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

Der Einfluss von YWHAE auf das chondrogene Potenzial von chondrogenen Progenitorzellen

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Jochen Haßfeld

aus

Heidelberg

Göttingen 2019

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in	Prof. Dr. med. N. Miosge
Ko-Betreuer/in:	Prof. Dr. med. A. Schilling

Prüfungskommission

Referent/in	Prof. Dr. med. N. Miosge
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. med. A. Schilling
Drittreferent/in:	Prof. Dr. med. dent. R. Mausberg

Datum der mündlichen Prüfung: 29.06.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Der Einfluss von YWHAE auf das chondrogene Potenzial von chondrogenen Progenitorzellen“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den …… ……

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis III

Tabellenverzeichnis III

Abkürzungsverzeichnis IV

1 Einleitung 1

1.1 Gelenkknorpel 1

1.2 Osteoarthrose 5

1.2.1 Epidemiologie 5

1.2.2 Ätiologie und Pathogenese 5

1.2.3 Therapie 8

1.3 Chondrogene Progenitorzellen 9

1.4 Regulation der Chondrogenese 10

1.5 YWHAE 12

1.6 Aufgabenstellung 14

2 Material und Methoden 16

2.1 Material 16

2.1.1 Chemikalien 16

2.1.2 Geräte 18

2.1.3 Kits 19

2.1.4 Verbrauchsmaterialien 19

2.1.5 Puffer 20

2.1.6 Zellkulturmedien 21

2.1.7 Färbelösungen 21

2.1.8 Bakterienkulturen 21

2.2 Methoden 22

2.2.1 Zelllinie 22

2.2.2 Zellkultur 22

2.2.3 CRISPR/Cas9-Methode 23

2.2.4 FACScan 25

2.2.5 DNA-Isolierung 25

2.2.6 Polymerase chain reaction (PCR) 25

2.2.7 KO-Screening 26

2.2.8 Western Blot 27

2.2.9 mRNA-Lyse und Umschreiben der mRNA in cDNA 31

2.2.10 Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) 32

2.2.11 Wachstumskurve 34

2.2.12 Scratch Assay 34

2.2.13 Migration Assay 34

2.2.14 Alginatkultur 35
2.2.15 Immunhistochemie 36
2.2.16 Bio-Rad-V3-Western-Blot-Workflow 38
2.2.17 Immunhistochemie Knorpelschnitte 39

3 Ergebnisse 40

3.1 Homozygoter YWHAE-Knockout 40
3.2 Heterozygoter YWHAE-Knockout 42
3.3 Ergebnisse der YWHAE$^{+/-}$-2D-Kultur 42
3.3.1 Relatives mRNA-Level 43
3.3.2 Relatives Protein-Level 44
3.3.3 Wachstumskurve 47
3.3.4 Scratch Assay 48
3.3.5 Migration Assay 50
3.4 Ergebnisse der YWHAE$^{+/-}$-3D-Kultur 50
3.4.1 Histologische Bilder der Alginatkultur 50
3.4.2 Relatives mRNA-Level 52
3.4.3 Relatives Protein-Level 53
3.5 Knorpelschnitte 56

4 Diskussion 58

4.1 YWHAE im Knorpel 59
4.2 Homozygoter YWHAE-Knockout 59
4.3 Einfluss des heterozygoten YWHAE-Knockouts auf die CPCs 60
4.3.1 Einfluss auf die Regulatoren SOX9 und RUNX2 60
4.3.2 Chondrogenes Potenzial der CPCs 63
4.3.3 Korrelation zwischen mRNA- und Proteinmenge 66
4.3.4 Teilungsrate und Migrationsfähigkeit der CPCs 66

5 Zusammenfassung 68

6 Literaturverzeichnis 69

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die molekulare Organisation des Knorpels 3
Abbildung 2: Zonen des Gelenkknorpels 4
Abbildung 3: Histologische Bilder der Osteoarthrose 7
Abbildung 4: Entwicklung der CPCs 10
Abbildung 5: Beispiel eines KO-Screenings 41
Abbildung 6: Western Blot eines potenziell homozygoten YWHAE-KOs 41
Abbildung 7: qPCR-Ergebnisse des 2D-Modells 43
Abbildung 8: Western Blots des 2D-Modells 45
Abbildung 9: Western-Blot-Ergebnisse des 2D-Modells 46
Abbildung 10: Wachstumskurve 47
Abbildung 11: Scratch Assay 49
Abbildung 12: Histologische Fotografien der Alginatkultur 51
Abbildung 13: qPCR-Ergebnisse des 3D-Modells 52
Abbildung 14: Western Blots des 3D-Modells 54
Abbildung 15: Western-Blot-Ergebnisse des 3D-Modells 55
Abbildung 16: Histologische Bilder der Knorpelschnitte 57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien 16
Tabelle 2: Geräte 18
Tabelle 3: Kits 19
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialen 19
Tabelle 5: Puffer 20
Tabelle 6: Zellkulturmedien 21
Tabelle 7: Färbelösungen 21
Tabelle 8: Bakterienkulturen 21
Tabelle 9: Oligonukleotide 24
Tabelle 10: Sequenzierungs-Primer 26
Tabelle 11: Sammelgel (Zusammensetzung) 28
Tabelle 12: Trenngel (Zusammensetzung) 28
Tabelle 13: Western-Blot-Antikörper 30
Tabelle 14: Pipettierschema Bioenyzm cDNA Synthesis Kit 32
Tabelle 15: qPCR Primer 33
Tabelle 16: Primäre Antikörper 36
Tabelle 17: Ablauf Immunhistochemie 37
Tabelle 18: Ablauf Immunhistochemie Knorpelschnitte 39

Abkürzungsverzeichnis

α-Tub	α-Tubulin
β2M	beta-2-Mikroglobulin
ACAN	Aggrecan
AK	Antikörper
BAD	*bcl-2-antagonist of cell death*
CCD	cleidocraniale Dysplasie
CD	*cluster of differentiation*
cDNA	*complementary DNA*
COL1	Kollagen Typ I
COL2	Kollagen Typ II
COL9	Kollagen Typ IX
CPC	chondrogene Progenitorzelle
CRISPR/Cas9	*clustered regulatory interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein9*
ct	*cycle threshold*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	*fetal calf serum*
fw	*forward*
gDNA	*genomic DNA*
GFP	*green fluorescence protein*
gRNA	*guide RNA*
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-[2-Hydroxyethyl]-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IGFI	*insulin-like growth factor I*
IGFIR	*insulin-like growth factor I receptor*
ITS	Insulin, Transferrin, Selen

KO	Knockout
LB	*lysogeny broth*
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	*messenger RNA*
MSC	mesenchymale Stammzelle
MW	*molecular weight*
OA	Osteoarthrose
p27	*cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	*phosphate-buffered saline*
PCR	*polymerase chain reaction*
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	*quantitative real-time polymerase chain reaction*
rev	*reverse*
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RUNX2	*runt-related transcription factor 2*
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOX9	*SRY (sex determining region Y)-box 9*
STZ	*superficial tangential zone*
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBS-T	*tris-buffered saline and tween 20*
TE	Trypsin EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
YWHAE	*tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein epsilon*

1 Einleitung

Die Arbeitsgruppe „Orale Biologie und Geweberegeneration“ beschäftigt sich unter anderem mit der Geweberegeneration bei Osteoarthrose (OA) des Knie- und Kiefergelenks. Insbesondere chondrogene Progenitorzellen (CPC), die im Reparaturgewebe fortgeschrittener Stadien der Arthrose vorkommen (Koelling et al. 2009), sind Gegenstand der Forschung. Zum einen hofft man, dass die Forschung zum Verständnis der molekularen Mechanismen der Pathologie der OA beiträgt, andererseits sollen verschiedene Experimente Aufschluss darüber geben, ob das chondrogene Potenzial der CPCs beeinflusst werden kann. Wäre dies der Fall, könnten die CPCs als Teil einer zellbiologischen Therapie genutzt werden.

Thema der vorliegenden Dissertation ist der Einfluss des Proteins YWHAE (*tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein epsilon* oder auch 14-3-3ε) auf die CPCs und ihr chondrogenes Potenzial. Einleitend wird ein Überblick über Funktion und Aufbau des Gelenkknorpels, über verschiedene Aspekte der OA und über das bereits gesammelte Wissen zu CPCs und zum Protein YWHAE gegeben.

1.1 Gelenkknorpel

Die an den Gelenkspalt von Diarthrosen angrenzenden Knochen sind von Knorpel überzogen, der wie ein Stoßdämpfer wirkt. Der Gelenkknorpel besteht aus hyalinem Knorpel, ist allerdings nicht von einem Perichondrium überzogen. Auf dem Gelenkknorpel bildet sich ein Schmierfilm, der ein reibungsarmes Gleiten der Gelenkköpfe ermöglicht. Dieser Schmierfilm wird mithilfe eines durch Druck gesteuerten Mechanismus reguliert (Greene et al. 2011). Gelenkknorpel lässt sich in zwei Hauptbestandteile einteilen: einen flüssigen Teil, bestehend aus Wasser und Elektrolyten, und einen festen Teil, bestehend aus Zellen, Kollagenfibrillen, Proteoglykanen und anderen Glykoproteinen (Mow et al. 1992). Das Gewebe enthält weder Nerven noch Blut- oder Lymphgefäße und nur einen Zelltyp, die Chondrozyten. Chondrozyten sind spezialisierte Zellen, die sich in Lakunen anordnen, von extrazellulärer Matrix (ECM) umgeben sind und durch Diffusion aus der Synovia versorgt werden (Mow et al. 1992). Die Lakunen, auch Chondrone genannt, sind mit Flüssigkeit gefüllt und schützen die Chondrozyten vor äußeren Einflüssen (Muir 1995).

Die Anzahl dieser Zellen im Knorpel ist relativ gering, sie variiert zwischen 14 und 30 x 10^3 Zellen/mm^3 (Stockwell 1971) und macht nur ca. 5% des Gewebevolumens aus (Kuettner 1992).

Dass Chondrozyten eine geringe Teilungsrate besitzen, eine hohe metabolische Aktivität haben und hauptsächlich indirekt über verschiedene Botenstoffe kommunizieren (Kuettner 1992), ist, neben anderen Ursachen wie der fehlenden Vaskularisierung, verantwortlich für die schlechte Heilungskapazität des Knorpelgewebes (Fox et al. 2009). Eine Aufgabe der Chondrozyten ist die Synthese der ECM, die viele Proteoglykane, insbesondere Aggrecan (ACAN), Kollagene (Typ II, VI, IX, X, XI) und Wasser enthält. Das Proteoglykan ACAN bildet große Komplexe mit dem Polysaccharid Hyaluronan, die dann Wasser im Knorpel speichern (Hardingham und Muir 1972). So kann Knorpelgewebe zum großen Teil (83%) aus Wasser bestehen (Linn und Sokoloff 1965). Aufgrund dieser Struktur kann der Knorpel Belastungen wie ein Puffer, ähnlich wie ein Schwamm, abfangen. In Abhängigkeit von seiner Lokalisation kann der Knorpel sogar Belastungen bis zu 5,5 MPa abfedern (Bendjaballah et al. 1995). Bei der Abfederung von Belastungen wird die Flüssigkeit innerhalb des Knorpels zu weniger beanspruchten Arealen verschoben und erreicht nach Ende der Belastung mithilfe von osmotischen Veränderungen wieder die Ausgangsposition (Urban 1994). Des Weiteren finden sich Proteoglykane wie z. B. Fibromodulin in der ECM (Oldberg et al. 1989). Fibromodulin kann sowohl Kollagen Typ I (COL1) als auch Kollagen Typ II (COL2) binden (Hedbom und Heinegard 1993). Ein weiteres Proteoglykan, COMP (*cartilage oligomeric matrix protein*), wurde zuerst im Knorpelgewebe von Rindern entdeckt und findet sich ausschließlich im Knorpel, lokalisiert in der interterritorialen Zone (Hedbom et al. 1992).

Kollagene durchziehen das Gewebe in Form von Kollagenfibrillen und sind damit wichtig für seine Struktur. Während sich im Knochen hauptsächlich die Kollagene I, III und V finden, bestehen drei Viertel des Trockengewichts von Knorpelgewebe aus den Kollagenen II, VI, IX, X, XI, wobei COL2 den deutlich größten Anteil (90% der Kollagene im erwachsenen Knorpelgewebe) ausmacht (Mow et al. 1992; Eyre 2002). Die COL2-Moleküle sind untereinander kovalent mit 3-hydroxypyiridin-Ketten vernetzt. Die Anzahl dieser Verbindungen nimmt mit fortschreitendem Lebensalter zu (Eyre et al. 1988; Kuettner 1992). Kollagen-Typ-IX-Moleküle (COL9) können ebenfalls untereinander per kovalenter Bindung vernetzt sein oder kovalente Bindungen mit COL2-Molekülen eingehen (Wu et al. 1992) und so das Gewebe weiter verstärken (Kuettner 1992). Das Innere der Kollagenfibrillen besteht aus COL2 und Kollagen Typ XI, ihre Oberfläche enthält zusätzlich COL9. An COL9 können verschiedene Moleküle wie beispielsweise Proteoglykane binden (Goldring

und Goldring 2010). Kollagene besitzen im Knorpel eine sehr lange Halbwertszeit, so dass davon ausgegangen werden kann, dass bei einem Erwachsenen keine Erneuerung des Kollagens stattfindet (Maroudas et al. 1992). Die molekulare Organisation des Knorpels wird in drei Zonen eingeteilt, die nach ihrer Nähe zu den Chondrozyten unterschieden und benannt werden: perizellulär, territorial und interterritorial (Abbildung 1).

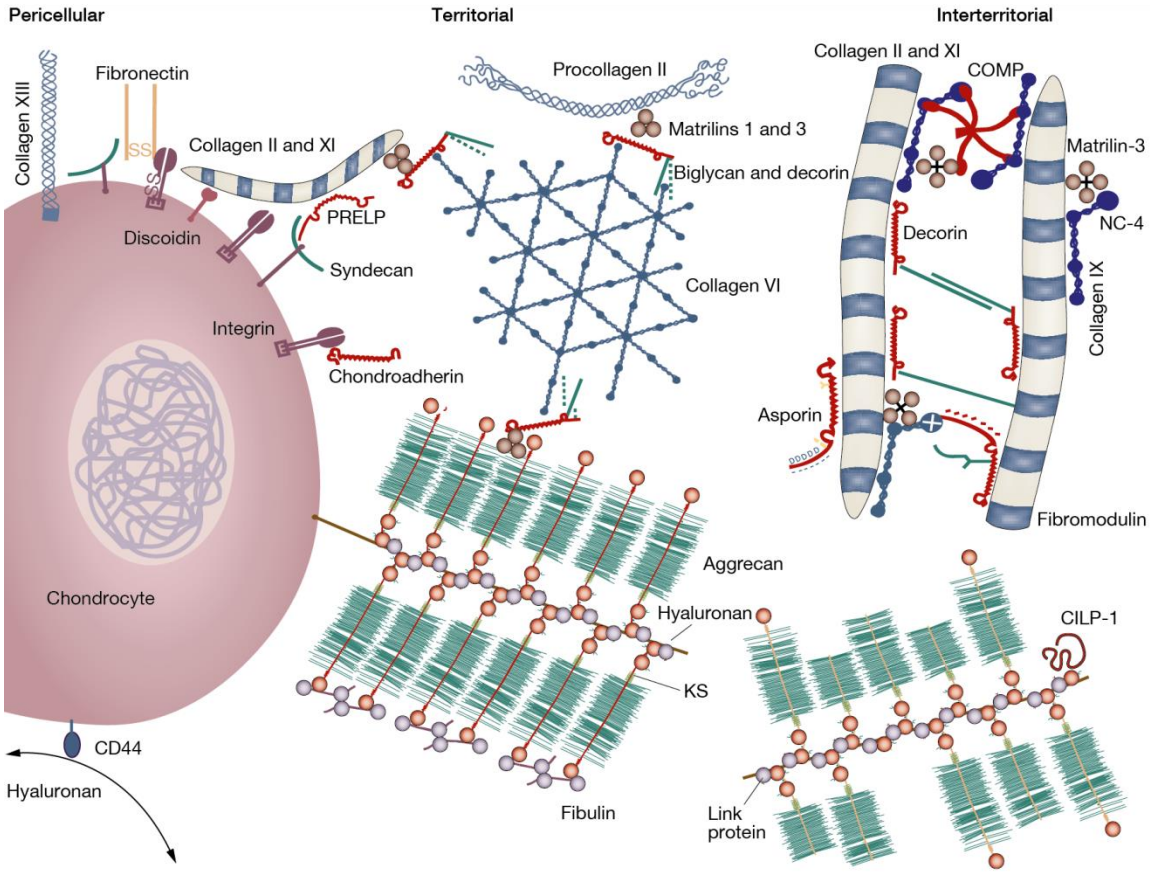


Abbildung 1: Die molekulare Organisation des Knorpels.

Die extrazelluläre Matrix wird in drei Zonen (perizellulär, territorial, interterritorial) eingeteilt. Abkürzungen: CD44 – *cluster of differentiation* 44; CILP-1 – *cartilage intermediate layer protein 1*; COMP – *cartilage oligomeric matrix protein*; CS – *chondroitin sulfate*; KS – *keratan sulfate*; NC-4 – *N-terminal noncollagenous domain 4*; PRELP – *proline-arginine-rich repeat protein*. (Modifiziert nach Heinegård und Saxne 2010; die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags.)

Im Lichtmikroskop lässt sich der Gelenkknorpel hingegen in die folgenden vier Zonen einteilen: die superfizielle, die mittlere und die tiefe Schicht sowie den kalzifizierten Knorpel, auf den der subchondrale Knochen folgt (Abbildung 2). Die superfizielle Schicht (STZ – *superficial tangential zone*) besteht aus wenigen, flachen Chondrozyten und hauptsächlich aus COL2- und COL9-Fasern, die parallel zur Oberfläche laufen und den Knorpel so gegen direkte Krafteinwirkung schützen (Poole 1997; Fox et al. 2009). Die mittlere Schicht enthält mehr Proteoglykane, die Chondrozyten treten hier in einem eher runden bzw. sphä-

rischen Typ auf. In der tiefen Schicht sind runde Chondrozyten, die sich in Chondronen gruppieren, zu finden. Die Kollagenfasern sind hier senkrecht angeordnet. Die Übergangszone zum subchondralen Knochen wird als kalzifizierte Zone bezeichnet und enthält runde Chondrozyten in nicht kalzifizierten Lakunen. Innerhalb der kalzifizierten Matrix befinden sich keine Proteoglykane und nur relativ wenig Kollagen (Poole 1997; Fox et al. 2009). Zwischen tiefer Schicht und kalzifiziertem Knorpel ist die charakteristische Tidemark zu erkennen, eine im histologischen Schnitt auffallende basophile Linie zwischen hyalinem und kalzifiziertem Knorpel (Abbildung 2; Fawns und Landells 1953).

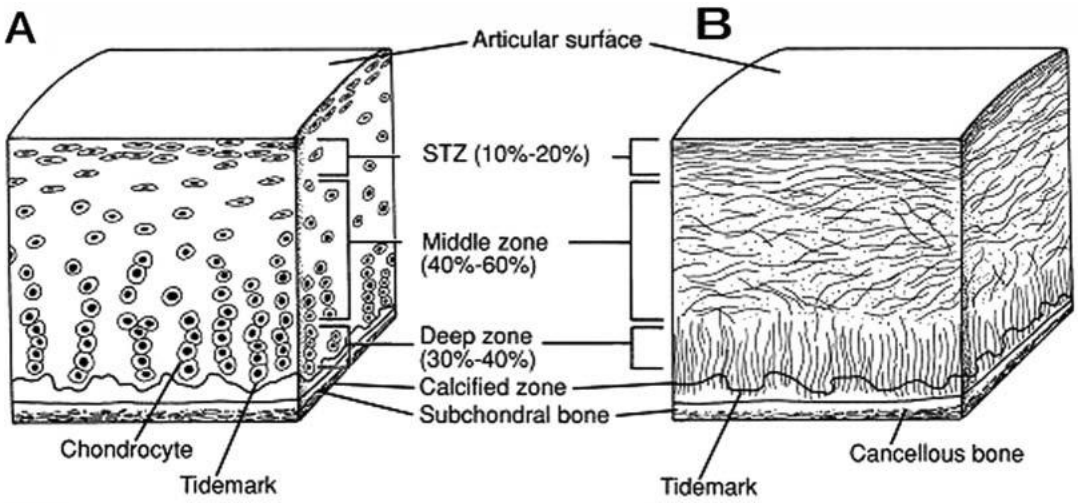


Abbildung 2: Zonen des Gelenkknorpels.

Die verschiedenen Zonen des Gelenkknorpels dargestellt im Lichtmikroskop. **A** Zelluläre Organisation in den Zonen (STZ − superfizielle Schicht), **B** Anordnung der Kollagenfibrillen. (Buckwalter et al. 1994, die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Wolters Kluwer Health-Verlags.)

1.2 Osteoarthrose

Die Osteoarthrose (OA), eine chronische Gelenkerkrankung, tritt vor allem bei älteren Menschen auf. Am häufigsten betroffen sind das Kniegelenk, die Schulter und die Hüfte. Während bei einer primären OA die Ursachen für die Erkrankung nicht bekannt sind, können die Auslöser einer sekundären Arthrose Fehlstellungen, Fehlbildungen, Erkrankungen (z. B. Rachitis), Traumata oder Operationen sein (Rabenberg 2013). Risikofaktoren, die eine Erkrankung fördern, sind unter anderem fehlerhafte Belastungen des Gelenkes (Sharma et al. 2001), genetische Prädisposition (Valdes et al. 2007), ein erhöhter BMI (Murphy et al. 2008), Verletzungen (Murphy et al. 2008) und ein hohes Lebensalter.

1.2.1 Epidemiologie

Osteoarthrose ist eine weltweit weit verbreitete chronische Gelenkerkrankung (Woolf und Pfleger 2003). In Deutschland wird das Vorliegen einer Arthrose von 17,9% der Erwachsenen berichtet (Fuchs et al. 2017). Am stärksten betroffen ist die Gruppe der Über-65-Jährigen, wobei hier Frauen mit 48,1% deutlich häufiger erkranken als Männer (31,2%; Fuchs et al. 2017). Insgesamt beliefen sich die anfallenden direkten Krankheitskosten in Deutschland im Jahr 2015 auf ca. 8,7 Milliarden Euro und machten damit 2,6% aller erfassten Krankheitskosten aus (Statistisches Bundesamt 2017). In ganz Europa leiden ca. 40 Millionen Menschen an OA. Man kann davon ausgehen, dass die daraus resultierenden indirekten Kosten 0,5% des Bruttoinlandproduktes verbrauchen (Conaghan et al. 2014). Indirekte Kosten fallen beispielsweise an, wenn Patienten aufgrund einer Bewegungseinschränkung arbeitsunfähig werden.

1.2.2 Ätiologie und Pathogenese

Zu Beginn der OA ist diese für gewöhnlich nicht symptomatisch, da nur langsam Veränderungen im Knorpelstoffwechsel auftreten. Es überwiegen katabole Prozesse, die durch die geringe Aktivität der Chondrozyten, die fehlende Durchblutung und die daraus resultierende niedrige Regenerationsfähigkeit des Knorpelgewebes, irreversible Schäden verursachen. Vor allem Matrix-Metallo-Proteasen (MMP-1,-8 und -13) und ADAM-TS-Proteine sind am Abbau von Kollagenen und anderen ECM-Bestandteilen beteiligt (Murphy und Nagase 2008). Eine wichtige Rolle scheint hier die MMP-13 zu spielen, die über eine besonders hohe Potenz als Kollagenase verfügt (Mitchell et al. 1996). Eine von Billinghurst et al. 1997 veröffentliche Studie belegt ebenfalls den durch die MMP -1, -8 und insbesondere MMP-13 verursachten erhöhten Abbau von COL2 im osteoarthritischen Knorpel. COL9, das wegen

seiner kovalenten Bindungen ein wichtiger Bestandteil des Knorpels ist, kann von der MMP-3 abgebaut werden (Okada et al. 1989). Der Abbau dieser Bestandteile der ECM führt zu einem Funktionsverlust des Knorpels. Aufgrund der fehlenden Pufferfunktion entstehen zusätzlich mechanische Schäden an Knochen und Knorpel. Chondrozyten verlieren im Laufe des Lebens wie viele andere Zellen die Fähigkeit, sich zu teilen, und erreichen ein Stadium der Seneszenz (Martin und Buckwalter 2001b). Martin und Buckwalter (2001a) stellen die Hypothese auf, dass diese fehlende Fähigkeit zur Teilung die Progression der OA begünstigt.

Abbildung 3 zeigt einen Vergleich zwischen gesundem (Abbildung 3 A) und osteoarthritischem Knorpel (Abbildung 3 B-D) im Lichtmikroskop. Unter histologischem Aspekt fallen mehrere Tidemarks auf (Abbildung 3 B). Es bilden sich Zellcluster v. a. in der superfiziellen Schicht (Abbildung 3 B). Aus dem subchondralen Knochen wandert mesenchymales Gewebe ein, das von dort Zellmigration in den Knorpel ermöglicht (Abbildung 3 D). Diese Vaskularisierung des Knorpelgewebes korreliert mit dem Fortschreiten der OA (Walsh et al. 2007). Narbengewebe mit einem hohen COL1-Anteil ist häufig zu finden (Abbildung 3 C). Generell erhöht sich im Verlauf einer OA der Anteil an COL1 im Gewebe, wohingegen der Anteil an COL2 sinkt. Zusätzlich wurde eine erhöhte Menge von COL1-mRNA (*messenger*-Ribonukleinsäure) beobachtet (Miosge et al. 1998; Miosge et al. 2004).

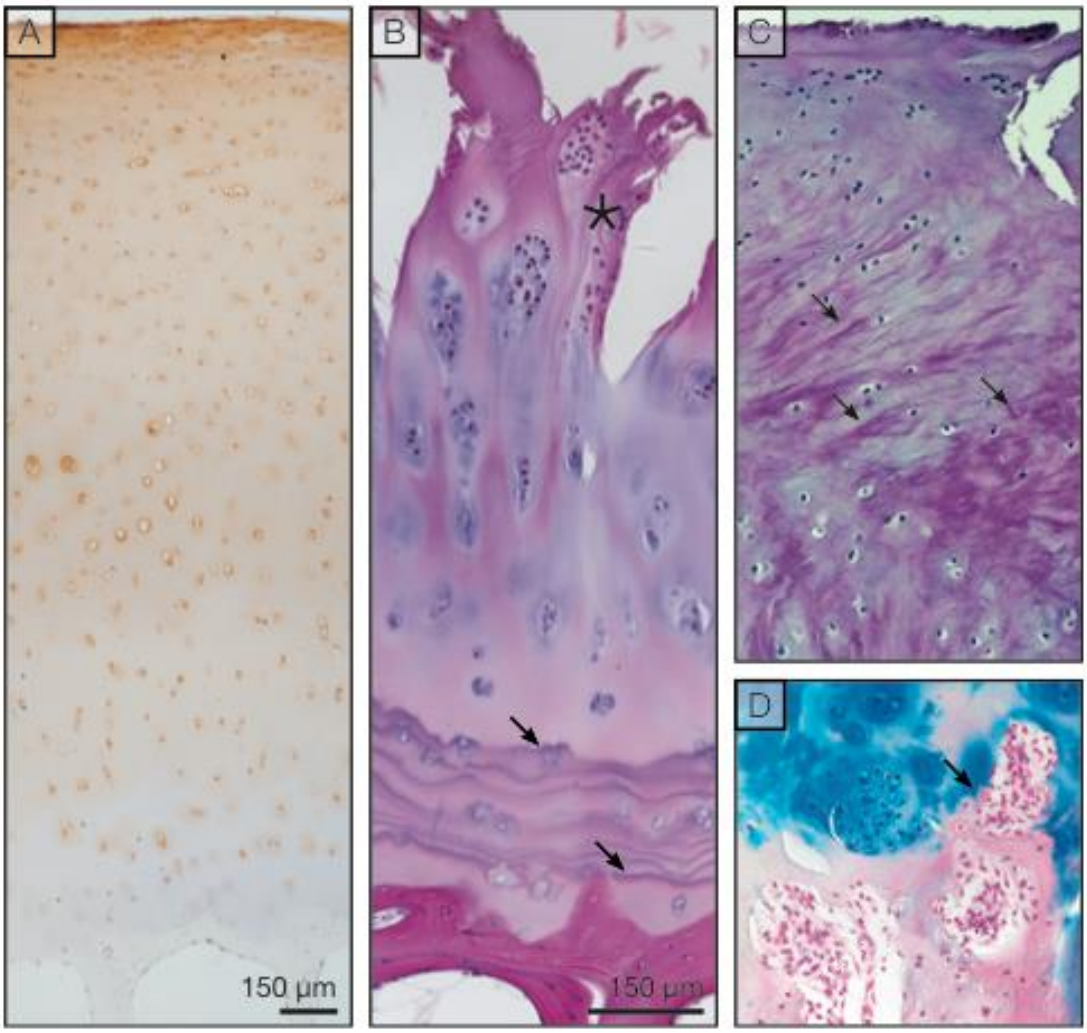


Abbildung 3: **Histologische Bilder der Osteoarthrose.**

A: Gesunder Gelenkknorpel. **B**: Spätes OA-Stadium. Auffallend sind die multiplen Tidemarks (Pfeile) und die Zellcluster (Stern). **C**: Fibrokartilaginäres Ersatzgewebe (Pfeile). **D**: Einwandern von mesenchymalem Gewebe aus dem subchondralen Knochen (Pfeil). (Modifiziert nach Schminke 2011 und Schminke und Miosge 2014; die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags.)

1.2.3 Therapie

Eine OA wird zuerst symptomatisch behandelt, um die Schmerzen und ggf. die Schwellung zu mindern. Eine wichtige Rolle spielt hier die eigenverantwortliche Mitarbeit der Patienten, z. B. durch Gewichtsreduktion oder Ausüben schmerzlindernder Aktivitäten (Rabenberg 2013). Dazu zählt beispielsweise der Versuch, der Bewegungseinschränkung mit Physiotherapie entgegenzuwirken. Des Weiteren wird im Bedarfsfall eine medikamentöse Schmerzbehandlung durchgeführt (Lohmander und Roos 2007). Sollten die Symptome mit konservativen Methoden nicht behandelbar sein oder zu starke Schmerzen und/oder Bewegungseinschränkungen auftreten, wird eine operative Behandlung empfohlen. Dabei sind gelenkerhaltende Operationen von gelenkersetzenden und gelenkeliminierenden Eingriffen zu unterscheiden (Rabenberg 2013).

Zelltherapie könnte einen Ansatz bieten, die Auswirkungen der Erkrankung nicht nur zu stoppen, sondern teilweise auch zu heilen. Derzeit ist die Herstellung von Knorpelgewebe unter Laborbedingungen trotz erfolgversprechender Ansätze noch nicht möglich. Die in Frage kommenden Zelltypen sind entweder schwer verfügbar, wie Chondrozyten von jungen Spendern, zeigen eine geringere metabolische Aktivität, wie Chondrozyten von älteren Spendern, oder produzieren ein vergleichsweise minderwertiges Knorpelgewebe, wie verschiedene Stammzelltypen (Kock et al. 2012). Stammzelltherapien beinhalten viele Risiken, wie etwa die Bildung von Tumoren oder einsetzende Immunreaktionen (Herberts et al. 2011). Außerdem haben Studien (Knutsen et al. 2007; Hunziker 2009) gezeigt, dass beispielsweise eine ACI (*autologous chondrozyte implantation*) keine besseren Langzeitergebnisse als eine Mikrofrakturierung zeigt. Darüber hinaus erfüllen die Langzeitergebnisse beider Techniken bei über 50-jährigen Patienten nicht die Erwartungen, können also einem Großteil der Patienten nicht auf Dauer helfen.

Eine zusätzliche, vielversprechende Option böte nach derzeitigem Kenntnisstand die Verwendung von nur im Gewebe von OA-Patienten vorkommenden und Fibroblasten ähnelnden Zellen, den chondrogenen Progenitorzellen.

1.3 Chondrogene Progenitorzellen

Osteoarthrose führt zu diversen Veränderungen im Gewebe, unter anderem zu Veränderungen der ECM und auch der vorliegenden Zelltypen (Buckwalter et al. 1994). Auffällig sind spezifisch nur im erkrankten Knorpelgewebe auftretende Progenitorzellen. Diese konnten mithilfe von CD (*cluster of differentiation*)-Markern von Knochenzellen und Chondrozyten abgegrenzt werden (Koelling et al. 2009). Die chondrogenen Progenitorzellen (CPC) dringen durch ihre Migrationsfähigkeit bis in die ECM ein und sind aktiver als gewöhnliche Chondrozyten (Schminke und Miosge 2014). CPCs zeigen eine ähnliche Teilungsrate wie Stammzellen und sind multipotent (Koelling et al. 2009). Abbildung 4 gibt einen Überblick über die Herkunft und Entwicklung von CPCs. Im Gegensatz zu Chondrozyten synthetisieren die CPCs im osteoarthritischen Gewebe hauptsächlich COL1 und nur wenig COL2, wodurch eine bindegewebige Narbe entsteht, die die physiologischen Funktionen des Knorpels nicht ausführen kann (Tesche und Miosge 2005). Allerdings konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die COL2-Expression und damit das chondrogene Potenzial der CPCs zu erhöhen (Koelling et al. 2009). Das chondrogene Potenzial der CPCs wird hauptsächlich durch die beiden Transkriptionsfaktoren RUNX2 (*runt-related transcription factor* 2) und SOX9 (SRY [*sex determing region Y*]-box 9) beeinflusst, die den Phänotyp der CPCs und die Sekretion bestimmter ECM-Bestandteile durch die CPCs regulieren (Koelling et al. 2009; Schminke et al. 2014). Nachgewiesen wurde ein Einfluss von verschiedenen Sexualhormonen auf die Expression von RUNX2, SOX9, COL1 und COL2 und damit ein Einfluss auf die Chondrogenität der CPCs (Koelling und Miosge 2010). Außerdem spielen verschiedene weitere Stoffe in der Regulation der CPCs eine Rolle. Noradrenalin inhibiert die Chondrogenese und beeinflusst die Heilung der OA negativ (Jenei-Lanzl et al. 2014). Weitere relevante Proteine sind Laminin und Nidogen-2, die in vitro das chondrogene Potenzial erhöhen, indem sie die SOX9- und COL2-Synthese steigern (Schminke et al. 2016). Da CPCs in situ vorliegen und also nicht im Rahmen einer Stammzelltherapie eingebracht werden müssen, kann davon ausgegangen werden, dass eine Therapie mit CPCs weniger Komplikationen bei Patienten hervorrufen würde. Bevor CPCs in der Therapie genutzt werden können, müssen allerdings nach Muhammad et al. 2013 noch einige Aspekte in Betracht gezogen werden. Erstens ist zu klären, welchen Einfluss das Alter des Patienten und das Fortschreiten der Erkrankung auf die CPCs haben. Des Weiteren muss die Nische der Zellen untersucht und geprüft werden, ob eine Migration der Zellen gesteuert werden kann. Gegenstand weiterer Untersuchungen sollte auch die Frage sein, ob und inwieweit die Proteinsynthese der Zellen manipuliert werden kann, um vollwertiges Knorpelgewebe mit möglichst viel COL2 zu erhalten.

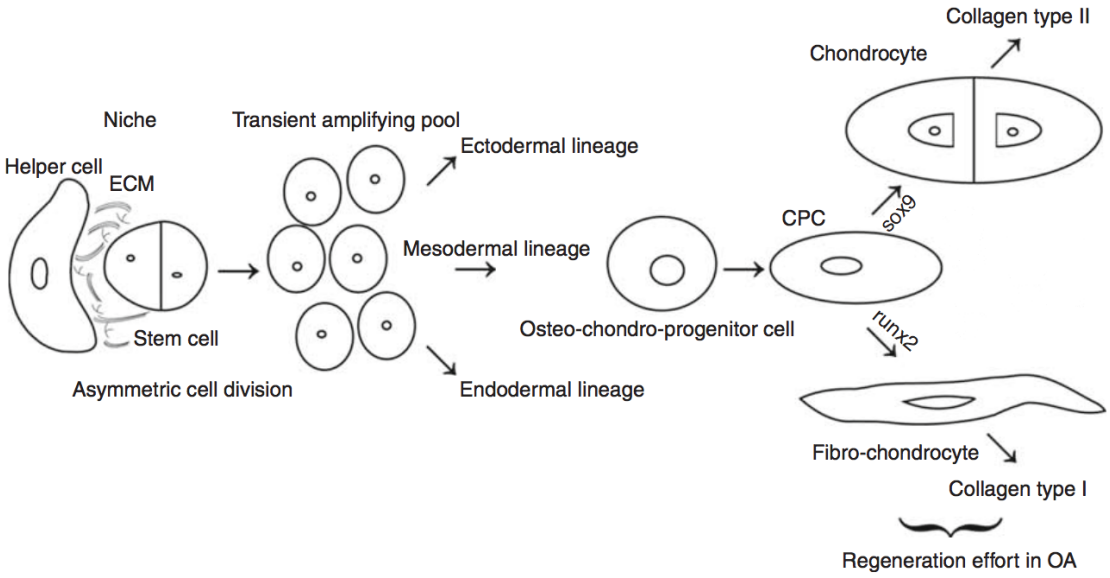


Abbildung 4: Entwicklung der CPCs.

Die CPCs entwickeln sich aus mesenchymalen Stammzellen. Bei OA entwickeln sie sich unter Einfluss von RUNX2 zu Fibro-Chondrozyten, die im Knorpelgewebe vorkommen. Durch die Manipulation der Regulatoren hin zu einer erhöhten Synthese von SOX9 sollen sie zur Ausbildung eines chondrogenen Typus geleitet werden. (Modifiziert nach Muhammad et al. 2013; die Verwendung erfolgt mit freundlich Genehmigung des Taylor and Francis-Verlags.)

1.4 Regulation der Chondrogenese

CPCs werden von den beiden wichtigsten Regulatoren der Osteochondrogenese, den Transkriptionsfaktoren SOX9 und RUNX2, in ihrer Differenzierung beeinflusst. Daraus resultiert eine Expression von unterschiedlichen Kollagentypen und ECM-Bestandteilen.

SOX9 enthält eine HMG (*high mobility group*) -Domäne, die an DNA (Desoxyribonukleinsäure) bindet und diese biegt (Lefebvre und Smits 2005). Zuerst wurde das *Sox9*-Gen anhand dieser Domäne in der Maus identifiziert (Wright et al. 1993). Foster et al. entdeckten 1994 ein homologes Protein im Menschen. Sox9 wurde anhand von Versuchen mit embryonalen Stammzellen von Mäusen als essenzieller Faktor für die Chondrozyten-Differenzierung und die Knorpelbildung identifiziert (Bi et al. 1999). Da SOX9 direkt an den *Enhancer* (Transkriptionsverstärker) des *COL2a*-Gens bindet, korreliert die Expression von SOX9 stark positiv mit der Expression von COL2 (Bell et al. 1997; Lefebvre et al. 1997). Diese Korrelation und Koexpression von Sox9 und Col2 spielt in der Maus eine große Rolle in der Differenzierung der Stammzellen zum chondrogenen Typus (Wright et al. 1995; Ng et al. 1997). In Chondrozyten führt eine Überexpression von SOX9 zum Anstieg der COL2- und Proteoglykan-Produktion (Cucchiarini et al. 2006). Mutationen des

SOX9-Gens können beim Menschen zu Kampomeler Dysplasie und zu Differenzen zwischen genetisch und körperlich ausgeprägtem Geschlecht führen (Foster et al. 1994; Wagner et al. 1994). SOX9 kann von der Protein-Kinase A phosphoryliert und so aktiviert werden (Huang et al. 2000).

RUNX2 (auch Osf2/Cbfa1) ist ein sog. *core binding factor* (CBF), der als Transkriptionsfaktor an die DNA bindet. RUNX2 findet sich hauptsächlich in Knochen und Osteoblasten und bindet unter anderem an das *OSE*-Gen, das die Aktivität des Osteocalcin-Promotors erhöht. Außerdem ist das Vorliegen von RUNX2 im Laufe der Entwicklung der Zellen ein Zeichen für die Differenzierung zu Osteoblasten. Neben der Freisetzung von Osteocalcin beeinflusst RUNX2 auch die Freisetzung von Osteopontin, COL1, Bone-Sialoprotein und Osteocalcin positiv (Ducy et al. 1997). Die osteoblastische Differenzierung der Zellen korreliert nicht direkt mit der Menge, sondern mit der Aktivierung von RUNX2, beispielsweise durch Phosphorylierung (Shui et al. 2003). Ein homozygoter Knockout von Runx2 hat im Mausmodell das vollständige Fehlen von Knochen und Osteoblasten und somit den Tod aufgrund fehlender Fähigkeit zum Atmen zur Folge. Ein heterozygoter Runx2-Knockout führt im selben Mausmodell zu einem der Cleidocranialen Dysplasie (CCD) ähnlichen Krankheitsbild (Komori et al. 1997; Otto et al. 1997). Aufgrund der fast identischen Symptome und der sich auf dem Chromosom 6 befindenden Mutation vermuten Otto et al. 1997 außerdem, dass auch beim Menschen die Mutation, die zu einer CCD führt, auf dem RUNX2 codierenden Gen liegen könnte. Bei erwachsenen Mäusen wurde Runx2 nur in prähypertrophen Chondrozyten und nicht in Chondrozyten in den oberen Schichten des Knorpels detektiert (Kuboki et al. 2003). Das könnte darauf hindeuten, dass dort ausschließlich der chondrogene Phänotyp der Zellen vertreten ist. Im osteoarthritischen Gewebe ist RUNX2 im Gegensatz zu gesundem Kontrollgewebe auch in den oberflächlichen Schichten in fast allen Zellen zu finden (Wang et al. 2004). RUNX2 interagiert mit MMP-13 und führt bei zusätzlicher Präsenz von FGF2 (*fibroblast growth factor 2*) zu einer deutlich erhöhten Aktivität von MMP-13. Es ist also davon auszugehen, dass RUNX2 zu einer Degeneration des Knorpelgewebes beiträgt (Wang et al. 2004). Im Mausmodell zeigt sich ebenfalls ein erhöhter Runx2-Spiegel bei OA, der die Freisetzung von Kollagen Typ X und MMP-13 zu steigern scheint (Kamekura et al. 2006).

Die direkte Manipulation von SOX9 und/oder RUNX2 kann, wie bereits erwähnt, große und derzeit nicht vorhersehbare Auswirkungen auf den gesamten Organismus haben. Somit bietet sich stattdessen eine indirekte Manipulation der Proteinlevel der Regulatoren über Kofaktoren an.

1.5 YWHAE

YWHAE (*tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein epsilon* oder auch 14-3-3ε) wurde in den Versuchen der AG Miosge (Cingöz 2015) per Immunpräzipitation in einer CPC-Kultur als ein mit SOX9 interagierendes Protein identifiziert. Außerdem konnte in verschiedenen anderen Studien ein Einfluss von YWHAE auf Chondrogenese und Chondrozyten beobachtet werden. Im Laufe der Entwicklung des Mausembryos wird YWHAE zuerst fast ubiquitär freigesetzt, dann allerdings sinkt die Menge an YWHAE in mesenchymalen Zellen, die sich zu Osteoblasten oder Chondrozyten differenzieren, stark (McConnell et al. 1995). Priam et al. (2013) stellten fest, dass YWHAE bei Kompression des Gewebes im subchondralen Knochen von OA-Patienten stark freigesetzt wird und in der Synovialflüssigkeit zu finden ist. Dieser Kompression des Gelenkknorpels vergleichbar induziert YWHAE in vitro die Freisetzung von katabolen Faktoren aus Chondrozyten. Außerdem führt die Zugabe eines YWHAE-blockierenden Antikörpers zu geringerer Freisetzung von MMP-3 und MMP-13 aus Chondrozyten (Priam et al. 2013). YWHAE bindet direkt an den sich auf der Zelloberfläche von Chondrozyten befindenden Rezeptor CD13, wodurch MMP-3 und MMP-13 aktiviert werden. Dieser Mechanismus kann mit CD13-blockender siRNA (*small interfering* RNA*)* unterbunden werden (Nefla et al. 2015). Der CD13-Rezeptor findet sich auch an der Membran von CPCs (Koelling et al. 2009).

Diese Erkenntnisse führen zu der Annahme, dass YWHAE im chondrogenen Stoffwechsel der CPCs relevant sein könnte. Da YWHAE in Chondrozyten eine katabole und osteogene Wirkung hat, wird vermutet, dass CPCs in ähnlicher Weise beeinflusst werden.

YWHAE gehört zur Familie der 14-3-3-Proteine, die als regulierende Proteine in jeder eukaryotischen Zelle vorkommen (Celis et al. 1990; Fu et al. 2000). Es existieren mehrere verschiedene Isoformen, die ihrer Position in der Hochleistungsflüssigkeitschromatografie folgend mit griechischen Buchstaben (α-η) benannt wurden (Ichimura et al. 1988; Martin et al. 1993). Die Rolle der 14-3-3-Proteine innerhalb der Zellen ist zwar noch nicht vollständig geklärt, bekannt ist aber, dass diese Proteine an einigen wichtigen Mechanismen, wie Zellzykluskontrolle, verschiedenen Transduktionswegen, Zelladhäsion oder neuraler Plastizität, beteiligt sind (Fu et al. 2000). 14-3-3-Protein-Homologe wurden beispielsweise in der DNA-Kontrolle während des Zellzyklus von Hefebakterien entdeckt (Ford et al. 1994). Außerdem binden verschiedene 14-3-3-Isoformen an die phosphorylierte Form des Apoptose fördernden BAD (*bcl-2-antagonist of cell death*) -Proteins und können so einen Zelltod verhindern (Zha et al. 1996). Als Beispiel des Einflusses auf Transduktionswege sei die durch 14-3-3-Proteine hervorgerufene Aktivierung der Proteinkinase C angeführt (Tanji et

al. 1994). Verschiedene 14-3-3-Isoformen zeigen in Arabidopsis-Zellen unterschiedliche Affinität zur H^+-ATPase, die dann in der Folge unterschiedlich stark aktiviert wird (Pallucca et al. 2014). Über die Zelladhäsion wird eine Interaktion zwischen Cas-Protein und 14-3-3-Isoformen hervorgerufen (Garcia-Guzman et al. 1999). Außerdem interagiert YWHAE mit *insulin-like growth factor I receptor* und *insulin receptor substrate I*, die beide für Zelldifferenzierung und Mitose von Bedeutung sind (Craparo et al. 1997).

Alle 14-3-3 Proteine können in vitro phosphorylierte Proteine binden (Muslin et al. 1996; Mackintosh 2004). Diese Fähigkeit könnte ihnen bei der Interaktion mit SOX9 und RUNX2, die beide auch phosphoryliert werden können (Huang et al. 2000; Shui et al. 2003), zugutekommen.

1.6 Aufgabenstellung

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit dem Einfluss des Proteins YWHAE auf das chondrogene Potenzial von CPCs und seinen möglichen therapeutischen Nutzen. Die Arbeitsgruppe „Orale Biologie und Geweberegeneration“ möchte CPCs in ihrer Chondrogenität positiv beeinflussen und erforschen, ob eine Zelltherapie mit solchen veränderten Zellen möglich wäre.

Das Protein YWHAE wurde bereits als Kofaktor des Transkriptionsfaktors SOX9 identifiziert (Cingöz 2015). Allerdings bleibt die Frage offen, ob und wie stark YWHAE das chondrogene Potenzial von CPCs beeinflusst. Um das zu untersuchen, wird ein sog. Knockout (KO) des Proteins bewirkt. Mithilfe des CRISPR/Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats [CRISPR]/CRISPR-associated [Cas] systems*) -Verfahrens kann das YWHAE-codierende Gen aus dem Genom entfernt werden. Hierbei ist ein homozygoter und ein heterozygoter, also ein nur ein Chromosom betreffender, KO zu unterscheiden. Dadurch kann in vitro entweder eine Reduzierung (heterozygoter KO) oder ein vollständiges Fehlen (homozygoter KO) der Protein-codierenden DNA-Sequenz hervorgerufen werden. Ein heterozygoter YWHAE-KO wurde von der Arbeitsgruppe bereits hergestellt.

Die per CRISPR/Cas9-Verfahren veränderten CPCs werden auf ihre Chondrogenität untersucht, indem sowohl die mRNA-Menge als auch die Konzentration relevanter Proteine detektiert wird. Dazu werden *quantitative real-time polymerase chain reactions* (qPCRs) und Western Blots mit in vitro kultivierten CPCs durchgeführt. Entscheidend für die Chondrogenität sind vor allem SOX9, RUNX2, COL1, COL2 und ACAN. Um die Synthese der ECM-Bestandteile zu untersuchen, werden die CPCs nicht nur zweidimensional in Flaschen, sondern auch in einem 3D-Modell kultiviert. Dazu werden die CPCs zu einem dreidimensionalen Wachstum in Alginat, das sich als gutes Medium zur Simulation der in vivo bestehenden Bedingungen herausgestellt hat, angeregt (Häuselmann et al. 1992; Häuselmann et al. 1994).

Aus den Studien von Priam et al. (2013) und Cingöz (2015) ist bekannt, dass YWHAE Chondrozyten zur Synthese bzw. zur Freisetzung von katabolen Faktoren anregt und dass YWHAE mit SOX9 interagiert. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die CPCs auch durch eine Reduktion von YWHAE beeinflusst werden. Naheliegend wäre, dass eine Reduktion des Proteins zu einer erhöhten Chondrogenität führt. Diese würde sich wahrscheinlich durch Veränderungen der Proteinlevel zeigen, nämlich in einer Erhöhung von SOX9 und einer Reduktion von RUNX2. Beobachtet werden muss auch, ob es im 3D-Versuch zu einer Erhöhung der COL2-Menge bei gleichzeitiger Reduktion der COL1-

Menge kommt, was eine Voraussetzung dafür wäre, dass die YWHAE-Reduktion im Rahmen einer Zelltherapie mit CPCs genutzt werden könnte. Die Verteilung der Kollagene ist entscheidend für die Chondrogenität der Zellen.

Des Weiteren ist das Migrationsverhalten der Zellen von Bedeutung. Wie bereits erwähnt, migrieren CPCs wahrscheinlich aus dem Knochenmark in den Knorpel und bewegen sich dort weiter fort. Falls eine Manipulation des Genoms diese Fähigkeiten beeinflusst oder sogar behindert, könnte das Auswirkungen auf den therapeutischen Nutzen bzw. die Art der Anwendung haben. Da YWHAE die Regulation des Zytoskeletts beeinflusst (Tzivion et al. 2000; Sluchanko et al. 2013), liegt die Vermutung nahe, dass eine Manipulation des Gens zu Änderungen der Fortbewegungsfähigkeiten und somit auch der Migration führt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Acrylamid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Alginat	FMC Biopolymer (Girvan, Großbritannien)
Ammoniumperoxodisulfat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ampicillin	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Annealing Puffer	Promega (Fitchburg, USA)
Ascorbinsäure, gepulvert	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Bariumchlorid-Dihydrat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Calcein AM	PromoCell (Heidelberg, Deutschland)
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Coomassie Brillant Blue R 250	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Dextamethason	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dulbecco's modified Eagle Medium mit Glutamax™	Gibco (Carlsbad, USA)
Essigsäure 100%	AppliChem (Darmstadt, Deutschland))
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol abs. p.a.	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
fetales Kälberserum (FCS)	Gibco (Carlsbad, USA)
Formalin 37%	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Gentamycin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Thermo Fisher (Waltham, USA)
Glycerin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glycin	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
HEPES	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
HiDef Detection Amplifier	Cell Marque (Rocklin, USA)
HiDef Detection AP Polymer	Cell Marque (Rocklin, USA)
ITS+ Premix	Corning (Corning, USA)
Isopropanol	Chemie Vertrieb Hannover (Hannover, Deutschland)

Chemikalie	**Hersteller**
4x Laemmli Puffer	Bio-Rad (Hercules, USA)
L-Prolin	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
LB-Agar	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
LB-Medium	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Lichtgrün SF	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ligation Buffer	Thermo Fisher (Waltham, USA)
Magermilchpulver	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Mayers Hämalaun	Merck (Darmstadt, Deutschland)
2-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Methanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Natriumpyruvat	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher (Waltham, USA)
Paraplast Plus	Leica (Nussloch, Deutschland)
Paraformaldehyd	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
PeqGOLD Universal Agarose	peqLab (Erlangen, Deutschland)
Perma-Red AP-Auto Chromogen	Diagonistic Biosystems (Pleasanton, USA)
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Protaqs	Biocyc (Luckenwalde, Deutschland)
pSp-Cas9(BB)-2A-GFP	Addgene (Teddington, Großbritannien)
Roti®-GelStain	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure 25%	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
T7 Ligase	Biolabs (Ipswich, USA)
Tetramethylethylendiam (TEMED)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
4−15% TGX Gel	Bio-Rad (Hercules, USA)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Trypsin-EDTA	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Tween-20	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Xylol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

2.1.2 Geräte

Tabelle 2: Geräte.

Produkt	Hersteller
Amaxa™ Nucleofector® II	Lonza (Basel, Schweiz)
Arium® pro	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Axiovert 40 CFL Zeiss	Zeiss (Göttingen, Deutschland)
C-DiGit® Blot Scanner	LI-COR (Bad Homburg, Deutschland)
CanonScan 9000F Mark II	Canon (Krefeld, Deutschland)
Centrifuge 5810	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Centrifuge 5425 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
ChemiDoc XRS+ System	Bio-Rad (Hercules, USA)
Concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Duomax 1030	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
FACSan	Becton (Dickinson, USA)
HerasafeTM KS12	Thermo Fisher (Waltham, USA)
inoLab pH 720	WTW (Weilheim, Deutschland)
Labotect C200 Inkubator	Labotect (Göttingen, Deutschland)
Mastercycler® ep gradient S realplex 2	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electro-phoresis Cell	Bio-Rad (Hercules, USA)
NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher (Waltham, USA)
Nexcelom Cellometer™ Auto T4	peqLab (Erlangen, Deutschland)
Nikon D90	Nikon (Düsseldorf, Deutschland)
Olympus CX 40 Binocular Microscope	Olympus (Tokio, Japan)
PerfectBlue™ Tank-Elektroblotter	peqLab (Erlangen, Deutschland)
Sartorius Extend	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Spectramax M2	Molecular Devices (San Jose, USA)
Stempel	Eigenbau (Wissenschaftliches Labor, UMG Göttingen)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Trans-Blot® Turbo™ Transfer Starter	Bio-Rad (Hercules, USA)
TW8 und TW12	Julabo (Seelbach, Deutschland)
Whatman Biometra Dunkelhaube	Biometra (Göttingen, Deutschland)

2.1.3 Kits

Tabelle 3: Kits.

Kit	Hersteller
Amaxa™ Human MSC Nucleofactor	Lonza (Basel, Schweiz)
Biozym cDNA Synthesis Kit	Biozym (Oldendorf, Deutschland)
HiDef Detection Polymer System	Cell Marque (Rocklin, USA)
Kapa Mouse Genotyping Kit	Kapa Biosystems (Wilmington, USA)
Kapa SYBR Fast qPCR Kit	Kapa Biosystems (Wilmington, USA)
peqGOLD Total RNA Kit	peqLab (Erlangen, Deutschland)
PureYield™ Plasmid Midiprep-System	Promega (Fitchburg, USA)
PureYield™ Plasmid Miniprep-System	Promega (Fitchburg, USA)
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher (Waltham, USA)
WesternBright™ Sirius	Biozym (Oldendorf, Deutschland)
WesternBright™ ECL	Biozym (Oldendorf, Deutschland)

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialen.

Produkt	Hersteller
Eppendorf Safe-Lock Röhrchen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Handschuhe	Starlab (Hamburg, Deutschland)
Immobilon-P Membran, PVDF, 0,45µm	Millipore Merck (Darmstadt, Deutschland)
Multiplate 96, weiß, unskirted	Biozym (Oldendorf, Deutschland)
Nitrocellulose Membran	Bio-Rad (Hercules, USA)
Pipettenspitzen 10/20µl, 200µl, 1000µl,5000µl	Starlab (Hamburg, Deutschland)
TC-Flasche T75, Stand., Bel., Kap.	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
TC-Platte 6 Well	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
ThinCert Einsätze 24-Well	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
24-Well Platte mit Deckel	Starlab (Hamburg, Deutschland)
15ml-Falcon-Tube-Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
50ml-Falcon-Tube-Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

2.1.5 Puffer

Tabelle 5: Puffer.

Name	Inhalt	pH
gepuffertes Formalin nach Lillie	20 ml 37 % Formalin 66,6 ml 0,3 M Sörensen-Puffer 113,3 ml H_2O	7,4
HEPES-EDTA-Puffer	55 mM EDTA 10 mM HEPES	7,4
Laufpuffer	50 mM Tris-HCl 380 mM Glycin 0,1% SDS	8,7
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl	6,8
Sörensen-Puffer	0,3 M KH_2PO_4 0,3 M NA_2HPO_4	7,4
Strippingpuffer	62,5 mM Tris-HCl 2% SDS 150 mM 2-Mercaptoethanol	6,7
TAE (50x)	2 M Tris 0,1 M EDTA	8,5
TBS-T (10x)	200 mM Tris-HCl 1,5 M NaCl 0,5% Tween 20	7,4
Transferpuffer	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 20% Methanol	8,3
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl	8,9
3xSDS-Puffer	0,3 M Tris 9% SDS 22,5% Glycerin 10% 2-Mercaptoethanol	6,7

2.1.6 Zellkulturmedien

Tabelle 6: Zellkulturmedien.

Name	Bestandteile
Standardmedium	DMEM
	10 % FCS
	50 µg /ml Gentamycin
chondrogenes Differenzierungs-Medium	Standardmedium
	3,9 µg /100 ml Dextamethasone
	10 mg /100 ml Na-Pyruvat
	4 mg /100 ml L-Prolin
	5 mg / 100 ml Ascorbat
	5 µl / 1ml frisches ITS

2.1.7 Färbelösungen

Tabelle 7: Färbelösungen.

Name	Bestandteile
Färbelösung	0,1 g Brillant-Blau R 250 (0,1%)
	50 ml Methanol (50%)
	7 ml Essigsäure (7%)
	Aqua dest. (42,9%)
Entfärbelösung	50 ml Methanol (50%)
	7 ml Essigsäure (7%)
	Aqua dest. (43%)

2.1.8 Bakterienkulturen

Tabelle 8: Bakterienkulturen.

Name	Hersteller
OneShot® Stbl3	Thermo Fisher (Waltham, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Zelllinie

Bei der Zelllinie „CPC241hT“ handelt es sich um eine immortalisierte chondrogene Progenitorzelllinie, die von Christa Bode bereitgestellt wurde. Die Zellen wurden dem Knorpel des Knies einer 61-jährigen Patientin entnommen. Diese litt zum Zeitpunkt der Entnahme an einer fortgeschrittenen Osteoarthrose. Die Kriterien des American College of Rheumatology wurden erfüllt (Altman et al. 1986). Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen überprüft und genehmigt (Antragsnummer 25/12/10).

Die Immortalisierung der Zellen fand, wie bereits in einer Studie der Arbeitsgruppe (Schminke et al. 2015) beschrieben, per lentiviralem Gentransfer statt. Die heterozygote YWHAE Knockout-Zelllinie wurde von Jérôme Janßen bereitgestellt und übernommen.

2.2.2 Zellkultur

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen unter Zugabe von Standardmedium und unter standardisierten Bedingungen (37 °C und 5% CO_2) im Zellschrank (Labotect C200 Inkubator) kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium gewechselt. Sobald eine Konfluenz von 70−80% erreicht war, wurden die Zellen geerntet. Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden zweimal mit ca. 2 ml PBS gewaschen und schließlich unter Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA (TE) für 2 Minuten im Brutschrank trypsiniert. Im Anschluss wurde per Mikroskop kontrolliert, ob sich die Zellen vom Boden gelöst haben. Danach wurde die Zellsuspension in ein 15 ml-Kulturgefäß überführt, in das 2 ml Medium vorgelegt worden war, um die zellschädigende Wirkung des TE zu inhibieren. Die Flasche wurde zweimal mit Medium gewaschen, das ebenfalls in das Falcon überführt wurde. Die Lösung wurde daraufhin für 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde nun verworfen, die entstehenden Zellpellets wurden in 1 ml PBS resuspendiert und per Cellometer gezählt. Dazu wurden 20 µl Zellsuspension in eine Zählkammer gegeben. Anschließend wurde die gesamte Suspension erneut zentrifugiert. Dann wurde der Überstand entfernt und die Zellpellets wurden entweder bei −80 °C eingefroren oder direkt in einem Versuch verwendet.

2.2.3 CRISPR/Cas9-Methode

Die YWHAE-Knockout (KO)-Zelllinie wurde mittels der CRISPR/Cas9-Methode (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats [CRISPR]/CRISPR-associated [Cas] systems*), die im Jahr 2012 erstmals als Option zum Gen-Editing beschrieben wurde (Jinek et al. 2012), generiert. Mithilfe einer Bakterien-Nuklease lassen sich beliebige DNA-Abschnitte, sofern die Sequenz bekannt ist und diese eine PAM (*protospacer adjacent motif)*-Sequenz enthält, schneiden und entfernen. Dazu wurde die auf einem Plasmid codierte Nuklease per Vektor in eine Zelle eingebracht, die zu diesem Zweck elektrisch zur Porenbildung angeregt wurde. Die Nuklease kann mit einer Einzelstrang-RNA (*guide RNA*, gRNA) auf eine beliebige Zielsequenz programmiert werden (Jinek et al. 2012). Das Design dieser RNAs (Tabelle 9) wurde mit dem Zhang Lab online CRISPR Design Tool (http://tools.genome-engineering.org) entworfen. Hergestellt wurden sie von der Firma Eurofin Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland). Die gRNA wurde jeweils auf eine Sequenz vor (1A/B) und nach (2A/B) dem Exon X codiert. Das Schneiden der DNA vor bzw. nach dem Exon erfolgt in mehreren Arbeitsschritten.

Zu Beginn eines Versuchs wurden 100 pmol von jedem der Oligonukleotidpaare und 1 µl Anneal Puffer in ein Eppendorf-Gefäß gegeben. Zur Doppelbindung der Oligonukleotide wurde diese Lösung mit H_2O auf 10 µl aufgefüllt, anschließend in 300 ml Wasser bei 80 °C für 5 Minuten inkubiert und danach langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Dann wurden je 10 pmol der nun doppelsträngigen Oligonukleotidpaare, 100 ng pSp-Cas9(BB)-2A-GFP, 10 µl Ligation Puffer (2-fach konzentriert) und 0,5 µl T7 Ligase (1500 U) hinzugefügt. Der Vektor muss bereits zuvor mit dem Verdauungsenyzm Bpi1 linealisiert werden. Der Ansatz wurde mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Die Lösung wurde dann für 30 Minuten bei 23 °C inkubiert. 5 µl der erstellten Ligationslösung und 50 µl OneShot® Stbl3 (*E.coli*-Bakterienstamm) wurden für 30 Minuten auf Eis gelegt. Dieser Transformationsansatz wurde eine Minute lang auf 42 °C erhitzt und dann 2 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Transformation wurde SOC-Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden bei 200 rpm und 37 °C für eine Stunde geschüttelt. Auf mit 100 µg/ml Ampicillin präparierten Platten wurden 100 µl des Transformationsansatzes über Nacht bei 37 °C kultiviert. Danach wurden einzelne Kolonien geerntet und in Röhrchen mit 5 ml LB Medium und 100 µg/ml Ampicillin kultiviert. Der folgende Inkubationsschritt fand für 16 Stunden bei 37 °C und 200 rpm statt. Der Vektor enthält ein Ampicillinresistenzgen, somit ist gewährleistet, dass in den Röhrchen nur Bakterienkulturen heranwachsen, die den Vektor aufgenommen haben. Um Vektor-DNA zur Sequenzierung aus den Bakterien zu extrahieren, wurde das PureYield™ Plasmid Miniprep-System verwendet. Die gewonnene DNA wurde von der Seqlab Sequence Labo-

ratories GmbH (Göttingen, Deutschland) sequenziert. Positive Klone werden als Glycerinkultur bei −80 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde mit dem PureYield™ Plasmid Midiprep-System die Plasmid-DNA aus den positiven Klonen extrahiert. Um den Vektor in CPCs zu integrieren, mussten diese zur Porenbildung angeregt werden. Die Elektroporation der CPCs wurde mit dem Amaxa™ Human MSC Nucleofactor Transfection Kit durchgeführt. Dazu wurden 1 x 10^6 CPCs in 100 µl Lösung, entnommen aus einem Ansatz bestehend aus 90 µl Transfektionspuffer und 20 µl Zusätzen, gegeben. Danach wurde, nach der Zugabe von 2 µg des Plasmides, das die gRNA enthält, die Elektroporation mit dem C17-Programm des Amaxa™ Nucleofactor®II durchgeführt. Die Zellen wurden daraufhin unter Standardbedingungen kultiviert. Auf dem Plasmid befindet sich zusätzlich ein grün fluoreszierendes Protein (*green fluorescent protein,* GFP), das dazu dient, ein sog. *Sorting* (Sortierung) möglich zu machen. Per FACScan (Kap 2.2.4) wurden Zellen, die den Vektor aufgenommen haben, von den restlichen Zellen differenziert.

Das CRISPR/Cas9-Verfahren zum Herstellen des Knockouts wurde von Jérôme Janßen durchgeführt.

Tabelle 9: Oligonukleotide.

Name	Sequenz
YWHAE 1A	CACCGAGGCTCCTCAGTTAATTTCC
YWHAE 1B	AAACGGAAATTAACTGAGGAGCCTC
YWHAE 2A	CACCGAAGTTAAGGGGGGCGCTGTT
YWHAE 2B	AAACAACAGCGCCCCCCTTAACTTC

2.2.4 FACScan

Ziel des FACScan (*fluorescence activated cell sorting*) ist eine Sortierung (*Sorting*) der Zellen. Ein solches *Sorting* kann erfolgen, wenn ein Vektor, der zusätzlich zum CRISPR/Cas9-Enzym auch ein GFP enthält, in die Zellen eingebracht wird. Dazu wurden die in Medium gelösten Zellen in ein 15 ml-Kulturgefäß gegeben, das in das Gerät gestellt wird. Nur die Zellen, die den Vektor aufgenommen haben, fluoreszieren und werden automatisch einzeln per FACScan in 96-Well-Platten verteilt. Das FACScan erkennt fluoreszierende Zellen mithilfe eines Lasers, lädt sie elektrisch auf, sortiert sie anschließend nach Höhe der Ladung und verteilt sie in 96-Well-Platten. In den folgenden Tagen wurde das Medium alle zwei bis drei Tage gewechselt. Mit einem Mikroskop wurde nach Zellkulturen gesucht. Sobald diese erkannt wurden, wurden die entsprechenden Wells geerntet, in Zellkulturflaschen überführt und dort weiter nach Protokoll kultiviert.

Dieser Versuch wurde von Sabrina Becker, FACS Plattform der UMG, durchgeführt.

2.2.5 DNA-Isolierung

Um genomische DNA (gDNA) zu isolieren, also von anderen zellulären Bestandteilen zu trennen, wurde das Kapa Mouse Genotyping Kit verwendet. Zuerst wurde das Zellpellet, bestehend aus mindestens 3 x 10^5 Zellen, in 22 µl destilliertem Wasser resuspendiert, dann wurden 2,5 µl Kapa Express Puffer und 0,5 µl Kapa Express Enzym hinzugefügt. Anschließend wurde die Probe 10 Minuten lang bei 75 °C inkubiert und 5 Minuten bei 95 °C inaktiviert. Isolierte gDNA ist bei −20 °C für sechs Monate stabil.

2.2.6 Polymerase chain reaction (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction,* PCR) ermöglicht die Amplifizierung von *complementary* DNA (cDNA). Dazu muss diese zunächst aus mRNA gewonnen werden. Außerdem ist das Designen der Primer nur möglich, wenn die DNA zuvor sequenziert wurde. Um eine PCR des *YWHAE*-Gens durchzuführen, wurde ein Ansatz erstellt. In jeweils ein Well der 96-Well-Platte wurden pro µl gDNA 8,5 µl Wasser, 3 µl Primer Mix (bestehend aus *forward*- und *reverse*-Primer) und 12,5 µl Kappa 2g fast pipettiert. Die PCR findet in Zyklen aus drei sich stetig wiederholenden Phasen statt. Zuerst wurde die Temperatur erhöht, um den DNA-Doppelstrang aufzutrennen (*Denaturation*). Die Denaturierung erfolgte über 3,25 Minuten bei 90 °C. Danach wurde die Temperatur reduziert, um ein Anlagern der Primer zu ermöglichen (*Annealing*). Diese Annealing-Temperatur ist spezifisch für den jeweiligen Primer. Hier betrug die Annealing-Temperatur der YWHAE-Primer 63 °C, sie wurde für 30 Sekunden aufrecht gehalten. Anschließend wurde die Tem-

peratur, damit die Taq-Polymerase die Komplementärstränge synthetisieren kann (*Elongation*), gleichmäßig in 1,5 Minuten auf 72 °C erhöht und für 7 Minuten gehalten. Da die spezielle Polymerase auch bei hohen Temperaturen arbeiten kann, verkürzt sich der Prozess und die DNA-Stränge lagern sich nicht wieder zusammen. Zudem verdoppelt sich die DNA pro Zyklus, sodass die Menge der DNA im Laufe der PCR exponentiell ansteigt. Diese Zyklen finden in einem Thermocycler (Mastercycler® ep gradient S realplex 2) statt und wiederholen sich bis zu 45-mal.

2.2.7 KO-Screening

Beim KO-Screening wird das Genom auf eine Zielsequenz untersucht, damit festgestellt werden kann, ob diese Sequenz noch in ihrer ursprünglichen Form vorliegt. Dies dient z. B. dem Nachweis, dass zuvor ein Gen mithilfe der CRIPSR/Cas9-Methode entfernt wurde. Zur Analyse des Genoms wird eine ausreichende Menge genomischer DNA aus dem Zellkern benötigt. Mithilfe des Kapa Mouse Genotyping Kits wurde gDNA aus den geernteten Zellen (ca. 3 x 10^5 Zellen) gewonnen. Nach Verdünnung der gDNA auf ca. 100ng/µl wurde eine Amplifizierung mit PCR durchgeführt. Bei diesem Vorgang müssen spezifische Primer (Tabelle 10) benutzt werden, damit nur die Zielsequenz amplifiziert wird. Diese Primer bestehen aus DNA und binden komplementär an den DNA-Strang. Sie wurden für diese YWHAE-codierende Sequenz mithilfe von Primer3Puls (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi) entworfen und von der Firma Eurofin Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland) hergestellt.

Tabelle 10: Sequenzierungs-Primer.

Name	Sequenz	Annealing Temperatur [°C]
YWHAE fw	CGGCATACATTTCACAGTGC	63
YWHAE rev	GCCTAGCCAAAATGGTGAAA	63

Die amplifizierte gDNA wurde per Gelelektrophorese untersucht und nachgewiesen. Um die Gelelektrophorese vorzubereiten, wurde 1,5 %iges Agarosegel aus 0,75 g Agarose und 50 ml TAE Puffer hergestellt. Dafür wurden die Komponenten vermischt und in einer Mikrowelle erhitzt. Sobald das Gel abgekühlt war, wurden 4 µl Roti®-GelStain zugefügt. Roti®-GelStain interkaliert in die doppelsträngige DNA und erzeugt so eine Fluoreszenz, deren Stärke proportional zur vorliegenden DNA-Menge ist.

Auf das Gel wurden 15 µl eines Markers (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder), der als Referenz dient, 25 µl DNA einer Kontrollprobe und 25 µl der KO-Probe aufgetragen und bei 100 V

für 40 Minuten in der Elektrophoresekammer aufgetrennt. Die Tatsache, dass die DNA-Sequenz, je kleiner sie ist, desto weiter im Gel läuft, erlaubt einen Vergleich der Probe mit einer Kontrolle. Mit der Software BioDocAnalyze von Biometra (Göttingen, Deutschland) wurde die fluoreszierende DNA in einer Whatman Biometra Dunkelhaube per UV-Licht detektiert. Der Marker enthält ein Gemisch verschiedener DNA-Fragmente in vorgegebenen Größen, die als Skala erkennbar sind. Nun wurde die Höhe der detektierten DNA-Frequenz mit dem Marker verglichen. Tritt die spezifische Bande nur in der Kontrolle auf, ist der KO verifiziert.

2.2.8 Western Blot

Der Western Blot dient der Quantifizierung von Proteinen, die in einem Zellpellet vorliegen. Diese Quantifizierung erfolgt in drei Schritten:

1. Die Proteine werden durch eine diskontinuierliche Gelelektrophorese, den SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese), aufgetrennt und ordnen sich in Banden an.

2. Die Banden werden per Nassblot auf eine Nitrocellulose- oder PVDF (Polyvinylidenfluorid) -Membran übertragen.

3. Der Nachweis der Banden erfolgt über eine Antikörperreaktion.

Für den SDS-PAGE (Laemmli 1970) wurden zwei Gele hergestellt. Das Sammelgel enthält 5% Acrylamid und soll die Proteine im Gel sammeln. Im Trenngel, das je nach gesuchten Proteinen unterschiedliche Acrylamidmengen (10/12 %) enthält, wurden die Proteine nach ihrer Größe unterteilt. Diese Gele wurden aus ihren Komponenten (Tabelle 11 u.

Tabelle **12**) gemischt und zwischen zwei vorher mit 100% Ethanol gereinigte Platten gegossen. Dazu wurden zuerst 6 cm Trenngel zwischen zwei Platten gegossen und mit 100 % Ethanol übergossen. Nach der Polymerisation wurde das Ethanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel geschichtet. Danach wurde ein Kamm, der zehn Taschen im Sammelgel herstellt, platziert. Die Glasplatten, zwischen denen sich das Gel befand, wurden in einer Biometra Elektrophoresekammer (Nachbau) fixiert. Die beiden Kammern wurden mit Laufpuffer gefüllt.

Tabelle 11: Sammelgel (Zusammensetzung).

Bestandteil	5%iges Gel
Sammelgelpuffer	1,25 ml
10%SDS	50 µl
TEMED	5 µl
Acrylamid	0,8 ml
H_2O	2,7 ml
10% APS	0,2 ml

Tabelle 12: Trenngel (Zusammensetzung).

Bestandteil	10%iges Gel	12%iges Gel
Trenngelpuffer	1,4 ml	1,4 ml
10%SDS	55 µl	55 µl
TEMED	5 µl	5 µl
Acrylamid	1,85 ml	2,22 ml
H_2O	2,0 ml	1,62 ml
10% APS	0,25 ml	0,25 ml

Vor dem Auftragen in die Geltaschen wurden die Zellpellets (ca. 1,5 x 10^5 Zellen) in 3 x 3 SDS Probenpuffer resuspendiert und auf 95 °C erhitzt, um Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine zu denaturieren. Nun wurden die Proben und mindestens ein Marker (PageRuler Prestained Protein Ladder), der als Referenz in kDa dient, aufgetragen. Sobald alle Proben in das Gel pipettiert worden waren, wurde eine Spannung angelegt. Die Stromstärke betrug, solange sich die Proteine im Sammelgel befanden, 15 mA pro Gel. Erreichten die Proteine das Trenngel, wurde die Spannung auf 25 mA pro Gel erhöht. Wegen ihrer negativen Ladung laufen die Proteine dann in Richtung des positiven Pols. Zur Übertragung der Banden auf die PVDF-Membran wurde ein Nassblot (Towbin et al. 1979) durchgeführt. Das Trenngel wurde direkt auf eine zuvor mit Ethanol aktivierte PVDF-Membran gelegt und in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer 90 Minuten lang unter Strom (350 mA) gesetzt. Dieser Vorgang fand unter permanenter Wasserkühlung statt. Für den Nachweis der Proteine auf der Membran wurde diese zuerst für 2 bis 10 Minuten mit Coomassie-Färbemittel gefärbt. So waren eine Transferkontrolle der Proteinbanden und eine Fehlersuche (z. B. Luftblasen im Gel) möglich. Danach wurde die Membran für 2 bis 5 Minuten in einer Entfärbelösung geschwenkt, damit die Proteine besser vom Hinter-

grund abgegrenzt werden konnten. Zur Sicherung der dargestellten Banden wurde die Membran zum ersten Mal gescannt, u .a. weil die Färbung in den folgenden Schritten verloren geht.

Zur Vorbereitung der Antikörperreaktion wurden zuerst unspezifische Bindungsstellen geblockt. Milchpulver wurde im Verhältnis 1:20 in TBS-T gelöst und als Blocklösung für eine Stunde auf die Membran gegeben. Direkt im Anschluss wurden der spezifische primäre Antikörper (Tabelle 13) in der Blocklösung verdünnt und die Membran für einen Zeitraum von einer bis zu 24 Stunden im Kühlraum in dieser Lösung inkubiert. Während dieses Zeitraums bindet der Antikörper an das Protein. Im Anschluss wurde die Membran fünfmal Mal für 5 Minuten mit TBS-T gewaschen. Nun wurden der sekundäre Antikörper (Tabelle 13) verdünnt und die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in dieser Verdünnung inkubiert. Dieser sekundäre Antikörper besitzt einerseits eine Bindungsstelle für den primären Antikörper und andererseits ein reaktives Enzym, das im letzten Schritt, der nach erneutem Waschen in TBS-T erfolgt, das zugegebene Substrat umsetzt. Diese chemische Reaktion führt zu einer Lumineszenz, die mithilfe des C-DiGit® Blot Scanner nachgewiesen wurde. Je größer die Proteinmenge auf der Membran, desto stärker ist das Signal. So kann eine Quantifizierung stattfinden und die Proteinmenge der Proben kann untersucht und verglichen werden. Die Auswertung wurde mit der Software „Image Studio Digit Ver. 5.2“ von LI-COR Biosciences (Lincoln, USA) durchgeführt. Allerdings handelt es sich nur um eine relative und nicht um eine absolute Quantifizierung, was den Vergleich mit einer Kontrollprobe und eine Ladungskontrolle (α-Tubulin) nötig macht. Als Substrat wurden die Präparate WesternBright™ ECL und Sirius sowie SuperSignal™ West Femto Maximum verwendet.

Strippt man eine bereits verwendete Membran, kann auf ihr ein anderes Protein detektiert werden. Dazu wurde sie für 15 Minuten in einem Stripping Puffer bei 65 °C inkubiert und alle 5 Minuten bewegt. Anschließend wurde die Membran viermal für 5 Minuten in TBS-T gewaschen. Nun wurde die Detektion erneut mit dem Blocken der Membran begonnen und wie oben beschrieben durchgeführt.

Die Western-Blot-Ergebnisse wurden mit einem Einstichproben-t-Test auf Vassarstats (http://vassarstats.net/t_single.html) auf Signifikanz kontrolliert.

Tabelle 13: Western-Blot-Antikörper.

Primärer AK	Verdünnung	Sekundärer AK	Verdünnung	Substrat
α-Tubulin (Sigma-Aldrich, T 6074)	1:5000 in 5%iger Milch in TBS-T	Goat anti-Mouse IgG-Peroxidase (Sigma-Aldrich, A9917)	1:40 000 in 5%iger Milch in TBS-T	WesternBright™ ECL
COL1 (Acris, R1038)	1:300 in 5%iger Milch in TBS-T	Goat anti-Rabbit IgG-Peroxidase (Sigma-Aldrich, A0545)	1:100 000 in 5%iger Milch in TBS-T	SuperSignal™ West Femto Maxium
COL2 (Santa Cruz, SC-5186179)	1:300 in 5%iger Milch in TBS-T	Goat anti-Mouse IgG-Peroxidase (Sigma-Aldrich, A9917)	1:40 000 in 5%iger Milch in TBS-T	SuperSignal™ West Femto Maxium
RUNX2 (Cell Signaling Technology, #8486)	1:1000 in 5%iger Milch in TBS-T	Goat anti-Rabbit IgG-Peroxidase (Sigma-Aldrich, A0545)	1:100 000 in 5%iger Milch in TBS-T	WesternBright™ Sirius
SOX9 (Acris, AP06583PU-N)	1:1000 in 5%iger Milch in TBS-T	Goat anti-Rabbit IgG-Peroxidase (Sigma-Aldrich, A0545)	1:100 000 in 5%iger Milch in TBS-T	WesternBright™ Sirius
YWHAE (Santa Cruz, SC-23957	1:750 in 5%iger Milch in TBS-T	Goat anti-Mouse IgG-Peroxidase (Sigma-Aldrich, A9917)	1:40 000 in 5%iger Milch in TBS-T	WesternBright™ Sirius

2.2.9 mRNA-Lyse und Umschreiben der mRNA in cDNA

2.2.9.1 Lyse

Zur Gewinnung der mRNA mithilfe des peqGold Total RNA Kits wurde ein Zellpellet mit mindestens $1x10^5$ Zellen benötigt. Die Zellen wurden mit der beschriebenen Methode (Kap. 2.2.2) geerntet, gezählt und für 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert, um ein solches Zellpellet zu erhalten. Zuerst wurden dem Zellpellet 400 µl RNA Lysis Buffer beigefügt. Es entstand ein Lysat, das ohne Gewebereste auf ein DNA Removing Column pipettiert und für eine Minute bei 12 000 g zentrifugiert wurde. Nun wurde der Durchfluss, der keine DNA mehr enthielt, mit 70%igem Ethanol vermischt und auf das PerfectBind RNA Column geladen. Die Probe wurde erneut eine Minute lang bei 10 000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde entfernt. Es folgten drei Waschschritte, der erste mit 500 µl RNA Wash Buffer I, die nächsten beiden mit 600 µl RNA Wash Buffer II. Nach Zugabe des jeweiligen Puffers wurde die Lösung pro Schritt 15 Sekunden lang bei 10 000 g zentrifugiert, der Durchfluss wurde entfernt. Anschließend wurde das PerfectBind RNA Column für 2 Minuten bei 10 000 g trockenzentrifugiert. Nun wurden 30 µl RNase freies, destilliertes Wasser auf die Matrix gegeben. Innerhalb einer Inkubationszeit von 3 Minuten wurde die RNA im Wasser gelöst und diffundierte durch das PerfectBind RNA Column. Die Probe befand sich nun im Mikroreaktionsgefäß und wurde bei −80 °C gelagert.

2.2.9.2 Umschreiben der mRNA in cDNA

Da per qPCR keine RNA sondern nur DNA quantifiziert werden kann, muss die mRNA-Probe in cDNA umgeschrieben werden. Diese Transkription erfolgte mit dem Biozym cDNA Synthesis Kit. Die Komponenten des Kits sind Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) Mix, RNase Inhibitor, Hexamer Primer, cDNA Synthese Buffer, RNase freies Wasser und eine reverse Transkriptase, die RNA in DNA umschreiben kann. Daraus wurde ein Mastermix (genaue Zusammensetzung s. Tabelle 14) angesetzt, in dem die RNA resuspendiert wurde. Zwischen allen Schritten wurden die Reagenzien auf Eis gelagert, um eine frühzeitige Reaktion zu verhindern.

Die Probe wurde zuerst für 10 Minuten bei 30 °C und dann für 30 Minuten bei 55 ° C inkubiert. In dieser Zeit fand die Reaktion statt. Zuletzt wurde das Enzym für 5 Minuten bei 99 °C inaktiviert. Die entstandene cDNA wurde sofort weiterverarbeitet oder bei −20 °C gelagert.

Tabelle 14: Pipettierschema Bioenyzm cDNA Synthesis Kit.

Komponenten	Volumen	Konzentration
dNTP Mix (je 10mM)	2 µl	1 mM (je dNTP)
RNase Inhibitor	0,5 µl	1 U/µl
Hexamer Primer	1 µl	1,25 µM
5x cDNA Synthesis Buffer	4 µl	1x
mRNA	200 ng	
reverse Transkriptase	1 µl	10U/µl
PCR Grade Water	Variabel	
gesamtes Volumen	20 µl	

2.2.10 Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR)

Mit der qPCR kann die DNA-Menge bestimmter Gene einer Probe quantifiziert werden. Dazu muss die DNA zuerst nach dem Prinzip der PCR amplifiziert werden.

Im Gegensatz zur PCR wird der Probe bei der qPCR ein fluoreszierender Farbstoff (SYBR-Green) zugefügt. Dieser lagert sich während der Elongation an die DNA an und kann ab einer bestimmten Menge im Mastercycler® ep gradient S realplex 2 detektiert werden. Detektiert wurde der sogenannte ct-Wert (*cycle threshold*), der den PCR-Zyklus beschreibt, in dem zuerst eine Fluoreszenz gemessen wird. Je niedriger der ct-Wert ist, desto früher wurde DNA detektiert und desto höher war die ursprüngliche DNA- bzw. mRNA-Menge. Bestimmt wurde also lediglich eine relative und keine absolute DNA-Menge. Aus diesem Grund müssen zu testende Proben stets mit einer Kontrolle in Bezug auf ein Normalisierungsgen, in diesem Fall beta-2 Mikroglobulin (ß2M), verglichen werden. Dieses Normalisierungsgen wird unabhängig von Zellzyklus und äußeren Faktoren immer gleichmäßig exprimiert und lässt somit einen Rückschluss auf die ursprüngliche DNA-Menge bzw. Zellzahl zu. Wichtig ist außerdem das Verfolgen der Schmelzkurve, denn hier sind ggf. die Ausschläge sichtbar, die auf fehlerhafte Messungen hinweisen.

Per qPCR kann das relative mRNA-Level ausgewählter Proteine einer Zellkultur bestimmt werden. Dazu wurde zunächst die mRNA aus dem Zellpellet gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde dann per qPCR quantifiziert. Der Ansatz wurde mithilfe des KAPA SYBR Fast qPCR Kits hergestellt. Pro µl cDNA wurden 5 µl SYBR-Green, 2 µl Primer-Mix und 2 µl Wasser verwendet. Dieser Ansatz wurde in eine 96-Well-Platte pipettiert. Dazu musste die Annealing-Temperatur des Primers entsprechend eingestellt werden (Tabelle 15).

Tabelle 15: qPCR Primer.

Name	Sequenz	Annealing Temp. [°C]
ACAN fw	ACAGCTGGGGACAT	60,5
ACAN rev	GTGGAATGCAGAGG	60,5
COL1 fw	TTCCCCCAGCCACAAAGAGTC	60,5
COL1 rev	CGTCATCGCACAACACCT	60,5
COL2 fw	CTCCTGGAGCATCTGGAGAC	63
COL2 rev	ACCACGATCACCCTTGACTC	63
β2M fw	TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT	60,5
β2M rev	TCTCTGCTCCCCACCTCTAA	60,5
RUNX2 fw	TTCCAGACCAGCAGCACTC	63
RUNX2 rev	CAGCGTCAACACCATCATT	63
SOX9 fw	CAGGCTTTGCGATTTAAGGA	60,5
SOX9 rev	CCGTTTTAAGGCTCAAGGTG	60,5
YWHAE fw	AGTAGCAGGGATGGATGTGG	63
YWHAE rev	CTTTCTGTTCAATGCTGCTGA	63

Die Primer wurden mithilfe von Primer3Puls (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi) entworfen und von der Firma Eurofin Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland) hergestellt.

Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der Pfaffl-Ratio (Pfaffl 2001), mit der die relative mRNA-Menge aus den ct-Werten der gesuchten mRNA eines Proteins sowie der mRNA-Menge des zuvor festgelegten Housekeeping-Proteins beta-2-Mikroglobulin (β2M) berechnet werden. Die Daten wurden mit einem Einstichproben-t-Test mithilfe von Vassarstats (http://vassarstats.net/t_single.html) auf Signifikanz überprüft.

2.2.11 Wachstumskurve

Die Proliferation der Zellen kann mit einer Wachstumskurve dargestellt werden. Dazu wurde eine festgelegte Zellzahl jeder Probe (48 000 Zellen) in drei kleine Zellflaschen ausgesät. Alle 24 Stunden wurde eine Flasche geerntet, die Zellzahl wurde per Cellometer gezählt. Da dieser Vorgang die Zellen schädigen kann, wurden einmal geerntete Zellen nicht erneut ausgesät. Stattdessen wurde am nächsten Tag die nächste der gleichzeitig angesetzten Flaschen geerntet. So konnte das Wachstum der Zellen für die Zeitspanne von 24, 48 und 72 Stunden gemessen werden.

Der Versuch dauerte drei Tage. Beim Aussäen der Zellen wurde 3 ml Standardmedium zugegeben. Ein Wechsel des Mediums war aufgrund der kurzen Versuchsdauer nicht nötig. Die Daten wurden mit einem Einstichproben-t-Test mithilfe von Vassarstats (http://vassarstats.net/t_single.html) auf Signifikanz überprüft.

2.2.12 Scratch Assay

Um die Migration der Zellen zu bewerten, wurden diese in 24-Wells ausgesät und dort belassen, bis 80% Konfluenz erreicht war. Sie befanden sich in 500 µl Standardmedium, das alle zwei bis drei Tage gewechselt wurde. Sobald die benötigte 80%ige Konfluenz erreicht war, wurde mit einem speziellen Stempel eine Linie innerhalb des Wells von Zellen befreit. Nun konnte unter dem Mikroskop eine gerade Linie am Boden des Wells beobachtet werden, die nicht von Zellen besiedelt war. Mit Fotos, die 0, 6, 12 und 24 Stunden nach der Verwendung des Stempels gemacht wurden, wurde die Bewegung der Zellen in diesem Bereich dokumentiert.

2.2.13 Migration Assay

Mithilfe des Boyden Chamber Migration Assays, einer 1962 von Dr. Stephen Boyden das erste Mal beschriebenen Methode, kann die Migration der Zellen genauer untersucht werden. Durch das Trennen zweier Kammern mit einer semipermeablen Membran kann beurteilt werden, ob Zellen auch ein solches Hindernis überqueren. Dazu wurden ThinCert™-Einsätze in Wells einer 24-Well-Platte eingesetzt. In die 24-Well-Platte wurden pro Well 600 µl Standardmedium pipettiert. Die zu untersuchenden Zellen, eine Kontrollgruppe und eine KO-Zelllinie, wurden nach bereits beschriebenem Schema geerntet. Pro Zelllinie wurden $5x10^5$ Zellen in 200 µl serumfreiem Medium gelöst und dann behutsam, um eine Verletzung der Membran zu vermeiden, in die Einsätze pipettiert. Anschließend wurde die Platte für 12 Stunden im Zellschrank bei 5% CO_2 und 37 °C inkubiert. Danach wurde das Standardmedium in den Wells durch 450 µl serumfreies Medium, dem 8 µM Calcein-AM

zugefügt worden war, ersetzt. Um zu gewährleisten, dass das Calcein-AM in den lebenden Zellen mithilfe von Esterasen in Calcein umgesetzt wurde und damit es seine fluoreszierende Wirkung entfalten konnte, wurde die Platte unter den genannten Bedingungen für weitere 45 Minuten im Zellschrank inkubiert. Nach dem Entfernen des Mediums in den Einsätzen wurden diese in eine vorbereitete 24-Well-Platte, die pro Well 500 µl Trypsin-EDTA enthielt, überführt und für 10 Minuten in den Zellschrank zurückgestellt. Durch gelegentliches und vorsichtiges Schütteln der Platte wurden die Zellen von der Unterseite des Einsatzes gelöst. In einem letzten Schritt wurden 200 µl der Trypsin-EDTA-Lösung in Wells einer 96-Well-Platte überführt, damit die Fluoreszenz (Anregungsmaximum 485nm, Emissionsmaximum 520nm) im Spectramax gemessen werden konnte.

2.2.14 Alginatkultur

Um ein 3D-Modell zu erstellen, bietet es sich an, die Zellen in Alginatkugeln zu kultivieren (Häuselmann et al. 1992; Häuselmann et al. 1994). Zu Beginn wurden Zellen mithilfe des bereits beschriebenen Verfahrens geerntet (Kap. 2.2.2). Das Zellpellet wurde in 1,2%iger Alginat-Lösung resuspendiert. Dabei musste darauf geachtet werden, dass das Verhältnis zwischen Zellmenge und Alginat exakt den Vorgaben entsprach: 40 000 Zellen wurden mit 20 µl Alginat resuspendiert. Diese Suspension wurde nun in eine bereits vorgelegte $CaCl_2$-Lösung (3 ml pro Well) getropft. In einem Well sollten nicht mehr als zehn Alginatkugeln kultiviert werden, um eine ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten. Nach 10 Minuten Polymerisationszeit wurde die $CaCl_2$-Lösung entfernt und die Alginatkugeln wurden mit Standardmedium gewaschen.

Danach folgte eine Inkubationszeit von 24 Stunden in 3 ml Medium, das aus 50% Standardmedium und 50% chondrogenem Differenzierungsmedium bestand. Anschließend wurde das Medium entfernt und 3 ml chondrogenes Differenzierungsmedium wurden eingebracht. Die Zellen blieben nun für 28 Tage im Zellschrank, um eine ECM zu bilden. Während dieser Zeit wurde das Medium alle 3 bis 4 Tage gewechselt. Falls die Zellen eine Kultur außerhalb der Alginatkugel im Well gebildet hatten, wurden die Kugeln in ein neues Well überführt, um einen Einfluss von Differenzierungsfaktoren aus den nun zweidimensional wachsenden Zellen zu verhindern. Dieses Auswandern der Zellen ist aufgrund der räumlichen Enge innerhalb der Alginatkugeln möglich. Nach 28 Tagen wurden die Alginatkugeln aus den 6-Well-Platten in ein 15ml-Kulturgefäß überführt. Die Zugabe von 1 ml HEPES-EDTA-Puffer führte zur Lysierung der Kugeln. Nach zehnminütigem Zentrifugieren bei 300 g wurden die Zellen gezählt, erneut zentrifugiert und als Pellets bei −80 °C eingefroren.

2.2.15 Immunhistochemie

Um histologische Schnitte anzufertigen, wurden Alginatkugeln aus den 6-Well-Platten entnommen. Diese wurden nach dem Fixieren und Einbetten in 7 µm dünne Scheiben geschnitten. Mit dem HiDef Detection Polymer System wurde ein primärer Antikörper detektiert.

Diese primären Antikörper binden an spezifische Proteine (Tabelle 16). Danach kann ein sekundärer Antikörper an den primären Antikörper binden. Aufgrund der Reaktion einer Chromogenfärbung mit dem sekundären Antikörper sind die Proteine mikroskopisch sichtbar. Das Protokoll der immunhistochemischen Reaktion ist in Tabelle 17 aufgeführt. Nach dem Dehydrieren folgt das Eindecken der Präparate.

Tabelle 16: Primäre Antikörper.

Primärer AK	Verdünnung
COL1 (Acris, R1038)	1:100 in A.bi
COL2 (Santa Cruz, SC-52658)	1:50 in A. bi

Tabelle 17: Ablauf Immunhistochemie.

Schritt	Lösung/Substrat	Dauer
Fixieren	4% Formaldehyd in HEPES-Puffer mit $CaCl_2$ bei RT	3 h
Waschen	HEPES-Puffer mit Bariumchlorid bei 4 °C	über Nacht
Alkoholreihe	Ethanol (70%, 80%, 96%, 100%)	3 h, 1 h, 1 h, 1 h
Zwischenmedium	Xylol	2 h
Einbetten	Parafin (Paraplastplus)	7 h (60 °C)
Hitze fixieren	Wasser (80 °C)	30 Min.
Alkoholreihe	Ethanol (100%, 90%, 80%, 60%)	je 2 Min.
Waschen	A.Bi	
Primärer AK	1:50/1:100 in A.Bi bei 37 °C	1 h / über Nacht
Waschen	A.Bi	
Sekundärer AK	HiDef Det. Amplifier	10 Min.
Waschen	A.Bi	
Polymer	HiDef Det. AP Polymer	10 Min.
Waschen	A.Bi	
Chromogenfärbung	1 Teil PermaRed, 1 Teil Puffer	6−12 Min.
Waschen	A.Bi	
Gegenfärben	Lichtgrün	90 Sek.
Waschen	1% Essigsäure	
Alkoholreihe	Ethanol (60%, 80% ,90%, 100%)	je 2 Min.
Dehydrieren	Xylol 2	2−5 Min.
	Xylol 1	5 Min.

2.2.16 Bio-Rad-V3-Western-Blot-Workflow

Der Bio-Rad-V3-Western-Blot-Workflow ist ein automatisierter Ablauf des Western Blots. Vorteile des Verfahrens sind die schnelleren Abläufe, die Möglichkeit zum Verzicht auf eine Coomassie-Färbung und die geringere Anzahl an Fehlerquellen. Die Zellen wurden in 4x Laemmli Puffer resuspendiert und in 10 Minuten auf 95° C erhitzt. Daraufhin wurden sie in *stain-free* 4−15%iges TGX Gel pipettiert und durch eine konstant aufrecht erhaltene Spannung (200 V) in einer Elektrophoresekammer (Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell) innerhalb von 35 Minuten separiert. In diesem Gel wurden die Proteine kovalent an einen visualisierbaren Stoff gebunden. Dieser wird mit UV-Strahlung aktiviert. Dadurch kann mit der bildgebenden Software ImageLab™ (Bio-Rad, Hercules USA) die Zellzahl der verschiedenen Proben ohne Coomassie-Färbung und ohne Housekeeping-Protein normalisiert werden. Danach wurde das Gel in eine weitere Kammer (PerfectBlue™ Tank-Elektroblotter), die eine Membran enthält, überführt. Dieser Vorgang erfolgte ebenfalls mithilfe eines Stromflusses (2,5 A). In diesem Fall handelte es sich, im Gegensatz zum klassischen Ablauf des Western Blots, um eine Nitrocellulose-Membran, die nicht per Methanol aktiviert muss. Außerdem wird für dieses als *semi-dry* bezeichnete Verfahren weniger Puffer als beim Nassblot benötigt. Die Membran und das Gel sind feucht, befinden sich allerdings nicht in einem mit Puffer gefüllten Tank. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem bereits bekannten Verfahren. Allerdings wurde zusätzlich ein sensitiverer Scanner (Chemidoc XRS+) verwendet. Die Nitrocellulose-Membran kann auf gleichem Wege gestrippt und im Anschluss auf ein anderes Protein untersucht werden.

Der Bio-Rad-Workflow wurde genutzt, um die Menge an COL1 und COL2 der Proben zu quantifizieren, da diese auf den Membranen des klassischen Workflows nicht bzw. schwer detektiert werden konnten. Außerdem ist mit dem Bio-Rad-Workflow eine Detektion trotz geringerer Zellmengen (weniger als 1,5 x 10^5 Zellen) möglich. Aufgrund des 3D-Modells waren teilweise nur noch geringe Zellmengen übrig. Deshalb wurden die Zellpellets der 3D-Proben unter anderem per Bio-Rad-Workflow untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte per Einstichproben t-Test auf Vassarstats (http://vassarstats.net/t_single.html.).

2.2.17 Immunhistochemie Knorpelschnitte

In Knorpelschnitten eines an OA erkrankten Patienten, die der Arbeitsgruppe bereits vorlagen, wurde YWHAE mit einem AK angefärbt. Die Knorpelproben wurden nach den Standards der Osteoarthritis Research Society International (ORSI; Pritzker et al. 2006) klassifiziert. Mit den Schnitten wurde ähnlich verfahren wie mit den Alginatkugeln. Nach einer 30-minütigen Hitzefixierung bei 80 °C folgen die in Tabelle 18 aufgeführten Schritte. Nach dem Dehydrieren wurden die Präparate in Deckgläschen eingedeckt. Die Versuche mit diesen Knorpelschnitten sind ebenfalls durch den Ethikantrag mit der Antragsnummer 25/12/10 genehmigt.

Tabelle 18: Ablauf Immunhistochemie Knorpelschnitte.

Schritt	Lösung/Substrat	Zeit
Fixieren	Gepuffertes Formalin nach Lillie bei 4 °C	6 h
Waschen	70% Ethanol	über Nacht
Alkoholreihe	Ethanol (70%, 80%, 90%, 96 %, 100%)	3 h, 1 h, 1 h, 1 h, 2 h
	Isopropylalkohol	2 h, 1,5 h
Zwischenmedium	Xylol	2 h
Einbetten	Parafin (Paraplastplus)	30 Min.; 7 h bei 60 °C
Antigendemaskierung	Protaqs bei 60 °C	30 Min.
Waschen	TBS-T	3 x 2 Min.
Blocken	1% BSA/TBS	10 Min.
Primärer Antikörper	YWHAE 1:100 bei RT	über Nacht
Waschen	TBS-T	3 x 2 Min.
Sekundärer Antikörper	HiDef Amplifier	10 Min.
Waschen	TBS-T	3 x 2 Min.
Polymer	HiDef Polymer AP	10 Min.
Waschen	TBS-T	3 x 2 Min.
Chromogenfärbung	PermaRed	4 Min.
Waschen	TBS-T	10 Min.
Gegenfärbung	Hämalaun (Verdünnung 1:8)	1 Min.
Waschen	Wasser	10 Min.
Dehydrieren	Ethanol 50%, 60%, 80%, 90%, 100 %	je 3 Min.
	Xylol 2, Xylol 1	2 x 5 Min., 10 Min.

3 Ergebnisse

3.1 Homozygoter YWHAE-Knockout

Ziel der Versuche war es, eine Deletion des YWHAE-codierenden Gens auf beiden Chromosomen zu erreichen. Mithilfe der CRISPR/Cas9-Methode hatte die Arbeitsgruppe bereits einen heterozygoten YWHAE-Knockout, der im KO-Screening nachgewiesen wurde, hergestellt. In einem weiteren Versuch wurden die nach dem heterozygoten KO entstandenen DNA-Fragmente sequenziert. Um einen homozygoten Knockout herzustellen, wurde in diesen Zelllinien mit heterozygoten YWHAE-KO nun erneut die CRISPR/Cas9-Methode angewandt. Da nun nur noch ein Chromosom das Gen enthält, besteht eine größere Chance, dass die Nuklease am zweiten Chromosom bindet. Mithilfe einer ebenfalls auf dem Vektor liegenden GFP-Markierung können die Zellen per FACS sortiert und danach kultiviert werden. Sobald genügend Zellen vorhanden sind, wird ein KO-Screening durchgeführt.

Die DNA aller gewachsenen 47 Klone wurde mit PCRs vervielfältigt und mit einem KO-Screening untersucht. Bei allen zeigte sich das bereits bekannte, auf einen heterozygoten Knockout hinweisende Bild (Abbildung 5). Im Screening sind deutlich ein DNA-Fragment mit der Länge von ca. 700 bp, ein Fragment mit der Länge von 1 kb und ein minimal kürzeres Fragment zu erkennen. Das Fragment mit der Länge von 1 kb entspricht dem ursprünglichen YWHAE-codierenden Exon des Gens. Die beiden zusätzlichen Fragmente sind durch CRISPR/Cas9 veränderte Fragmente. Somit ist davon auszugehen, dass keine weitere Deletion des Zielgens stattfand. Eine Probe (s. Abbildung 5 direkt rechts neben der Kontrolle) zeigte eine besonders schwache Fluoreszenz des 1 kb langen Fragmentes. Deshalb wurde diese Zelllinie geerntet und mit einem Western Blot auf das Protein YWHAE getestet. Im Vergleich zur Kontrollprobe ist hier zwar eine Reduktion des Proteins auf ca. 25% zu erkennen, ein homozygoter Knockout und somit ein vollständiges Fehlen des Proteins konnte dennoch nicht detektiert werden (Abbildung 6).

Es konnten also keine Anhaltspunkte für einen erfolgreichen homozygoten Knockout gefunden werden. Ein Überleben von Zellen, bei denen das Zielgen in beiden Chromosomen entfernt wurde, konnte in diesem Versuch nicht beobachtet werden.

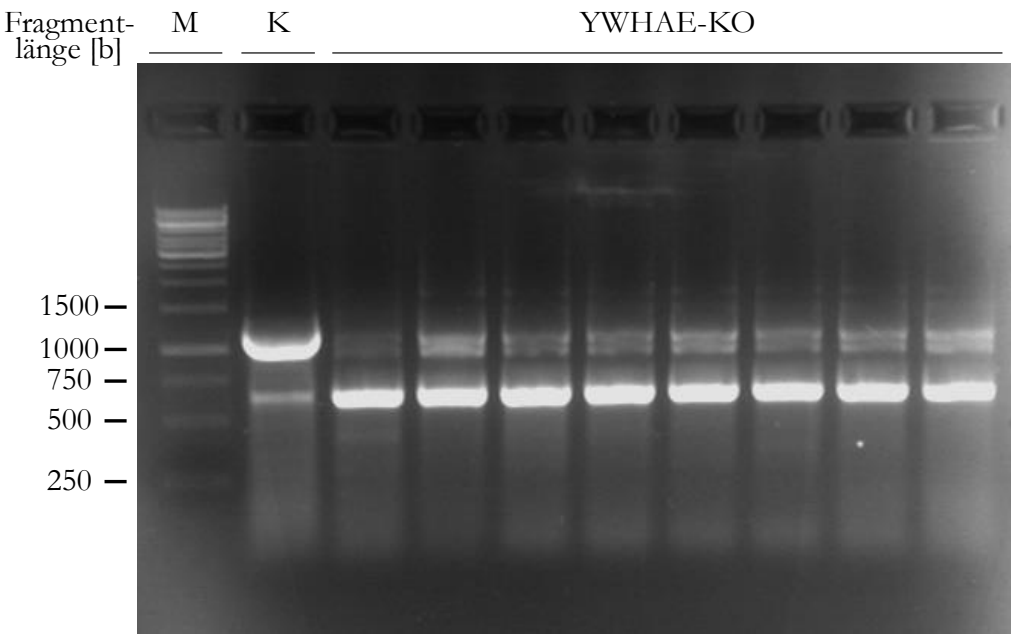


Abbildung 5: Beispiel eines KO-Screenings.

Acht potenzielle YWHAE-KO-Zelllinien wurden mit einer Kontrolle verglichen. Per PCR wurde die YWHAE-codierende DNA-Sequenz amplifiziert und mit einer Gelelektrophorese detektiert. (M=Marker, K=CPC-Kontrolle)

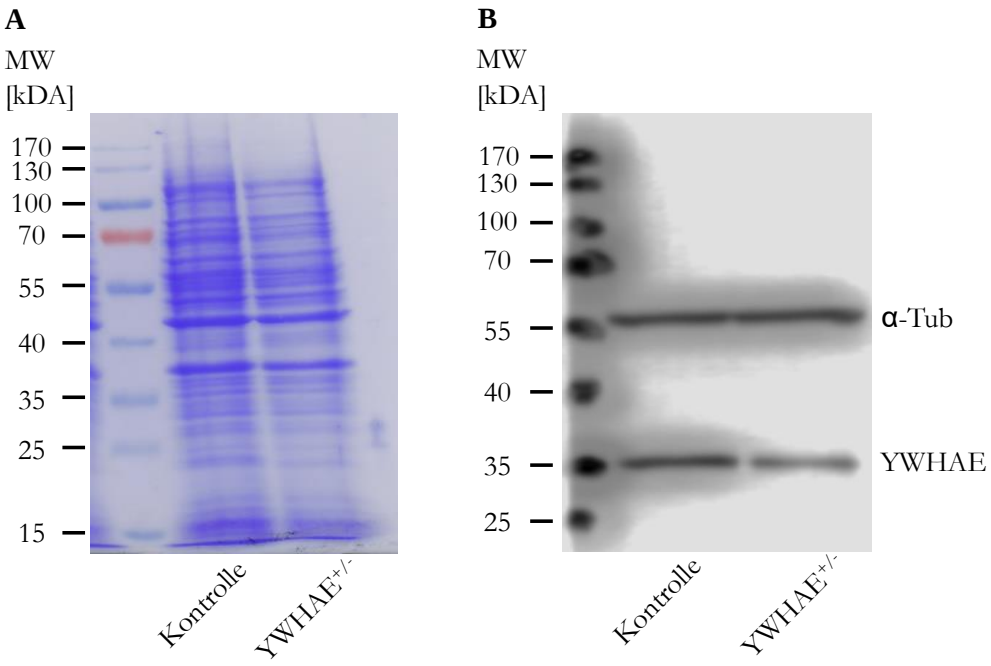


Abbildung 6: Western Blot eines potenziell homozygoten YWHAE-KOs.

A: Gesamter Blot in Coomassie-Färbung. **B**: Vergleich der möglichen KO-Zelllinie mit einer CPC-Kontrolle auf das Proteinlevel von YWHAE. α-Tubulin wurde als Housekeeping-Protein verwendet. Deutlich zu erkennen ist die noch vorhandene YWHAE-Proteinbande der YWHAE-KO-Probe.

3.2 Heterozygoter YWHAE-Knockout

Nun wurden die CPCs mit heterozygotem YWHAE-Knockout untersucht, da auch diese Deletion einen Einfluss auf das chondrogene Potenzial haben kann. Diese Zelllinie wird in den folgenden Kapiteln als $YWHAE^{+/-}$ bezeichnet. Dazu wurden das mRNA- und das Protein-Level dieser $YWHAE^{+/-}$-Kultur und einer aus CPCs bestehenden Kontrollgruppe untersucht. Grundlage waren in Zellflaschen kultivierte Zellen, die bis zu einer Konfluenz von ca. 70−80% kultiviert, dann geerntet und weiter untersucht wurden. Zur Simulation eines Wachsens der Zellen im dreidimensionalen Raum und um Bestandteile der ECM, wie COL1, COL2 und ACAN, quantifizieren zu können, wurden Zellen in Alginat eingebettet und für 28 Tage kultiviert. Auch die CPCs der Kontrollgruppe wurden für 28 Tage, der für die Synthese der ECM-Bestandteile nötigen Zeitspanne, in Alginatkugeln kultiviert.

Außerdem wurden Histologie-Bilder erstellt, um diese mit den Western-Blot-Ergebnissen zu vergleichen. Zusätzlich wurde die Vermehrungsrate der Zellen untersucht und in einer Wachstumskurve dargestellt. Zwei weitere Versuche, ein Scratch und ein Migration Assay, wurden durchgeführt, um das Migrationsverhalten der Zellen beurteilen zu können. Dieses kann anschließend ins Verhältnis zur Teilungsrate gesetzt werden. Nachfolgend finden sich die entsprechenden Ergebnisse.

3.3 Ergebnisse der $YWHAE^{+/-}$-2D-Kultur

Relevante Faktoren für das Fortschreiten einer OA sind vor allem die sinkende Menge an COL2 sowie an ACAN und die daraus resultierenden Veränderungen der ECM. Die beiden wichtigsten regulatorisch auf die Synthese dieser Proteine wirkenden Proteine sind die Transkriptionsfaktoren SOX9 und RUNX2. CPCs, die in einer Zellflasche zweidimensional auf Plastik kultiviert werden, werden durch dieses ungewohnte Umfeld in ihrer Synthese der ECM gestört. Somit wurden diese CPCs nur auf die Synthese der genannten regulatorischen Proteine SOX9 und RUNX2 sowie auf YWHAE und nicht die Synthese von ECM-Bestandteilen untersucht. Ziel war hier, zu klären, wie stark der heterozygote KO die Produktion von YWHAE und inwiefern der veränderte YWHAE-Spiegel RUNX2 und SOX9 auf mRNA- und Protein-Level beeinflusst.

3.3.1 Relatives mRNA-Level

Um das mRNA-Level der gesuchten Proteine zu quantifizieren, wurde eine qPCR durchgeführt. Dabei wurden die YWHAE$^{+/-}$-CPCs in Relation zu einer CPC-Kontrollgruppe gesetzt. Um die Zellmenge der jeweiligen Proben mit einzubeziehen, wurde mit einem House Keeping Gen (ß2M) eine Normalisierung durchgeführt. Die YWHAE$^{+/-}$-Probe zeigt für alle drei untersuchten mRNA ein signifikant höheres mRNA-Level als die Kontrollprobe (Abbildung 7). SOX9 ist dabei um das 2,5-Fache und somit am stärksten erhöht.

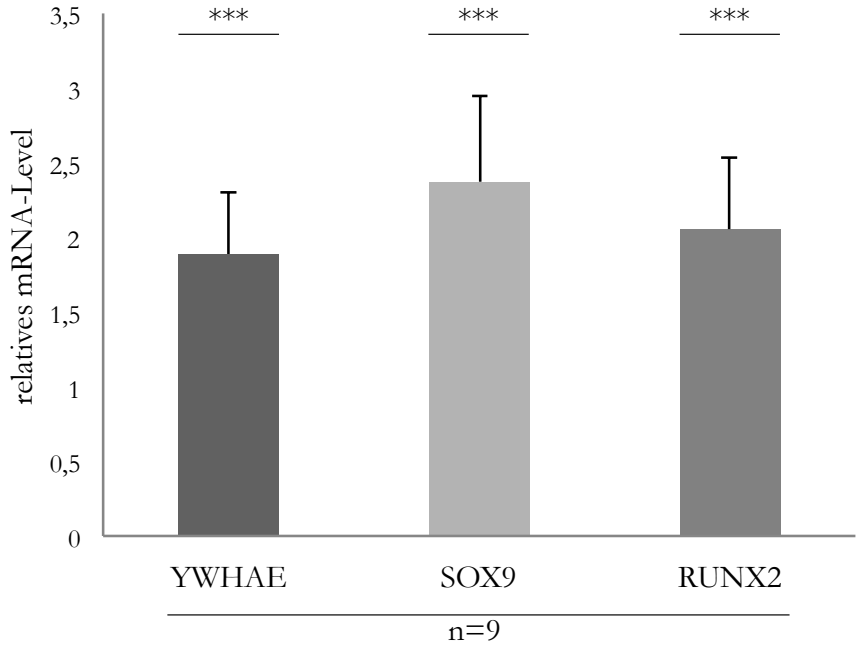


Abbildung 7: qPCR-Ergebnisse des 2D-Modells.

Das relative mRNA-Level ausgewählter Gene der YWHAE$^{+/-}$-CPCs wurde mit einer CPC-Kontrollprobe (definiert als Wert 1) verglichen. Das Housekeeping-Gen β2M diente als Ladungskontrolle. n steht für die Zahl an Versuchsreplikaten. Die Standardabweichung ist durch ⊤ auf den Balken dargestellt. (*** = P < 0,001)

3.3.2 Relatives Protein-Level

Mit einem Western Blot wurde das relative Protein-Level der YWHAE$^{+/-}$-CPCs mit einer CPC-Kontrollprobe verglichen. Als Housekeeping-Protein wurde α-Tubulin verwendet. Dadurch konnte ein Rückschluss auf die Zellmenge gezogen und die Proteinmengen konnten in Relation gesetzt werden. Abbildung 8 zeigt Scans verschiedener Western Blots, die mit unterschiedlichen Antikörpern inkubiert wurden. Nach statistischer Datenanalyse ergibt sich eine signifikante Reduktion von YWHAE auf ca. 30% (Abbildung 9). Der heterozygote KO wirkt sich also wie erwartet auf die Synthese des Proteins aus. Die Menge an SOX9 ist hingegen größer, wenn auch statistisch nicht signifikant. RUNX2 zeigt eine statistisch nicht signifikante Reduktion. Die Ergebnisse decken sich mit der Annahme, dass sich eine Reduktion von YWHAE positiv auf die Chondrogenität der CPCs auswirken könnte.

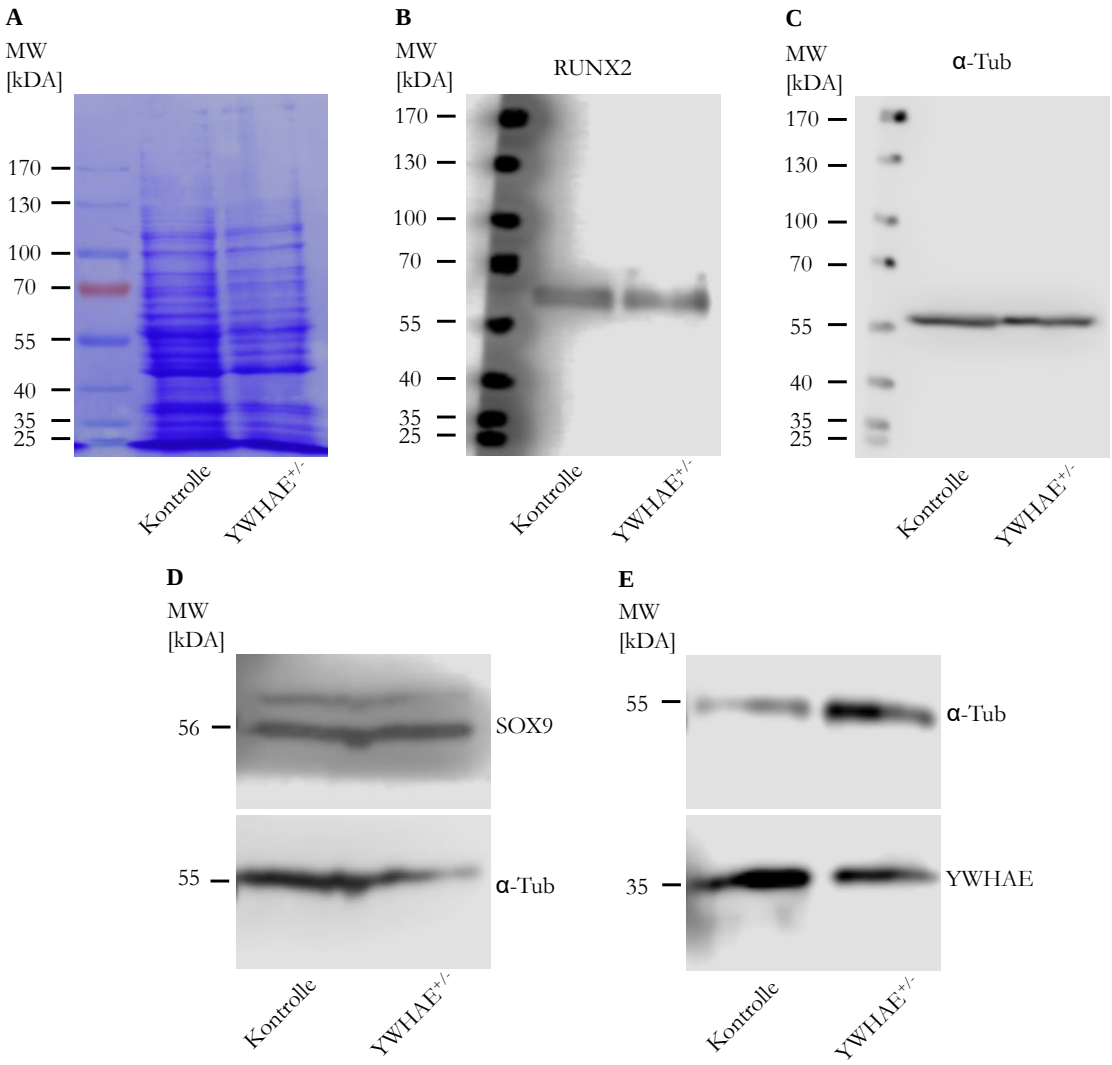


Abbildung 8: Western Blots des 2D-Modells.

A: Beispiel eines mit Coomassie-Färbelösung gefärbten Western Blots. **B**: Die Detektion des RUNX2-Antikörpers dient dem Vergleich des relativen Proteinlevels von CPC-Kontrollprobe und YWHAE$^{+/-}$-Probe. **C:** Mithilfe der Detektion des α-Tubulin-Antikörpers wird eine Ladungskontrolle durchgeführt. **D**: Die Ausschnitte der Scans zeigen den Vergleich der SOX9-Proteinlevel, der in Relation zur Ladungskontrolle mit α-Tubulin gesetzt wurde. **E**: Hier sind das YWHAE-Proteinlevel und die Ladungskontrolle mit α-Tubulin dargestellt.

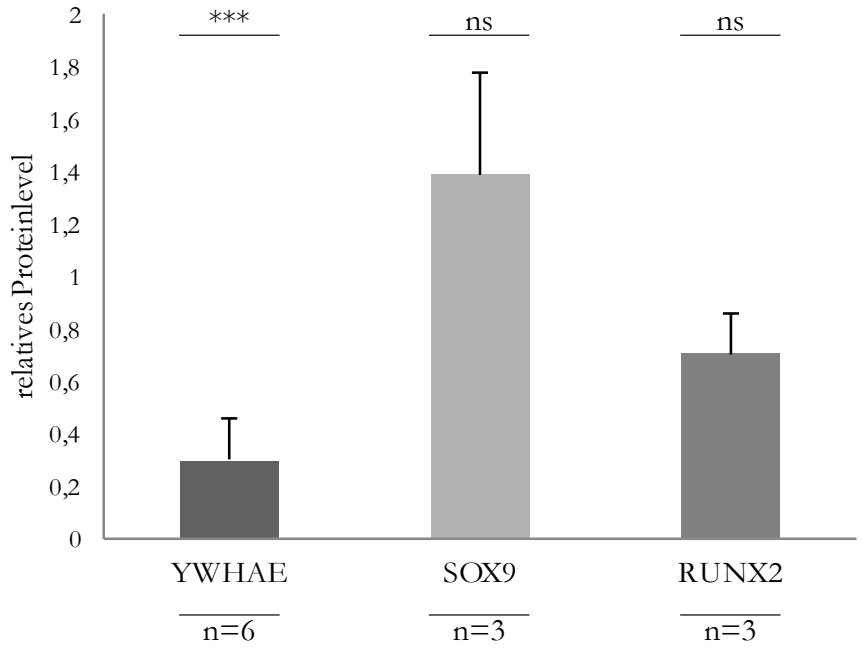


Abbildung 9: Western-Blot-Ergebnisse des 2D-Modells.

Das relative Protein-Level ausgewählter Proteine der YWHAE$^{+/-}$-Probe wurde mit einer CPC-Kontrollprobe (definiert als Wert 1) verglichen. Das Housekeeping-Gen α-Tubulin diente als Ladungskontrolle. n steht für die Zahl an Versuchsreplikaten. Die Standardabweichung ist durch ⊤ auf den Balken dargestellt. (*** = P < 0,001; ns = nicht signifikant)

3.3.3 Wachstumskurve

Die Wachstumskurve stellt das Wachstum der YWHAE$^{+/-}$-CPCs im Vergleich zum Wachstum einer aus CPCs bestehenden Kontrollgruppe dar. Hier zeigte sich eine deutlich stärkere Teilungsrate der YWHAE$^{+/-}$-CPCs. Diese Tendenz war bereits nach 24 Stunden zu erkennen. Innerhalb von zwei Tagen hatte sich die Anzahl dieser Zellen verdreifacht, während sich die Anzahl der Zellen der Kontrollgruppe lediglich verdoppelte (Abbildung 10). Ein statistisch signifikanter Unterschied der Zellzahl konnte allerdings lediglich nach zwei Tagen festgestellt werden.

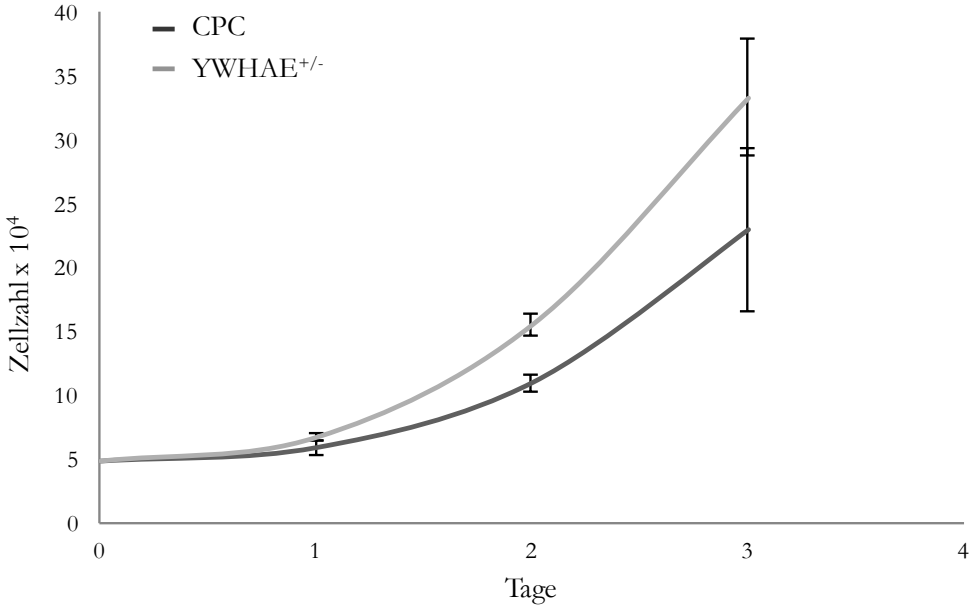


Abbildung 10: Wachstumskurve.

Die Wachstumskurve stellt das Wachstum einer CPC-Zellkontrolle im Vergleich zu einer YWHAE$^{+/-}$-Probe dar. Es wurden jeweils 48 000 Zellen ausgesät. Die Zellzahl wurde alle 24 Stunden per Cellometer gezählt. Es wurden drei Versuchsreplikate durchgeführt.

3.3.4 Scratch Assay

Das Scratch Assay wurde durchgeführt, um die Migrationsfähigkeit der Zellen zu beurteilen. Dazu wurde per Stempel eine gerade Linie Zellen in einem Well einer 48-Well-Plate entfernt und über 24 Stunden beobachtet. Der Wachstumskurve ist zu entnehmen, dass sich die Anzahl keiner der beiden Zelltypen innerhalb eines Tages verdoppelte. Somit ist davon auszugehen, dass ein Verschluss der entstandenen Linie nicht alleine durch Zellteilung entsteht.

Wie in den anderen Versuchen ist auch hier der Vergleich der YWHAE$^{+/-}$-CPCs mit einer CPC-Kontrollgruppe wichtig. Bei beiden Zellkulturen ist zweifelsfrei eine Migration erkennbar, die zu einem kontinuierlichen Schließen der entstandenen zellfreien Lücke führt (Abbildung 11). Allerdings zeigen die YWHAE$^{+/-}$-CPCs bereits nach 6 Stunden eine leicht stärkere Migration. Diese setzt sich fort, sodass nach 12 Stunden keine Lücke mehr zu erkennen ist. Die Zellen der Kontrollprobe haben zu diesem Zeitpunkt die Lücke ebenfalls geschlossen, allerdings ist sie noch sichtbar. Nach 24 Stunden ist in beiden Proben keine Lücke mehr vorhanden. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und zeigte jeweils ähnliche Ergebnisse.

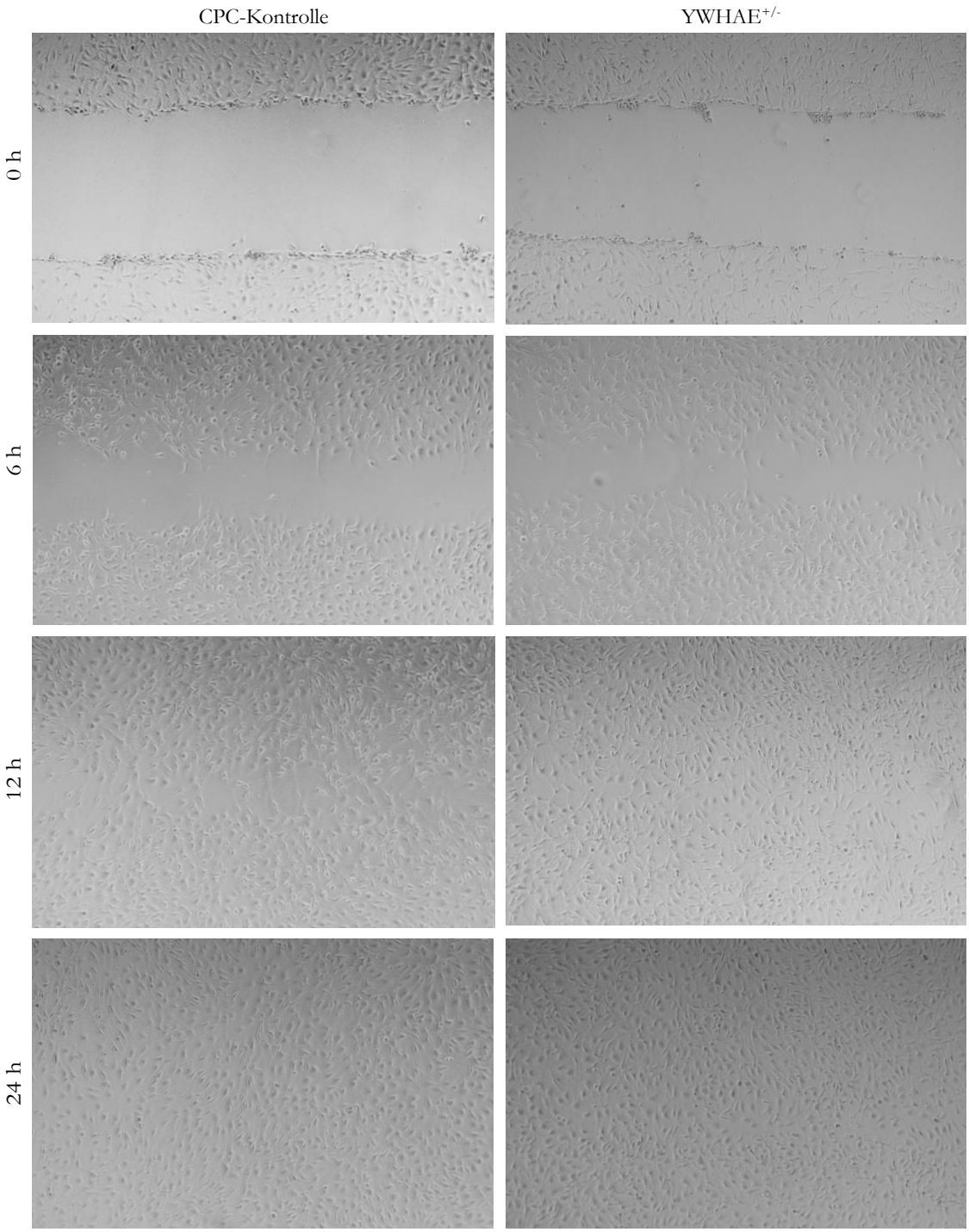


Abbildung 11: Scratch Assay.

Zellkulturen einer CPC-Kontrolle und einer YWHAE$^{+/-}$-Probe in 5-facher Vergrößerung jeweils 0, 6, 12 und 24 Stunden nach der Nutzung des Stempels. (n=3)

3.3.5 Migration Assay

Dieser Versuch kontrolliert die Fähigkeit der Zellen, eine semipermeable Membran zu passieren, und soll einen weiteren Aufschluss über das Migrationsverhalten geben. Die YWHAE$^{+/-}$-CPCs wurden mit einer aus CPCs bestehenden Kontrollprobe verglichen. Die Migration wurde nach 12 Stunden mit einem fluoreszierenden Marker überprüft.

Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Proben feststellbar. Die Werte unterliegen einer relativ hohen Schwankung. Der Versuch belegt, dass der YWHAE$^{+/-}$-KO keinen signifikanten Einfluss auf das Migrationsverhalten der Zellen hat. Beide Zelllinien sind in vitro in der Lage, durch eine semipermeable Membran zu migrieren.

3.4 Ergebnisse der YWHAE$^{+/-}$-3D-Kultur

Die CPCs, die für 28 Tage in Alginatkugeln kultiviert wurden, wurden nicht nur auf die bereits genannten regulatorischen Proteine, sondern auch auf Bestandteile der ECM (COL1, COL2, ACAN) untersucht. Es zeigte sich, dass die Zellen während dieser 28 Tage in der Lage sind, innerhalb der dreidimensionalen Struktur eine ECM aufzubauen. Dies erlaubt eine deutlich bessere Simulation sowie realistischere Rückschlüsse auf die möglichen Auswirkungen des KOs in vivo. In den folgenden Versuchen wurde jeweils eine YWHAE$^{+/-}$-Probe mit einer aus CPCs bestehenden Kontrollprobe verglichen.

3.4.1 Histologische Bilder der Alginatkultur

Die in Alginat kultivierten CPCs wurden fixiert und mit verschiedenen Antikörpern inkubiert (Abbildung 12). So können in einer 40-fachen Vergrößerung Rückschlüsse auf die vorhandene Menge an bestimmten Proteinen gezogen werden. Allerdings sind die Aufnahmen nur ein kleiner Ausschnitt des Gesamtbildes und sollen deshalb nur als Unterstützung des Western-Blot-Ergebnisses dienen. Das linke Bild in der ersten Reihe zeigt eine mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbte Alginatkugel in 4-facher Vergrößerung. Deutlich sichtbar sind Zellkerne, die in Alginat eingebettet sind. Ihre direkte Umgebung ist nicht gefärbt, da das Zytoplasma beim Waschen entfernt wird. Das rechte Foto der ersten Reihe ist eine Negativkontrolle, in der lediglich die Zellkerne angefärbt wurden.

Auf den folgenden Bildern sind die ECM-Bestandteile COL1 und COL2 mit spezifischen Antikörpern und Chromatogen angefärbt. Die Ausschnitte zeigen, dass beide Kollagene sowohl in unveränderten CPCs als auch in der YWHAE$^{+/-}$-Kultur vorkommen. Während bei COL2 kein Unterschied zu sehen ist, wurde in diesem speziellen Ausschnitt mehr COL1 in der YWHAE$^{+/-}$-Kultur detektiert.

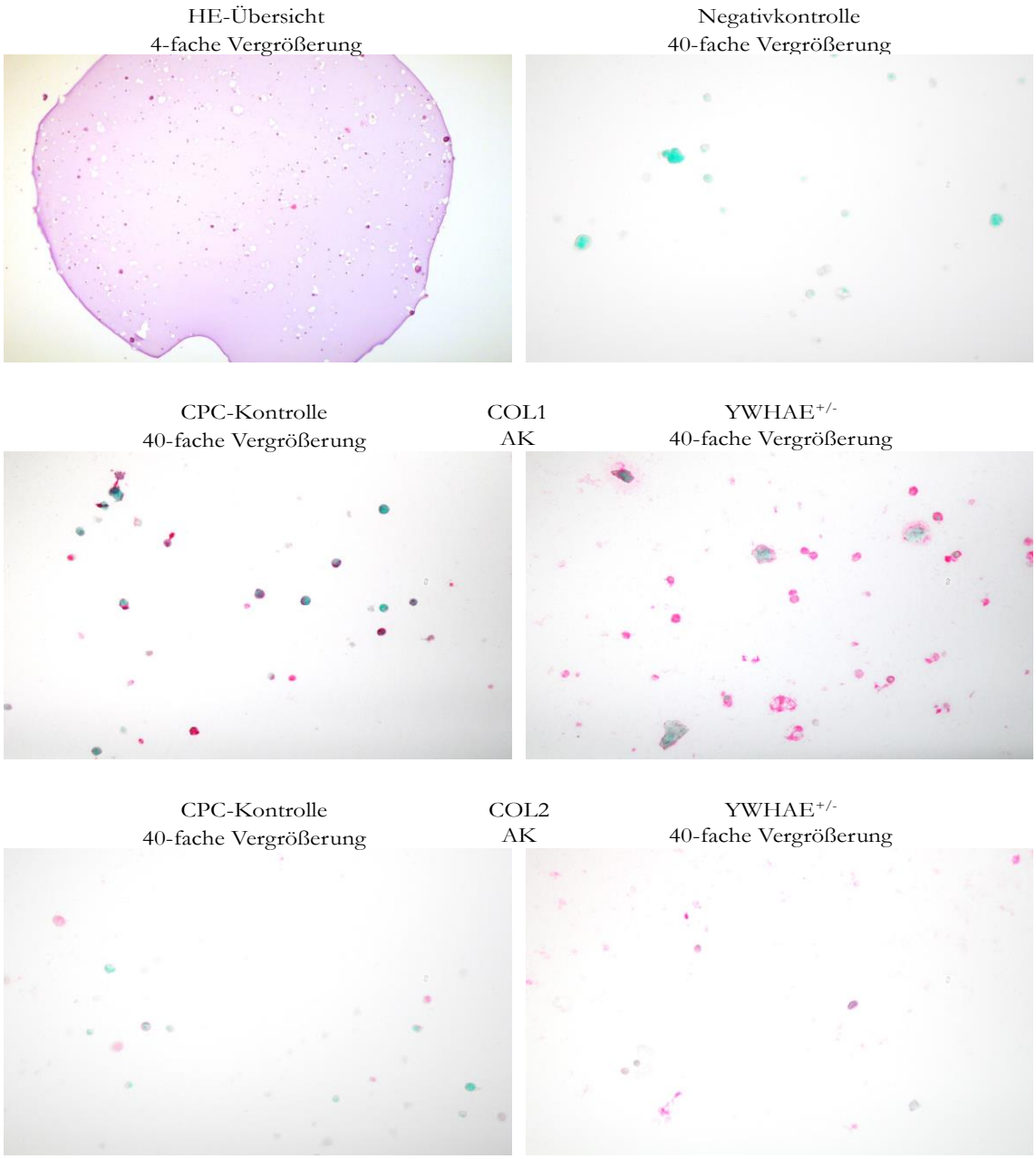


Abbildung 12: Histologische Fotografien der Alginatkultur.

Die erste Reihe zeigt eine Übersicht einer Alginatkugel mit CPCs in 4-facher Vergrößerung und eine Negativkontrolle ohne Protein-AK in 40-facher Vergrößerung. Die anderen Bilder (40-fache Vergrößerung) stellen angefärbte relevante Proteine in einer Alginatkugel dar. Die Zellkerne sind jeweils mit Lichtgrün angefärbt. (Abkürzungen: HE-Färbung − Hämatoxylin-Eosin-Färbung, AK – Antikörper)

3.4.2 Relatives mRNA-Level

Per qPCR wurde eine relative Quantifizierung der mRNA-Menge durchgeführt. Zusätzlich zu den im 2D-Versuch detektierten mRNA von YWHAE, RUNX2 und SOX9 wurden hier außerdem die ECM-Bestandteile COL1, COL2 und ACAN berücksichtigt. Im Gegensatz zum 2D-Modell fällt im 3D-Modell generell eine signifikant geringere mRNA-Menge in der YWHAE$^{+/-}$-Probe auf. Wie in Abbildung 13 zu erkennen, sind lediglich von SOX9 und COL2 mehr als 50% der mRNA-Menge der Kontrollprobe detektiert worden. Ein Einfluss des Knockouts auf die gesamte mRNA-Produktion ist nicht auszuschließen.

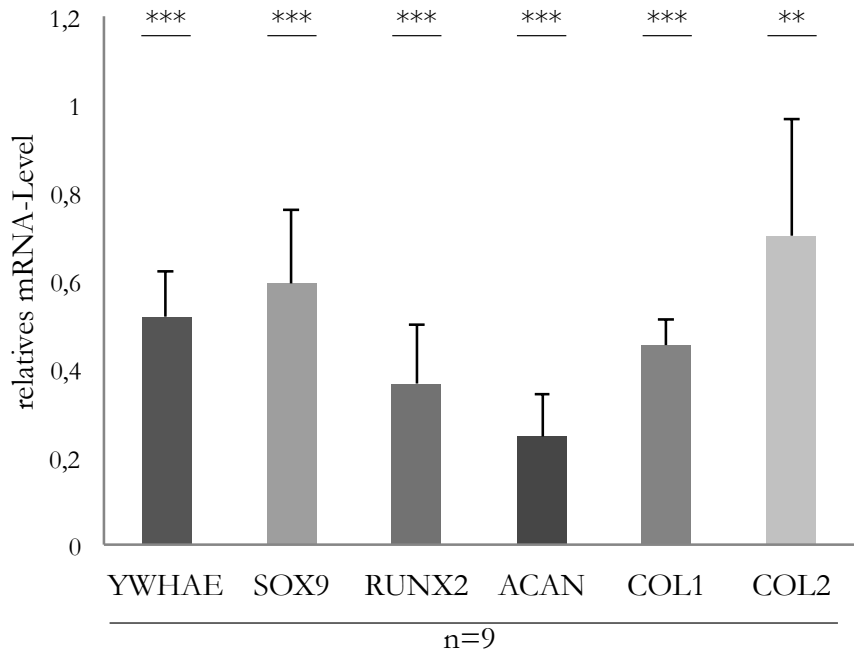


Abbildung 13: qPCR-Ergebnisse des 3D-Modells.

Das relative mRNA-Level ausgewählter Gene der YWHAE$^{+/-}$-CPCs in Relation zu einer CPC-Kontrollprobe (definiert als Wert 1). Beide Proben wurden 28 Tage im 3D-Modell kultiviert. Das Housekeeping-Gen β2M dient als Ladungskontrolle. n steht für die Zahl an Versuchsreplikaten. Die Standardabweichung ist durch ┬ auf den Balken dargestellt. (*** = P < 0,001; ** = P < 0,01)

3.4.3 Relatives Protein-Level

Die Protein-Level der YWHAE$^{+/-}$-CPCs, die 28 Tage in Alginatkugeln kultiviert wurden, wurden mit denen einer Kontrollprobe, bestehend aus ebenfalls in Alginat kultivierten CPCs, verglichen. Durch die Quantifizierung des House-Keeping-Proteins α-Tubulin wird eine relative Mengenangabe der anderen Proteine möglich. Beispiele der Western Blots und der verschiedenen Antikörper-Detektionen sind in Abbildung 14 dargestellt. Analog zum Ergebnis des Western Blots des 2D-Versuches zeigen sich eine signifikante Reduktion von YWHAE (auf ca. 30%, Abbildung 15) sowie ein höheres SOX9-Level und ein niedrigeres RUNX2-Level. Hier sind beide Unterschiede zur Kontrolle statistisch signifikant. Somit wird in diesem Versuch die gewünschte Tendenz der Regulatoren deutlich.

Allerdings sind weder das COL1- noch das COL2-Level relevant beeinflusst. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte nicht festgestellt werden. Im Rahmen der Versuche zeigte sich eine leichte Reduktion beider Proteine. Da kein geeigneter Antikörper für ACAN vorlag, konnte das Protein-Level nicht quantifiziert werden.

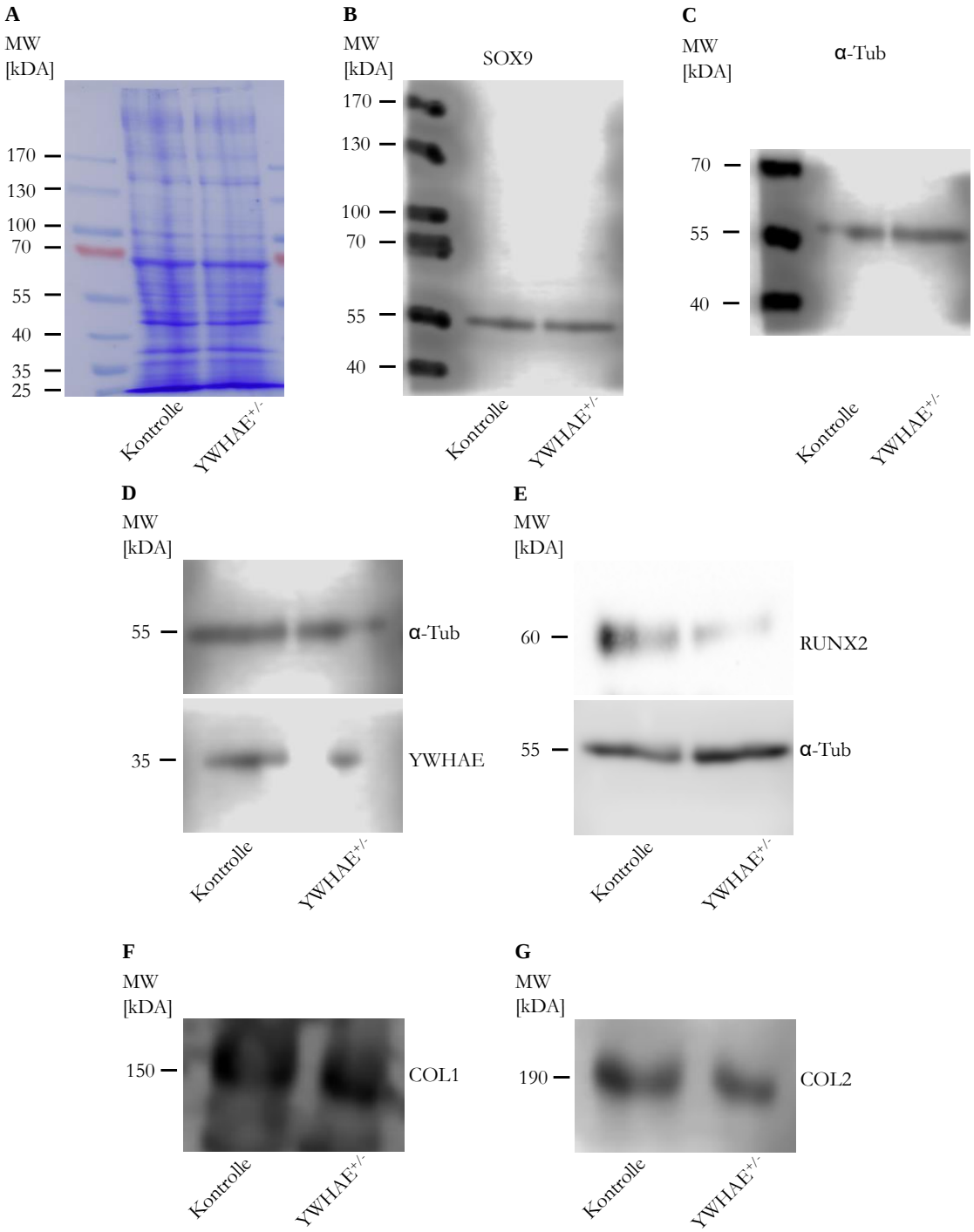


Abbildung 14: Western Blots des 3D-Modells.

A: Beispiel eines Western Blots. **B**: Die Detektion des SOX9-Antikörpers dient dem Vergleich des relativen Proteinlevels. **C:** Mithilfe der Detektion des α-Tubulin-Antikörpers wird eine Ladungskontrolle durchgeführt. **D**: Die Ausschnitte der Scans zeigen den Vergleich der YWHAE-Proteinlevel, der mit der Ladungskontrolle durch α-Tubulin in Relation gesetzt wurde. **E**: Hier sind das RUNX2-Proteinlevel und die Ladungskontrolle mit α-Tubulin dargestellt. **F**: Der Scan zeigt die COL1-Proteinlevel. Da dieser Western Blot mit dem Bio-Rad-V3-Workflow durchgeführt wurde, ist keine Ladungskontrolle mit α-Tubulin nötig. **G**: Der Scan zeigt die COL2-Proteinlevel. Er wurde ebenfalls mit dem Bio-Rad-V3-Workflow durchgeführt.

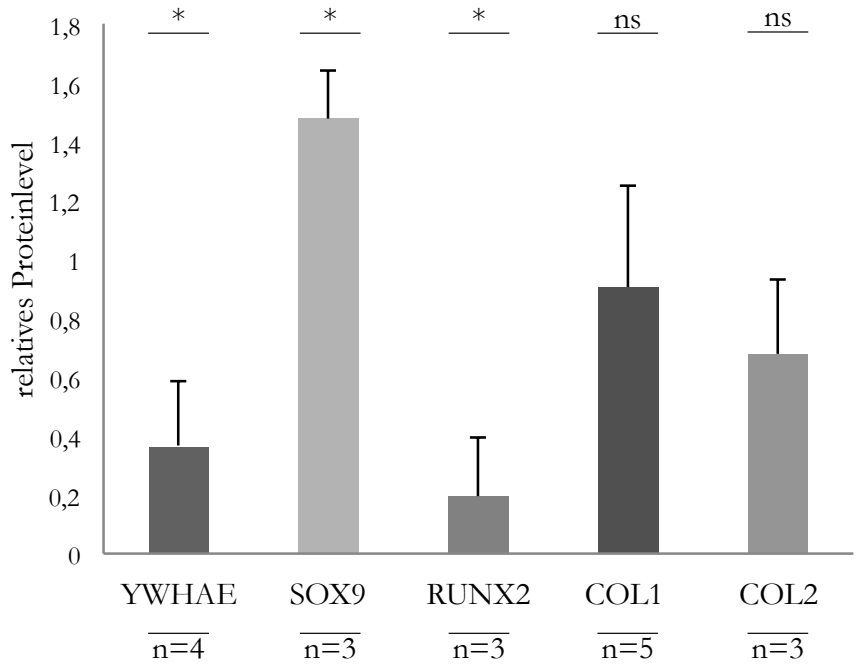


Abbildung 15: Western-Blot-Ergebnisse des 3D-Modells.

Das relative Protein-Level ausgewählter Proteine der YWHAE$^{+/-}$-CPCs ist hier in Relation zu einer CPC-Kontrollprobe (definiert als Wert 1) gesetzt. Das Housekeeping-Gen α-Tubulin dient als Ladungskontrolle. n steht für die Zahl an Versuchsreplikaten. Die Standardabweichung ist durch ⊤ auf den Balken dargestellt. (* = P < 0,05; ns = nicht signifikant)

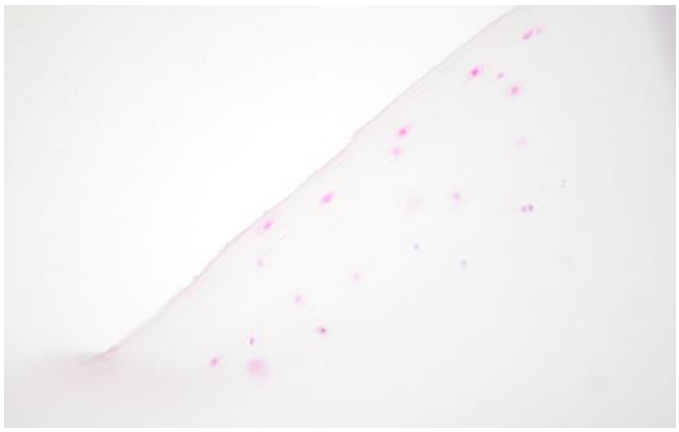
3.5 Knorpelschnitte

Die Knorpelschnitte stammen aus unterschiedlichen Bereichen des Knorpels desselben Patienten. Dies erlaubt einen aussagekräftigen Vergleich zwischen gesunden und osteoarthritischen Knorpelproben. Histologische Bilder dieser Knorpelschnitte wurden mit YWHAE-Antikörper angefärbt (Abbildung 16). In beiden Fällen ist YWHAE in den Zellkernen zu finden. Auf diesen Bildern sind vor allem die Zellkerne in oberen Schichten angefärbt. Da es sich allerdings nur um eine Probe handelt und keine Quantifizierung durchgeführt wurde, kann kein Rückschluss auf die Verteilung gezogen werden. Dennoch wird mithilfe der Bilder deutlich, dass YWHAE in vivo sowohl im gesunden als auch im erkrankten, histologisch veränderten Knorpel zu finden ist.

Negativkontrolle
40-fache Vergrößerung

gesunder Knorpel
40-fache Vergrößerung

YWHAE
AK



osteoarthritischer Knorpel
40-fache Vergrößerung

YWHAE
AK

Abbildung 16: Histologische Bilder der Knorpelschnitte.

Die Negativkontrolle ohne AK bildet den Vergleich zwischen gesundem und osteoarthritischem Knorpel ab. Im gesunden und im osteoarthritischen Knorpel ist YWHAE in der oberflächlichen Schicht vor allem in den Zellkernen zu finden. Zu erkennen ist die aufgrund der katabolen Prozesse der OA veränderte Oberflächenstruktur.

4 Diskussion

Osteoarthrose ist eine weltweit weit verbreitete, chronische Gelenkerkrankung, die vor allem ältere Menschen betrifft. Die Erkrankung führt durch katabole Prozesse im Knorpelgewebe zu Schmerzen und Verlust der Beweglichkeit. Nach anfänglicher Behandlung mit Analgetika ist im späteren Stadium häufig eine operative Therapie in Form einer Gelenkprothese die einzige Option. Das körpereigene Ersatzgewebe enthält deutlich weniger COL2 als gesundes Gewebe und zeigt keine physiologische Proteinzusammensetzung und Funktionsfähigkeit. CPCs, lokale Progenitorzellen, die durch eine mögliche Manipulation regulativer Transkriptionsfaktoren (SOX9, RUNX2) über ein erhöhtes chondrogenes Potenzial verfügen und mehr COL2 synthetisieren, könnten in der Zelltherapie gegen OA eingesetzt werden. Da eine direkte Manipulation dieser Transkriptionsfaktoren viele Nebenwirkungen hat, bietet sich eine Manipulation von Kofaktoren an.

Das ubiquitär vorkommende Protein YWHAE wurde in CPC-Kulturen nachgewiesen und dort als Interaktionspartner von SOX9 identifiziert (Cingöz 2015). Darüber hinaus führt YWHAE durch die Bindung an CD13 auf der Membran von Chondrozyten zur Freisetzung von katabolen Faktoren wie MMP-3 und MMP-13 (Priam et al. 2013; Nefla et al. 2015). CD13 wurde auch an der Membran von CPCs identifiziert (Koelling et al. 2009). Unter anderem deshalb wurde YWHAE als potenziell relevantes Protein im Stoffwechsel der CPCs eingestuft. Allerdings muss bei den Überlegungen berücksichtigt werden, dass es sich bei CPCs um einen anderen Zelltyp als bei Chondrozyten handelt und so nicht sicher davon ausgegangen werden kann, dass dieselben YWHAE-induzierten Effekte eintreten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Proteins YWHAE im Stoffwechsel der CPCs untersucht und hier vor allem sein Einfluss auf das chondrogene Potenzial der CPCs. Da YWHAE in Chondrozyten die Chondrogenität negativ beeinträchtigt, wurde per CRISPR/Cas9-Methode ein Knockout durchgeführt, um die Chondrogenität der CPCs zu erhöhen. Der Versuch, einen homozygoten Knockout herzustellen, schlug fehl. Die Auswirkungen des heterozygoten Knockouts ($YWHAE^{+/-}$) wurden in zweidimensional in Flaschen und in dreidimensional in Alginat kultivierten CPCs untersucht.

In zweidimensional kultivierten CPCs wurden per qPCR und Western Blot die Protein- und mRNA-Level von wichtigen Regulatoren (SOX9, RUNX2) ermittelt. Außerdem wurden die Zellen in ihrer Teilungs- und Migrationsfähigkeit beurteilt. Im Falle des 3D-Versuches wurden per qPCR und Western Blot neben den genannten Regulatoren auch Änderungen der Menge an ECM-Bestandteilen (COL1, COL2, ACAN) bewertet. Histolo-

gische Schnitte der Alginatkugeln mit den darin enthaltenen CPCs wurden mit Antikörpern inkubiert und fotografiert. Dadurch konnten weitere Rückschlüsse auf die Proteinmengen gezogen werden. Außerdem wurden Knorpelproben mit YWHAE-Antikörper gefärbt, um das Vorkommen in vivo zu untersuchen.

4.1 YWHAE im Knorpel

Um zu bestätigen, dass YWHAE im Knorpel vorkommt, wurden Knorpelschnitte angefertigt. Diese mit YWHAE-AK gefärbten Knorpelschnitte erlauben einen Vergleich zwischen gesundem und osteoarthritischem Knorpel (Kap. 3.5). Da beide Proben von demselben Patienten stammen, kann davon ausgegangen werden, dass sich die Bedingungen ausschließlich durch die OA verändert haben. Offenbar befindet sich auch bei OA viel YWHAE in den Zellkernen. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung, dass bei einer Kompression des Gewebes bei OA YWHAE freigesetzt wird (Priam et al. 2013). Auch in diesem Fall könnte durch die beschädigte Oberfläche des Knorpels mehr Druck auf das Gewebe ausgeübt werden und somit vielleicht im späteren Verlauf YWHAE freigesetzt werden. Die Schnitte sind ein weiterer Hinweis darauf, dass YWHAE im Fortschreiten der OA eine Rolle spielt.

4.2 Homozygoter YWHAE-Knockout

Um den Einfluss von YWHAE auf CPCs zu erforschen, war geplant, einen homozygoten KO des YWHAE-codierenden Gens in CPCs durchzuführen. So hätten die Auswirkungen eines vollständigen Fehlens des Proteins beurteilt werden können. Dazu bietet sich das CRISPR/Cas9-Verfahren an, mit dem ein sequenziertes Zielgen schnell und effizient entfernt werden kann (Jinek et al. 2012). In einem KO-Screening wurde im Anschluss allerdings in allen Zellkulturen die YWHAE codierende DNA-Sequenz identifiziert. Zusätzlich wurde YWHAE in einer Zelllinie per Western Blot nachgewiesen (Kap. 3.1). Wie schon bei zwei früheren Experimenten der Arbeitsgruppe ist es also nicht gelungen, einen homozygoten YWHAE-KO in CPCs herzustellen.

Möglicherweise sind CPCs ohne YWHAE nicht in vitro kultivierbar. Es wäre denkbar, dass regulative Mechanismen in CPCs einen homozygoten Knockout verhindern. Da sich YWHAE in nahezu allen Geweben nachweisen lässt (Celis et al. 1990), liegt unter Einbeziehung der Ergebnisse jedoch die Vermutung nahe, dass YWHAE ein essenzielles Gen in CPCs ist, so dass CPCs ohne das Protein nicht überleben können. YWHAE ist wichtig für intrazelluläre Prozesse wie den Zellzyklus, die Zelladhäsion, die Signaltransduktion und die

Apoptose (Fu et al. 2000). Eine der Ursachen für den nicht möglichen homozygoten KO in CPCs könnte die Funktion von YWHAE im Mechanismus der Apoptose sein. YWHAE inhibiert das die Apoptose fördernde BAD-Protein (Zha et al. 1996). Außerdem beeinflusst YWHAE durch Aktivierung des *insulin-like growth factor I receptor* (IGFIR; Craparo et al. 1997) den *insulin-like growth factor I* (IGFI)-Signalweg, der ebenfalls bei der Apoptose (Zha et al. 1996) und zusätzlich im Zellzyklus (LeRoith et al. 1995) von Bedeutung ist. YWHAE interagiert darüber hinaus mit der DNA-Topoisomerase IIα, die an der Zellproliferation und dem Überleben von Zellen beteiligt ist (Kurz et al. 2000).

Diese und andere (evtl. auch noch nicht entdeckte) Faktoren könnten dazu führen, dass CPCs mit einem homozygoten YWHAE-Knockout in Kultur entweder nicht wachsen oder nach kurzer Zeit sterben. Hier sind weitere Untersuchungen nötig, um die Abhängigkeit der CPCs von YWHAE zu bestätigen.

4.3 Einfluss des heterozygoten YWHAE-Knockouts auf die CPCs

Der $YWHAE^{+/-}$-KO konnte per Sequenzierung verifiziert werden. Die Reduktion des Proteins innerhalb der Zelllinie wurde auf Proteinebene detektiert (Kap. 3.3.2, Kap. 3.4.3) und daraus resultierende Auswirkungen auf mRNA- und Proteinlevel relevanter Proteine des chondrogenen Stoffwechsels wurden erforscht.

4.3.1 Einfluss auf die Regulatoren SOX9 und RUNX2

Der Einfluss des $YWHAE^{+/-}$-KOs auf die regulatorisch agierenden Proteine SOX9 und RUNX2 wurde sowohl bei CPCs der 2D- als auch der 3D-Kultur auf mRNA- und Proteinlevel getestet.

Zunächst wurden die mRNA-Level von YWHAE, RUNX2 und SOX9 der in 2D-Kultur angesetzten Zellen der $YWHAE^{+/-}$-Probe mit denen einer Kontrollgruppe verglichen. Hier fällt eine signifikant erhöhte mRNA-Menge aller drei untersuchten mRNAs auf (Kap. 3.3.1). Erwartet worden war bei YWHAE eine Reduktion, da durch den heterozygoten Knockout die Ziel-DNA aus einem Chromosom entfernt wurde. Allerdings kann ein solcher Knockout auch durch verschiedene Regulationsmechanismen kompensiert werden (El-Brolosy und Stainier 2017). Trotzdem scheint eine Erhöhung der mRNA trotz des heterozygoten Knockouts unwahrscheinlich. Es fiel auf, dass der ct-Wert des Housekeeping-Gens β2M der $YWHAE^{+/-}$-Probe leicht höher war als der der Kontrolle. Um einen Fehler bei der Normalisierung auszuschließen, wurden zusätzlich zu β2M weitere Housekeeping-Gene getestet. Dabei zeigten sechs der sieben zusätzlich getesteten Housekeeping-Gene ein

ähnliches Ergebnis. Da diese Gene viele unterschiedliche Prozesse regulieren bzw. beeinflussen, ist es unwahrscheinlich, dass alle von YWHAE reguliert werden. Beispielsweise spielt die Glycerinaldehy-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) in der Glykolyse eine Rolle, während es sich bei dem Protein *60s riobosomal protein L13* (RPL13) um ein ribosomales Protein handelt. Die *peptidylprolyl isomerase* A (PPIA) hingegen faltet Proteine. Somit ist eher davon auszugehen, dass es bei der Normalisierung nicht zu einem Fehler kam. Es konnte nicht geklärt werden, warum trotz des heterozygoten KOs mehr YWHAE-mRNA vorhanden ist.

Der 2D-Western Blot (Kap. 3.3.2) zeigt im Hinblick auf die Menge des Proteins YWHAE das erwartete Ergebnis der Reduktion. Die Probe enthält nur noch ca. 30% der Menge des Proteins im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Änderung ist signifikant und verifiziert somit das Vorliegen eines heterozygoten Knockouts. Die Vermutung, dass im Rahmen der 2D-Versuche die Menge an SOX9 durch die YWHAE-Reduktion erhöht wird, hat sich nicht in statistisch signifikanter Höhe bestätigt. Gleichzeitig ist auch die Menge an RUNX2 nicht statistisch signifikant reduziert. Vermutet worden war eine Reduktion durch eine mögliche Interaktion von RUNX2 mit YWHAE bzw. bei einer signifikanten SOX9-Reduktion aufgrund des RUNX2/SOX9-Antagonismus. Erkennbar sind zumindest Tendenzen in diese Richtung.

Die qPCR der in Alginatkultur angesetzten CPCs lieferte unter anderem Ergebnisse für YWHAE, SOX9, RUNX2. Von allen liegt in den $YWHAE^{+/-}$-CPCs der 3D-Kultur signifikant weniger mRNA als in der Kontrollprobe vor (Kap. 3.4.2). Da sowohl die Kontrolle als auch die $YWHAE^{+/-}$-Probe für 28 Tage in Alginat kultiviert wurden, kann dieser Unterschied nicht im Zusammenhang mit der Alginatkultur stehen. Allerdings könnte der $YWHAE^{+/-}$-KO im 3D-Modell natürlich andere Auswirkungen auf die CPCs haben als im 2D-Modell. Hier sei erwähnt, dass in Alginat kultivierte CPCs sich nicht teilen und in der G0-Phase verweilen.

Die Ergebnisse des Western Blots der 3D-Zellen sind im Rahmen der regulatorischen Proteine vielversprechend (Kap. 3.4.3). Die signifikante Reduktion von YWHAE hat eindeutig Einfluss auf die Menge der Proteine SOX9 und RUNX2. SOX9 ist im Vergleich zur Kontrolle signifikant, um das 1,5-Fache, erhöht. Die bereits bekannte Interaktion zwischen YWHAE und SOX9 (Cingöz 2015) stellt sich also in CPCs als Inhibition da. Eine Reduktion von YWHAE führt zu einer erhöhten Synthese von SOX9. Der Signalweg bzw. die Form der Interaktion und mögliche Bindungsstellen konnten hier nicht untersucht werden und wären mögliche Inhalte weiterer Forschungsprojekte. RUNX2 hingegen zeigt eine

signifikante Reduktion auf lediglich 20% der Proteinmenge der Kontrollgruppe. Dieser Effekt kommt wahrscheinlich durch den Antagonismus zwischen SOX9 und RUNX2 zustande. Eine Steigerung der SOX9-Menge führt in CPCs zur Reduktion der RUNX2-Menge (Koelling et al. 2009). Dennoch ist ein zusätzlicher Einfluss von YWHAE auf RUNX2 oder seine Regulatoren denkbar.

Gegenstand weiterer Untersuchungen könnte sein, warum sich sowohl die qPCR- als auch die Western-Blot-Ergebnisse des 2D- von denen des 3D-Modells unterscheiden. Während im 2D-Versuch alle untersuchten mRNAs stärker synthetisiert wurden, zeigte sich im 3D-Versuch genau das Gegenteil. Die signifikanten Veränderungen der Proteinlevel von RUNX2 und SOX9 konnten lediglich im 3D-Versuch detektiert werden. Die CPCs befinden sich in den Modellen in stark unterschiedlichen Umgebungen. Im 2D-Modell wachsen sie in Standardmedium flach auf der Plastikoberfläche der Zellflasche. Sie teilen sich und bleiben mit den anderen CPCs in direktem Kontakt. Im 3D-Modell hingegen sind die CPCs räumlich durch das Alginat getrennt, teilen sich nicht und befinden sich in einem speziellen Medium. Dadurch stehen die CPCs unter deutlich unterschiedlichen externen Einflüssen, die Auswirkungen auf Transkription und Translation haben. Die fehlende Zellteilung und dadurch bedingte Persistenz der in Alginat kultivierten CPCs in der G0-Phase des Zellzyklus stellt einen möglicherweise entscheidenden Unterschied dar. Eine Reduktion von YWHAE könnte in Abhängigkeit vom Zustand der jeweiligen CPCs unterschiedliche Auswirkungen haben. YWHAE interagiert einerseits mit vielen zellzyklusabhängigen Faktoren und wird andererseits auch von diesen beeinflusst (Fu et al. 2000; Tzivion und Avruch 2002). Zum Beispiel interagiert YWHAE im Zytoplasma mit dem p27-Protein (Fujita et al. 2002), einem Inhibitor des Zellzyklus. Die Verfügbarkeit von p27 schwankt während der unterschiedlichen Phasen dieses Zellzyklus (Soos et al. 1996). Wenn die Zelle sich in der G0-Phase befindet, bindet viel p27 im Zellkern an *cyclin dependent kinases* (Deng et al. 2004). Somit könnte vermutet werden, dass eine Reduktion von YWHAE in den verschiedenen Zellzyklusphasen verschiedene Auswirkungen hat, da unterschiedliche Mengen von Proteinen um die Interaktion mit YWHAE konkurrieren. Außerdem wurde nachgewiesen, dass RUNX2 in Prä-Osteoblasten zellzyklusabhängig exprimiert wird (Pratap et al. 2003; Galindo et al. 2005). Eine ähnliche Regulation ist auch in CPCs nicht auszuschließen.

Grundsätzliche Überlegungen zur fehlenden Korrelation zwischen den qPCR- und Western-Blot-Ergebnissen werden in Kapitel 4.3.3 angestellt.

4.3.2 Chondrogenes Potenzial der CPCs

Die Manipulation der Regulatoren SOX9 und RUNX2 durch die YWHAE-Reduktion deutet auf ein besseres chondrogenes Potenzial der YWHAE$^{+/-}$-CPCs hin. Weitere Hinweise auf dieses chondrogene Potenzial der CPCs konnten durch die Kontrolle der Synthesemenge der ECM-Bestandteile COL1, COL2 und ACAN gefunden werden. Die ECM von gesundem Knorpelgewebe ist vor allem von COL2 geprägt, enthält viel ACAN und kaum COL1 (Kuettner 1992). Eine hohe COL1-Konzentration hingegen ist charakteristisch für osteoarthritisches Knorpelgewebe (Miosge et al. 1998; Miosge et al. 2004).

Die mRNA-Mengen von COL1, COL2 und ACAN der YWHAE$^{+/-}$-CPCs im 3D-Modell zeigen eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrolle (Kap. 3.4.2). Hier war eine erste Tendenz zu erkennen, dass evtl. keine erhöhte Synthese von COL2 und ACAN stattgefunden hat. Allerdings ist eine geringere mRNA-Menge kein verlässlicher Indikator für eine niedrigere Proteinsynthese. Zum Beispiel konnte eine Erhöhung des SOX9-Proteinlevels trotz signifikant reduzierter mRNA festgestellt werden. Auf die fehlende Korrelation der qPCR- und Western-Blot-Ergebnisse wird in Kapitel 4.3.3 eingegangen.

Im Western Blot der in Alginat kultivierten YWHAE$^{+/-}$-CPCs konnte weder die erhoffte signifikante Erhöhung des Proteinlevels von COL2 noch die erhoffte signifikante Reduktion des Proteinlevels von COL1 im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden (Kap. 3.4.3). Die mikroskopischen Bilder der histologischen Schnitte unterstützen die Ergebnisse (Kap. 3.4.1). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein heterozygoter Knockout von YWHAE nicht in der Lage ist, die Chondrogenität der CPCs positiv zu beeinflussen. Denn obwohl regulatorisch ein positiver Effekt zu erkennen ist, synthetisieren die YWHAE$^{+/-}$-CPCs keine erhöhte Menge an chondrogenen Markern. Da von ACAN keine Western-Blot-Ergebnisse vorliegen, kann keine abschließende Aussage zur Synthese dieses Proteins getroffen werden.

Es stellt sich nun die Frage, warum trotz der erwiesenen Korrelation zwischen SOX9 und COL2 (Bell et al. 1997; Lefebvre et al. 1997) mit der signifikanten Erhöhung von SOX9 keine signifikante Erhöhung von COL2 einhergeht. Die Korrelation zwischen SOX9- und COL2-Mengen konnte auch in CPCs in 3D-Kultur nachgewiesen werden (Koelling et al. 2009), allerdings wurde in dieser Studie das SOX9- bzw. RUNX2-Level direkt per Knockdown beeinflusst. Ein ähnlich ausbleibender Effekt einer Manipulation von SOX9 auf die Chondrogenität der CPCs zeigte sich in einer anderen Untersuchung der Arbeitsgruppe. Die Stimulation von TGF-β (*tissue growth factor β*) - und EGF (*epidermal growth factor*) -Signalwegen in CPCs führte zu einer gesteigerten SOX9-Produktion und hatte eine positive

Auswirkung auf die Menge an COL2-mRNA, steigerte allerdings auch die COL1- und COL10-mRNA-Synthese (Janssen et al. 2018).

Die Interaktion zwischen SOX9 und COL2 wurde bis jetzt vor allem in Chondrozyten untersucht. Dort wurden verschiedene Prozesse entdeckt, die eine direkte positive Korrelation zwischen SOX9 und COL2 in Frage stellen. SOX9 hat verschiedene Auswirkungen auf COL2. So konnte nachgewiesen werden, dass eine starke Überexpression in Chondrozyten über eine Bindung von SOX9 an einen Promotor zur Inhibition der COL2-Synthese führt. Zusätzlich spielen In-vitro-Faktoren wie Differenzierung und Passage der Zellen bei der Interaktion von SOX9 und COL2 eine Rolle (Kypriotou et al. 2003). Obwohl durch den heterozygoten YWHAE-KO nur eine 1,5-fache Überexpression von SOX9 bewirkt wurde, sollten diese möglichen Interaktionswege von SOX9 mit COL2 auch als Ursache für die nicht erhöhte Produktion von COL2 in YWHAE$^{+/-}$-CPCs in Betracht gezogen werden. Die Erhöhung des chondrogenen Potenzials kann außerdem mit zwei weiteren SOX-Proteinen (SOX5, SOX6) in Zusammenhang stehen. Die Interaktion von SOX9 mit SOX5 und SOX6 führt in Chondrozyten und undifferenzierten mesenchymalen Zellen zur stärkeren Aktivierung von COL2 (Lefebvre et al. 1998; Stokes et al. 2001). Ein möglicher Einfluss von YWHAE auf diese beiden Kofaktoren könnte also die Chondrogenität der CPCs reduzieren. Zum Nachweis dieses Einflusses sollte die Rolle von SOX5 und SOX6 in CPCs sowie der Interaktion zwischen diesen beiden Faktoren und YWHAE Gegenstand von weiteren Untersuchungen sein.

Die signifikante Reduktion von RUNX2 hat anscheinend auch keine signifikanten Auswirkungen auf die Synthese der getesteten chondrogenen Marker in den YWHAE$^{+/-}$-CPCs, obwohl in verschiedenen Studien belegt wurde, dass RUNX2 einerseits die Freisetzung von katabolen Faktoren erhöht (Wang et al. 2004; Kamekura et al. 2006) und andererseits zur osteogenen Differenzierung von mesenchymalen Zellen führt (Ducy et al. 1997). Allerdings steht die osteogene Differenzierung nicht in direkter Korrelation zur Menge an RUNX2, sondern zum Anteil an aktiviertem RUNX2 (Shui et al. 2003). Eine chondrogene Differenzierung von Stammzellen ist ohne RUNX2 jedoch auch nicht möglich (Chen et al. 2011). Somit könnte eine zu starke Reduktion von RUNX2 wiederum negative Auswirkungen auf das chondrogene Potenzial haben. Bei den genannten Studien handelt es sich allerdings um Untersuchungen in Chondrozyten oder mesenchymalen Stammzellen (MSC) und nicht in CPCs. Gegenstand weiterer Untersuchungen sollten die genaue Wirkungsweise von RUNX2 in CPCs sowie eine möglicherweise direkte Interaktion zwischen YWHAE und RUNX2 bzw. einem Kofaktor sein.

In den Western Blots dieser Arbeit wurde lediglich die Menge von RUNX2 und SOX9 detektiert und nicht, ob diese Proteine aktiviert bzw. phosphoryliert vorliegen. Es wäre also denkbar, dass in YWHAE$^{+/-}$-CPCs lediglich mehr SOX9 und RUNX2 synthetisiert, jedoch nicht aktiviert wird. Somit hätte die erhöhte Proteinkonzentration möglicherweise keinen bzw. einen geringen Einfluss auf die Synthese der chondrogenen Marker. Für SOX9 und RUNX2 wurde beispielsweise eine Aktivierung durch Phosphorylierung nachgewiesen (Huang et al. 2000; Shui et al. 2003). Weitere Untersuchungen sollten sich mit der Relevanz und dem Vorliegen einer solchen Phosphorylierung beschäftigen.

Im Gegensatz zur direkten Manipulation von SOX9 oder RUNX2 hat die Beeinflussung eines Kofaktors wie z. B. von YWHAE wahrscheinlich noch andere, derzeit nicht bekannte Effekte auf die CPCs. Da CPCs erst seit Kurzem Gegenstand der Forschung sind, wurde auch der Einfluss von YWHAE auf CPCs noch nicht untersucht. Die meisten Studien konzentrierten sich bisher auf den Einfluss auf Chondrozyten (Priam et al. 2013; Nefla et al. 2015). Gegenstand weiterer Untersuchungen sollte sein, ob in CPCs wie in Chondrozyten eine durch YWHAE hervorgerufene Aktivierung von MMPs stattfindet. In Chondrozyten findet diese mithilfe des CD13-Rezeptors, der auch an der Membran von CPC zu finden ist (Koelling et al. 2009), statt (Nefla et al. 2015). Bei Verletzung des Knorpelgewebes wurden CPCs mit, im Vergleich zu Chondrozyten, erhöhtem Level an Metalloproteasen (z. B. MMP3, MMP13, ADAMTS4) nachgewiesen (Seol et al. 2012). Es ist allerdings nicht geklärt, wie dieses Level zustande kommt. Sollte ein über YWHAE vermittelter Mechanismus auch bei CPCs auftreten, stellt sich die Frage, wieso der vorliegende YWHAE$^{+/-}$-KO nicht durch eine geringere Aktivierung von MMPs zu einem höheren COL2-Level führt. Im Rahmen des 3D-Modells könnten sich Unterschiede des Abbaus von COL2 durch MMPs in den Western-Blot-Ergebnissen zeigen.

Da 14-3-3-Proteine auf verschiedene Signalwege wirken, könnte einer dieser Signalwege Auswirkungen auf die Chondrogenität der CPCs haben. Als Ursache denkbar wäre die Interaktion zwischen YWHAE und IGFIR. Ist dieser Rezeptor phosphoryliert, bindet YWHAE an ihn und führt in der Folge zu einer gesteigerten Aktivierung (Craparo et al. 1997). IGFI erhöht die Chondrogenität von Chondrozyten, indem er die Produktion von COL2 und Proteoglykanen (z. B. ACAN) erhöht und die von COL1 senkt (Madry et al. 2001; Fortier et al. 2002). Demzufolge ist denkbar, dass die Reduktion von YWHAE die CPCs negativ in ihrer Chondrogenität beeinflusst, da die Aktivität des IGFIR reduziert und somit die Sensitivität für IGFI erniedrigt wird. Um diese Hypothese zu belegen, wären weitere Versuche nötig, die diese Effekte auch bei CPCs nachweisen.

4.3.3 Korrelation zwischen mRNA- und Proteinmenge

Auffällig sind die sowohl im 2D- als auch im 3D-Modell nicht korrelierenden mRNA- und Proteinmengen. Weder ließ sich von einer erhöhten mRNA-Menge auf eine gesteigerte Proteinsynthese noch von einer erniedrigten mRNA-Menge auf eine reduzierte Proteinsynthese schließen. Zu beachten ist, dass hier viele verschiedene Faktoren (regulatorische RNA und Proteine, Codon Bias, Menge an Ribosomen, Protein Halbwertszeit) beteiligt sind und sicher nicht immer von einer direkten Korrelation ausgegangen werden kann (Maier et al. 2009). Außerdem spielen Faktoren wie der Zellzyklus und die Lokalisation der mRNA eine Rolle (Greenbaum et al. 2003).

Möglich wäre, dass die Zellen in einer 2D-Kultur, in der sie nicht lange kultiviert werden, versuchen, mit gesteigerter mRNA-Produktion auf die Deletion zu reagieren. Dieser Vorgang ließe sich möglicherweise durch die genetische Kompensation erklären, die von vielen verschiedenen Mechanismen wie DNA-Reparatur oder mRNA gesteuerten Prozessen abhängig ist. Nicht nur auf mRNA-, sondern sogar auf Proteinlevel können so Knockouts von Gensequenzen kompensiert werden (El-Brolosy und Stainier 2017). Dass das länger angesetzte 3D-Modell insgesamt eine geringere mRNA-Produktion zur Folge hatte, könnte dadurch bedingt sein, dass die vielen unterschiedlichen Funktionen von YWHAE durch den Knockout beeinträchtigt werden. Innerhalb des 3D-Modells verweilen die Zellen in der G0-Phase und verhalten sich somit anders als die teilungsaktiven Zellen in der 2D-Kultur. Hier könnte beispielsweise die bereits erwähnte Interaktion zwischen YWHAE und p27 von Bedeutung sein.

4.3.4 Teilungsrate und Migrationsfähigkeit der CPCs

In weiteren Experimenten wurden die Teilungsrate und das Migrationsverhalten von CPCs untersucht. Es ist für die therapeutische Nutzung der Zellen relevant, dass sie in der Lage sind, zu migrieren, um eine gleichmäßig verteilte ECM im Knorpel zu bilden und zu nicht vaskularisierten Regionen mit katabolem Stoffwechsel zu gelangen (Schminke und Miosge 2014). Aufgrund des Einflusses von YWHAE auf das Heat Shock Protein B6 (Sluchanko et al. 2013) und auf Vimentin (Tzivion et al. 2000), die an der Regulation bzw. dem Aufbau des Zytoskeletts beteiligt sind, liegt ein Einfluss des YWHAE$^{+/-}$-KOs auf die Migrationsfähigkeit nahe.

Zuerst wurde die Teilungsrate der CPCs untersucht, da ein starker Unterschied zwischen den Teilungsraten der Kontrolle und der YWHAE$^{+/-}$-Probe zu falscher Interpretation des Migrationsverhaltens führen könnte. Zellen, die sich deutlich häufiger teilen, könnten als

besonders bewegungsaktiv beurteilt werden. Die Wachstumskurve zeigt eine vor allem nach dem ersten Tag stärkere Teilungsrate der YWHAE$^{+/}$-CPCs (Kap. 3.3.3). Diese könnte wiederum auf den Einfluss von YWHAE auf den IGFI-Rezeptor (Craparo et al. 1997) zurückzuführen sein. IGFI wird mit einer stärkeren Aktivierung des Zellzyklus in Verbindung gebracht (LeRoith et al. 1995). Außerdem inhibiert YWHAE Cdc25C (*cell divison cycle phosphatase 25C*) eine Phosphatase, die wichtig für den Übergang der Zelle in die Mitose ist (Dalal et al. 2004). Auch Raf1, ein weiteres Protein, das im Zellzyklus eine Rolle spielt, wird von 14-3-3-Proteinen beeinflusst (Thorson et al. 1998). Somit könnte eine YWHAE-Reduktion bewirken, dass die Mitose häufiger stattfindet.

Die Migrationsfähigkeit der YWHAE$^{+/-}$-CPCs wurde mit einem Scratch Assay und einem Migration Assay untersucht. Um die Teilungsrate als Faktor auszuschließen, wurden die Versuche höchstens über 24 Stunden beobachtet. Die Ergebnisse des Scratch Assay zeigen ein stärkeres Migrationspotenzial der YWHAE$^{+/-}$-CPCs in vitro (Kap. 3.3.4). Allerdings handelt es sich hierbei um ein 2D-Modell. Die stärkere Neigung zur Migration könnte z. B. durch Veränderung des Zytoskeletts verursacht sein, da YWHAE unter anderem mit Vimentin, einem Bestandteil des Zytoskeletts interagiert (Tzivion et al. 2000). Das Migration Assay, das die Migration durch eine semipermeable Membran beurteilt, zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Migration beider CPC-Kulturen (Kap. 3.3.5). Das Ergebnis belegt aber, dass die CPCs trotz der Manipulation des Genoms in der Lage sind, zu migrieren, und dies sogar durch eine Membran. Allerdings kann die Aufhebung von Zelladhäsion für die Migration nötig sein (Theveneau und Mayor 2013). Die Zelladhäsion hat Einfluss auf 14-3-3 Proteine (Garcia-Guzman et al. 1999). Somit könnte eine Migration YWHAE$^{+/-}$-CPCs anders als unveränderte CPCs beeinflussen. Das sog. *Homing*, also die Migration der therapeutisch verwendeten Zellen zum erkrankten Gewebe, wurde zum Beispiel an MSCs untersucht. Einfluss darauf haben unter anderem das Alter und die Passage der Zellen, die Kulturbedingungen und die Methode des Einbringens (Sohni und Verfaillie 2013). Es wäre naheliegend, dass diese Faktoren auch CPCs beeinflussen. Bei Verletzungen des Knorpels migrieren CPCs, gesteuert von Chemotaxis, zu den verletzen Arealen und bilden dort Ersatzgewebe (Seol et al. 2012). CPCs im osteoarthritischen Gewebe sollten noch genauer auf ihre Migrationsfähigkeit und auf die dafür relevanten Faktoren untersucht werden. Denn auch wenn der YWHAE$^{+/-}$-KO die Migration in vitro nicht zu beeinflussen scheint, könnte das Homing in vivo beeinflusst sein.

5 Zusammenfassung

Die Aufgabenstellung bestand darin, den Einfluss von YWHAE auf das chondrogene Potenzial von CPCs zu untersuchen. Kann das chondrogene Potenzial erhöht werden, stellen CPCs im Falle einer OA eine Option zur Zelltherapie dar. Zuerst wurde versucht, einen homozygoten YWHAE-Knockout in CPCs zu erreichen. Dieser KO war hier jedoch mit der CRISPR/Cas9-Methode nicht zu erzielen. Es bleibt offen, ob regulierende Mechanismen in CPCs einen KO verhindern oder ob CPCs ohne YWHAE nicht überlebensfähig sind. Ein heterozygoter YWHAE-Knockout in CPCS hingegen ist möglich. Aus diesem resultiert eine Reduktion des Proteins YWHAE auf ca. ein Viertel der Menge einer Kontrollprobe. Diese Reduktion beeinflusst die chondrogenen Regulatoren SOX9 und RUNX2 in ihrer Expression. Werden YWHAE$^{+/-}$-CPCs in Alginat kultiviert, synthetisieren sie signifikant mehr SOX9 und weniger RUNX2 als unveränderte CPCs. Daraus lässt sich schließen, dass YWHAE einen negativen Einfluss auf die Synthese des chondrogenen Regulators SOX9 und einen positiven Einfluss auf die Synthese des Regulators RUNX2 in CPC-Kulturen hat. Trotz dieser durch den heterozygoten Knockout hervorgerufenen, vielversprechenden Manipulation der Regulatoren synthetisieren die YWHAE$^{+/-}$-CPCs keine erhöhte Anzahl an chondrogenen Markern wie etwa COL2. Die Menge des osteogenen Markers COL1 wurde nicht gesenkt. Die vorliegenden qPCR-Ergebnisse für ACAN zeigen eine signifikante Reduktion der mRNA-Menge und sind somit ebenfalls nicht vielversprechend. Zusätzlich zeigen histologische Bilder der Alginatkugeln keine auffälligen Veränderungen der chondrogenen Marker. Eine direkte Reduktion von YWHAE scheint also keine vielversprechende Option zur Verbesserung der Chondrogenität von CPCs zu sein.

Weitere Studien wären nötig, um die zusätzlichen Effekte von YWHAE auf CPCs zu erforschen, die möglicherweise Einfluss auf die Synthese der ECM haben. Auch die Interaktion von SOX9 sowie RUNX2 und YWHAE sollte präziser untersucht werden. Neue Erkenntnisse könnten z. B. genutzt werden, um nur die Bindungsstellen von YWHAE an diese beiden Regulatoren zu blocken, sodass die anderen Wirkungen von YWHAE unbeeinflusst blieben. Wichtig wäre auch die Untersuchung der Interaktion der Regulatoren SOX9 und RUNX2 mit COL2, um verstehen zu können, warum hier keine Auswirkungen sichtbar sind. Sollte mithilfe der Beeinflussung der CPCs durch eine Manipulation von YWHAE oder einem anderen Faktor die Chondrogenität der CPCs erhöht werden können, müssten zusätzliche Versuche neben der Detektion von chondrogenen Markern durchgeführt werden, um eine Eignung der veränderten CPCs als Therapieoption zu belegen.

6 Literaturverzeichnis

Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M (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

Bell DM, Leung KKH, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, Sham HM, Koopman P, Tam PPL, Cheah KSE (1997): SOX9 directly regulates the type-ll collagen gene. Nat Genet 16, 174–178

Bendjaballah M, Shirazi-Adl A, Zukor D (1995): Biomechanics of the human knee joint in compression: reconstruction, mesh generation and finite element analysis. Knee 2, 69–79

Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrugghe B (1999): Sox9 is required for cartilage formation. Nat Genet 22, 85–89

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

Buckwalter J, Mow V, Ratcliffe A (1994): Restoration of Injured or Degenerated Articular Cartilage. J Am Acad Orthop Surg 2, 192–201

Celis JE, Gesser B, Rasmussen HH, Madsen P, Leffers H, Dejgaard K, Honore B, Olsen E, Ratz G, Lauridsen JB (1990): Comprehensive two-dimensional gel protein databases offer a global approach to the analysis of human cells: the transformed amnion cells (AMA) master database and its link to genome DNA sequence data. Electrophoresis 11, 989–1071

Chen H, Ghori-Javed FY, Rashid H, Serra R, Gutierrez SE, Javed A (2011): Chondrocyte-Specific Regulatory Activity of Runx2 Is Essential for Survival and Skeletal Development. Cells Tissues Organs 194, 161–165

Cingöz G (2015): Identifizierung neuer Coregulatoren von SOX9 und RUNX2 in chondrogenen Progenitorzellen in der Osteoarthrose. Med. Diss. Göttingen 2015

Conaghan PG, Kloppenburg M, Schett G, Bijlsma JWJ (2014): Osteoarthritis research priorities: a report from a EULAR ad hoc expert committee. Ann Rheum Dis 73, 1442–1445

Craparo A, Freund R, Gustafson TA (1997): 14-3-3 (ϵ) Interacts with the Insulin-like Growth Factor I Receptor and Insulin Receptor Substrate I in a Phosphoserine-dependent Manner. J Biol Chem 272, 11663–11669

Cucchiarini M, Thurn T, Weimer A, Kohn D, Terwilliger EF, Madry H (2006): Restoration of the extracellular matrix in human osteoarthritic articular cartilage by overexpression of the transcription factor SOX9. Arthritis Rheum 56, 158–167

Dalal SN, Yaffe MB, DeCaprio JA (2004): 14-3-3 Family Members Act Coordinately to Regulate Mitotic Progression. Cell Cycle 3, 670–675

Deng X, Mercer SE, Shah S, Ewton DZ, Friedman E (2004): The Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p27Kip1 Is Stabilized in G0 by Mirk/dyrk1B Kinase. J Biol Chem 279, 22498–22504

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997): Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. Cell 89, 747–754

El-Brolosy MA, Stainier DYR (2017): Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. PLoS Genet 13, e1006780

Eyre DR (2002): Articular cartilage and changes in Arthritis: Collagen of articular cartilage. Arthritis Res 4, 30–35

Eyre DR, Dickson IR, Van Ness K (1988): Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. Age-related changes in the content of mature hydroxypyridinium residues. Biochem J 252, 495–500

Fawns HT, Landells JW (1953): Histochemical Studies of Rheumatic Conditions: I. Observations on the Fine Structures of the Matrix of Normal Bone and Cartilage. Ann Rheum Dis 12, 105–113

Ford J, al-Khodairy F, Fotou E, Sheldrick K, Griffiths D, Carr A (1994): 14-3-3 protein homologs required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. Science 265, 533–535

Fortier LA, Mohammed HO, Lust G, Nixon AJ (2002): Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. J Bone Joint Surg Br 84-B, 276–288

Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanović M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN (1994): Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. Nature 372, 525–530

Fox AJS, Bedi A, Rodeo SA (2009): The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. Sports Health 1, 461–468

Fu H, Subramanian RR, Masters SC (2000): 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. Annu Rev Pharmacol Toxicol 40, 617–647

Fuchs J, Kuhnert R, Scheidt-Nave C (2017): 12-Monats-Prävalenz von Arthrose in Deutschland. Journal of Health Monitoring 2, 55–60

Fujita N, Sato S, Katayama K, Tsuruo T (2002): Akt-dependent Phosphorylation of p27Kip1 Promotes Binding to 14-3-3 and Cytoplasmic Localization. J Biol Chem 277, 28706–28713

Galindo M, Pratap J, Young DW, Hovhannisyan H, Im H-J, Choi J-Y, Lian JB, Stein JL, Stein GS, van Wijnen AJ (2005): The Bone-specific Expression of Runx2 Oscillates during the Cell Cycle to Support a G(1)-related Antiproliferative Function in Osteoblasts. J Biol Chem 280, 20274–20285

Garcia-Guzman M, Dolfi F, Russello M, Vuori K (1999): Cell Adhesion Regulates the Interaction between the Docking Protein p130Cas and the 14-3-3 Proteins. J Biol Chem 274, 5762–5768

Goldring MB, Goldring SR (2010): Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. Ann N Y Acad Sci 1192, 230–237

Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M (2003): Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. Genome Biol 4, 117

Greene GW, Banquy X, Lee DW, Lowrey DD, Yu J, Israelachvili JN (2011): Adaptive mechanically controlled lubrication mechanism found in articular joints. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 5255–5259

Hardingham TE, Muir H (1972): The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans. Biochim Biophys Acta 279, 401–405

Häuselmann HJ, Aydelotte MB, Schumacher BL, Kuettner KE, Gitelis SH, Thonar EJ-MA (1992): Synthesis and Turnover of Proteoglycans by Human and Bovine Adult Articular Chondrocytes Cultured in Alginate Beads. Matrix 12, 116–129

Häuselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, Kuettner KE, Thonar EJ (1994): Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. J Cell Sci 107, 17–27

Hedbom E, Heinegard D (1993): Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens. J Biol Chem 268, 27307–27312

Hedbom E, Antonsson P, Hjerpe A, Aeschlimann D, Paulsson M, Rosa-Pimentel E, Sommarin Y, Wendel M, Oldberg A, Heinegard D (1992): Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. J Biol Chem 267, 6132–6136

Heinegård D, Saxne T (2010): The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. Nat Rev Rheumatol 7, 50–56

Herberts CA, Kwa MS, Hermsen HP (2011): Risk factors in the development of stem cell therapy. J Transl Med 9, 29–29

Huang W, Zhou X, Lefebvre V, de Crombrugghe B (2000): Phosphorylation of SOX9 by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase A Enhances SOX9's Ability To Transactivate a Col2a1 Chondrocyte-Specific Enhancer. Mol Cell Biol 20, 4149–4158

Hunziker EB (2009): The Elusive Path to Cartilage Regeneration. Adv Mater 21, 3419–3424

Ichimura T, Isobe T, Okuyama T, Takahashi N, Araki K, Kuwano R, Takahashi Y (1988): Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. Proc Natl Acad Sci U S A 85, 7084–7088

Janssen JN, Batschkus S, Schimmel S, Bode C, Schminke B, Miosge N (2019): The Influence of TGF-β3, EGF, and BGN on SOX9 and RUNX2 Expression in Human Chondrogenic Progenitor Cells. J Histochem Cytochem, im Druck

Jenei-Lanzl Z, Grässel S, Pongratz G, Kees F, Miosge N, Angele P, Straub RH (2014): Norepinephrine Inhibition of Mesenchymal Stem Cell and Chondrogenic Progenitor Cell Chondrogenesis and Acceleration of Chondrogenic Hypertrophy. Arthritis Rheumatol 66, 2472–2481

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337, 816–821

Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K, Shimoaka T, Chikuda H, Maruyama Z, Komori T, Sato S, Takeda S, Karsenty G (2006): Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. Arthritis Rheum 54, 2462–2470

Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, Grontvedt T, Isaksen V, Ludvigsen TC, Roberts S, Solheim E, Strand T, Johansen O (2007): A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. J Bone Joint Surg Am 89, 2105–2112

Kock L, van Donkelaar CC, Ito K (2012): Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. Cell Tissue Res 347, 613–627

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

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson R., Gao YH, Inada M (1997): Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturational Arrest of Osteoblasts. Cell 89, 755–764

Kuboki T, Kanyama M, Nakanishi T, Akiyama K, Nawachi K, Yatani H, Yamashita K, Takano-Yamamoto T, Takigawa M (2003): Cbfa1/Runx2 gene expression in articular chondrocytes of the mice temporomandibular and knee joints in vivo. Arch Oral Biol 48, 519–525

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

Kurz EU, Leader KB, Kroll DJ, Clark M, Gieseler F (2000): Modulation of Human DNA Topoisomerase IIα Function by Interaction with 14-3-3ε. J Biol Chem 275, 13948–13954

Kypriotou M, Fossard-Demoor M, Chadjichristos C, Ghayor C, de Crombrugghe B, Pujol JP, Galéra P (2003): SOX9 Exerts a Bifunctional Effect on Type II Collagen Gene (COL2A1) Expression in Chondrocytes Depending on the Differentiation State. DNA Cell Biol 22, 119–129

Laemmli UK (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227, 680–685

Lefebvre V, Smits P (2005): Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. Birth Defects Res C Embryo Today 75, 200–212

Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrugghe B (1997): SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. Mol Cell Biol 17, 2336–2346

Lefebvre V, Li P, de Crombrugghe B (1998): A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. EMBO J 17, 5718–5733

LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CTJ (1995): Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. Endocr Rev 16, 143–163

Linn FC, Sokoloff L (1965): Movement and Composition of Interstitial Fluid of Cartilage. Arthritis Rheum 8, 481–494

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

Mackintosh C (2004): Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. Biochem J 381, 329–342

Madry H, Zurakowski D, Trippel S (2001): Overexpression of human insulin-like growth factor-I promotes new tissue formation in an ex vivo model of articular chondrocyte transplantation. Gene Ther 8, 1443–1449

Maier T, Güell M, Serrano L (2009): Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. FEBS Lett 583, 3966–3973

Maroudas A, Palla G, Gilav E (1992): Racemization of Aspartic Acid in Human Articular Cartilage. Connect Tissue Res 28, 161–169

Martin H, Patel Yasmina, Jones David, Howell Steve, Robinson Karen, Aitken Alastair (1993): Antibodies against the major brain isoforms of 14-3-3 protein. FEBS Lett 331, 296–303

Martin JA, Buckwalter JA (2001a): Roles of Articular Cartilage Aging and Chondrocyte Senescence in the Pathogenesis of Osteoarthritis. Iowa Orthop J 21, 1–7

Martin JA, Buckwalter JA (2001b): Telomere Erosion and Senescence in Human Articular Cartilage Chondrocytes. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 56, B172–B179

McConnell JE, Armstrong JF, Hodges PE, Bard JBL (1995): The Mouse 14-3-3 ϵ Isoform, a Kinase Regulator Whose Expression Pattern Is Modulated in Mesenchyme and Neuronal Differentiation. Dev Biol 169, 218–228

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 fibro-cartilaginous tissue of late-stage osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage 6, 278–285

Miosge N, Hartmann M, Maelicke C, Herken R (2004): Expression of collagen type I and type II in consecutive stages of human osteoarthritis. Histochem Cell Biol 122, 229–236

Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ, Geoghegan KF, Hambor JE (1996): Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. J Clin Invest 97, 761–768

Mow VC, Ratcliffe A, Robin Poole A (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

Murphy G, Nagase H (2008): Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? Nat Clin Pract Rheumatol 4, 128–135

Murphy L, Schwartz TA, Helmick CG, Renner JB, Tudor G, Koch G, Dragomir A, Kalsbeek WD, Luta G, Jordan JM (2008): Lifetime Risk of Symptomatic Knee Osteoarthritis. Arthritis Rheum 59, 1207–1213

Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM, Shaw AS (1996): Interaction of 14-3-3 with Signaling Proteins Is Mediated by the Recognition of Phosphoserine. Cell 84, 889–897

Nefla M, Sudre L, Denat G, Priam S, Andre-Leroux G, Berenbaum F, Jacques C (2015): The pro-inflammatory cytokine 14-3-3ε is a ligand of CD13 in cartilage. J Cell Sci 128, 3250–3262

Ng L-J, Wheatley S, Muscat GE, Conway-Campbell J, Bowles J, Wright E, Bell DM, Tam PP., Cheah KS, Koopman P (1997): SOX9 Binds DNA, Activates Transcription, and Co-expresses with Type II Collagen during Chondrogenesis in the Mouse. Dev Biol 183, 108–121

Okada Y, Konomi H, Yada T, Kimata K, Nagase H (1989): Degradation of type IX collagen by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) from human rheumatoid synovial cells. FEBS Lett 244, 473–476

Oldberg A, Antonsson P, Lindblom K, Heinegård D (1989): A collagen-binding 59-kd protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). EMBO J 8, 2601–2604

Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS., Mundlos S, Olsen BR (1997): Cbfa1, a Candidate Gene for Cleidocranial Dysplasia Syndrome, Is Essential for Osteoblast Differentiation and Bone Development. Cell 89, 765–771

Pallucca R, Visconti S, Camoni L, Cesareni G, Melino S, Panni S, Torreri P, Aducci P (2014): Specificity of ε and Non-ε Isoforms of Arabidopsis 14-3-3 Proteins Towards the H+-ATPase and Other Targets. PLoS ONE 9, e90764

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

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

Pratap J, Galindo M, Zaidi SK, Vradii D, Bhat BM, Robinson JA, Choi JY, Komori T, Stein JL, Lian JB (2003): Cell Growth Regulatory Role of Runx2 during Proliferative Expansion of Preosteoblasts. Cancer Res 63, 5357–5362

Priam S, Bougault C, Houard X, Gosset M, Salvat C, Berenbaum F, Jacques C (2013): Identification of Soluble 14-3-3ϵ as a Novel Subchondral Bone Mediator Involved in Cartilage Degradation in Osteoarthritis. Arthritis Rheum 65, 1831–1842

Pritzker K, Gay S, Jimenez S, Ostergaard K, Pelletier J-P, Revell P, Salter D, van den Berg W (2006): Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. Osteoarthritis Cartilage 14, 13–29

Rabenberg M: Arthrose. In: Robert-Koch-Institut und Statistisches Bundesamt (Hrsg.): Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Heft 54, Robert-Koch-Institut 2013

Schminke B: Laminine während der Knorpelentwicklung, im gesunden Knorpel und deren Bedeutung für die Pathogenese der Osteoarthritis des Menschen. Med. Diss. Göttingen 2011

Schminke B, Miosge N (2014): Cartilage Repair In Vivo: The Role of Migratory Progenitor Cells. Curr Rheumatol Rep 16, 461

Schminke B, Muhammad H, Cingöz G, Miosge N (2014): Manipulation of chondrogenic progenitor cells from late stages of osteoarthritis for cartilage repair. Eur Cell Mater 28, 25

Schminke B, vom Orde F, Gruber R, Schliephake H, Bürgers R, Miosge N (2015): The Pathology of Bone Tissue during Peri-Implantitis. J Dent Res 94, 354–361

Schminke B, Frese J, Bode C, Goldring MB, Miosge N (2016): Laminins and Nidogens in the Pericellular Matrix of Chondrocytes. Am J Pathol 186, 410–418

Seol D, McCabe DJ, Choe H, Zheng H, Yu Y, Jang K, Walter MW, Lehman AD, Ding L, Buckwalter JA (2012): Chondrogenic progenitor cells respond to cartilage injury. Arthritis Rheum 64, 3626–3637

Sharma L, Felson DT, Cahue S, Shamiyeh E, Dunlop DD (2001): The role of knee alignment in disease progression and functional decline in knee osteoarthritis. JAMA 286, 188–195

Shui C, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S (2003): Changes in Runx2/Cbfa1 Expression and Activity During Osteoblastic Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells. J Bone Miner Res 18, 213–221

Sluchanko NN, Chebotareva NA, Gusev NB (2013): Modulation of 14-3-3/Phosphotarget Interaction by Physiological Concentrations of Phosphate and Glycerophosphates. PLoS ONE 8, e72597

Sohni A, Verfaillie CM (2013): Mesenchymal Stem Cells Migration Homing and Tracking. Stem Cells Int 2013, 130763

Soos TJ, Kiyokawa H, Yan JS, Rubin MS, Giordano A, DeBlasio A, Bottega S, Wong B, Mendelsohn J, Koff A (1996): Formation of p27-CDK complexes during the human mitotic cell cycle. Cell Growth Differ 7, 135–146

Statistisches Bundesamt: Gesundheit. Krankheitskosten 2015. Fachserie 12. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2017

Stockwell RA (1971): The interrelationship of cell density and cartilage thickness in mammalian articular cartilage. J Anat 109, 411–421

Stokes DG, Liu G, Dharmavaram R, Hawkins D, Piera-Velazquez S, Jimenez SA (2001): Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box (SOX) transcription factors. Biochem J 360, 461–470

Tanji M, Horwitz R, Rosenfeld G, Waymire JC (1994): Activation of Protein Kinase C by Purified Bovine Brain 14-3-3: Comparison with Tyrosine Hydroxylase Activation. J Neurochem 63, 1908–1916

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

Theveneau E, Mayor R (2013): Collective cell migration of epithelial and mesenchymal cells. Cell Mol Life Sci 70, 3481–3492

Thorson JA, Yu LWK, Hsu AL, Shih N-Y, Graves PR, Tanner JW, Allen PM, Piwnica-Worms H, Shaw AS (1998): 14-3-3 Proteins Are Required for Maintenance of Raf-1 Phosphorylation and Kinase Activity. Mol Cell Biol 18, 5229–5238

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76, 4350–4354

Tzivion G, Avruch J (2002): 14-3-3 Proteins: Active Cofactors in Cellular Regulation by Serine/Threonine Phosphorylation. J Biol Chem 277, 3061–3064

Tzivion G, Luo Z-J, Avruch J (2000): Calyculin A-induced Vimentin Phosphorylation Sequesters 14-3-3 and Displaces Other 14-3-3 Partners in Vivo. J Biol Chem 275, 29772–29778

Urban JPG (1994): The Chondrocyte: A Cell Under Pressure. Br J Rheumatol 33, 901–908

Valdes AM, Loughlin J, Oene MV, Chapman K, Surdulescu GL, Doherty M, Spector TD (2007): Sex and ethnic differences in the association of ASPN, CALM1, COL2A1, COMP, and FRZB with genetic susceptibility to osteoarthritis of the knee. Arthritis Rheum 56, 137–146

Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E (1994): Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. Cell 79, 1111–1120

Walsh DA, Bonnet CS, Turner EL, Wilson D, Situ M, McWilliams DF (2007): Angiogenesis in the synovium and at the osteochondral junction in osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage 15, 743–751

Wang X, Manner PA, Horner A, Shum L, Tuan RS, Nuckolls GH (2004): Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage. Osteoarthritis Cartilage 12, 963–973

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

Wright EM, Snopek B, Koopman P (1993): Seven new members of the Sox gene family expressed during mouse development. Nucleic Acid Res 21, 744

Wright EM, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J, Evans T, Gangadharan U, Greenfield A, Koopman P (1995): The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. Nat Genet 9, 15–20

Wu JJ, Woods PE, Eyre DR (1992): Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding. J Biol Chem 267, 23007–23014

Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ (1996): Serine Phosphorylation of Death Agonist BAD in Response to Survival Factor Results in Binding to 14-3-3 Not BCL-XL. Cell 87, 619–628

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Nicolai Miosge für seine ausgezeichnete Betreuung. Ich danke ihm außerdem für seine Unterstützung bei der Entstehung der Arbeit, seine Anregungen und Hilfestellungen.

Besonderer Dank geht auch an Herrn Jérôme Janßen, der mich sowohl bei theoretischen als auch bei praktischen Fragestellungen unterstützte und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Bei Frau Christa Bode und Frau Elvira Henze bedanke ich mich für die Einarbeitung im Labor, die vielen Tipps und all ihre kompetente Hilfe während meiner Experimente.

Den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere meinen Mitstreitern Herrn Nima Gholamzadeh Biji und Herrn Fabian Weeber, möchte ich für die tolle Arbeitsatmosphäre und den fachlichen Austausch danken.

Außerdem bedanke ich mich bei Frau Ute Haßfeld für Korrekturlesungen und Anmerkungen zur äußeren Form.

Lebenslauf

Am 30.05.1992 wurde ich als zweiter Sohn meiner Eltern Ute und Stefan Haßfeld in Heidelberg geboren.

Von 1998 bis 2002 besuchte ich die Kurpfalz Grundschule in Dossenheim. Im Anschluss wechselte ich auf das Kurpfalz-Gymnasium Schriesheim, an dem ich bis 2005 Schüler war. Nach dem Umzug meiner Familie nach Dortmund besuchte ich das Goethe-Gymnasium Dortmund. Dort legte ich 2011 mein Abitur ab.

Danach arbeitete ich von August 2011 bis März 2012 im Klinikum Dortmund als Bundesfreiwilliger.

Zum Sommersemester 2012 begann ich das Studium der Zahnmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Nach dem im Sommersemester 2017 absolvierten Examen war ich als Famulant bei der NGO „Mini Molars“ in Phnom Penh tätig.

Seit Dezember 2017 arbeite ich an meiner Promotion bei Herrn Prof. Dr. N. Miosge in der Arbeitsgruppe „Orale Biologie und Geweberegeneration“.

Derzeit bin ich als Zahnarzt für die Praxis „Z17“ in Göttingen tätig.