Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Hendrik Lehnert

Einfluss der Integrin-vermittelten Wirkung von Fibronektin auf die chondrogene Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

– **Aus der Sektion Medizin** –

vorgelegt von
David Krug
aus Heidelberg

Lübeck 2012

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Jan Kramer

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Justus Gille

Tag der mündlichen Prüfung: 30.07.2013

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 30.07.2013

Promotionskommission der Sektion Medizin

Erklärung

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Heidelberg, den 16. September 2013

Inhaltsverzeichnis

1 Abkürzungen **1**

2 Einleitung **3**

2.1 *In vitro*-Modellsysteme zur Untersuchung der Chondrogenese 3

2.2 Knorpel- und Knochenentwicklung 5

2.3 Integrine - Schnittstellen zwischen Zellen und ihrer Umgebung 8

2.4 Fibronektin 10

2.5 Relevanz der Interaktion zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix für die Knorpelentwicklung 14

2.6 Zielsetzung und Hypothesen 15

3 Material und Methoden **17**

3.1 Material 17

3.2 Zellkulturlösungen 20

3.2.1 Nährmedien 20

3.2.2 Lösungen 21

3.3 Grundlegende Zellkulturtechniken 22

3.3.1 Beschichten von Zellkulturmaterialien mit Gelatine 22

3.3.2 Mediumwechsel 23

3.3.3 Waschen von Zellen mit PBS 23

3.3.4 Auftauen von Zellen 23

3.3.5 Passagieren und Einfrieren von Zellen 23

3.3.5.1 Trypsinieren von Zellen 23

3.3.5.2 Einfrieren von Zellen 24

3.3.5.3 Passagieren von Zellen 24

3.3.6 Zellzählung 24

3.3.7 Inaktivierung muriner embryonaler Fibroblasten mit Mitomycin C 24

3.4 Spezielle Zellkulturtechniken 25

3.4.1 Isolierung von murinen embryonalen Fibroblasten 25

3.4.2 Differenzierung von embryonalen Stammzellen *via* "Hängende Tropfen" 25

3.4.3 Behandlung von EBs mit Integrin-blockierenden Peptiden . . . 26

3.4.4 Gewinnung von Chondrozyten aus embryonalem Rippenknorpel 27
3.4.5 Aufreinigung und *in vitro*-Differenzierung einer homozygot Fibronektin-defizienten ES-Zelllinie . . . 28
3.4.6 Behandlung von Fibronektin-Knock Out-ES-Zellen mit Fibronektin . . . 30
3.4.7 Größenbestimmung von EBs . . . 30
3.5 Immunfluoreszenzfärbungen . . . 30
3.6 Phalloidin-Färbungen . . . 32
3.7 Bromdesoxyuridin-Assay zur Bestimmung der zellulären Proliferation . 33
3.8 Alcianblau-Färbung . . . 34
3.9 Elektronenmikroskopie . . . 34
3.9.1 Immunelektronenmikroskopie . . . 34
3.9.2 Transmissionselektronenmikroskopie . . . 35
3.10 Analyse von genomischer DNA und Genexpression . . . 36
3.10.1 Extrahierung genomischer DNA . . . 36
3.10.2 RNA-Isolation . . . 36
3.10.3 Reverse Transkription . . . 37
3.10.4 Semiquantitative Polymerasekettenreaktion und Agarose-Gelelektrophorese 38
3.10.5 Quantitative Real-Time-PCR . . . 40
3.11 Phosphoprotein-Nachweis mittels Western Blot . . . 42
3.11.1 Probengewinnung . . . 42
3.11.2 Immunadsorbtion . . . 42
3.11.3 SDS-PAGE und Durchführung des Western Blots . . . 43
3.12 Statistische Auswertung . . . 45

4 Ergebnisse **46**
4.1 Nachweis und Lokalisation von Kollagen II, IX und XI während der chondrogenen Differenzierung muriner ES-Zellen . . . 46
4.2 Expression von Fibronektin und α_5-Integrin während der Knorpeldifferenzierung muriner ES-Zellen . . . 47
4.3 *In vitro*-Differenzierung homozygot Fibronektin-defizienter muriner ES-Zellen . . . 50
4.4 Modulation der Chondrogenese durch Integrin-blockierende RGD-Peptide 54
4.5 Analyse der Dedifferenzierung primärer muriner Chondrozyten . . . 60

5 Diskussion **66**
5.1 ES-Zell-Differenzierung als Modellsystem zur Untersuchung der Knorpelentwicklung . . . 66

5.1.1 Kollagen IX und XI werden während der chondrogenen Differenzierung muriner ES-Zellen exprimiert. 66
5.1.2 Während früher chondrogener Differenzierungsstadien werden hohe Expressionslevel von α_5-Integrin und Fibronektin detektiert. 67
5.1.3 Die *in vitro*-Differenzierung homozygot Fibronektin-defizienter ES-Zellen ist gestört. 68
5.1.4 RGD-enthaltende Peptide inhibieren die chondrogene Differenzierung muriner ES-Zellen *in vitro*. 70
5.2 Etablierung eines Primärkulturmodelles zur Untersuchung der Dedifferenzierung muriner Chondrozyten 73

6 Zusammenfassung **76**

7 Literaturverzeichnis **78**

8 Anhang **88**

1 Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
A	Ampère
Abb.	Abbildung
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	copy DNA
CLSM	konfokale Laser Scanning-Mikroskopie
Cy3	Carbocyanin 3
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAsen	DNA-verdauende Enzyme
EB	Embryoid Body
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FN	Fibronektin
g	Gramm
h	Stunde
IF	Immunfluoreszenz
kDa	Kilodalton
KO	Knock Out
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
min	Minute
M	molar
MBS	Maleate Buffered Saline
ml	Milliliter
MMC	Mitomycin C
MMP	Matrixmetalloproteinase

mRNA	messenger RNA
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGK	Phosphoglyceratkinase
qPCR	quantitative Real Time-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNAsen	RNA-verdauende Enzyme
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOX	Sry-related High Mobility Group Box
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris Buffered Saline
TK	Thymidinkinase
V	Volt

2 Einleitung

2.1 *In vitro*-Modellsysteme zur Untersuchung der Chondrogenese

Die Isolation von Chondrozyten aus Gelenkknorpel und deren Kultivierung als Monolayer-Kultur *in vitro* führt zu einem raschen Wechsels des Expressionsmusters von der physiologischen Produktion von Kollagen II und Proteoglykanen hin zur Bildung von Kollagen I und Fibronektin. Zudem verlieren die Knorpelzellen ihre runde Form und nehmen eine spindelförmige, fibroblastoide Morphologie an [93]. Dieser Vorgang wird als Dedifferenzierung bezeichnet. Durch die Hinzugabe von Wachstumsfaktoren wie TGF-β [38], durch die Kultivierung in Agarose [11] oder in hoher Zelldichte [16, 80] lässt sich dieser Prozess umkehren und zumindest teilweise eine Re-Differenzierung erreichen.

Aufgrund dieser Problematik wurden verschiedene Modellsysteme zur Untersuchung der chondrogenen Differenzierung und des Verhaltens von Knorpelzellen *in vitro* entwickelt. Eines der ältesten Modelle ist die Isolierung und Kultivierung von Progenitorzellen aus embryonalen Extremitätenknospen. Werden diese als sog. "Micromass Cultures", d.h. in Aggregaten mit hoher Zelldichte, kultiviert, so vollziehen sie die Stadien der endochondralen Osteogenese [17, 19, 108]. Die bedeutenden Nachteile dieses Modellsystems bestehen in der Notwendigkeit der Tötung von Embryonen und der erschwerten Reproduzierbarkeit durch Unterschiede zwischen verschiedenen Isolaten.

Stammzellen sind Zellen mit der besonderen Eigenschaft der asymmetrischen Zellteilung, die die Aufrechterhaltung eines definierten Stammzellpools ermöglicht. Hierauf beruht die hierarchische Organisation vieler Gewebe und deren Regenerierungsfähigkeit. Mittlerweile wurden aus einer Vielzahl von Geweben wie Knochenmark, Fettgewebe und Nabelschnurblut sog. adulte Stammzellen isoliert. Sie stellen gewebsresidente Progenitorzellen mit limitierter Differenzierungskapazität dar. Das *in vitro*-Differenzierungsvermögen multipotenter mesenchymaler Stammzellen unter der Behandlung mit bestimmten Differenzierungsmedien ist in der Regel auf die Adipogenese, Chondrogenese und Osteogenese beschränkt [69].

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) wurden erstmals 1981 beschrieben [21, 50]. Sie

stellen undifferenzierte Vorläuferzellen dar, die aus der inneren Zellmasse eines frühen Embryonalstadiums, der Blastozyste, isoliert werden. Ihr Vermögen in Gewebe aller drei Keimblätter und in Keimzellen zu differenzieren wird als Pluripotenz bezeichnet. Nachgewiesen wird diese Fähigkeit durch die Bildung von Teratomen nach subkutaner Injektion, sowie durch die Injektion in Blastozysten mit folgender Bildung chimärer Embryonen, heterozygoter Nachkommen in der ersten sowie homozygoter Nachkommen in der zweiten Filialgeneration nach den Mendel'schen Regeln.
Murine ES-Zellen können *in vitro* auf murinen embryonalen Fibroblasten, die den sog. Leukämie-inhibierenden Faktor (engl. leukemia inhibitory factor, LIF) produzieren, oder durch alleinige Hinzugabe von LIF *in vitro* nahezu unbegrenzt passagiert werden, ohne ihre Pluripotenz zu verlieren [56].

ES-Zellen eröffnen die Möglichkeit der Untersuchung des Einflusses bestimmter exogener Faktoren (u.a. Wachstumsfaktoren) sowie die Möglichkeit der genetischen Modifikation zum Beispiel durch die Generierung sog. "Knock Out"-ES-Zelllinien [99]. Diese Methode besteht in der Einschleusung von genetisch modifizierten DNA-Abschnitten, die durch die homologe Rekombination zwischen der genomischen und der eingebrachten, modifizierten DNA zur gezielten Veränderung des zellulären Erbguts genutzt werden. Werden beide Allele eines Gens hierdurch funktionsunfähig (beispielsweise durch ein fehlendes Startcodon), spricht man von einem homozygoten Knock Out, ansonsten von einem heterozygoten Knock Out. Wenn die genetisch veränderten ES-Zellen in eine Blastozyste injiziert werden und an der Embryonalentwicklung teilhaben, entstehen chimäre Knock Out-Tiere, aus denen durch Kreuzung homozygote Nachkommen gezüchtet werden können.
Die *in vitro*-Differenzierung muriner ES-Zellen stellt ein hervorragendes Modellsystem zur Untersuchung entwicklungsbiologischer Fragestellungen dar. Eine Differenzierung konnte u.a. in Kardiomyozyten, Skelettmuskelzellen, Neuronen, hämatopoietische Vorläuferzellen, glatte Muskulatur, Adipozyten, Chondrozyten, epitheliale Zellen, Endothelien, Hepatozyten, Keratinozyten und glatte Muskelzellen gezeigt werden ([99], siehe Abb. 1). In der überwiegenden Zahl der Publikationen findet die Differenzierung von ES-Zellen als Zellaggregate, sog. "Embryoid Bodies" (kurz EBs), Verwendung. Hierfür werden die undifferenzierten ES-Zellen in Abwesenheit von LIF entweder in Suspensionskultur, in Methylcellulosegelen, oder als sog. "Hängende Tropfen" kultiviert [44]. Die letztgenannte Methode ist die bevorzugte Methode für die Differenzierung muriner ES-Zellen, wobei die Vorteile in der Homogenität der EBs hinsichtlich Größe und Differenzierung liegen.
Dass ES-Zellen, die *in vitro* als Hängende Tropfen differenziert werden, eine chondrogene Differenzierung analog zur Knorpelentwicklung *in vivo* vollziehen, konnte im Jahre 2000 erstmals gezeigt werden [40]. Die in Abbildung 2 gezeigten Stadien der

zellulären Differenzierung werden hierbei rekapituliert [33, 105]. Knorpelaggregate, die aus ES-Zellen gewonnen wurden, weisen, wenn sie mittels Elektronenmikroskopie und konfokaler Laser Scanning-Mikroskopie untersucht werden, eine hohe Ähnlichkeit zu hyalinem Knorpel auf [42]. ES-Zellinien unterscheiden sich jedoch in ihrem Differenzierungsmuster, das größte chondrogene Potential in einer vergleichenden Studie besaß die Linie BLC-6 [41, 100].

2.2 Knorpel- und Knochenentwicklung

Die Bildung des knöchernen Skelettes nimmt in der Embryonalentwicklung von Vertebraten eine wichtige Stellung ein. In der Literatur sind zwei wesentliche Mechanismen beschrieben.
Die Knochen des Viszerokraniums und das Schlüsselbein entstehen durch eine direkte Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen des Neuralrohrs in Osteoblasten, die eine kollagen- und proteoglykanreiche Osteoid-Matrix sezernieren. Dieser Prozess wird als intramembranöse oder desmale Ossifikation bezeichnet und wird hier nicht weiter thematisiert werden.
Im Bereich der langen Röhrenknochen, des Beckens, der Schädelbasis und der Wirbelsäule findet hingegen die sog. endochondrale Ossifikation statt (siehe Abb. 2). Zunächst wird ein knorpeliges Skelett angelegt, das anschließend in Knochen umgewandelt wird. Jede der einzelnen Differenzierungsschritte, die im weiteren detailliert besprochen werden, zeichnet sich durch ein definiertes Expressionsmustern von Matrixproteinen und Oberflächenmarkern aus, die in Abbildung 3 aufgeführt sind.

Die Determinierung der chondrogenen Differenzierung erfolgt durch die Expression des Transkriptionsfaktors pax1 in mesenchymalen Progenitorzellen des paraaxialen Mesoderms (Wirbelsäule, Rippen) bzw. des lateralen Mesoderms (Extremitäten), die durch den löslichen Faktor “sonic hedgehog“ induziert wird [49]. Entscheidend scheint zudem der Einfluss von Wachstumsfaktoren aus der Familie der sog. “bone morphogenetic proteins“, kurz BMP’s, zu sein. So konnte gezeigt werden, dass durch subkutane Injektion von rekombinantem humanem BMP-2a in Ratten eine ektope Knorpel- und Knochenbildung induziert werden kann [95]. Zudem stimulieren BMP-2 und BMP-4 die chondrogene Differenzierung muriner ES-Zellen [40].

Die mesenchymalen Progenitorzellen sezernieren eine Matrix bestehend aus Kollagen I, Fibronektin, Hyaluronan und Tenascin [17]. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Expression von Hyaluronidase, deren proteolytische Aktivität die Entstehung enger Zell-Zell-Kontakte ermöglicht [14]. Unter dem Einfluss der Zelladhäsionsmoleküle N-CAM und N-Cadherin kommt es zu einer Verdichtung der Vorläuferzellen und zur

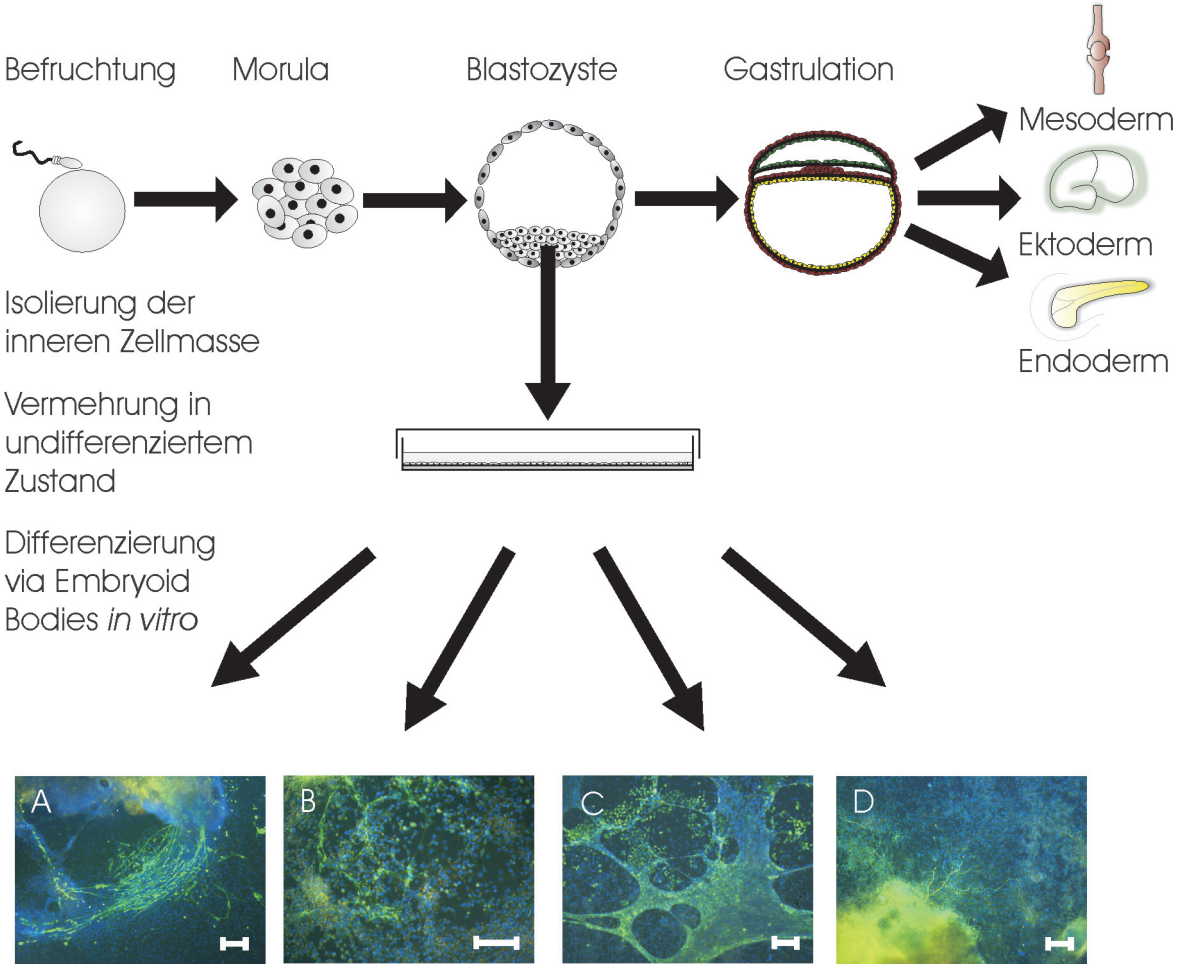

Abbildung 1: Die Gewinnung von ES-Zellen erfolgt durch die Isolierung der inneren Zellmasse aus dem embryonalen Blastozysten-Stadium. In Gegenwart von LIF können ES-Zellen *in vitro* nahezu unbegrenzt in ihrem undifferenzierten Zustand passagiert werden. Werden sie als Embryoid Bodies (EBs, s. Abb. 5) kultiviert, differenzieren sie spontan in Zellen der drei embryonalen Keimblätter, sowie in Keimzellen. Beispielhaft für die *In vitro*-Pluripotenz muriner ES-Zellen sind indirekte Immunfluoreszenzfärbungen von Muskelzellen (A, FITC = Myosin), Epithelzellen (B, FITC = Panzytokeratin), Endothelzellen (C, FITC = PECAM-1) und Nervenzellen (D, FITC = Neurofilament 68) dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Balken = 100 µm. Nach [39].

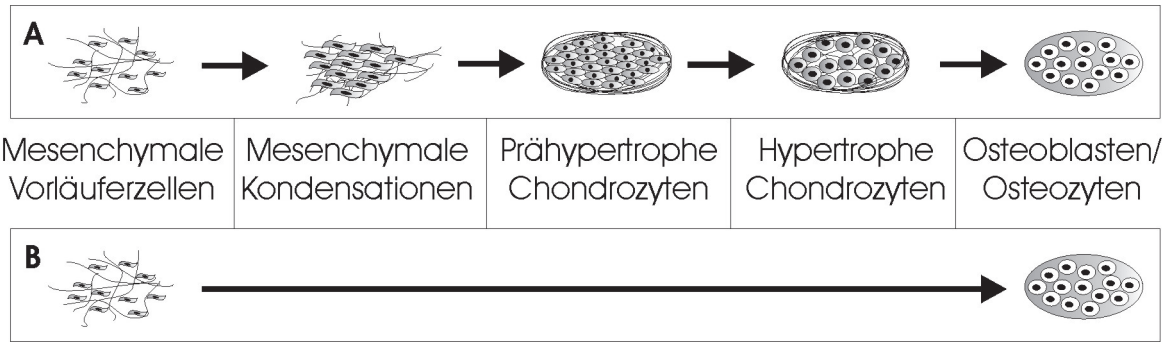

Abbildung 2: Schematische Darstellung der endochondralen (A) und desmalen (B) Osteogenese. Nach [39].

Ausbildung sog. mesenchymaler Kondensationen [57, 97]. Begünstigt wird dies zudem durch TGF-β, vermittelt über die Hochregulation des Matrixmoleküls Fibronektin, sowie über Activin-A, die die Expression der Adhäsionsmoleküle N-CAM und N-Cadherin induzieren [31]. Nachweisen lassen sich diese frühen Stadien durch die Anreicherung des Lektins "Peanut Agglutinin", kurz PNA, das an Oberflächenstrukturen der kondensierenden mesenchymalen Zellen bindet [52].

Der Übergang vom Kondensationsstadium hin zur Ausbildung differenzierter Chondrozyten wird eng reguliert [13, 14]. Essentiell für diesen Schritt sind die Transkriptionsfaktoren L-Sox5, Sox6 und Sox9. So konnte anhand von Knock Out-Studien gezeigt werden, dass sowohl homozygot L-Sox5/Sox6-defiziente, als auch heterozygot Sox9-defiziente Mäuse durch eine Hypoplasie bzw. komplette Abwesenheit der endochondralen Osteogenese gekennzeichnet sind und bereits *in utero* versterben [5, 84]. Desweiteren existiert ein negativer Feedback-Mechanismus, in den "indian hedgehog" , ein Mitglied der "hedgehog"-Familie, und das Parathormon-verwandte Peptid, PTHrP, involviert sind [13]. Die proliferierenden Chondrozyten sezernieren die charakteristische Knorpelmatrix, die vorrangig aus Kollagen II, Kollagen IX, Kollagen XI und Aggrecan besteht, wohingegen Kollagen I vermindert exprimiert wird wird [14].
Kollagen IX und XI werden auch als sog. "minor collagens" bezeichnet, da sie im Knorpelgewebe in wesentlich geringerem Ausmaß als Kollagen II synthetisiert werden. Das Verhältnis dieser drei Kollagen-Typen variiert während der Embryogenese und liegt bei ca. 8:1:1 zugunsten von Kollagen II [63, 90]. In humanen fetalen Kniegelenken werden Kollagen IX und XI vor allem in der proliferativen und der hypertrophen Zone exprimiert [94]. Kollagen XI bildet Fibrillen mit Kollagen II aus, während Kollagen IX an der Oberfläche derselben lokalisiert ist und Quervernetzungen bzw. Interaktionen mit anderen Kollagen-Fibrillen [102] ermöglicht. Kollagen XI kann darüber hinaus mit Proteoglykanen bzw. Glykosaminoglykanen in Interaktion treten [91]. Mäuse mit einem homozygoten Knock Out des *Col9a1*-Gens zeigten keine Auffälligkeiten der skelettalen

Differenzierung, entwickelten jedoch im Alter von vier Monaten arthrotische Gelenkveränderungen [22]. Sind hingegen beide Allele des *Col11a1*-Genes defekt, entsteht das Krankheitsbild der Chondrodysplasie mit aufgetriebenen Metaphysen und verkürztem Achsen- und Gliedmaßenskelett aufgrund einer Desorganisation der Epiphyse und verdickten Kollagenfasern [45].

Der Transkriptionsfaktor Sox9 kontrolliert auch die anschließende Hypertrophie der Chondrozyten. In Untersuchungen an murinen ES-Zellen konnte gezeigt werden, dass diese in homozygot Sox9-defizienten ES-Zellen unterbleibt [32]. Gekennzeichnet ist dieses Stadium durch die präferentielle Expression von Kollagen X und die blasige Hypertrophie der Knorpelzellen [11]. Diese können in einem letzten Schritt entweder in Osteoblasten transdifferenzieren oder apoptotisch werden [72]. *In vivo* findet eine Vaskularisierung des knorpeligen Skeletts durch eine Invasion perichondraler Gefäße und ein Umbau der Matrix durch Osteoblasten und Chondroklasten zu einer Kollagen I-reichen, mineralisierten Matrix statt. Hauptregulator der osteoblastären Differenzierung ist der Transkriptionsfaktor Cbfa1/Runx2. In Cbfa1/Runx2-Knock Out-Mäusen ist interessanterweise sowohl die desmale, als auch die endochondrale Ossifikation gestört. Weder die VEGF-getriggerte Gefäßinvasion, noch die Matrixdegradation durch Chondroklasten und Osteoblasten finden statt [59].

2.3 Integrine - Schnittstellen zwischen Zellen und ihrer Umgebung

Die Integrine sind eine Familie von transmembranären, heterodimeren Rezeptoren, die sich aus jeweils einer α- und einer β-Einheit zusammensetzen. Bislang sind für Säugetiere 18 verschiedene α- und 8 β-Untereinheiten beschrieben, die 24 unterschiedliche Heterodimere bilden. Grob lassen sich die 24 Integrine in vier Gruppen aufteilen: (1.) Leukozyten-spezifische Integrine, (2.) Kollagen-Rezeptoren, (3.) Laminin-Rezeptoren und (4.) Integrine, die an die Tripeptidsequenz RGD (Arginin - Glycin - Aspartat) in Matrixproteinen binden [37].
Zum einen fungieren Integrine als mechanisches Bindeglied zwischen Bestandteilen der extrazellulären Matrix wie Kollagenen und Fibronektin oder zellulären Rezeptoren wie VCAM-1 (engl. vascular adhesion molecule 1) und dem Aktin-Zytoskelett im Zellinneren [70], zum anderen sind sie Ausgangspunkt zahlreicher Signaltransduktionswege, die unter anderem Zellmotilität, Zellüberleben, und Proliferation vermitteln bzw. beeinflussen [37]. Dabei werden einerseits durch die Bindung extrazellulärer Liganden Signale in die Zelle transduziert (engl. outside-in signalling), andererseits wird die Affinität der

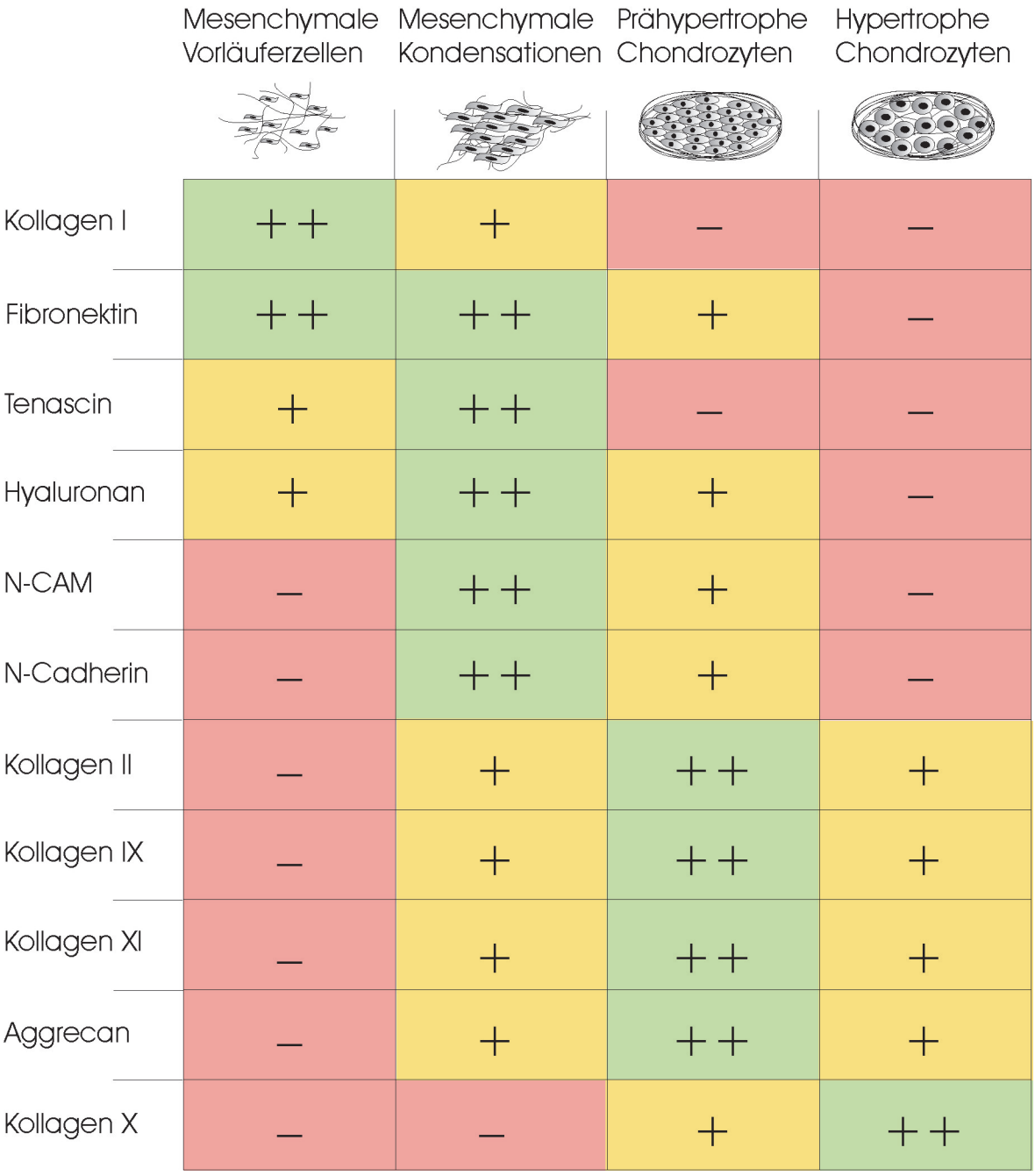

Abbildung 3: Expressionsmuster von Matrixproteinen und Zell-Matrix-/Zell-Zell-Interaktionsvermittelnden Rezeptoren während der Chondrogenese (nach [14, 31])

Ligandenbindung und der Aktivitätszustand der Integrine durch intrazelluläre Signale reguliert (engl. inside-out signalling).
Bei Ligandenbindung erfolgt eine lokale Anreicherung von Integrinen (engl. clustering) und die Bildung sog. fokaler Adhäsionen in der Zellperipherie. Durch Bindung von Adaptormolekülen wie Paxillin und Talin an den intrazytoplasmatischen Schwanz der β_1-Untereinheit werden zahlreiche Tyrosinkinasen wie FAK (engl. focal adhesion kinase), Kinasen aus der src-Familie und ILK (engl. integrin-linked kinase) rekrutiert und aktiviert [29]. Der FAK-Signalweg wird von den meisten Integrin-Rezeptoren genutzt. Nach Aktivierung kommt es zu einer Autophosphorylierung am Tyrosinrest in Position 397 (Tyr^{397}). Vermittelt über die Src-Kinase wird das kleine G-Protein Ras und damit der ERK- (engl. extracellular signal related kinase)/MAPK (engl. mitogen activated protein kinase)-Signalweg aktiviert [29].
Nach heutigem Kenntnisstand ist die Funktion der 24 beschriebenen Integrine nicht redundant, was unter anderem aus Studien an Knock Out-Tieren hervorgeht [8]. Defekte in der mesodermalen Differenzierung sind hier für α_5-Integrin und einen konditionellen Knock Out von β_1-Integrin unter der Kontrolle des chondrozyten-spezifischen Kollagen II-Promotors beschrieben [30, 110].
Eine Vielzahl von Publikationen belegt, dass Integrine sowohl im humanen wie auch im murinen hyalinen Knorpelgewebe exprimiert werden. Nachgewiesen werden konnten insbesondere β_1-Integrine, unter anderem $\alpha_1\beta_1$-Integrin, $\alpha_3\beta_1$-Integrin, $\alpha_5\beta_1$-Integrin und $\alpha_6\beta_1$-Integrin [1, 47, 79]. Salter et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass sich das Integrin-Expressionsmuster in verschiedenen Lokalisationen und Zellpopulationen unterscheidet [79]. Die differentielle Expression von Integrinen während pathologischer Vorgänge wie der Arthrose [47, 58] und während der Dedifferenzierung humaner Gelenkknorpelzellen [86] sprechen für eine funktionelle Rolle von Integrinen im Knorpelgewebe.

2.4 Fibronektin

Fibronektin ist ein Glykoprotein, das sowohl in der extrazellulären Matrix, als auch im Plasma zahlreicher Lebewesen vorkommt. Es ist an einer Vielzahl biologischer Prozesse wie Zelladhäsion und -migration, Differenzierung, Transformation, Entzündung, Fibrose und Proliferation maßgeblich beteiligt [36].
Erstmals wurde Fibronektin in den 70er Jahren als sogenanntes “fibroblast surface antigen“ (engl. für oberflächliches Fibroblasten-Antigen) beschrieben [78]. In Präparationen von Hühnerembryonen konnte es in mesenchymalen Gewebeanteilen sowie in Basalmembranen nachgewiesen werden [46].
Fibronektin ist ein dimeres Protein, das aus zwei etwa 250 kDa großen Untereinheiten

besteht, die nahe des C-Terminus durch Disulfidbrücken kovalent verbunden sind. Sie sind aus repetitiven Motiven zusammengesetzt, die als Typ I- bis Typ III-Einheiten (engl. "repeats") bezeichnet werden. Fibronektin besteht aus zwölf Typ I, zwei Typ II und 15-17 Typ III "repeats".
Typ I-Einheiten sind ca. 40 Aminosäuren lang, Typ II-Einheiten setzen sich aus gut 60 Aminosäuren zusammen und Typ III-Einheiten bestehen aus über 90 Aminosäuren. Alle drei Motive finden sich auch in zahlreichen anderen Molekülen wie beispielsweise dem Gerinnungsfaktor XII wieder, was eine Entstehung des Fibronektin-Genes durch ein sog. "Exon-Shuffling" (Evolution von Genen durch Rekombination von Exons) wahrscheinlich macht [61].

Durch alternatives Spleißen (Entstehung verschiedener mRNA's aus einer prä-mRNA durch unterschiedliche Exon-Kombinationen) in verschiedenen Regionen können eine Vielzahl verschiedener Fibronektin-Formen entstehen. Am häufigsten werden diese Vorgänge im zentralen Bereich der Typ III-Elemente beobachtet. Die sogenannten EIIIA bzw. EIIIB "repeats" können durch "Exon skipping" entweder ein- oder ausgeschlossen werden. Desweiteren findet sich eine nicht-homologe Region, die als V (für variabel) bzw. CS (für "connecting segment") bezeichnet wird. Hier finden speziesabhängig komplexe Spleissvorgänge statt, die als Resultat zwischen acht (Ratte) und zwanzig (Mensch) verschiedene mRNA's generieren [23]. Viele dieser Subformen weisen entwicklungs- und/oder gewebsspezifische Expressionsmuster auf.
Auf der Basis ihrer Löslichkeit können zudem zwei Formen von Fibronektin unterschieden werden - das lösliche Plasma-Fibronektin und das weniger lösliche zelluläre Fibronektin. Das im Plasma zirkulierende Fibronektin wird vornehmlich von Hepatozyten synthetisiert und ist insbesondere durch die Abwesenheit der EIIIA- und EIIIB-Elemente gekennzeichnet, wohingegen die zelluläre Variante eine wesentlich größere Variationsbreite an Spleissformen aufweist [23]. Der schematische Aufbau eines Fibronektin-Monomers ist in Abbildung 4 dargestellt.

Anhand von mRNA-Analysen konnte in verschiedenen Tiermodellen gezeigt werden, dass dem Großteil der Fibronektin-Transkripte in Gelenkknorpelisolaten sowohl die V- als auch die CS-Domäne fehlen. Diese Isoform konnte in elf anderen untersuchten Geweben gar nicht bzw. nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden. Interessanterweise veränderte sich das Spleissmuster der Chondrozyten für Fibronektin auch während einer die Dedifferenzierung begünstigenden Monolayer-Kultur [48]. Hinsichtlich der Domänen EIIIA und EIIIB findet im Verlauf der chondrogenen Differenzierung im Bereich der Extremitätenknospen von Hühnern ein Wandel des Expressionsmuster statt. In mesenchymalen Vorläufergeweben sind beide vorhanden, wohingegen nach dem Ablaufen von Kondensationsvorgängen und im differenzierten Knorpelgeweben nur noch Isoformen ohne die EIIIA-Domäne aufzufinden sind [25].

Neben der Strukturaufklärung fanden weiterhin funktionelle Untersuchungen des Fibronektin-Moleküles statt. Als erste zellbindende Domäne wurde der Bereich des zehnten Typ III-"repeats" (III_{10}) ausgemacht. Durch Klonierung wurde das Tripeptid Arginin - Glycin - Aspartat (im Einbuchstabencode RGD) als wesentliche Sequenz identifiziert [66, 67]. Sie ist keineswegs spezifisch für Fibronektin, sondern kommt in mehr als 2000 weiteren Proteinen vor - jedoch nicht in jedem Fall mit zellbindender Aktivität [77, 76].

Das RGD-Motiv in Fibronektin fungiert als Bindungsstelle für eine große Zahl von Integrinen, wie $\alpha_5\beta_1$-Integrin, die Mitglieder der α_v-Subfamilie, $\alpha_8\beta_1$- und $\alpha_9\beta_1$-Integrin [37]. $\alpha_5\beta_1$-Integrin, der vorherrschende Fibronektin-Rezepter im Knorpelgewebe [20, 47, 58, 82], interagiert zudem auch mit dem N-terminalen Fragment. Interessanterweise lösen diese beiden Bindungspartner an ein und demselben Rezeptor unterschiedliche intrazelluläre Signale aus [34]. Die Effizienz der Interaktion von $\alpha_5\beta_1$-Integrin mit der RGD-Sequenz innerhalb von III_{10} ist von der sog. Synergie-Region mit dem zentralen Bindungsmotiv PHSRN (für Prolin - Histidin - Serin - Arginin - Asparagin) in III_9 abhängig [81].
Neben dem RGD-Tripeptid existieren weitere Zellbindungsdomänen wie LDV (für Leucin, Aspartat, Valin) und REDV (für Arginin - Glutamat - Aspartat - Valin) innerhalb der V/CS-Region, die von den Integrinen $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_4\beta_7$ erkannt werden [60]. Darüber hinaus interagiert Fibronektin mit anderen Molekülen der extrazellulären Matrix wie Heparin, Kollagen und Fibrin [60].

Die entwicklungsbiologische Bedeutung von Fibronektin wird durch Studien an Knock Out-Mäusen belegt. Dies sind Tiere, denen ein bzw. beide Allele des Fibronektin-Gens fehlen, die also hetero- bzw- homozygot fibronektin-defizient sind. Während heterozygote Tiere phänotypisch normal sind, sterben homozygote Embryonen bereits im frühen Embryonalstadium ab. Acht Tage nach der Implantation chimärer Blastozysten traten erste Veränderungen auf. Die Embryonen wiesen eine Verkürzung der anterior-posterioren Achse, ein geknicktes Neuralrohr, eine Fehlen der Somiten und des Notochords sowie in einigen Fällen eine mangelhafte Entwicklung der Herzanlage bis hin zum kompletten Fehlen derselben auf. Der wahrscheinlichste Grund für die schlussendliche Degeneration der homozygot Fibronektin-defizienten Embryonen liegt in Fehlbildungen der intra- und extraembryonalen Gefäßstrukturen [26]. In einer weiteren Publikation konnte gezeigt werden, dass die das Mesoderm betreffenden Effekte am ehesten auf eine gestörte Kondensation bzw. Organisation der vorhandenen Progenitorzellen zurückzuführen sind [27].
Zahlreiche Publikationen belegen, dass Fibronektin nicht nur an Differenzierungsprozessen, sondern auch an pathologischen Vorgängen beteiligt ist. In der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Rheumatoider Arthritis finden sich hohe Konzentrationen von

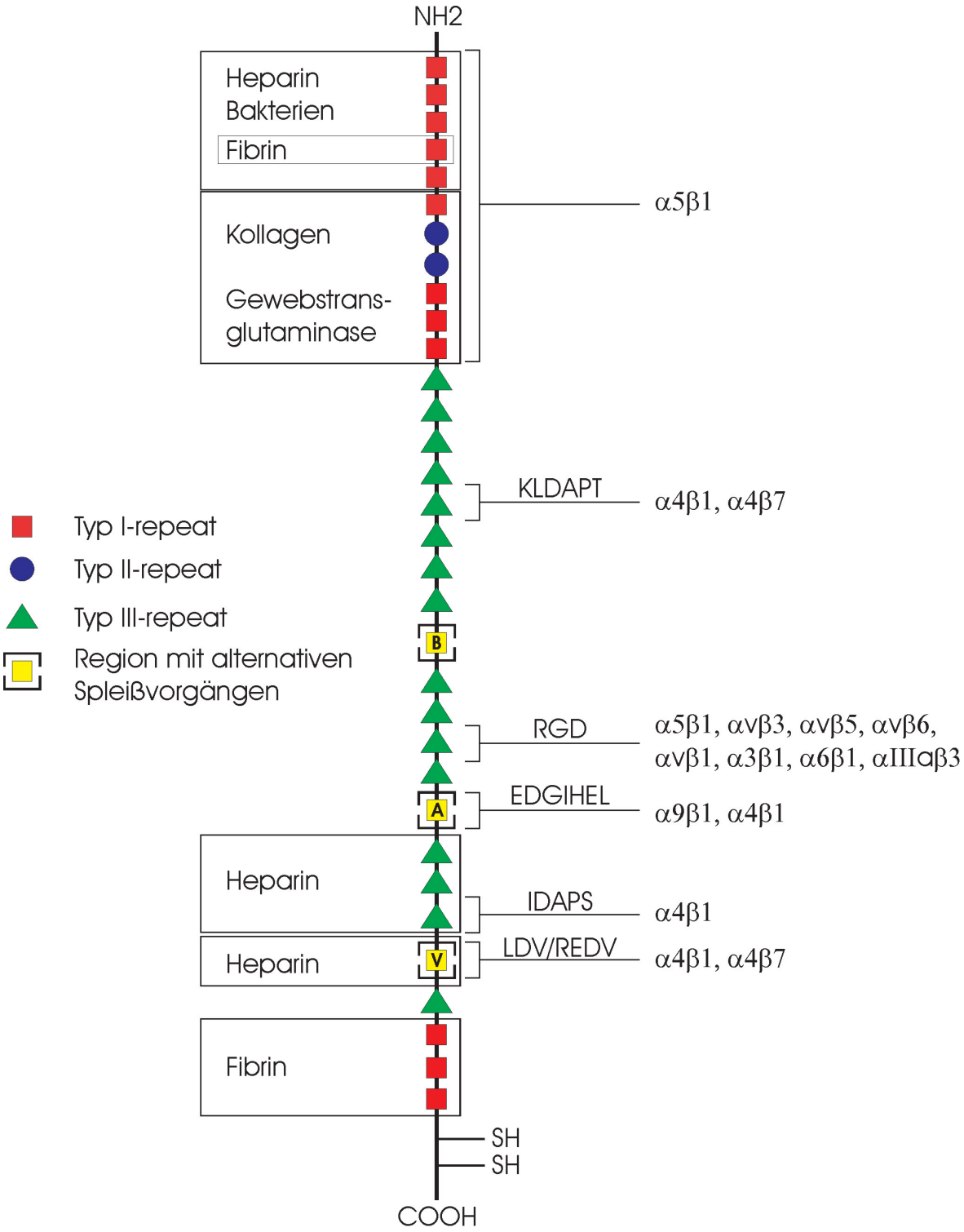

Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Fibronektin-Monomers. Linksseitig aufgeführt sind Interaktionen mit Molekülen der extrazellulären Matrix, während rechts die Bindungsstellen zellulärer Integrin-Rezeptoren mit ihren Bindungsmotiven (falls vorhanden) gezeigt sind. Die alternativ gespeißten Regionen A, B, und V/CS sind in gelb darstellt. Nach [60].

Fibronektin-Fragmenten [3]. Die Arbeitsgruppe von Damsky konnte zeigen, dass diese Fragmente über Integrin-vermittelter Signaltransduktionswege die Expression von Matrixmetalloproteinasen regulieren [35, 96]. Am ehesten ist dieser Effekt durch eine Imbalance in der Interaktion zwischen Fibronektin und zellulären Integrinen zu erklären, die eine Veränderung des Genexpressionsmusters bewirkt [65].

2.5 Relevanz der Interaktion zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix für die Knorpelentwicklung

Bezüglich der Aufklärung der spezifischen Funktion im Rahmen der Knorpelentwicklung existieren neben den oben erwähnten Studien an Knock Out-Tieren zahlreiche, zum Teil widersprüchlich erscheinende Veröffentlichungen.
Bereits 1979 wurde eine inhibitorische Wirkung von exogenem Fibronektin auf differenzierte Chondrozyten mit Ausbildung einer fibroblastoiden Morphologie sowie einer signifikanten Reduktion der Glykosaminoglykan-Synthese publiziert [62].
Tavella et al. konnten *in vitro* zeigen, dass die Hinzugabe von Oligopeptiden, die das als Integrin-Bindungssequenz in vielen Matrixmolekülen vorkommende RGD-Tripeptid enthielten, die Aggregation von Zellen aus Hühner-Extremitätknospen in Suspensionskultur signifikant inhibiert. Interessanterweise war die Größenordnung dieses Effekts vergleichbar mit der Behandlung mit einem $\alpha_5\beta_1$-Integrin-spezifischen Antikörper [87].
Dass auch weitere Interaktionsstellen in der direkten Umgebung des RGD-Tripeptides funktionell bedeutsam sein könnten, legt eine Publikation von Moursi et al. [53] nahe. Während GRGDSPK-Oligopeptide laut den Autoren vorrangig zu einer Inhibition der Reifung von Osteoblasten-Aggregaten in Zellkultur führten, ergab die Addition der Typ III "repeats" 6-10 des Fibronektin-Moleküls auch eine verminderte Bildung dieser Aggregate.
Die Injektion von RGD-enthaltenden Peptiden in den Gelenkspalt in einem Kulturmodell von Mäuse-Extremitäten führt zur Bildung ektoper Gelenkspalte wohingegen die ektope Überexpression von $\alpha_5\beta_1$-Integrin eine Gelenkfusion nach sich zieht [24].
Durch Studien an einer transgenen Maus, bei der beide Fibronektin-Gene durch eine modifizierte Variante ersetzt wurde, die anstelle des Integrinbindungsmotivs RGD das inaktive Tripeptid RGE (Arginin - Glycin - Glutamat) enthielt (sog. "Knock In"-Modell), konnte dessen Bedeutung weiter untersucht werden. Der Phänotyp der RGE-Knock In-Maus ähnelte dem der α_5-Integrin-Knock Out-Maus. Die Embryonen starben nach zehn Tage *in utero* ab und wiesen eine geringere Größe sowie fehlende Somiten

im Schwanzbereich auf [85]. Die Assemblierung des typischen fibrillären Fibronektin-Netzwerkes *in vitro* war jedoch nicht gestört.

Wie hier dargelegt wurde, nehmen sowohl Matrixproteine wie die unterschiedlichen Kollagen-Typen und Fibronektin als auch Zell-Matrix-Rezeptoren aus der Integrin-Familie entscheidende Rollen in der Embryonal- und Knorpelentwicklung *in vivo* wie auch *in vitro* ein. Bislang existieren jedoch keine Daten zum Einfluss der Modulation der Wechselwirkung zwischen diesen Molekülen während der chondrogenen Differenzierung muriner ES-Zellen *in vitro*. Desweiteren bleibt der Mechanismus der inhibitorischen Wirkung RGD-enthaltender Peptide auf die Chondrogenese bislang ungeklärt.

2.6 Zielsetzung und Hypothesen

Die Zielsetzung dieses Promotionsvorhabens ist die Untersuchung der Rolle von Interaktionen zwischen Zellen und ihrer umgebenden Matrix vermittelt über RGD-bindende Integrine auf chondrogene Differenzierungs- und Dedifferenzierungsvorgänge. Als Modellsystem für die Chondrogenese wird die chondrogene Differenzierung muriner ES-Zellen verwendet. Hierfür stehen Wildtyp- und Fibronektin-Knock Out-ES-Zelllinien zur Verfügung. Für die Analyse chondrogener Dedifferenzierungsvorgänge wurde im Rahmen dieser Arbeit zudem ein Modellsystem basierend auf Primärkulturen isolierter muriner embryonaler Chondrozyten aus Rippenkäfigen etabliert. Zelluläre Differenzierungs- und Dedifferenzierungsprozesse werden anhand indirekter Immunfluoreszenzfärbungen, histochemischer Färbungen, Immunelektronenmikroskopie, Western Blotting, semi-quantitativer und quantitativer Real-Time-PCR untersucht.

Hypothesen:

1. Fibronektin und $\alpha_5\beta_1$-Integrin werden während früher chondrogener Differenzierungsstadien muriner ES-Zellen in hohem Maße exprimiert. Während der chondrogenen Differenzierung muriner ES-Zellen kann neben den maßgeblichen Komponenten der extrazellulären Knorpelmatrix, der Proteoglykane und Kollagen II, auch die Expression von "minor collagens" wie Kollagen IX und XI nachgewiesen werden.

2. Die Blockade der Wechselwirkungen zwischen Fibronektin und $\alpha_5\beta_1$-Integrin durch die Applikation RGD-enthaltender Peptide führt zu einer reduzierten chondrogenen Differenzierung muriner ES-Zellen.

3. Ein homozygoter Knock-Out des Fibronektin-Gens in murinen ES-Zellen führt ebenfalls zu einer reduzierten chondrogenen Differenzierung.

4. Die chondrogene Dedifferenzierung kann mittels eines Primärkultursystems analysiert werden. Während der Dedifferenzierung tritt eine Modulation der Expression von Fibronektin und/oder seinem zellulären Rezeptor, $\alpha_5\beta_1$-Integrin, auf.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Material	Hersteller
Aceton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Alcian blue 8GX	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München
Anti-FAK pY^{397}-Antikörper	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Anti-FAK-Antikörper	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Araldite	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München
AxioCam MRc5	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Axioplan 2, Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Axiovert 40C, inverses Mikroskop	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
AxioVision 4.6, Software	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
beta-Mercaptoethanol	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
bovines Serumalbumin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Bradford Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München
5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Chamber Slides	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
CO_2-Inkubator HeraCell	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. Co. KG, Bonn
CO_2-Inkubator US Autoflow	NuAire Inc., Plymouth, USA
DAPI	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München
DMEM-Basismedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DNA-Größenstandard	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
dNTP-Mix 1 mM	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
ECL-Kit	PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc., Rodgau

Einmalpipetten	Brand GmbH + CO KG, Wertheim
Elektronenmikroskop EM 400	Philips, Niederlande
Elektrophoresekammern für Western Blot	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Fetales Kälberserum "Research Grade FBS"	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. Co. KG, Bonn
Fibronektin, plasmatisch	Millipore Corporation, Billerica, USA
Fibronektin, zellulär	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München
Gelatine	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt
GRGDSP- und GRGESP-Peptide	AnaSpec Inc., Fremont, USA
Hepes	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
iCycler, quantitative Real Time-PCR	Bio-Rad Laboratories GmbH
ImageJ, Software	NIH, Bethesda, USA
Inkubator	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
KCl	Merck KGaA, Darmstadt
KH_2PO_4	Merck KGaA, Darmstadt
Kollagenase A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Kryoröhrchen	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
LAS-4000 mini	Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München
Leukemia inhibitory factor	Millipore Corporation, Billerica, USA
L-Glutamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
LSM 5 meta, CLSM-Mikroskop	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
LR White	Polysciences Inc. Europe, Eppelheim
Maxima Probe qPCR Master Mix	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
β-Mercaptoethanol	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Mitomycin C	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
$Na_2HPO_4 + 2\ H_2O$	Merck KGaA, Darmstadt
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt
NMRI-Mäuse für Zellisolation	Charles River Laboratories International Inc., Wilmington, USA
Non-essential Amino Acids MEM 100x	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NP40	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München
Nucleo Spin RNA II-Kit	Macherey-Nagel GmbH Co. KG, Düren

NucleoSpin Tissue-Kit	Macherey-Nagel GmbH Co. KG, Düren
Oligo dT-Primer	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München
Peanut-Agglutinin, FITC-markiert	Biomeda Corporation, Foster City, USA
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Phalloidin, Alexa Fluor 488-markiert	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München
Photometer BioMate3	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. Co. KG, Bonn
Pierce Protein G Agarose Beads	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. Co. KG, Bonn
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt AG Co., Nümbrecht
PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Primer	TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin
qPCR-Gerät iCycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
RevertAid H minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Sekundärantikörper	dianova GmbH, Hamburg
Sigma Plot 2000, Software	Systat Software GmbH, Erkrath
Spritzen Discardit II	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
Sterilfilter Stericup	Millipore Corporation, Billerica, USA
Taq-Polymerase	NatuTec GmbH, Frankfurt am Main
Triton-X 100	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München
Ultracut E Mikrotom	Reichert-Jung, Nussloch
Ultrafree-MC Centrifugal Filter Device	Millipore Corporation, Billerica, USA
Ultrostainer Carlsberg System	LKB, Bromma, Schweden
UV-Arbeitsplatz Fluo-Link	Bioblock Scientific AG, Frenkendorf, Schweiz
Vanadate	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München
Vecta Shield	VECTOR Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Vortex-Gerät TTS3 digital	IKA Works, Wilmington, USA
Wasserbad GFL	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Zellkulturmaterialien	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	TPP AG, Trasadingen, Schweiz

Zentrifuge (Zellkultur) CL-GPR	Beckman Coulter
Zentrifuge Biofuge Pico	Heraeus Instruments

3.2 Zellkulturlösungen

Alle Lösungen, die zur Behandlung von Zellen in Kultur eingesetzt wurden, wurden unter einer sterilen Werkbank angesetzt. Falls unsterile Substanzen zum Ansetzen verwendet wurden, so wurden diese vor dem Gebrauch sterilfiltriert.
Für die ES-Zell-Kulturmedien wurde das fetale Kälberserum für 30 min bei 54°C inaktiviert.

3.2.1 Nährmedien

- Kultivierungsmedium:

DMEM	409 ml
hitzeinaktiviertes FKS	75 ml
L-Glutamin	5 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
nicht-essentielle Aminosäuren	5 ml
β-Mercaptoethanol	1 ml

- 20%-Differenzierungsmedium:

DMEM	384 ml
hitzeinaktiviertes FKS	100 ml
L-Glutamin	5 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
nicht-essentielle Aminosäuren	5 ml
β-Mercaptoethanol	1 ml

- 0,2%-Differenzierungsmedium:

DMEM	483 ml
hitzeinaktiviertes FKS	1 ml
L-Glutamin	5 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
nicht-essentielle Aminosäuren	5 ml
β-Mercaptoethanol	1 ml

- Einfriermedium:

Kultivierungsmedium	9,2 ml
DMSO	800 µl

- MMC-Medium:

Kultivierungsmedium	6 ml
MMC	300 µl

- LIF-Medium:

Kultivierungsmedium	50 ml
LIF	25 µl

- 2xLIF-Medium:

Kultivierungsmedium	50 ml
LIF	50 µl

- Chondrozyten-Medium:

DMEM	440 ml
FKS	50 ml
L-Glutamin	5 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
nicht-essentielle Aminosäuren	5 ml
L-Ascorbinsäure	30 mg

3.2.2 Lösungen

- PBS:

NaCl	100 g
KCl	2,5 g
Na_2HPO_4 + 2 H_2O	14,4 g
KH_2PO_4	2,5 g

Die Stoffe wurden in 10 l deionisiertem Wasser gelöst, aliquotiert und anschließend autoklaviert.

- Trypsin/EDTA

2,5%-Trypsin	2 ml
1% EDTA	1 ml
PBS	97 ml

Die Lösung wurde sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

- 0,3%-Kollagenase-Lösung:

  Die benötige Menge an Kollagenase A wurde in DMEM gelöst und die Lösung anschließend sterilfiltriert. Die Lösung wurde stets frisch angesetzt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

- 0,1%-Gelatine-Lösung:

Gelatine	1 g
PBS	1000 ml

- TBE

Tris-Base	10,8 g
Borsäure	5,5 g
Na_2EDTA	0,75 g

  Die Stoffe wurden in 1000 ml H_2O dest. gelöst, sterilfiltriert und der pH auf 8,3 eingestellt.

- PCR-Probenpuffer:

Ficoll	1,5 g
1%-Bromphenolblau	100 µl
4M-LiCl	250 µl
0,5M-EDTA	400 µl

  Die Stoffe wurden in 10 ml H_2O dest. gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert und bei 4°C gelagert.

3.3 Grundlegende Zellkulturtechniken

Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Zellkulturen wurden in einem CO_2-Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert.

3.3.1 Beschichten von Zellkulturmaterialien mit Gelatine

Zellkulturschalen und sog. “Chamber Slides“ wurden mit Gelatine beschichtet, um ein Anhaften der Zellen zu ermöglichen. Dafür wurde der Boden der Gefäße mit 0,1%-Gelatine-Lösung überschichtet und diese über Nacht bei 4°C im Kühlschrank stehen gelassen. Die Gelatinelösung wurde am nächsten Tag abgesaugt und anschließend

1,5 ml (Chamber Slides) bzw. 4 ml (6cm-Schalen) des gewünschten Mediums vorgelegt.

3.3.2 Mediumwechsel

Da in den verwendeten Medien nur eine begrenzte Menge an Nährstoffen enthalten waren und diese von den Zellen innerhalb von 2-3 Tagen verbraucht wurden, wurde das Medium nach diesem Zeitraum ausgetauscht. Dafür wurde zunächst das Medium abgesaugt und anschließend durch frisches Medium ersetzt.

3.3.3 Waschen von Zellen mit PBS

Hierfür wurde das Medium abgesaugt und durch PBS ersetzt, welches wiederum abgesaugt wurde. Die letzten beiden Schritte wurden anschließend wiederholt. Das Waschen mit PBS dient dem vollständigen Entfernen des Mediums und der darin enthaltenen enzym-inaktivierenden Substanzen.

3.3.4 Auftauen von Zellen

Murine embryonale Fibroblasten ("Feeder Layer") und ES-Zellen wurden in speziellen Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert. Sie wurden zunächst schnell im Wasserbad aufgetaut und dann unter der sterilen Werkbank resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 6 ml Kultivierungsmedium gegeben und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, wurde das Zellpellet in 2 ml Medium gründlich resuspendiert und auf mit 0,1%-Gelatine beschichtete Zellkulturschalen gegeben.

3.3.5 Passagieren und Einfrieren von Zellen

3.3.5.1 Trypsinieren von Zellen

Um Zellen von Zellkulturmaterialien abzulösen, wurden diese zunächst zwei Mal mit PBS gewaschen und dann mit 2 ml Trypsin/EDTA überschichtet. Nach mikroskopischer Kontrolle des Ablösens der Zellen, wurde die Zellsuspension mit einer Pipette in 6 ml Kultivierungsmedium aufgenommen, in ein 10 ml Falcon-Gefäß überführt und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert.

3.3.5.2 Einfrieren von Zellen

Das Zellpellet, das nach dem Absaugen des Überstandes erhalten wurde, wurde gründlich resuspendiert, in 1 ml Einfriermedium aufgenommen, in ein Kryoröhrchen gegeben und bei -80°C eingefroren.

3.3.5.3 Passagieren von Zellen

Alternativ wurde das Zellpellet in 2 ml Medium aufgenommen, gründlich mit einer Pipette resuspendiert und auf die gewünschten, mit 0,1%-Gelatine-beschichteten Zellkulturmaterialien aufgebracht.

3.3.6 Zellzählung

Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA abgelöst, zentrifugiert und gründlich in 2 ml Medium resuspendiert. Der Zellsuspension wurden 10 µl entnommen und die enthaltenen Zellen in einer Neubauer-Zählkammer unter einem Mikroskop gezählt.

3.3.7 Inaktivierung muriner embryonaler Fibroblasten mit Mitomycin C

Um eine Interferenz der murinen embryonalen Fibroblasten (Feeder Layer) mit der Proliferations- und Differenzierungskapazität der ES-Zellen zu verhindern, wurden die Feeder Layer-Zellen mit dem Zytostatikum Mitomycin C (MMC) behandelt um eine Teilungsinaktivierung zu erreichen. Eingefrorene Feeder Layer-Zellen wurden aufgetaut und auf gelatine-beschichtete 10 cm-Zellkulturschalen plattiert. Bei Konfluenz wurden 6 ml MMC-Medium auf die Zellen pipettiert und diese für 150 min im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen, trypsiniert und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Kultivierungsmedium resuspendiert und die Zellen auf gelatine-beschichtete 6 cm-Schalen verteilt, die zuvor mit Kultivierungsmedium beschickt worden waren. Der zytotoxische MMC-Abfall wurde fachgerecht entsorgt.

3.4 Spezielle Zellkulturtechniken

3.4.1 Isolierung von murinen embryonalen Fibroblasten

Murine embryonale Fibroblasten wurden zur Kultivierung undifferenzierter embryonaler Stammzellen aus Mäuseembryonen isoliert. Hierfür wurden Mausembryonen 14-16 Tage nach der Verpaarung aus tragenden NMRI-Mäusen entnommen. Unter sterilen Bedingungen wurden Haut und Bauchfell eröffnet, der Uterus entfernt und in eine mit PBS gefüllte bakteriologische Petrischale platziert. Die Embryonen wurden präpariert und nach Entfernung des Kopfes und der Leber zunächst mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie für 30 min bei Raumtemperatur in 0,2%-Trypsin-Lösung bei gleichzeitiger mechanischer Einwirkung durch sterile Glasperlen enzymatisch vereinzelt. Die Suspension wurde durch ein steriles Sieb filtriert und dieses mit 10 ml Kultivierungsmedium gespült. Anschließend wurde das Filtrat bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Kultivierungsmedium aufgenommen, resuspendiert und auf gelatine-beschichtete 10 cm-Zellkulturschalen verteilt. Wenn ein konfluenter Zellrasen vorlag, wurden die Zellen trypsiniert und eingefroren.

3.4.2 Differenzierung von embryonalen Stammzellen *via* "Hängende Tropfen"

Zunächst wurden die embryonalen Stammzellen der Linie BLC-6 [100] auf mit MMC inaktivierten embryonalen Fibroblasten kultiviert, um eine Vermehrung im undifferenzierten Stadium zu ermöglichen. Dies wird durch den "Leukemia Inhibitory Factor" (LIF), einen Faktor, der durch die Fibroblasten sezerniert und zusätzlich dem Medium beigefügt wird, erreicht. War ein konfluenter Zellrasen und damit eine ausreichende Zellzahl erreicht, so wurden die Zellen durch eine Trypsin/EDTA-Lösung von den Kulturschalen abgelöst und abzentrifugiert.
Nach einer Zellzahlbestimmung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer erfolgte die Verdünnung auf eine Zellzahl von 800 Zellen pro 20 µl (40.000 Zellen pro ml). In den Boden einer 10 cm-Kulturschale wurden mit einer 20 µl-Pipette 60-70 Tropfen pipettiert. Durch das Umdrehen der Schale und die folgende Kultivierungszeit erreichte man, dass sich die Zellen, der Schwerkraft folgend, am tiefsten Punkt des Tropfens sammelten und dort Aggregate - die sogenannten "embryoid bodies" (EBs) - bildeten. In den Deckel der 10 cm-Schale wurde ein Deckel einer 6 cm-Schale platziert, der 5 ml PBS enthält. Diese Maßnahme sorgt für ein feuchtes Milieu und wirkt der Verdunstung entgegen.

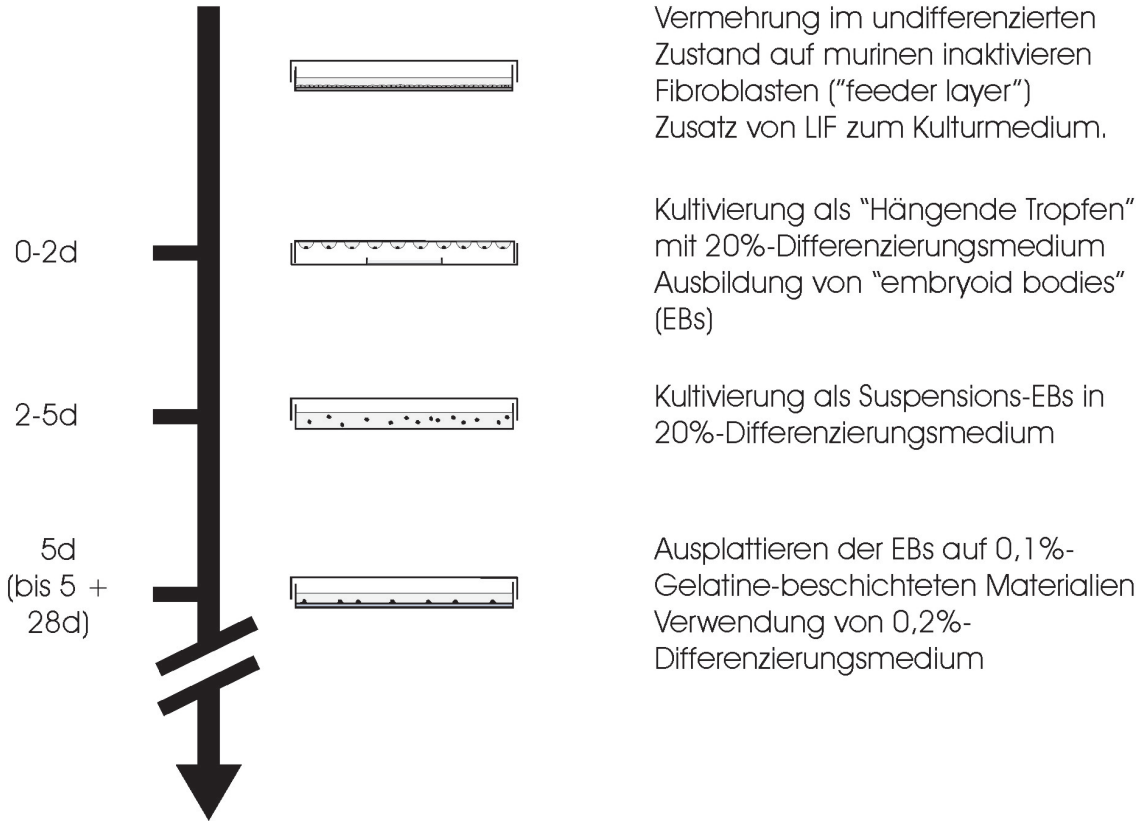

Abbildung 5: Kultivierung und Differenzierung von murinen ES-Zellen als Hängende Tropfen. LIF = Leukemia Inhibitory Factor.

Nach zwei Tagen (2d) wurden die EBs in Suspensionskultur überführt, indem nach dem Entfernen der PBS-Schale der Boden der Kulturschale mit den Hängenden Tropfen umgedreht wurde und 10 ml 20%-Differenzierungsmedium hinzugegeben wurden. Fünf Tage nach Versuchsbeginn (5d) wurden die Suspensions-EBs mit einer 100 µl-Pipette aus der Suspension kollektiert und auf 0,1%-Gelatine-beschichtete 6 cm-Kulturschalen (je 10 EBs) und Chamber Slides (je 5 EBs pro Vertiefung) gegeben, die zuvor mit 0,2%-Differenzierungsmedium beschickt wurden. Die EBs wurden bis zu 28 Tage (5 + 28d) kultiviert, das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt. Die Kultivierung als Hängende Tropfen ist in Abbildung 5 grafisch dargestellt.

3.4.3 Behandlung von EBs mit Integrin-blockierenden Peptiden

Zur Untersuchung der Bedeutung des Matrixproteins Fibronektin und seiner Wechselwirkung mit $\alpha_5\beta_1$-Integrin wurden Integrin-blockierende Peptide eingesetzt, die das RGD-Motiv (G**RGD**SP) enthalten, das als zentrale Zellbindungsdomäne des Fibronektins angesehen wird. Als Kontrollpeptide wurden Peptide verwendet, die gegenüber

den blockierenden Peptiden in einer Aminosäure verändert waren (G**RGE**SP). Da die bisher publizierten Arbeiten [2, 24, 53, 54, 87] eine Beteiligung von Fibronektin während der Formation mesenchymaler Kondensationen nahelegen, wurden die Peptide den EBs der ES-Zelllinie BLC-6 im Differenzierungszeitraum 5 + 4d bis 5 + 7d hinzugefügt. Dieser Zeitraum der EB-Kultivierung konnte als typisch für das Auftreten mesenchymaler Kondensationen charakterisiert werden [40]. Beide Peptide wuden in einer Konzentration von 100 µg/ml angewendet. Als weitere Kontrolle wurden unbehandelte EBs der ES-Zelllinie BLC-6 benutzt.
Um ungebundene Petide zu entfernen, wurden die EBs (auch unbehandelte Kontroll-EBs) an Tag 5 + 7d ein Mal mit PBS gespült.

3.4.4 Gewinnung von Chondrozyten aus embryonalem Rippenknorpel

Zum Vergleich der im ES-Zellkultursystem gewonnenen Daten sowie der Analyse chondrogener Dedifferenzierungsvorgänge wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zur Gewinnung von primären Knorpelzellen aus embryonalem Rippenknorpel nach einem modifizierten Protokoll von Thirion und Berenbaum [89] etabliert.
Die Entnahme von Embryonen aus tragenden NMRI-Mäusen erfolgte am 19. Tag nach der Verpaarung. Mit sterilem Besteck wurden die Haut sowie das Peritoneum durchtrennt. Der Uterus wurde von seinen Mesenterien befreit und in eine mit PBS gefüllte bakteriologische Petrischale gegeben. Die Embryonen wurden präpariert und wiederum in eine weitere mit PBS gefüllte Petrischale gegeben. Unter Zuhilfenahme eines Präparationsmikroskops wurde der Rippenkäfig der Embryonen entfernt und nach dreimaligem Waschen mit PBS für 90 min bei 37°C in einem Brutschrank in einer 0,3%-igen Kollagenase A in Chondrozyten-Medium inkubiert.
Durch mehrmaliges Waschen mit PBS wurden Bindegewebsreste entfernt. Die Rippenkäfige wurden für sechs Stunden mit 0,3%-iger Kollagenase A-Lösung in Chondrozyten-Medium bei 37°C in einer bakteriologischen Petrischale inkubiert, so dass nur noch die Rippenkäfige unverdaut blieben. Die Zellsuspension wurde sorgfältig von den verbliebenen, unverdauten Fragmenten getrennt und in ein 50 ml-Falcon-Gefäß gegeben. Die isolierten Chondrozyten wurden zwei Mal mit PBS und ein Mal mit Chondrozyten-Medium gewaschen und anschließend in einer Dichte von 10^5 Zellen pro cm^2 auf gelatine-beschichteten Zellkulturschalen bzw. Chamber Slides ausplattiert.

3.4.5 Aufreinigung und *in vitro*-Differenzierung einer homozygot Fibronektin-defizienten ES-Zelllinie

Im Rahmen einer Kooperation wurde uns freundlicherweise von Dr. Roy Hynes (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA) die homozygote Fibronektin-Knock Out-ES-Zelllinie 129/3 zur Verfügung gestellt. Die Generierung dieser Zelllinie wurde bereits publiziert [26], die Methodik ist in Abbildung 6 A graphisch dargestellt. Das Konstrukt enthält zwischen zwei *Sma1*-Restriktionsstellen ein Neomycin-Resistenzgen unter der Kontrolle des Phosphoglyceratkinase (PGK)-Promoters, dass das Startcodon und Teile des ersten Exons ersetzt. Desweiteren wurde ebenfalls mit einem PGK-Promoter ein Thymidinkinase-Gen, das eine Resistenz gegenüber Ganciclovir verleiht, zwischen einer *HindIII* und einer *SalI*-Restriktionsstelle eingefügt. ES-Zellen der Linie D3 wurden mittels Elektroporation transfiziert und Klone mit Doppelresistenz selektiert. Mittels PCR konnte im Rahmen dieser Arbeit die Insertion des Neomycingenes nachgewiesen werden (s. Abb. 6 B; Primer und Durchführung s. Abschnitt 3.10).

Bei der anfänglichen Kultivierung in unserem Institut stellte sich eine Kontaminierung der Zelllinie, am ehesten durch Fibronektin-sezernierende Feeder Layer-Zellen heraus. Um eine Beeinflussung des Differenzierungs- und Proliferationspotentials der Fibronektin-Knock Out-Zellen sicher ausschließen zu können, führten wir eine Subklonierung durch. Hierfür wurden die Zellen auf 0,1%-Gelatine-beschichteten 10cm-Zellkulturschalen in 2xLIF-Medium ausplattiert, um auch in der Abwesenheit von Feeder Layer-Zellen ein Verbleiben im undifferenzierten Zustand zu sichern. Die geringe Zelldichte machte es möglich mit Hilfe eines inversen Mikroskops unter Sicht mit einer 20 µl-Pipette einzelne Kolonien (klonale Zellansammlungen) zu isolieren. Diese Kolonien wurden anschließend durch Trypsin-Anwendung vereinzelt, auf 24-Well-Platten ausgesät und wiederum mit 2xLIF-Medium kultiviert. Anhand von RT-PCR-Analysen für Fibronektin wurde der Klon mit der geringsten Kontamination (gemessen an der mRNA-Expression von Fibronektin) ausgewählt und anschließend weiter passagiert, um den Einfluss der teilungsinaktivierten Feeder Layer-Zellen zu minimieren.

Die *in vitro*-Differenzierung wurde als Hängende Tropfen (s. Abschnitt 3.4.2) durchgeführt. Um eine erneute Kontamination mit Fibronektin zu verhindern, wurden die undifferenzierten ES-Zellen ohne Feeder Layer in 2xLIF-Medium vermehrt.

Als Kontrolle wurde die ES-Zellline D3 [18] verwendet, aus der die Fibronektin-defiziente Zelllinie generiert wurde.

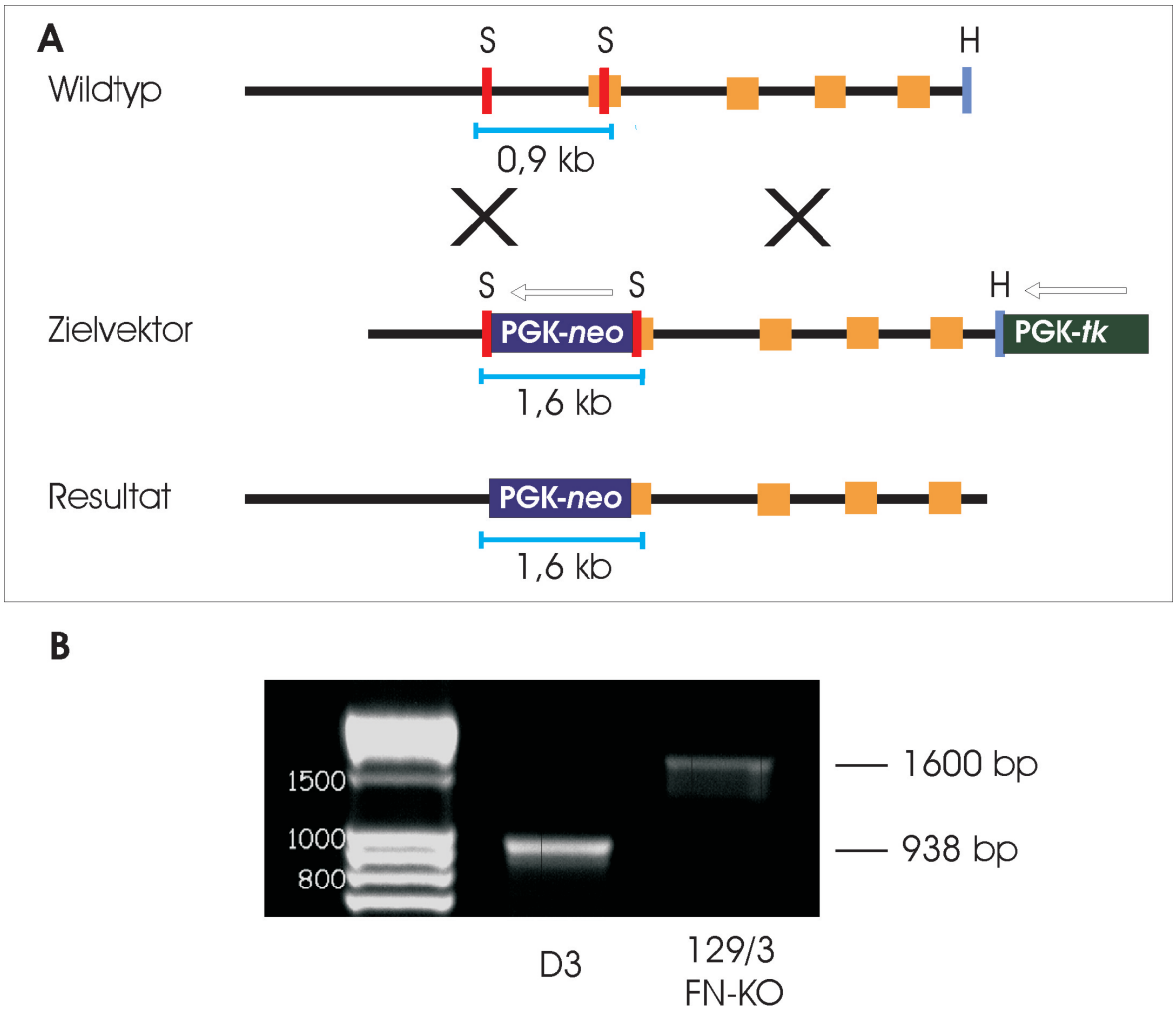

Abbildung 6: Generierung einer Fibronektin-defizienten ES-Zelllinie. Zwischen zwei *Sma1*-Restriktionsstelle (S) wurde ein Neomycin-Resistenzgen (neo) unter der Kontrolle des Phosphoglyceratkinase-Promoters (PGK) eingefügt, darüber hinaus findet sich ein Thymidinkinase-Gen (tk) ebenfalls unter einem PGK-Promoter zwischen einer *HindIII*- (H) und einer *SalI*-Schnittstelle (S). Durch die Insertion des *neo*-Gens werden Teile des ersten Exons (gelb) inklusive des Startkodons ersetzt. Die Ableserichtung ist mit einem Pfeil dargestellt (A, nach [26]). DNA-Fragmente aus undifferenzierten Wildtyp (D3) und Fibronektin-Knock Out-ES-Zellen (129/3, FN-KO), die mittels PCR amplifiziert wurden, sind in hellblau abgebildet. Die Ergebnisse der PCR zum Nachweis der Knock Out-Gens sind unter B dargestellt.

3.4.6 Behandlung von Fibronektin-Knock Out-ES-Zellen mit Fibronektin

Um den Einfluss von Fibronektin auf die *in vitro*-Differenzierung homozygot Fibronektin-defizienter ES-Zellen zu untersuchen, wurden diese mit Fibronektin-supplementiertem Medium behandelt. Hierfür wurde dem Zellkulturmedium während der Kultivierung als Hängende Tropfen und während der Suspensionskultur humanes Plasma-Fibronektin bzw. zelluläres Fibronektin in einer Konzentration von 10 µg/ml hinzugefügt. Als Kontrollen dienten unbehandelte EBs der Fibronektin-Knock Out-Zelllinie sowie die Wildtyp-ES-Zelllinie D3.

3.4.7 Größenbestimmung von EBs

ES-Zellen der Zelllinien 129/3 und D3 wurden *via* Hängende Tropfen differenziert. Während der Suspensionskultur-Phase wurden an zwei Zeitpunkten (2d und 5d, siehe Abb. 5) jeweils 20 EBs mittels des inversen Mikroskopes Axiovert 40C und der Kamera MRc5 fotografiert und der Durchmesser der EBs mit dem Programm AxioVision 4.6 ausgemessen. Die EBs wurde anschließend ausplattiert, für bis zu 14 Tage kultiviert und auch während dieses Zeitraumes alle zwei Tage fotografiert.

3.5 Immunfluoreszenzfärbungen

Um die Expression bestimmter Differenzierungsmarker auf Protein-Ebene untersuchen zu können, wurden indirekte Immunfluoreszenzfärbungen erstellt. Dafür wurden EBs auf Chamber Slides mit zwei Vertiefungen kultiviert. Die Zellen wurden erst mit einem Antikörper, der gegen das gewünschte Protein gerichtet war (dem sog. Primärantikörper), inkubiert, und anschließend mit einem Antikörper, der gegen die Herkunftsspezies des Primärantikörpers gerichtet und mit einem Fluorochrom gekoppelt war (Sekundärantikörper). Es wurden hauptsächlich Doppelfärbungen (gegen zwei Antigene) erstellt, als Fluorochrome wurden FITC (grün) und Cy3 (rot) verwendet. Darüberhinaus wurden in jedem Präparat die Zellkerne mit dem in DNA-Moleküle interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blau) gegengefärbt. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 1 und 2 dargestellt. Um eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers auszuschließen, wurden als Kontrolle Färbungen ohne Primärantikörper durchgeführt (s. Abb. 7.

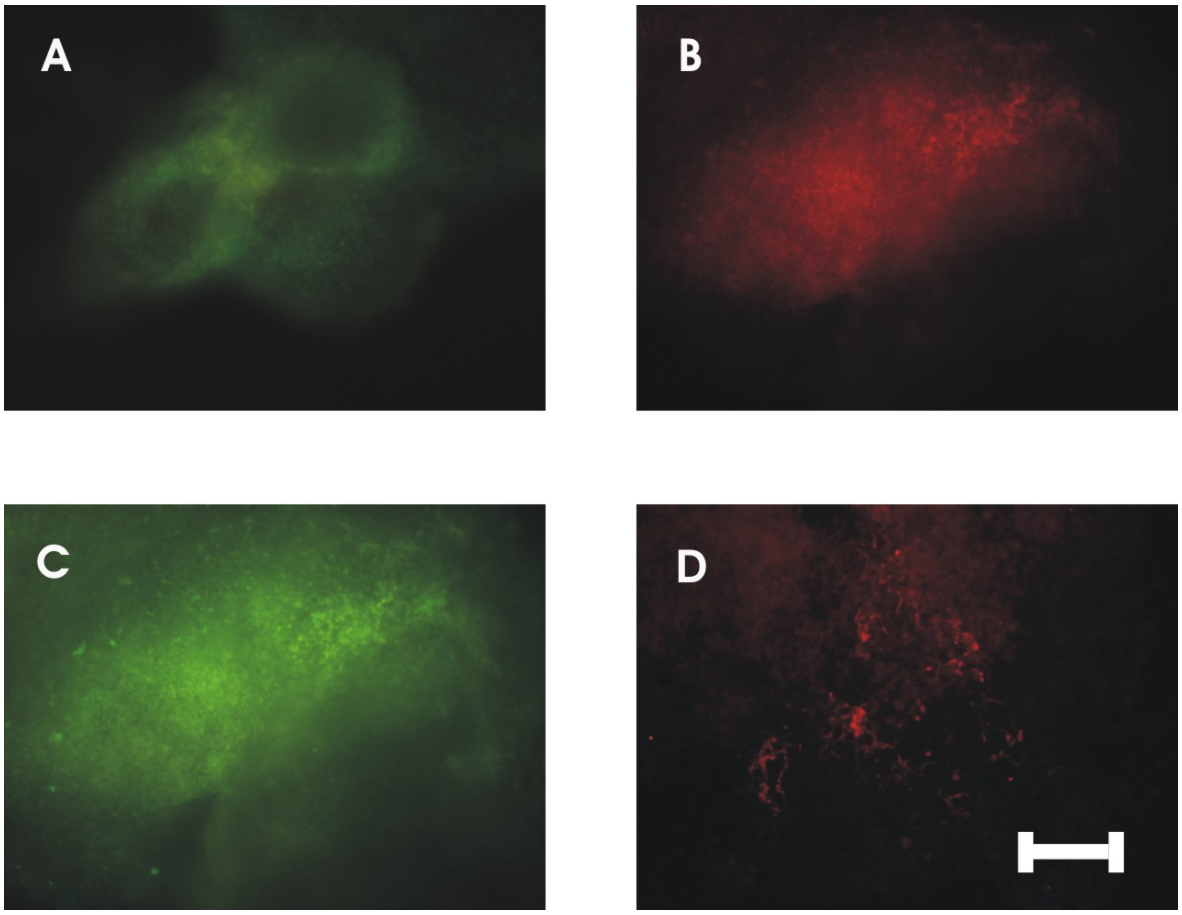

Abbildung 7: Immunfluoreszenzfärbungen ohne Primärantikörper als Negativkontrolle. Abgebildet sind Färbungen von EBs mit speziesspezifischen Sekundärantikörpern gegen Kaninchen- (A), Ziegen- (B) und Maus- (C) und Rattenantigene (D). Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 aufgeführt. Balken = 100 µm.

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper

Antigen	Klonalität	Spezies	Firma	Name	Verdünnung
alpha$_5$-Integrin	mono	Ratte	scbt	sc-52594	1:50
Fibronektin	poly	Ziege	scbt	sc-6953	1:50
Kollagen I	poly	Kaninchen	scbt	sc-28654	1:50
Kollagen II	mono	Maus	DSHB	II-II6B3	1:50
Kollagen IX	poly	Kaninchen	Calbiochem	234194	1:50
Kollagen XI	poly	Kaninchen	Cosmo Bio Co.	LSL-LB-1110	1:50
MMP-3	poly	Ziege	scbt	sc-6839	1:50

Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper

Antigen	Fluorochrom	Spezies	Firma	Verdünnung
Maus IgG	FITC	Kaninchen	dianova	1:200
Kaninchen IgG	Cy3	Ziege	dianova	1:600
Kaninchen IgG	FITC	Ziege	dianova	1:200
Ziege IgG	Cy3	Kaninchen	dianova	1:600
Ratte IgG	Cy3	Esel	dianova	1:600

Zunächst wurde das Medium abgesaugt und das Präparat zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Präparat mit 500 µl eiskaltem Methanol-Aceton (Verhältnis 7:10) fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden 300 µl 7,5 % BSA in PBS für 30 min bei Raumtemperatur aufgebracht, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Nun wurde der/die gewünschte/n Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung aufgetragen (300 µl pro Vertiefung des Chamber Slides) und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Im folgenden wurde nach viermaligem Waschen der/die passende/n Sekundärantikörper hinzugegeben und wiederum für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Um die Zellkerne darzustellen, wurde das Präparat anschließend mit 300 µl DAPI in PBS (Verdünnung 1:1000) versetzt und für 5 min bei 37°C inkubiert. Durch erneutes viermaliges Waschen mit PBS wurde die nicht gebundenen Farbstoffe entfernt. Chamber und Silikon wurden mit einem Skalpell entfernt, das Präparat anschließend mit VectaShield eingedeckt und mit einem Deckglas versehen. Untersucht wurden die Präparate mit einem Axioplan 2-Mikroskop und der Kamera MrC5. Die Analyse mittels konfokaler Laser Scanning-Mikroskopie (CLSM) wurde mit einem LSM 5 meta-Gerät in Kooperation mit dem Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck (PD Dr. med. Matthias Klinger; Direktor Prof. Dr. med. Jürgen Westermann) durchgeführt.

3.6 Phalloidin-Färbungen

Phalloidin ist ein Toxin des Grünen Knollenblätterpilzes. Es bindet bevorzugt an filamentäres Aktin und stabilisiert so das Aktin-Zytoskelett. Fluoreszenz-markierte Phalloidin-Derivate ermöglichen die Visualisierung der zellulären Mikrofilamente [103]. Die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend für 20 min bei Raumtemperatur mit 1 ml 4%-igem Paraformaldehyd fixiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen wurden die Zellen mit 1 ml 1%-Triton X-100 über 10 min bei Raumtemperatur permeabilisiert um das Eindringen von Phalloidin zu ermöglichen. Unspezifische Bindungsstellen wurden nun durch eine halbstündige Inkubation mit 1%-FKS in PBS

geblockt, bevor dann die Inkubation mit 100 µl Alexa Fluor 488-markiertem Phalloidin bei 37°C für eine Stunde erfolgte.
Um die zytoskelettale Organisation von Chondrozyten beurteilen zu können, erfolgte eine Ko-Immunfluoreszenzfärbung gegen Kollagen II wie oben (s. 3.5) beschrieben. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt, die Präparate mit VectaShield eingedeckt und mit einem Deckglas verschlossen. Die mikroskopische Analyse erfolgte analog zu der der indirekten Immunfluoreszenzfärbungen.

3.7 Bromdesoxyuridin-Assay zur Bestimmung der zellulären Proliferation

- Fixierungslösung: (pH 2,0)

Ethanol abs.	70 ml
Glycin (50 mM)	ad 100 ml

Bromdesoxyuridin (BrdU), ein Analogon des Pyrimidin-Nukleosids Thymidin, wird in seiner phosphorylierten Form als Nukleotid in die DNA proliferierender Zellen eingebaut. Durch einen Immunfluoreszenzassay wurde inkorporiertes BrdU fluoreszenzmikroskopisch in primären murinen embryonalen Chondrozyten nachgewiesen. Zur Anwendung kam das "5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit I".
Für diesen Assay wurden die Zellen auf Chamber Slides kultiviert. Zum gewünschten Zeitpunkt nach der Isolation wurde in jede Vertiefung 1,5 ml frisches Chondrozytenmedium und 1,5µl BrdU Labeling reagent gegeben und die Zellen bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nachdem die Chamber Slides drei Mal mit der beigefügten Waschlösung gewaschen worden waren, wurden je 500µl Fixierungslösung in jede Vertiefung des Chamber Slides gegeben und 20 min bei -20°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden je 300µl Anti-BrdU-Antikörper-Lösung hinzugegeben und 30 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Mit 300 µl Anti-Maus-Ig-FITC-Lösung (Sekundärantikörper) und 0,3 µl DAPI wurde, nachdem der Primärantikörper durch drei Waschschritte entfernt worden war, 30 min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Es folgten drei abschließende Waschschritte und das Eindecken mit VectaShield-Medium.
Die Präparate wurden mit einem Axioplan 2-Mikroskop und der Kamera MrC5 analysiert. Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurden mit dem Programm AxioVision 4.6 Aufnahmen mit dem 10x-Objektiv erstellt und die Anzahl der Zellkerne mit einem

positiven (grünen und blauen) Fluoreszenzsignal durch die Gesamtanzahl der DAPI-gefärbten (blauen) Zellkerne geteilt.

3.8 Alcianblau-Färbung

- Alcianblau-Färbelösung:

Alcian blue 8 GX	0,25 g
NaCl	4,5 g
MgCl	6,4 g
Essigsäure	500 ml

  Die Lösung wurde filtriert und der pH auf 1,5 eingestellt.

Mithilfe der Alcianblau-Färbung wurden Proteoglykane des Knorpelgewebes histochemisch dargestellt [40, 73].
Die auf 6 cm-Schalen kultivierten EBs wurden zwei Mal mit PBS gewaschen und mit 3,7%-Formaldehyd-Lösung für 30 min fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schalen mit Alcianblau-Färbelösung überschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schalen drei Mal mit PBS gewaschen und bis zur mikroskopischen Auswertung mit PBS überschichtet. Aufnahmen der Knorpelnodules wurden mit dem Mikroskop Axiovert 40c und der Kamera MRc5, sowie dem zugehörigen Programm Axiovision 4.6. erstellt und ausgewertet.

3.9 Elektronenmikroskopie

Die Probenaufarbeitung und -analyse wurden in Kooperation mit PD Dr. med. Matthias Klinger (Institut für Anatomie, Universität zu Lübeck; Direktor Prof. Dr. med. Jürgen Westermann) durchgeführt.

3.9.1 Immunelektronenmikroskopie

Die Proben wurden für eine Stunde bei 22°C mit Paraformaldehyd (2%) und Glutaraldehyd (0,05%) in PBS fixiert. Es folgten drei Waschschritte mit Sucrose (3,5%) in PBS und eine Inkubation in PBS mit Ammoniumchlorid und Sucrose (50 mM) für eine Stunde bei 0°C. Nach dreimaligem Waschen mit MBS (0,1 M Maelatpuffer, 3,5%-Sucrose, pH 6,5) schloss sich die Postfixierung mit 2% Uranylacetat in MBS an und

erneutes Waschen mit MBS an. Zur Vorbereitung der Einbettung wurde eine Dehydrierung mit einer Ethanol-Verdünnungsreihe (50%, 70%, 90%, 100% Ethanol, je 20 min) durchgeführt. Die Einbettung in das Acrylharz LR White wurden die Proben nacheinander mit einer Mischung aus Ethanol und LR White im Verhältnis 2:1 (30 min), 1:1 (30 min) und reinem LR White (60 min) bei 22°C) inkubiert. Die Polymerisierung des Harzes erfolgte durch erneute Hinzugabe von LR White und eine Inkubation bei 50°C für einen Tag.
Ultradünnschnitte wurden mit Hilfe eines Ultracut E erzeugt und anschließend auf Nickel-Rastern platziert, mit drei Tropfen Tris-Puffer (0,1 M Tris-HCl, 100 mM NaCl, TBS, pH 7,4) für 30 min gespült und unspezifische Bindungsstellen mit 0,5% BSA in PBS geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (s. Tabelle 1, Verdünnung 1:10 für Kollagen II, 1:50 für Kollagen XI und 1:100 für Kollagen I und IX, jeweils in TBS) erfolgte für 18 Stunden bei 22°C. Der Sekundärantikörper (Verdünnung 1:250 in TBS; IgG gekoppelt mit 12 nm Goldpartikeln) wurde nach Waschen mit 5 Tropfen TBS für 30 min für zwei Stunden hinzugefügt. Anschließend wurden die Schnitte erneut mit 5 Tropfen TBS für 30 min gespült und die Antigen-Antikörper-Komplexe mit 2% Glutaraldehyd 5 min lang stabilisiert. Nach einmaligen Waschen mit 3 Tropfen destilliertem Wasser erfolgte die Färbung der Schnitte mit Uranylacetat und Bleicitrat. Die Untersuchung der Schnitte wurde mit dem Elektronenmikroskop EM 400 bei 60 kV durchgeführt.

3.9.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Zellen, die auf Chamber Slides kultiviert wurden, wurden für eine Stunde mit 2,5%-Glutaraldehyd in 0,1-molarem Cacodylat-Puffer fixiert. Anschließend wurden die Proben für zwei Stunden mit OsO_4 zur Postfixierung behandelt und in einer Ethanolreihe (s.o.) dehydriert. Die Einbettung erfolgte in Araldite.
Ultradünnschnitte wurden mit Hilfe eines Ultracut E, für 20 min mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt und mit dem Elektronenmikroskop EM 400 bei 60 kV untersucht.

3.10 Analyse von genomischer DNA und Genexpression

3.10.1 Extrahierung genomischer DNA

Die Gewinnung von genomischer DNA aus ES-Zellen erfolgte mit dem NucleoSpin Tissue-Kit. Die Lysierung der Zellen erfolgt zunächst durch eine Inkubation mit Proteinase K und Natriumdodecylsulfat. Nach Hinzufügen von Ethanol und chaotropen Salzen werden die Nukleinsäuren auf Silikamembranen in Säulen geladen. Nach mehreren Waschschritten erfolgt die Elution mit einem alkalischen Puffer.
Die Zellen wurden zunächst zwei Mal mit PBS gewaschen, mit 200 µl T1-Puffer versetzt, mit einem Zellschaber abgelöst und in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. Nachdem 25 µl Proteinase K-Lösung und 180 µl B3-Puffer hinzugefügt wurden, wurde der Ansatz bei 70°C für 10 bis 15 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Probe mit 200 µl Ethanol (96-100%) mit einem Vortex vermischt, auf eine mitgelieferte Säule gegeben und eine Minute bei 11.000 rpm zentrifugiert. Der Durchsatz wurde verworfen und die Säule anschließend jeweils ein Mal mit 500 µl BW-Puffer bzw. mit 600 µl B5-Puffer beschickt und danach jeweils 1 min bei 11.000 rpm zentrifugiert. Zur Trocknung der Membran erfolgte ein letzter Zentrifugationsschritt für eine Minute bei 11.000 rpm, dann wurde die genomische DNA mit 100 µl vorgewärmtem BE-Puffer durch Zentrifugation bei 11.000 rpm für eine Minute eluiert. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

3.10.2 RNA-Isolation

Um Analysen der Genexpression mittels RT-PCR durchführen zu können, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die gesamte RNA unter Verwendung des NucleoSpin RNA II-Kits aus den kultivierten Zellen isoliert.
Die Zellen werden zunächst durch chaotrope Substanzen lysiert und gleichzeitig RNA-verdauende Enzyme (RNAsen) inaktiviert. Die Nukleinsäuren werden auf in Säulen angeordnete Silikamembranen geladen. Genomische DNA wird durch den Zusatz einer rekombinanten DNAse verdaut. Nach mehreren Waschschritten, die der Entfernung von Salzen und makromolekularen Zellbestandteilen dienten, wird die RNA mit RNAse-freiem Wasser eluiert.
Die ES-Zellen wurden nach der Suspensionskultur auf 6 cm-Schalen bzw. 6-Well-Platten ausplattiert. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Auf die Schale wurden anschließend 3,5 µl β-Mercaptoethanol und 350 µl RA1-Puffer gegeben und die EBs mit Hilfe eines Zellschabers gelöst. Die entstandene

Tabelle 3: Pipettierschema für das Primerannealing bei der Reversen Transkription

Substanz	Volumen
RNA	500 ng
Oligo-dT-Primer	1µl
DEPC-H_2O	ad 12,5µl

Suspension wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei -20°C gelagert.
Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und auf die erste Säule pipettiert. Durch einminütige Zentrifugation bei 11.000 rpm wurde die Zellsuspension filtriert. Um eine Denaturierung und hierdurch die Bindung der RNA an die Silikamembran zu erreichen, wurden dem Filtrat 350 µl 70%-Ethanol hinzugefügt und die Probe durch Vortexen gut vermischt. Im nächsten Schritt erfolgte die Beladung der Membran: Die Probe wurde auf die Säule pipettiert und 30 s bei 11.000 rpm zentrifugiert. Um den Verdau der genomischen DNA zu ermöglichen, wurde die gebundene RNA mit 350µl "Membrane Desalting Buffer" gewaschen, d.h. 1 min bei 11.000 rpm zentrifugiert. Der Verdau erfolgte nach Zugabe von 95µl DNAse-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur. Diesem Schritt schlossen sich drei Waschschritte mit 200µl RA2 und 600µl RA3 für jeweils 30 s sowie mit 250µl RA3 für 2 min bei 11.000 rpm an. Die Eluierung erfolgte mit 60µl RNAse-freiem Wasser für 1 min bei 11.000 rpm.
Die auf diese Weise aufgereinigten RNA-Proben wurden bei -20°C gelagert.

3.10.3 Reverse Transkription

Die durch die RNA-Isolation gewonnenen Proben wurden für die anschließende Vervielfältigung mittels PCR zunächst enzymatisch von RNA zu DNA umgeschrieben, also revers transkribiert. Um selektiv die mRNA in sog. "copy DNA" (cDNA) zu transkribieren, wurde ein Oligo-dT-Primer verwendet, der an den 3'-Poly-A-Schwanz der mRNA bindet.
Zur Verwendung kam das Kit "'RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis". Alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:50 mit RNAse-freiem Wasser verdünnt. In einem Photometer wurde die Extinktion bei 260 nm (RNA) sowie bei 280 nm (DNA) ermittelt. Das Verhältnis von RNA zu DNA als Maß für die Reinheit der Proben sollte 1,7 bis 2,0 betragen. Anhand der Extinktion bei 260 nm lässt sich die RNA-Konzentration in der jeweiligen Probe errechnen. Für die Reverse Transkription wurden jeweils 500 ng RNA eingesetzt. Das Pipettierschema ist in Tabelle 3 aufgeführt. Der Ansatz wurde anschließend 5 min lang bei 65°C inkubiert.

Tabelle 4: Pipettierschema für die Reverse Transkription

Substanz	Volumen
5x Reaktionspuffer	4µl
RNAse-Inhibitor	0,5µl
dNTP-Mix	2µl
Reverse Transkriptase	1µl

Die hybridisierten Proben wurden nun mit der Reversen Transkiptase, Desoxynukleotiden und Reaktionspuffer versetzt (siehe Tabelle 4) und 60 min bei 42°C inkubiert. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.10.4 Semiquantitative Polymerasekettenreaktion und Agarose-Gelelektrophorese

Die gewonnene genomische DNA bzw. cDNA wurde anschließend mittels Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) amplifiziert. Bei dieser Methode macht man sich die temperaturabhängige DNA-Amplifikation durch die DNA-Polymerase des Organismus *Thermophilus aquaticus* zunutze. Die sog. *taq*-Polymerase amplifiziert DNA in einem hohen Temperaturbereich. Zur Verwendung kommen sequenzspezifische Primer, die bei einer definierten Temperatur (Annealing-Temperatur) mit der Proben-DNA bzw. cDNA (engl. template) hybridisieren und als Anknüpfungspunkt für die Synthese des komplementären Stranges dienen. Durch zyklische Temperaturveränderungen werden wiederholt die Schritte DNA-Denaturierung, Primerannealing und Amplifikation durchlaufen. So findet eine exponentielle Vervielfältigung des zwischen den beiden Primern liegenden DNA-Abschnittes statt. Der Ablauf wurde wie folgt durchgeführt:

1. Initiale Denaturierung (95°C, 2min)
2. 40 Zyklen:
   a) Denaturierung (95°C, 40 s)
   b) Annealing (primerspezifische Temperatur, 40 s; s. Tabelle 6)
   c) Amplifikation (72°C, 40 s)
3. Abschließende Amplifikation (72°C, 8 min)
4. Herunterkühlen (4°C, 10 min)

Tabelle 5: Pipettierschema für die semiquantitative PCR

Substanz	Volumen
Puffer	2,5µl
Primer	je 1,25µl
dNTP-Mix (10µM)	1µl
taq-Polymerase	0,25 µl
cDNA	0,25µl
DEPC-H_2O	18µl

Tabelle 6: Verwendete Primer für die semiquantitative PCR

Marker	Primersequenz	Fragment [bp]	Annealing [°C]
α_5-Integrin	-AATGGTGTCCCGTTGTGG- -GAGGTGGCTGGAGGCTTG-	157	61
Fibronektin	-GGACCCCTCCTGATAGTGTG- -GTGGCTTTGGGACTCTGCT-	457	67
Fibronektin (Knock Out)	-GGAAAAGCACCCAGAAGGAG- -TCACGCTTGCTCTGACTGAC-	938	61
GAPDH	-GGAGGGCTCATGACCACA- -CCGTTCAGCTCTGGGATGAC-	159	62
Kollagen X	-ATGCCTTGTTCTCCTCTTACTGGA- -CTTTCTGCTGCTAATGTTCTTGACC-	164	61
MMP-3	-TGATGAACGATGGACAGAGG- -GAGAGATGGAAACGGGACAA-	159	55

Die verwendeten, sequenzspezifische Primer sowie die jeweilige spezifische Annealingtemperatur sind in Tabelle 6 aufgelistet. Sie wurden unter Zuhilfenahme des frei verfügbaren Programmes Primer3 [74] generiert und von der Firma TIB MOLBIOL synthetisiert. Um bei der Analyse der mRNA-Expression die Amplifikation genomischer DNA zu vermeiden, wurden Exon-übergreifende Primer verwendet.
Alle benötigten Substanzen wurden auf Eis aufgetaut und nach dem in Tabelle 13 aufgeführten Schema zusammengeführt. Als Positiv- bzw. Negativkontrollen wurden cDNA aus 16 Tage alten Mäuseembryonen und DEPC-behandeltes Wasser anstelle der Proben-cDNA verwendet.

Zur Analyse der amplifizierten cDNA-Abschnitte wurden die Fragmente in einem 2%-Agarosegel ihrer Länge nach aufgetrennt. Um die amplifizierten cDNA sichtbar zu machen, wurde dem Gel Ethidiumbromid hinzugesetzt. Ethidiumbromid ist ein in die DNA interkalierender Farbstoff, durch den die Fragmente bei UV-Licht sichtbar gemacht werden können.
2 g Agarose wurden in 100 ml TBE-Puffer gegeben, erhitzt bis die Agarose sich löste

und anschließend 2,5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Das Gel wurde nun in eine Form gegossen, in der es erhärten konnte. Es wurden Kämme eingesetzt, um Probenkammern im Gel zu erzeugen. Das Gel wurden nach dem Aushärten in einer Gelkammer mit TBE-Puffer überschichtet. Die amplifizierten Proben wurden mit 5 µl PCR-Probenpuffer versetzt, gut durchmischt und anschließend in die Kammern pipettiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 80 V und 100 mA.
Nach ca. 45 min wurden die Gele unter UV-Licht fotografiert und densitometrisch mit dem Programm ImageJ (NIH, Bethesda, USA) ausgewertet. Um eine semiquantitative Bestimmung des mRNA-Gehaltes für verschiedene Markergene vornehmen zu können, wurde für jede Probe auch eine RT-PCR für die mRNA des konstitutiv exprimierten sog. "House Keeping"-Gens *GAPDH*, das für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase kodiert, durchgeführt. Die densitometrischen Daten für die untersuchten Gene wurden durch die entsprechenden GAPDH-Werte dividiert.
Zudem wurden die Expressionsdaten jeweils noch auf die maximale relative mRNA-Expression eines Markers innerhalb des jeweiligen Versuches bezogen. Das heißt, dass die maximale Expression eines Markes innerhalb einer Gruppe (Kontrolle, GRGDSP-behandelte EBs, GRGESP-behandelte EBs) und eines Versuches gleich 100% gesetzt wurde und die weiteren Werte innerhalb der Gruppe und des Versuches auf diesen Wert normiert wurden. Dies ermöglichte es, die Daten verschiedener Versuche untereinander zu vergleichen [7].

3.10.5 Quantitative Real-Time-PCR

Die Analyse der mRNA-Expression von Kollagen II erfolgte mittels quantitativer Real-Time-PCR nach der sogenannten *TaqMan*-Methode mit einem iCycler-Gerät.
Analog zu der beschriebenen semi-quantitativen RT-PCR findet hier eine zyklische Amplifizierung von cDNA statt. Durch Verwendung von mit Fluorophoren versehenen Primern und einer Standardreihe ist jedoch bei diesem, auf dem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer basierenden Verfahren, eine absolute Quantifizierung der enthaltenen cDNA-Menge möglich.
Zur Anwendung kommen neben den komplementären Primern *TaqMan*-Sonden, die an einem Ende mit einem Reporter-Fluorochrom, an ihrem anderen Ende mit einem sog. "Quencher"-Fluorochrom markiert sind. Solange die Sonde in intaktem Zustand vorliegt, unterdrückt der Quencher die Reporter-Fluoreszenz. Kommt es jedoch zu einer Synthese des komplementären Stranges, wird die Sonde durch die Exonukleaseaktivität der *taq*-Polymerase abgebaut, Quencher und Reporter entfernen sich voneinander und die Reporterfluoreszenz kann detektiert werden. Messungen finden nach der Elongation in jedem Zyklus statt.

Tabelle 7: Pipettierschema für die qPCR

Substanz	Volumen
Master Mix	10µl
Primer	je 0,4µl
TaqMan-Sonde	0,4µl
taq-Polymerase	0,25 µl
cDNA (1:5 verdünnt)	5µl
DEPC-H_2O	3,8µl

Tabelle 8: Verwendete qPCR-Primer. FAM = Reporter-Fluorochrom, TMR = Quencher-Fluorochrom.

Marker	Primersequenz	Annealing [°C]	Zyklenanzahl
Aggrecan	-CAGAAACAACCATGTCCCTGA- -TGTGACTGCTGCTCCCGAC- **FAM**-ACCCTGGAACTT- GGTCCACCCCT-**TMR** (Sonde)	58,9	50
Kollagen I	-GACCGATGGATTCCCGTTC- -GGTGTGACTCGTGCAGCC- **FAM**-TCCACAAGGGTGCT- GTAGGTGAAGCGA-**TMR** (Sonde)	66	50
Kollagen II	-ACGGTGGCTTCCACTTCA- -TACATCATTGGAGCCCTGGA- **FAM**-AACCTGGCTCC- CAACACCGCTAA-**TMR** (Sonde)	66	50

Um die cDNA-Menge bestimmen zu können, wurden Standardmessreihen mit bekannter DNA-Menge zwischen 0,2 fg/µl und 0,2 ng/µl verwendet.
Die entsprechende cDNA wurde im Verhältnis mit H_2O dest. 1:5 verdünnt und mit Maxima Probe qPCR Master Mix, der Desoxynukleotide, einen Puffer, sowie die DNA-Polymerase enthält, versetzt. Zusätzlich wurden Sonde und Primer (s. Tabelle 6) hinzugefügt. Primer und Sonden wurden durch die Firma TIB MOLBIOL synthetisiert. Das Pipettierschema findet sich in Tabelle 7, eine Auflistung der verwendeten Primer in Tabelle 8.
Zur Quantifizierung wurde der sog. "Cycle Threshold"-Wert verwendet, der die Zyklenzahl bezeichnet, bei der die während der exponentiellen Phase der Amplifikation gemessene Fluoreszenz erstmals das Hintergrundrauschen überschreitet.
Wie für die semi-quantitative RT-PCR beschrieben, wurden die Messwerte jeweils auf den Maximalwert für den jeweiligen Markers innerhalb des Versuches bezogen.

3.11 Phosphoprotein-Nachweis mittels Western Blot

Um zu überprüfen, ob Integrin-vermittelte Signalkaskaden durch die Behandlung mit RGD-enthaltenden Peptiden beeinflusst werden, wurden Western Blots mit einem Antikörper durchgeführt, der spezifisch an einen phosphorylierten Tyrosinrest (pY^{397}) der Fokalen Adhäsionskinase (FAK) bindet.

3.11.1 Probengewinnung

- Lysis-Puffer:

Hepes	0,57 g
NaF	0,67 g
10%-Igepal	10 ml
EDTA (0,5 M)	1,6 ml
H_2O dest.	3,4 ml
Na-Vanadate (200 mM)	75 µl
Dichloressigsäure	2,5 µl
PMSF	100 µl
Leupeptin	37,3 µl

An den Tagen 5 + 4d (jeweils vor und nach Peptidapplikation) und 5 + 7d nach Plattieren der EBs wurden Proteinproben gewonnen. Hierfür wurden jeweils 10 EBs nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS mit einem Zellschaber von 6 cm-Zellkulturschalen abgelöst und in 100 µl frisch angesetztem Lysis-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden 20 min auf Eis inkubiert, dann 10 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend bei -80°C gelagert.
Als Positivkontrolle dienten murine embryonale Fibroblasten (Feeder Layer), die für einen Tag auf mit 10 µg/l Fibronektin-beschichteten Zellkulturschalen kultiviert wurden. Die Probengewinnung wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

3.11.2 Immunadsorbtion

- Waschpuffer:

NP 40 (10%)	500 µl
BSA	1 g
Glycerol (85%)	10 g
Na-Vanadate (200 mM)	50 µl
NaCl	5,9 g
KCl	0,19 g
Hepes	4,76 g
H_2O dest.	ad 100 ml

- Laemmli-Puffer (pH 6,8):

SDS (10% in H_2O dest.)	4 ml
DTT	0,31 g
Bromphenolblau (1% in H_2O dest.)	20 µl
Glycerol (85%)	1,6 g
Tris-HCl (pH 6,8)	2 ml
EDTA (0,5 mM, pH 8,0)	400 µl
H_2O dest.	ad 10 ml

Zur Aufreinigung und Konzentrierung des zu untersuchenden Proteins wurde dem Western Blot eine Immunadsorption vorangestellt. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bradford-Assay bestimmt.
Anschließend wurden zunächst 500 µg Protein bzw. 50 µl der Positivkontrolle mit Waschpuffer auf gleiches Volumen gebracht und 10 min bei 4°C auf 40 µl Pierce Protein G Agarose Beads inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 4 µl anti-FAK Antikörper (s. Tabelle 9) über Tag bei 4°C geschüttelt. 40 µl Protein G Beads wurden drei Mal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend die Protein-Antikörper-Suspension hinzugegeben. Es folgte eine Schüttelinkubation über Nacht bei 4°C. Morgens wurde der Überstand abgenommen, die Protein G Beads mit dem gebundenen Protein drei Mal mit Waschpuffer gewaschen und mit 45 µl Laemmli-Puffer für 30 min bei 37°C geschüttelt. Die Probe wurden dann durch einen Filter zentrifugiert und 5 min bei 95°C gekocht.

3.11.3 SDS-PAGE und Durchführung des Western Blots

- Sammelgel:

H_2O dest.	3,05 ml
Tris-HCl (pH 6,8)	1,25 ml
Acrylamid	0,67 ml
10%-SDS	50 µl
APS	100 µl
TEMED	20 µl

- Trenngel (10%):

H_2O dest.	6,05 ml
Tris-HCl (pH 6,8)	3,13 ml
Acrylamid	3,13 ml
10%-SDS	125 µl
APS	250 µl
TEMED	12,6 µl

Die aufgereinigte Probe wurde durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (kurz PAGE) ihrer Größe nach aufgetrennt. Durch den Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) wurden die Ladungen der Proteine abgeschirmt. Zunächst wurde das Trenn- und anschließend das Sammelgel gegossen. Nach der Polymerisation wurde das Gel in eine Pufferkammer eingespannt und diese daraufhin mit Elektrodenpuffer befüllt.
Die Proben wurden nun im Semidry-Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran überführt, um FAK und die Phosphorylierung an Tyrosinrest 397 mittels spezifischer Antikörper nachweisen zu können. Das Gel wurde hierfür zwischen Filterpapieren platziert, die ebenso wie das Gel und die Transfermembran in Anoden- bzw. Kathodenpuffer getränkt wurden. Der Transfer erfolgte bei 0,8 mA/cm^2 für 95 min.
Die Transfermembran wurde über Nacht bei 4 °C mit Trockenmilchpulver in PBS (5%) geblockt. Am nächsten Morgen erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (s. Tabelle 9) für eineinhalb Stunden bei Raumtemperatur. Um Rückstände ungebundener Antikörper zu entfernen, wurde die Membran im Folgenden zwei Mal mit PBS, ein Mal mit PBS-T und wiederum zwei Mal mit PBS für je 5 min auf einem Schüttelinkubator gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (s. Tabelle 9), der zum Zwecke des Proteinnachweises an die sog. "Horse Radish"-Peroxidase (kurz HRP) gekoppelt war, erfolgte für 90 min bei Raumtemperatur. Analog zur Verfahrensweise mit dem Primärantikörper wurden auch hier fünf Waschschritte mit PBS bzw. PBS-T durchgeführt.
Zum Nachweis wurden ein ECL-Kit verwendet, die Visualisierung erfolgte mit dem Chemoluminiszenzdetektionsgerät LAS-4000 mini.

Tabelle 9: Verwendete Antikörper für Western Blots

Antigen	Klonalität	Spezies	Firma	Verdünnung
FAK	poly	Invitrogen	Kaninchen	1:1000
FAK pY^{397}	poly	Invitrogen	Kaninchen	1:1000
anti-Kaninchen, HRP-gekoppelt	poly	Dako	Ziege	1:2000

3.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten, die jeweils aus mindestens drei unabhängigen Versuchen stammten ($n \geqq 3$), erfolgte mit dem Programm Sigma Plot 2000. Zur Anwendung kam für unabhängige Stichproben der *Student's t-test*, für abhängige Proben der *paired Student's t-test*. Lag ein zweiseitiger p-Wert $\leqq 0{,}05$ vor, wurde die Nullhypothese verworfen und das Ergebnis somit als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis und Lokalisation von Kollagen II, IX und XI während der chondrogenen Differenzierung muriner ES-Zellen

Die Expression des knorpelspezifischen Proteins Kollagen II war in EBs der ES-Zelllinie BLC-6 bereits wenige Tage nach dem Plattieren nachzuweisen. Zunächst waren jedoch nur einzelne, ungeordnete Fibrillen zu erkennen. Beginnend 7 Tage nach dem Plattieren (5 + 7d) konnten einige wenige lokalisierte Zellansammlungen detektiert werden, die zunächst nur eine schwache Kollagen II-Expression aufwiesen. Das Färbemuster war hauptsächlich punktuell lokalisiert. Diese Ansammlungen zeigten bereits eine dreidimensionale Struktur, die sich mittels konfokaler Laser Scanning-Mikroskopie (CLSM) darstellen ließ (s. Abb. 8 A). Mit fortlaufender Kultivierungsdauer bildeten sich zunehmend größere Aggregate, die von einem organisierten Netzwerk aus Kollagen II-enthaltenden Fasern umgeben waren. Diese werden in der Literatur als Knorpel-Knötchen (engl. "Nodules") bezeichnet [40, 42]. In den CLSM-Aufnahmen ließ sich eine dreidimensionale Organisation der Nodules darstellen. Es zeigte sich eine Abhebung vom Objektträger, interessanterweise bildete sich unter einer oberflächlichen Schicht von Kollagen II-positiver Matrix ein zellfreier Hohlraum (s. Abb. 8 B). Die Anzahl der Kollagen II-positiven Nodules erreichte um Tag 21 nach dem Plattieren der EBs (5 + 14d) ihren Höhepunkt (Daten nicht gezeigt). Verfolgte man die Differenzierung weiter, so nahm die Anzahl der Knorpelnodules mit Kollagen II-reicher Matrix wieder ab. Lichtmikroskopisch waren jedoch weiterhin hypertrophe Zellaggregate zu erkennen.

Auch andere Kollagentypen ließen sich mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbungen in Knorpelnodules nachweisen. Abbildung 9 zeigt die Lokalisation von Kollagen IX und Kollagen XI. Beide Proteine wurden erst in späten Differenzierungsstadien exprimiert. Kollagen IX konnte erstmals 21 Tage nach dem Plattieren (5 + 21d) in Knorpelnodules nachgewiesen werden. In der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie wurde eine überwiegend periphere Lokalisation von Kollagen IX in den Nodules detektiert. Kollagen XI konnte erst nach einem Differenzierungszeitraum von 28 Tagen nach dem Plattieren

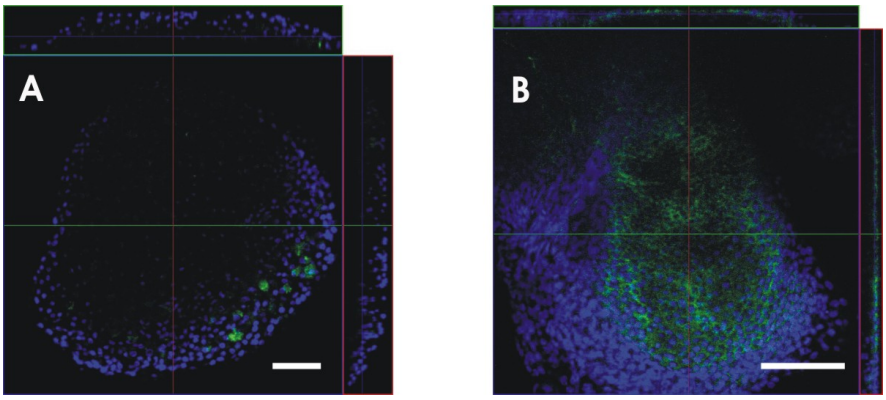

Abbildung 8: Dreidimensionale Darstellung der Morphologie von frühen Kollagen II-positiven Aggregaten (A, 5 + 21d) und späten Kollagen II-positiven Nodules (B, 5 + 21d) aus EBs mittels konfokaler Laser Scanning-Mikroskopie (FITC = Kollagen II, DAPI = Zellkerne). Balken = 100 µm.

(5 + 28d) in bereits hypertrophen Knorpelnodules dargestellt werden. Entgegen der Lokalisation von Kollagen IX war es jedoch auch im Zentrum der Nodules nachweisbar und wies ein eher punktuelles Färbemuster auf.
Mittels konfokaler Mikroskopie konnte schließlich gezeigt werden, dass auch Kollagen IX an zentraler Stelle in Knorpelnodules nachweisbar ist. Sowohl Kollagen IX als auch Kollagen XI wiesen mit CLSM betrachtet eine ähnliche Lokalisation wie Kollagen II auf.
Eine ultrastrukturelle Analyse der Knorpelnodules mittels Immunelektronenmikroskopie (s. Abb. 10) zeigte zum einen kräftige, quergestreifte Fibrillen mit einer Immunoreaktivität für Kollagen I und Kollagen II. Zum anderen konnten auch dünnere, Kollagen XI-positive Fasern nachgewiesen werden. Antikörper gegen Kollagen IX ergaben hingegen kein spezifisches Signal (s. Abb. 10C).

4.2 Expression von Fibronektin und α_5-Integrin während der Knorpeldifferenzierung muriner ES-Zellen

Die Lokalisation von Fibronektin und Kollagen II in Knorpelaggregaten ist in Abbildung 11 gezeigt. Während Kollagen II in frühen Stadien noch das beschriebene eher punktartige Muster zeigt, zeigt sich bereits in diesem Stadium eine Ablagerung von Fibronektin (s. Abb. 11 A-C). Mit fortlaufender Differenzierung und zunehmender Hypertrophie der Knorpelzellen nimmt die Kolokalisation von Fibronektin und Kollagen

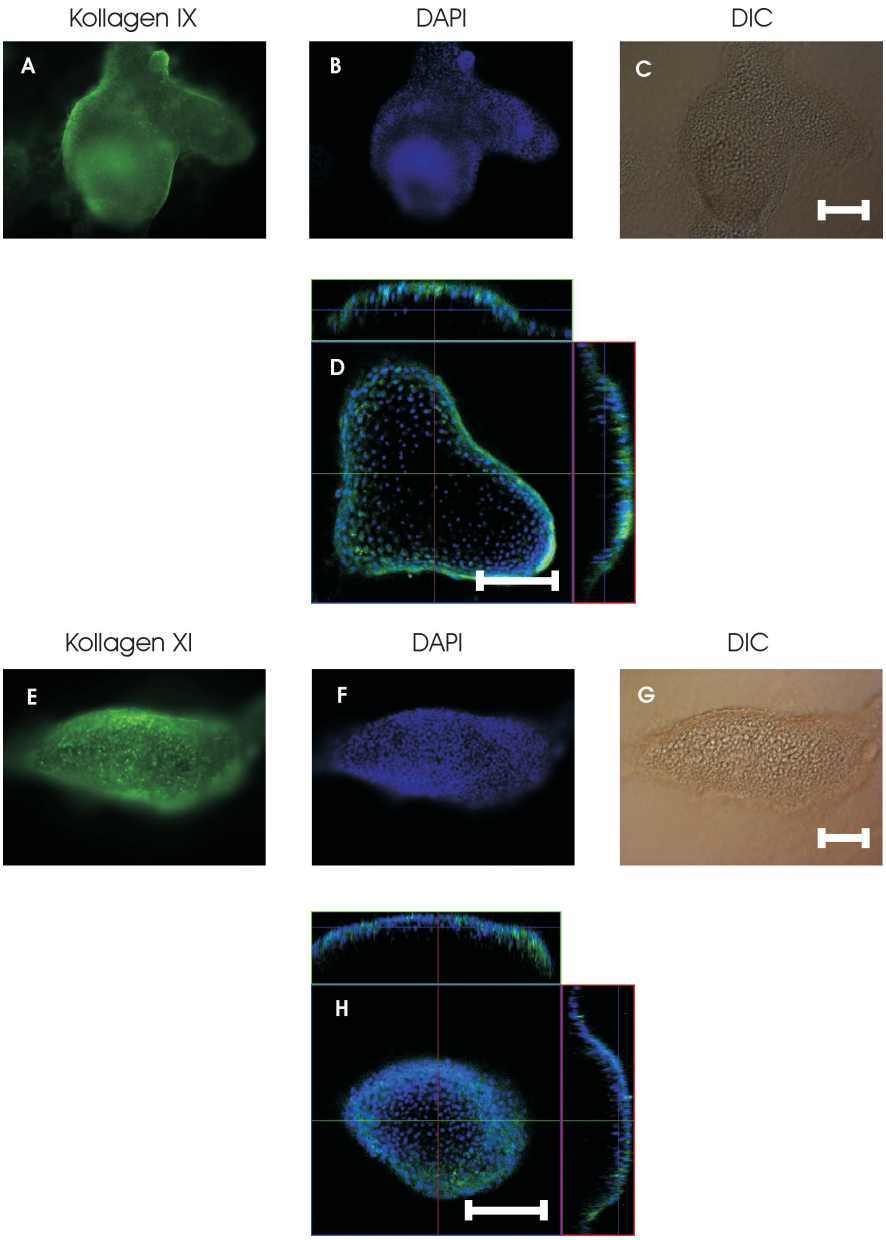

Abbildung 9: Lokalisation von Kollagen IX (A - D) und XI (E - H) in EBs 28 Tage nach dem Plattieren (5 + 28d) dargestellt mittels konventioneller Immunfluoreszenzmikroskopie (A - C, E - G) sowie konfokaler Laser Scanning-Mikroskopie (D, H) und Differentialinterferenzkontrast-Mikroskopie (C, G). FITC = Kollagen IX bzw. XI, DAPI = Zellkerne. Balken = 100 µm.

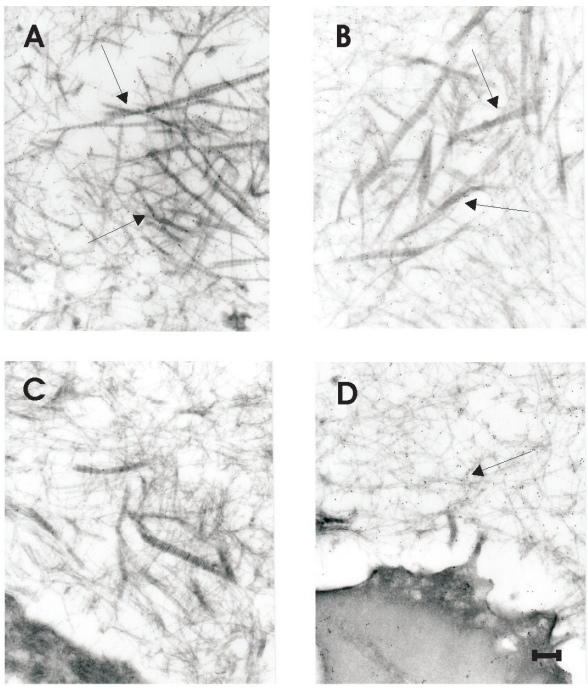

Abbildung 10: Ultrastrukturelle Analyse von EBs der ES-Zelllinie BLC-6 mittels Elektronenmikroskopie mit Immunogold-Markierung für Kollagen I (A), II (B), IX (C) und XI (D). Immunogold-markierte Fibrillen sind beispielhaft mit Pfeilen gekennzeichnet. Der Nachweis der Expression von Kollagen IX gelang mittels dieser Methode nicht. Balken = 200 nm.

II ab (s. Abb. 11 D-F). Fibronektin zeigt sich in den späten Stadien mit zentral bereits fehlender Anfärbbarkeit für Kollagen II ebenfalls randständig und lediglich vereinzelt punktförmig im Bereich der hypertrophen Knorpelnodules (s. Abb. 11 G-I). Diese Lokalisation konnte mittels konfokaler Laser Scanning-Mikroskopie bestätigt werden.
Interessanterweise bildet Fibronektin eine Art Randwall um die Kollagen II-positiven Aggregate, die sich kuppelartig darstellen (s. Abb. 11 J).
Ähnliche Verteilungsmuster finden sich für Ko-Färbungen von Kollagen II und α_5-Untereinheit des $\alpha_5\beta_1$-Integrins (s. Abb. 12). Allerdings bleibt die Anfärbbarkeit für α_5-Integrin in Knorpelnodules zum Teil auch in fortgeschrittenen Differenzierungsstadien erhalten (s. Abb. 12 G-I).

Mittels quantitativer Real Time-PCR konnte ein signifikanter Anstieg der Expression der Kollagen II-mRNA während der chondrogenen Differenzierung muriner ES-Zellen von 5 + 14d bis 5 + 21d nachgewiesen werden (s. Abb. 13 A). Die relative Expression stieg vom Zeitpunkt 5 + 2d bis 21 Tage nach dem Plattieren (5 + 28d) an, um dann tendentiell abzufallen.
Die Expression von Kollagen X zeigte ebenfalls einen signikanten Anstieg von 5 + 14d bis 5 + 21d (s. Abb. 13 B), der im Einklang mit dem zunehmenden Auftreten hypertropher Knorpelzellaggregate während fortgeschrittener Differenzierungszeitpunkt steht.
Eine Untersuchung der mRNA-Expression von Fibronektin ergab eine maximale Expression bereits zwei Tage nach dem Plattieren (5 + 2d). Diese Expression fiel bis 5 + 14d signifikant ab, um gegen Ende des beobachteten Differenzierungszeitraumes wieder gering anzusteigen (s. Abb. 13 C). Für α_5-Integrin hingegen wurden an allen untersuchten Zeitpunkten hohe mRNA-Level gefunden(s. Abb. 13 D).
Die Expression von MMP-3, die Fibronektin spaltet, lag an 5 + 2d bei etwa 60% des Maximalwertes. Eine Woche nach dem Plattieren (5 + 7d) fiel die Expression auf ein Minimum von unter 40% ab, stieg jedoch anschließend bis 5 + 28d auf ca. 85% an (s. Abb. 13 E).

4.3 *In vitro*-Differenzierung homozygot Fibronektin-defizienter muriner ES-Zellen

Die homozygote Fibronektin-Knock Out-ES-Zelllinie 129/3 [26] wurde analog zu der Zelllinie BLC-6 *via* Hängende Tropfen differenziert. Als Wildtypkontrolle wurde die ES-Zelllinie D3 [18] verwendet, auf deren Basis die Zelllinie 129/3 generiert wurde.
Die morphologischen Unterschiede zwischen den undifferenzierten ES-Zellen der beiden

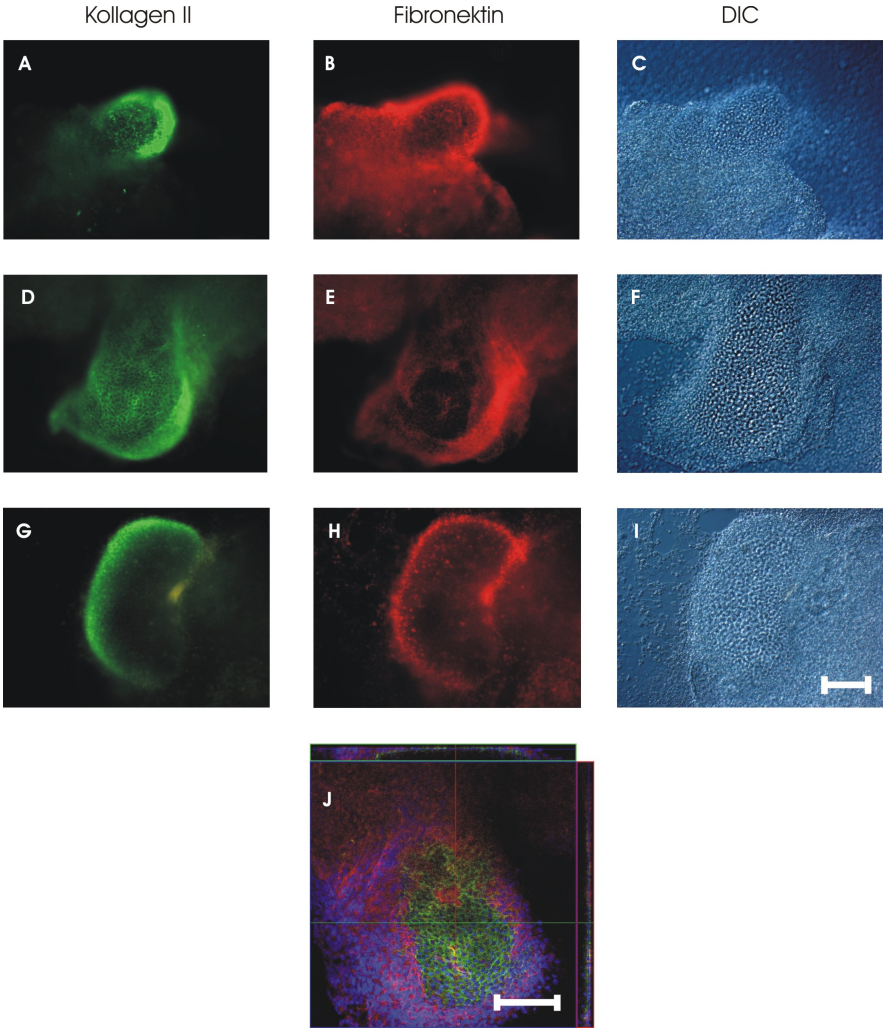

Abbildung 11: Expression von Fibronektin in mesenchymalen Kondensationen (A-C, 5 + 10d), prähypertrophen Knorpelnodules (D-F, J, 5 + 14d) und hypertrophen Knorpelnodules (G-I, 5 + 14d) dargestellt mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbungen mit konventioneller Technik (A-I) bzw. konfokaler Laser Scanning-Mikroskopie (J; FITC = Kollagen II, Cy3 = Fibronektin, DAPI = Zellkerne). DIC = Differentialinterferenzkontrast-Mikroskopie. Balken = 100 µm.

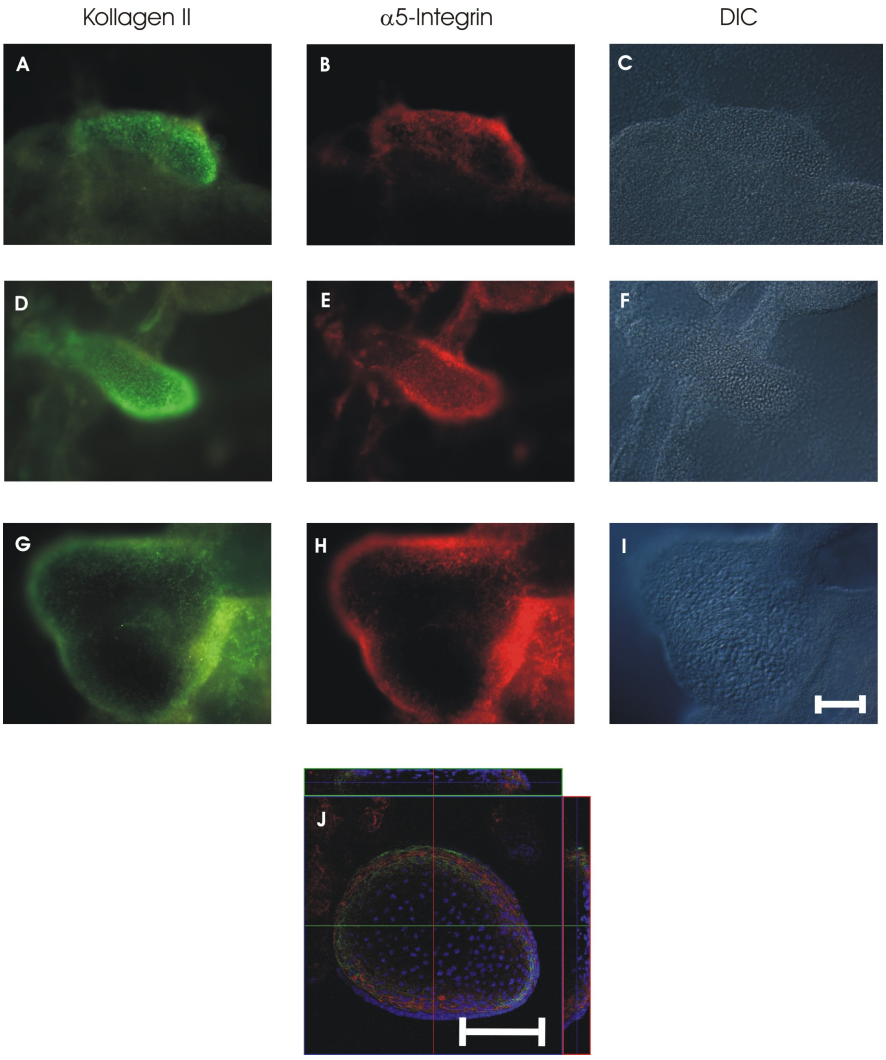

Abbildung 12: Anfärbung von α_5-Integrin mittels indirekter Immunfluoreszenz in mesenchymalen Kondensationen (A-C, 5 + 10d), prähypertrophen Knorpelnodules (D-F, 5 + 28d; J, 5 + 21d) und hypertrophen Knorpelnodules (G-I, 5 + 21d) anhand eines regulären Immunfluoreszenzmikroskopes (A-I) oder eines konfokalen Laser Scanning-Mikroskopes (J; FITC = Kollagen II, Cy3 = α5-Integrin, DAPI = Zellkerne). DIC = Differentialinterferenzkontrast-Mikroskopie. Balken = 100 µm.

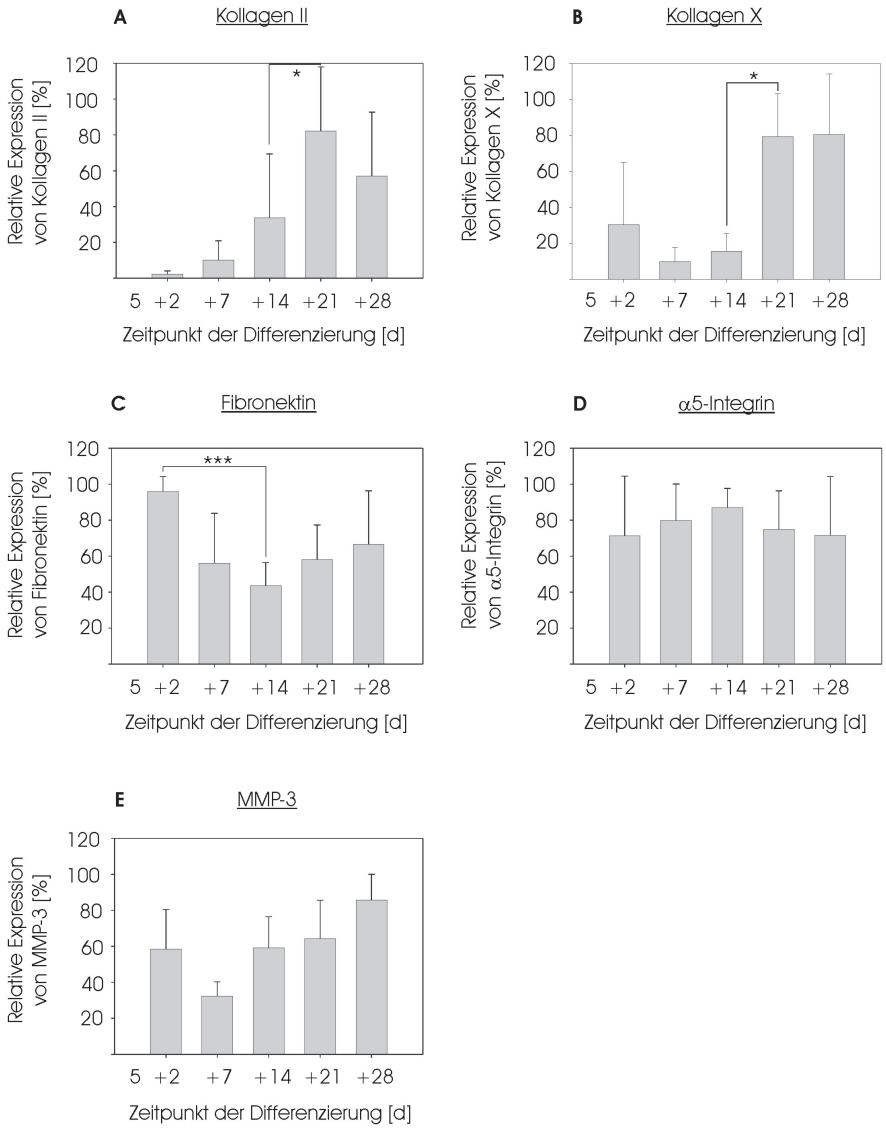

Abbildung 13: mRNA-Expression knorpelassoziierter Marker während der *in vitro*-Differenzierung muriner ES-Zellen mittels quantitativer Real Time-PCR (Kollagen II, A) bzw. semi-quantitativer PCR (alle anderen Marker, B-E). Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung von mindestens 3 unabhängigen Versuchen (n $\geqq$ 3). $\star$: p $\leqq$ 0,05, $\star\star\star$: p $\leqq$ 0,001.

Zelllinien sind durch die Kultivierung der Fibronektin-defizienten ES-Zellen in Abwesenheit von Feeder Layer-Zellen zu erklären (s. Abb. 14 A). Während die EBs nach dem Transfer in die Suspensionskultur nach zwei Tagen als Hängende Tropfen noch eine vergleichbare Größe zu den EBs der Kontroll-Zelllinie D3 hatten, zeigten sie sie zu Ende der Suspensionsperiode signifikant kleiner (Abb. 14 A, B). Auch während der weiteren Differenzierung nach dem Plattieren waren die EBs kleiner. Bereits wenige Tage nach dem Plattieren (5 + 4d) begannen die EBs sich von den Zellkulturmaterialien abzulösen (Abb. 14 A). Bis 5 + 14d waren nahezu alle EBs von den Zellkulturmaterialien abgelöst, sodass eine weitere Analyse der Differenzierungsvorgänge *in vitro* nicht möglich war.
Wurde während der Kultivierung der EBs als Hängende Tropfen und in Suspension (0 - 5d) humanes Plasma-Fibronektin in einer Konzentration von 10 µg/ml hinzugefügt, kam es nicht zu einer Größenzunahme der Knock Out-EBs (s. Abb. 14 C). In Vorversuchen ergab auch eine Substitution von zellulärem Fibronektin während der Kultivierung der Knock Out-EBs (0-5d) keine signifikante EB-Größenzunahme (Daten nicht gezeigt).

4.4 Modulation der Chondrogenese durch Integrin-blockierende RGD-Peptide

Um den Einfluss Integrin-blockierender Peptide auf die chondrogene Differenzierung von ES-Zellen zu untersuchen, wurden RGD-enthaltende Peptide (G**RGD**SP) während früher chondrogener Entwicklungsstadien von 5 + 4d bis 5 + 7d den EB-Kulturen hinzugefügt. Die chondrogene Differenzierung wurde während der Kultivierung im Vergleich zu unbehandelten und mit nicht-blockierenden Kontroll-Peptiden (G**RGE**SP) behandelten EBs bis 5 + 28d analysiert.

Sowohl EBs, die mit Integrin-blockierenden, als auch EBs, die mit nicht-blockierenden Peptiden behandelt wurden, bildeten PNA-positive mesenchymale Kondensationen aus (s. Abb. 15). Die Applikation RGD-enthaltender Peptide resultierte jedoch im Vergleich zu mit Kontroll-Peptiden behandelten EBs und unbehandelten EBs in einer signifikanten Abnahme des Anteils von EBs, die PNA-positive mesenchymale Kondensationen enthielten (s. Abb. 16; $p \leqq 0{,}05$).

Auch Kollagen II-positive Aggregate und Knorpelnodules wurden in der Kontroll-Peptid- und in der mit G**RGD**SP inhibierten Gruppe gebildet. Hierbei zeigte sich keine signifikante Reduktion der Nodule-Bildung (s. Abb 17). Anhand von Untersu-

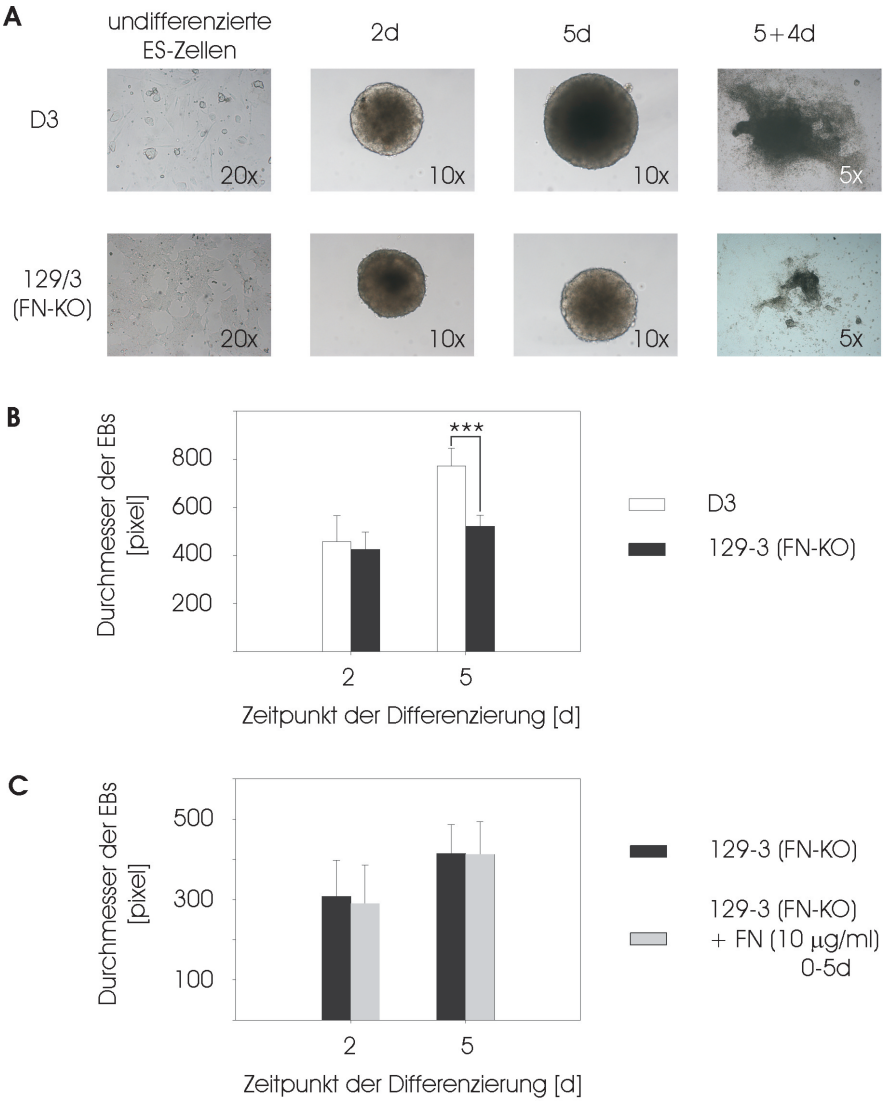

Abbildung 14: Homozygot Fibronektin (FN)-defiziente ES-Zellen der Zelllinie 129-3 bilden kleinere Nodules als die Wildtyp-ES-Zelllinie D3 (A). Zu Ende der Suspensionskultur-Periode ist diese Differenz statistisch signifikant (B). Eine Substitution von humanem Plasma-Fibronektin während der Kultivierung der Knock Out (KO)-EBs (Zeitraum 0 - 5d) führt nicht zur Bildung größerer EBs (C). Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung von mindestens 3 unabhängigen Versuchen (n $\geqq$ 3). $\star\star\star$: p $\leqq$ 0,001.

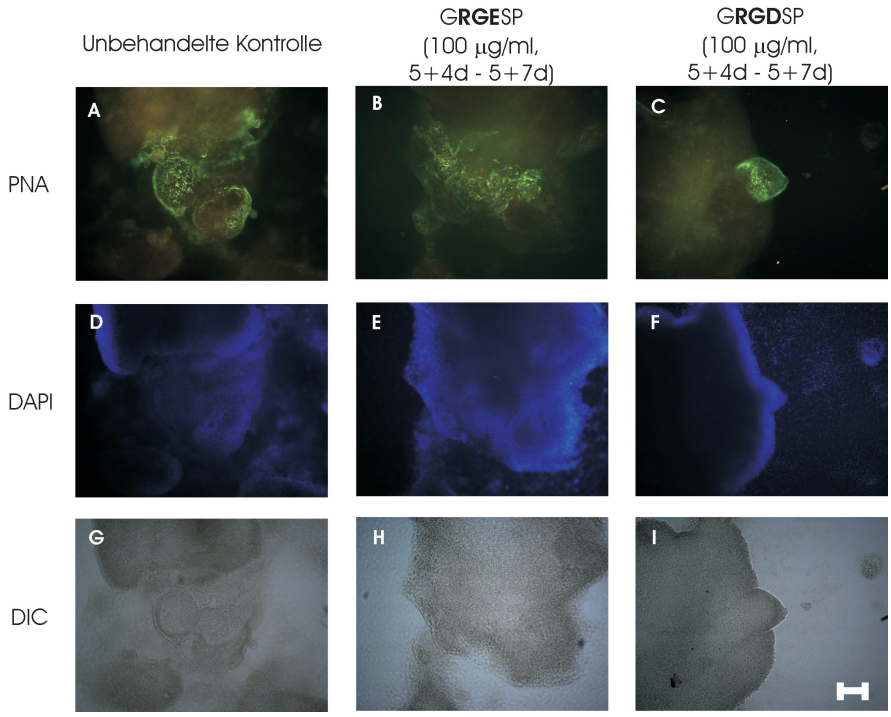

Abbildung 15: PNA-positive Kondensationen (FITC) werden wie in Kontroll-EBs (A) und mit nicht-blockierenden RGE-Peptiden behandelten EBs (B) auch in Anwesenheit RGD-enthaltender, Integrin-blockierender Peptide (C) 7 Tage nach dem Plattieren (5 + 7d) gebildet. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (D - F). DIC = Differentialinterferenzkontrast-Mikroskopie (G - I). Balken = 100 µm.

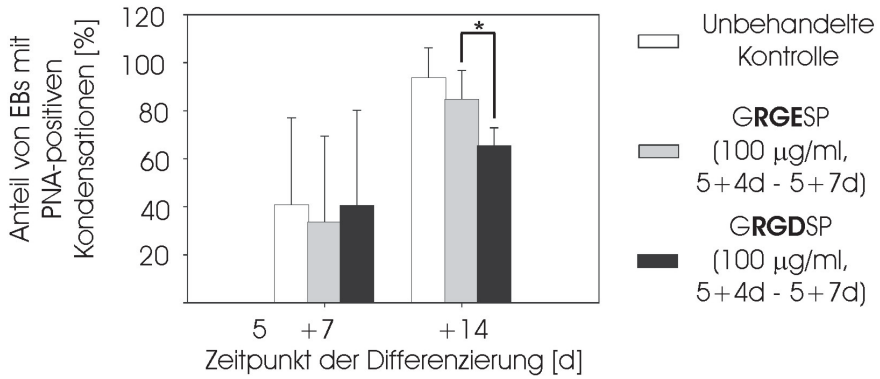

Abbildung 16: Integrin-blockierende RGD-Peptide reduzieren gegenüber Kontrollpeptiden (G**RGE**SP) die Bildung PNA-positiver mesenchymaler Kondensationen (s. Abb. 15) in EBs signifikant. Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung von mindestens 3 unabhängigen Versuchen (n $\geqq$ 3). $\star$: p $\leqq$ 0,05.

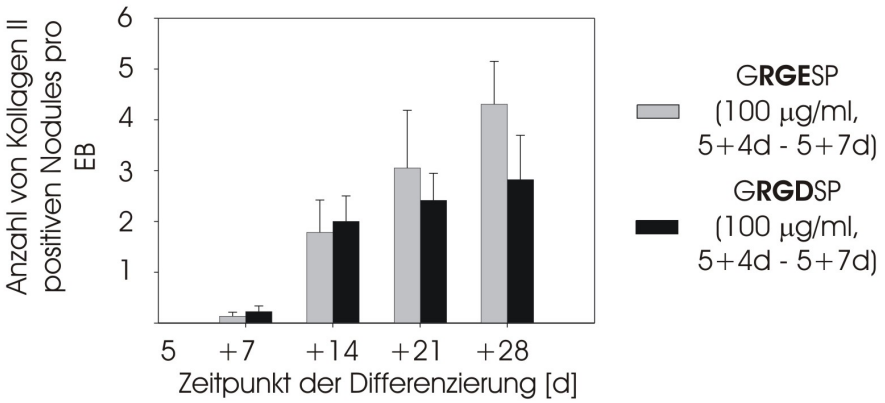

Abbildung 17: Die Bildung Kollagen II-positiver Nodules wird durch Hinzugabe von RGD-enthaltenden Peptiden nicht signifikant beeinflusst.

chungen mit einem konfokalen Laser Scanning-Mikroskop konnten wesentliche strukturelle Veränderungen der Nodules sowie eine Modulation des Verteilungsmusters von Fibronektin und α_5-Integrin in den Knorpelnodules ausgeschlossen werden (s. Abb. 18).

Mittels Alcianblau-Färbung wurden Proteoglykane der extrazellulären Matrix in Knorpelnodules dargestellt (s. Abb. 19 A). Es konnte eine hoch-signifikante Reduktion ($p \leqq 0{,}01$) von Alcianblau-gefärbten Knorpelnodules im Vergleich zwischen blockierenden und nicht-blockierenden Petiden nachgewiesen werden (s. Abb. 19 B). Diese verminderte chondrogene Differenzierung hielt bis zwei Wochen nach dem Zeitraum der Peptidbehandlung an und erreichte erst zum letzten Beobachtungszeitpunkt (5 + 28d) wieder das Niveau G**RGE**SP-behandelter EBs. Während sich unbehandelte und mit Kontroll-Peptiden behandelte EBs durch einen starken initialen Anstieg Alcianblau-positiver Aggregate mit anschließender Plateauphase auszeichneten, stieg die Zahl der Alcianblau-angefärbten Flächen pro EB in der Gruppe der EBs, die den G**RGD**SP-Peptiden ausgesetzt waren, kontinuierlich an (s. Abb. 19 B).

Auf mRNA-Ebene zeigte die Peptid-Behandlung keine signifikanten Einflüsse auf die Expression von Kollagen II (s. Abb. 20 A). Ähnlich wie in der Kontrollgruppe stieg die Expression in der mit blockierenden Peptiden behandelten Gruppe gegen Ende des Beobachtungszeitraums an. In der Gruppe der mit Kontroll-Peptiden behandelten EBs nahm die Expression der Kollagen II-mRNA hingegen nicht-sgnifikant ab. Der relative mRNA-Gehalt von Kollagen X wie in den Kontroll-EBs in beiden Peptid-behandelten Gruppen über den Differenzierungsverlauf stetig an und erreichte an 5 + 28d nach

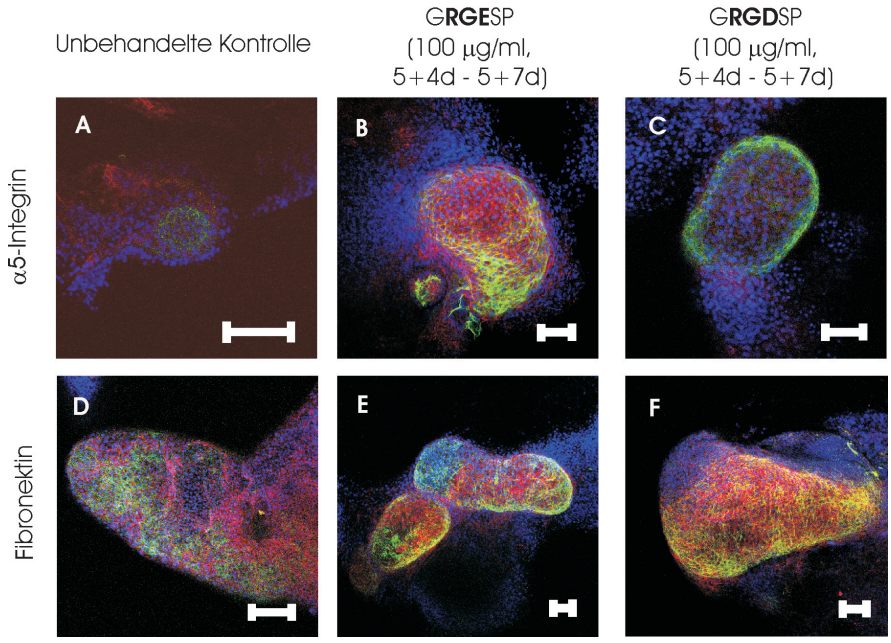

Abbildung 18: Eine Behandlung von EBs in frühen Differenzierungsstadien mit Integrin-blockierenden RGD-Peptiden (C, F) hat keinen Einfluss auf die Morphologie der Knorpelnodules (FITC = Kollagen II, Cy3 = α5-Integrin (A-C) bzw. Fibronektin (D-F), DAPI = Zellkerne). Als Kontrolle dienten EBs, die mit nicht-blockierenden, RGE-enthaltenden Peptiden behandelt wurden (B, E) sowie unbehandelte EBs (A, D). Die Aufnahme stammen von Nodules 17 (A, 5 + 17d)) bzw. 21 (B-F, 5 + 21d) Tage nach dem Plattieren. Balken = 100 µm.

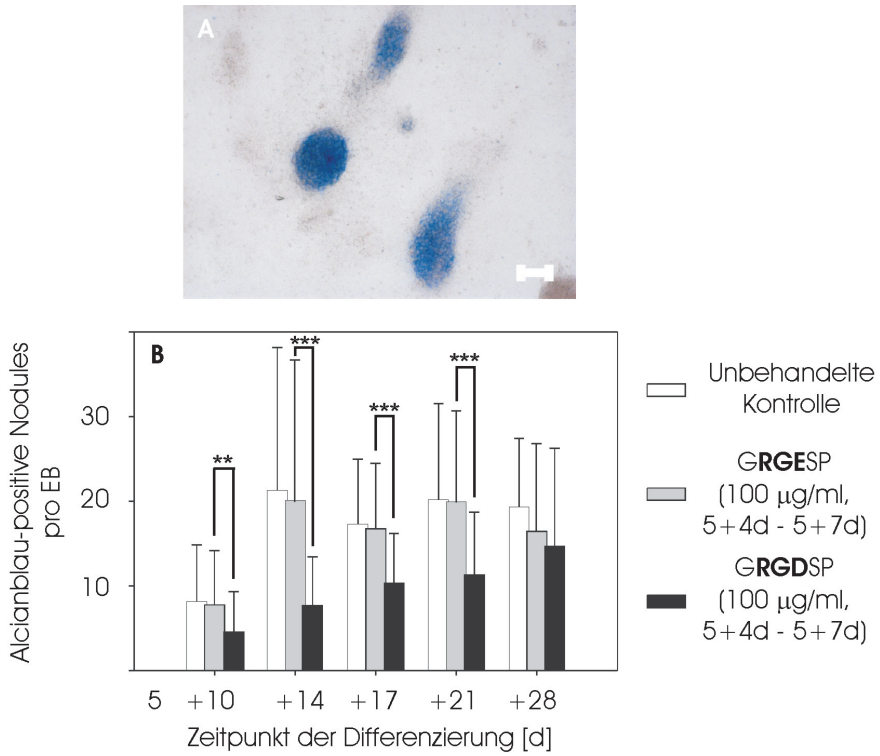

Abbildung 19: Knorpelnodules zeigen eine extrazelluläre Matrix mit Alcianblau-positiven Proteoglykanen (A, 5 + 17d). Mit Integrin-blockierenden RGD-enthaltenden Peptiden behandelte EBs zeigen gegenüber mit Kontrollpeptiden behandelten EBs eine hochsignifikant reduzierte Bildung von Alcianblau-positiven Knorpelnodules (B). Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung von mindestens 3 unabhängigen Versuchen (n $\geqq$ 3). $\star\star$: p $\leqq$ 0,01; $\star\star\star$: p $\leqq$ 0,001.

dem Plattieren ein Maximum (s. Abb. 20 B). Der Verlauf der mRNA-Expression von Fibronektin wurde durch die Hinzugabe beider Peptide verändert (s. Abb. 20 C). So trat die maximale Expression nicht bereits an zwei Tage nach dem Plattieren (5 + 2d), sondern erst an 5 + 21d auf. Zudem fiel die Fibronektin-mRNA-Expression an 5 + 28d in RGD-behandelten EBs gegenüber der Kontroll-Peptid-Gruppe ab, dieser Unterschied war grenzwertig signifikant ($p = 0{,}05$). Auch die Expression von α_5-Integrin wurde durch die Hinzugabe Integrin-blockierender Peptide beeinflusst (s. Abb. 20 D). Direkt am Anschluss an den Applikationszeitraum der RGD-enthaltenden Peptide (5 + 7d) zeigte sich ein signifikant geringerer relativer mRNA-Gehalt verglichen zur Kontroll-Petid-Gruppe ($p \leqq 0{,}05$). Diese Relation blieb in der Tendenz bis zum Ende der Differenzierungsperiode erhalten, erreichte jedoch für die folgenden Beobachtungszeitpunkte keine statistische Signifikanz. Die Genexpression von MMP-3 betreffend zeigten sich keine signifikanten Differenzen zwischen den drei Gruppen (s. Abb. 20 E).

Um zu untersuchen, ob die Applikation RGD-enthaltender Peptide einen Einfluss auf die intrazelluläre, β_1-Integrin-assoziierte Signaltransduktion hat, wurde der Phosphorylierungszustand der Fokalen Adhäsionskinase (FAK) an Tyrosinrest 397 mittels Western Blot-Analyse untersucht.
Ein signifikanter Unterschied konnte hierbei weder an 5 + 4d eine Stunde nach Hinzugabe der Peptide, noch an 5 + 7d vor dem Auswaschen der Peptide detektiert werden (s. Abb. 21). Tendentiell zeigte sich jedoch eine Abnahme der FAK-Autophosphorylierung nach der Applikation Integrin-blockierender Peptide ($p = 0{,}068$). Die Original-Blots sind im Anhang dargestellt.

4.5 Analyse der Dedifferenzierung primärer muriner Chondrozyten

Isolierte Chondrozyten in Primärkultur verlieren während der *in vitro*-Kultivierung als Monolayer ihre physiologischen, morphologischen und sekretorischen Eigenschaften. Dieser Prozess wird als Dedifferenzierung bezeichnet. Um die Expression von Fibronektin, α_5-Integrin und Kollagen IX und XI während dieses Vorganges zu untersuchen, wurde ein Protokoll zur Isolation muriner embryonaler Chondrozyten aus Rippenknorpel im Rahmen dieser Promotionsarbeit etabliert.
In den Primärkulturen wurde am Tag 3 nach der Isolation eine Population stark Kollagen II-exprimierender, rundlicher, teilweise gruppiert liegender Zellen mit kortikal angeordnetem Aktin-Zytoskelett detektiert, die differenzierten Chondrozyten entsprechen. Diese waren umgeben von elongierten, fibroblastoiden, zahlreiche Aktin-Stressfasern

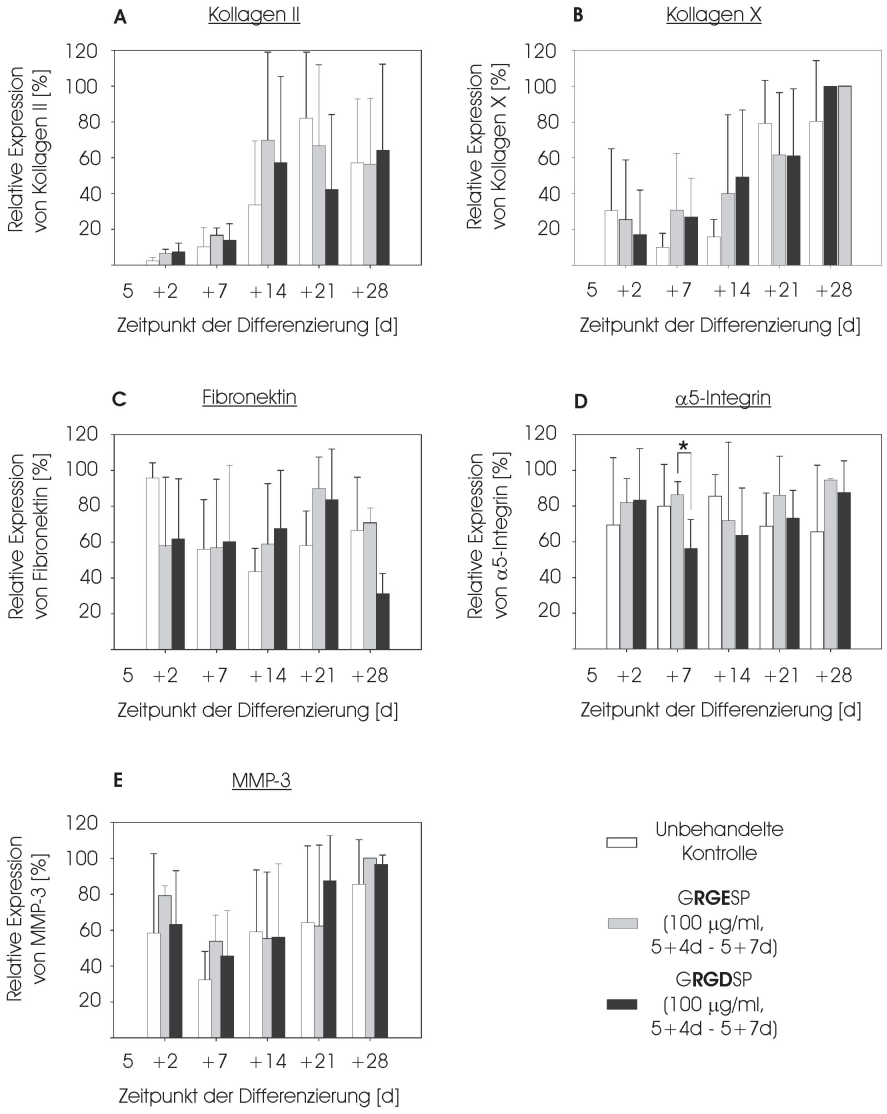

Abbildung 20: Analyse der mRNA-Expression knorpelassoziierter Marker während der *in vitro*-Differenzierung muriner ES-Zellen mittels quantitativer Real TIme-PCR (Kollagen II, A) bzw. semi-quantitativer PCR (alle anderen Marker, B-E). Eine Hinzugabe von Integrin-blockierenden G**RGD**SP-Peptiden führt verglichen mit EBs, die mit Kontroll-Peptiden (RGE) behandelt wurden, zu einer signifikant niedrigeren Expression von α_5-Integrin direkt nach dem Applikationszeitraum. Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung von mindestens 3 unabhängigen Versuchen ($n \geqq 3$). $\star$: $p \leqq 0{,}05$.

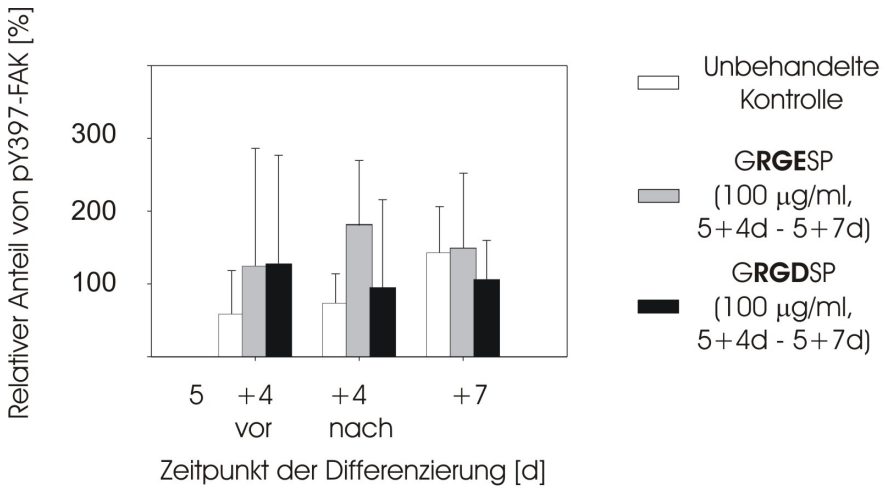

Abbildung 21: Integrin-blockierende RGD-enthaltende Peptide führen in einem phosphorylierungsspezifischen Western Blot zu keiner signifikanten Reduktion der Phosphorylierung der Fokalen Adhäsionskinase (FAK) an Position Tyr 397 gegenüber Kontroll-EBs, die mit RGE-Peptiden behandelt wurden. Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung von mindestens 3 unabhängigen Versuchen (n $\geqq$ 3).

aufweisenden, Kollagen II-negativen Zellen. Diese Zellen entsprechen phänotypisch dedifferenzierten Chondrozyten (s. Abb. 22). Die differenzierten Knorpelzellnester konnten in Immunfluoreszenzfärbungen positiv für Kollagen II und XI dargestellt werden und wiesen eine Proteoglykan-Matrix auf, die sich mit Alcianblau anfärben ließ (s. Abb. 22). Kollagen IX konnte hingegen mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbungen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).
Eine elektronenmikroskopische Untersuchung der primären Chondrozyten zeigte Faserproteine und matrix-sezernierende Zellen (s. Abb. 23).

Im weiteren Kultivierungszeitraum fand eine starke Proliferation der isolierten Zellen statt. Mittels eines BrdU-Assays konnte eine Proliferationsrate von etwas 10% festgestellt werden (s. Abb. 22 H). Die Expression von Kollagen II und XI nahm während der andauernden Kultivierung stark ab, zudem zeigten die Kollagen II-/XI-positiven Zellen am Tag 10 nach der Isolation eine deutlich elongierte, für dedifferenzierte Chondrozyten typische Form (vgl. Abb. 22 A und C mit B und D).
Für α_5-Integrin wurde eine insgesamt starke Anfärbbarkeit detektiert (s. Abb. 22 A, B), allerdings konnte lediglich eine minimale Kolokalisation von Kollagen II und α_5-Integrin gefunden werden (s. Abb. 22 I). Differenzierte Chondrozyten schienen also in den Primärkulturen α_5-Integrin nicht zu exprimieren.
Fibronektin wurde während des gesamten Beobachtungszeitraumes stark exprimiert. Drei Tage nach der Isolation waren einzelne Fibronektin-Fasern abzugrenzen, während

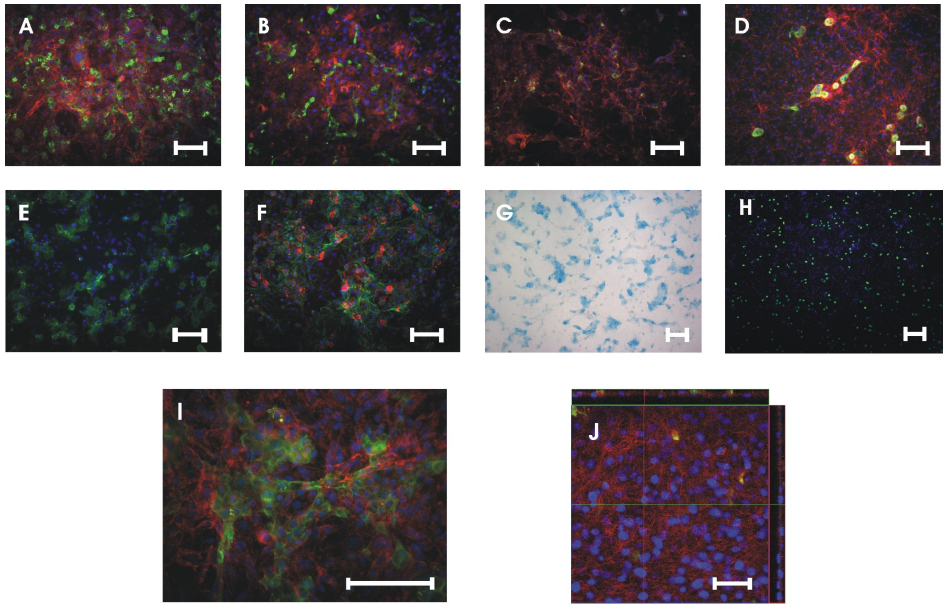

Abbildung 22: Murine primäre embryonale Chondrozyten exprimieren Kollagen II (FITC, A-F, I, J), α_5-Integrin (Cy3, A-B, I), Fibronektin (Cy3, C-D, I) Kollagen XI (FITC, E) und weisen in der Phalloidin-Färbung ein kortikales Aktin-Zytoskelett auf (F, FITC, Ko-Färbung Kollagen II Cy3). Histochemisch konnten mittels Alcianblau-Färbung Proteoglykane dargestellt werden (G). Mittels eine BrdU-Assays werden proliferierende Zellen detektiert (H, FITC = teilungsaktive Zellen). Differenzierte Chondrozyten exprimieren kein α_5-Integrin (I). Konfokale Aufnahmen zeigen, dass Kollagen II-positive Zellen auf ein dichtes Netzwerk aus Fibronektin aufgelagert sind (J). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Die Zellen wurden 3 (A,C,E-G) bzw. 10 (B, D, H-J) Tage nach Isolation fixiert und gefärbt. Balken = 100 µm.

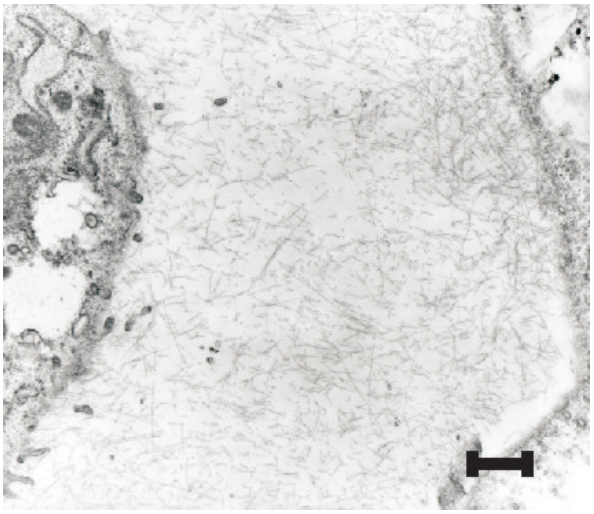

Abbildung 23: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der murinen embryonalen Chondrozyten an Tag 10 nach der Isolation zeigen von extrazellulärer Matrix umgebene Zellen. Balken = 2 µm.

der weiteren Kultivierung aber entwickelte sich ein dichtes, netzähnliches Färbemuster. Mittels konfokaler Laser Scanning-Mikroskopie konnte dieser Eindruck bestätigt werden. Einem dichten "Teppich" aus Fibronektin waren wenige Kollagen II-positive Zellen aufgelagert (s. Abb. 22 I).

Die Analyse der Genexpression mittels PCR bestätigte eine Dedifferenzierung der isolierten Chondrozyten. Auf mRNA-Expressionsebene konnte bei zunehmender Kultivierungszeit eine signifikante Zunahme der Kollagen I-Expression und eine signifikante Abnahme der Aggrecan-Expression nachgewiesen werden, wohingegen sich für Kollagen II und Kollagen X auf Genexpressionsebene ein nicht-signifikanter Abfall zeigte (s. Abb. 24). Auch die Expression von Fibronektin und α_5-Integrin nahm ab, ohne dass dies eine statistische Signifikanz erreichte.

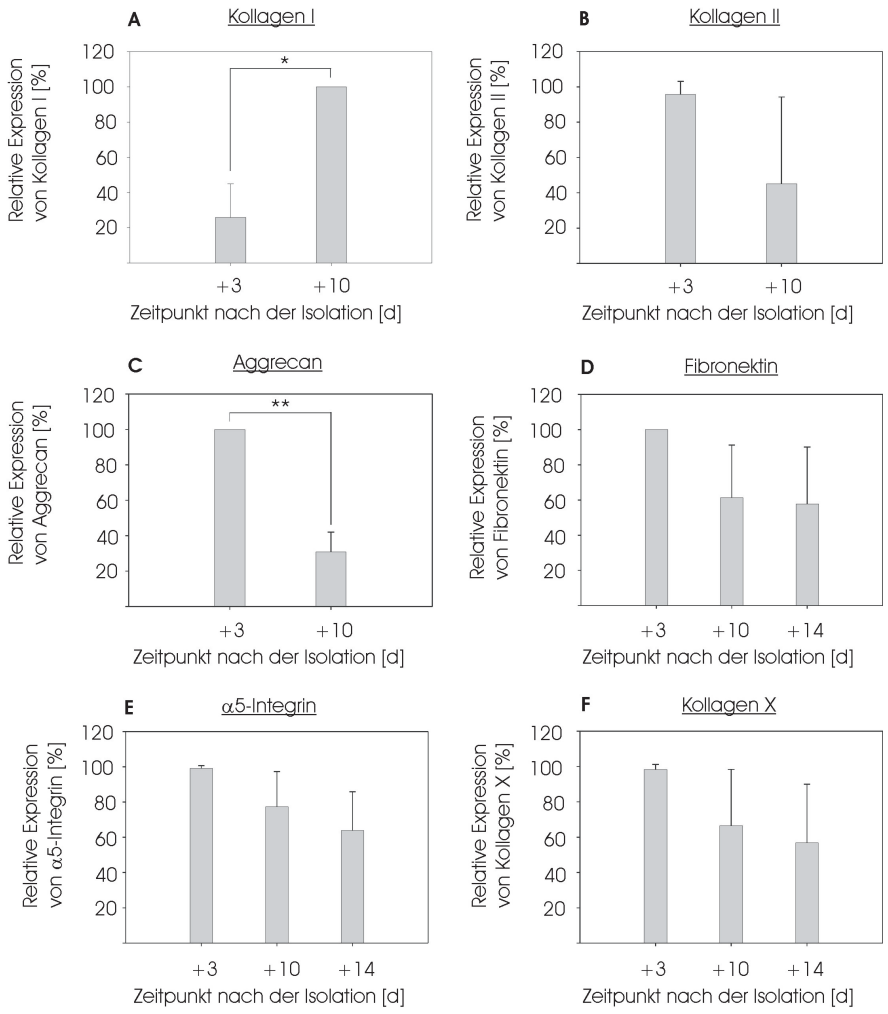

Abbildung 24: Genexpression muriner embryonaler Chondrozyten nach Isolation aus Rippenknorpel auf mRNA-Ebene, untersucht mittels Real Time (Kollagen I, Kollagen II, Aggrecan) bzw. semi-quantitativer RT-PCR (Fibronektin, α_5-Integrin, Kollagen X). Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung von mindestens 3 unabhängigen Versuchen ($n \geqq 3$). $\star$: $p \leqq 0{,}05$; $\star\star$: $p \leqq 0{,}01$.

5 Diskussion

5.1 ES-Zell-Differenzierung als Modellsystem zur Untersuchung der Knorpelentwicklung

Die *in vitro*-Differenzierung embryonaler Stammzellen stellt ein etabliertes Modellsystem für die Untersuchung von frühen Entwicklungsvorgängen dar. Es wurde wiederholt belegt, dass murine ES-Zellen eine chondrogene Differenzierung vollziehen und hierbei die Stadien der *in vivo*-Knorpelentwicklung rekapitulieren [40, 105]. Eine wesentliche Stärke dieses Systems stellt die Möglichkeit der Beeinflussung zellulärer Differenzierungsprozesse beispielsweise durch die Applikation exogener Wachstumsfaktoren [40] oder die endogene Manipulation durch die Generierung spezifischer Knock Out-Zelllinien [32] dar.

5.1.1 Kollagen IX und XI werden während der chondrogenen Differenzierung muriner ES-Zellen exprimiert.

Während der Knorpelentwicklung folgt der mesenchymalen Kondensationsphase das chondrogene "Committment" der Progenitorzellen und damit im Verlauf die Ausbildung des typischen Phänotyps und die Synthese der charakteristischen, funktionsrelevanten extrazellulären Matrix, maßgeblich bestehend aus Kollagen II und Glykosaminoglykanen bzw. Proteoglykanen wie Aggrecan [105].

Kollagen IX und XI machen gegenüber Kollagen II einen wesentlich geringeren Anteil der Knorpelmatrix aus und werden daher als "minor collagens" bezeichnet. Ihre Funktion im Knorpelgewebe ist nur zum Teil charakterisiert. Die Lokalisation von Kollagen IX an der Oberfläche von aus Kollagen II und Kollagen XI bestehenden Fibrillen sowie eine Vielzahl beschriebener Interaktionsstellen mit Kollagen II und weiteren Kollagen IX-Molekülen machen einen stabilisierenden Einfluss auf die Architektur des Gelenkknorpels wahrscheinlich [55]. Hierfür spricht auch die Entstehung arthrotischer

Veränderungen in Mäusen, denen die α1-Kette von Kollagen IX fehlt [22]. Kollagen XI beeinflusst in *in vitro*-Experimenten indirekt über das Verhältnis zu Kollagen II die Dicke der heterotypen Kollagenfibrillen des Knorpelgewebs [6]. Kollagen IX erhöht wiederum die Effizienz der Assemblierung dieser Fibrillen [6].

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Expression der beiden Kollagen-Typen IX und XI in späten Stadien der Chondrogenese mittels Immunelektronenmikroskopie bzw. indirekter Immunfluoreszenzfärbung erstmals im ES-Zell-Modellsystem der Chondrogenese nachgewiesen werden. Im Falle von Kollagen IX gelang dieser Nachweis ausschließlich mittels indirekter Immunfärbung. Die mRNA-Expression von Kollagen IX ist in einem bestimmten Differenzierungsstadium *in vivo*, analog zur tief gelegenen hypertrophen Zone des fetalen humanen Gelenkknorpels, herunterreguliert [94]. Dies würde jedoch nicht die fehlende Nachweisbarkeit auf Proteinebene in den Knorpelnodules in EBs mittels Immunelektronenmikroskopie erklären. Während sich der Nachweis von Kollagen XI durch die enge Assoziation mit Kollagen II ohne extensive Vorbehandlung auf elektronenmikroskopischer Ebene schwierig gestalten kann [51], ist ein ähnliches methodisches Problem für Kollagen IX in der Literatur nicht beschrieben. Dennoch ist der fehlende Nachweis von Kollagen IX in chondrogenen Nodules mittels Immunelektronenmikoskopie am ehesten auf technische bzw. methodische Gründe zurückzuführen, da mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbungen der Nachweis beider Minor-Kollagene in diesen Aggregaten im ES-Zell-Modellsystem eindeutig gelang.

5.1.2 Während früher chondrogener Differenzierungsstadien werden hohe Expressionslevel von α_5-Integrin und Fibronektin detektiert.

Die Kondensation mesenchymaler Progenitorzellen stellt den initialen Schritt der Knorpelentwicklung dar [31, 105]. Geprägt ist dieses frühe Stadium durch die beginnende Sekretion einer extrazellulären Matrix, v.a. bestehend aus Kollagen I und Fibronektin, sowie die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten über N-Cadherin und N-CAM. Diese wird durch die Erhöhung der Zelldichte begünstigt [31]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von Fibronektin und der α_5-Untereinheit des $\alpha_5\beta_1$-Integrins, des vorherrschenden Fibronektin-Rezeptors im Knorpelgewebe [20, 47, 58, 82], untersucht.

Sowohl Fibronektin, als auch die α_5-Untereinheit des $\alpha_5\beta_1$-Integrins konnten während der *in vitro*-Differenzierung muriner ES-Zellen mittels RT-PCR und indirekter Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden. Beide Moleküle konnten durch Kolokalisationsanalysen mit Kollagen II in chondrogenen Arealen identifiziert werden.
Insbesondere wurde die Expression von Fibronektin und α_5-Integrin in frühen Diffe-

renzierungsstadien detektiert. Mit abnehmender Intensität der Kollagen II-Expression kam es ebenfalls zu einer geringeren Darstellbarkeit von Fibronektin mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbungen, während α_5-Integrin zum Teil weiterhin exprimiert wurde. Die Lokalisation der Expression beider Marker in Knorpelnodules verschob sich hierbei von einem zentralen hin zu einem eher peripheren Muster.
Auf mRNA-Ebene zeigte Fibronektin bei anfangs hoher Expression eine starke Herunterregulation während späterer Differenzierungsstadien der EBs. Für α_5-Integrin hingegen konnte eine konstante Expression während des gesamten Differenzierungszeitraumes nachgewiesen werden. Diese Genexpressionsedaten sind allerdings aufgrund der möglichen Beeinflussung durch die multidirektionalen simultanen Differenzierungsvorgänge innerhalb der EBs und der mangelnden Spezifität der beiden Proteine für das Knorpelgewebe nur begrenzt aussagekräftig.

Gestützt werden die Beobachtungen durch Ergebnisse, die anhand anderer Modellsysteme erhoben wurden. In embryonalen Extremitätenknospen stimmt das Expressionsmuster von Fibronektin während der chondrogenen Differenzierung *in vitro* mit dem von Kollagen I überein. Beide Proteine waren mittels Immunfluoreszenz im Mesenchym, im Perichondrium und an der meso-endodermalen Grenze nachweisbar, jedoch nicht im reifen Knorpelgewebe [15, 17, 46]. Auf mRNA- und Proteinebene konnte dieses zeitliche Muster bestätigt werden [43, 106]. Die Daten von Tavella et al. [87] stimmen mit unseren Ergebnissen ebenfalls überein. Auch diese Autoren beschrieben für Fibronektin in chondrogenen Nodules aus Primärkulturen ein betont peripheres Verteilungsmuster. Über die Expression von $\alpha_5\beta_1$-Integrin während der Knorpel- und Knochenentwicklung wurde lediglich in einer weiteren Publikation berichtet. Die Autoren konnten für die β_1-Untereinheit, die allerdings auch mit zahlreichen anderen α-Untereinheiten dimerisieren kann, eine über den beobachteten Zeitraum von 21 Tagen konstante Expression nachweisen [106].

5.1.3 Die *in vitro*-Differenzierung homozygot Fibronektin-defizienter ES-Zellen ist gestört.

Wie bereits erwähnt, ermöglicht das ES-Zell-Modellsystem die Untersuchung der entwicklungsbiologischen Relevanz bestimmter Faktoren durch die Erstellung von Knock Out-ES-Zelllinien. Unserer Arbeitsgruppe wurde von Professor Hynes (MIT, Cambridge, USA) eine homozygot Fibronektin-defiziente ES-Zell-Linie zur Verfügung gestellt.
Fibronektin ist für die embryonale Entwicklung essentiell, wie die frühe embryonale

Letalität von Mäuseembryonen mit zwei defekten Fibronektin-Allelen zeigt [26]. Die auffälligsten Missbildungen waren im Bereich der Somiten, des Neuralrohrs, des Notochords und des Herzkreislaufsystems zu finden [26]. Trotz normaler Induktion und Lokalisation notochordialer und somitischer Marker in den Embryonen kam es während der weiteren Entwicklung zu weitgreifenden Veränderungen insbesondere in diesen Regionen, die möglicherweise durch eine gestörte zelluläre Kondensation oder durch reduzierte Proliferation während der späten Gastrulation begründet sind [27].
Nicht nur das Vorhandensein von Fibronektin, sondern auch die Wechselwirkung zwischen Fibronektin und $\alpha_5\beta_1$-Integrin ist bedeutsam für die Aggregation von Zellen. Dass dies speziell auch für EB-ähnliche Aggregate und deren viskoelastische Eigenschaften gilt, konnten Caicedo-Carvajal et al. am Beispiel von CHO-Zellen (engl. Chinese Hamster Ovary) zeigen [10]. Interessanterweise spielte hierbei nicht nur die Konzentration von Fibronektin, sondern auch die Rezeptordichte von $\alpha_5\beta_1$-Integrin eine entscheidende Rolle. Bei besonders hoher Dichte von $\alpha_5\beta_1$-Integrin, kam es zu einer Depletion des hinzugefügten, löslichen Fibronektins und einer reduzierten Kohäsion [10].
Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von Fibronektin bei der Ausbildung und dem Wachstum zellulärer Aggregate sowie deren Adhäsion an Oberflächen. So waren Fibronektin-defiziente EBs trotz der regelhaften Verwendung von FKS- und somit auch Fibronektin-enthaltendem Medium zu Ende der Suspensionskultur-Periode signifikant kleiner als die der Kontroll-Zelllinie D3. Zu Beginn der Suspensionskultur war diese Differenz nicht statistisch signifikant. Dies könnte durch den Einfluss der Schwerkraft zu erklären sein, die auch in Abwesenheit von Fibronektin die Adhärenz und Aggregation der ES-Zellen in den Hängenden Tropfen begünstigt. Nach dem Plattieren der Fibronektin-defizienten EBs kam es im Laufe einer Kultivierungszeit von bis zu zwei Wochen zur vollständigen Ablösung der Zellen von den Zellkulturmaterialien.
Auch die Applikation von exogenem Plasma-Fibronektin im Kulturmedium während der Phase der Hängenden Tropfen und der Suspensionskultur führte nicht zu einem Angleich der Größe der Knock Out-EBs an die der Wildtyp-EBs. Eine Depletion des hinzugefügten Plasma-Fibronektins ist eine mögliche Erklärung hierfür, insbesondere da ES-Zellen funktionale $\alpha_5\beta_1$-Integrine exprimieren und deren Wechselwirkung mit Fibronektin die Differenzierung beeinflussen kann [68].
Letztendlich scheint für die einwandfreie embryonale Differenzierung also nicht die reine Präsenz von Fibronektin, sondern viel mehr die an das jeweilige Entwicklungsstadium angepasste Konzentration bzw. Expression des Moleküls maßgeblich zu sein.
Eine tiefgehendere Untersuchung der Auswirkungen eines absoluten Fibronektinmangels auf die chondrogene Differenzierung von ES-Zellen *in vitro* wäre beispielsweise in Zukunft durch die Generierung eines konditionellen Knock Outs unter der Kontrol-

le eines Promoters eines knorpelspezifischen Markers wie Kollagen II möglich. Dieser Ansatz wurde bereits für die gewebespezifische Ausschaltung des β_1-Integrin-Gens beschrieben [1].

5.1.4 RGD-enthaltende Peptide inhibieren die chondrogene Differenzierung muriner ES-Zellen *in vitro*.

Das RGD-Tripeptid fungiert in verschiedenen Matrixmolekülen als Bindungsdomäne für zelluläre Rezeptoren der Integrin-Familie [60, 76, 77]. Wie oben dargestellt, scheint das Matrixmolekül Fibronektin während früher chondrogener Differenzierungsstadien eine wichtige Rolle einzunehmen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher murine ES-Zellkulturen in frühen Stadien der EB-Differenzierung (5 + 4d bis 5 + 7d) mit RGD-enthaltenden Peptiden behandelt, die die Bindung von Fibronektin an $\alpha_5\beta_1$-Integrine inhibieren, um somit die Bedeutung dieser Zell-Matrix-Interaktion für die chondrogene *in vitro*-Differenzierung muriner ES-Zellen zu untersuchen.

Es kam in den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen durch die Behandlung muriner ES-Zellkulturen mit RGD-enthaltenden Peptiden während früher Differenzierungsstadien zu einer Inhibition der chondrogenen Differenzierung. Sowohl die Zahl der mesenchymalen Kondensationen als auch der Alcianblau-positiven Knorpelnodules wurde signifikant reduziert. Dass dieser Effekt im Falle der Kollagen II-positiven Nodules nicht eindeutig beobachtet wurde, ist möglicherweise auf eine insgesamt sehr geringe Anzahl von Nodules sowohl in der Kontroll-, als auch in der Verumgruppe zurückzuführen. Die signifikante Reduktion der mRNA-Expression von α_5-Integrin nach Hinzugabe der Integrin-blockierenden RGD-Peptide spricht für einen spezifischen Effekt der Peptide.

Von Peters et al. [65] wurde die Theorie aufgestellt, dass durch eine Bindung von Fibronektin-Fragmenten unterschiedlicher Größe an Integrinrezeptoren differierende Genexpressionsmuster hervorgerufen werden können. Relevant sei dies im pathophysiologischen Sinne insbesondere für die Arthrose, bei der im Gelenkknorpel und in der Synovialflüssigkeit betroffener Patienten Fibronektinfragmente nachgewiesen werden konnten [64, 104]. Experimentell gestützt werden konnte diese Hypothese durch Arbeiten von Damsky und Mitarbeiter [35, 96], die zunächst *in vitro* zeigen konnten, dass durch einen Anti-$\alpha_5\beta_1$-Integrin-Antikörper die Expression von matrix-degradierenden Enzymen (Kollagenase und Stromelysin = MMP-3) in synovialen Fibroblasten des Kaninchens induziert wird. Denselben Effekt erzeugte die Applikation von RGD-Peptiden, allerdings begleitet von einem Wechsel von einer fibroblastoiden hin zu einer rundlichen Zellmorphologie. Eine Behandlung mit intaktem Fibronektin blieb ohne Auswir-

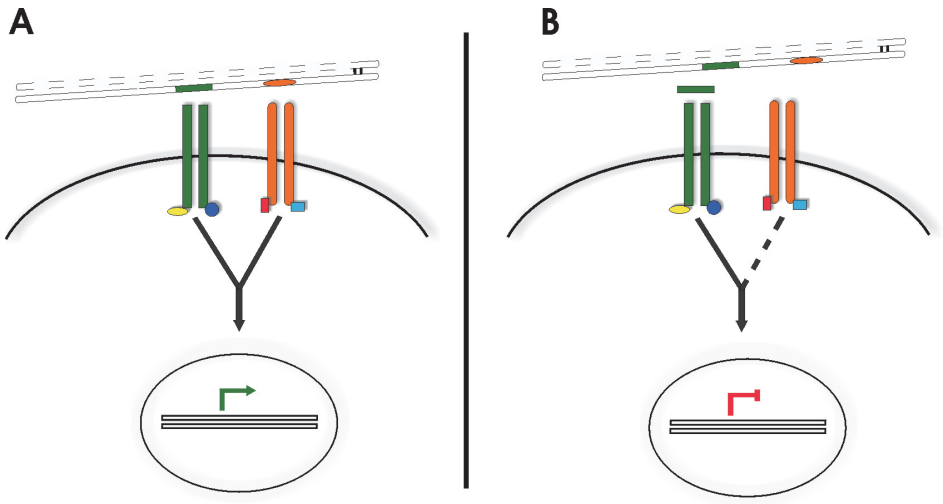

Abbildung 25: Schematische Darstellung der Fibronektin-induzierten Signaltransduktion in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von Fibronektin-Fragmenten. Die Anwesenheit von Fibronektin-Fragmenten blockiert die Bindung eines intakten Fibronektin-Moleküls und moduliert so intrazelluläre Signalwege. Modifiziert nach Peters [65].

kung auf Aussehen und Proteasenexpression der Zellen [96]. In einer nachfolgenden Publikation wurde belegt, dass dieses Ergebnis Folge einer inhibierenden Wirkung der V/CS-Domäne, vermittelt über $\alpha_4\beta_1$-Integrin, ist [35]. Diese Beobachtung ist insofern bemerkenswert, als dass die im Knorpelgewebe überwiegende Isoform des Fibronektins aufgrund alternativer Spleissvorgänge keine V/CS-Domäne aufweist [48].
Vor diesem Hintergrund stellt die Beeinflussung der physiologischen, mittels intakter Fibronektin-Moleküle ausgelösten Signalkaskade durch eine Veränderung des Bindungsmusters extrazellulärer Liganden von $\alpha_5\beta_1$-Integrin durch RGD-enthaltende Peptide eine mögliche Ursache für die beobachtete inhibitorische Wirkung auf die chondrogene Differenzierung dar. Diese Hypothese ist in Abbildung 25 dargestellt. Mittels Phosphoproteinanalysen konnte allerdings in der vorliegenden Arbeit auch gezeigt werden, dass zumindest die Fokale Adhäsionskinase nicht an dieser Signaltransduktionskaskade beteiligt zu sein scheint, da ihre Autophosphorylierung durch eine Hinzugabe von RGD-enthaltenden Peptiden nicht signifikant beeinflusst wurde. Allerdings konnte zumindest tendentiell eine Abnahme der Phosphorylierung an Position Y^{397} nachgewiesen werden. Eine eindeutige Induktion von MMP-3 durch RGD-Peptide konnte anhand von mRNA-Expressionsdaten ebenfalls nicht festgestellt werden.

Ein aufgrund der vorgestellten Ergebnisse wahrscheinlicher Zusammenhang besteht zwischen der reduzierten chondrogenen Differenzierung der ES-Zellen stellt und der Inhibierung der Bildung von mesenchymalen Kondensationen in den EBs. Durch die Beeinflussung der Wechselwirkung zwischen dem RGD-Motiv und Integrin-Rezeptoren kommt es zu einer Beeinflussung der Zellmigration [83] und einer verminderten Aggre-

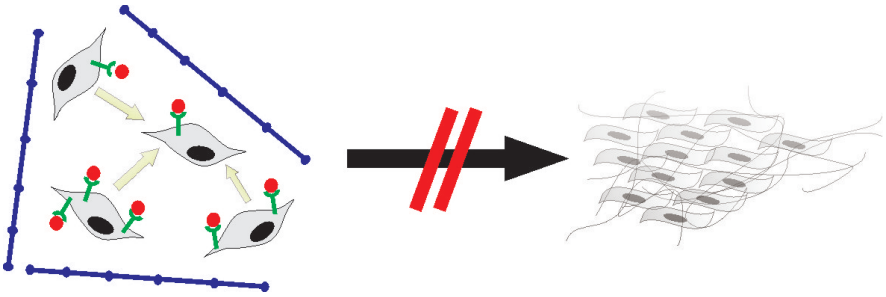

Abbildung 26: Die Hinzugabe von RGD-Peptiden (rot) blockiert die Wechselwirkung zwischen Fibronektin-Molekülen (blau) und Integrin-Rezeptoren (grün) und stört dadurch die für die Ausbildung von mesenchymalen Kondensationen notwendige Migration (Pfeile).

gation (Abb. 26).

Wie von Tavella et al. [87] gezeigt, führte die Hinzugabe von RGD-Peptiden zu einer Inhibiton der Kondensation und Aggregation primärer embryonaler Chondrozyten in Suspensionskultur. Ebenso war die Synthese von Glykosaminoglykanen und die chondrogene Genexpression von mesenchymalen Stromazellen, die in RGD-beschichteten Alginatgelen kultiviert wurden, dosisabhängig signifikant reduziert [12]. In einem *in vitro*-Osteogenese-Modell führten RGD-Peptide ebenso wie ein Anti-Fibronektin-Antikörper zu einer reduzierten Ausbildung von Knochennodules. Morphologisch unterschieden sich diese beiden Gruppen jedoch. Durch RGD-Peptide schien vor allem die Reifung der Knochennodules inhibiert zu werden. Darüber hinaus war die osteogene Genexpression anders als in der Antikörper-behandelten Zellen nicht reduziert. Interessanterweise war der inhibitorische Effekt - wie auch in den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimenten - reversibel, d.h. nach Entzug der Peptide bzw. des Antikörpers kam es zu einer verzögerten Normalisierung der Noduleformation [53]. Vergleichbare Ergebnisse zum Anti-Fibronektin-Antikörper wurden in dem selben Modellsystem durch Antikörper gegen $\alpha_3\beta_1$-Integrin, $\alpha_5\beta_1$-Integrin und $\alpha_8\beta_1$-Integrin, nicht jedoch durch Antikörper gegen $\alpha_4\beta_1$-Integrin, erzielt [54]. Ebenfalls ohne Einfluss auf die Noduleentstehung waren ein Poypeptid aus der V/CS-Domäne, sowie ein Antikörper gegen das N-terminale Fragment des Fibronektin-Moleküls.

Bang et al. [2] konnten zeigen, dass Fibronektin für die Ausbildung von Kondensationen in einem Extremitätenknospen-Modell essentiell ist. Die Expression von Fibronektin stieg während der frühen Differenzierung und Kondensation stark an, zeitgleich fand sich zudem eine starke Kolokalisation von Fibronektin mit der FAK und Paxillin, einem Adaptormolekül in Fokalen Adhäsionen. Durch einen anti-β_1-Integrin-Antikörper ließ sich sowohl die Assoziation von Fibronektin mit der FAK und Paxillin, als auch die Kondensation und die nachfolgende Chondrogenese blockieren [2].

Eine wichtige Aussage konnte durch die Erstellung einer RGE/RGE-Knock In-Maus

getroffen werden. Entwicklungsbiologisch zeigte sich ein Phänotyp, der dem der α_5-Integrin-Knock Out-Maus sehr ähnelte [30]. Interessant ist auch der Nachweis einer gesteigerten Apoptose in Extremitätenknospen dieser Embryonen. In nachfolgenden Experimenten stellte sich heraus, dass die zellvermittelte Bildung einer $FN^{RGE/RGE}$-Matrix jedoch bis auf verdickte Fibronektinfibrillen nicht gestört war. Als alternativer Mechanismus zur RGD-vermittelten $\alpha_5\beta_1$-Integrin-abhängigen Assemblierung [98] konnte eine Bindung von $\alpha_v\beta_3$-Integrinen an ein Motiv im fünften Typ I-Repeat von Fibronektin identifiziert werden, die sich durch RGD-Peptide inhibieren ließ [85].
Es müssen also über die Assemblierung der Fibronektin-Matrix hinaus weitere Funktionen des RGD-Motivs innerhalb des Fibronektin-Moleküls, und damit maßgeblich der Interaktion zwischen $\alpha_5\beta_1$-Integrin und diesem Motiv vorliegen, die durch andere Wechselwirkungen nicht kompensiert werden können. Weiterhin lässt sich schlussfolgern, dass - obgleich der scheinbar niedrigen Spezifität der Sequenz - dem RGD-Motiv innerhalb des Fibronektin-Moleküls eine Schlüsselrolle in der mesodermalen Differenzierung zukommt.

Zusammengefasst sprechen die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse für eine wichtige Rolle des RGD-Motivs während der frühen chondrogenen Differenzierung muriner ES-Zellen. Die beobachteten inhibitorischen Effekte auf die chondrogene Differenzierung durch die Blockade der Wechselwirkungen zwischen Fibronektin und $\alpha_5\beta_1$-Integrin sind hierbei am ehesten durch eine gestörte Bildung mesenchymaler Kondensationen bedingt. Dies ist auch eine mögliche Erklärung für die gestörte *in vitro*-Differenzierung homozygot Fibronektin-defizienter ES-Zellen.

5.2 Etablierung eines Primärkulturmodelles zur Untersuchung der Dedifferenzierung muriner Chondrozyten

Die Dedifferenzierung primärer Chondrozyten nach der Isolation aus Knorpelgewebe stellt ein zentrales Problem des "Tissue Engineering" im Bereich der degenerativen Gelenkerkrankungen dar.
Wie in der Literatur beschrieben [9, 16, 17], konnte auch in der vorliegenden Arbeit in primären murinen Chondrozyten der Wechsel von der Expression von Kollagen II zu Kollagen I beobachtet werden. Zunächst exprimierten die Chondrozyten Kollagen II und synthetisierten Proteoglykane, die sich Alcianblau-positiv darstellten. Mit zunehmender Kultivierungsdauer kam es jedoch zu einer abnehmenden Expression von Kollagen II und der Annahme eines fibroblastoiden, spindelzelligen Phänotyps durch

die dedifferenzierten Chondrozyten. Mittels fluoreszenzmarkiertem Phalloidin, das an fibrilläres Aktin bindet, konnte die unterschiedliche Organisation des Zytoskelettes in differenzierten und dedifferenzierten Chondrozyten dargestellt werden. Auf Genexpressionsebene konnte mit zunehmender Kultivierungszeit eine signifikante Steigerung der Kollagen I-Expression, eine signifikante Abnahme der Aggrecan-Expression sowie nichtsignifikante niedrigere Expressionslevel von Kollagen II und Kollagen X gezeigt werden. Fibronektin wurde während der Dedifferenzierung in starkem Maße exprimiert und extrazellulär deponiert. Auch Kollagen XI-positive Zellen konnten mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbungen nachgewiesen werden, Kollagen IX hingegen konnte in den Primärkulturzellen nicht detektiert werden.
Die gesteigerte Fibronektin-Synthese während der Dedifferenzierung stellt möglicherweise eine temporäre Reaktion der isolierten Chondrozyten auf den Verlust der typischen Knorpel-Matrix und die hiermit verbundenen Signale dar [15]. Tallheden et al. [86] stellen zudem die Theorie auf, dass es durch die Isolation zu einer "Degeneration" der Chondrozyten in Vorläuferzellen kommt, was durch die Beobachtung gestützt wird, dass es bei der Redifferenzierung humaner primärer Chondrozyten in Pelletkultur zu einer Re-Expression von Markern der embryonalen Chondrogenese kommt [86].
Die Expression von Kollagen IX und XI durch Chondrozyten in Kultur betreffend finden sich unterschiedliche Beobachtungen in der Literatur. Kollagen IX wird tendentiell eher in "permanentem" Knorpelgewebe exprimiert, das keine endochondrole Ossifikation vollzieht [51, 71, 75]. Die Beobachtungen von Gerstenfeld et al. an isolierten Hühner-Chondrozyten [28] bestätigen dies. Chondrozyten aus knorpeligen Brustbeinen zeigten eine etwa doppelt so hohe Kollagen-Syntheserate wie Chondrozyten aus Wirbelkörpern, die letztlich eine endochondrale Ossifikation vollziehen [28]. Dies legt einen Einfluss der Herkunft und des entwicklungsbiologischen "Schicksals" der isolierten Chondrozyten nahe und könnte die fehlende Expression von Kollagen IX innerhalb des hier beschriebenen Modellystems erklären.
Auch wenn isolierte Zellen zum Teil weiterhin Kollagen II synthetisieren, konnte es überwiegend nicht mehr extrazellulär detektiert werden. Stattdessen fanden sich Kollagen I und Fibronektin in der extrazellulären Matrix primärer Chondrozyten [15]. Wurden primäre Chondrozyten als Monolayer kultiviert, kam es unabhängig von einer Beschichtung der Zellkulturmaterialien mit Kollagen I, Kollagen II oder Fibronektin zu einer Dedifferenzierung [9]. Die Hinzugabe von Fibronektin zum Kulturmedium zeigte einen inhibitorischen Effekt auf die Chondrogenese, der sich durch den Zusatz von RGD-Peptiden aufheben ließ [107].
Nach dem enzymatischen Verdau der Knorpelmatrix und dem Ausplattieren der primären Chondrozyten kommt es zu einem Wandel der Morphologie von einem rundlichen hin zu einem fibroblastoiden Aussehen. Verursacht wird dieser durch eine veränderte Architektur des Zytoskeletts. Statt eines peripheren Verteilungsmusters wurden Bün-

del von sog. Aktin-Stressfasern, die über Fokale Adhäsionen mit membranständigen Integrin-Rezeptoren kommunizieren [9, 92], detektiert. Die Schlüsselrolle des Zytoskeletts wird durch Versuche aus den 1980er Jahren illustriert, in denen es gelang durch eine Zerstörung des Zytoskeletts mit dem Aktin-bindenden Reagens Cytochalasin D eine chondrogene Differenzierung von Zellen aus embryonalen Extremitätenknospen auch bei geringer Zelldichte und initial spindelartiger Form zu erreichen [108]. Auch im ES-Zell-Modellsystem konnte eine chondrogene Differenzierung durch Cytochalasin D induziert werden [109]. Der inhibitorische Effekt von Vitamin A und Fibronektin auf die Chondrogenese kann durch Cytochalasin D bzw. ein Analogon überwunden werden, im Fall der Applikation von Vitamin A auch ohne eine Veränderung der Zellmorphologie [4, 108]. Dass das Aktin-Zytoskelett weit mehr als nur die Form der Chondrozyten vermittelt, belegt die Abhängigkeit der BMP-7-induzierten chondrogenen Genexpression in bovinen Chondrozyten von der Intaktheit des Zytoskeletts [92].
Vermittelt werden die zytoskelettalen Effekte über die sog. Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42, die wiederum die Aktivität Aktin-modifizierender Proteine regulieren [101]. Die Inhibition der RhoA-Effektorkinasen ROCK-1 und -2 hebt die Bildung von Aktin-Stressfasern in humanen Knorpelzellen in Monolayer-Kultur auf und induziert die Expression des chondrogenen Transkriptionsfaktors Sox9 [88].

Abschließend lässt sich sagen, dass mit der Etablierung des Isolationsmodells in Verbindung mit dem ES-Zell-Modellsystem die Möglichkeit der Untersuchung und Modulation sowohl der chondrogenen Differenzierung als auch der Dedifferenzierung primärer Chondrozyten innerhalb einer Spezies geschaffen wurde. Dieses stellt die Basis für die weitere molekulare Charakterisierung dieser Entwicklungsprozesse dar.

6 Zusammenfassung

Die Knorpelentwicklung ist ein komplexer, mehrstufiger Prozess, der anhand verschiedener Modellsysteme untersucht werden kann. Die *in vitro*-Differenzierung embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) nimmt aufgrund der Rekapitulation der chondrogenen *in vivo*-Entwicklungsprozesse und der Möglichkeit der Beeinflussung zellulärer Differenzierungsprozesse durch exogene Faktoren oder genetische Modifizierung eine besondere Stellung in der Grundlagenforschung ein.
Die Kondensation mesenchymaler Vorläuferzellen stellt den Beginn der Chondrogenese dar. Durch die Erhöhung der Zelldichte und die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten wird die Sekretion der charakteristischen und funktionsbestimmenden extrazellulären Knorpel-Matrix, die vor allem aus Kollagen II und Proteoglykanen wie Aggrecan besteht, initiiert. Einen wesentlich geringeren Anteil der Matrix machen andere Kollagen-Typen wie Kollagen IX und XI aus. Die Isolierung von Knorpelzellen aus Gelenken, der meist damit verbundene enzymatische Verdau der Knorpel-Matrix und das Ausplattieren in einer Monolayer-Kultur führen zum Verlust dieser Matrix und der physiologischen Eigenschaften der Chondrozyten. Dieser Vorgang wird auch als Dedifferenzierung bezeichnet.
Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Rolle des Matrixproteins Fibronektin und seiner Wechselwirkungen mit dem wichtigsten zellulären Rezeptor im Knorpelgewebe, $\alpha_5\beta_1$-Integrin, über das Tripeptid-Bindungsmotiv RGD während chondrogener Differenzierungs- und Dedifferenzierungsprozesse. Darüber hinaus wurde die Expression von Kollagen IX und XI während dieser Prozesse studiert.

Als Modellsystem für die Knorpeldifferenzierung *in vitro* wurden murine ES-Zellen verwendet und als sog. “Hängende Tropfen“ *via* “Embryoid Bodies“ (EBs) differenziert. Mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbungen, histochemischer Färbungen, Immunelektronenmikroskopie und semi-quantitativer RT-PCR sowie quantitativer Real Time-PCR wurde die Expression von Fibronektin und der α_5-Untereinheit des $\alpha_5\beta_1$-Integrins und weiterer knorpelassoziierter Markermoleküle überprüft. Erstmalig wurde dabei auch die Expression und Lokalisation der Minorkollagene IX und XI im ES-Zell-Modellsystem beschrieben. Die Wechselwirkung von Fibronektin und $\alpha_5\beta_1$-Integrin wurde außerdem während früher Differenzierungsstadien durch die Hinzugabe Integrin-blockierender, RGD-enthaltender Peptide beeinflusst. Anhand einer homozy-

got Fibronektin-defizienten ES-Zelllinie wurden die Auswirkungen eines Fehlens von endogenem Fibronektin und dessen exogene Applikation auf die *in vitro*-Differenzierung getestet. Zum Zwecke der Analyse der Expression von Fibronektin und α_5-Integrin im Rahmen von Dedifferenzierungsprozessen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zudem ein Primärkulturmodell durch die Isolation von murinen embryonalen Chondrozyten aus Rippenkäfigen etabliert.

Es konnte gezeigt werden, dass *in vitro* während früher Stadien der chondrogenen Differenzierung muriner ES-Zellen das Matrixprotein Fibronektin und die α_5-Untereinheit seines zellulären Rezeptors $\alpha_5\beta_1$-Integrin in hohem Maße exprimiert werden. Zudem ließen sich Kollagen IX und XI in reifen Knorpelnodules nachweisen. Eine Behandlung von ES-Zellen in frühen Entwicklungsstadien mit Integri-blockierenden, RGD-enthaltenden Oligopeptiden führte durch die verringerte Bildung von mesenchymalen Kondensationen zu einer Inhibition der Knorpeldifferenzierung. Homozygot Fibronektin-defiziente ES-Zellen bildeten während der *in vitro*-Differenzierung als Hängende Tropfen signifikant kleinere EBs, aus und begannen sich nach kurzer Kultivierungsdauer von den Zellkulturmaterialien abzulösen. Eine Substitution von humanem Plasma-Fibronektin im Kulturmedium hatte keinen konsistenten Effekt auf die Größe der EBs.
Während der Kultivierung muriner embryonaler Chondrozyten in Primärkultur *in vitro* kam es zu einem für die Dedifferenzierung typischen Wandel der Morphologie sowie des Genexpressionsmusters. Fibronektin und α_5-Integrin wurden auch während dieses Prozesses in hohem Maße exprimiert. Dies könnte die Theorie unterstützen, dass der Vorgang der Dedifferenzierung der "Degeneration" reifer Chondrozyten in Vorläuferzellen entspricht

Zusammengefasst wird in dieser Arbeit das Modellsystem der ES-Zell-Differenzierung zur Untersuchung von Vorgängen der Knorpelentwicklung insbesondere in frühen Stadien näher charakterisiert und eine essentielle Rolle des RGD-Motivs für chondrogene Entwicklungsvorgänge innerhalb dieses Systems beschrieben. Gemeinsam mit der Etablierung eines murinen Primärkulturmodelles stellt dies die Basis für zukünftigige Forschungsvorhaben zur Erforschung chondrogener Differenzierungs- und Dedifferenzierungsvorgängen innerhalb einer Spezies dar.

7 Literaturverzeichnis

[1] A. Aszodi, E. B. Hunziker, C. Brakebusch, und R. Fässler. Beta1 integrins regulate chondrocyte rotation, g1 progression, and cytokinesis. *Genes Dev*, 17(19):2465–2479, 2003.

[2] O. S. Bang, E. J. Kim, J. G. Chung, S. R. Lee, T. K. Park, und S. S. Kang. Association of focal adhesion kinase with fibronectin and paxillin is required for precartilage condensation of chick mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 278(3):522–529, 2000.

[3] M. L. Barilla und S. E. Carsons. Fibronectin fragments and their role in inflammatory arthritis. *Semin Arthritis Rheum*, 29(4):252–265, 2000.

[4] P. D. Benya, P. D. Brown, und S. R. Padilla. Microfilament modification by dihydrocytochalasin b causes retinoic acid-modulated chondrocytes to reexpress the differentiated collagen phenotype without a change in shape. *J Cell Biol*, 106(1):161–170, 1988.

[5] W. Bi, J. M. Deng, Z. Zhang, R. R. Behringer, und B. de Crombrugghe. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet*, 22(1):85–89, 1999.

[6] U. K. Blaschke, E. F. Eikenberry, D. J. Hulmes, H. J. Galla, und P. Bruckner. Collagen xi nucleates self-assembly and limits lateral growth of cartilage fibrils. *J Biol Chem*, 275(14):10370–10378, 2000.

[7] F. Böhrnsen, U. Lindner, M. Meier, A. Gadallah, P. Schlenke, H. Lehnert, J. Rohwedel, und J. Kramer. Murine mesenchymal progenitor cells from different tissues differentiated via mesenchymal microspheres into the mesodermal direction. *BMC Cell Biol*, 10:92, 2009.

[8] D. Bouvard, C. Brakebusch, E. Gustafsson, A. Aszodi, T. Bengtsson, A. Berna, und R. Fässler. Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Circ Res*, 89(3):211–223, 2001.

[9] K. R. Brodkin, A. J. Garcia, und M. E. Levenston. Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers. *Biomaterials*, 25(28):5929–5938, 2004.

[10] C. E. Caicedo-Carvajal, T. Shinbrot, und R. A. Foty. Alpha5beta1 integrin-fibronectin interactions specify liquid to solid phase transition of 3d cellular aggregates. *PLoS One*, 5(7):e11830, 2010.

[11] P. Castagnola, G. Moro, F. Descalzi-Cancedda, und R. Cancedda. Type x collagen synthesis during in vitro development of chick embryo tibial chondrocytes. *J Cell Biol*, 102(6):2310–2317, 1986.

[12] J. T. Connelly, A. J. Garcia, und M. E. Levenston. Inhibition of in vitro chondrogenesis in rgd-modified three-dimensional alginate gels. *Biomaterials*, 28(6):1071–1083, 2007.

[13] B. de Crombrugghe, V. Lefebvre, und K. Nakashima. Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr Opin Cell Biol*, 13(6):721–727, 2001.

[14] A. M. DeLise, L. Fischer, und R. S. Tuan. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage*, 8(5):309–334, 2000.

[15] W. Dessau, J. Sasse, R. Timpl, F. Jilek, und K. von der Mark. Synthesis and extracellular deposition of fibronectin in chondrocyte cultures. response to the removal of extracellular cartilage matrix. *J Cell Biol*, 79(2 Pt 1):342–355, 1978.

[16] W. Dessau, B. M. Vertel, H. von der Mark, und K. von der Mark. Extracellular matrix formation by chondrocytes in monolayer culture. *J Cell Biol*, 90(1):78–83, 1981.

[17] W. Dessau, H. von der Mark, K. von der Mark, und S. Fischer. Changes in the patterns of collagens and fibronectin during limb-bud chondrogenesis. *J Embryol Exp Morphol*, 57:51–60, 1980.

[18] T. C. Doetschman, H. Eistetter, M. Katz, W. Schmidt, und R. Kemler. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol*, 87:27–45, 1985.

[19] S. A. Downie und S. A. Newman. Different roles for fibronectin in the generation of fore and hind limb precartilage condensations. *Dev Biol*, 172(2):519–530, 1995.

[20] M. Enomoto, P. S. Leboy, A. S. Menko, und D. Boettiger. Beta 1 integrins mediate chondrocyte interaction with type i collagen, type ii collagen, and fibronectin. *Exp Cell Res*, 205(2):276–285, 1993.

[21] M. J. Evans und M. H. Kaufman. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819):154–156, 1981.

[22] R. Fässler, P. N. Schnegelsberg, J. Dausman, T. Shinya, Y. Muragaki, M. T. McCarthy, B. R. Olsen, und R. Jaenisch. Mice lacking alpha 1 (ix) collagen develop noninflammatory degenerative joint disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(11):5070–5074, 1994.

[23] C. ffrench Constant. Alternative splicing of fibronectin–many different proteins but few different functions. *Exp Cell Res*, 221(2):261–271, 1995.

[24] D. Garciadiego-Cazares, C. Rosales, M. Katoh, und J. Chimal-Monroy. Coordination of chondrocyte differentiation and joint formation by alpha5beta1 integrin in the developing appendicular skeleton. *Development*, 131(19):4735–4742, 2004.

[25] A. L. Gehris, S. A. Oberlender, K. J. Shepley, R. S. Tuan, und V. D. Bennett. Fibronectin mrna alternative splicing is temporally and spatially regulated during chondrogenesis in vivo and in vitro. *Dev Dyn*, 206(2):219–230, 1996.

[26] E. L. George, E. N. Georges-Labouesse, R. S. Patel-King, H. Rayburn, und R. O. Hynes. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development*, 119(4):1079–1091, 1993.

[27] E. N. Georges-Labouesse, E. L. George, H. Rayburn, und R. O. Hynes. Mesodermal development in mouse embryos mutant for fibronectin. *Dev Dyn*, 207(2):145–156, 1996.

[28] L. C. Gerstenfeld, M. H. Finer, und H. Boedtker. Quantitative analysis of collagen expression in embryonic chick chondrocytes having different developmental fates. *J Biol Chem*, 264(9):5112–5120, 1989.

[29] F. G. Giancotti und E. Ruoslahti. Integrin signaling. *Science*, 285(5430):1028–1032, 1999.

[30] K. L. Goh, J. T. Yang, und R. O. Hynes. Mesodermal defects and cranial neural crest apoptosis in alpha5 integrin-null embryos. *Development*, 124(21):4309–4319, 1997.

[31] B. K. Hall und T. Miyake. Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. *Int J Dev Biol*, 39(6):881–893, 1995.

[32] G. Hargus, R. Kist, J. Kramer, D. Gerstel, A. Neitz, G. Scherer, und J. Rohwedel. Loss of sox9 function results in defective chondrocyte differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Int J Dev Biol*, 52(4):323–332, 2008.

[33] C. Hegert, J. Kramer, G. Hargus, J. Müller, K. Guan, A. M. Wobus, P. K. Müller, und J. Rohwedel. Differentiation plasticity of chondrocytes derived from mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci*, 115(Pt 23):4617–28, Dec 2002.

[34] D. C. Hocking, J. Sottile, und P. J. McKeown-Longo. Activation of distinct alpha5beta1-mediated signaling pathways by fibronectin's cell adhesion and matrix assembly domains. *J Cell Biol*, 141(1):241–253, 1998.

[35] P. Huhtala, M. J. Humphries, J. B. McCarthy, P. M. Tremble, Z. Werb, und C. H. Damsky. Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin. *J Cell Biol*, 129(3):867–879, 1995.

[36] R. O. Hynes. *Fibronectins*. Springer, 1990.

[37] R. O. Hynes. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6):673–687, 2002.

[38] M. Jakob, O. Demarteau, D. Schafer, B. Hintermann, W. Dick, M. Heberer, und I. Martin. Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation in vitro. *J Cell Biochem*, 81(2):368–377, 2001.

[39] J. Kramer. *Chondrogene und renale Differenzierung von Stammzellen*. Habilitationsschrift, 2006.

[40] J. Kramer, C. Hegert, K. Guan, A. M. Wobus, P. K. Muller, und J. Rohwedel. Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by bmp-2 and bmp-4. *Mech Dev*, 92(2):193–205, 2000.

[41] J. Kramer, C. Hegert, G. Hargus, und J. Rohwedel. Mouse es cell lines show a variable degree of chondrogenic differentiation in vitro. *Cell Biol Int*, 29(2):139–146, 2005.

[42] J. Kramer, M. Klinger, C. Kruse, M. Faza, G. Hargus, und J. Rohwedel. Ultrastructural analysis of mouse embryonic stem cell-derived chondrocytes. *Anat Embryol (Berl)*, 210(3):175–185, 2005.

[43] W. M. Kulyk, W. B. Upholt, und R. A. Kosher. Fibronectin gene expression during limb cartilage differentiation. *Development*, 106(3):449–455, 1989.

[44] H. Kurosawa. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng*, 103(5):389–398, 2007.

[45] Y. Li, D. A. Lacerda, M. L. Warman, D. R. Beier, H. Yoshioka, Y. Ninomiya, J. T. Oxford, N. P. Morris, K. Andrikopoulos, und F. Ramirez. A fibrillar collagen gene, col11a1, is essential for skeletal morphogenesis. *Cell*, 80(3):423–430, 1995.

[46] E. Linder, A. Vaheri, E. Ruoslahti, und J. Wartiovaara. Distribution of fibroblast surface antigen in the developing chick embryo. *J Exp Med*, 142(1):41–49, 1975.

[47] R. F. Loeser, C. S. Carlson, und M. P. McGee. Expression of beta 1 integrins by cultured articular chondrocytes and in osteoarthritic cartilage. *Exp Cell Res*, 217(2):248–257, 1995.

[48] J. N. MacLeod, N. Burton-Wurster, D. N. Gu, und G. Lust. Fibronectin mrna splice variant in articular cartilage lacks bases encoding the v, iii-15, and i-10 protein segments. *J Biol Chem*, 271(31):18954–18960, 1996.

[49] C. Marcelle, S. Ahlgren, und M. Bronner-Fraser. In vivo regulation of somite differentiation and proliferation by sonic hedgehog. *Dev Biol*, 214(2):277–287, 1999.

[50] G. R. Martin. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(12):7634–7638, 1981.

[51] M. Mendler, S. G. Eich-Bender, L. Vaughan, K. H. Winterhalter, und P. Bruckner. Cartilage contains mixed fibrils of collagen types ii, ix, and xi. *J Cell Biol*, 108(1):191–197, 1989.

[52] J. Milaire. Lectin binding sites in developing mouse limb buds. *Anat Embryol (Berl)*, 184(5):479–488, 1991.

[53] A. M. Moursi, C. H. Damsky, J. Lull, D. Zimmerman, S. B. Doty, S. Aota, und R. K. Globus. Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation. *J Cell Sci*, 109 (Pt 6):1369–1380, 1996.

[54] A. M. Moursi, R. K. Globus, und C. H. Damsky. Interactions between integrin receptors and fibronectin are required for calvarial osteoblast differentiation in vitro. *J Cell Sci*, 110 (Pt 18):2187–2196, 1997.

[55] W. Müller-Glauser, B. Humbel, M. Glatt, P. Strauli, K. H. Winterhalter, und P. Bruckner. On the role of type ix collagen in the extracellular matrix of cartilage: type ix collagen is localized to intersections of collagen fibrils. *J Cell Biol*, 102(5):1931–1939, 1986.

[56] P. Murray und D. Edgar. The regulation of embryonic stem cell differentiation by leukaemia inhibitory factor (lif). *Differentiation*, 68(4-5):227–234, 2001.

[57] S. A. Oberlender und R. S. Tuan. Expression and functional involvement of n-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. *Development*, 120(1):177–187, 1994.

[58] K. Ostergaard, D. M. Salter, J. Petersen, K. Bendtzen, J. Hvolris, und C. B. Andersen. Expression of alpha and beta subunits of the integrin superfamily in

articular cartilage from macroscopically normal and osteoarthritic human femoral heads. *Ann Rheum Dis*, 57(5):303–308, 1998.

[59] F. Otto, A. P. Thornell, T. Crompton, A. Denzel, K. C. Gilmour, I. R. Rosewell, G. W. Stamp, R. S. Beddington, S. Mundlos, B. R. Olsen, P. B. Selby, und M. J. Owen. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, 89(5):765–771, 1997.

[60] R. Pankov und K. M. Yamada. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci*, 115(Pt 20):3861–3863, 2002.

[61] R. S. Patel, E. Odermatt, J. E. Schwarzbauer, und R. O. Hynes. Organization of the fibronectin gene provides evidence for exon shuffling during evolution. *EMBO J*, 6(9):2565–2572, 1987.

[62] J. P. Pennypacker, J. R. Hassell, K. M. Yamada, und R. M. Pratt. The influence of an adhesive cell surface protein on chondrogenic expression in vitro. *Exp Cell Res*, 121(2):411–415, 1979.

[63] M. Perala, M. Savontaus, M. Metsaranta, und E. Vuorio. Developmental regulation of mrna species for types ii, ix and xi collagens during mouse embryogenesis. *Biochem J*, 324 (Pt 1):209–216, 1997.

[64] J. H. Peters, S. Carsons, K. Kalunian, S. McDougall, M. Yoshida, F. Ko, M. van der Vliet-Hristova, und T. J. Hahn. Preferential recognition of a fragment species of osteoarthritic synovial fluid fibronectin by antibodies to the alternatively spliced eiiia segment. *Arthritis Rheum*, 44(11):2572–2585, 2001.

[65] J. H. Peters, G. A. Loredo, und H. P. Benton. Is osteoarthritis a 'fibronectin-integrin imbalance disorder'? *Osteoarthritis Cartilage*, 10(11):831–835, 2002.

[66] M. D. Pierschbacher und E. Ruoslahti. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, 309(5963):30–33, 1984.

[67] M. D. Pierschbacher und E. Ruoslahti. Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(19):5985–5988, 1984.

[68] P. Pimton, S. Sarkar, N. Sheth, A. Perets, C. Marcinkiewicz, P. Lazarovici, und P. I. Lelkes. Fibronectin-mediated upregulation of alpha5beta1 integrin and cell adhesion during differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cell Adh Migr*, 5(1):73–82, 2011.

[69] M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, und D. R. Marshak. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411):143–147, 1999.

[70] E. F. Plow, T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, und J. W. Smith. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem*, 275(29):21785–21788, 2000.

[71] A. M. Reginato, J. W. Lash, und S. A. Jimenez. Biosynthetic expression of type x collagen in embryonic chick sternum cartilage during development. *J Biol Chem*, 261(6):2897–2904, 1986.

[72] H. I. Roach, J. Erenpreisa, und T. Aigner. Osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes involves asymmetric cell divisions and apoptosis. *J Cell Biol*, 131(2):483–494, 1995.

[73] B. Romeis. *Mikroskopische Technik*. (Ed. P. Böck) Seite 425-26, 443-44. Urban und Schwarzenberg, München, 17 edition, 1989.

[74] S. Rozen und H. Skaletsky. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, 132:365–386, 2000.

[75] F. Ruggiero, B. Petit, M. C. Ronziere, J. Farjanel, D. J. Hartmann, und D. Herbage. Composition and organization of the collagen network produced by fetal bovine chondrocytes cultured at high density. *J Histochem Cytochem*, 41(6):867–875, 1993.

[76] E. Ruoslahti. Rgd and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 12:697–715, 1996.

[77] E. Ruoslahti und M. D. Pierschbacher. Arg-gly-asp: a versatile cell recognition signal. *Cell*, 44(4):517–518, 1986.

[78] E. Ruoslahti, A. Vaheri, P. Kuusela, und E. Linder. Fibroblast surface antigen: a new serum protein. *Biochim Biophys Acta*, 322(2):352–358, 1973.

[79] D. M. Salter, J. L. Godolphin, und M. S. Gourlay. Chondrocyte heterogeneity: immunohistologically defined variation of integrin expression at different sites in human fetal knees. *J Histochem Cytochem*, 43(4):447–457, 1995.

[80] G. Schulze-Tanzil, P. de Souza, H. Villegas Castrejon, T. John, H.-J. Merker, A. Scheid, und M. Shakibaei. Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell Tissue Res*, 308(3):371–379, 2002.

[81] J. L. Sechler, S. A. Corbett, und J. E. Schwarzbauer. Modulatory roles for integrin activation and the synergy site of fibronectin during matrix assembly. *Mol Biol Cell*, 8(12):2563–2573, 1997.

[82] M. Shakibaei und H. J. Merker. Beta1-integrins in the cartilage matrix. *Cell Tissue Res*, 296(3):565–573, 1999.

[83] M. Shimizu, K. Minakuchi, S. Kaji, und J. Koga. Chondrocyte migration to fibronectin, type i collagen, and type ii collagen. *Cell Struct Funct*, 22(3):309–315, 1997.

[84] P. Smits, P. Li, J. Mandel, Z. Zhang, J. M. Deng, R. R. Behringer, B. de Crombrugghe, und V. Lefebvre. The transcription factors l-sox5 and sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell*, 1(2):277–290, 2001.

[85] S. Takahashi, M. Leiss, M. Moser, T. Ohashi, T. Kitao, D. Heckmann, A. Pfeifer, H. Kessler, J. Takagi, H. P. Erickson, und R. Fässler. The rgd motif in fibronectin is essential for development but dispensable for fibril assembly. *J Cell Biol*, 178(1):167–178, 2007.

[86] T. Tallheden, C. Karlsson, A. Brunner, J. Van Der Lee, R. Hagg, R. Tommasini, und A. Lindahl. Gene expression during redifferentiation of human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 12(7):525–535, 2004.

[87] S. Tavella, G. Bellese, P. Castagnola, I. Martin, D. Piccini, R. Doliana, A. Colombatti, R. Cancedda, und C. Tacchetti. Regulated expression of fibronectin, laminin and related integrin receptors during the early chondrocyte differentiation. *J Cell Sci*, 110 (Pt 18):2261–2270, 1997.

[88] S. R. Tew und T. E. Hardingham. Regulation of sox9 mrna in human articular chondrocytes involving p38 mapk activation and mrna stabilization. *J Biol Chem*, 281(51):39471–39479, 2006.

[89] S. Thirion und F. Berenbaum. Culture and phenotyping of chondrocytes in primary culture. *Methods Mol Med*, 100:1–14, 2004.

[90] L. Vaughan, M. Mendler, S. Huber, P. Bruckner, K. H. Winterhalter, M. I. Irwin, und R. Mayne. D-periodic distribution of collagen type ix along cartilage fibrils. *J Cell Biol*, 106(3):991–997, 1988.

[91] A. Vaughan-Thomas, R. D. Young, A. C. Phillips, und V. C. Duance. Characterization of type xi collagen-glycosaminoglycan interactions. *J Biol Chem*, 276(7):5303–5309, 2001.

[92] R. L. Vinall, S. H. Lo, und A. H. Reddi. Regulation of articular chondrocyte phenotype by bone morphogenetic protein 7, interleukin 1, and cellular context is dependent on the cytoskeleton. *Exp Cell Res*, 272(1):32–44, 2002.

[93] K. von der Mark, V. Gauss, H. von der Mark, und P. Muller. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature*, 267(5611):531–532, 1977.

[94] S. I. Vornehm, J. Dudhia, K. Von der Mark, und T. Aigner. Expression of collagen types ix and xi and other major cartilage matrix components by human fetal chondrocytes in vivo. *Matrix Biol*, 15(2):91–98, 1996.

[95] E. A. Wang, V. Rosen, J. S. D'Alessandro, M. Bauduy, P. Cordes, T. Harada, D. I. Israel, R. M. Hewick, K. M. Kerns, und P. LaPan. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(6):2220–2224, 1990.

[96] Z. Werb, P. M. Tremble, O. Behrendtsen, E. Crowley, und C. H. Damsky. Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. *J Cell Biol*, 109(2):877–889, 1989.

[97] R. B. Widelitz, T. X. Jiang, B. A. Murray, und C. M. Chuong. Adhesion molecules in skeletogenesis: Ii. neural cell adhesion molecules mediate precartilaginous mesenchymal condensations and enhance chondrogenesis. *J Cell Physiol*, 156(2):399–411, 1993.

[98] I. Wierzbicka-Patynowski und J. E. Schwarzbauer. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J Cell Sci*, 116(Pt 16):3269–3276, 2003.

[99] A. M. Wobus und K. R. Boheler. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev*, 85(2):635–678, 2005.

[100] A. M. Wobus, H. Holzhausen, P. Jakel, und J. Schoneich. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res*, 152(1):212–219, 1984.

[101] A. Woods, G. Wang, und F. Beier. Regulation of chondrocyte differentiation by the actin cytoskeleton and adhesive interactions. *J Cell Physiol*, 213(1):1–8, 2007.

[102] J. J. Wu, P. E. Woods, und D. R. Eyre. 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(32):23007–23014, 1992.

[103] E. Wulf, A. Deboben, F. A. Bautz, H. Faulstich, und T. Wieland. Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9):4498–4502, 1979.

[104] D. L. Xie, R. Meyers, und G. A. Homandberg. Fibronectin fragments in osteoarthritic synovial fluid. *J Rheumatol*, 19(9):1448–1452, 1992.

[105] A. Yamashita, S. Nishikawa, und D. E. Rancourt. Identification of five developmental processes during chondrogenic differentiation of embryonic stem cells. *PLoS One*, 5(6):e10998, 2010.

[106] Y. M. Yu, R. Becvar, Y. Yamada, und A. H. Reddi. Changes in the gene expression of collagens, fibronectin, integrin and proteoglycans during matrix-induced bone morphogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 177(1):427–432, 1991.

[107] N. C. Zanetti, V. M. Dress, und M. Solursh. Comparison between ectoderm-conditioned medium and fibronectin in their effects on chondrogenesis by limb bud mesenchymal cells. *Dev Biol*, 139(2):383–395, 1990.

[108] N. C. Zanetti und M. Solursh. Induction of chondrogenesis in limb mesenchymal cultures by disruption of the actin cytoskeleton. *J Cell Biol*, 99(1 Pt 1):115–123, 1984.

[109] Z. Zhang, J. Messana, N. S. H. Hwang, und J. H. Elisseeff. Reorganization of actin filaments enhances chondrogenic differentiation of cells derived from murine embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 348(2):421–427, 2006.

[110] D. Zimmerman, F. Jin, P. Leboy, S. Hardy, und C. Damsky. Impaired bone formation in transgenic mice resulting from altered integrin function in osteoblasts. *Dev Biol*, 220(1):2–15, 2000.

8 Anhang

Analyse der Phosphorylierung der Fokalen Adhäsionskinase mittels Western Blot

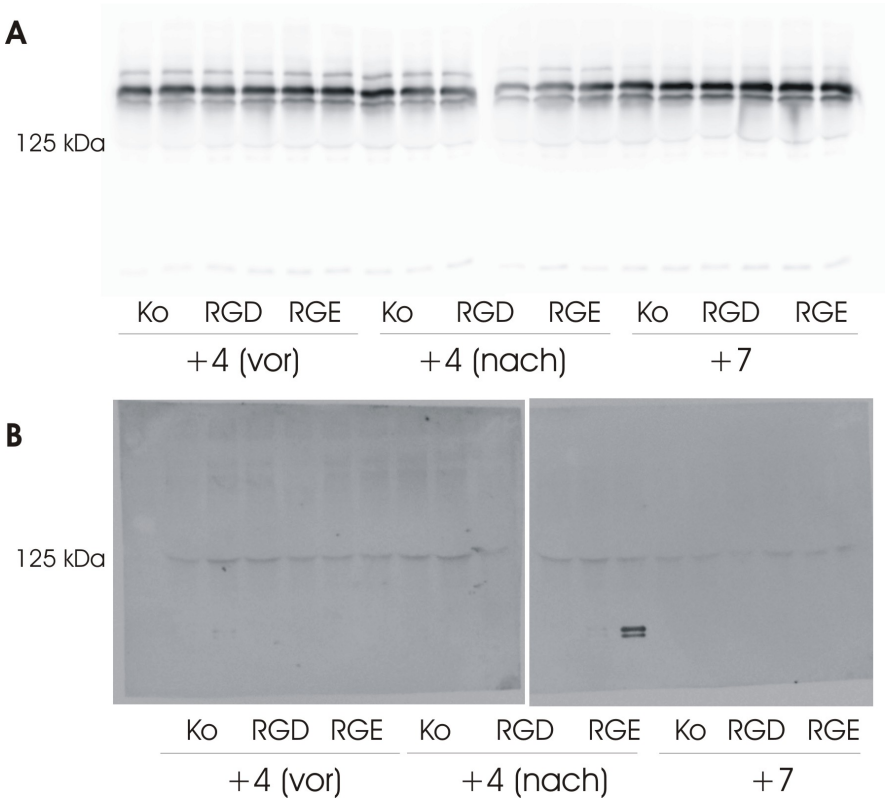

Abbildung 27: Detektierung der Fokalen Adhäsionskinase (FAK, A) und deren an Position 397 phosphorylierten Form (pFAK, B) mittels Western Blotting an Tag 5 + 4d vor und nach Peptidapplikation sowie an Tag 5 + 7d nach Auswaschen der Peptide für unbehandelte EBs (Ko), GRGDSP-behandelte EBs (RGD), sowie GRGESP-behandelte EBs (RGE). Dargestellt sind Doppelbestimmungen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

- Name: David Krug
- Adresse: Kaiserstraße 61, 69115 Heidelberg
- Geburtsdatum: 16.08.1985 in Heidelberg
- Familienstand: verheiratet

Schulausbildung

- 1991–1995: Strahlenberger Grundschule, Schriesheim
- 1995–2004: Heinrich-Sigmund-Gymnasium, Schriesheim
- Juli 2004: Abitur (Durchschnittsnote 1,4)

Studium

- Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck (Oktober 2004 bis April 2011)
- Praktisches Jahr:
  - Februar bis April 2010: Klinik für Strahlentherapie (Direktor: Prof. Dr. J. Dunst), Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
  - April bis Juni 2010: Midwest Proton Radiotherapy Institute (Direktor: Prof. Dr. P. Johnstone), Indiana University School of Medicine, Bloomington, IN
  - Juni bis Oktober 2010: Medizinische Klinik I (Direktor: Prof. Dr. H. Lehnert) und Medizinische Klinik II (Direktor: Prof. Dr. H. Schunkert), Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
  - Oktober bis Dezember 2010: Klinik für Chirurgie (Direktor: Prof. Dr. H.-P. Bruch), Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
- Ärztliche Prüfung:
  - Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: Gesamtnote 1,5 (September 2006)
  - Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: Gesamtnote 1,0 (April 2011)

Promotionsarbeit

- Durchführung in der Interdisziplinären Arbeitsgruppe "Stammzellbiologie" der Medizinischen Klinik I (PD Dr. med. Jan Kramer; Direktor Prof. Dr. med. Hendrik Lehnert) und des Institutes für Virologie und Zellbiologie (Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Rohwedel; Direktor Prof. Dr. rer. nat. Norbert Tautz) der Universität zu Lübeck
- Betreuung: PD Dr. J. Kramer, Medizinische Klinik I
- Förderung durch das Promotionsstipendium "Exzellenzmedizin" der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck
- Juli 2007 bis Februar 2010: praktische Arbeit im Labor
- Februar 2010 bis Juni 2011: Verfassen der Dissertationsschrift
- Poster/Abstracts:
  - **Krug D**, Kramer J. Einer für alle, alle für einen! Mesenchymale Kondensationen während der Knorpelentwicklung.
    Uni im Dialog/Doktorandentag der Universität zu Lübeck (Juli 2008).
  - **Krug D**, Klinger M, Lehnert H, Rohwedel J, Kramer J. Disruption of fibronectin-beta1integrin interactions results in a delayed chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells. Tissue Eng; 15: 690
    3rd Congress on Regenerative Biology and Medicine, Stuttgart (Oktober 2008).
  - Kramer J, Bartsch M, **Krug D**, Nitschke M, Klinger M, Rohwedel J. Simvastatin modulates cartilage nodule formation in murine ES cell-derived embryoid bodies
    5th International Meeting of the Competence Network North-Rhine Westphalia, Aachen (März 2009).
  - **Krug D**, Büning J, Klinger M, Rohwedel J, Kramer J. Fibronectin-integrin interactions during chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells in vitro. Hum Gen Ther; 20: 1498.
  - **Krug D**, Lindner U, Meier M, Rohwedel J, Kramer J. Calciphylaxis: Who is to be blamed? Hum Gen Ther; 20: 1489-90.
    Combined Meeting of the ESGCT, GSZ, DG-GT and ISCT, Hannover (November 2009).
- Aus der Promotionsarbeit hervorgegangene Veröffentlichungen:

- **Krug D**, Klinger M, Haller R, Hargus G, Büning J, Rohwedel J, Kramer J. Minor cartilage collagens are expressed during embryonic stem cell-derived in vitro. Ann Anat 2012, Aug 21. (Epub ahead of print).
- Kramer J, Bartsch M, **Krug D**, Klinger M, Nitschke M, Rohwedel J. Simvastatin modulates mouse ES cell-derived chondrogenesis in vitro. Toxicol In Vitro. 26(7):1170-6, 2012.
- **Krug D**, Klinger M, Rohwedel J, Kramer J. Integrin-mediated effects of fibronectin on chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells. *In Vorbereitung.*

Weitere Publikationen

- **Krug D**, Dunst J. Sekundärmalignome nach Therapie von Ewing-Sarkomen im Kindesalter (Literaturkommentar zu Navid F et al. Eur J Cancer 2008). Strahlenther Onkol 2009; 6: 403-4.
- **Krug D**, Dunst J. Lässt sich das Risiko für Sekundärmalignome vermindern? InFo Onkologie 2009;12: 2-3.
- **Krug D**. Stereotaktische Bestrahlung von Lebermetastasen (Literaturkommentar zu Rusthoven F et al. J Clin Oncol 2009) Strahlenther Onkol; 186: 57-8.
- **Krug D**. Stereotaktische Bestrahlung - Auch bei Lebermetastasen ein schonendes und effektives Verfahren. InFo Onkologie 2010;13: 2-3.
- **Krug D**. Prognostischer Einfluss der HPV-assoziierten p16INK4A-Expression auf das Überleben von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich nach Radiotherapie (Literaturkommentar zu Lassen et al. J Clin Oncol 2009) Strahlenther Onkol; 186: 241-2.

Beruflicher Werdegang

- seit 15.08.2011: Assistenzarzt am Universitätsklinikum Heidelberg, Abt. RadioOnkologie und Strahlentherapie

Extrakurrikuläre Aktivitäten an der Universität zu Lübeck

- 2007 - 2010: gewähltes Mitglied des Konventes der Medizinischen Fakultät
- 2007 - 2010: gewähltes Mitglied der Forschungskommission der Medizinischen Fakultät

- 2008 - 2010: gewähltes Mitglied der Strukturkommission der Medizinischen Fakultät
- 2009 - 2010: gewähltes Mitglied des Senates der Universität zu Lübeck
- 2007 - 2011: regelmäßige Teilnahme an Berufungskommissionen

Preise und Auszeichnungen

- Apollinaire-Preis der Robert-Bosch-Stiftung für außerordentliche Leistungen im Abiturfach Französisch (2004)
- Alfred-Maul-Medaille des Oberschulamtes Karlsruhe für hervorragende Leistungen in Sport (2004)
- Promotionsstipendium "Exzellenzmedizin" der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck (2008)
- Friedrich-Thieding-Preis der Friedrich-Thieding-Stiftung des Hartmannbundes für sehr gute Studienleistungen und berufs- und sozialpolitisches Engagement während des Medizinstudiums (2009)

Tierversuche

Die Isolierung muriner Zellen zum Zwecke der Gewinnung embryonaler Fibroblasten und Chondrozyten wurde durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume Schleswig-Holstein genehmigt (Aktenzeichen V 312-72241.122.4).

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Professor Tautz, Herrn Professor Müller und Herrn Professor Lehnert möchte ich als Instituts- bzw. Klinikdirektoren für die großzügige Bereitstellung von Arbeitsraum und Materialien danken. Darüber hinaus gebührt an dieser Stelle der Medizinischen Fakultät (jetzt Sektion Medizin) der Universität zu Lübeck für die finanzielle Unterstützung in Form des Promotionsstipendiums "Exzellenzmedizin" mein besonderer Dank.

Meinem Doktorvater Jan Kramer verdanke ich nicht nur das Thema der Promotionsarbeit, sondern auch die Heranführung an die Forschung. Beginnend mit dem Antrag für das Promotionsstipendium über zahlreiche Poster und Kongressreisen, bis hin zur Einreichung dieser Arbeit hat er mich mit Rat und Tat unterstützt und war dabei für mich nicht nur in fachlicher Hinsicht eine große Unterstützung. Mein Dank gilt auch Jürgen Rohwedel für viele fruchtvolle Diskussionen, Besprechungen und die Unterstützung meiner Arbeit.
Herrn PD Dr. Matthias Klinger danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die Hilfe im Umgang mit der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie und der Elektronenmikroskopie.

Für die praktische Hilfe möchte ich Alexandra Tiedtke, Barbara Andresen und Heiko Steenbock danken. Sie haben mit allen Bachelor-Studenten, Doktoranden und Praktikanten (besonders Johannes Waldmann, Mandy Bartsch, Elena Schuh und Ralf Haller) dafür gesorgt, dass ich gerne ins Labor gekommen bin und Spaß am Forschen und Arbeiten hatte.

Mein persönlicher Dank gilt meiner Familie, die mich auf dem langen und steinigen Weg über Studium und Promotion immer unterstützt und kein einziges Mal an mir gezweifelt hat.
Last but not least möchte ich meiner Frau Anne danken. Anne, ohne Dich gäbe es diese Arbeit nicht. Danke für Deine Geduld, für Deine Ermutigungen, Deine Beharrlichkeit und Dein Vertrauen in mich.