das Wasser in der EZM (Buckwalter und Rosenberg 1988). Auf diese Weise sorgen sie für einen hohen Quellungsdruck (Mow et al. 1992). Dies ermöglicht unter Kraffteinwirkung einen Wasseraustritt aus dem Gewebe und somit eine reversible Verformung des Knorpels (Buckwalter und Rosenberg 1988, Kuettner 1992). Das häufigste PG ist das Aggrecan, dessen Glykosaminoglykanketten vor allem aus Keratansulfat und Chondroitinsulfat bestehen. Das Aggrecan liegt innerhalb der extrazellulären Matrix, zum Teil an Hyaluronsäure gebunden vor, wobei ein Hyaluronsäuremolekül bis zu 200 Aggrecane binden kann (Kuettner 1992).

Abbildung1: Hyaluronsäure. Entnommen aus Mow et al. 1992 mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlages.



Die Abbildung zeigt ein Hyaluronsäure-Filament, an welches mehrere PG gebunden sind. Die kurzen Seitenketten stellen Keratansulfat dar, während es sich bei den längeren Seitenketten um Chondroitinsulfat handelt. Das relativ kleine Link-Protein stabilisiert hierbei die Aggregate aus Hyaluronsäure und Aggrecan

Durch ihre polyanionischen Seitenketten können die PG unter Wasser bis auf das 50fache anschwellen. Dieses wird im Knorpel jedoch durch die Kollagene auf 20% des Maximums begrenzt. Weitere kleinere PG im Knorpel sind Biglykan und Dekorin. Ihr Anteil im Knorpel ist sehr gering, nimmt jedoch während des Alterungsprozesses und hierbei insbesondere in der Superfizialschicht zu (Kuettner 1992). Zusätzlich gehören zu der EZM Glykoproteine, wie beispielsweise das relativ kleine Link-Protein. Dieses stabilisiert die Aggregate aus Hyaluronsäure und Aggrecan (Muir 1995). Im Laufe des Alterungsprozesses sind die neu gebildeten Aggrecane nur noch vermindert fähig, an Hyaluronsäure zu binden, auch kommt es zu einer Zunahme des Keratansulfates (Venn 1978, Mow et al. 1992). Dadurch ändert sich

Einleitung

die Zusammensetzung und die Kettenlänge der PG (Kuettner 1992, Muir 1995). Im normalen Alterungsprozess des Knorpels kommt es schon in frühen Jahren zu einem Verlust des Wassergehaltes. Auch nimmt der Kollagenanteil am Trockengewicht stetig ab. Diese Alterungsprozesse betreffen vor allem die tiefen Schichten des Knorpels, an der Knorpeloberfläche sind die Veränderungen deutlich geringer ausgeprägt (Venn 1978).

Der Aufbau der EZM kann in drei verschiedene Kompartimente unterteilt werden: Die perizelluläre, die territoriale und die interterritoriale Matrix. Diese zeigen alle Unterschiede in ihrer spezifischen Zusammensetzung (Poole et al. 1984, Poole et al. 1987). Die perizelluläre oder auch lakunäre Matrix ist reich an PG und Hyaluronsäure und besitzt keine Kollagenfibrillen aus Kollagen Typ II, dafür jedoch Aggregate aus Kollagen Typ VI (Poole et al. 1992). Die territoriale oder auch kapsuläre Matrix ist aus feinen Kollagenfibrillen als korbähnliche Struktur aufgebaut (Kuettner 1992). Zusammen mit dem Chondrozyten und der perizellulären Matrix bildet sie das Chondron. In der mittleren und der tiefen Schicht des Knorpels ist das Chondron von der interterritorialen Matrix zusätzlich von einer Kapsel abgegrenzt (Poole et al. 1987). Die interterritoriale Matrix macht den größten Anteil aus. Ihre Kollagenfibrillen besitzen den kleinsten Durchmesser und wechseln ihre Ausrichtung in den unterschiedlichen Schichten um 90° (Buckwalter et al. 2005).

1.1.4 Die verschiedenen Zonen des Gelenkknorpels

Innerhalb des Gelenkes zeigt der hyaline Knorpel einen zonalen Aufbau. Die superfizielle Zone, die transitionale Zone, die mittlere (oder Radiärzone) und zuletzt die calcifizierte Zone (Poole et al. 1987, Buckwalter et al. 2005).

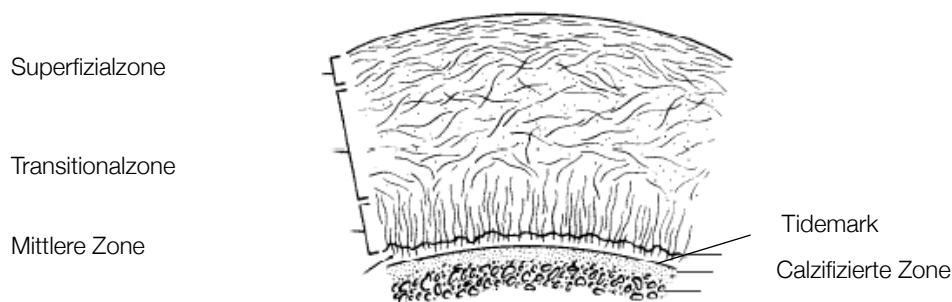


Abbildung 2: Das kollagene Netzwerk des Knorpels. Modifiziert nach Mow et al. 1992 mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlages.

Die Abbildung zeigt die Organisation des kollagenen Netzwerkes des Knorpels. In der Superficialzone liegen die Kollagene annähernd parallel zur Oberfläche. In der Transitionalzone verlaufen die Kollagene zunehmend schräg, während sie in der mittleren Zone orthogonal zur Oberfläche verlaufen. Auch verlaufen die kollagenen Fasern durch die Tidemark hindurch und sorgen so für einen festen Halt zwischen Knorpel und Knochen.

Einleitung

Die Unterschiede zwischen den Zonen betreffen dabei sowohl den Chondrozyten, als auch die Ausrichtung der Kollagene und die Konzentration der PG (Minns und Steven 1977, Buckwalter et al. 2005).

In der superfizialen Schicht (entspricht in etwa 10-20% der Gesamtmenge) sind die Chondrozyten diskoid und parallel zur Oberfläche (Poole et al. 1987, Mow et al. 1992). Die EZM hat relativ wenig PG, dafür ist der Anteil an Kollagenen am größten, welche parallel zur Oberfläche verlaufen (Minns und Steven 1977). Die Transitionalzone macht 40-60% der Gesamtmenge des Knorpels aus. Hier sind die Chondrozyten entweder einzeln oder paarweise angeordnet, rundlich oder oval und von einer perizellulären Schicht umgeben (Poole et al. 1987). Es kommt zu einer Zunahme an PG. Die kollagenen Fasern verlaufen hier zunehmend schräg und besitzen einen größeren Durchmesser (Poole et al. 1987, Mow et al. 1992, Buckwalter et al. 2005). In der mittleren Zone (oder Radiärzone) ordnen sich die Chondrozyten in Säulen an, welche perpendikulär zur Oberfläche stehen (Hunziker et al. 2002). Insgesamt macht die mittlere Zone 30% der Gesamtmenge aus. Hier ist die Konzentration an PG hoch, die Kollagene verlaufen strahlenförmig und in 90° zur Oberfläche (Poole 1997, Buckwalter et al. 2005). Angrenzend an die Radiärzone befindet sich die calcifizierte Zone. Beide werden durch die Tidemark voneinander getrennt. In dieser Zone sind die Chondrozyten rund und die hier calcifizierte Matrix beinhaltet zwar noch Kollagenfibrillen, jedoch keine PG mehr (Poole 1997). Die durch die Tidemark hindurch verlaufenden Kollagenfasern sorgen für einen festen Halt zwischen Knorpel und Knochen (Minns und Steven 1977). Die calcifizierende Schicht bildet die Abgrenzung zum darunter befindlichen Knochen.

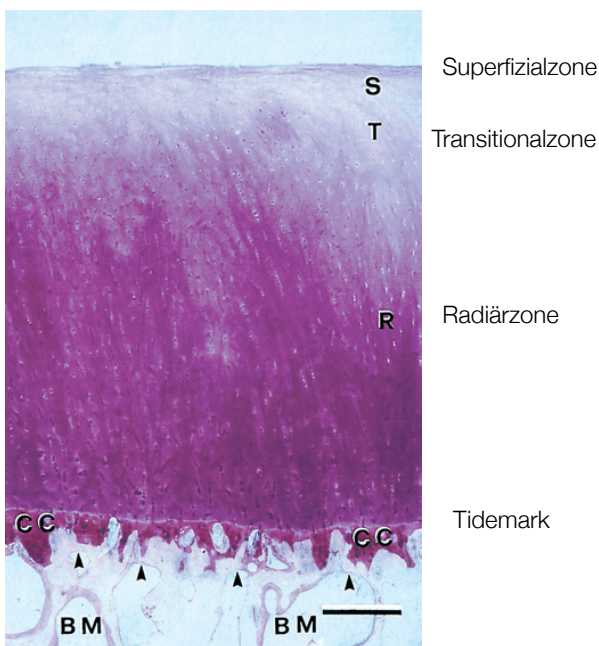


Abbildung 3: Lichtmikroskopische Übersicht des Knorpels. Modifiziert nach Hunziker et al. 2002 mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlages.

Dargestellt wurde eine lichtmikroskopische Übersicht des Knorpels der Femurkondyle, gefärbt mittels McNeil's Tetrachrome-Färbung, Fuchsin und Toluidinblau. Die Abbildung zeigt den zonalen Aufbau des Gelenkknorpels. Während die Zellen der Superficialzone (S) parallel zur Oberfläche liegen, wechseln sie ihre Ausrichtung in den tiefer liegenden Schichten zu einem perpendikulären Verlauf in der Radiärzone (R). In dieser sind die Chondrozyten zu Säulen angeordnet. Die Radiärzone wird durch die Tidemark von der calcifizierten Zone (CC) getrennt. Unterhalb der calcifizierenden Zone sind noch Anschnitte des darunter befindlichen Knochens zu sehen. Der Maßstab im unteren Bildrand entspricht 500 µm.

1.2 Osteoarthritis

1.2.1 Kennzeichen der Osteoarthritis

Bei der Osteoarthritis (OA) handelt es sich um die häufigste chronisch degenerative Gelenkerkrankung. Die Prävalenz nimmt im Laufe des Lebens immer weiter zu (Felson 1988). Sie betrifft 9,6% der Männer und 18% der Frauen oberhalb des 60. Lebensjahres (Woolf und Pfleger 2003).

Die OA kann in eine primäre (idiopathische) und eine sekundäre Form (bedingt durch eine andere Erkrankung) unterteilt werden. Da in der vorliegenden Arbeit die primäre OA untersucht wurde, wird aus Gründen der Übersichtlichkeit nur noch auf diese eingegangen. Zu den Risikofaktoren der primären OA zählen das Lebensalter, Zugehörigkeit zum weiblichen Geschlecht, Übergewicht und berufliche Belastung (Anderson und Felson 1988).

Charakteristisch für die OA ist der progressive Verlust des Gelenkknorpels, jedoch handelt es sich um eine Erkrankung, welche alle Strukturen des Gelenkes betrifft. So kommt es begleitend zu pathologischen Veränderungen des subchondralen Knochens, der Bänder und Menisken und zu einer inflammatorischen Reaktion der Synovialmembran. Der Verlust des Knorpels bedingt die Leitsymptome: Schmerzen verbunden mit Morgensteifigkeit, Krepitationen und Funktionsverlust (Altman et al. 1986). Durch die Schmerzen kommt es zu einer Einschränkung der Gelenkfunktion und somit zu Bewegungseinbußen, welche mit einer starken Alltagsbeeinträchtigung einhergehen. Dadurch ist die OA meist mit einer Beeinträchtigung des sozialen Status assoziiert (Woolf und Pfleger 2003). Die Diagnose der OA wird in Zusammenschau klinischer und radiologischer Kriterien gestellt. Zu den charakteristischen radiologischen Kennzeichen der OA gehören die Verschmälerung des Gelenkspaltes, subchondrale Sklerosierung und Zystenbildung sowie osteophytäre Anbauten (Kellgren und Lawrence 1957). Insgesamt weisen nur 30-40% derjenigen, welche radiologische Kennzeichen einer OA aufweisen, auch klinische Symptome einer OA auf, sodass die Diagnose der OA eine primär klinische Diagnose ist (Felson 1988).

1.2.2 Pathogenese der Osteoarthritis

Die Pathogenese der OA ist noch nicht gut verstanden, dennoch können im Verlauf spezifische Änderungen in der Zusammensetzung der EZM, aber auch des Phänotypes und des Genexpressionsmuster der Chondrozyten festgestellt werden (Sandell und Aigner 2001). Mehrere Faktoren spielen in der Pathogenese der OA eine Rolle: die enzymatische Destruktion der Knorpelmatrix, der mechanische Verschleiß und die gestörte Chondrozyten-Matrix-Beziehung (Aigner und McKenna 2002). Im Unterschied zu den altersbedingten Veränderungen proliferieren die Chondrozyten des osteoarthrotischen Knorpels und zeigen eine erhöhte Stoffwechselrate (Poole et al. 1991). Bis die pathologischen Vorgänge der OA zu

Einleitung

einer manifesten Erkrankung mit den typischen Symptomen führen, dauert der Prozess in der Regel mehrere Jahre (Poole 1999).

Als eine der ersten pathologischen Veränderungen lassen sich an der Knorpeloberfläche makroskopisch sichtbare Fibrillationen sehen (Aigner und Mckenna 2002). Diese werden als Ergebnis der Zerstörung des kollagenen Netzwerkes gewertet. Ursache ist der durch Stromelysin (MMP-3) bedingte Abbau des Kollagens Typ IX, welches normalerweise das kollagene Netzwerk stabilisiert. Als Folge kommt es zu einem vermehrten Wassereinstrom und der Knorpel schwillt an (Muir 1995). Konsekutiv kommt es zu einem Verlust des Aggrecans und der kleineren PG Decorin, Biglykan und des Link-Proteins in der superfizialen und mittleren Schicht, während es in den tieferen Schichten zu einer Zunahme dieser Faktoren kommt (Mow et al. 1992). Der Verlust des Aggrecans bedeutet eine Abnahme des Schwellungsdruckes und konsekutiv des Wassergehaltes des Knorpels. Somit nimmt die Festigkeit des Knorpels ab, während die Permeabilität zu nimmt (Buckwalter et al. 2005). Die Abbauprodukte gelangen in die Synovialflüssigkeit, wo sie von Synovialzellen phagozytiert werden. Die Synovialmembran hypertrophiert und wird hyperplastisch (Martel-Pelletier et al. 1999). Histologisch sind Infiltrate immunologischer Zellen nachweisbar (Haraoui et al. 1991). Durch die Zunahme der Permeabilität können Wachstumsfaktoren in die Matrix eindringen, wodurch die Chondrozyten zur Proliferation und Produktion von Matrixmolekülen angeregt werden. Hauptsächlich dringen dabei von den Synovialzellen gebildete proinflammatorische Zytokine, unter anderem Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor α (TNF α) ein. Dadurch werden die Chondrozyten zur Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine angeregt, hauptsächlich IL-1, IL-6, IL-8 und TNF α (Mow et al. 1992, Sandell und Aigner 2001, Fernandes et al. 2002). Diese Zytokine bewirken eine vermehrte Bildung kataboler Enzyme. Dabei handelt es sich bei den katabolen Enzymen um Matrix-Metalloproteinasen (MMP), wie beispielsweise Kollagenasen, Stromelysin (MMP-3) und Gelatinasen, ebenso Aggrecanasen ADAM-TS4 und ADAM-TS5 (*a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin-motif*) (Archer und Francis-West 2003). Im Gegensatz dazu werden die anabolen Zytokine IGF-1 (*insulin like growth factor 1*), TGF- β 1,2 und 3 (*transforming growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*) und BMP (*bone morphogenetic protein*), welche alle eine gesteigerte Matrixsynthese bedingen, nicht in demselben Maße vermehrt gebildet (Sandell und Aigner 2001). Auch erfolgt eine Abnahme der Abbau-hemmenden Proteine TIMP (*tissue inhibitor metalloproteinase*). Es entsteht ein Ungleichgewicht zwischen den anabolen und katabolen Stoffwechselprozessen im Knorpel. Dies bedeutet, dass der enzymatische Abbau der EZM die Neusynthese von EZM-Molekülen übersteigt (Dean et al. 1989, Aigner und Mckenna 2002).

Einleitung

In den frühen Stadien der OA reagieren die Chondrozyten, indem sie die Synthese der Matrixmoleküle steigern (Aigner et al. 1997, Sandell und Aigner 2001). Im gesunden Knorpel zeigen die Chondrozyten keine proliferative Aktivität. Im Gegensatz dazu proliferieren die Chondrozyten des osteoarthrotischen Knorpels und bilden als Folge dessen, insbesondere in der superfizialen Schicht, Zellcluster aus (Poole et al. 1991). Die metabolische Aktivität der Zellcluster ist gesteigert, sodass vermehrt Matrixmoleküle wie Aggrecan, aber auch Kollagene Typ II und III gebildet werden (Kouri et al. 1996, Aigner et al. 1997). Die Menge an GAG in der Superfizial- und Mittelschicht nimmt in der OA jedoch trotzdem deutlich ab, auch ändert sich die spezifische Zusammensetzung. Der Anteil an Keratansulfat nimmt ab, während der Anteil an Chondroitin-4- und 6-Sulfat steigt (Mankin und Lippiello 1971). Es kommt zu einem Abbau des kollagenen Netzwerkes und als Folge dessen zu einer Destabilisierung des Knorpels. Der größte Anteil des kollagenen Abbaus erfolgt durch die MMP-13. Zusätzlich wird die Zerstörung der Verbindung zwischen dem Kollagen Typ II und Typ IX durch MMP-3 bewirkt (Billinghurst et al. 1997).

In späteren Stadien der OA kommt es durch den Einfluss des IL-1 zu einer Dedifferenzierung der Chondrozyten, welche nun einen fibroblastenähnlichen Phänotyp aufweisen (Sandell und Aigner 2001). Sie exprimieren kein Kollagen Typ II und Aggrecan mehr, dafür vermehrt Kollagen Typ I, III, und V (Aigner et al. 1997, Miosge et al. 1998, Sandell und Aigner 2001). Diese länglichen Zellen sind vor allem in den tieferen Schichten zu finden (Kouri et al. 1996). Zusätzlich kommt es in den tieferen Schichten und um die Chondrozytencluster zu einer Produktion von Kollagen Typ X, welches normalerweise von den hypertrophen Chondrozyten in der Wachstumsfuge und der Schicht nahe der Tidemark produziert wird (Kuettner 1992, Sandell und Aigner 2001). Das gebildete Gewebe entspricht einem fibrocartilaginären Ersatzgewebe, welches auf längere Zeit die Funktion des Knorpels nicht aufrechterhalten kann. Es kommt konsekutiv zu einem Verlust der Knorpelschicht. Die anfangs nur oberflächlichen Fissuren reichen nun bis in tiefere Schichten des Knorpels, bis es zu einem vollständigen Freiliegen des subchondralen Knochens kommt (Aigner und McKenna 2002). Weiterhin kommt es zu einem Einsprossen von Gefäßen durch die Tidemark hindurch in das Knorpelgewebe (Koelling et al. 2009). Vor allem in der superfizialen und mittleren Schicht sind vermehrt apoptotische Chondrozyten nachweisbar (Blanco et al. 1998, Hashimoto et al. 1998). Dabei ist die Anzahl der apoptotischen Zellen proportional zu dem Schweregrad der OA (Weiss und Mirow 1972). Als Reaktion auf die veränderten Eigenschaften des Gewebes kommt es zu knöchernen Anbauten mit Knorpelkappe, sogenannten Osteophyten. Des Weiteren entstehen die im radiologischen Bild sichtbaren subchondralen Geröllzysten, welche einen mit Muzinen gefüllten Hohlraum darstellen.

1.2.3 Chondrogene Progenitorzellen und Osteoarthritis

Mesenchymale Stammzellen (MSC) scheinen an den Regenerationsprozessen des Knorpels beteiligt zu sein. 2004 gelang es der Arbeitsgruppe um Alsalameh Zellen im gesunden und osteoarthrotischen menschlichen Knorpel nachzuweisen, welche charakteristische Oberflächenmoleküle und den Phänotyp mesenchymaler Stammzellen aufweisen. Der Anteil an MSCs nimmt im osteoarthrotischen Knorpel zu (Alsalameh et al. 2004). Der Nachweis von MSC-ähnlichen Zellen gelang darüber hinaus in der Synovia, der synovialen Flüssigkeit und dem Hoffa-Fettkörper (Fickert et al. 2004, Jones et al. 2004). Bei MSCs handelt es sich um Zellen, die sich durch das Vorhandensein bestimmter Eigenschaften wie Klonogenität, Multipotenz und migratorische Eigenschaften auszeichnen. Sie gehen aus dem Mesoderm hervor und können in hämatopoetische und nicht-hämatopoetische Stammzellen unterteilt werden. Unter dem Begriff adulte Stammzellen versteht man Vorläuferzellen, welche sich in bereits differenzierten Geweben befinden (Muhammad et al. 2013). MSCs bilden das Stütz- und Bindegewebe des menschlichen Körpers wie beispielsweise Sehnen, Bänder, Muskel, Knochen und eben auch den Knorpel (Bruder et al. 1994). Somit besitzen die MSCs die Fähigkeit, sich *in vitro* in Fettgewebe, Knochen und Knorpel zu differenzieren (Gronthos et al. 2003).

2009 gelang es Koelling et al. fibroblastenartige Chondrozyten aus dem osteoarthrotisch verändertem Knorpelgewebe zu isolieren und sie hinsichtlich ihrer Eigenschaften zu untersuchen. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Zellen neben einem hohen chondrogenen Potenzial auch Eigenschaften von Stammzellen besitzen, wie Klonogenität, Multipotenz und die Fähigkeit, in und aus Gewebe zu migrieren. Auch zeichnen sich die Zellen durch ein hohes Zellteilungspotenzial aus. Im Gegensatz zu MSCs zeigen diese Zellen nach durchschnittlich 60PD (*population doubling*) eine Abnahme der Zellteilung und somit Anzeichen der Zellalterung. Er nannte die Zellen in Hinblick auf die Unterschiede zu den MSCs chondrogene Progenitorzellen (CPCs). Bisher konnte noch nicht abschließend geklärt werden, ob es sich um eine mesenchymale Stammzelllinie handelt oder um dedifferenzierte Chondrozyten (Koelling et al. 2009). Im gesunden Knorpelgewebe sind die Zellen nicht nachweisbar (Koelling und Miosge 2010).

Es gelang der Arbeitsgruppe unter dem Einsatz unterschiedlicher Differenzierungsmedien, die CPCs in Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten zu differenzieren, was Multipotenz impliziert. In Alginatkultur differenzieren sich die CPCs ohne Verwendung eines Differenzierungsmedium in einen chondrozytenähnlichen Phänotyp, auch produzieren sie verstärkt Kollagen Typ II. Entfernt man osteoarthrotisch geschädigten Knorpel und kultiviert diesen *in vitro*, so migrieren die Zellen aus dem Knorpel. Die CPCs können *in vivo* durch die Tidemark in erkranktes Gewebe einwandern und scheinen dort an Regenerationsprozessen

Einleitung

beteiligt zu sein. Darüber hinaus können die Zellen *in vitro* in erkranktes Gewebe eindringen und dieses besiedeln. Sie tragen einige der Oberflächenmarker, welche MSCs charakterisieren, wie Stro-1, CD13 (*Cluster of differentiation*-), CD29, CD44, CD73, CD90 und CD105. Im Unterschied zu MSCs konnten die Oberflächenmarker CD271, CD18 oder CD31 auf CPCs nicht nachgewiesen werden. Die CPCs tragen keine der Oberflächenmarker CD 34, CD31, CD117 und CD45, welche hämatopoetische Stammzellen kennzeichnen (Koelling et al. 2009).

1.3 G-Protein-signaling

1.3.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren: Aufbau und Funktion

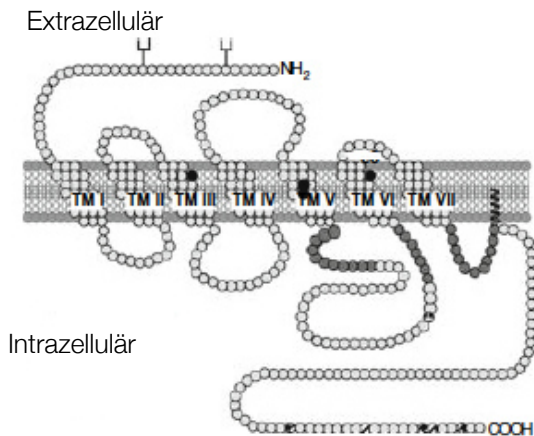
Damit eine Zelle innerhalb ihres Zellverbandes ihre Funktion erfüllen kann, ist sie auf Informationen und Signale der umliegenden Zellen, aber auch entfernter Gewebe angewiesen. Diese Informationsweitergabe wird entweder über direkte Zell-Zell-Kontakte oder mittels Mediatoren, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, Hormone oder Zytokine vermittelt. Damit diese an der Zelle eine Wirkung entfalten können, benötigen sie den passenden Rezeptor. Bei den zellulären Rezeptoren kann zwischen Zellmembran- und Kernmembranrezeptoren unterschieden werden. Zu den Zellmembranrezeptoren zählen unter anderem die Transmembranrezeptoren. Zu diesen gehören die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Für die Erforschung der G-Proteine und ihrer Funktionen innerhalb der Signaltransduktion erhielten Alfred G. Gilman und Martin Rodbell 1994 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin (Rodbell 1995).

Die GPCRs stellen mit einem Anteil von 60% die größte Untergruppe der Transmembranrezeptoren dar (Gether 2000). Allen Mitgliedern der GPCRs ist eine aus 20-25 Aminosäuren (AS) bestehende 7-Transmembrandomäne gemeinsam, deren Sequenz die am meisten konservierte Gensequenz des Rezeptors ist (Strader et al. 1994). Sie zieht als α -helicale Struktur durch die Zellmembran, wodurch sich drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen bilden (Luttrell 2008). An ihrer extrazellulären Domäne kommt es zur Bindung des Liganden, die intrazelluläre Domäne beinhaltet unter anderem eine Bindungsstelle für die G-Proteine (Gether und Kobilka 1998).

Es gibt mehrere Klassifikationen, durch welche die GPCRs anhand unterschiedlicher Kriterien in Unterfamilien unterteilt werden können. Das gebräuchlichste Klassifikationssystem unterteilt die GPCRs anhand von Gensequenzhomologien in fünf unterschiedliche Familien: die Glutamat-, Rhodopsin-, Adhesion-, Frizzled/taste- und Secretinfamilie (Fredriksson et al. 2003).

Einleitung

Abbildung 4: GPCR. Modifiziert nach Luttrell 2008 mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlages.



Dargestellt ist ein GPCR, welcher zu den 7-Transmembranrezeptoren gehört. An der extrazellulären (N-terminalen) Domäne erfolgt die Bindung des Liganden. Die intrazelluläre (C-terminale) Domäne beinhaltet unter anderem die Bindungsstelle der G-Proteine. Durch die hier dargestellte Palmitoylierung entsteht eine vierte intrazelluläre Schleife. Die verschiedenen Transmembrandomänen sind jeweils mit TM I bis TM VII beschriftet.

An die unterschiedlichen GPCRs können dabei eine ausgesprochene Vielzahl unterschiedlichster Moleküle binden: Von Photonen, Ionen, Nukleotiden, Glykoproteinen, Lipiden, biogenen Aminen, Peptiden über Proteasen, Polypeptid-Hormonen, Autacoiden bis zu Neurotransmittern (Gilman 1987; Gether 2000). Die GPCRs stellen die wichtigste Rezeptorart innerhalb des Skelettsystemes dar (Bowler et al. 1998). Welche nachgeschalteten Transduktionskaskaden bei Bindung eines Liganden erfolgen, ist von der Art des gekoppelten G-Proteins abhängig. Die GPCRs aktivieren zwar größtenteils G-Proteine bei Bindung eines Liganden, dennoch gibt es auch verschiedene G-proteinunabhängige Signaltransduktionen. So konnten bereits Interaktionen zwischen GPCRs und sogenannten *small G-Proteinen*, Tyrosinkinasen und weiteren Adapterproteinen nachgewiesen werden (Maudsley et al. 2005).

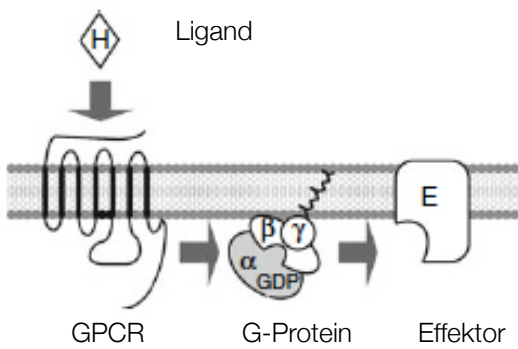
1.3.2 G-Proteine: Aufbau und Funktion

Der Begriff G-Protein steht als Abkürzung für „Guanin-Nucleotid bindende Proteine“ und beschreibt eine heterogene Gruppe von Proteinen, welche in der Lage sind GDP und GTP zu binden. Es handelt sich dabei um membranständige Proteine, welche innerhalb der Signaltransduktion der GPCR als Bindeglied zwischen dem extrazellulären Rezeptor und den intrazellulären Effektoren vermitteln (Gilman 1987). Die G-Proteine sind die Haupteffektoren der GPCR und befinden sich an der Innenseite der Zellmembran (Koelle 1997). Sie gehören zu der Familie der regulatorischen GTPasen, das heißt sie hydrolysieren GTP (Guanosin-Tri-Phosphat) zu GDP (Guanosin-Di-Phosphat) (Hamm und Gilchrist 1996). Da diese im inaktiven Zustand aus drei verschiedenen Polypeptiden, der α -, β - und γ -Untereinheit, aufgebaut sind, werden sie auch als heterotrimere Proteine bezeichnet (Gilman 1987) .

Einleitung

Abbildung 5: Schema GPCR und G-Protein. Modifiziert nach Luttrell 2008 mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlages.

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung eines GPCR mit dem dazu gehörigen G-Protein. Das G-Protein ist mit den drei Untereinheiten (α -, β -, γ -Untereinheit) im inaktiven, GDP-gebundenen Zustand dargestellt. Nach Bindung eines Liganden (H) erfolgt eine Aktivierung des G-Proteins, wodurch ein Effektor aktiviert wird.



Die α -Untereinheit bindet und hydrolysiert das GTP durch ihre intrinsische GTPase-Aktivität (Neer 1995, Luttrell 2008). Sie bildet mit 39-52 kDa die größte der drei Untereinheiten und stellt das gemeinsame Merkmal der G-Proteine dar. Die β - und γ -Untereinheiten bilden in der weiteren Signaltransduktion eine funktionelle Einheit und aktivieren verschiedene *second messenger*. Die Größe der β -Untereinheit beträgt 36 kDa und die der γ -Untereinheit 6-9 kDa.

Für die Signaltransduktion ist entscheidend, dass die G-Proteine in zwei verschiedenen Zuständen existieren, dem inaktiven GDP-gebundenen sowie dem aktiven GTP-gebundenen Zustand. Durch diese beiden unterschiedlichen Zustände besitzen die G-Proteine unterschiedliche Affinitäten zu den jeweiligen Molekülen. Im inaktiven, GDP-gebundenen Zustand befinden sie sich am Rezeptor und die Affinität zwischen der α -, β - und γ -Untereinheit ist groß, während sie im aktiven, GTP-gebundenen Zustand geringer ist und somit die Dissoziation der α - von der β - und γ -Untereinheit erfolgt. Die β - und γ -Untereinheiten sind fest miteinander verbunden und wirken in der nachfolgenden Signalkaskade als eine funktionelle Einheit (Hamm 1998). Die α -Untereinheit zeigt dabei eine große Variabilität, kann jedoch anhand von Gensequence-Homologien in vier große Familien ($G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12}$) eingeteilt werden (Neer 1995, Hamm und Gilchrist 1996). Jede $G\alpha$ -Familie nutzt dabei einen anderen nachgeschalteten Effektor (s. Abbildung 6).

So erfolgt bei der Aktivierung der $G\alpha_s$ -Familie eine Aktivierung der Adenylylcyclase und in Folge eine Erhöhung der cAMP-Produktion. Die $G\alpha_q$ -Familie vermittelt eine Aktivierung der Phospholipase C, welche unter Spaltung des PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) IP3 (Inositoltriphosphat) und DAG (Diacylglycerol) bildet (Preininger und Hamm 2004). Die $G\alpha_i$ -Familie zeigt eine komplexere Signaltransduktion, da es sowohl zur Hemmung der Adenylylcyclase durch $G\alpha_i$ - oder $G\alpha_z$ -UE als auch zur Aktivierung der Phosphodiesterase kommen kann. Entscheidend ist hierbei, dass alle Wege zu einer Abnahme des cAMP oder cGMP führen. Als letzte Unterform führt die $G\alpha_{12}$ -Familie zu einer Aktivierung der Rho-GTPasen und Rho-Kinasen. Über diese verschiedenen Mechanismen wird die Konzentration

Einleitung

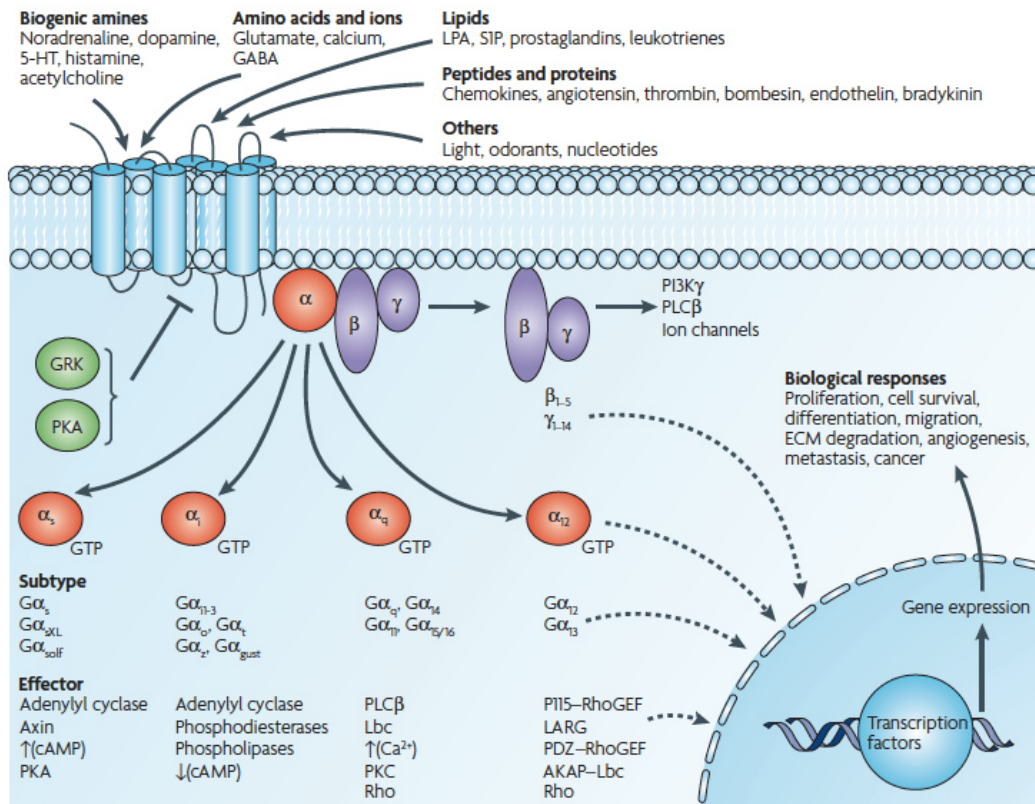


Abbildung 6: Signalkaskaden der α -Untereinheiten. Entnommen aus Dorsam und Gutkind 2007 mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlages.

Dargestellt sind die verschiedenen Signalkaskaden der vier verschiedenen α -Untereinheiten ($G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12}$) und der $\beta\gamma$ -Untereinheit. Durch $G\alpha_s$ erfolgt eine Aktivierung der Adenylylcyclase und infolgedessen kommt es zur Erhöhung der cAMP-Konzentration, während $G\alpha_i$ die Adenylylcyclase inhibiert und die cAMP-Konzentration abnimmt. $G\alpha_q$ aktiviert die Phospholipase C, welche PIP₂ in DAG und IP₃ spaltet. Die β/γ -Untereinheit kann verschiedene Signalmoleküle aktivieren, wie beispielsweise Phospholipasen, Ionenkanäle und Lipidkinasen.

von weiteren Signalmolekülen beeinflusst, wodurch wiederum weitere Signalwege aktiviert oder inhibiert werden (Neer 1995).

Auch von der β - und γ -Untereinheit konnten bereits viele verschiedene Unterformen identifiziert werden. So sind bis heute 16 verschiedene α -, 5 β - und 14 γ -Untereinheiten bekannt (Preiner und Hamm 2004). Zusammen aktivieren sie eine Vielzahl von nachgeschalteten Effektoren, wie beispielsweise die Adenylylcyclase, Phospholipase C β (PLC β), Phospholipase A₂, Phosphoinositide-3-Kinase (PI3K) und β -adrenerge Rezeptor-Kinasen oder weitere Ionenkanäle (Neer 1995).

1.3.3 RGS-Proteine: Aufbau und Funktion

Die Abkürzung RGS steht für *regulator of G-protein signaling*. Es handelt sich hierbei um Proteine, welche die Dauer der Signaltransduktion vieler G-Proteine regulieren. Diese Funktion nehmen sie hauptsächlich wahr, indem sie die GTP-Hydrolyse der α -Untereinheit beschleunigen und somit die Signaltransduktion verkürzen. Daher werden sie auch als GAPs (*GTPase-activating proteins*) bezeichnet (Watson et al. 1996). Insgesamt sind die RGS-Proteine eine sehr unterschiedliche Gruppe mit bisher über 27 verschiedenen RGS-Mitgliedern, deren gemeinsames Merkmal die 120 AS große sogenannte RGS-Box bzw. -Domäne ist (De Vries und Gist Farquhar 1999). Die RGS-Domäne bildet eine Neun- α -Helix-Form, welche für die Interaktion mit dem G-Protein erforderlich ist (Popov et al. 1997, De Vries und Gist Farquhar 1999). Jedes RGS-Protein weist dabei eine unterschiedliche Affinität für die verschiedenen $G\alpha$ -UE auf. Fast alle untersuchten RGS-Moleküle binden an $G\alpha_i$ und $G\alpha_{12}$ -Untereinheiten, während RGS2, -4, -14 an $G\alpha_q$ -Untereinheiten binden und keines der untersuchten RGS-Moleküle an $G\alpha_s$ -Untereinheiten bindet (De Vries und Gist Farquhar 1999). Die RGS-Proteine kommen sowohl zytoplasmatisch, im Golgi-Apparat, im Nucleus als auch an die Zellmembran gebunden vor. Welche Lokalisation innerhalb einer Zelle vorliegt, ist von der N-terminalen Sequenz und posttranslationalen Modifizierungen abhängig. Ihre Funktion als GAPs können sie jedoch nur wahrnehmen, solange sie an einer α -Untereinheit an der Plasmamembran gebunden sind (Kach et al. 2012).

Die verschiedenen RGS-Proteine werden anhand von Gensequenzhomologien in 8 Unterfamilien eingeteilt: A/RZ, B/R4, C/R7, D/R12, E/RA, F/GEF, G/GRK (GPCR-Kinasen) und H/SNX (Willars 2006). Zum anderen werden die RGS-Proteine Zell- und Gewebespezifisch exprimiert. Neben der RGS-Domäne kommen weitere Domänen hinzu, welche zusätzliche Funktionen erfüllen und zu einer großen Variabilität der RGS-Moleküle führen (Hepler 1999). Durch diese werden unter anderem die Interaktion mit weiteren Molekülen wie Phospholipide, Rezeptoren und Effektoren oder Gerüstproteinen ermöglicht. Die N-terminale Sequenz vermittelt die Rezeptorspezifität und Membranassoziation (Willars 2006).

1.3.4 Signaltransduktion der G-Proteine und die Termination durch die RGS-Moleküle

Am Beginn der Signaltransduktion steht die Bindung des Liganden an den GPCR. Bindet ein Ligand an dessen extrazelluläre Domäne, so erfolgt ein Übergang des GPCRs vom inaktiven in den aktiven Zustand (Gether 2000). An der intrazellulären Domäne ändert sich dessen Konformation, wodurch eine Bindungsstelle für das G-Protein zugänglich wird. Bindet nun ein G-Protein, dissoziiert das GDP von der α -Untereinheit, und die Bindung zwischen GPCR und G-Protein wird fester. Sowohl durch eine erhöhte intrazelluläre GTP-Konzentration, als auch durch die nun erhöhte GTP-Affinität kommt es zu dem Austausch des GDP gegen ein GTP.

Einleitung

Durch die GTP-Bindung an der α -Untereinheit ändert sich der Energiezustand des G-Proteins und damit auch die Affinität zwischen den einzelnen Untereinheiten. Als Folge dissoziiert das G-Protein von seinem Rezeptor, aber auch die α -Untereinheit von der β - und γ -Untereinheit (Neer 1995, Koelle 1997, Hamm 1998). Hierbei wirken sowohl die GTP tragende α -Untereinheit als auch die β - und γ -Untereinheit als *second messenger* und können eine Vielzahl von nachgeschalteten Signaltransduktionsketten aktivieren. Dadurch erfolgt nicht nur die Signaltransduktion, sondern auch dessen Amplifikation (Dohlman et al. 1991, Neer 1995, Koelle 1997). Die Terminierung der Signaltransduktion erfolgt, indem die α -Untereinheit durch ihre intrinsische GTPase-Aktivität das GTP zu GDP hydrolysiert, wodurch die Untereinheiten des G-Proteins wieder zu der inaktiven heterotrimeren Form reassoziieren (Neer 1995, Watson et al. 1996). Durch diesen Vorgang gehen die G-Proteine wieder in ihren inaktiven GDP-gebundenen Zustand über. Damit stellt die Rate der GTP-Hydrolyse den zeitlich limitierenden Faktor dar, welcher die Dauer der Aktivierung der α - β - und γ -Untereinheit begrenzt. Zwar zeigen unterschiedliche α -Untereinheiten eine unterschiedliche Rate an GTP-Hydrolyse, doch ist diese intrinsische GTPase-Aktivität insgesamt langsam und die Signaltransduktion erfordert schnellere Anpassungen (Neer 1995, Watson et al. 1996, Koelle 1997).

Diese Funktion übernehmen die RGS-Moleküle, welche eine bis zu hundertfache Beschleunigung der Hydrolyse bewirken können (Koelle 1997, Zerangue und Jan 1998). Dies bewirken die RGS-Moleküle, indem sie den Übergangszustand der G-Proteine stabilisieren (Koelle 1997).

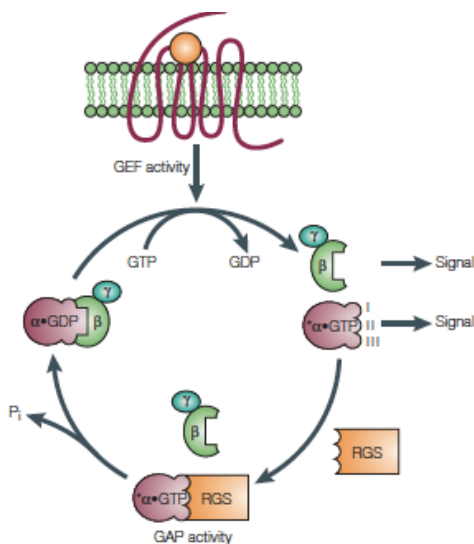


Abbildung Nr. 7: Zyklus eines GPCR. Entnommen aus Neubig und Siderovski 2002 mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlages.

Dargestellt ist der Zyklus eines GPCR nach dessen Aktivierung durch Bindung eines Liganden. Nach Aktivierung kommt es zur Bindung eines G-Proteins und durch die nachfolgende Konformationsänderung zum Austausch des GDP durch GTP. Es erfolgt die Dissoziation des G-Proteins vom GPCR und die Dissoziation der α -Untereinheit von der β - und γ -Untereinheit. Durch Bindung eines RGS wird die Terminierung durch Hydrolyse des GTP zu GDP begünstigt, wodurch es zu einer Reassoziierung der Untereinheiten des G-Proteins kommt.

1.3.5 RGS4

RGS4 gehört zu der Subfamilie B/R4, in welche die kleineren RGS-Moleküle zusammengefasst werden. Neben der RGS-Domäne weisen sie nur kleine weitere Abschnitte

Einleitung

auf (Willars 2006). Innerhalb der Zelle befindet sich das RGS4 sowohl an der Zellmembran als auch im Zytosol und in intrazellulären Kompartimenten, wie bspw. an der Golgi-Membran (Tu et al. 2001). RGS4 wechselt innerhalb der Zelle kontinuierlich die Lokalisation zwischen Plasmamembran und Endosomen (Bastin et al. 2012).

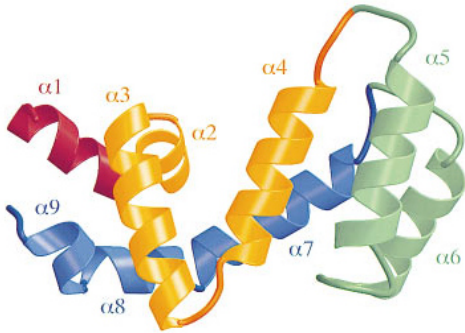


Abbildung 8: RGS4. Entnommen aus Tesmer et al. 1997 mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlages.

Dargestellt ist die Tertiärstruktur des RGS4. Die RGS-Box besteht aus neun Helices (α 1-9). Das RGS4 weist neben der RGS-Domäne nur einen kleinen weiteren Abschnitt auf, sodass die hier in der Abbildung gezeigten neun α -Helices alle Teil der RGS-Domäne sind.

Das Gen, welches für RGS4 kodiert, befindet sich auf Chromosom 1 Abschnitt p23.3 (Sierra et al. 2002). Bisher sind von dem RGS4 fünf verschiedene Isoformen bekannt. Sowohl RGS4-1 als auch RGS4-2 umfassen 205 AS. Aufgrund einer 97 AS langen N-terminalen Erweiterung, deren Funktion bisher nicht bekannt ist, umfasst das RGS4-3 302 AS. RGS4-4 ist mit 93 AS die kleinste der Isoformen. Dagegen weist RGS4-5 187 AS auf (Ding et al. 2007). Da das RGS4-Gen mehrere Transkriptionsstartpunkte aufweist, wird vermutet, dass die unterschiedlichen Isoformen entweder von unterschiedlichen Promotoren reguliert werden oder das Ergebnis alternativen Splicings sind. Die Isoformen weisen eine gewebespezifische Expression auf (Ding et al. 2007). Neben der GTPase-beschleunigenden Funktion konnte für das RGS4 bereits eine direkte inhibitorische Funktion auf die Phospholipase C nachgewiesen werden, indem es die Bindung der G α -UE an die Phospholipase C verhindert (Hepler et al. 1997).

Die regulatorische Funktion des RGS4 konnte innerhalb des ZNS, im kardiovaskulären System und in der Tumorneogenese nachgewiesen werden. Es ist das am stärksten im ZNS exprimierte RGS-Protein (Erdely et al. 2004, Rivero et al. 2013). Innerhalb der Chondrogenese nimmt die chondrogene Differenzierung unter RGS4 ab (Appleton et al. 2006). Auch nimmt die osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen unter RGS4 ab, während es die adipogene Differenzierung fördert (Madrigal et al. 2017).

Das RGS4 wird auf verschiedenen Ebenen reguliert. Die durchschnittliche Halbwertszeit (HWZ) eines RGS4-Proteins beträgt ca. 30 min. Der Abbau erfolgt durch das Proteasom (Lee et al. 2005). Zu den wichtigsten posttranslationalen Modifizierungen gehört die Palmitoylierung, wodurch die Adhäsion mit der Plasmamembran verstärkt wird (Bijlmakers und Marsh 2003).

1.3.6 RGS10

Das RGS10 gehört zusammen mit dem RGS12 und RGS14 zu der D/R12-Subfamilie und besitzt als kleinstes der Mitglieder kaum mehr als die RGS-Domäne (Siderovski und Willard 2005). Dadurch verliert es auch die Domäne, welche die Bindung mit der Plasmamembran vermittelt. Somit liegt es in der Zelle fast ausschließlich im Zytosol vor. Daher ist RGS10 auf die Palmitoylierung angewiesen, durch welche eine Membranassoziation entsteht (Tu et al. 1999). Durch Phosphorylierung erfolgt eine Translokation von der Plasmamembran bzw. dem Zytosol in den Nucleus und eine damit verbundene Deaktivierung (Burgon et al. 2001). RGS10 wirkt selektiv an der $G\alpha_i$ -, $G\alpha_z$ -, nicht jedoch an der $G\alpha_s$ -UE (Hunt et al. 1996).

Das RGS10-Gen liegt auf Chromosom 10 und beinhaltet zwei Transkriptionsstartpunkte. Dadurch entstehen zwei verschiedene Isoformen: die 181 AS (21 kDa) große RGS10 Isoform A und die mit 167 AS (19,5kDa) etwas kleinere Isoform B (Ali et al. 2013).

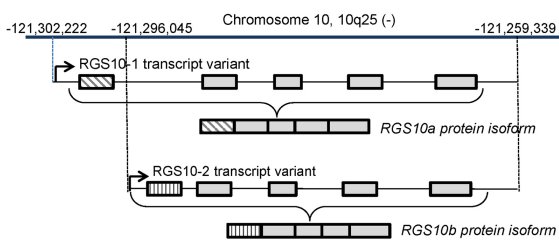


Abbildung 9: Transkriptionsvarianten des RGS10. Entnommen aus Ali et al. 2013.

Dargestellt sind die zwei Transkriptionsvarianten des RGS10. Das Gen befindet sich auf dem Chromosom 10. Die beiden RGS-Isoformen entstehen dabei durch zwei verschiedene Transkriptionsstartpunkte, wodurch sie sich durch das erste Exon unterscheiden. RGS10.1 beinhaltet 181AS, während das kleinere RGS10.2 167AS groß ist.

Ähnlich dem RGS4 ist auch das RGS10 im ZNS ausgeprägt lokalisiert (Rivero et al. 2010). Des Weiteren wurde RGS10 im Thymus und in Lymphknoten nachgewiesen. Innerhalb der Chondrogenese nimmt die chondrogene Differenzierung unter RGS10 zu (Appleton et al. 2006).

1.3.7 Beeinflussung der Chondrozytendifferenzierung durch RGS4 und RGS10

Bereits 2006 untersuchte Appleton den Einfluss unterschiedlicher RGS-Proteine auf die chondrogene Differenzierung anhand von ATDC-5-Zellen. Dabei handelt es sich um eine chondrogene Zelllinie aus einem Teratokarzinom, welche als gut untersuchtes Modell der chondrogenen Differenzierung gilt. Während die Überexpression von RGS5, -7, und -10 zu einer Zunahme der chondrogenen Differenzierung und somit einer Zunahme der GAG-Synthese und Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) führt, nimmt die chondrogene Differenzierung durch eine Überexpression des RGS4 ab. Somit konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen RGS-Moleküle die chondrogene Differenzierung unterschiedlich beeinflussen. Es kommt unter Überexpression von RGS4 zu einer Abnahme der Kollagen-Typ-IIa-Synthese, ebenso der Synthese der AP und deren Aktivität. RGS4 und RGS10

werden während der chondrogenen Differenzierung vermehrt gebildet. Eine Überexpression des RGS10-Moleküls führt dagegen zu einer Zunahme der chondrogenen Differenzierung und folglich zu einer Zunahme der GAG-Synthese und der AP-Aktivität. Darüber hinaus führt es zu einer Zunahme des Kollagens Typ X, ebenso des Kollagens Typ IIa und der *SRY (sex determining region Y)-box 9 (Sox9)*, welche als Marker der frühen Chondrozyten-differenzierung gelten. Das RGS10 selber wird während der chondrogenen Entwicklung verstärkt gebildet. Somit werden unterschiedliche Parameter jeweils von mehreren RGS-Molekülen beeinflusst, zum Teil mit übereinstimmenden, zum Teil mit entgegengesetzten Effekten (Appleton et al. 2006).

1.4 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Die Reparaturmechanismen des Knorpels sind sehr begrenzt. Das entstehende Gewebe weist aufgrund einer veränderten Zusammensetzung eine verminderte Belastbarkeit auf. Die einzige Therapie im Falle einer Osteoarthritis stellt bisher der vollständige mechanische Ersatz eines Gelenkes mittels Totalendoprothese dar.

Seit Jahrzehnten wird versucht, Verfahren zu etablieren, die einen Aufbau von Knorpelgewebe stimulieren. Dies erwies sich jedoch bisher als nicht erfolgsversprechend. Eine Möglichkeit stellt das Pradie-Drilling dar, bei welchem ein Zugang zu dem unter dem Knorpel befindlichen Knochen und dem Knochenmark geschaffen wird. Ziel hierbei ist die Nutzung von MSCs für die Produktion von Knorpelgewebe. Es gelang kürzlich der Arbeitsgruppe um Miosge et al. der Nachweis chondrogener Progenitorzellen im osteoarthrotischen Knorpel, welchen eine herausragende Rolle in der Reparatur geschädigten Knorpelgewebes zugesprochen wird. Da diese ein gutes chondrogenes Potenzial besitzen, stellen sie einen neuen Angriffspunkt in der Knorpelreparatur dar. Appleton gelang es 2006 zu zeigen, dass die RGS-Moleküle 4,5,7 und 10 einen unterschiedlichen Einfluss auf die chondrogene Differenzierung ausüben. Somit stellt sich die Frage, ob RGS4 und RGS10 auch im osteoarthrotisch veränderten Knorpel und in den chondrogenen Progenitorzellen nachgewiesen werden können.

Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis von RGS4 und RGS10 sowohl im osteoarthrotischen Knorpel als auch in den chondrogenen Progenitorzellen. Auf diese Weise sollen neue Erkenntnisse für die molekularen Abläufe innerhalb von CPCs und in den pathologischen Vorgängen der Osteoarthritis gewonnen werden. Dies ist insbesondere für eine Beeinflussung der chondrogenen Entwicklung durch RGS-Proteine notwendig, damit zukünftig durch diese neue Therapiestrategien zur Knorpelbildung und somit neue Ansätze zur Behandlung der Osteoarthritis etabliert werden können.

2. Material und Methoden

2.1 Probengewinnung

Die zu untersuchenden Gewebeproben stammen von sieben Patienten im Alter zwischen 49 und 82 Lebensjahren, welche aufgrund einer fortgeschrittenen Osteoarthrose eine Knie-Totalendoprothese erhalten hatten. Sie gaben nach sorgfältiger Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis für die Entnahme der Proben zu Forschungszwecken. Die Genehmigung der Studie erfolgte durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen unter der Antragsnummer 25/12/10.

Die operativ entfernten Knieanteile wurden in einem autoklavierten Behälter in 50 ml Medium aus DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) + GlutaMAX (GIBCO, Invitrogen, Paisley, UK) und 50 ml PBS (Sigma- Aldrich, Steinheim, DE) überführt. Im Labor erfolgte die weitere Bearbeitung der Gewebeprobe unter sterilen Bedingungen an der Zellbank. Bevor Gewebeproben aus den operativ gewonnenen Knien entnommen wurden, wurde der Knorpel in Hinblick auf Schwere des Knorpelschadens und Gefäßeinsprossungen inspiziert. Für die Inspektion wurden die Proben in einer mit PBS (10%) befüllten Petrischale gegeben, um ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern.

Tabelle 1: Zusammensetzung PBS 10%

Inhalstoff	Menge
NaCl	81,8 g
Na ₂ HPO ₄ (AppliChem, Darmstadt, DE)	16,0 g
KCl	2,0 g
KH ₂ HPO ₄ (Merck, Darmstadt, DE)	2,0 g
auffüllen auf 1 Liter mit dest. Wasser	
pH 7,4	

Nachfolgend wurden die Proben für die Gewinnung von CPCs entnommen. Hierbei wurden in der Übergangszone zwischen dem gesunden und dem defekten Gewebe Knorpel-Chips (ca. 2x2 mm) per Skalpell (Feather, Osaka, Japan) entfernt. Diese wurden in eine Zellkulturflasche (Sarstedt, Newton, USA) in DMEM-Medium überführt und in einem Brutschrank für 10 Tage bewegungsfrei inkubiert. Dabei war zuvor dem DMEM-Medium Gentamycin (PromoCell, Heidelberg, DE) und FCS (GIBCO, Paisley, UK) beigefügt worden.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Inkubationsmediums

Inhaltsstoff	Menge
DMEM	450 ml
Gentamycin	5 ml
FCS	45 ml

Nach einer Inkubationszeit von 10 Tagen waren lichtmikroskopisch die aus den Knorpelchips migrierenden CPCs zu sehen, sodass die Knorpelchips per Ausschütten des DMEM-Mediums entfernt werden konnten. Um ein Wachstum der CPCs in Zellclustern zu verhindern, erfolgte mittels Zellschaber (Sarstedt, Newton, USA) eine mechanische Lösung der CPCs von der Oberfläche der Zellkulturflasche. Anschließend wurden die CPCs über den gesamten Boden der Zellkulturflasche verteilt und in der Zellkultur belassen.

Auch die Gewebeproben für die Immunhistochemie wurden aus den operativ entfernten Knien gewonnen. Dabei erfolgte für die Immunhistochemie eine Gewebeprobenentnahme aus dem Übergangsbereich angrenzend an die Defektzone. Die Entnahme der Gewebeproben erfolgte mittels Pinzette und Skalpell (Feather, Osaka, Japan), indem der Knorpel in vertikaler Schnittführung entfernt und anschließend in Formalinpuffer nach Lillie überführt wurde (weiteres Vorgehen siehe Abschnitt 2.3.1).

2.2. Zellkultur

Damit die CPCs optimal wachsen, müssen sie in der Zellkultur unter bestimmten Bedingungen gehalten werden. Die optimale Temperatur liegt bei 37 °C, der CO₂-Gehalt der Luft sollte 5% betragen. Jedoch muss durch diese Bedingungen besonders auf Sterilität geachtet werden, da die vorherrschenden Bedingungen auch Bakterienwachstum fördern. Somit müssen alle für die Zellkultur benutzten Objekte desinfiziert und autoklaviert sein. Auch wurde die Zellkultur einmal wöchentlich über Nacht mit UV-Licht bestrahlt, um ein Wachstum von Bakterien zu verhindern.

Das Nährmedium bestand aus DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), welchem 45 ml BSA (*Bovine serum albumin*) und 5 ml Gentamycin (PromoCell, Heidelberg, DE) zugesetzt wurden. Alle drei bis vier Tage erfolgte ein Wechsel des Nährmediums. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen lichtmikroskopisch (Carl Zeiss, Göttingen, DE) beurteilt, sowohl um das Wachstum zu überwachen als auch um eine mögliche bakterielle Kontamination frühzeitig zu detektieren. Erreichten die Zellen eine Konfluenz von 80%, so wurden sie auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Dieser Vorgang wird „Passagieren“ genannt. Ein weiteres Wachstum über 80% hinaus sollte auf jeden Fall vermieden werden, da die Zellen sich bei

einem dichteren Wachstum differenzieren, was nachteilig bezüglich der weiteren Versuche wäre.

Um die Zellen zu passagieren, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimalig mittels PBS gewaschen, damit alle verbliebenen Proteinreste des Nährmediums vollständig entfernt wurden. Anschließend wurden die Zellen für 4 min bei 37 °C mit Trypsin (PAN Biotech, Aidenbach, DE) inkubiert. Durch diesen Vorgang lösen sich die Zellen von der Oberfläche der Zellkulturflasche. Die Reaktion wurde mit der äquivalenten Menge an DMEM-Medium gestoppt und die nun im DMEM gelösten Zellen mittels Pipette in ein 50 ml Falcon-Tube-Röhrchen überführt. Durch vorsichtiges Beklopfen der Zellkulturflasche konnten noch an der Oberfläche haftende Zellen mobilisiert und durch Spülen mittels DMEM-Mediums dem Falcon-Tube-Röhrchen zugeführt werden. Die Zellen wurden für 10 min bei 1200 rcf zentrifugiert (Zentrifuge 5810, Eppendorf, DE). Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 1000 µl Medium bzw. 1000 µl PBS resuspendiert und 20 µl der Probe wurden im Zellometer (Cellometer Auto T4 Cell Counter, Nexcelom Bioscience, Lawrence, USA) gezählt, sodass die Konzentration der Zellen bestimmt wurde. Für ein weiteres Kultivieren der Zellen wurden diese in einer Zellzahl von 70 000 bis 100 000 Zellen in 10 ml Nährmedium resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen überführt.

Bei denjenigen Zellen, welche eingefroren werden sollten, wurde der Überstand nach dem Abzentrifugieren abpipettiert. Die Zellen wurden nach erfolgter Dokumentation der Patientennummer, der Passagennummer und des Datums bei -81 °C eingefroren.

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Präparation des Gewebes für die Immunhistochemie: Fixierung, Entkalkifizierung, Dehydrierung, Einbettung, Schneiden

Nach der Entnahme wurden die Proben in je 50 ml Formalinpuffer nach Lilie überführt, in welchem sie bei 4 °C über Nacht inkubierten (mindestens 6 Stunden, maximal 16 Stunden). Dabei war wichtig, dass die Proben lichtgeschützt gelagert wurden. Bei dem Formalinpuffer nach Lilie handelt es sich um eine Lösung aus 3,7%igem Formaldehyd und Sörensen-Puffer. Dieser Vorgang dient der Fixierung des Gewebes und stoppt die sonst beginnende Zersetzung des Gewebes durch Autolyse.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Sörensen-Puffers

Lösung	Zusammensetzung	
Sörensen-Puffer:	0,3 M (182 ml Lösung A + 818 ml Lösung B)	
Lösung A:	20,42 g KH ₂ PO ₄	mit dest. Wasser auf 500 ml auffüllen
Lösung B:	85,18 g Na ₂ HPO ₄	mit dest. Wasser auf 2 l auffüllen

Tabelle 4: Zusammensetzung des Formalinpuffers nach Lilie

Lösung	Menge
37% Formalin (Roth, Karlsruhe, DE)	32,4 ml
Sörensen-Puffer 0,3 M	100 ml
Mit H ₂ O auf 300 ml auffüllen	

Für die darauf folgende Entkalkung des Knorpels und der Knochen wurden die Gewebeproben für ungefähr 4 Wochen in 20%igem EDTA (Roth, Karlsruhe, DE) gelagert, wobei anfangs ein tägliches Wechseln der EDTA-Lösung erfolgen musste. EDTA bindet als Chelator Calciumionen und sorgt somit für eine Entkalkung des Gewebes. Für diesen Vorgang wurde jede Probe einzeln in ein Falcon-Tube-Röhrchen mit 50 ml EDTA-Lösung gegeben.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Entkalkerlösung (20%EDTA)

Lösung	Menge
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	400 g
mit H ₂ O auf 1700 ml auffüllen	
NaOH (5N)	210 ml
bei 50-70 °C für 1-2 Stunden rühren	
pH auf 7,4 einstellen	

Da die Reaktion lichtgeschützt ablaufen musste, wurden die Röhrchen mit Aluminiumfolie umwickelt. Ab der zweiten Entkalkungswoche reichte ein Wechsel der EDTA-Lösung alle zwei Tage, ab der dritten Entkalkungswoche alle drei Tage. Den Fortschritt der Entkalkung überprüfte man anhand der Gewebefestigkeit mittel einer Präpariernadel. Die Entkalkung war abgeschlossen, wenn die Präpariernadel gut in das Gewebe eingebracht werden konnte. Die

Material und Methoden

Dauer der Entkalkung ist abhängig von der Art des Gewebes und der Größe der Gewebeprobe.

Nach vollständiger Entkalkung wurde die Probe je 2x10 min mit Leitungswasser gewaschen. Anschließend erfolgte eine Dehydrierung in aufsteigender Ethanolreihe. Dabei wird das im Gewebe gebundene Wasser durch Ethanol ersetzt. Die Dehydrierung der Proben wurde mit Hilfe des Einbettautomatens (Duplex Processor, Shandon Elliot, Cheshire, UK) und des folgenden Protokolls durchgeführt:

Tabelle 6: Protokoll des Einbettautomatens

Schritt	Chemikalie	Dauer
1	70 % Ethanol	3 std
2	80 % Ethanol	1 std
3	90 % Ethanol	1 std
4	96 % Ethanol	1 std
5	100% Ethanol	2 std
6	Isopropylalkohol	2 std
7	Isopropylalkohol	1,5 std
8	Xylol	30 min
9	Xylol	45 min
10	Xylol	45 min
11	Paraplast Plus	30 min
12	Paraplast Plus	7 std bei 60 °C

Nach Abschluss der Dehydrierung konnte die Einbettung in Paraffin (ThermoScientific, Cheshire, UK) erfolgen. Dies erfolgte in Metallformen, in welche man die Gewebeprobe platzierte und anschließend mit dem heißen flüssigen Paraffin übergoss. Nun folgte das Aushärten des Paraffin bei Raumtemperatur über 24 Stunden.

Die ausgehärteten Paraffin-Gewebeblöcke wurden mittels Mikrotom (Leica, Nusslock, DE) in 5-6 µm dünne Schnitte geschnitten und anschließend zur Glättung in ein ca. 35 °C warmes Wasserbad überführt. Anschließend platzierte man die nun glatten Schnitte auf einen Objektträger (Thermo Scientific, Braunschweig, DE), um sie auf einer Wärmeplatte (Heraeus, Hanau, DE) bei 42 °C für ca. 30 min zu trocknen. Nachfolgend wurden die Schnitte für 48 Stunden bei 37 °C in einem Wärmeschrank (Heraeus, Hanau, DE) getrocknet und standen nun für die immunhistochemischen Färbungen zur Verfügung.

2.3.2 HE-Färbung von Gewebeschnitten

Vor der eigentlichen immunhistochemischen Färbung der Schnitte mit den jeweiligen Antikörpern wurde zur Übersicht und zur Beurteilung der Gewebeproben eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) durchgeführt. In der HE-Färbung werden mittels des Hämalaun (Merck, Darmstadt, DE) alle basophilen Strukturen, wie beispielsweise die DNA der Zellkerne, blau gefärbt. Zum anderen färbt der Farbstoff Eosin (Roth, Karlsruhe, DE) alle azidophilen Strukturen, bspw. Zellplasmabestandteile, rot. Die HE-Färbung erfolgte mittels des Färbeautomaten (Diapath, Martinego, IT) nach dem folgenden Protokoll:

Tabelle 7: Protokoll der HE-Färbung mittels Färbeautomaten

Schritt	Chemikalie	Dauer
1	Xylol	5 min
2	100% Ethanol	2 min
3	80% Ethanol	2 min
4	Aqua dest.	2 min
5	Hämalaun	4 min
6	Aqua dest.	1 min
7	fließend Wasser	15 min
8	Eosin	7 min
9	Aqua dest.	1 min
10	60% Ethanol	1 min
11	80% Ethanol	1 min
12	100% Ethanol	2 min
13	Xylol	3 min

Nach Abschluss der HE-Färbung wurden die Schnitte mit Eukitt (Sigma Aldrich, Steinheim, DE) überzogen und mit einem Deckglas (Thermo Scientific, Braunschweig, DE) eingedeckt.

2.3.3 Nachweis der RGS-Proteine mittels Immunhistochemie

Theorie zur Methode: Bei der Immunhistochemie handelt es sich um eine Methode, in der eine Antigen-Antikörperreaktion genutzt wird, um bestimmte Proteine im Gewebe nachzuweisen. Dabei wird zuerst das Gewebe mit dem primären Antikörper (AK) inkubiert, welcher spezifisch an das gesuchte Antigen bindet. Darauf erfolgt die Zugabe des sogenannten Sekundärantikörpers, welcher an den Primärantikörper bindet und an welchem ein Polymer gebunden ist. An dieses Polymer ist ein Enzym gekoppelt, in diesem Falle die alkalische Phosphatase (AP). Nach Zugabe des Substrates Chromogen, welches von der AP

Material und Methoden

umgesetzt wird, kommt es zu einer Rotfärbung derjenigen Strukturen, an welche der primäre Antikörper gebunden hat. Durch diese chemische Reaktion werden spezifisch einzelne Moleküle für die mikroskopische Betrachtung sichtbar gemacht. Als Vorbereitung der Antikörperbindung muss das Gewebe zuerst den Antikörpern zugänglich gemacht werden. Dies bedeutet, dass das Gewebe von dem Paraffin befreit und rehydriert werden muss, damit anschließend die Quartärstruktur wieder hergestellt werden kann. Damit die darzustellenden Antigene frei an der Oberfläche liegen, muss zuvor ein Verdau des Gewebes stattfinden.

Protokoll: Um die Schnitte für die Färbung vorzubereiten, durchliefen diese zuerst die absteigende Ethanolreihe. Dadurch wurde das Paraffin entfernt und dem Gewebe wurde wieder Wasser zugeführt. Dabei wurden die Schnitte für je 10 min zuerst zweimal in Xylol gesetzt, anschließend je 5 min in 100%igem, 90%igem, 80%igem, 60%igem und zuletzt in 50%igem Alkohol. Um die Schnitte zu waschen, wurden sie dreimal für je 10 min in eine Küvette mit je 20 mM TBS-Puffer mit 0,05% Tween (TBS-T) gesetzt.

Tabelle 08: Zusammensetzung TBS-T (10fach)

Inhaltsstoff	Menge
200 mM Tris MG 121,14	24,2 g
1,5 M NaCl MG 58,44	87,6 g
0,5 % Tween 20	5 g
Vor der Tween-Zugabe muss der pH auf 7,4 eingestellt werden. Auffüllen mit dest. Wasser auf 1000 ml.	

Um im Gewebe die endogene Phosphatase zu blocken, welche ebenfalls mit dem zugegebenen Substrat Chromogen eine chemische Reaktion eingehen würde und somit zu einer unspezifischen Reaktion führt, wurden die Schnitte für 30 min mit dem Universalblock (KPL, Gaithersburg, USA) inkubiert. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgte jeweils ein dreifacher Waschschrift der Schnitte für je 5 min in TBS-T. Damit die Proteine der Gewebeschnitte wieder ihre Quartärstruktur einnehmen, wurden die Schnitte für 20 min bei 60 °C im Wasserbad mit Protaq (BIOCYC, Luckenwalde, DE) inkubiert. Um das Gewebe anzudauen, sodass die Proteine im Gewebe freiliegen, wurden die Schnitte nun für 5 min mit Hyaluronidase (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE), Chondroitinase (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) sowie Protease 24 (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) inkubiert und anschließend erneut dreimal gewaschen.

Tabelle 09: Zusammensetzung Protease 24

Inhaltsstoff	Menge
Aqua dest	45 ml
Tris-HCl 0,05 M pH7,6	5 ml
Protease XXIV (Sigma P8038)	25 mg
CaCl ₂	25 mg

Um die Spezifität der AK zu erhöhen, wurden die Schnitte für 10 min mit 1% BSA-TBS geblockt. Anschließend erfolgte die Zugabe des primären Antikörpers und die anschließende Inkubation in einer Feuchtkammer. Die Konzentration des primären AK und die Dauer der Inkubationszeit variierte dabei zwischen den jeweiligen primären Antikörpern. Für die Färbung des RGS4 und RGS10 wurde eine Verdünnung von 1/50 und eine Inkubationszeit von 16 Stunden bei Raumtemperatur (RT) gewählt.

Tabelle 10: Antikörperliste

Primärer AK	aus	Firma/Bezeichnung	Verdünnung in IHC
RGS4	Kaninchen, polyklonal	Proteintech 14530-1-AP	1/50 16 std. bei RT
RGS10	Maus, monoklonal	Santa Cruz A-8 (sc-46679)	1/50 16 std. bei RT

Nach der Bindung des primären AK war ein dreifacher Waschschrift je 5 min mit TBS-T unbedingt notwendig, damit alle Antikörper, welche nicht spezifisch gebunden haben, von den Schnitten entfernt werden. Um die Spezifität des sekundären Antikörpers zu erhöhen, erfolgte ein Blockvorgang mit DAKO Block S3022 (Dako, Carpinteria, USA) für 5 min in der Feuchtkammer. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl pro Schnitt des HiDef Amplifiers (HiDef Detection Alk Phos Polymer System von Cell Marque) für 10 min, welcher dem Sekundärantikörper entspricht. Erneut wurden die Schnitte dreimal je 3 min mit TBS-T gewaschen. Nun wurde auf die Schnitte je 100 µl des HiDef Polymer (HiDef Detection Alk Phos Polymer System von Cell Marque) pipettiert, an welches das Enzym AP gekoppelt ist. Die Inkubationszeit hierfür betrug 10 min. Nach einem erneuten dreifachen Waschgang mit TBS-T wurden je 100 µl einer Chromogenlösung (Diagnostic BioSystem, Pleasanton, USA) auf die Schnitte gegeben, welche das Substrat beinhaltet. Da es sich bei der Chromogenlösung um eine lichtempfindliche Substanz handelt, musste die Reaktion in einer abgedunkelten Feuchtkammer stattfinden. Alle 2-3 min wurde die Färbung der Schnitte beurteilt. Kam es zu einer Rotfärbung als Ausdruck der stattgehabten chemischen Reaktion, wurden die Schnitte dreimal mit TBS-T gewaschen. Anschließend erfolgte ein 2-3 minütiges

Material und Methoden

Gegenfärben der Schnitte mit Hämalaun (Merck, Darmstadt, DE) 1/4 verdünnt mit Aqua dest., welches die Zellkerne blau färbt. Um das Hämalaun zu aktivieren, wurden die Schnitte für ca. 15 min unter fließendes Wasser gehalten. Nun wurden die Schnitte noch in der aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert. Dabei durchliefen sie die Schritte zu Beginn der Färbung in umgekehrter Reihenfolge mit 50%igem Alkohol, 60%igem Alkohol, 80%igem Alkohol, 90%igem Alkohol, 100%igem Alkohol, Xylol für je 10 min. Zuletzt verblieben die Schnitte für 15 Min in Xylol, bevor sie mit Eukit-Mounting Medium (Sigma Aldrich, Steinheim, DE) bedeckt und mit Deckgläschen (Thermo Scientific, Braunschweig, DE) gedeckelt wurden.

2.4 Lichtmikroskopische Immunfluoreszenz

Theorie zur Methode: Bei der Immunfluoreszenz handelt es sich um eine Methode, bei der eine Antigen-Antikörper-Reaktion genutzt wird, um intrazelluläre oder membrangebundene Proteine in Zellen nachzuweisen. Dabei wird ein primärer Antikörper verwendet, welcher sich spezifisch gegen ein gesuchtes Antigen richtet. An diesen bindet ein Sekundärantikörper, an den ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Anschließend kann der fluoreszierende Farbstoff mittels UV-Licht unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden. Zusätzlich wird der Kern der Zellen mittels DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindole) gefärbt. Dabei bindet DAPI als interkalierende fluoreszierende Substanz an AT-reiche Regionen der DNA. In dieser Arbeit wurde die Methode verwendet, um das RGS4 und RGS10 in CPCs nachzuweisen und deren Lokalisation innerhalb der Zellen zu beurteilen. Um die Spezifität des sekundären Antikörpers zu prüfen, durchlaufen zeitgleich Negativkontrollen dieselbe Prozedur mit Ausnahme der Hinzugabe des primären Antikörpers. Auf diese Weise kann sichergestellt werden, dass es zu keiner unspezifischen Bindung des sekundären AK kommt und somit die Ergebnisse verfälscht werden.

Protokoll: Für die Immunfluoreszenz wurden CPCs aus den Zellkulturflaschen wie oben bereits beschrieben geerntet, in PBS resuspendiert und mittels Zellometer gezählt (siehe Abschnitt Zellkultur). Für die Vorbereitung wurden sterile Deckgläschen (Thermo Scientific Braunschweig, DE) mit einem Durchmesser von 12 mm in die Wells einer 24-Well-Platte (Sarstedt, USA) gelegt. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 5000 Zellen pro Well in je 1 ml DMEM-Medium auf die 24-Well-Platte ausgesät und auf dieser für mehrere Tage in dem Brutschrank bei 37 °C kultiviert, bis die Zellen auf der Platte eine ausreichende Konfluenz erreicht hatten. Für die immunzytochemische Färbung wurden die Deckgläschen von der 24-Well-Platte auf einen sterilen Untergrund überführt. Zunächst erfolgte ein zweifacher Waschschrift. Dafür wurde jedes einzelne Deckgläschen zweimal mit je 100 µl PBS gewaschen, anschließend wurde das PBS unter Verwendung der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Um die Zellen auf dem Deckgläschen zu fixieren, wurden sie für 15 min mit je 100 µl 2%igem Paraformaldehyd in PBS (Roth, Karlsruhe, DE) bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 11 : Zusammensetzung 2% Paraformaldehyd in PBS

Inhaltsstoff	Menge
Paraformaldehyd	0,5 g
PBS	25 ml
In einem 50-ml-Röhrchen im Wasserbad bei 70 °C lösen	

Anschließend erfolgte erneut ein zweifach durchgeführter Waschschrift mit PBS. Um bei den

Zellen eine Permeabilisierung der Zellmembran zu erreichen und sie somit für den Antikörper zugänglich zu machen, wurden sie für 10 min mit je 250 µl 0,25%igen Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) pro Deckgläschen behandelt, welches nachfolgend durch einen zweifachen Waschschrift mit PBS von dem Deckgläschen entfernt wurde.

Tabelle 12: Zusammensetzung 0,25% Triton X-100 in PBS

Inhaltsstoff	Menge
Triton X-100	0,125 g
PBS	50 ml
Lösen im Wasserbad bei 70 °C	

Anschließend wurden die Zellen für 15 min mit 250 µl 1%igen BSA in PBS pro Deckglas geblockt, was eine unspezifische Bindung des Antikörpers verringern soll.

Tabelle 13: Zusammensetzung 1% BSA in PBS

Inhaltsstoff	Menge
BSA	0,5 g
PBS	50 ml

Erneut wurden die Zellen zweifach mit PBS gewaschen, bevor der primäre Antikörper in einer Verdünnung von 1/50 in PBS mit je 100 µl pro Deckgläschen hinzugegeben wurde und die mit dem Antikörper versetzten Zellen im Wärmeschrank für 60 min bei 37 °C inkubierten. Die Negativkontrollen wurden anstelle des Antikörpers mit 200 µl der 1%igen BSA-PBS-Lösung versetzt und inkubierten ebenfalls 60 min bei 37 °C im Wärmeschrank. Nach einem dreifachen Waschgang sowohl der Proben als auch der Negativkontrollen mit PBS wurde der sekundäre Antikörper 1/100 in PBS verdünnt auf alle Deckgläschen aufgetragen. Die mit dem sekundären Antikörper versetzten Zellen inkubierten 30 min bei 37 °C. Der sekundäre Antikörper war bereits mit einem Fluoreszenzfarbstoff (mit Dylight488 oder Dylight549) markiert. Dylight488 emittiert nach Anregung mittels Licht der Wellenlänge 493 nm ein Licht der Wellenlänge 518 nm und erscheint damit grün. Die Anregung des Dylight549 erfolgt bei 593 nm unter Emission von Licht der Wellenlänge 618 nm, wodurch der Fluoreszenzfarbstoff rot erscheint. Nach Absaugen des sekundären Antikörpers und einem erneuten zweimaligen Waschen der Zellen mit PBS, wurden die Zellen für 5 min mit DAPI (KPL, Gaithersburg, USA) in einer Verdünnung in destillierten Wasser von 1/1000 gegengefärbt. Wie oben bereits beschrieben handelt es sich um einen interkalierenden Farbstoff, welcher an AT-reiche DNA bindet und somit den Zellkern färbt. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem Fluorescence Mounting Medium (DAKO, Carpinteria, USA) auf einem

Material und Methoden

Objektträger eingedeckt und anschließend zum Trocknen lichtgeschützt bei 4 °C über Nacht im Kühlschrank verwahrt, damit am folgenden Tag eine Beurteilung der Immunreaktion am Fluoreszenzmikroskop möglich war. Abschließend wurden sowohl die Zellen mit Primär- und Sekundärantikörper als auch die Negativkontrolle unter dem Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung der Kamera Nikon D90 (Tokyo, JPN) fotografiert.

Tabelle 14: Verwendete Primärantikörper

Bezeichnung	Firma/ Nummer	Herkunft	Verdünnung	Inkubationszeit
RGS4	Santa Cruz H-40 (sc-98933)	Kaninchen	1/50	60 min bei RT
RGS10	Santa Cruz C-20 (sc-6206)	Ziege	1/50	60 min bei RT

Tabelle 15: Verwendete Sekundärantikörper

Bezeichnung	Firma/ Nummer	Herkunft	Verdünnung	Inkubationszeit
Dylight549	KPL: 072-04-15-06	Ziege, IgG anti- Kaninchen	1:100	30 min bei RT
Dylight488	KPL: 072-03-13-06	Kaninchen, IgG anti-Ziege	1:100	30 min bei RT

2.5 Real-time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

2.5.1 Vorbereitende Methoden: mRNA-Isolierung aus primären Zellen

Theorie zur Methode: Die Gewinnung der mRNA erfolgte aus den CPCs, welche aus der Zellkultur durch Trypsinierung gewonnen wurden (siehe Abschnitt Zellkultur). Für die Isolierung wurde das Rneasy Mini Kit der Firma Qiagen (Qiagen RNeasy Minikit Cat. No.74106) verwendet, welches auf dem Prinzip von hydrophilen Siliziumdioxidsäulen und der Verwendung verschiedener Puffer beruht. Die mRNA wird dabei per Zentrifugation in den Siliziumdioxidsäulen von den restlichen Zellkomponenten gereinigt. Außerdem wird die RNA von derjenigen RNA getrennt, welche kleiner als 200 Nukleotide ist. Dies betrifft zum Beispiel 5s-rRNA und die tRNA, welche insgesamt 15-20% der Gesamt-RNA ausmachen. Die Trennung der DNA erfolgt durch Ausfällen nach Zugabe von Ethanol. Für die mRNA-Isolierung wurden das Protokoll des Herstellers genutzt.

Das Kit beinhaltet dafür Rneasy Mini-Säulen, Qiagen-Shredder, RLT-Puffer, RW1-Puffer, RPE-Puffer, RNase-freies Wasser. Der RLT-Puffer enthält Guanidin-Thiocyanat, welches hochdenaturierend wirkt und die RNAsen inaktiviert, der RW1-Puffer enthält Ethanol und Guanidin-Thiocyanat.

Protokoll: Die zuvor geernteten CPCs befanden sich nach erfolgter Zentrifugation in einem Eppendorfcup. Durch Zugabe von 350 µl RLT-Puffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol (β-ME) wurden die Zellen lysiert und die RNAsen inaktiviert. Hierfür ist entscheidend, dass sich kein Medium mehr in dem Eppendorfcup befindet, da sonst die dort enthaltenen Proteine die Lysis verhindern. Aufgrund des hinzugefügten β-ME mussten alle weiteren Arbeiten unter dem Abzug erfolgen. Die Mischung aus Zellen, RLT-Puffer und β-ME mussten anschließend durch Vortexen vermischt werden und darauf folgend 2 min bei RT inkubieren. Das Lysat wurde auf die Qiagen-Shredder pipettiert und 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, wodurch die restlichen Zellbestandteile als „Zellschrott“ an der Membran des Qiagen-Shredders haften blieben und mit dem Qiagen-Shredder entsorgt werden konnten. Die mRNA und die DNA befanden sich im Durchfluss. Die Zugabe von 70%igem Ethanol in gleicher Volumenmenge fällte die DNA durch Verdrängen der Hydrathülle von den Phosphatresten aus. Die Lösung wurde auf die Rneasy Mini-Säule pipettiert und für 30 Sekunden bei 10 000 rpm zentrifugiert, wobei die mRNA in der Säule verblieb, sodass nun der Überstand verworfen wurde. Die Säule wurde mehrfach mit zwei verschiedenen Pufferlösungen gewaschen, zuerst mit 700 µl RW1-Puffer, darauf folgend zweifach mit 500 µl RPE-Puffer. Zwischen den einzelnen Waschschrritten wurde die Säule für 30 Sekunden bei 10 000 rpm zentrifugiert, wodurch die mRNA von übrig gebliebenen Zellbestandteilen und DNA gereinigt wurde. Damit das Ethanol vollständig verdampfte, wurde die Säule in ein neues

Material und Methoden

2-ml-Sammelröhren überführt und für eine Minute bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Zum Lösen der mRNA aus der Säule wurde diese in ein 1,5-ml-Eppendorfcup überführt und nach Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wassers für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Säule für 1 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert, wodurch sich die mRNA von der Säule löst und sich somit in dem Durchfluss befand. Für die weitere Verwendung der mRNA musste diese auf Eis gelagert werden, damit deren Abbau vermieden wurde.

Die Bestimmung der Konzentration der mRNA erfolgte durch den Nanodrop 1000 der Firma Thermo Scientific (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE). Dabei wurde die Konzentration der mRNA spektrometrisch bei einer Emission von 220 nm bis 750 nm bestimmt. Anschließend wurde dessen Reinheit durch den Quotienten 260nm/280nm und 260nm/230nm bestimmt. Die Konzentration wurde gegen das RNase-freie Wasser gemessen, in welcher die mRNA gelöst vorlag. Dafür wurde zuerst zur Eichung die Konzentration von 2 µl RNase-freien Wassers bestimmt. Anschließend wurden 2 µl der mRNA-Probe gemessen und mit den Werten des RNase-freien Wassers verrechnet. Die Konzentration wird in ng/µl angegeben, die Reinheit ist als Quotient dimensionslos und sollte bei 260/280 zwischen 1,8 und 2,2 liegen.

2.5.2 cDNA-Synthesierung

Theorie zur Methode: Für den Vorgang der cDNA-Synthesierung macht man sich die Reverse Transkriptase zu nutze, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche aus Retroviren stammt. Diese nutzt die RNA-Stränge, um an ihnen den komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Diese Reaktion findet bei 42 °C statt. Anschließend werden die mRNA und der komplementäre cDNA-Strang bei 95 °C voneinander getrennt.

Für die Synthesierung wurde das Quanti Tect Reverse Transkription Kit der Firma Qiagen genutzt (Cat.No 205313). Das Kit beinhaltet gDNA-Wipeout-Puffer-7x, welcher mittels DNAsen die restliche verbliebene genomische DNA zerstört. Als weiterer Inhalt besteht die Quantiscript Reverse Transcriptase aus den heterodimeren Enzymen „omniscrypt“ und „sensiscrypt“ Reverse Transcriptase, sowie RNase-Inhibitoren. Der Quantiscript RT Buffer optimiert die Reaktionsbedingungen und enthält die dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphate). Des Weiteren ist der RT Primer Mix mit oligo-dT (entspricht dem Oligo-Desoxythymidine) und Primern, sowie RNase-freies Wasser enthalten. Es wurde das Protokoll des Herstellers verwendet.

Ziel der Umschreibung ist es eine cDNA-Konzentration von 200ng/200µl zu erhalten (bzw. 1 ng/µl). Dafür wird das Volumen der mRNA errechnet, welches erforderlich ist, um die gewünschte Konzentration der cDNA zu ergeben. Die Konzentration der mRNA ist im

Material und Methoden

vorherigen Schritt mittels Nanodrop1000 bestimmt worden, die Konzentration der cDNA soll 200ng/200µl betragen. Unter der Annahme, dass bei dem Umschreiben der mRNA die äquivalente Menge an cDNA gewonnen wird, errechnet man das erforderliche Volumen der mRNA, welches die mRNA-Menge von 200 ng beinhaltet. Unter Verwendung von $c=n/v$ bzw. nach Umformen $v= n/c$ kann die Menge $n=200$ ng und die bestimmte mRNA-Konzentration eingesetzt werden, um das benötigte Volumen zu erhalten.

Protokoll: Für jede Probe wurde nun in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß das errechnete Volumen $x\mu$ l mRNA und 2 µl gDNA-wipe-out-Puffer-7x pipettiert, welches die übrige gDNA aus der mRNA Probe eliminierte. Im folgenden Schritt wurde die Probe mit RNase-freiem Wasser auf 14 µl aufgefüllt und für 2 min bei 42 °C erhitzt, wodurch die restliche DNA verdaut wurde. Anschließend wurden zu der Lösung 4 µl des RT-Transkriptionspuffers und je 1 µl der RT-Transkriptase und des RT-Primer-Mix pipettiert. Die Lösung wurde nun 15 min bei 42 °C inkubiert. In dieser Zeit fand die Synthetisierung der komplementären DNA an der mRNA statt. Anschließend wurde die Lösung für 3 min auf 95 °C erhitzt, wodurch die Reverse Transkriptase inaktiviert wurde und sich der cDNA-Strang von dem mRNA-Strang trennte. Um die gewünschte Konzentration von 200ng/200µl zu erhalten, musste die Probe abschließend noch mit RNase-freiem Wasser auf 200 µl aufgefüllt werden. Die cDNA konnte anschließend bei -20 °C aufbewahrt werden.

2.5.3 Primerdesign

Die Primer zur Durchführung der RT-PCR des RGS4 und RGS10 sowie des verwendeten Housekeeping-Gens (HKG) *Peptidylprolyl isomerase1* (PPIa) wurden mit Hilfe der Software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) designed. Dafür wird mit Hilfe der Online-Gendatenbank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) die Gesamtsequenz der mRNA des zu untersuchenden Proteins eingegeben und das Programm errechnet unter Berücksichtigung von zuvor eingegebenen Parametern diejenigen Sequenzen aus, die sich für einen Forward- und einen Reverse-Primer eignen. Zu den Parametern zählen unter anderem die Länge der erwünschten Primer von 20 bis 25 Basen, eine Länge des gebildeten Produktes von 100-300 Basenpaaren und eine Temperaturdifferenz zwischen dem Forward- und dem Reverse-Primer von maximal 1 °C. Außerdem sollte der Guanin/Cytidin-Gehalt zwischen 40% und 60% liegen.

Anschließend wurden die vorgeschlagenen Primersequenzen mit Hilfe der Online-Datenbank NCBI Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) hinsichtlich möglicher Übereinstimmungen zu anderen Genen (*Alignments*) überprüft. Dies soll verhindern, dass neben dem erwünschten Gen auch die DNA anderer Gene vervielfältigt wird. Die erstellten Sequenzen wurden für die Herstellung der Firma Operon Biotechnologie GmbH (Köln, Deutschland) übermittelt, welche

anschließend die Primer produzierte. Für die Nutzung mussten die Primer abschließend nach den Herstellerangaben mit Aqua dest. resuspendiert werden.

Zuletzt muss für jeden Primer die Primereffizienz bestimmt werden. Dafür nutzt man eine Standardverdünnungsreihe, indem man die cDNA 1:2, 1:5 und 1:10 verdünnt. Die Primereffizienz sollte 2 betragen, was einer Verdopplung der cDNA pro Zyklus entspricht.

Tabelle Nr. 16: Primersequenz

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur
RGS4	<i>left Primer:</i> aga gga aag gca ttg gga gt <i>right Primer:</i> att cgc aag cag gaa aga aa	60 °C
RGS10	<i>left Primer:</i> aac cga gga aga gga aga aga <i>right Primer:</i> aat aaa aca cac act cca	55 °C
PPIa	<i>left Primer:</i> atg gca aga cca gca aga ag <i>right Primer:</i> ggg aac aag gaa aac atg ga	60 °C

2.5.4 Sequenzierung der PCR-Produkte (Methode nach Sanger)

Die Sequenzierung des PCR-Produktes dient der Überprüfung der Spezifität der ermittelten Primer. Dabei wurde die Sequenz eines DNA-Einzelstranges anhand der Kettenabbruchmethode (DNA-Sequenzierung nach Sanger) ermittelt. Die Sequenzierung des erhaltenen PCR-Produktes wurde von den Sequence-Laboratorien Göttingen GmbH durchgeführt. Nach Erhalt der Nukleotidsequenzabfolge wurde diese mittels der NCBI-Nukleotid-Datenbank erneut abgeglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) um zu überprüfen, ob die ermittelte Sequenzfolge derjenigen des Zielgenes entsprach.

2.5.5 Durchführung der quantitativen Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Theorie zur Methode: Bei der qRT-PCR handelt es sich um eine Methode zur Amplifikation und quantitativen Messung von bestimmten DNA-Sequenzen. Um diese speziellen DNA-Sequenzen zu erhalten, werden spezifische Primer eingesetzt, welche zuvor ermittelt worden waren (siehe Abschnitt Primerdesign). Es wird die cDNA eingesetzt, welche aus der mRNA der zu untersuchenden Zellen gewonnen worden war und welche somit das aktuelle Genexpressionsmuster der Zellen zum Zeitpunkt der mRNA-Präparation widerspiegelt. Für die Synthese der Doppelstrang-DNA nutzt man die hitzestabile Taq-Polymerase, welche unter Zugabe von Nukleotiden und den jeweiligen Primern den Gegenstrang synthetisiert. Zusätzlich wird dem Ansatz der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green beigegeben, welcher an die DNA-Doppelstränge bindet und durch die Emission von Licht der Wellenlänge 521 nm (grün) detektiert werden kann. Dadurch ergibt sich ein quantitativer Nachweis der pro Zyklus entstandenen cDNA-Menge.

Material und Methoden

Zuerst werden die Doppelstränge bei 95 °C voneinander getrennt (Denaturierung). Im nächsten Schritt kommt es zu der Anlagerung von Primern (*Annealing*) bei der jeweiligen zuvor ermittelten Annealing-Temperatur, welche von den Eigenschaften der Primer abhängig ist (siehe Abschnitt Gradienten-PCR). Anschließend arbeitet die Taq-Polymerase bei 72 °C und synthetisiert die Komplementärstränge (Elongation), wobei zeitgleich der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green eingebaut wird. Diese drei Arbeitsschritte wiederholen sich 45 mal. Nach Abschluss der Zyklen wird erneut die Temperatur von 72 °C für einen Zeitraum von 10 min gehalten. Dies soll ein Auffüllen von eventuellen Lücken in den Matrizen bewirken. Nach Abschluss dieser Zyklen erfolgt die Erstellung der Schmelzkurve, in welcher bei einer kontinuierlichen Messung der Fluoreszenz das PCR-Produkt von der Annealing-Temperatur ausgehend in 0,2 °C-Schritten erhitzt wird. Erreicht das PCR-Produkt die jeweilige spezifische Schmelztemperatur, so denaturieren die DNA-Doppelstränge. Durch diesen Schritt wird es für den Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green unmöglich zu binden, und es ist kein Fluoreszenzsignal mehr messbar. Die Methode dient der Überprüfung, dass nur die gewünschte DNA vorhanden ist und nicht noch weitere Nebenprodukte. Dieser Vorgang wird auch zur Bestimmung der Annealing-Temperatur genutzt (Siehe Abschnitt Gradienten-PCR).

Bei der qRT-PCR ist davon auszugehen, dass es theoretisch bei jedem Durchgang zu einer Verdopplung der DNA-Menge kommt. Durch den Einbau des SYBR-Green kann die amplifizierte DNA ab einem bestimmten Schwellenwert detektiert werden. Der Zeitpunkt, bei welchem dieser Schwellenwert erreicht wird, bezeichnet man als *ct-Wert* (*threshold cycle*). Eine starkes Fluoreszenzsignal bedeutet hierbei eine große Menge cDNA und somit einen niedrigen ct-Wert. Durch diesen reziproken Zusammenhang zwischen dem ct-Wert und der Ausgangsmenge der cDNA lassen sich Rückschlüsse auf die Genexpression des gesuchten Genes ziehen.

Protokoll: Es wurde für die RT-PCR der HotStar Taq DNA Polymerase Kit der Firma Qiagen genutzt, welches die Taq-Polymerase und einen zusätzlichen PCR-Puffer beinhaltet. Zusätzlich wurde SYBR-Green der Firma Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet, welches die Polymerase, die dNTP (10 mM) und einen 10fach PCR Puffer (15 mM MgCl₂) enthielt. Ein Primeransatz bestehend aus einem Forward- und einem Reverse-Primer wurde dabei wie folgt pipettiert:

Tabelle 17: Primer-Ansatz (10 pmol/ μ l/ Primer)

Inhaltsstoff Primeransatz	Menge
forward-Primer	20 μ l
reverse-Primer	20 μ l
RNAse-freies Wasser	160 μ l

Für je einen Ansatz wurde ein Master-Mix benötigt, welcher in einem 1,5-ml-Eppendorfcup nach dem unteren Schema pipettiert wurde. Bei Benutzung mehrerer Ansätze musste daher die benötigte Ansatzmenge ermittelt werden.

Tabelle 18: Master-Mix für einen Ansatz

Inhaltsstoff	Menge
SYBR-Green	5 μ l
Primer-Ansatz (10 pmol/ μ l/Primer)	2 μ l
RNAse-freies Wasser	2 μ l

Es wurden je 9 μ l eines Ansatzes in ein Well einer 96-Well-Platte (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE) pipettiert. Anschließend wurden zu jedem Well 1 μ l cDNA gegeben und die Wells wurden per *Optical Flat Cap* (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE) verschlossen. Die 96-Well-Platte wurde anschließend in einer Eppendorf-Zentrifuge (Eppendorf, Hamburg, DE) kurz zentrifugiert, damit sich der innen befindliche Ansatz am Boden sammelte. Für jeden Primer wurden für jede Probe je 3 Ansätze pipettiert, damit eine interne Kontrolle stattfand.

Anschließend wurde die 96-Well-Platte in die qRT-PCR (Mastercycle Realplex S, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt. Es erfolgte die Durchführung, wie im Text beschrieben, nach folgendem Protokoll:

Tabelle 19: Protokoll der qRT-PCR

Durchführungsschritte	Dauer	Temperatur in °C	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	180 Sekunden	95	
Denaturierung	15 Sekunden	95	45 Zyklen
Annealing	15 Sekunden	Temperatur je nach Primer	
Verlängerung/ Messpunkte	15 Sekunden	72	
Auffüllen der Matrizen	10 Minuten	72	

Die drei Arbeitsschritte Denaturierung - Annealing - Verlängerung (mit Rahmen umfasst) werden fünfundvierzigmal wiederholt, bevor bei 95 °C die Stränge ein letztes Mal voneinander getrennt werden und die Schmelzkurve ermittelt wird.

2.5.6 Gradienten-PCR

Theorie zur Methode: Die Gradienten-PCR dient dazu, die spezifische Annealing-Temperatur des Primers zu ermitteln. Bei der Annealing-Temperatur handelt es sich um diejenige Temperatur, bei welcher sich der Primer am besten an die komplementäre cDNA-Sequenz anlagert und somit am effektivsten arbeitet. Dies wird zum einen durch die Länge, zum anderen durch den GC-Gehalt des Primers bestimmt. Die Temperatur wird ermittelt, indem mittels einer Gradienten-PCR zwölf verschiedene Annealing-Temperaturen durchlaufen werden. Da sich die Annealing-Temperatur durch die höchste Effizienz auszeichnet, stellt sich die Schmelzkurve als höchster und schmalster Peak dar, ohne Auftreten eines zweiten Peaks. Ist in der Schmelzkurve ein zweiter Peak zu beobachten, so handelt es sich um ein Primer-Dimer, welches aufgrund seiner kurzen Nukleotidsequenz eine deutlich geringere Schmelztemperatur als das untersuchte PCR-Produkt aufweist.

Protokoll: Die Durchführung der Gradienten-PCR erfolgte mit Hilfe des Mastercycler-Gerätes der Firma Eppendorf (Hamburg, DE) nach dem Protokoll des Herstellers. Für jeden Primer wurde für jede Temperatur ein Ansatz aus dem jeweiligen Primermix, SYBR-Green, RNase-freien Wasser und der cDNA erstellt. Bei der verwendeten cDNA handelte es sich erneut um die cDNA der CPCs. Ein Ansatz wurde nach dem folgenden Schema erstellt:

Tabelle 20: Ansatz Gradienten-PCR

Inhaltsstoff	Menge pro well
Primermix (forward/reverse)	2 µl
SYBR-Green	5 µl
RNase-freies Wasser	2 µl
cDNA	1 µl

Anschließend erfolgte eine Gradienten-PCR bei 52 °C, 52,2 °C, 53,1 °C, 54,6 °C, 56,4 °C, 58,5 °C, 60,7 °C, 62,9 °C, 64,9 °C, 66,6 °C, 67,8 °C und 68,5 °C nach dem folgenden Schema:

Tabelle 21: Protokoll der Gradienten-PCR

Durchführungsschritte	Dauer	Temperatur in °C	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	180 Sekunden	95	
Denaturierung	15 Sekunden	95	45 Zyklen
Annealing	15 Sekunden	verschiedene (s.Text)	
Elongation	15 Sekunden	72	
Denaturierung	10 Sekunden	95	
Auffüllen der Matrizen	10 Minuten	72	
Schmelzkurve	je 8 Sekunden	je 0,2 °C Temperaturanstieg bis 95 °C	

Wie bereits im Theorieteil beschrieben, wurde nachfolgend diejenige Temperatur als Annealingtemperatur verwendet, welche den höchsten und schmalsten Peak in der Schmelzkurve aufweist ohne das Auftreten eines zweiten Peaks.

2.5.7 Statistik

Zuerst erfolgte die Auswertung der einzelnen PCR-Durchläufe. Dafür wurden für die drei Proben je der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die Standardabweichung muss für die drei Proben weniger als 0,5 ct-Punkte betragen, damit die Intratest-, sowie die Intertest-Variabilitätsbreite weniger als 1% beträgt.

Anschließend erfolgte die Auswertung der PCR-Ergebnisse anhand der Pfaffl-Methode (Pfaffl 2001). Dabei vergleicht man die PCR-Daten des jeweiligen Zielgenes des untersuchten Gewebes mit einem Referenzgewebe unter Normalisierung mittels eines Housekeeping-Gens

(HKG). Bei einem HKG handelt es sich um ein Gen, welches in allen Geweben des Körpers exprimiert wird. Jedes Gewebe weist dabei eine spezifische, jedoch konstante und von anderen Faktoren unabhängige Expressionsrate des HKG auf. Innerhalb dieser Arbeit erfolgte eine Normalisierung unter Verwendung der PPIa als HKG. Die PPIa wurde verwendet, da diese innerhalb der Versuche eine konstante Expression aufwies. Dabei wurde zuerst die Effizienz der PCR mittels einer Verdünnungsreihe bestimmt (siehe Abschnitt „Primerdesign“). Die Effizienz ergibt sich dabei aus der Steigung der Standardkurve. Sowohl für RGS10 als auch für das HKG ergab sich eine Effizienz der PCR von gerundet 2.

Als Ergebnis der Normalisierung erhält man den Δct -Wert. Um nun die relative Expression des Zielgenes zu errechnen, setzt man die normalisierten Daten des Zielgewebes in Verhältnis zu den normalisierten Daten eines Referenzgewebes. In dieser Arbeit wurden mesenchymale Stammzellen als Referenzgewebe verwendet. Als Ergebnis der relativen Genexpression erhält man somit den $\Delta\Delta ct$ -Wert. Zuletzt errechnet man den relativen Expressionsunterschied der Proben zwischen dem Ziel- und dem Referenzgewebe, normalisiert durch das HKG, aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta ct}$.

Hierbei stellt das RGS4 jedoch eine Ausnahme dar. Mittels PCR war in mehreren Proben kein RGS4 nachweisbar, weitere Proben wiesen einen ct-Wert > 35 auf, sodass es sich hier am ehesten um eine Amplifikation unspezifischer Nebenprodukte handelt. Es erfolgte daher in weiteren Versuchen eine Überprüfung des RGS4 Primers unter Verwendung weiterer Gewebe. So erfolgte die Wiederholung der PCR an mesenchymalen Stammzellen (MSC), sowie an Meniskus-Progenitorzellen (MPC). Auch in diesen Referenzgeweben war kein Nachweis von RGS4-cDNA möglich, sodass keine Normalisierung der PCR-Daten mittels der Methode nach Pfaffl 2001 erfolgen konnte. Daher erfolgte für das RGS4 eine Darstellung der absoluten PCR-Ergebnisse anhand Darstellung der ct-Werte.

2.6 Western Blot

Theorie zur Methode: Der Western Blot (Immunoblot) dient der Auftrennung eines Proteingemisches nach der Größe der Proteine und dem anschließenden spezifischen Nachweis eines Proteins innerhalb dieses Proteingemisches. Dabei werden die unterschiedlichen Proteine zuerst mittels SDS-Gelelektrophorese anhand eines elektrischen Feldes ihrer Größe nach getrennt. Anschließend werden die Proteine aus dem Elektrophoresegel auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF-) Membran übertragen und fixiert, auf welcher eine Immunreaktion mittels Primär- und Sekundärantikörper stattfindet. Unter Zugabe eines Substrates wird dieses durch ein an dem Sekundärantikörper befindliches Enzym in einer chemischen Reaktion umgesetzt und so sichtbar gemacht. Auf diese Weise kann ein spezifischer Nachweis von Proteinen innerhalb eines Gewebes oder innerhalb von Zellen erfolgen.

Die SDS-Gelelektrophorese (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese), welche vor dem eigentlichen Immunoblot stattfindet, nutzt ein Polyacrylamidgel, um Proteine ihrer Größe nach zu separieren. Dabei nutzt man ein elektrisches Feld, durch welches die Proteine aufgrund ihrer negativen Ladung das Polyacrylamidgel in Richtung Anode durchlaufen. Durch das zugegebene SDS kommt es zu einem Verlust der Quartärstruktur und Tertiärstruktur der Proteine, und die Eigenladung der Proteine wird überdeckt. Daher ist die Geschwindigkeit, mit welcher die Proteine das Gel durchlaufen, nur noch proportional zu der Masse der Proteine, und es erfolgte eine Aufteilung der Proteine innerhalb des Gels anhand ihrer Masse.

Das Polyacrylamidgel beinhaltet TEMED (Tetramethylethylendiamin), APS (Ammoniumperoxodisulfat), Puffer und SDS (Sodiumdodecylsulfat). Das APS sorgt als Radikalbildner für die Vernetzung des Acrylamids, während das TEMED als Katalysator wirkt. Die Größe der Poren des Gels wird durch die Konzentration des Polyacrylamids bestimmt. Durch die Zugabe des SDS werden die Proteine, wie oben beschrieben, entfaltet und negativ geladen, damit sie alle ein einheitliches Masse/Ladungsverhältnis aufweisen. Die Gele weisen dabei zwei verschiedene Schichten (Trenngel und Sammelgel) auf, die sich zum einen in der Acrylamidkonzentration und somit der Porengröße, zum anderen im pH unterscheiden. Die Proben durchlaufen dabei zuerst das Sammelgel, dessen Acrylamidkonzentration immer 5% und somit großporig ist. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels ist 15% und somit kleinporig. Das Sammelgel ist mit einem pH von 6,8 saurer als das Trenngel mit einem pH von 8,8. Durch das alkalische Milieu des Trenngeles erhält das Glycin des Laufpuffers eine negative Ladung und läuft schneller zum Pluspol. Da es sich bei den hier untersuchten RGS-

Material und Methoden

Proteinen um kleine Moleküle von einem ungefähren Molekulargewicht zwischen 20 kDa und 35 kDa handelt, wurde ein 15%iges Trenngel verwendet.

Nach dem SDS-Page werden die aufgetrennten Proteinbanden erneut mittels eines elektrischen Feldes, welches nun jedoch senkrecht zu dem Polyacrylamidgel gerichtet ist, auf eine PVDF-Membran übertragen. Die PVDF-Membran fixiert dabei die Proteine aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen. Bei jedem Western Blot durchlaufen neben den eigentlichen Proteinproben auch immer sogenannte Proteinstandards das Polyacrylamidgel, welche nach der Übertragung auf die PVDF-Membran die Lokalisation bestimmter Proteingrößen farblich markiert. Um die Auftrennung der Proteine zu überprüfen, erfolgt nach deren Übertragung auf die PVDF-Membran eine unspezifische Proteinfärbung mittels Coomassie-Brilliant-Blue. Auch findet auf dieser Membran die anschließende Immunreaktion mittels des spezifischen Antikörpers statt. Nach Inkubation des Primärantikörpers, welcher gegen das gesuchte Antigen gerichtet ist, erfolgt nach mehreren Waschschrritten die Zugabe des Sekundärantikörpers, welcher gegen den primären Antikörper gerichtet ist und mit dem Enzym *horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelt ist. Dieses Enzym setzt ein Substrat in einer Chemolumineszenz-Reaktion um, welche für die Belichtung eines Fotofilmes genutzt wird.

2.6.1 Probenvorbereitung

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Durchführung des Western Blots als Proteingemisch die zuvor geernteten CPCs verwendet. Für die Durchführung der Gelelektrophorese wurden die Zellen geerntet, gezählt und erneut 10 min bei 0,3 rcf abzentrifugiert (Siehe Abschnitt Zellkultur). Der Überstand wurde entfernt und die Zellen wurden in dem Volumen 3fach SDS-Probenpuffer + β ME im Verhältnis 10:1 resuspendiert, sodass sie in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen pro 10 μ l vorlagen. Anschließend wurden sie 5 min bei 95 °C denaturiert und konnten nun in die Probenaschen des Gels pipettiert werden.

Tabelle 22: Zusammensetzung des SDS-Probenpuffers (3fach)

Inhaltsstoff	Menge
Tris (0,3 M) (Roth, Karlsruhe, DE)	3,6 g
SDS 9% (Roth, Karlsruhe, DE)	9 g
Glycerin 22,5% (Roth, Karlsruhe, DE)	22,5 g
Bromphenolblau (Roth, Karlsruhe, DE)	Spatelspitze
HCl	bis pH 6,7
Aqua dest	auf 100 ml auffüllen

2.6.2 SDS-Page (Gelelektrophorese)

Für die Herstellung der Polyacrylamidgele wurden zwei Glasplatten mit absoluten Alkohol gereinigt und unter Verwendung einer Gummiabdichtung aufeinander gelegt und mittels zweier Klammern fixiert. Die Gummiabdichtung sorgte somit für einen Raum zwischen den Platten, in welchen später die Gele gegossen wurden. Mittels eines wasserfesten Stiftes wurde in einem Abstand von 6 cm von dem unteren Rand eine Markierungslinie gezogen, welche die spätere Grenze zwischen dem Sammel- und dem Trenngel markierte. Nun erfolgte das Pipettieren des Trenngels in der unten genannten Zusammensetzung. Wichtig für beide Gele war es zu beachten, dass das APS (Roth, Karlsruhe, DE) als Radikalbildner zuletzt hinzugegeben werden musste, da anschließend direkt der Polymerisierungsprozess startete. Anschließend wurde zuerst das Trenngel in den Raum zwischen den beiden Glasplatten gegossen und mit absolutem Ethanol (AppliChem, Darmstadt, DE) vorsichtig überschichtet um Unregelmäßigkeiten der Geloberfläche zu verhindern und der Bildung von Luftbläschen vorzubeugen. Ist die Polymerisierung des Gels nach ca. 15 min bei Raumtemperatur abgeschlossen, so konnte die Pipettierung des Sammelgels stattfinden. Nach Abschütten des absoluten Ethanols wurde das Sammelgel zwischen die Platten gegossen. Es wurde in das Sammelgel ein Kamm eingesetzt, welcher durch seine Kammspitzen die späteren Probenaschen bildet. Nun wurde das gegossene Gel zur vollständigen Polymerisierung für ca. 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden die Gummiabdichtung und der Kamm entfernt, und die Gele konnten bis zur Benutzung in einer feuchten Kammer bei 4 °C für maximal sieben Tage gelagert werden.

Tabelle 23: Zusammensetzung der Western Blot-Gele

Inhaltsstoff	Sammelgel (5%)	Trenngel (15%)
Puffer	Sammelgelpuffer: 1,25 ml	Trenngelpuffer: 1,4 ml
10%iges SDS (Fuka (71999))	50 µl	55 µl
TEMED (Roth, Karlsruhe, DE)	5 µl	5 µl
Acrylamid (Roth, Karlsruhe, DE)	0,8 ml	2,78 ml
Aqua dest	2,7 ml	1,06 ml
10%iges APS (Roth, Karlsruhe, DE)	0,2 ml	0,25 ml

Tabelle 24: Zusammensetzung des Sammelgel-Puffers

Inhaltsstoff	Menge
Tris (0,5 M) (Roth, Karlsruhe, DE)	15,1 g
HCl	bis pH 6,8
Aqua dest.	auf 250 ml auffüllen

Tabelle 25: Zusammensetzung des Trenngel-Puffers

Inhaltsstoff	Menge
Tris (1,5 M) (Roth, Karlsruhe, DE)	45,4 g
HCl	bis pH 8,9
Aqua dest.	auf 250 ml auffüllen

In dieser Zeit wurde das am Vortag gegossene Gel in die Gelelektrophoresekammer (Biometra) gesetzt, mit Klammern befestigt und die Kammer wurde zur Hälfte mit SDS-Laufpuffer gefüllt.

Tabelle 26: Zusammensetzung des SDS-Laufpuffers (5fach)

Inhaltsstoff	Menge
Tris (0,25 M) (Roth, Karlsruhe, DE)	30,3 g
Glycin (1,9 M)	142,6 g
10%iges SDS	50 ml
Aqua dest.	auf 1000 ml auffüllen

Darauf folgend wurden die vorbereiteten Proben in die Taschen pipettiert. Bei der Auftragung der Proteine in die Taschen des Gels ist darauf zu achten, dass das maximale Auftragsvolumen 30 μ l bzw. 4×10^5 Zellen beträgt. Um die Größe der Proteine ermitteln zu können, wurden 4 μ l eines SDS-Page-Rulers (Proteinleiter) mit auf das Gel gegeben, welcher zuvor festgelegte Proteinmassen markiert und somit eine Einschätzung des Molekulargewichtes des untersuchten Proteins ermöglicht. Anschließend wurde das elektrische Feld mit einer Stromstärke von 10-15 mA für das Sammelgel eingestellt. Sobald die Proben die Trennlinie erreicht hatten, konnte die Stromstärke für das Trenngel auf 20-25 mA erhöht werden. Das SDS-Page war beendet, sobald die vollständige Proteinleiter auf dem Gel zu sehen war.

2.6.3 Western Blot

Für die Durchführung des Western Blots wurden 6 Filterpapiere der Größe 6x9 cm, ebenso eine PVDF-Membran (Immobilon-P 0,45 µm von Millipore) derselben Größe benötigt. Die PVDF-Membran wurde zuerst durch eine Lagerung von 15 Sekunden in 100%igen Methanol aktiviert und anschließend für 2 min in destillierten Wasser geschwenkt. Die 6 Filterpapiere, die aktivierte Transfermembran und 2 Schwämme wurden für 15 min in kalten Transferpuffer eingelegt. Auch der Zusammenbau der Blotkassette erfolgte in dem Transferpuffer, damit sich möglichst keine Luftblasen in der Apparatur befanden.

Tabelle Nr. 27: Zusammensetzung des Transferpuffers (10fach)

Inhaltsstoff	Menge
Tris (25 mM) (Roth, Karlsruhe, DE)	6,05 g
Glycine (129 mM)	28,8 g
Methanol 20%	400 ml
Aqua dest	auf 2000 ml auffüllen

Der Tank der Blotkassette (PaqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE) wurde mit Transferpuffer gefüllt. Für den Zusammenbau der Blotkassette wurde initial auf der Anodenseite ein Schwamm, anschließend drei Filterpapiere und die PVDF-Membran gelegt. Nun musste das Trenngel vorsichtig auf die Membran platziert werden, gefolgt von drei weiteren Filterpapieren, einem Schwamm und nun der Kathodenseite der Kassette. Die Kassette wurde mit Gummibändern verschlossen und in die Blotkassette eingesetzt, welche zuvor mit Transferpuffer befüllt worden war. Anschließend wurde ein senkrecht zur Membran liegendes elektrisches Feld erzeugt. Die Stromstärke für 1-2 Gele lag bei 350 mA für 90 min, sodass die negativ geladenen Proteine von dem Gel in Richtung Anode auf die PVDF-Membran wanderten. Dadurch lagen die Proteine weiterhin ihrer Größe nach getrennt nun auf der Membran vor. Da während des Vorgangs Hitze erzeugt wurde, jedoch eine stabile Temperatur gewährleistet sein musste, erfolgte eine kontinuierliche Kühlung durch Verwendung eines Magnetrührers sowie eines Anschlusses an das Kaltwassersystem.

2.6.4 Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung als unspezifischer Proteinnachweis

Bevor nun die Membran mit dem primären Antikörper inkubierte, wurde zuvor noch eine unspezifische Proteinfärbung mittels Coomassie-Brilliant-Blue (Roth, Karlsruhe, DE) durchgeführt. Dafür wurde die Membran für 5 min mit dem Coomassie-Brilliant-Blue in einer kleinen Schale auf der Wippe inkubiert.

Tabelle Nr. 28: Zusammensetzung Coomassie-Brilliant-Blue

Inhaltsstoff	Menge
Coomassie-Brilliant-Blue R (0,1%)	0,1 g
Methanol (50%)	50 ml
Essigsäure (7%)	7 ml
Aqua dest	auffüllen auf 100 ml

Zur Reduktion der Hintergrundfärbung wurde die Membran mehrfach mit der Entfärberlösung 1 auf der Wippe inkubiert, bis die Proteinbanden bei einer minimalen Hintergrundfärbung gut sichtbar waren.

Tabelle Nr. 29: Zusammensetzung der Entfärberlösung 1

Inhaltsstoff	Menge
Methanol (50%)	50 ml
Essigsäure (7%)	7 ml
Aqua dest.	auffüllen auf 100 ml

Anschließend konnte die Membran eingescannt werden. Wichtig war, darauf zu achten, dass die Membran nicht austrocknete. Für die weitere Verwendung, insbesondere die Immunreaktion, musste die Membran mindestens 5 mal 5 min mit TBS-T gewaschen werden, da in der Entfäberlösung Essigsäure enthalten ist, welche die Proteine der Milchlösung, in welcher die AK gelöst sind, ausfallen würde.

2.6.5 Immunreaktion

Die zuvor 5fach mittels TBS-T gewaschene Membran wurde zum Blocken unspezifischer Proteinbindungen für eine Stunde bei RT mit der Blocklösung (Milchlösung) auf der Wippe inkubiert.

Tabelle Nr. 30: Zusammensetzung der Blocklösung

Inhaltsstoff	Menge
Milchpulver (5%) (Roth, Karlsruhe, DE)	5 g
TBS-T	100 ml

Der primäre Antikörper wurden in der Blocklösung verdünnt (Verdünnung siehe Liste) und die Membran wurde mit der AK-Blocklösung entweder für eine Stunde bei RT oder über Nacht im Kühlraum bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die Membran erneut 5 mal für 5 min mit TBS-T gewaschen, um alle nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Folgend wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper inkubiert, welcher sich spezifisch gegen den Wirt des primären Antikörpers richtete. Zusätzlich ist der sekundäre Antikörper mit dem Enzym *horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelt. Auch der sekundäre Antikörper wurde in der Blocklösung verdünnt und die Membran wurde für 1 Stunde bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Die Membran wurde erneut 5 mal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Folgend inkubierte die Membran mit der Detektionslösung, welche das Substrat für die HRP beinhaltet. Als Detektionslösung diente das ECL Prime Western Blotting Reagens von Amersham (GE Healthcare Buckinghamshire, UK, (#RPN2106)). Die darin enthaltenen zwei Lösungen mussten im gleichen Verhältnis gemischt werden. Das darin befindliche Substrat wird durch die am sekundären AK gekoppelte HRP in ein Reaktionsprodukt umgesetzt, welches in der Lage ist, einen Röntgenfilm zu schwärzen. Von der Lösung wurden 1,5 ml auf die Membran gegeben und für 5 min inkubiert. Die Reaktion musste lichtgeschützt stattfinden, da sonst das Substrat als lichtempfindliche Substanz zerfiel. Daher wurde die Membran nach erfolgter Inkubation in einer Dunkelkammer unter Verwendung eines Röntgenfilmes zwischen zwei Folien einer Röntgenkassette gelegt. In dieser Röntgenkassette belichtete die Membran den Röntgenfilm (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Die Belichtungszeit ist abhängig von der vorhandenen Antikörper- und Substratmenge und lag zwischen mehreren Sekunden und bis zu einer Stunde, sodass die jeweilige Zeit notiert wurde. Anschließend wurde der Film entwickelt, indem er zuerst in der Entwicklerlösung (Kodak, Rochester, USA) für gut 5 min geschwänkt wurde, bis Banden sichtbar wurden. Nachfolgend wurde der Film zuerst in Leitungswasser und abschließend in der Fixierlösung (Kodak, Rochester, USA) erneut für ungefähr 5 min belassen. Um den Film nicht zu schwärzen, fand der gesamte Vorgang in einer Dunkelkammer statt. Anhand eines

Vergleiches des Fotofilmes mit der auf der Membran befindlichen Proteinleiter konnte die molekulare Masse des Proteins abgelesen werden.

2.6.6 Verwendete Antikörper

Tabelle Nr.31: Verwendete Primärantikörper

Bezeichnung	Firma/ Nummer	Herkunft	Verdünnung	Inkubationszeit
RGS4	Santa Cruz c-17 sc-6203	Ziege, polyklonal	1/1000	üN bei 4 °C
RGS4	Proteintech 14530-1-AP	Kaninchen, polyklonal	1/2000	üN bei 4 °C
RGS10	Santa Cruz C-20 sc-6206	Ziege, polyklonal	1/2000	üN bei 4 °C
α -Tubulin	Sigma-Aldrich T 6199	Maus, monoklonal	1/1000	1std bei RT

Tabelle Nr.32: Verwendete Sekundärantikörper

Bezeichnung	Firma/ Nummer	Herkunft	Verdünnung	Inkubationszeit
Anti-Kaninchen - Peroxidase gekoppelt	Sigma-Aldrich A0545	Ziege	1/100 000	1 std bei RT
Anti-Ziege - Peroxidase gekoppelt	DAKO P044801-2	Kaninchen	1/2000	1 std bei RT
Anti-Maus, Peroxidase gekoppelt	Sigma-Aldrich A9917	Ziege	1/40 000	1 std bei RT

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis auf Gewebeebene: Immunhistochemie

3.1.1 Beispiel einer HE-Färbung von osteoarthrotischem Knorpel

Die Schnitte zur Durchführung immunhistochemischer Färbungen entstammten einer Knorpelprobe aus einem Knie, welches im Rahmen einer Kniegelenks-Totalendoprothese entnommen worden war. Die Knorpelprobe entstammte dem makroskopisch gesunden Bereich angrenzend an Knorpeldefekte. In Abbildung 10 ist die HE-Färbung eines vertikalen Schnittes der Knorpelprobe dargestellt. Abbildung A zeigt eine Übersichtsaufnahme in 4facher Vergrößerung. Abbildung B bis D zeigen zur Verdeutlichung Detailaufnahmen der verschiedenen Schichten des Knorpels in 40facher Vergrößerung. Der Maßstab ist am unteren Bildrand angegeben. In Abbildung B ist die superfizielle Schicht zu sehen, in welcher nahezu parallel zur Oberfläche verlaufende, meist einzelne Chondrozyten liegen. In der mittleren und tiefen Schicht (C) sind die für Osteoarthritis typischen Clusterformationen zu erkennen. In Abbildung D ist die Tidemark zu erkennen, welche die Grenze zum darunter befindlichen Knochen bildet. Zusätzlich zeigt die Oberfläche (B) Unregelmäßigkeiten im Sinne einer Fibrillation als weiteres Kennzeichen der Osteoarthritis.

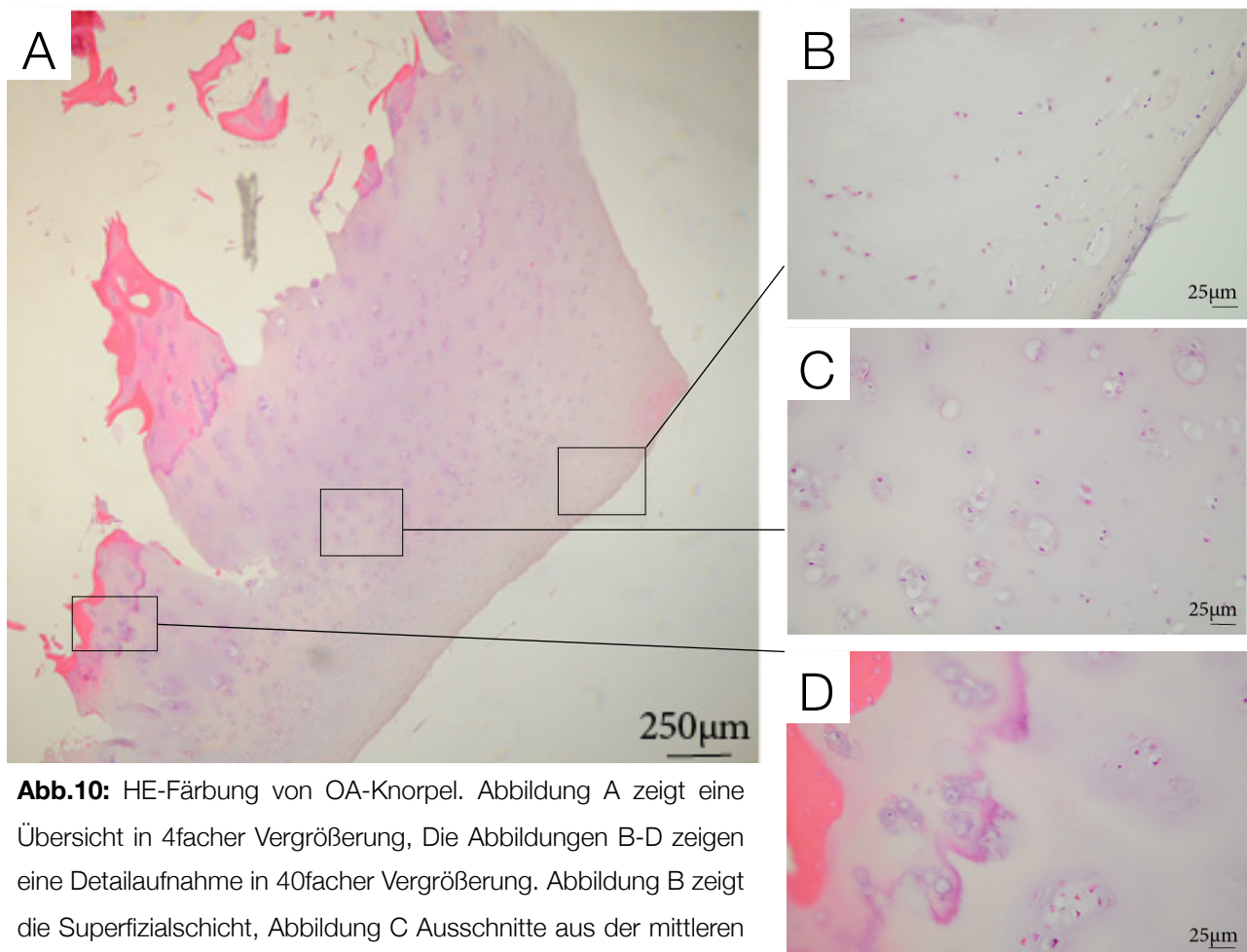


Abb.10: HE-Färbung von OA-Knorpel. Abbildung A zeigt eine Übersicht in 4facher Vergrößerung, Die Abbildungen B-D zeigen eine Detailaufnahme in 40facher Vergrößerung. Abbildung B zeigt die Superfizialschicht, Abbildung C Ausschnitte aus der mittleren und tiefen Schicht. Abbildung D zeigt die Tidemark.

Ergebnisse

3.1.2 Nachweis des RGS4 auf Gewebeebene: Immunhistochemie

Abbildung 11 zeigt die Färbung von Knorpelgewebe zum Nachweis des RGS4 mittels eines spezifischen Antikörpers. Das Material wurde im Rahmen einer Knie-Totalendoprothesen-Implantation aus Knorpelproben eines an Osteoarthritis erkrankten Patienten gewonnen. Die Knorpelproben stammten dabei aus dem Randbereich zwischen dem gesunden und dem defekten Knorpel. Abbildung A zeigt die Übersicht des vertikalen Schnittes in einer 10fachen Vergrößerung. Abbildung B-D zeigen jeweils Detailaufnahmen in einer 40fachen Vergrößerung aus den jeweiligen unterschiedlichen Bereichen des Knorpels. Der Maßstab ist am unteren Bildrand angegeben.

Die Schnitte zeigen einen positiven Nachweis des RGS4 in OA-Knorpel. In der Übersichtsaufnahme (A) und in Abbildung D sind an der Knorpeloberfläche Fissuren als Zeichen der Osteoarthritis zu sehen. Die Abbildung zeigt die Lokalisation des RGS4 innerhalb der Zellen. So lag dieses im Zytoplasma, an intrazelluläre Kompartimente (bspw. Golgi-Membran) und an der Zellmembran gebunden vor. Jedoch zeigten sich deutliche Unterschiede in den verschiedenen Schichten des Knorpels. Während in der superfizialen Schicht (D) kein RGS4 nachgewiesen werden konnte, war der Nachweis in der mittleren Schicht (B und C) positiv. Dabei ist zu erkennen, dass sich das RGS4 vor allem in den Chondrozyten der Clusterformationen nachweisen ließ (B und C).

Ergebnisse

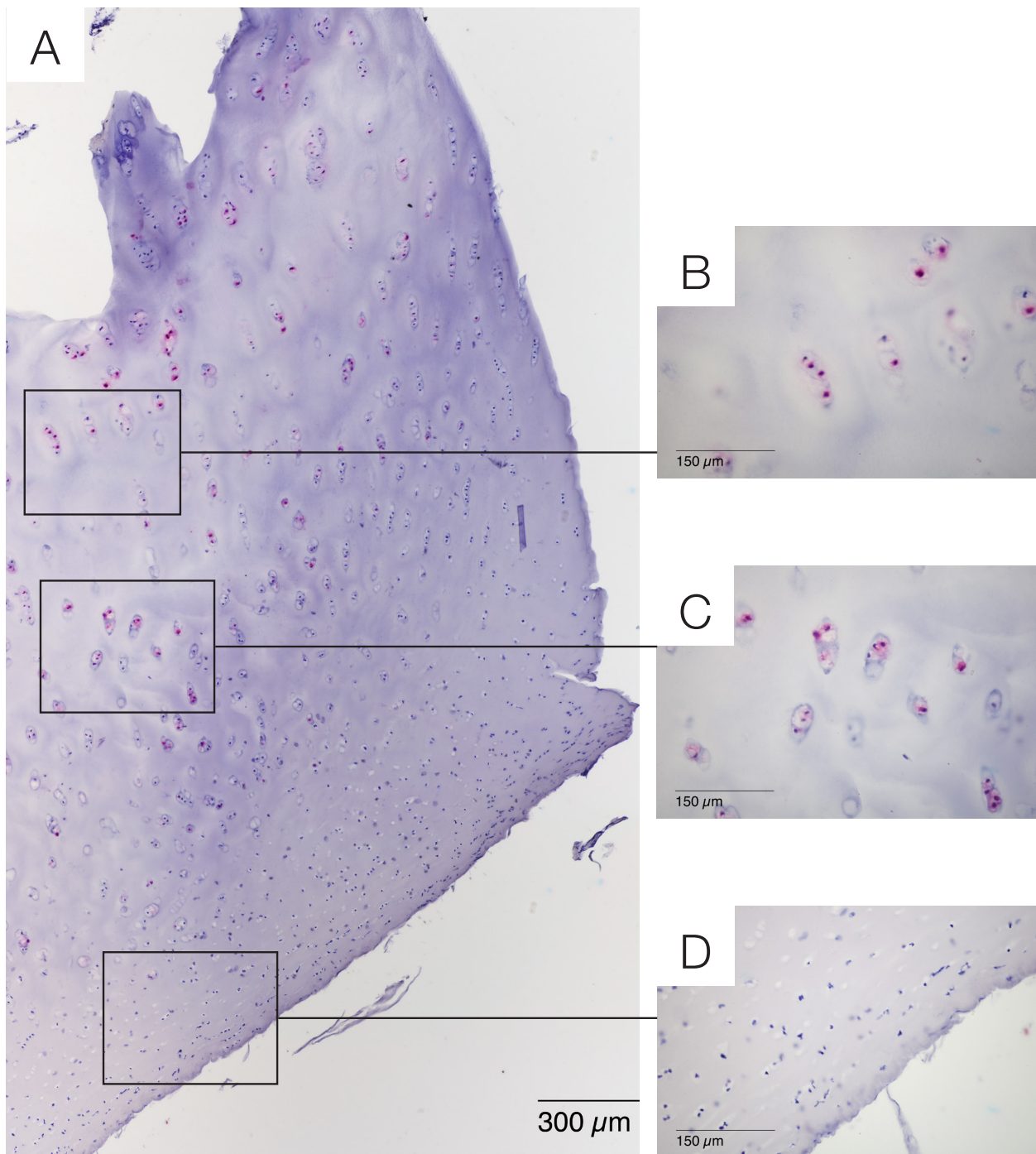


Abbildung 11: Immunhistochemie des RGS4. Die Abbildung zeigt den spezifischen RGS4-Nachweis in einer Knorpelprobe eines an Osteoarthrose erkrankten Patienten. Abbildung A zeigt die Übersicht in 10facher Vergrößerung. Die Abbildungen B-D stellen jeweils Einzelaufnahmen in 40facher Vergrößerung dar. Bei Abbildung B handelt es sich um die Vergrößerung einer Clusterformation aus den tiefer gelegenen Knorpelschichten, Abbildung C stellt die mittlere Schicht und Abbildung D die superfizielle Schicht dar. Der jeweilige Maßstab ist im unteren Bildrand abgebildet. Die Abbildung zeigt zum einen die Lokalisation des RGS4, da es sich im Zytoplasma, an die Zellmembran gebunden und an intrazelluläre Strukturen gebunden befindet. Zum anderen zeigt es eine spezifische Verteilung innerhalb des Knorpels. Während in der superfizialen Schicht in den Chondrozyten kein RGS4 nachweisbar war, zeigten vor allem die Chondrozyten der Clusterformationen in den darunter gelegenen Schichten eine Anreicherung des RGS4.

Ergebnisse

3.1.3 Nachweis des RGS 10 auf Gewebeebene: Immunhistochemie

In Abbildung 12 ist der immunhistochemische Nachweis von RGS10 innerhalb von osteoarthrotisch verändertem Knorpelgewebe dargestellt. Die Knorpelproben wurden im Rahmen einer Knie-Totalendoprothesen-Implantation aus Knorpelproben eines an Osteoarthrose erkranktem Patienten gewonnen. Die Proben entstammten dem makroskopisch gesunden Randbereich angrenzend an die Defektzone.

Abbildung A zeigt in 10facher Vergrößerung eine Übersichtsaufnahme. Abbildung B und C zeigen jeweils Detailaufnahmen in einer 40fachen Vergrößerung aus den unterschiedlichen Bereichen des Knorpels. Der Maßstab ist am unteren Bildrand angegeben. Abbildung B zeigt die Superfizialschicht und einen Teil der Transitionalschicht. Dabei ist die Form der Chondrozyten gut zu erkennen, welche diskoid sind und parallel zur Oberfläche liegen. Auch sind in Abbildung B Unterbrechungen der Oberfläche im Sinne von Fibrillationen als Zeichen der Osteoarthrose zu erkennen. Die Abbildung C zeigt die für die Spätphase der Osteoarthrose typische Clusterformation der Chondrozyten in der mittleren Schicht des Knorpels.

Wie in Abbildung 12 dargestellt, konnte der Nachweis von RGS10 in osteoarthrotischem Knorpel erfolgen. Hierbei zeigten die Chondrozyten der Superfizialschicht (B) keinen Nachweis von RGS10. Dagegen erfolgte sowohl in der Transitionalschicht (B) als auch in der mittleren Schicht (C) ein positiver Nachweis für das RGS10. In Abbildung C ist die Lokalisation des RGS10 zu erkennen, welches neben der zytoplasmatischen und zellmembrangebundenen Lokalisation überwiegend intranukleär vorlag.

Ergebnisse

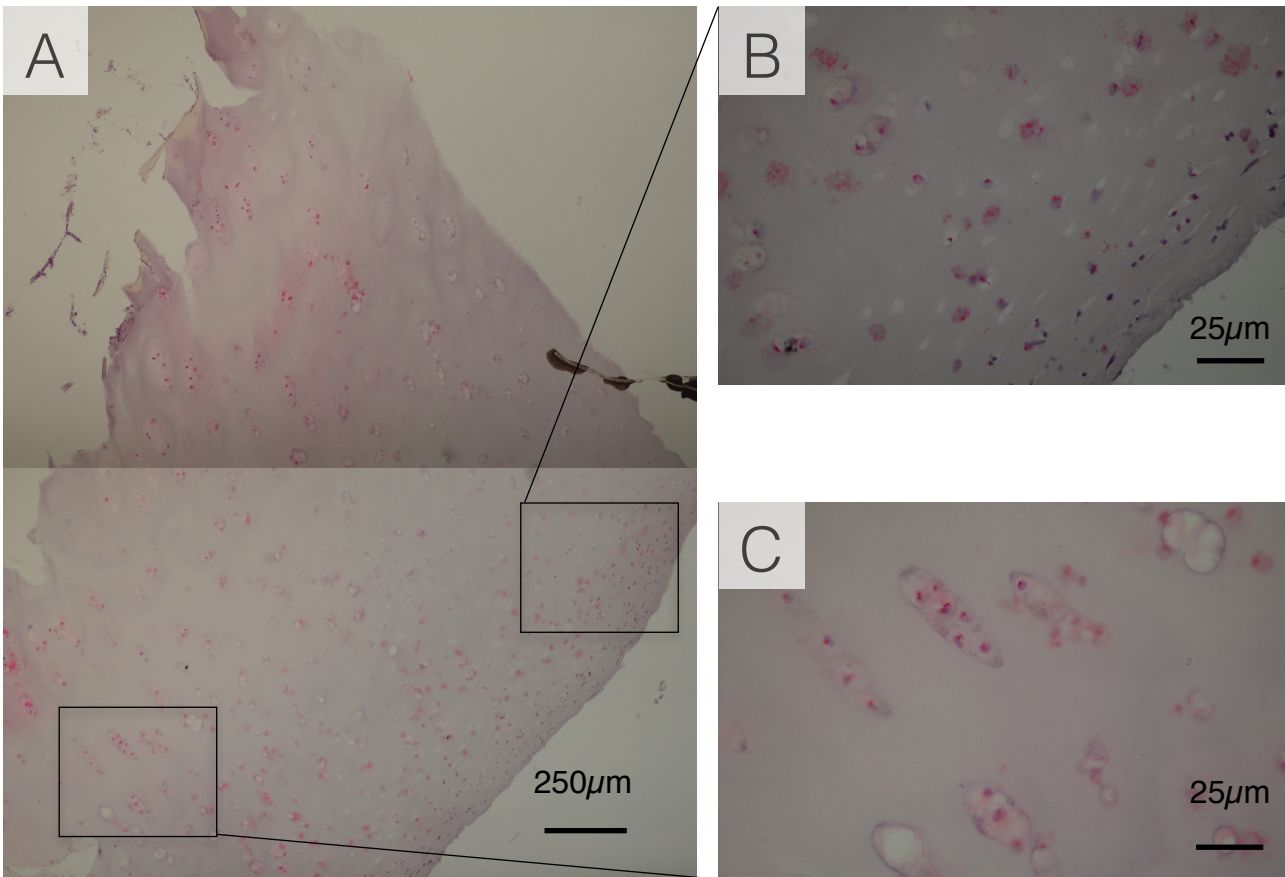


Abbildung 12: Immunhistochemie des RGS10. In der Abbildung ist der immunhistochemische Nachweis des RGS10 in einer Korpelprobe eines Knies dargestellt, welches im Rahmen einer Totalendoprothesen-Implantation entnommen worden war. Abbildung A zeigt eine 10fache Vergrößerung. Die Abbildungen B und C zeigen jeweils eine Detailaufnahme in 40facher Vergrößerung. Der jeweilige Maßstab ist im unteren Bildrand dargestellt. Abbildung B zeigt die superfiziale Schicht, in welcher kein Nachweis von RGS10 erfolgen konnte. Sowohl in der Transitionalschicht (B) als auch in der mittleren Schicht (C) konnte RGS10 mittels immunhistochemischer Färbung nachgewiesen werden. Die Abbildungen B und C zeigen die Lokalisation des RGS10. Dieses war vor allem intranukleär lokalisiert, es lag jedoch auch an der Zellmembran gebunden und im Zytoplasma der Zellen vor.

3.2 Nachweis der RGS-Moleküle auf Zellebene: Immunzytochemie

3.2.1 Nachweis des RGS4 auf Zellebene

Abbildung 13 zeigt den positiven Nachweis und die Lokalisation des RGS4 in den CPCs anhand einer immunfluoreszenzzytochemischen Färbung. Dabei lag das RGS4 innerhalb der Zelle sowohl an der Zellmembran als auch im Zytosol und an intrazelluläre Strukturen gebunden vor (A). Die Kerne wurden jeweils mit dem Fluoreszenzfarbstoffes DAPI blau angefärbt (A, C). Die Abbildungen C und D zeigen als Negativkontrolle kein Fluoreszenzsignal.

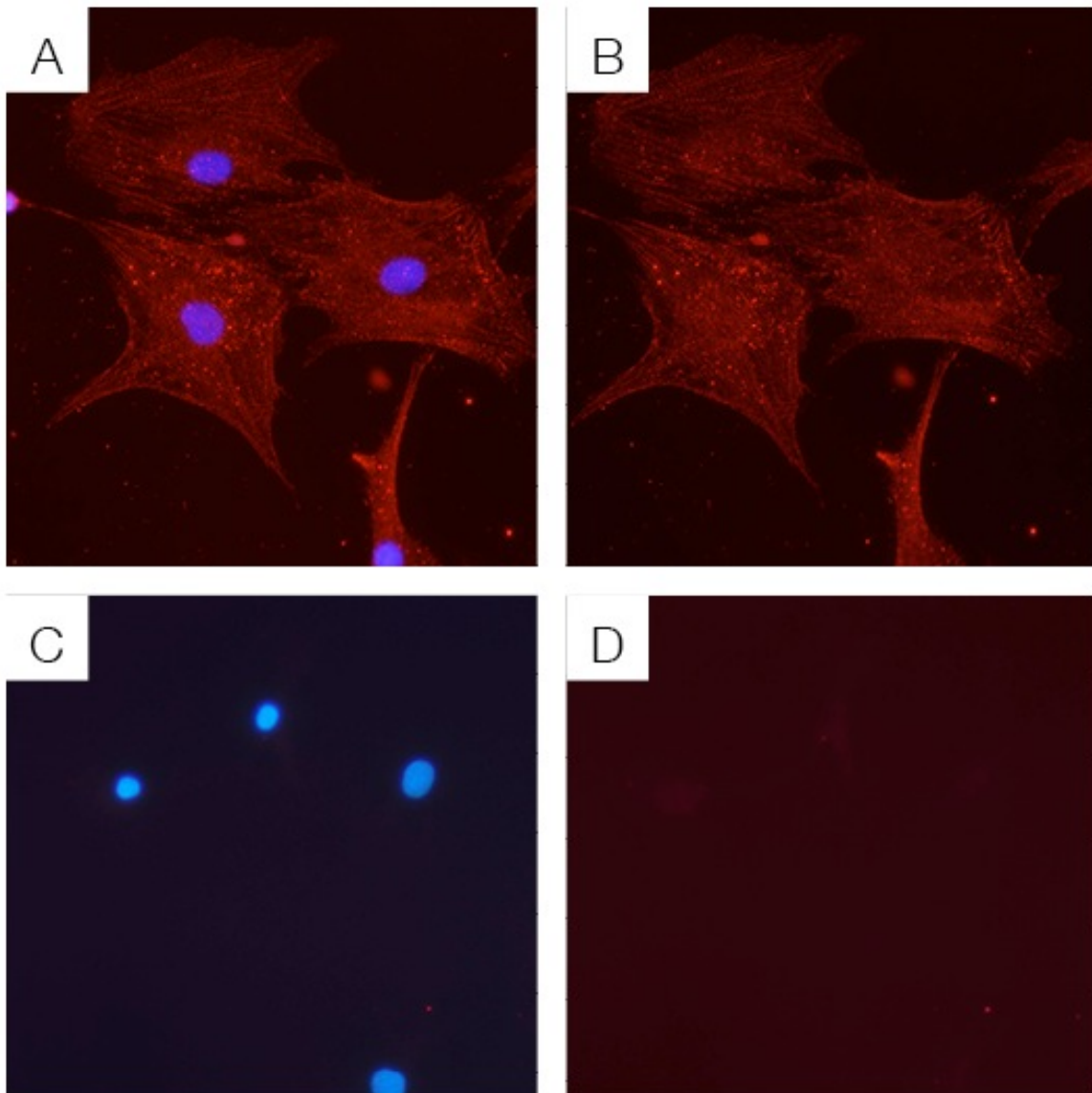


Abbildung 13: Immunzytochemie des RGS4. In Abbildung A ist die zelluläre Lokalisation des RGS4 dargestellt. So lag das RGS4 sowohl an die Zellmembran gebunden als auch im Zytosol und an intrazelluläre Kompartimente gebunden vor. In Abbildung A und C ist zusätzlich der Zellkern mittels DAPI dargestellt. Abbildung C und D zeigt die Negativkontrolle, zum einen mit Anfärbung der Kerne mittels DAPI (C), zum anderen ohne Anfärbung der Kerne (D). Die Abbildungen sind in 60facher Vergrößerung dargestellt.

Ergebnisse

3.2.2 Nachweis des RGS10 auf Zellebene

Abbildung 14 zeigt den positiven Nachweis von RGS10 in den CPCs anhand einer immunfluoreszenzzytochemischen Färbung. Die CPCs stammten aus osteoarthrotischem Knorpel. Die Abbildungen A und C zeigen eine zusätzliche Anfärbung des Zellkernes mittels des blauen Fluoreszenzfarbstoffes DAPI. Die Negativkontrolle, in welcher nur der sekundäre AK verwendet wurde, ist in den Abbildungen C und D dargestellt und zeigte kein Fluoreszenzsignal. Anhand der Abbildungen ist die Lokalisation des RGS10 zu erkennen. So lag RGS10 an der Zellmembran gebunden sowie zytoplasmatisch und intranukleär vor (A). Abbildung B verdeutlicht die intranukleäre Lokalisation.

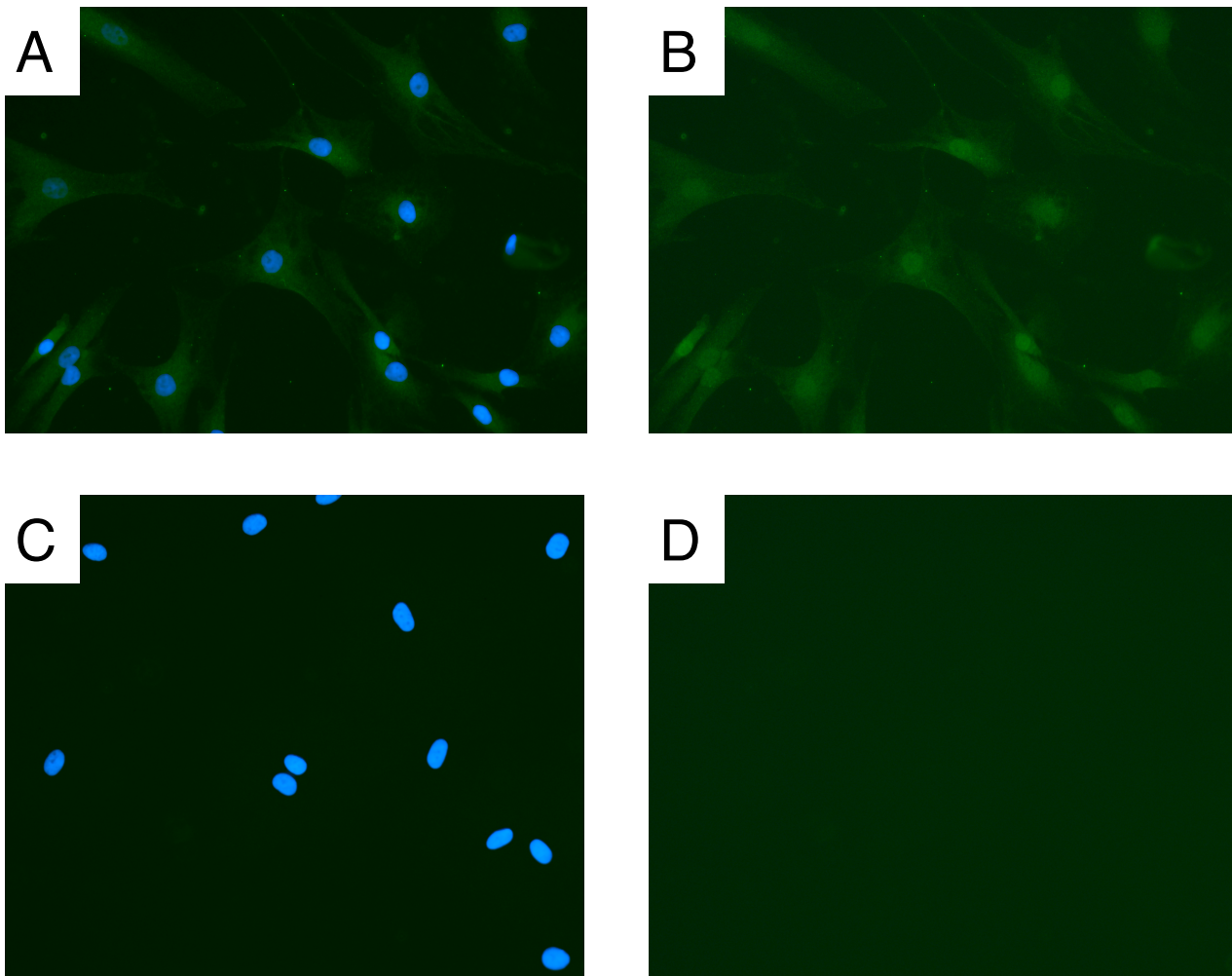


Abbildung 14: Immunzytochemie des RGS10: Abbildung A zeigt die Lokalisation des RGS10 innerhalb des Zytoplasmas. Abbildung B verdeutlicht zusätzlich dessen nukleäre und perinukleäre Lokalisation. Die Negativkontrolle wird in den Abbildungen C und D gezeigt und zeigt kein Fluoreszenzsignal. Die Abbildungen sind in 60facher Vergrößerung dargestellt.

3.3 Nachweis der RGS-Moleküle auf Genebene: RT-PCR

3.3.1 Genexpressionsanalyse des RGS4

Für die Genexpressionsanalyse des RGS4 wurde die cDNA von insgesamt sieben Proben untersucht. Bei zwei von sieben Proben ließ sich kein RGS4 nachweisen (Werte nicht gezeigt). In drei der verbliebenen fünf Proben lag der ct-Wert > 35 . Dabei ergaben sich für Proben mit einem hohen ct-Wert hohe Standardabweichungen. Aufgrund des fehlenden Nachweises des RGS4 in den CPCs wurde die Untersuchung an zwei Referenzgeweben wiederholt. Dabei wurden als Referenzgewebe Meniskus-Progenitorzellen (MPCs) und mesenchymale Stammzellen (MSCs) verwendet. In beiden Gewebe konnte kein Nachweis von RGS4 in den Proben erfolgen (Werte nicht gezeigt).

Aufgrund des fehlenden Nachweises sowohl in den CPCs als auch in den Referenzgeweben war eine Normalisierung der Ergebnisse nach Pfaffl (Pfaffl 2001) nicht möglich. Es erfolgt daher die Darstellung der Ergebnisse der RT-PCR des RGS4 mittels Darstellung der ct-Werte.

Abbildung 15 zeigt die Genexpression von RGS4 in CPCs anhand von Säulendiagrammen. Auf der x-Achse sind die verschiedenen Proben aufgetragen. Auf der y-Achse sind die ct-Werte der RT-PCR dargestellt. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichungen. Dabei ergeben sich für das RGS4 für alle fünf Proben hohe ct-Werte. Methodenbedingt ergibt sich für hohe ct-Werte eine hohe Standardabweichung.

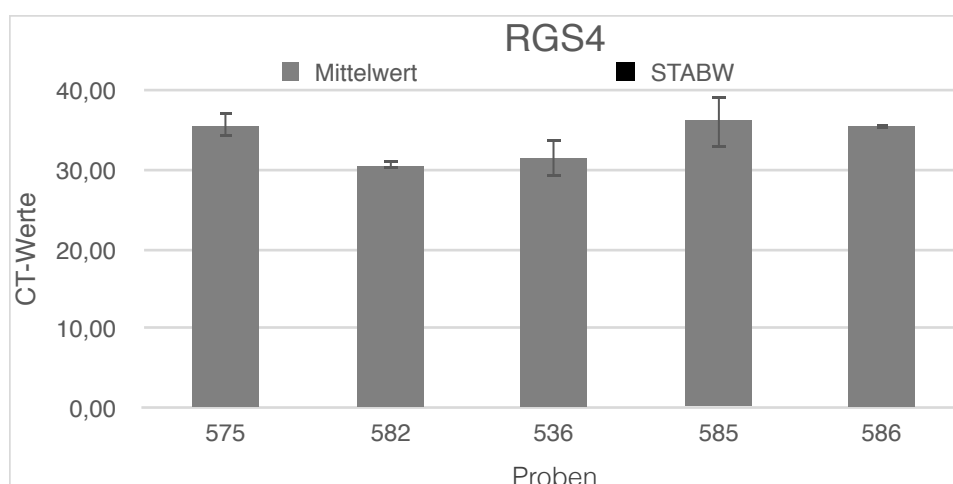


Abbildung 15: Auswertung der RT-PCR-Analyse des RGS4: Die Abbildung zeigt die mRNA Level für RGS4 anhand der Ergebnisse der RT-PCR von fünf Proben. Die x-Achse zeigt die Proben verschiedener CPCs. Auf der y-Achse sind die ct-Werte aufgetragen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.

Ergebnisse

3.3.2 Genexpressionsanalyse des RGS10

Abbildung 16 zeigt die relative Genexpression von RGS10 in CPCs. Die Darstellung der Ergebnisse der RT-PCR erfolgt als Säulendiagramm. Auf der x-Achse sind die Proben verschiedener CPCs dargestellt. Die y-Achse stellt die relativen Genexpressionslevel dar. Dabei wurden die mittels RT-PCR gewonnenen Daten nach Pfaffl (2001) normalisiert. Als HKG wurde die PPIa verwendet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.

Es ist zu erkennen, dass die Genexpression des RGS10 in den unterschiedlichen CPCs variierte. Das höchste Genexpressionslevel lag bei den CPCs der Probe 582 vor, gefolgt von den CPCs der Probe 586 und 595. Bei den CPCs der Probe 575 und 585 war nur ein sehr niedriges Genexpressionslevel für RGS10 nachweisbar. Einzig die CPCs der Probe 582 zeigten eine relative Genexpression über 1, was einem höheren mRNA-Gehalt von RGS4 im Verhältnis zu dem mRNA-Gehalt des HKGs entspricht. Der mRNA-Gehalt der restlichen Proben lag unterhalb derjenigen des HKG.

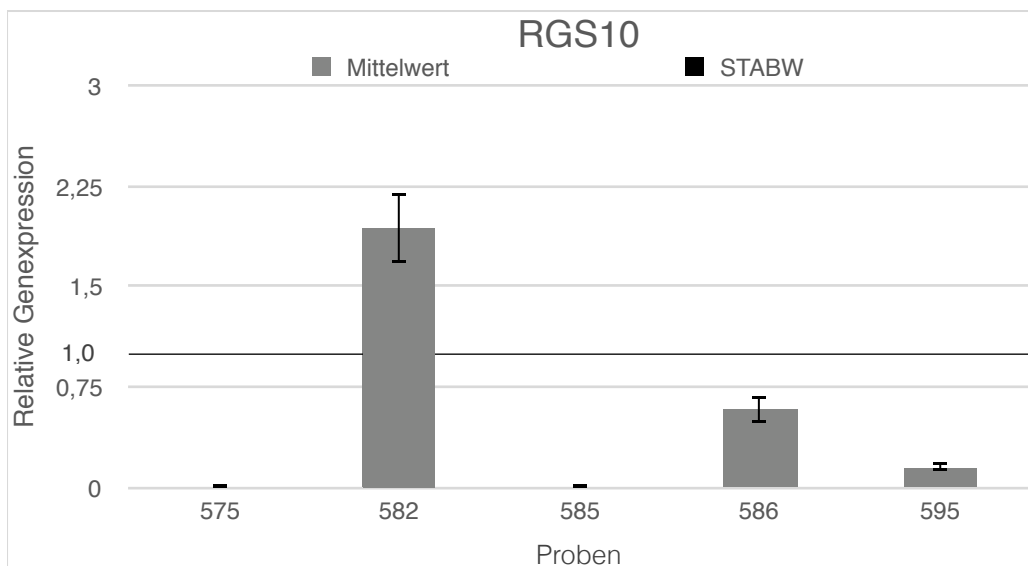


Abbildung 16: Auswertung der RT-PCR-Analyse des RGS10: Relative Genexpressionslevel für RGS10 in CPCs. Das Säulendiagramm zeigt die relativen Genexpressionslevel der verschiedenen Patienten anhand der Auswertung der RT-PCR-Daten. Die x-Achse zeigt die Proben verschiedener CPCs. Die y-Achse zeigt die relativen Genexpressionslevel. Dabei wurden die Ergebnisse nach Pfaffl (2001) normalisiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.

3.4 Nachweis der RGS-Moleküle auf Proteinebene: Western Blot der CPCs

3.4.1 Nachweis des RGS4 mittels Western Blot

In Abbildung 17 ist der Nachweis des RGS4 in den CPCs verschiedener Proben mittels Western Blot dargestellt. Abbildung A zeigt die erfolgreiche Übertragung der Proteine des Zellysates auf die PVDF-Membran anhand der Coomassie-Färbung. Abbildung B zeigt einen α -Tubulin-Blot, welcher eine identische Zell- bzw. Proteinbeladung der Proben bewies. In Abbildung C ist die Proteinbande des RGS4 dargestellt. Für diesen Versuchsaufbau wurden die CPCs von drei verschiedenen Proben untersucht (531, 575, 582). Die Proteinleiter befindet sich links in Abbildung A (Coomassie-Färbung). Sie wurde zur Verbesserung der Übersichtlichkeit in die Abbildungen der Proteinnachweise (B und C) übertragen.

Der Nachweis des RGS4 auf Proteinebene mittels Western Blot konnte nicht für alle Proben erfolgen. Abbildung C zeigt, dass die Proben 582 und 531 eine Bande bei 35 kDA aufwiesen. Dabei wies die Probe 582 eine stärkere Bande und somit höheren RGS4-Gehalt auf. Für die Probe 575 konnte mittels Western Blot kein Nachweis des RGS4 erfolgen. Die Antikörperverdünnung lag bei 1/1000 und die Inkubationszeit betrug 16 Stunden über Nacht.

Die erwartete molekulare Größe des RGS4 beträgt ca. 23 kDA, während die im Western Blot mittels Proteinleiter ermittelte Größe bei ca. 35 kDA lag.

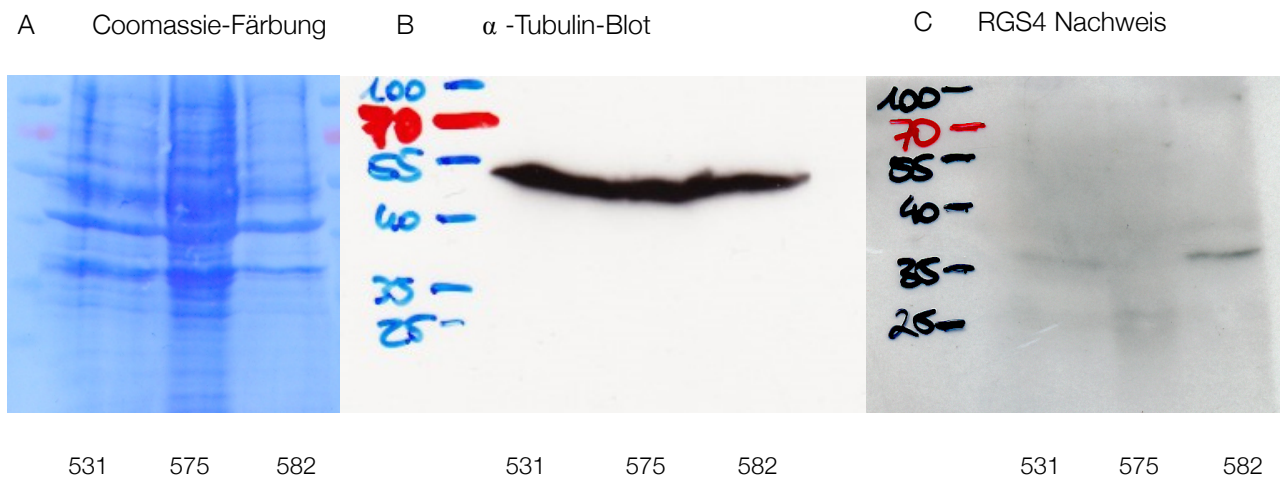


Abbildung 17: Nachweis des RGS4 auf Proteinebene mittels Western Blot. In Abbildung A ist die Coomassie-Färbung dargestellt. Abbildung B zeigt eine gleichmäßige Zellbeladung der Membran mittels α -Tubulin-Blot. Abbildung C zeigt den positiven Nachweis des RGS4 in den CPCs der Proben 531 und 582. Es zeigten sich unterschiedlich starke Proteinbanden, wobei dieselbe Zell- bzw. Proteinmenge aufgetragen wurde, was anhand des α -Tubulin-Blot bestätigt werden konnte (B). Es konnte mittels WB kein Nachweis des RGS4 in den CPCs der Probe 575 erfolgen.

Ergebnisse

Abbildung 18 stellt einen weiteren Nachweis von RGS4 mittels Western Blot dar. Es wurde dabei eine Probe in unterschiedlicher AK-Verdünnung untersucht. Wie in Abbildung 18 gezeigt wird, trat neben der Bande bei 35 kDa auch noch eine zusätzliche Bande bei ungefähr 46 kDa auf. Um auszuschließen, dass es sich bei der zusätzlichen Bande um das Ergebnis einer unspezifischen Bindung des AK bei zu hoher AK-Konzentration handelt, erfolgte eine Wiederholung des Versuchs mit einem weiteren Antikörper aus einem anderen Host. In der Abbildung 18 sind die verschiedenen RGS4-Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen dargestellt. Abbildung A zeigt die erfolgreiche Übertragung der Proteine des Zellysates auf die PVDF-Membran anhand der Coomassie-Färbung. Abbildung B zeigt die Antikörpertestung des RGS4-AK 14530-1-AP der Firma Proteintech (Host Kaninchen) in verschiedenen Konzentrationen. Abbildung C stellt die Antikörpertestung des RGS4-AK c-17 der Firma Santa Cruz (Host Ziege) in verschiedenen Konzentrationen dar. Abbildung B zeigt, dass in allen Antikörperkonzentrationen zwei Banden zu erkennen waren (Höhe 35 kDa und 46 kDa). In Abbildung C ist anhand der Konzentrationstestung des Antikörpers C-17 zu erkennen, dass nur bei einer Verdünnung von 1:250 und 1:500 zwei Banden zu sehen waren. Ab einer höheren Verdünnung zeigen sich keine Banden. Somit konnte bewiesen werden, dass das Auftreten einer zweiten Bande keine unspezifische Bindung aufgrund einer zu hohen Antikörperkonzentration darstellte.

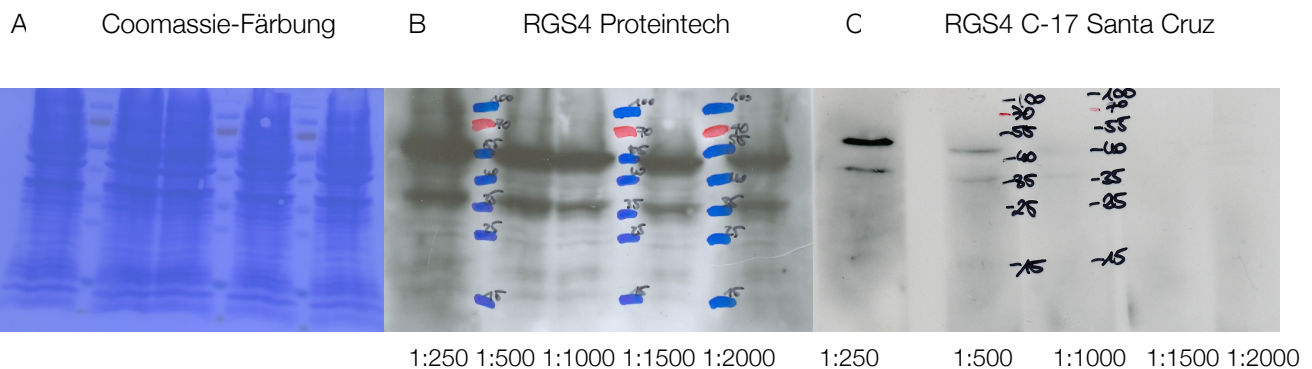


Abbildung 18: Konzentrationstestung zweier verschiedener RGS4-Antikörper. Die Abbildung 18 zeigt den Nachweis von RGS4 mittels zwei verschiedener RGS4-Antikörper. Abbildung A zeigt die Coomassie-Färbung, Abbildung B zeigt den Nachweis unter Verwendung des RGS4-AK der Firma Proteintech. Abbildung C bildet die Verwendung des RGS4-C-17-Ak der Firma Santa Cruz ab. Verwendet wurden die CPCs desselben Patienten in identischer Zellzahl. Es wurden unterschiedliche Antikörperkonzentrationen in absteigender Reihe verwendet. Die Verdünnung ist am unteren Rand der Abbildung angegeben. Dabei waren zwei Banden zu erkennen. Anhand der Proteinleiter konnte die Größe der Proteine bestimmt werden. Diese lagen bei ungefähr 35 kDa und 46 kDa. Beide Banden zeigten sich dabei auch in einer sehr hohen Antikörperverdünnung und waren somit nicht das Ergebnis einer unspezifischen Antikörperbindung bei zu hoher Antikörperkonzentration.

Ergebnisse

3.4.2 Nachweis des RGS10 mittels Western Blot

Abbildung 19 stellt den Nachweis des RGS10 auf Proteinebene dar. In Abbildung A ist der Nachweis einer erfolgreichen Proteinübertragung auf die PVDF-Membran mittels Coomassie-Färbung zu sehen. Abbildung B zeigt mittels α -Tubulin-Blot die Zellmenge bzw. Proteinbeladung der einzelnen Proben. In Abbildung C ist der positive Nachweis des RGS10 in den CPCs mittels Western Blot dargestellt. Untersucht wurden in diesem Versuchsaufbau die CPCs von drei verschiedenen Proben (582, 586 und 585). Die Proteinleiter ist in Abbildung A abgebildet. Sie wurde zur Verbesserung der Übersichtlichkeit in die Abbildungen B und C übertragen.

In Abbildung C ist zu erkennen, dass für die beiden CPCs im linken Abschnitt (582 und 586) ein Nachweis des RGS10 auf Proteinebene erfolgen konnte. Bei den beiden im rechten Abschnitt aufgetragenen Proben handelt es sich um die CPCs derselben Probe (585) in unterschiedlichen Auftragsmengen. Es wurden verschiedene Zellzahlen (1×10^5 Zellen bzw. 3×10^5 Zellen) aufgetragen. Die unterschiedliche Zellmenge wurde mittels α -Tubulin-Blot in Abbildung B nachgewiesen. Es konnte das RGS10 in den CPCs der Probe 585 mittels Western Blot nicht nachgewiesen werden, auch wenn die aufgetragene Zellzahl und somit Proteinmenge erhöht wurde.

Die Antikörperkonzentration betrug 1/2000, die Inkubationszeit betrug 16 Stunden über Nacht. Die molekulare Größe des RGS10 beträgt 21 kDA.

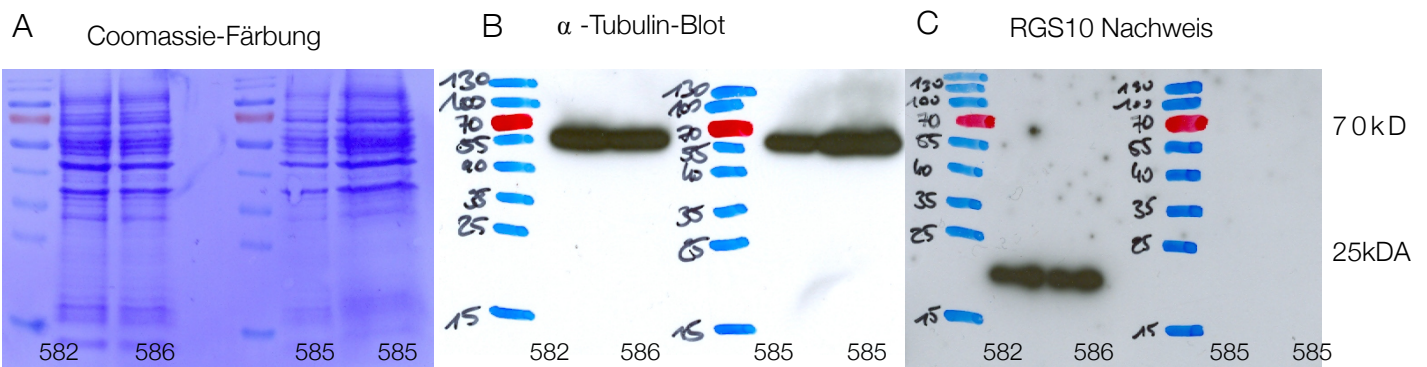


Abbildung 19: Nachweis des RGS10 auf Proteinebene mittels Western Blot. Die Abbildung A zeigt die Coomassie-Färbung. Abbildung B stellt den α -Tubulin-Blot dar. In Abbildung C ist der Nachweis von RGS10 zu sehen. Dabei wurden CPCs von drei Proben (582, 586 und 585) verwendet. Abbildung C zeigt den eindeutigen Nachweis des RGS10 in den CPCs der Proben 582 und 586, während für die Probe 585 kein Nachweis des RGS10 erfolgen konnte.

4. Diskussion

4.1 Diskussion der CPCs innerhalb osteoarthrotisch veränderten Knorpelgewebes

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Nachweis der regulatorischen Proteine RGS4 und RGS10 in chondrogenen Progenitorzellen und in osteoarthrotisch verändertem Knorpelgewebe. Lange galten Chondrozyten als einzige Zellart innerhalb des Knorpels. Dies änderte sich mit der Entdeckung der chondrogenen Progenitorzellen. Der erstmalige Nachweis der CPCs und die Beschreibung ihrer Eigenschaften gelang der AG Miosge 2009. Es erfolgte sowohl der Nachweis spezifischer Oberflächenmarker von Stammzellen als auch deren charakteristischer Merkmale, wie der Fähigkeit, in Gewebe zu migrieren sowie die Fähigkeit zur Pluripotenz (Koelling et al. 2009). CPCs scheinen im adulten Knorpel vorzukommen, auch scheinen sie eine entscheidende Rolle an der Regenerationsfähigkeit des Knorpels zu spielen. Ob es sich um adulte Stammzellen oder um dedifferenzierte Chondrozyten handelt, ist noch nicht endgültig geklärt.

Aufgrund ihres hohen chondrogenen Potenzials sind die CPCs Bestandteil der Forschung, da sie als zukünftige Therapieverfahren die Regeneration des Knorpels beeinflussen sollen. Die Regenerationsfähigkeit des Knorpels als avaskuläres Gewebe ist stark begrenzt. So sind zwar Regenerationsprozesse in den verschiedenen Stadien der OA nachweisbar, das neu gebildete Gewebe weist jedoch als fibrokartilaginäres Gewebe eine verminderte Menge an Kollagen Typ II bei erhöhter Menge an Kollagen Typ I auf und ist somit nur vermindert belastbar und dem gesunden Knorpelgewebe unterlegen (Tesche und Miosge 2005). Ein Ziel der Erforschung der OA stellt somit die Beeinflussung von Knorpelzellen zur Bildung eines hyalinen und nicht fibrokartilaginären Ersatzgewebes im Rahmen regenerativer Therapien dar. Die bisher am meisten verwendete Methode zur Beeinflussung der Differenzierung beruht auf der Verwendung unterschiedlicher Differenzierungsmedien. Jedoch konnte 2005 durch die Studiengruppe um Appleton eine Beeinflussung der chondrogenen Differenzierung durch Eingriff in die Signaltransduktion durch Überexpression der RGS-Proteine gezeigt werden (Appleton et al. 2006). Dies stellt eine neue und bisher kaum untersuchte Methode zur Beeinflussung des chondrogenen Potenzials von chondrogenen Zellen dar. Bei der durch die AG um Appleton untersuchten Zelllinie handelt es sich um ATDC5-Zellen, welche aus einem Teratokarzinom der Maus stammen und in Studien als in-vitro-Modell der Chondrogenese genutzt werden. Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war der Nachweis des RGS4 und RGS10 in chondrogenen Progenitorzellen, sowie innerhalb von osteoarthrotischen Knorpels. Dieses bildet die Grundlage für weiterführende Studien, um als Ziel neue regenerative Therapieverfahren zu entwickeln, welche über die regulatorischen RGS-Proteine die

Differenzierung der CPCs beeinflussen und diese zur Bildung von neuem hyalinen Knorpelgewebe nutzen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse auf Gewebeebene: Immunhistochemie

Durch Verwendung immunhistochemischer Nachweismethoden gelang es zu zeigen, dass im humanen Knorpelgewebe eines osteoarthrotisch veränderten Knies sowohl das RGS4 als auch das RGS10 innerhalb der Chondrozyten vorliegt. Der Nachweis ist dabei in Abbildung 11 und 12 dargestellt. Die Knorpelproben entstammen dem an die Knorpeldefekte angrenzenden Randbereich. Aus ethischen Gründen sind keine immunhistochemischen Färbungen von Knorpelgewebe gesunder Proben möglich, so dass kein Vergleich zwischen gesunden Knorpel und OA-Knorpel erfolgen kann.

Besonders auffällig ist die spezifische Verteilung innerhalb der verschiedenen Knorpelschichten. Sowohl RGS4 als auch RGS10 konnten nicht in der superfizialen Schicht des Knorpels nachgewiesen werden. Während das RGS4 lediglich in der mittleren Schicht des Knorpels nachzuweisen war, konnte das RGS10 sowohl in der Transitionalschicht als auch in der mittleren Schicht nachgewiesen werden. Bisher existieren keine Studien, welche den OA-Knorpel hinsichtlich des Vorkommens von RGS-Proteinen untersuchen, sodass keine Vergleiche zu Studienergebnissen gezogen werden können.

Ein möglicher Erklärungsansatz der nur in diesen Schichten vorkommenden RGS4- und RGS10-Proteine ergibt sich über die Zunahme der Stoffwechselaktivität in diesen Schichten während der Entstehung der OA. Der Phänotyp der Chondrozyten ändert sich, sodass diese nun nicht mehr rund, sondern elongiert erscheinen. Vor allem in diesen und in den Chondrozytenclustern zeigt sich ein Anstieg der Stoffwechselaktivität. So exprimieren sie innerhalb der OA wieder vermehrt Matrixmoleküle, insbesondere Kollagen Typ I, Decorin, Biglykan und Perlecan, wodurch ihnen der größte Anteil an der Regenerationsfähigkeit des Knorpels zugeschrieben wird (Tesche und Miosge 2005). Aufgrund der vermehrten Stoffwechselaktivität, insbesondere in der mittleren Schicht des OA Knorpels, kann der Nachweis des RGS4 und RGS10 in dieser Schicht als möglicher Einfluss in Regulationsmechanismen der Stoffwechselaktivität gedeutet werden. Dieses Ergebnis unterstützt die These, dass sowohl RGS4 als auch RGS10 an den Regenerationsprozessen regulatorisch beteiligt sind.

Wie oben bereits erwähnt, weisen die in diesen Schichten vorkommenden Chondrozyten einen veränderten Phänotyp und veränderte Genexpression auf, was als Ausdruck einer Dedifferenzierung gedeutet wird. Zu den Faktoren, welche eine Dedifferenzierung von Chondrozyten bewirken, gehören Wnt-5A und Wnt-7A (Hwang et al. 2004). Diese führen über den GPCR (Frizzled-Rezeptor) teils G-Protein-unabhängig, teils G-Protein-abhängig zu

Diskussion

einer Dedifferenzierung der Chondrozyten. Da eine Dedifferenzierung der Chondrozyten durch Wnt-5A und Wnt-7A begünstigt wird, kann ein Nachweis des RGS4 und RGS10 als Versuch gedeutet werden, dem Effekt dieser Wnt-Proteine entgegenzuwirken. Ein Zusammenhang zwischen den RGS-Molekülen und dem Wnt-Signalweg innerhalb der Pathogenese der OA ist bisher nicht untersucht und bedarf weiterer Studien.

Eine weitere These wäre, dass ein Zusammenhang zu dem *parathyroid-related peptide* (PTHrP) besteht, da dieses als Vertreter der GPCR-Liganden in den Chondrozytenclustern während der OA vermehrt gebildet wird (Hashimoto et al. 1998). Während der Embryogenese spielt das PTHrP eine entscheidende Rolle innerhalb der Chondrogenese und somit für die Entwicklung des Skelettsystemes. Es wird nahe der Wachstumsfuge gebildet und hemmt den Übergang der prähypertrophen Chondrozyten in hypertrophe Chondrozyten (De Crombrughe et al. 2000). Innerhalb der Pathogenese der OA wird die Dedifferenzierung der Chondrozyten unter Einfluss des analog wirkenden Parathormones gehemmt (Chang et al. 2009). Da es um die Zellcluster herum zu einer vermehrten Bildung des PTHrP kommt, kann dies als Versuch des Knorpels gedeutet werden, der Dedifferenzierung entgegen zu wirken. Der Nachweis der RGS-Proteine in eben diesen Zellclustern kann die Ursache des Versagens dieses Regulationsmechanismus sein.

4.3 Diskussion der Ergebnisse auf Zellebene: Immunzytochemie

Mittels immunzytochemischer Methoden konnte sowohl RGS4 als auch RGS10 innerhalb der CPCs nachgewiesen werden. Auch konnten Rückschlüsse auf deren Lokalisationen gezogen werden. Das RGS4 liegt an der Zellmembran, im Zytosol und an intrazellulären Kompartimenten gebunden vor. Diese Lokalisation stimmt mit der in der Literatur beschriebenen Lokalisation überein (Tu et al. 2001). Auch für das RGS10 zeigte sich ein positiver Nachweis innerhalb der CPCs. Im Gegensatz zum RGS4 liegt es zusätzlich auch intranukleär vor. Aufgrund dieser intranukleären Lokalisation ergeben sich Hinweise auf eine stattgehabte Phosphorylierung des RGS10 als posttranslationale Veränderung. Dieses wurden bereits in vorangegangenen Studien bestätigt (Burgon et al. 2001). Somit stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit mit bisherigen Studienergebnissen überein.

4.4 Diskussion der Ergebnisse auf Genebene: RT-PCR

In Abbildung 15 und 16 sind die Ergebnisse der RT-PCR des RGS4 und des RGS10 dargestellt. Es sind interindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Proben zu erkennen, auch unterscheiden sich die Ergebnisse der RT-PCR beider RGS-Proteine deutlich voneinander.

Die Auswertung der RT-PCR für das RGS4 wird in Abbildung 15 dargestellt. Mittels RT-PCR war in 5 von 7 Proben kein Nachweis des RGS4 in den CPCs möglich. Dabei konnte in zwei Proben überhaupt kein Nachweis erfolgen (Werte nicht gezeigt), in drei Proben lag der ct-Wert > 35 . Lediglich zwei Proben (536 und 582) wiesen ct-Werte < 35 auf. ct-Werte > 35 gelten als Ergebnis einer unspezifischen Amplifikation und führen als solche zu falsch positiven Ergebnissen. Damit kann nur in zwei von sieben Proben der Nachweis des RGS4 in den CPCs als positiv gewertet werden. Zur Überprüfung der Methode erfolgte eine Wiederholung an zwei verschiedenen Referenzgeweben. Auch in den verwendeten Referenzgeweben (MSC und MPC) konnte die RGS4-mRNA nicht nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Es existiert bisher keine Studie, welche die CPCs hinsichtlich der RGS4-Genexpression untersucht, sodass keine Vergleiche zu anderen Studienergebnissen möglich sind. Da innerhalb dieser Arbeit jedoch der Nachweis des RGS4 sowohl auf zellulärer Ebene als auch auf Proteinebene in diesen Proben gelang, scheint es sich um ein fehlerhaftes Ergebnis aufgrund eines methodischen Fehlers zu handeln. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine zu geringe Sensitivität des RGS4-Primers sein.

Aufgrund der hohen ct-Werte ergeben sich hohe Standardabweichungen, welche teilweise über 0,5 liegen. Ursache der unterschiedlichen Amplifikationseffizienz ist der 1995 von Karrer erstmals beschriebene Monte-Carlo-Effekt (Karrer et al. 1995). Der Monte-Carlo-Effekt beschreibt dabei die Abnahme der Amplifikationseffizienz bei nur gering vorhandener mRNA-Konzentration. Die Ursache des Effektes beruht darauf, dass die Bindung eines Primers an die Zielsequenz ein zufälliger Prozess ist und somit von der Konzentration der Zielsequenz und des Primers, der Annealingzeit und Annealingtemperatur abhängig ist (Bustin und Nolan 2004). Aufgrund der exponentiellen Phase der Amplifikation ergeben sich bei niedriger mRNA-Ausgangsmenge hohe Variationen im Ergebnis (Karrer et al. 1995).

Auch die Ergebnisse der RT-PCR des RGS10 zeigen zwischen den einzelnen Proben deutlich unterschiedliche Genexpressionslevel. Für das RGS10 wurden die mittels RT-PCR gewonnenen Daten nach Pfaffl (2001) normalisiert. Als Housekeeping-Gen (HKG) wurde die *Peptidyl-Prolyl-Isomerase A* (PPIa) verwendet, da die Primereffizienzen der verwendeten Primer für das RGS10 und PPIa nur geringe Unterschiede aufwiesen. Während für die Proben 575 und 585 kaum ein Nachweis von RGS10-mRNA erfolgen konnte, zeigten die Proben

Diskussion

586 und 595 ein erhöhtes Genexpressionslevel. Am höchsten war das Genexpressionslevel der Probe 582, welche eine relative Genexpression von ungefähr 1,94 aufwies. Damit zeigte sich nur in dieser Probe eine relative Genexpression des RGS10, welche oberhalb der Genexpression des HKGs lag.

Die Ursache der unterschiedlichen Genexpressionslevel bleibt unklar. Ein Zusammenhang zwischen der Genexpression und dem Geschlecht der Proben scheint nicht vorzuliegen, da es sich sowohl bei den Proben 575 und 585 (niedrigste Genexpression) als auch bei der Probe 582 (höchste Genexpression) um Proben aus dem Knorpelgewebe weiblicher Patienten handelt. Auch die Ergebnisse des BMI sind zwischen den drei Proben nahezu identisch. Alle CPCs entstammen dabei Knorpelchips aus derselben Lokalisation des Kniegelenkes. Die Chips wurden für alle Versuche aus dem Randbereich zwischen dem defekten und dem gesunden Knorpel gewonnen. Für alle PCR-Durchführungen wurden CPCs der ersten zwei Passagen verwendet, sodass kein Zusammenhang zu der Anzahl der Passagen besteht. Auch die verwendete Kultivierungsmethode der CPCs und die Verwendung des Mediums (FCS) unterscheidet sich nicht zwischen den einzelnen Versuchsdurchführungen. Durch die hohe Reproduzierbarkeit der Testergebnisse durch Mehrfachbestimmungen sind die Unterschiede der Genexpressionslevel nicht auf methodische Fehler oder Schwankungen im Reaktionsansatz zurückzuführen.

4.5 Diskussion der Ergebnisse auf Proteinebene: Western Blot

Sowohl RGS4 als auch RGS10 konnten in CPCs auf Proteinebene mittels Western Blot nachgewiesen werden. Für beide Moleküle gilt jedoch, dass sie nicht in allen Proben nachgewiesen werden konnten. In Abbildung 17 zeigt der hier exemplarisch gewählte Western Blot, dass ein Nachweis des RGS4 lediglich für die Probe 582, in geringerem Maße auch für die Probe 531 erfolgen konnte, während der Nachweis für die Probe 575 nicht möglich war. Damit ausgeschlossen werden konnte, dass die Sensitivität des gewählten RGS4-Antikörpers ursächlich für den fehlenden Nachweis ist, wurden die Versuche mit einem weiteren RGS4-Antikörper wiederholt. Es erfolgte eine Antikörpertestung, um die geeignetste AK-Konzentration zu ermitteln (siehe Abbildung 18). Die in der Literatur angegebene Proteingröße liegt bei ungefähr 23 kDA. In keinem der erfolgten Western Blots ließ sich eine Bande auf dieser Höhe nachweisen. Unter Verwendung beider Antikörper zeigte sich in nahezu allen erfolgten Western Blots neben der 35 kDA-Bande eine zusätzliche Bande auf der ungefähren Höhe von 46 kDA. Bei Erreichen einer geringeren AK-Konzentration, konnte weder die 35 kDA noch die 46 kDA-Bande nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass es sich bei der zusätzlichen Bande nicht um eine unspezifische Bande aufgrund einer zu hoch gewählten Antikörperkonzentration handelt. Diese zusätzliche Bande war bereits in mehreren Studien zuvor gezeigt worden. Die in verschiedenen Studien am häufigsten beobachtete Bande im Western Blot liegt bei ca. 35 kDA. Hierbei sind bisherige Studien uneinig über die Bedeutung dieser Bande. Manche Studien werten diese Bande als Isoform RGS4-3 (Rivero et al. 2013), andere Studien werten sie als Ergebnis einer Palmitoylierung des RGS4 (Doupnik et al. 2001). Bei Auftreten von zwei Banden (35 kDA und 46 kDA) wurden beide Banden als Ergebnis verschiedener Palmitoylierungszustände des RGS4 gewertet (Doupnik et al. 2001). Somit stimmen die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse mit den Ergebnissen der Literatur überein.

Das Vorliegen beider Banden im Western Blot könnte ein Hinweis darauf sein, dass das RGS4 in den CPCs palmitoyliert vorliegt. Eine Palmitoylierung der Cys-2-Position würde hierbei eine Verlängerung der HWZ des RGS4 bewirken, indem der Abbau über das Proteasom gehemmt wird (Wang et al. 2010). Durch Palmitoylierung der Cys-12-Position wird die Adhäsion an der Plasmamembran deutlich erhöht, sodass ohne Palmitoylierung an dieser Stelle keine Membranaffinität besteht und es zu einem Funktionsverlust des RGS4 kommt (Tu et al. 1999, Bastin et al. 2012). Dabei könnte das Vorliegen des RGS4 in palmitoylierter Form als Versuch der CPCs verstanden werden, dessen Aktivität und Halbwertszeit zu erhöhen. Ohne eine Palmitoylierung an der Cys-2-Position ist eine Bindung des RGS4 an Endosomen nicht möglich. Anhand immunzytochemischer Färbungen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das RGS4 innerhalb der CPCs an intrazelluläre Strukturen gebunden vorliegt,

Diskussion

sodass es zumindest teilweise in palmitoylierter Form vorliegen muss. Um nachzuweisen, um welche intrazelluläre Strukturen es sich handelt, sind weitere Experimente, beispielsweise elektronenmikroskopische Untersuchungen oder doppelimmunzytochemische Färbungen, nötig. Auch könnte die Ursache dafür, dass in den CPCs keine Bande bei 23 kDA vorliegt, in dem Bindungsverhalten des RGS4-AK liegen. Denkbar ist, dass sich der Antikörper spezifisch gegen ein Epitop richtet, welches erst im Zuge der Palmitoylierung entsteht. Folglich könnte solch ein Antikörper nur an diejenigen RGS4-Proteinen binden, welche palmitoyliert vorliegen. Somit würden die RGS4-Proteine, welche nicht palmitoyliert vorliegen, nicht durch den AK nachgewiesen werden.

Auch der Nachweis für RGS10 konnte innerhalb der CPCs auf Proteinebene erfolgen. Jedoch war nicht für alle Proben ein Nachweis des RGS10 möglich. Wie in Abbildung 19 gezeigt wird, konnte für die ersten beiden Proben (582 und 586) der Nachweis erfolgen, während für die dritte Probe (585) kein Nachweis von RGS10 möglich war. Dabei wurde die Durchführung des Western Blots mit den CPCs der Probe 585 mehrfach wiederholt. Auch durch wiederholte Versuche konnte kein Nachweis des RGS10 in dieser Probe erfolgen (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus stimmen diese Ergebnisse mit den Ergebnissen der RT-PCR überein, da auch hier für dieselbe Probe eine nur sehr geringe RGS10-Genexpression nachweisbar war. Somit ist der fehlende Nachweis des RGS10 in den CPCs der Probe 585 kein Resultat methodischer Fehler oder einer zu geringen AK-Sensitivität.

Die Ursache des unterschiedlichen RGS4- und RGS10-Nachweises innerhalb der verschiedenen Proben kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht benannt werden. Wichtig für das Verständnis der RGS-Proteine ist, dass sie verschiedenen Regulationsmechanismen, wie Palmitoylierung und Phosphorylierung, unterworfen werden, was deren Funktionsgrad maßgeblich beeinflusst. Nur ein Teil der RGS-Proteine nimmt somit Einfluss auf die Signaltransduktion. Der Western Blot als semiquantitative Methode ermöglicht keine Aussage über die genaue Konzentration der RGS-Proteine, auch ist mittels dieser Methode keine Aussage über die Lokalisation der RGS-Proteine und somit deren Funktionsgrad möglich. Eine Aussage bezüglich der „Aktivität“ der RGS-Proteine ist somit nicht möglich. Lediglich der Nachweis des RGS4 mit den Banden bei 35 kDA und 46 kDA zeigt erste Hinweise darauf, dass es sich bei den vorliegenden RGS-Proteinen um palmitoylierte und somit aktive Proteine handelt.

4.6 Diskussion des Nachweises von RGS4 und RGS10 innerhalb der CPCs

Zusammenfassend konnte sowohl das RGS4, als auch das RGS10 innerhalb der CPCs und in osteoarthrotischem Knorpelgewebe nachgewiesen werden. Dieser Nachweis erfolgte dabei auf Gewebeebene, Zellebene, Protein- und cDNA-Ebene. Insgesamt ließ sich das RGS4 auf Genexpressionsebene in nur zwei Proben nachweisen, was am ehesten als Fehler der Methode gewertet wurde.

Die Wirkungen des RGS4 und des RGS10 innerhalb der Chondrogenese unterscheiden sich deutlich voneinander, sodass auch der positive Nachweis innerhalb der CPCs und innerhalb des osteoarthrotischen Knorpels getrennt voneinander zu betrachten ist. Während RGS4 zu einer Abnahme der chondrogenen Differenzierung in ATDC5-Zellen führt, bewirkt RGS10 eine Zunahme der chondrogenen Differenzierung (Appleton et al. 2006). Das RGS4 bewirkt dabei eine Abnahme der Produktion des Kollagen Typ IIa und der alkalischen Phosphatase. Der erfolgte Nachweis des RGS4 könnte somit als Ursache der verminderten Kollagen-Typ-II-Synthese gedeutet werden. Das RGS10 bewirkt eine Zunahme der Kollagen-Typ-IIa-Synthese, sowie der AP, der GAG, des Sox9 und des Kollagen Typ X. Somit kann der positive Nachweis des RGS10 als Versuch gedeutet werden, eine Erhöhung des chondrogenen Potenziales und der Kollagen-Typ-II-Synthese sowohl in den CPCs als auch im osteoarthrotischen Knorpel zu bewirken. Da sich unter RGS10 nicht nur eine Zunahme von Kollagen Typ II und GAG, sondern auch des Kollagen Typ X und eine Zunahme der alkalischen Phosphatase-Aktivität ergibt, ist die Wirkung des RGS10 somit vielseitig und scheint über die alleinige chondroprotektive Erhöhung des Kollagen Typ II hinaus zu gehen. Eine Zunahme der Kollagen-Typ-X-Produktion innerhalb ausgereiften Knorpels stellt ein charakteristisches Merkmal von dedifferenzierten Chondrozyten dar. Somit kann vermutet werden, dass der erfolgte Nachweis des RGS10 in der mittleren und in den tieferen Schichten des Knorpels die Ursache der dortigen Kollagen-Typ-X-Produktion sein kann. Um diese Vermutung zu bestätigen, sind jedoch weitere Studien nötig.

In den Untersuchungsergebnissen liegen deutliche interindividuelle Unterschiede vor. Auf Proteinebene konnte kein RGS4-Nachweis in der Probe 575 und kein RGS10-Nachweis in der Probe 585 erfolgen. Entscheidend ist, dass die Ergebnisse des Western Blots und RT-PCR in Bezug auf das RGS10 übereinstimmen und somit nicht Folge einer fehlerhaften Bestimmung sind. Da mittels RT-PCR kaum RGS4-mRNA in den Proben nachgewiesen werden konnte, können beide Methoden nicht miteinander verglichen werden. Ursache der unterschiedlichen Konzentrationen zwischen den verschiedenen Proben bleibt zum jetzigen Zeitpunkt unklar und bedarf weiterer Versuche. Bisher scheinen die Unterschiede nicht durch das Geschlecht oder den BMI bedingt zu sein. Die Fallzahl der hier gewählten Proben (n=7)

Diskussion

ist jedoch zu gering, um eine qualitative Aussage bezüglich des Zusammenhanges zwischen den RGS-Proteinen und dem BMI, dem Alter und dem Geschlecht treffen zu können.

Mittels Western Blot ergeben sich Hinweise darauf, dass das RGS4 innerhalb der CPCs palmitoyliert vorliegt. Bereits viele verschiedene Studien zuvor konnten eine Funktionszunahme durch die Palmitoylierung der Cys-12-Position zeigen, da sich die Membranaffinität erhöht (Bastin et al. 2012). Auch führt eine Palmitoylierung der Cys-2-Position zu einer Verlängerung der HWZ, da der Abbau durch das Proteasom inhibiert wird (Wang et al. 2010). Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass sowohl die Halbwertszeit als auch die Aktivität des RGS4 in den CPCs durch Palmitoylierung zunimmt.

Auch das RGS10 unterliegt posttranslationalen Veränderungen, welche eine Zu- oder Abnahme der Aktivität bewirken. So wird das RGS10 durch Phosphorylierung in den Zellkern verlagert. Mit den hier gewählten Methoden kann nicht unterschieden werden, ob es sich bei dem RGS10 um eine phosphorylierte Form handelt oder nicht. Somit sind keine Aussagen bezüglich des Funktionszustandes des RGS10 möglich. Lediglich durch die Immunhistochemie sowie die Immunzytochemie ergeben sich aufgrund der nukleären Lokalisation des RGS10 Hinweise auf eine stattgehabte Phosphorylierung als posttranslationale Veränderung.

4.7 Diskussion der Wachstums- und Differenzierungsfaktoren innerhalb der Pathogenese der Osteoarthritis und des Zusammenhanges mit RGS4 und RGS10

Da RGS4 und RGS10 in den CPCs nachgewiesen werden konnte, scheinen sie eine Rolle innerhalb der Regulationsprozesse der CPCs zu spielen. Da sich beide RGS-Proteine auch innerhalb des osteoarthrotischen Knorpels nachweisen lassen, kann ein Zusammenhang zu der Osteoarthritis vermutet werden. Somit muss geprüft werden, welche der Regulationsmechanismen innerhalb der OA einen GPCR als Rezeptor nutzen und somit einer Regulation durch RGS-Proteine unterliegen.

Viele Faktoren und Zytokine spielen in der Pathogenese der OA eine Rolle. Dabei kann zwischen anabolen (chondroprotektiven), regulatorischen und katabolen (destruierenden) Faktoren unterschieden werden. Zu den katabolen Faktoren zählen das Interleukin-1 (IL-1) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α). Während den katabolen Faktoren Interleukin 17 (IL-17) und 18 (IL-18) innerhalb der rheumatoiden Arthritis eine Rolle zugeschrieben werden konnte, ist ein Zusammenhang zu der OA bisher nicht geklärt. Als weitere katabole Faktoren wirken der *leucemia inhibitory factor* (LIF) und Oncostatin M. Zu den regulatorischen Faktoren zählen die Interleukine IL-6 und IL-8. Auch die regulatorischen „inhibitorischen“ Faktoren IL-4, IL-10, IL-13 führen zu einer Abnahme proinflammatorischer Enzyme und wirken somit chondroprotektiv. Zu den inhibitorischen Faktoren zählen auch der IL-1-Rezeptor-Antagonist, sowie Interferon γ . Zuletzt sind die anabolen Faktoren zu nennen, welche insbesondere während der Chondrogenese als Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wirken. Hierzu zählen der *insulin-like growth factor* (IGF1), *transforming growth factor* β (TGF β) sowie der *fibroblast growth factor* (FGF), das *bone morphogenetic protein* (BMP) und der *growth differentiation factor 5* (GDF-5) (Goldring 2000). Dabei wirken alle bisher genannten Faktoren nicht durch GPCR, sondern als Thyrosinkinasen, und unterliegen dementsprechend keiner Regulation durch RGS-Proteine.

Somit wirkt ein Großteil der in der OA eingebundenen Faktoren RGS-unabhängig. Dennoch handelt es sich bei den GPCR um eine der wichtigsten Rezeptorarten innerhalb des Skelettsystems. Sie sind Bestandteil der Signaltransduktion des Parathormones (PTH) und Calcitonin sowie des lokalen Faktors *parathyroid-hormone related protein* (PTHrP) und der Prostaglandine (Bowler et al. 1998).

Als wichtiger Vertreter der GPCR-Liganden in den Chondrozyten gilt PTHrP. Bei dem PTHrP handelt es sich um einen parakrinen Faktor, welcher mit derselben Affinität an den PTH-Rezeptor bindet wie das Parathormon (Bowler et al. 1998). Dabei koordinieren das PTHrP zusammen mit dem PTH/PTHrP-Rezeptor und dem *indian hedgehog* (Ihh) die

Diskussion

Chondrozytendifferenzierung während der enchondralen Ossifikation. Unter Einfluss von PTHrP verzögert sich die Chondrozytendifferenzierung der prehypertrophen in hypertrophe Chondrozyten. Weitere Schritte der Chondrogenese scheinen durch PTHrP nicht beeinflusst zu werden (Kobayashi et al. 2002). Anhand von Mäusen ohne PTHrP (PTHrP^{-/-}) konnte gezeigt werden, dass auch die Wirkung des Ihh durch PTHrP vermittelt wird (Chung et al. 1998). Das Ihh bewirkt eine Zunahme des PTHrP, während PTHrP im Sinne eine negativen Rückkopplung die Produktion des Ihh inhibiert (Minina et al. 2001). Zusätzlich konnte in Studien eine Abnahme der Apoptoserate unter PTHrP beschrieben werden (Chang et al. 2009). Das PTHrP führt über $G\alpha s$ zu einer Aktivierung der Adenylylcyclase und somit zu einer Zunahme des cAMP (Bowler et al. 1998). Dies wiederum aktiviert den Proteinkinase A-Weg. Jedoch stimuliert das PTHrP zusätzlich über $G\alpha q$ die Phospholipase C, wodurch über IP3 die Proteinkinase C aktiviert wird. Die Aktivierung des $G\alpha s$ -Weges spielt innerhalb der Chondrozytendifferenzierung jedoch die größte Rolle (Sakamoto et al. 2005).

Die Chondrozyten durchlaufen in der OA eine Änderung ihres Phänotyps, ähnlich der Entwicklung innerhalb der enchondralen Ossifikation während der terminalen Differenzierung. So exprimieren sie erneut Marker der hypertrophen Chondrozyten (Annexine, AP, Kollagen Typ X). Nicht nur während der Chondrogenese verzögert das PTH/PTHrP die Differenzierung der Chondrozyten in hypertrophe Chondrozyten, auch innerhalb der Osteoarthrose wird dieser Prozess durch das PTH und PTHrP gehemmt. Somit kommt dem PTHrP eine chondroprotektive Rolle mit konsekutiver verzögerter Osteoarthrose zu (Chang et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass das PTHrP vermehrt innerhalb von osteoarthrotischen Knorpels gebildet wird (Terkeltaub et al. 1998), insbesondere innerhalb der Clusterformationen (Poole 1999). Dies könnte die Ursache dafür sein, dass es nicht in den Chondrozytenclustern, sondern insbesondere in den tieferen Knorpelschichten zu einer Dedifferenzierung der Chondrozyten und einer konsekutiven Produktion von Kollagen Typ X kommt. Innerhalb der Pathogenese der OA stellt die Dedifferenzierung der Chondrozyten ein lange bekanntes Merkmal dar. Somit stellt sich die Frage, ob und warum die Regulationsmechanismen des PTHrP versagen. Als Ergebnis der Studie von Appleton reduzierte das RGS4 zwar die Kollagen-Typ-II-Synthese, wies jedoch keinen Effekt auf die Kollagen-Typ-X-Synthese auf. Im Gegensatz dazu erfolgt unter dem Einfluss des RGS10 eine vermehrte Kollagen-Typ-X-Produktion, sodass sich die Frage ergibt, inwieweit die Wirkung des RGS10 durch Regulation des PTHrP vermittelt wird (Appleton et al. 2006).

In der Studie von Appleton wurde der Einfluss von RGS4 und RGS10 auf die cAMP-Produktion in Anwesenheit von PTHrP untersucht. Hierbei führte eine Überexpression von RGS4 und RGS10 zu keinem signifikanten Unterschied in der cAMP-Produktion in ATDC5 - Zellen unter Hinzugabe von PTHrP. Somit scheint weder RGS4 noch RGS10 einen

Diskussion

inhibitorischen Effekt auf den *G α s*-Weg auszuüben. Dies stützt die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um De Vries, welche keinem der RGS-Proteine einen Effekt auf den *G α s*-Weg nachweisen konnte (De Vries und Gist Farquhar 1999). Die Ergebnisse der Studie von Appleton berücksichtigen allerdings nur den *G α s*-, nicht jedoch den *G α q*-Signalweg, welcher jedoch für das PTHrP bereits nachgewiesen werden konnte. Ob RGS4 und RGS10 einen Einfluss auf den *G α q*-Weg ausüben und somit die Dedifferenzierung der Chondrozyten innerhalb der OA beeinflussen, ist bisher nicht untersucht. Dass das RGS4 die GTP-Hydrolyse an der *G α q*-UE beschleunigen kann, wurde bereits 1996 durch die Arbeitsgruppe Berman nachgewiesen (Berman et al. 1996). Sollte das RGS4 oder RGS10 einen Einfluss auf das *G α q* ausüben, indem es eine schnellere Terminierung der Signaltransduktion des PTHrP bewirkt, so würde dies den Effekt des PTHrP aufheben und somit beispielsweise zu einer Dedifferenzierung der Chondrozyten führen. Es kann also argumentiert werden, dass der positive Nachweis des RGS4 und RGS10 als Ursache des Versagens des chondroprotektiven Einflusses des PTHrP gedeutet werden kann. Jedoch existieren zum jetzigen Zeitpunkt keine Studien, welche eine Beeinflussung der Signaltransduktion des PTHrP unter Einfluss von RGS4 und RGS10 in Bezug auf den *G α q*-Transduktionsweg untersucht haben. Somit handelt es sich lediglich um einen vermuteten Zusammenhang. Diese Vermutung würde jedoch mit dem Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchungen in Einklang stehen, da sich der Nachweis des RGS4 und des RGS10 insbesondere auf die tiefen Knorpelschichten bezieht, in welcher auch eine Dedifferenzierung der Chondrozyten beobachtet wird. Bereits zuvor konnte eine Zunahme der Kollagen-Typ-X-Produktion unter RGS10 nachgewiesen werden, während das RGS4 keinen Einfluss zu haben scheint. Innerhalb des ausgereiften Knorpels ist die Kollagen-Typ-X-Produktion das charakteristische Merkmal der Dedifferenzierung der Chondrozyten, sodass sich die Frage stellt, inwieweit das RGS10 an dieser Dedifferenzierung beteiligt ist. Da das PTHrP die Dedifferenzierung hemmt, kann vermutet werden, dass es unter Einfluss des RGS10 zu einem verminderten Effekt des PTHrP mit konsekutiver Kollagen-Typ-X-Produktion kommt, sollte das RGS10 einen Einfluss auf den *G α q*-Transduktionsweg ausüben. Dies stellt jedoch nur eine Vermutung dar und muss in weiteren Studien geprüft werden.

Neben dem Parathormonrezeptor handelt es sich auch bei dem Frizzled-Rezeptor, welcher den Wnt-Signalweg vermittelt, um einen GPCR. Dabei stellen die Frizzled-Rezeptoren eine eigene Familie innerhalb der GPCR dar (Fredriksson et al. 2003). Bei den Wnt-Proteinen handelt es sich um Signalproteine, welche als lokale Botenstoffe entscheidend für die Zelldifferenzierung, das Zellschicksal und die Genexpression während der Embryonalentwicklung sind. Durch Bindung eines Wnt-Liganden an den Frizzled-Rezeptor werden drei verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst: der Wnt/ β -Catenin-Weg (kanonischer

Diskussion

Wnt-Signalweg), der planare Polaritäts-Signalweg und der Wnt/Ca²⁺-Weg. Lange galt der Wnt-Signalweg als G-Protein-unabhängig. Dies konnte jedoch bereits durch mehrere Studien widerlegt werden. Dabei wurde sowohl für den kanonischen (β-Catenin-abhängigen) Weg als auch für den planaren Polaritäts-Signalweg eine G-Protein-abhängige Signaltransduktion nachgewiesen (Koval und Katanaev 2011). Auch der Wnt/Ca²⁺-Weg ist G-Protein-abhängig.

Viele Studien konnten bereits einen Zusammenhang zwischen der Osteoarthrose und dem Wnt-Signalweg beweisen. Verschiedene Wnt-Proteine und Frizzled-Rezeptoren lassen sich bei Vorliegen einer OA in der Synovialflüssigkeit nachweisen (Ryu und Chun 2006). Auch wurde eine Zunahme unterschiedlicher Wnt-Proteine innerhalb des Knorpels bei Erkrankung an Osteoarthrose nachgewiesen, insbesondere des Wnt-7A und Wnt-5A. Diese Ergebnisse konnten 2011 mittels Massenspektroskopie gestützt werden, da sich Wnt-5A innerhalb des Sekretoms von CPCs nachweisen lässt (Gaida 2012).

Die Funktionen der Wnt-Proteine in Bezug auf den Knorpel sind vielfältig und zum Teil gegensätzlich. Da sowohl Wnt-5A als auch Wnt-7A eine Abnahme der Kollagen-Typ-II-Synthese und Zunahme der Kollagen-Typ-I-Synthese bewirken, wird ihnen eine Rolle in der Knorpeldestruktion und auch der Dedifferenzierung der Chondrozyten in der OA zugesprochen (Hwang et al. 2004). Dies wird insbesondere dadurch gestützt, dass die Wirkung des katabolen Faktors Interleukin-1β (IL-1β) durch die Wnt-Proteine Wnt-5A und Wnt-7A vermittelt wird. Auch wird die Synthese der beiden Wnt-Proteine innerhalb der OA durch das IL-1β gesteigert (Hwang et al. 2004). Das IL-1β gilt als wichtiger Faktor in der Entstehung der OA (Ryu und Chun 2006). Im Gegensatz dazu erfolgt durch Wnt-11 eine Zunahme der Kollagen-Typ-II-Synthese. Dementsprechend wird dem Wnt-11 eine Rolle in der Homöostase des Knorpels zugesprochen. Innerhalb der OA wird die Synthese des Wnt-11 durch IL-1β gehemmt (Ryu und Chun 2006). Die Signaltransduktion des Wnt-5A und Wnt-7A erfolgt teilweise über den kanonischen (β-Catenin-abhängigen) Weg, teilweise jedoch auch über den planaren Polaritäts-Signalweg (Ryu und Chun 2006). Zusätzlich reduziert Wnt-7A die NO vermittelte Zellapoptose (Hwang et al. 2004).

Ein weiterer Zusammenhang zwischen den Wnt-Proteinen und der OA ergibt sich durch Beeinflussung der MMP-Moleküle durch Wnt-Proteine. In Tiermodellversuchen wurde über viele Jahre eine Zunahme an MMP durch Einfluss von Wnt und somit eine Zunahme der OA postuliert. In einer Studie an bovinem Knorpel konnten Thomas et al. 2011 eine Zunahme kataboler Stoffwechselprozesse unter Einfluss von Wnt-3A zeigen. So erfolgt unter mechanischer Beanspruchung und Co-Stimulation mit Wnt-3A eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges. Als Resultat konnte eine Verschiebung von anabolen zu katabolen Stoffwechselprozessen gezeigt werden, wie es auch äquivalent innerhalb der Pathogenese der OA vorkommt. Wnt-3A bewirkte dabei eine Abnahme der Aggrecan- und

Diskussion

Sox9-Synthese, sowie eine Zunahme der MMP3- und ADAMTS-4-Synthese (Thomas et al. 2011). Eine ähnliche Beobachtung konnte an murinem Knorpel erfolgen. Dabei konnte 2012 die Arbeitsgruppe um Ma zeigen, dass diese Studienergebnisse nicht auf den menschlichen Knorpel übertragbar sind. Unter Versuchsbedingungen bewirkt eine Co-Stimulation menschlicher Chondrozyten unter Einfluss von IL-1 und Wnt-3A/ Wnt-7B eine Verringerung des Einflusses von IL-1 auf die Synthese der MMP-1, -3, -13. Dies wird insbesondere durch die inhibitorische Interaktion des β -Catenin mit dem *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) bewirkt, welcher die IL-1-abhängige Stimulation der MMP vermittelt (Ma et al. 2012). Somit konnte gezeigt werden, dass große Unterschiede zwischen den Effekten der Wnt-Proteine bestehen und Studien an murinem und bovinem Knorpel nicht auf humanen Knorpel übertragen werden können. Dabei wird die Zunahme des Wnt-7B innerhalb der OA als Versuch der Chondrozyten gedeutet, gegen den Knorpelabbau durch MMPs anzugehen (Ma et al. 2012).

Unter dem Einfluss der Wnt-Antagonisten *sekreted frizzled related protein* (sFRP), *Grem1* und *Dickkopf-1* (DKK-1) ließ sich eine Verzögerung der Dedifferenzierung von Chondrozyten innerhalb der OA zeigen (Clevers und Nusse 2012, Leijten et al. 2012). Das sFRP3 wird in der OA vermehrt gebildet. Während es im gesunden Knorpel nicht nachgewiesen werden kann, kommt es im osteoarthrotischen Knorpel zu einer Zunahme des sFRP3, insbesondere in der superfizialen Schicht, geringer ausgeprägt auch in der mittleren und tiefen Schicht (James et al. 2000). Eine Punktmutation im Gen des sFRP3 (oder auch FrzB-3) stellt eine Prädisposition für Osteoarthritis dar. Durch die Mutation wird die inhibitorische Aktivität des sFRP3 reduziert, wodurch die Wahrscheinlichkeit, eine OA zu erleiden, erhöht wird (Loughlin et al. 2004).

Zusammenfassend betrachtet sind die Funktionen der Wnt-Proteine als Ligand der GPCR sowohl während der Chondrogenese als auch innerhalb der Pathogenese der OA vielfältig und zum Teil entgegengesetzt. Da die Wnt-Antagonisten eine verzögerte Dedifferenzierung der Chondrozyten bewirken und bei einem nicht-funktionellen Wnt-Antagonisten aufgrund einer Genmutation eine Prädisposition bezüglich der OA besteht, scheinen die Wnt-Proteine an der Pathogenese der OA beteiligt zu sein. So konnte gezeigt werden, dass Wnt-7A und Wnt-5A die Wirkung des katabolen Faktors IL-1 β vermitteln. Im Gegensatz dazu scheinen Wnt-3A und Wnt-7B den Effekt von IL-1 β aufzuheben und so die MMP-Produktion zu verringern (Ma et al. 2012). Somit würde ihnen ein chondroprotektiver Charakter zugeschrieben werden. Weitere Studien sind nötig um die Effekte der einzelnen Wnt-Proteine in Bezug auf die Osteoarthritis weiter einzugrenzen. Bisher existiert keine Studie, welche den Zusammenhang zwischen den RGS-Proteinen und dem Wnt-Signalweg in Hinblick auf die Pathogenese der OA untersucht. Es bleibt also zu klären, welche der eben beschriebenen

Mechanismen durch RGS4 und RGS10 beeinflusst werden. Da in dieser Studie der Nachweis des RGS4 und RGS10 in den mittleren und tieferen Schichten des Knorpels erfolgen konnte, kann dies als Versuch gedeutet werden, dem katabolen Effekt des Wnt-5A und Wnt-7A entgegenzuwirken.

Neben den direkten GPCR-Liganden Wnt und PTHrP, kann den katabolen Faktoren IL-1 und TNF α eine indirekte G-Protein-abhängige Wirkung zugeschrieben werden. Durch beide Faktoren wird die Produktion der Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), der Cyclooxygenase-2 (COX-2) und Phospholipase A2 angeregt, wodurch vermehrt Prostaglandin E2 gebildet wird. Prostaglandin E2 stellt wie alle Prostaglandine einen Liganden der GPCR dar und repräsentiert somit einen G-Protein-abhängigen Faktor in der Entstehung der OA. Dabei konnte dem Prostaglandin E2 ein chondroprotektiver Effekt zugeschrieben werden, da es zu einer Erhöhung der Kollagen-Typ-II-Synthese führt und als autokriner Faktor den Effekt des IL-1 moduliert (Goldring und Berenbaum 1999). Sollte es zu einer Beeinflussung des Prostaglandin E2 durch das RGS4 oder RGS10 kommen (im Sinne einer schnellen Terminierung der Signalkaskade), würde dies eine Abnahme der Kollagen-Typ-II-Synthese und somit des chondroprotektiven Charakters bedeuten. Somit kann argumentiert werden, dass das Vorhandensein der RGS-Proteine innerhalb OA-Knorpels Ursache des Versagens der chondroprotektiven Wirkung des Prostaglandin E2 ist. Bisher jedoch existieren keine Studien, welche den Zusammenhang zwischen den RGS-Proteinen, den Prostaglandinen und der Pathogenese der OA untersuchen, sodass diese Annahme rein spekulativ bleibt.

4.8 Klinische Relevanz und therapeutischer Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals der Nachweis der regulatorischen Proteine RGS4 und RGS10 sowohl innerhalb osteoarthrotischen Knorpels als auch in chondrogenen Progenitorzellen erfolgen. Dabei gelang der Nachweis sowohl auf Gewebe-, Zell-, als auch auf Protein- und Genebene. Den CPCs wird zukünftig eine große Rolle in der Behandlung der Osteoarthrose zugesprochen, da sie als Progenitorzellen über ein hohes chondrogenes Potenzial verfügen. Der Nachweis der RGS-Proteine innerhalb der CPCs lässt somit hoffen, dass über diese ein Eingriff in die Signaltransduktion ermöglicht wird. Würde es gelingen, auf die chondrogene Differenzierung der CPCs Einfluss zu nehmen, so wäre dies der Grundbaustein zukünftiger neuer regenerativer Therapien. Viele weitere Studien sind jedoch nötig, um die genauen Mechanismen und Signalwege zu untersuchen, auf welche die RGS-Proteine Einfluss nehmen. Auch muss untersucht werden, ob die Stimulation der CPCs mit RGS-Proteinen deren chondrogenes Potenzial erhöht und es die Bildung hyalinen Knorpels zur Folge hat. Würde es unter dem Einsatz der RGS-Proteine zu der Bildung von Knorpelgewebe mit hyalinen Eigenschaften kommen, so wäre der Grundbaustein für eine weitere regenerative Therapieoption in der Behandlung der Osteoarthrose geschaffen. Hier

Diskussion

stellt der Nachweis der RGS-Proteine lediglich den ersten Schritt dar, wodurch sich viele Fragen ergeben: Mit welchen der genannten Faktoren interagieren die RGS-Proteine? Welche Signaltransduktion ist ausschlaggebend dafür, dass das RGS4 die chondrogene Differenzierung hemmt, während RGS10 diese fördert? Inwieweit kann man die RGS-Proteine *in vitro* nutzen, um das chondrogene Potenzial zu erhöhen? Und wie können solche Ergebnisse *in vivo* angewandt werden?

Bisher wurden die RGS-Proteine nur im Zusammenhang mit der Chondrogenese untersucht. Ob und welcher Zusammenhang zu der OA besteht, wurde bisher nicht untersucht. Bestandteil dieser Arbeit war der erstmalige Nachweis des RGS4 und RGS10 innerhalb osteoarthrotischen Knorpels. Aufgrund des erfolgten Nachweises der regulatorischen Proteine innerhalb des osteoarthrotischen Knorpels kann von einer regulatorischen Funktion dieser innerhalb der OA ausgegangen werden. Die genauen Mechanismen, auf welche die RGS-Proteine Einfluss nehmen, müssen noch untersucht werden. So stellt sich die Frage, welchen Anteil die RGS-Proteine an der Pathogenese der OA ausüben und ob sie ein mögliches Ziel in der Behandlung und auch der Prävention der OA sind. Diese Arbeit nennt mögliche Interaktionspartner der RGS-Proteine, jedoch sind viele weitere Studien nötig, um den genauen Pathomechanismus und die verschiedenen Signaltransduktionsketten benennen zu können, welche letztendlich ursächlich für die Entstehung der OA sind.

Viele weitere Studien sind nötig, damit der genaue Zusammenhang zwischen den RGS-Proteinen und der Entstehung der Osteoarthritis benannt werden kann und den RGS-Proteinen in der Therapie der Osteoarthritis eine klinische Bedeutung zukommt.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals die RGS-Proteine RGS4 und RGS10 in CPCs und in Knorpelproben von Knien nachgewiesen werden, welche im Rahmen einer TEP-Implantation bei Vorliegen einer OA entfernt worden waren. Der Nachweis erfolgte dabei innerhalb osteoarthrotischen Knorpels auf Gewebeebene und in Bezug auf die CPCs auf Gen-, Protein- und zellulärer Ebene.

Auf Proteinebene konnten beide RGS-Proteine in den CPCs nachgewiesen werden, auch konnte die Methode erste Hinweise darauf liefern, dass das RGS4 in CPCs in palmitoylierter Form vorliegt, was unter anderem durch eine Erhöhung der Membranaffinität eine Funktionszunahme bedeutet. Dabei konnten jedoch beide RGS-Proteine nicht in allen Patienten nachgewiesen werden. Der Grund für den probenspezifischen Nachweis bleibt unklar. Auf Genebene konnte RGS10 nachgewiesen werden. Der Nachweis des RGS4 auf Genebene blieb erfolglos. Die Ursache dafür wird in der zu geringen Sensitivität des RGS4-Primers vermutet. Auf zellulärer Ebene konnte ein positiver Nachweis sowohl für das RGS4 als auch das RGS10 erfolgen und es wurde gezeigt, dass das RGS4 insbesondere zellmembrangebunden sowie im Zytoplasma der Zellen vorliegt, während das RGS10 eine zusätzliche intranukleäre Lokalisation aufweist.

Anhand der Knorpelproben konnte gezeigt werden, dass sich sowohl RGS4 als auch RGS10 in der Spätphase der Osteoarthrose nicht in allen Schichten des Knorpels nachweisen lassen. So konnte in der Superfizialschicht weder RGS4 noch RGS10 nachgewiesen werden, während beide in den tieferen Schichten des Knorpels, insbesondere um die Chondrozytencluster, vorlagen. Die Ursache des schichtspezifischen Nachweises bleibt unklar und muss in weiterführenden Studien untersucht werden.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen somit, dass sowohl RGS4 als auch RGS10 innerhalb der CPCs und osteoarthrotischen Knorpels vorliegen. Welche Funktion diese jedoch innerhalb der CPCs und der Osteoarthrose ausüben und in welche Signaltransduktionen sie regulatorisch eingreifen, wurde bisher nicht untersucht. Es bleibt unklar, inwieweit sie an der Entstehung der Osteoarthrose beteiligt sind.

Dadurch, dass vorangegangene Studien eine Beeinflussung der chondrogenen Differenzierung durch RGS4 und RGS10 nachweisen konnten, ergeben sich über diese regulatorischen Eigenschaften vielversprechende Ansätze für zukünftige regenerative Verfahren und der positive Nachweis der RGS-Proteine in CPCs und innerhalb OA-Knorpels liefert erste Anknüpfungspunkte.

6. Literaturverzeichnis

Aigner T, McKenna L (2002): Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell Mol Life Sci* 59, 5-18

Aigner T, Gluckert K, von der Mark K (1997): Activation of fibrillar collagen synthesis and phenotypic modulation of chondrocytes in early human osteoarthritic cartilage lesions. *Osteoarthritis Cartilage* 5, 183-189

Ali MW, Cacan E, Liu Y, Pierce JY, Creasman WT, Murph MM, Govindarajan R, Eblen ST, Greer SF, Hooks SB (2013): Transcriptional suppression, DNA methylation, and histone deacetylation of the regulator of G-protein signaling 10 (RGS10) gene in ovarian cancer cells. *PLoS One* 8, e60185

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

Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M, et al. (1986): Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 29, 1039-1049

Anderson JJ, Felson DT (1988): Factors associated with osteoarthritis of the knee in the first national Health and Nutrition Examination Survey (HANES I). Evidence for an association with overweight, race, and physical demands of work. *Am J Epidemiol* 128, 179-189

Appleton CT, James CG, Beier F (2006): Regulator of G-protein signaling (RGS) proteins differentially control chondrocyte differentiation. *J Cell Physiol* 207, 735-745

Archer CW, Francis-West P (2003): The chondrocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 401-404

Bastin G, Singh K, Dissanayake K, Mighiu AS, Nurmohamed A, Heximer SP (2012): Amino-terminal cysteine residues differentially influence RGS4 protein plasma membrane targeting, intracellular trafficking, and function. *J Biol Chem* 287, 28966-28974

Berman DM, Wilkie TM, Gilman AG (1996): GAIP and RGS4 are GTPase-activating proteins for the Gi subfamily of G protein alpha subunits. *Cell* 86, 445-452

Bijlmakers MJ, Marsh M (2003): The on-off story of protein palmitoylation. *Trends Cell Biol* 13, 32-42

Billinghurst RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, Mitchell P, Hambor J, Diekmann O, Tschesche H, Chen J, Van Wart H, Poole AR (1997): Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest* 99, 1534-1545

Blanco FJ, Guitian R, Vazquez-Martul E, de Toro FJ, Galdo F (1998): Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum* 41, 284-289

- Bowler WB, Gallagher JA, Bilbe G (1998): G-protein coupled receptors in bone. *Front Biosci* 3, d769-780
- Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI (1994): Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* 56, 283-294
- Buckwalter JA (1998): Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther* 28, 192-202
- Buckwalter JA, Rosenberg LC (1988): Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. *Electron Microsc Rev* 1, 87-112
- Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ (2005): Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect* 54, 465-480
- Burgon PG, Lee WL, Nixon AB, Peralta EG, Casey PJ (2001): Phosphorylation and nuclear translocation of a regulator of G protein signaling (RGS10). *J Biol Chem* 276, 32828-32834
- Bustin SA, Nolan T (2004): Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 15, 155-166
- Chang JK, Chang LH, Hung SH, Wu SC, Lee HY, Lin YS, Chen CH, Fu YC, Wang GJ, Ho ML (2009): Parathyroid hormone 1-34 inhibits terminal differentiation of human articular chondrocytes and osteoarthritis progression in rats. *Arthritis Rheum* 60, 3049-3060
- Chung UI, Lanske B, Lee K, Li E, Kronenberg H (1998): The parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor coordinates endochondral bone development by directly controlling chondrocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13030-13035
- Clevers H, Nusse R (2012): Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 149, 1192-1205
- de Crombrughe B, Lefebvre V, Behringer RR, Bi W, Murakami S, Huang W (2000): Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biol* 19, 389-394
- De Vries L, Gist Farquhar M (1999): RGS proteins: more than just GAPs for heterotrimeric G proteins. *Trends Cell Biol* 9, 138-144
- Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF, Jr. (1989): Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 84, 678-685
- Ding L, Mychaleckyj JC, Hegde AN (2007): Full length cloning and expression analysis of splice variants of regulator of G-protein signaling RGS4 in human and murine brain. *Gene* 401, 46-60
- Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1991): Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem* 60, 653-688

- Dorsam RT, Gutkind JS (2007): G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 79-94
- Doupnik CA, Xu T, Shinaman JM (2001): Profile of RGS expression in single rat atrial myocytes. *Biochim Biophys Acta* 1522, 97-107
- Erdely HA, Lahti RA, Lopez MB, Myers CS, Roberts RC, Tamminga CA, Vogel MW (2004): Regional expression of RGS4 mRNA in human brain. *Eur J Neurosci* 19, 3125-3128
- Felson DT (1988): Epidemiology of hip and knee osteoarthritis. *Epidemiol Rev* 10, 1-28
- Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP (2002): The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 39, 237-246
- Fickert S, Fiedler J, Brenner RE (2004): Identification of subpopulations with characteristics of mesenchymal progenitor cells from human osteoarthritic cartilage using triple staining for cell surface markers. *Arthritis Res Ther* 6, R422-432
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB (2003): The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63, 1256-1272
- Gaida S: Untersuchung des Sekretoms chondrogener Progenitorzellen mittels metabolischer Markierung und quantitativer Massenspektrometrie. *Med.Diss. Göttingen* 2012
- Gether U (2000): Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* 21, 90-113
- Gether U, Kobilka BK (1998): G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* 273, 17979-17982
- Gilman AG (1987): G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56, 615-649
- Goldring MB (2000): The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 43, 1916-1926
- Goldring MB, Berenbaum F (1999): Human chondrocyte culture models for studying cyclooxygenase expression and prostaglandin regulation of collagen gene expression. *Osteoarthritis Cartilage* 7, 386-388
- Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ (2003): Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 116, 1827-1835
- Hamm HE (1998): The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* 273, 669-672
- Hamm HE, Gilchrist A (1996): Heterotrimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 8, 189-196

- Haraoui B, Pelletier JP, Cloutier JM, Faure MP, Martel-Pelletier J (1991): Synovial membrane histology and immunopathology in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. In vivo effects of antirheumatic drugs. *Arthritis Rheum* 34, 153-163
- Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, Lotz M (1998): Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 41, 1632-1638
- Hepler JR (1999): Emerging roles for RGS proteins in cell signalling. *Trends Pharmacol Sci* 20, 376-382
- Hepler JR, Berman DM, Gilman AG, Kozasa T (1997): RGS4 and GAIP are GTPase-activating proteins for Gq alpha and block activation of phospholipase C beta by gamma-thio-GTP-Gq alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 428-432
- Hunt TW, Fields TA, Casey PJ, Peralta EG (1996): RGS10 is a selective activator of G alpha i GTPase activity. *Nature* 383, 175-177
- Hunziker EB, Quinn TM, Hauselmann HJ (2002): Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 564-572
- Hwang SG, Ryu JH, Kim IC, Jho EH, Jung HC, Kim K, Kim SJ, Chun JS (2004): Wnt-7a causes loss of differentiated phenotype and inhibits apoptosis of articular chondrocytes via different mechanisms. *J Biol Chem* 279, 26597-26604
- James IE, Kumar S, Barnes MR, Gress CJ, Hand AT, Dodds RA, Connor JR, Bradley BR, Campbell DA, Grabill SE, Williams K, Blake SM, Gowen M, Lark MW (2000): FrzB-2: a human secreted frizzled-related protein with a potential role in chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage* 8, 452-463
- Jones EA, English A, Henshaw K, Kinsey SE, Markham AF, Emery P, McGonagle D (2004): Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum* 50, 817-827
- Kach J, Sethakorn N, Dulin NO (2012): A finer tuning of G-protein signaling through regulated control of RGS proteins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303, H19-35
- Karrer EE, Lincoln JE, Hogenhout S, Bennett AB, Bostock RM, Martineau B, Lucas WJ, Gilchrist DG, Alexander D (1995): In situ isolation of mRNA from individual plant cells: creation of cell-specific cDNA libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3814-3818
- Kellgren JH, Lawrence JS (1957): Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis* 16, 494-502
- Kobayashi T, Chung UI, Schipani E, Starbuck M, Karsenty G, Katagiri T, Goad DL, Lanske B, Kronenberg HM (2002): PTHrP and Indian hedgehog control differentiation of growth plate chondrocytes at multiple steps. *Development* 129, 2977-2986
- Koelle MR (1997): A new family of G-protein regulators - the RGS proteins. *Curr Opin Cell Biol* 9, 143-147

- 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
- Kouri JB, Jimenez SA, Quintero M, Chico A (1996): Ultrastructural study of chondrocytes from fibrillated and non-fibrillated human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 4, 111-125
- Koval A, Katanaev VL (2011): Wnt3a stimulation elicits G-protein-coupled receptor properties of mammalian Frizzled proteins. *Biochem J* 433, 435-440
- Kuettner KE (1992): Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem* 25, 155-163
- Lee MJ, Tasaki T, Moroi K, An JY, Kimura S, Davydov IV, Kwon YT (2005): RGS4 and RGS5 are in vivo substrates of the N-end rule pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15030-15035
- Leijten JC, Emons J, Sticht C, van Gool S, Decker E, Uitterlinden A, Rappold G, Hofman A, Rivadeneira F, Scherjon S, Wit JM, van Meurs J, van Blitterswijk CA, Karperien M (2012): Gremlin 1, frizzled-related protein, and Dkk-1 are key regulators of human articular cartilage homeostasis. *Arthritis Rheum* 64, 3302-3312
- Loughlin J, Dowling B, Chapman K, Marcelline L, Mustafa Z, Southam L, Ferreira A, Ciesielski C, Carson DA, Corr M (2004): Functional variants within the secreted frizzled-related protein 3 gene are associated with hip osteoarthritis in females. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9757-9762
- Luttrell LM (2008): Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Mol Biotechnol* 39, 239-264
- Ma B, van Blitterswijk CA, Karperien M (2012): A Wnt/beta-catenin negative feedback loop inhibits interleukin-1-induced matrix metalloproteinase expression in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 64, 2589-2600
- Madrigal A, Tan L, Zhao Y (2017): Expression regulation and functional analysis of RGS2 and RGS4 in adipogenic and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Biol Res* 50, 43
- Mankin HJ, Lippiello L (1971): The glycosaminoglycans of normal and arthritic cartilage. *J Clin Invest* 50, 1712-1719
- Martel-Pelletier J, Alaaeddine N, Pelletier JP (1999): Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci* 4, D694-703
- Maudsley S, Martin B, Luttrell LM (2005): The origins of diversity and specificity in G protein-coupled receptor signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 314, 485-494

- Minina E, Wenzel HM, Kreschel C, Karp S, Gaffield W, McMahon AP, Vortkamp A (2001): BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* 128, 4523-4534
- Minns RJ, Steven FS (1977): The collagen fibril organization in human articular cartilage. *J Anat* 123, 437-457
- 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
- 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
- Muir H (1995): The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *Bioessays* 17, 1039-1048
- Naumann A, Dennis JE, Awadallah A, Carrino DA, Mansour JM, Kastenbauer E, Caplan AI (2002): Immunochemical and mechanical characterization of cartilage subtypes in rabbit. *J Histochem Cytochem* 50, 1049-1058
- Neer EJ (1995): Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80, 249-257
- Neubig RR, Siderovski DP (2002): Regulators of G-protein signalling as new central nervous system drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 1, 187-197
- Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45
- Poole AR (1999): An introduction to the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci* 4, D662-670
- Poole CA (1997): Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat* 191 (Pt 1), 1-13
- Poole CA, Flint MH, Beaumont BW (1984): Morphological and functional interrelationships of articular cartilage matrices. *J Anat* 138 (Pt 1), 113-138
- Poole CA, Flint MH, Beaumont BW (1987): Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. *J Orthop Res* 5, 509-522
- Poole CA, Matsuoka A, Schofield JR (1991): Chondrons from articular cartilage. III. Morphologic changes in the cellular microenvironment of chondrons isolated from osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 34, 22-35

- Poole CA, Ayad S, Gilbert RT (1992): Chondrons from articular cartilage. V. Immunohistochemical evaluation of type VI collagen organisation in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy. *J Cell Sci* 103 (Pt 4), 1101-1110
- Popov S, Yu K, Kozasa T, Wilkie TM (1997): The regulators of G protein signaling (RGS) domains of RGS4, RGS10, and GAIP retain GTPase activating protein activity in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7216-7220
- Preininger AM, Hamm HE (2004): G protein signaling: insights from new structures. *Sci STKE* 2004, re3
- Rivero G, Gabilondo AM, Garcia-Sevilla JA, La Harpe R, Morentin B, Javier Meana J (2010): Characterization of regulators of G-protein signaling RGS4 and RGS10 proteins in the postmortem human brain. *Neurochem Int* 57, 722-729
- Rivero G, Gabilondo AM, Garcia-Sevilla JA, Callado LF, La Harpe R, Morentin B, Meana JJ (2013): Brain RGS4 and RGS10 protein expression in schizophrenia and depression. Effect of drug treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 226, 177-188
- Rodbell M (1995): Nobel Lecture. Signal transduction: evolution of an idea. *Biosci Rep* 15, 117-133
- Ryu JH, Chun JS (2006): Opposing roles of WNT-5A and WNT-11 in interleukin-1beta regulation of type II collagen expression in articular chondrocytes. *J Biol Chem* 281, 22039-22047
- Sakamoto A, Chen M, Kobayashi T, Kronenberg HM, Weinstein LS (2005): Chondrocyte-specific knockout of the G protein G(s)alpha leads to epiphyseal and growth plate abnormalities and ectopic chondrocyte formation. *J Bone Miner Res* 20, 663-671
- Sandell LJ, Aigner T (2001): Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 3, 107-113
- Siderovski DP, Willard FS (2005): The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int J Biol Sci* 1, 51-66
- Sierra DA, Gilbert DJ, Householder D, Grishin NV, Yu K, Ukidwe P, Barker SA, He W, Wensel TG, Otero G, Brown G, Copeland NG, Jenkins NA, Wilkie TM (2002): Evolution of the regulators of G-protein signaling multigene family in mouse and human. *Genomics* 79, 177-185
- Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RA (1994): Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem* 63, 101-132
- Terkeltaub R, Lotz M, Johnson K, Deng D, Hashimoto S, Goldring MB, Burton D, Deftos LJ (1998): Parathyroid hormone-related proteins is abundant in osteoarthritic cartilage, and the parathyroid hormone-related protein 1-173 isoform is selectively induced by transforming growth factor beta in articular chondrocytes and suppresses generation of extracellular inorganic pyrophosphate. *Arthritis Rheum* 41, 2152-2164
- 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

- Tesmer JJ, Berman DM, Gilman AG, Sprang SR (1997): Structure of RGS4 bound to AIF4--activated G(i alpha1): stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. *Cell* **89**, 251-261
- Thomas RS, Clarke AR, Duance VC, Blain EJ (2011): Effects of Wnt3A and mechanical load on cartilage chondrocyte homeostasis. *Arthritis Res Ther* **13**, R203
- Tu Y, Woodson J, Ross EM (2001): Binding of regulator of G protein signaling (RGS) proteins to phospholipid bilayers. Contribution of location and/or orientation to Gtpase-activating protein activity. *J Biol Chem* **276**, 20160-20166
- Tu Y, Popov S, Slaughter C, Ross EM (1999): Palmitoylation of a conserved cysteine in the regulator of G protein signaling (RGS) domain modulates the GTPase-activating activity of RGS4 and RGS10. *J Biol Chem* **274**, 38260-38267
- Venn MF (1978): Variation of chemical composition with age in human femoral head cartilage. *Ann Rheum Dis* **37**, 168-174
- Wang J, Xie Y, Wolff DW, Abel PW, Tu Y (2010): DHHC protein-dependent palmitoylation protects regulator of G-protein signaling 4 from proteasome degradation. *FEBS Lett* **584**, 4570-4574
- Watson N, Linder ME, Druey KM, Kehrl JH, Blumer KJ (1996): RGS family members: GTPase-activating proteins for heterotrimeric G-protein alpha-subunits. *Nature* **383**, 172-175
- Weiss C, Mirow S (1972): An ultrastructural study of osteoarthritis changes in the articular cartilage of human knees. *J Bone Joint Surg Am* **54**, 954-972
- Willars GB (2006): Mammalian RGS proteins: multifunctional regulators of cellular signalling. *Semin Cell Dev Biol* **17**, 363-376
- Woolf AD, Pfleger B (2003): Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ* **81**, 646-656
- Zerangue N, Jan LY (1998): G-protein signaling: fine-tuning signaling kinetics. *Curr Biol* **8**, R313-316

Danksagung

Danksagung

Als erstes möchte ich Herrn Prof. Dr. Nicolai Miosge meinen größten Dank für die Unterstützung während der Durchführung dieser Dissertation aussprechen. Ich danke ihm für die Möglichkeit, unter seiner Aufsicht und fachlichen Betreuung an der Dissertation zu arbeiten und einen Einblick in die Wissenschaft erhalten zu haben.

Auch Frau Christa Bode möchte ich meinen herzlichsten Dank für die gewissenhafte Einarbeitung sowie die tägliche Unterstützung während der Arbeit im Labor aussprechen. Ohne die stetige Ermutigung und ohne ihr ganzes Wissen, welches sie stets mit uns Doktoranden geteilt hat, wäre die Arbeit im Labor nicht dieselbe gewesen.

Ich danke Frau Bogusha Sadowski für die Unterstützung während der Einarbeitung und Durchführung immunhistochemischer Methoden.

Auch gilt mein Dank dem ganzen Team und den Mitdoktoranden für das freundliche und warme Arbeitsklima. Auch die gute Zusammenarbeit und der herzliche Umgang miteinander haben die Zeit zu einer schönen Erfahrung gemacht.