

aus dem Institut für Immunologie

Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Thiesen

**Steigerung der Matrixproduktion von humanen artikulären
Chondrozyten durch eine Kombination aus adenoviraler Trans-
duktion, Expansion im Monolayer und 3D-Kultur in Alginat**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum humanarum (Dr. rer. hum.)

der Universitätsmedizin Rostock

Rostock, 2012

vorgelegt von:

Dipl.-Ing. (FH) Diana Pohle

aus Hamburg

geboren am 05.12.1983 in Gera

Gutachter:

1. Gutachter:

Prof. Dr. Brigitte Müller-Hilke

Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. Rainer Bader

Orthopädische Klinik und Poliklinik, Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter:

PD Dr. Albert Heim

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene,

Medizinische Hochschule Hannover

Eingereicht am: 08. August 2012

Verteidigt am: 21. Mai 2013

Für meine Familie

1. EINLEITUNG	1
1.1 Knorpel	1
1.1.1 Aufbau und Funktion	1
1.1.1.1 Allgemeine Grundlagen	1
1.1.1.2 Extrazellulärmatrix	2
1.1.2 Umsatz der Extrazellulärmatrix	4
1.1.3 Osteoarthritis	6
1.1.3.1 Ursachen und Entstehung	6
1.1.3.2 Therapie	10
1.2 Rho-Proteine	11
1.2.1 Gruppe der Rho-Proteine und Funktion in der Zelle	11
1.2.2 Stand der Forschung	11
1.3 Adenoviren	12
1.3.1 Grundlagen	12
1.3.2 Klinik, Diagnostik und Therapie	14
1.3.3 Adenoviren in der Gentherapie	15
2. MATERIALIEN UND METHODEN	16
2.1 Spender	16
2.2 Produkte, Chemikalien, technische Geräte und Werkzeuge	16
2.3 Lösungen	20
2.4 PCR- und TaqMan-Primer	21
2.5 Expressionsvektoren und Adenoviren	22
2.6 Software	23
2.7 Herstellung eines RhoB-Expressionsvektors	24
2.7.1 Transformation kompetenter Zellen	24
2.7.2 Validierung der Transformation	24
2.7.2.1 Plasmidaufreinigung mit der QuickLyse Miniprep-Methode	24
2.7.2.2 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	24
2.7.2.3 Agarosegelelektrophorese	25
2.7.3 Ligation von Insert und Plasmidvektor	25
2.7.3.1 Plasmidisolierung mit der Qiagen-Methode	25
2.7.3.2 Ligation von DNA-Fragmenten	26

2.8	Herstellung von RhoB-Adenoviren	27
2.8.1	Herstellung des pAdEasy1-RhoB Plasmids	28
2.8.2	Produktion von Adenoviren	29
2.8.2.1	Phenol-Chloroform-Extraktion	30
2.8.2.2	Transfektion mit dem Effectene Transfection Reagent	30
2.8.2.3	Vermehrung der AdEGFP/RhoB Adenoviren in HEK 293 Zellen	30
2.8.3	Validierung der produzierten Adenoviren	31
2.8.3.1	Nachweis der Produktion von RhoB-Protein im Western Blot	31
2.8.3.1.1	Proteinisolierung	31
2.8.3.1.2	SDS-PAGE, Western Blot und Immunodetektion	32
2.8.3.2	Überprüfung des RhoB-Inserts auf DNA-Ebene	34
2.8.3.2.1	DNA-Isolierung	34
2.8.3.2.2	RhoB-PCR	34
2.8.3.2.3	Sequenzierung des RhoB-Inserts	35
2.9	Zellkultur	36
2.9.1	Anzucht und Passagieren von Zelllinien	36
2.9.2	Isolierung primärer Chondrozyten	36
2.9.2.1	Chondrozyten aus dem Kniegelenkknorpel	36
2.9.2.2	Chondrozyten aus dem Knorpel des Femurkopfes	36
2.10	Transfektion von Chondrozyten	37
2.11	Transduktion mit Adenoviralen Vektoren	38
2.11.1	Chondrozytentransduktion	38
2.11.1.1	Monolayerkultur	38
2.11.1.2	3D-Kultur in Alginat	39
2.11.2	Untersuchung der Matrixproduktion	39
2.11.2.1	Alginatlyse	39
2.11.2.2	RNA-Isolierung und Realtime PCR	39
2.11.2.3	Quantifizierung des DNA-Gehalts	40
2.11.2.4	Quantifizierung der Glukosaminoglykane	40
2.11.2.5	Proteinisolierung und Western Blot	41
2.12	Neutralisationstests	42
3.	ERGEBNISSE	44
3.1	Herstellung eines RhoB-Expressionsvektors	44
3.2	Transfektion von Chondrozyten	47
3.3	Herstellung der RhoB Adenoviren	50
3.3.1	Homologe Rekombination zur Herstellung des AdEasy1-RhoB Plasmids	50
3.3.2	Retransformation des pAdEasy-1 RhoB Plasmids in <i>E. coli</i> XL10-Gold	52
3.3.3	Produktion von AdEGFP/RhoB Adenoviren in HEK 293 Zellen	52
3.3.4	Überprüfung der hergestellten AdEGFP/RhoB Adenoviren	53
3.4	Transduktion von Chondrozyten mit AdEGFP	55
3.4.1	Nachverfolgung der Transgen-Expression	56
3.4.2	Matrixproduktion nach 3D-Kultur	56
3.4.3	Genexpressionsveränderungen nach 3D-Kultur	58
3.5	Neutralisationstests	59

4. DISKUSSION	61
4.1 Gentransfer durch Transfektion mit RhoB-Plasmiden	61
4.2 Gentransfer durch Transduktion mit AdEGFP/RhoB	61
4.3 Knorpel-spezifische Matrixproduktion von Chondrozyten nach Transduktion mit AdEGFP	63
4.4 Neutralisationstests	65
5. ZUSAMMENFASSUNG	67
6. LITERATURVERZEICHNIS	69
7. ANHANG	77

ACAN	aggrecan
ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
ADAMTS	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
APS	ammonium persulfate
BMP	bone morphogenic protein
CRTM	cartilage matrix protein
CRTL	cartilage link protein
EGF	endothelial growth factor
FRZB	secreted frizzled-related protein
GAG	glucosaminoglycan
GDF	growth differentiation factor
GDP	guanosine diphosphate
GTP	guanosine 5' triphosphate
IL	interleukin
IL-1R	interleukin-1 receptor
IFN	interferon
MMP	matrix metalloproteinase
PCR	polymerase chain reaction
Rho	ras homolog gene family
rpm	rounds per minute
SDC	syndecan
TEMED	tetramethylethylenediamine
TIMP	tissue inhibitors of metalloproteinases
TGF	transforming growth factor
TNC	tenascin
TNF	tumor necrosis factor
%	Prozent oder prozentig/e/er/em/es

1. Einleitung

1.1 Knorpel

1.1.1 Aufbau und Funktion

1.1.1.1 Allgemeine Grundlagen

Das Knorpelgewebe wird mit dem Knochengewebe zusammen zum Stützgewebe gezählt und entsteht im Embryo aus dem Mesenchym. Im gesamten Körper kommen verschiedene Knorpelarten vor, neben dem Faserknorpel der Sehnen und Bänder und dem elastischen Knorpel der Ohrmuschel wird der hyaline Knorpel der Atemwege und Gelenkflächen unterschieden. Die verschiedenen Arten des Knorpels unterscheiden sich in der Zusammensetzung der Interzellulärsubstanz [Welsch 2003].

Die Diarthrosen sind eine funktionale Einheit aus artikulierenden Gelenkflächen mit hyalinem Knorpel, subchondralem Knochen und Synovia, umgeben von einer Gelenkkapsel aus Membrana fibrosa und Membrana synovialis. Zudem können sich im Gelenkspalt weitere knorpelige Strukturen befinden. Dazu zählen unter anderem Disci, Menisci articulares und Labra articularia [Welsch 2003].

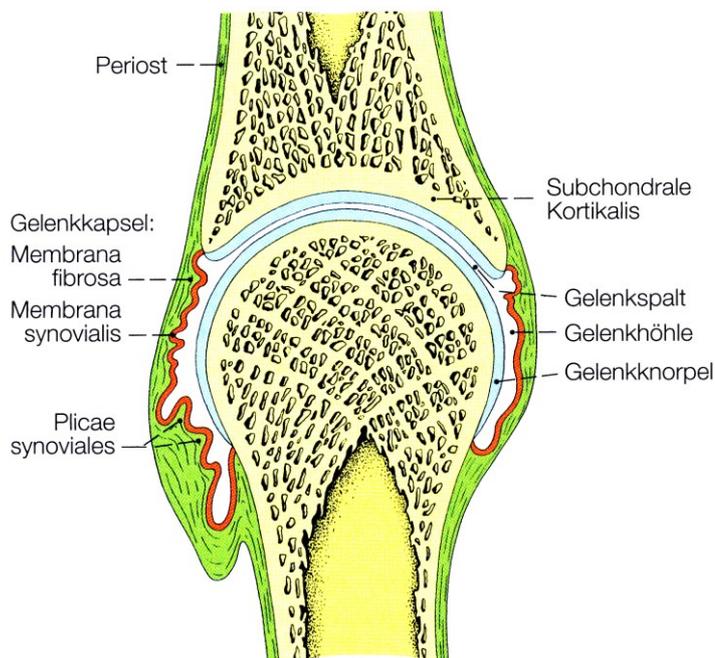


Abbildung 1: Aufbau einer Diarthrose [Benninghoff 2003]

Der hyaline Knorpel der Gelenkflächen besteht aus den Chondrozyten und Chondroblasten und der von ihnen sezernierten Extrazellulärmatrix. Da der hyaline Knorpel frei von Blutgefäßen und Nerven ist, kann die Versorgung ausschließlich durch Diffusion, ausgehend vom Perichondrium oder der Synovialflüssigkeit, erfolgen [Grey 1918].

Bei der Entstehung des Knorpels runden sich die Vorläuferzellen ab und wandeln sich in Chondroblasten um. Diese sekretieren die Extrazellulärmatrix und rücken dadurch weiter auseinander. In diesem Stadium ist die Matrix noch flexibel und die aus Zellteilung hervorgegangenen Zellen können sich noch weit voneinander entfernen. Nach der Versteifung der Knorpelmatrix bilden sich nach der Zellteilung gruppenförmige Aggregate, welche als Chondrone bezeichnet werden. Diese sind von einem Matrixsaum (Territorien) umgeben. Die Matrix zwischen den Territorien der Chondrone wird als Interterritorien bezeichnet. Für das weitere Wachstum des Knorpels, und in begrenztem Rahmen auch für die Regeneration von oberflächlichen Knorpelschäden, wird neuer Knorpel von der Oberfläche her gebildet. Die dort sitzenden Chondroblasten können sich noch mitotisch teilen und für ein weiteres Knorpelwachstum sorgen [Welsch 2003, Hall 2005].

Die Extrazellulärmatrix des Gelenkknorpels besteht aus Glukosaminoglykanen (GAGs; Chondroitinsulfat und Proteoglykane) und Kollagenen. Die Wasserbindekapazität des Gelenkknorpels wird durch das Proteoglykan Aggrekan und die Hyaluronsäure gewährleistet. Der Gelenkknorpel kann somit die Übertragung großer Druckkräfte in den Gelenken bei minimalen Reibungsverlusten gewährleisten und bis zu 80 % aus Wasser bestehen. Durch die Komprimierung des Knorpels bei den Gelenkbewegungen wird eine Versorgung aller Knorpelschichten mit Nährstoffen gewährleistet [Welsch 2003, Hall 2005, Scharf 2009].

1.1.1.2 Extrazellulärmatrix

Die von den Chondrozyten und Chondroblasten produzierte Matrix kann in Kollagene, Proteoglykane und Glykoproteine eingeteilt werden. Dabei zählen 60 % der Matrixmoleküle zu den Kollagenen, 30 % zu den Proteoglykanen und 10 % zu den Glykoproteinen. Die Kollagene bilden eine hochspezialisierte Familie der Glykoproteine. Im Gelenkknorpel kommen zu 90 % Kollagene des Typs 2 und zu 10 % die Typen 6, 9, 10 und 11 vor [Ayad 1998, Scharf 2009, Benninghoff 2003].

Kollagene

Das Kollagen 2 besteht aus drei identischen $\alpha 1(\text{II})$ Untereinheiten und wird durch das COL2A1-Gen codiert. Mehr als 50 Mutationen in diesem Gen sind beschrieben; einige stehen im Zusammenhang mit einem frühen Beginn einer Osteoarthritis. An die Kollagen Typ 2 Fibrillen lagert sich das Kollagen 9 an. So kann die Verbindung zu anderen Matrixbestandteilen hergestellt und der Durchmesser der Kollagen Typ 2 Fibrillen reguliert werden. Das Kollagen 9 besteht aus drei verschiedenen $\alpha(\text{IX})$ Untereinheiten welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Mutationen in den Genen COL9A1 und COL9A2 führen zu Chondrodysplasien und einem frühen Beginn einer Osteoarthritis. Das Kollagen 6 besteht aus drei verschiedenen $\alpha(\text{VI})$ Untereinheiten und ist im Wesentlichen durch seine Interaktion

mit der Zelloberfläche an der Anheftung und Signalübertragung zwischen dem Chondrozyt und der Matrix beteiligt. An der endochondralen Entwicklung des Knochens wirkt das Kollagen 10 mit, welches von hypertrophen Chondrozyten exprimiert wird. Das Kollagen 10 besteht, wie auch das Kollagen 2, aus drei identischen α -Untereinheiten ($\alpha 1(X)$). Ein weniger häufiges Kollagen des Gelenkknorpels ist das Typ 11 Kollagen. Dieses kann mit den Kollagenen Typ 2 und 10 auch untypische Fibrillen bilden [Ayad 1998, Poole 1997].

Proteoglykane

Bei diesen Proteinen handelt es sich um eine spezielle Form von Glykoproteinen, bestehend aus einem Kernprotein mit Seitenketten aus sulfatierten Glukosaminoglykanen (GAGs). Letztere sind lineare Polysaccharidketten aus repetitiven Disaccharideinheiten. Darüber hinaus handelt es sich bei diesen um hydrophile und negativ-geladene Moleküle, die im Knorpel Wasser binden können. Zu der Gruppe der sulfatierten GAGs zählen die Chondroitin-, Keratan-, Dermatan- und Heparansulfate [Ayad 1998, Benninghoff 2003].

Der häufigste Vertreter unter den Proteoglykanen des Knorpels und gleichzeitig auch der größte ist das Aggrecan. Der Proteinkern trägt Chondroitin- und Keratansulfatseitenketten und neigt zur Aggregatbildung mit Hyaluronsäure und Kollagen Typ 2 Fibrillen. Die Bindung des Aggrecans an die Hyaluronsäure wird zusätzlich durch ein Bindeprotein (Hyaluronectin) stabilisiert [Scharf 2009, Benninghoff 2003], siehe Abbildung 2.

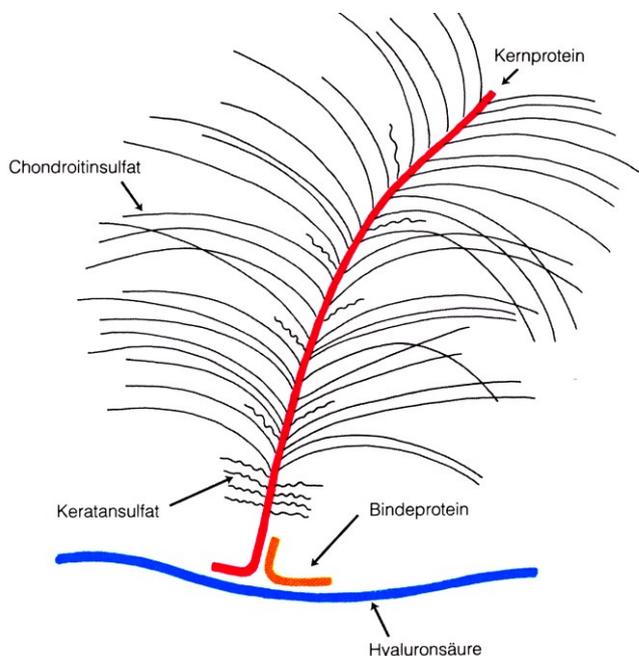


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur des Proteoglykans Aggrecan [Benninghoff 2003]

Eine Unterteilung der Proteoglykane kann in drei Gruppen erfolgen. Zur ersten Gruppe gehören die hyaluronsäurebindenden großen Proteoglykane wie Aggrecan und Versican. Zu einer zweiten Gruppe werden die kleinen interstitiellen Proteoglykane Fibromodulin und Decorin gezählt. Die dritte Gruppe bilden perizelluläre Proteoglykane zu denen auch Syndekan (Syndekan-1 bis -4) zählt. Die hyaluronsäurebindenden Proteoglykane sind für den Wasserhaushalt und die mechanische Belastung von entscheidender Bedeutung. Zudem sind sie an der Ausbildung der dreidimensionalen Struktur mit den Kollagenfasern wesentlich beteiligt. Fibromodulin und Decorin binden an Kollagenfibrillen und beeinflussen die Fibrillogenese. Zudem können sie den Wachstumsfaktor TGF- β binden und damit die Matrixsynthese beeinflussen. Die Syndekane sind transmembrane Proteoglykane auf der Oberfläche von Zellen. Sie können als Bindestellen für Wachstumsfaktoren, Cytokine und andere Extrazellulärmatrix-Proteine fungieren [Ayad 1998, Poole 1997, Benninghoff 2003].

Glykoproteine

Die Glykoproteine der Knorpelmatrix sind Fibronectin, Laminine, Chondronektin, Tenascine und COMP (cartilage oligomeric matrix protein, Sonderform der Thrombospondine). Diese Proteine besitzen im Gegensatz zu den Proteoglykanen nur kurze, nicht-sulfatierte Polysaccharidseitenketten. Glykoproteine können an die Zelle über Integrine binden und ermöglichen neben der Bewegung der Zellen im Gewebe auch deren Adhäsion. Fibronectin vermittelt den Kontakt der Zellen zu Kollagenfasern und Proteoglykanseitenketten. Tenascine kommen in fünf verschiedenen Formen vor und können wie Fibronectin an Proteoglykanseitenketten binden und eine Quervernetzung in der Extrazellulärmatrix ermöglichen. Um eine Verkalkung des Knorpels zu verhindern wird das Matrix-GIA-Protein benötigt [Ayad 1998, Benninghoff 2003].

1.1.2 Umsatz der Extrazellulärmatrix

Neben den Proteinen der Extrazellulärmatrix synthetisieren die Chondrozyten auch alle Enzyme und Inhibitoren des Matrixabbaus selbst. Unter anderem sezernieren die Chondrozyten verschiedene Proteinase (Matrix Metalloproteinase, MMP, „a disintegrin and metalloproteinase“, ADAM und „ADAM with thrombospondin motifs“, ADAMTS) und sie bauen Matrix durch Endozytose und lysosomale Degeneration ab [Benninghoff 2003]. Gegenspieler im Matrixabbau sind die Tissue Inhibitors of Metalloproteases (TIMPs). Diese können die katalytische Domäne verschiedener MMPs binden und dadurch den Matrixabbau inhibieren [Murphy 2005]. Im gesunden Knorpel herrscht ein Gleichgewicht zwischen der Synthese von Matrixproteinen und der Expression und Aktivierung von matrixabbauenden Proteasen.

Katabole Faktoren

Die für den Gelenkknorpel wichtigsten katabolen Cytokine sind die Interleukine, im speziellen Interleukin 1 (IL-1), IL-17 und IL-18, der Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und das Interferon- γ (IFN- γ). Chondrozyten reagieren mit der Expression verschiedener Proteine auf das pro-inflammatorische IL-1 β . Zum einen werden die Matrixproteine Aggrecan und Kollagen Typ 2 vermindert exprimiert, zum anderen werden die Matrix abbauenden Enzyme MMP-1, -3, -13 und ADAMTS-4 synthetisiert. Eine weitere Wirkung auf die Chondrozyten wird durch die Expression von IL-6 und LIF induziert. IL-6 wirkt ähnlich wie IL-1, hingegen kann LIF die Expression von Proteoglykanen durch die Chondrozyten unterdrücken und führt zu einer erhöhten MMP-13 Produktion der Chondrozyten [Pfander 2004, Huber 2000, Sandell 2001, Aigner 2006].

Eine Übersicht über die wichtigsten Enzyme des Matrixabbaus und deren Wirkungsweise soll mit Tabelle 1 und Abbildung 3 vermittelt werden.

Tabelle 1: Übersicht der am Matrixabbau beteiligten Enzyme [Murphy 2005, Huber 2000, Sandell 2001, Durigova 2011, Aigner 2002].

Enzyme	Synonym	Spaltung von
MMP-1, -8, -13	Kollagenase	Kollagenen
MMP-2, -9	Gelatinase	denaturierten Kollagenen
MMP-3, -10, -11	Stromelysin	Aggrecan, denaturierten Kollagenen, Kollagen Typ 4 und 9
MMP-7	Matrilysin	vielen verschiedenen Proteinen
ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9, -15	Aggrecanase	Aggrecan (aktivste Formen)
Cathepsin G		
Plasmin		Pro-Kollagenasen
Kallikrein		Plasminogen (Zymogen des Plasmins)

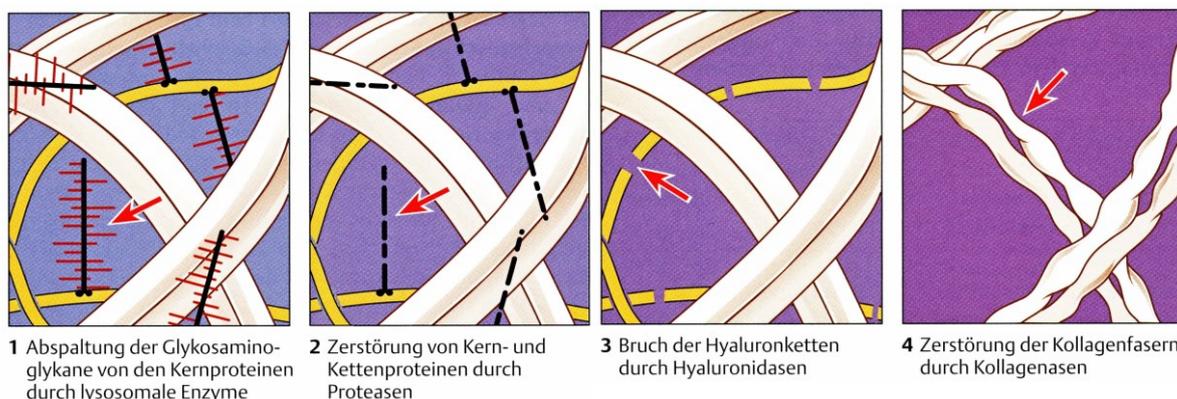


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Verlaufs der Matrixdegeneration [Niethard 2005]

Anabole Faktoren

Zu den stärksten anabolen Faktoren, die von Chondrozyten gebildet werden, zählen die bone morphogenic proteins (BMPs). Diese sind Mitglieder der TGF- β Superfamilie und führen zu einer Steigerung der Proteoglykan und Kollagen Typ 2 Synthese in Chondrozyten [Aigner 2006].

Ein anderer anaboler Faktor ist der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor 1 (IGF-1). Durch diesen wird die Proteoglykansynthese verstärkt, die Expression von inflammatorischen Cytokinen und MMPs reduziert und das Überleben von Chondrozyten verlängert. Eine weitere Gruppe anaboler Faktoren stellen die anti-inflammatorischen Cytokine IL-4, -10, -13 sowie der IL-1 Rezeptor Antagonist dar. Diese wirken den pro-inflammatorischen Cytokinen entgegen [Aigner 2002, Chubinskaya 2007].

Tabelle 2: Übersicht über die Inhibitoren der Proteinasen [Murphy 2005, Huber 2000, Baragi 1994, Butler 1999, Stratmann 2001, Troeberg 2009, Wang 2006].

Proteine	Inhibiert:
TIMP-1	MMP-1, -3, -9, -13
TIMP-2	MMP-2, proMMP-2
TIMP-3	MMP-2, -9 / ADAMTS-1, -2, -4, -5
TIMP-4	alle MMPs
plasminogen activator inhibitor	

1.1.3 Osteoarthritis

1.1.3.1 Ursachen und Entstehung

Bei der Osteoarthritis handelt es sich um eine degenerative Gelenkerkrankung, primär ohne entzündliche Ursache, die mit dem Abbau der Knorpelschicht einhergeht und zumeist Personen über 60 Jahre betrifft. Bei 90 % der über 75-jährigen kann radiologisch eine Osteoarthritis nachgewiesen werden, welche nicht zwangsläufig symptomatisch verlaufen muss [Arden 2008]. Die Erkrankung beginnt mit dem Ausfransen der obersten Knorpelschicht, die eine verminderte Gleitfähigkeit der Gelenkflächen bewirkt [Arden 2008]. Der Verlust an Knorpel führt zudem auch zu einer Instabilität des Gelenks. Bedingt durch eine reduzierte Distanz zwischen den Gelenken werden die Bänder nicht mehr ausreichend gespannt. Desweiteren treten auch andere physiologische Veränderungen ein, um den Knorpelverlust zu korrigieren [Arden 2008]. Dazu gehören die Vermehrung und Mineralisierung des subchondralen Knochens (Sklerosierung) [Benninghoff 2003] und die Bildung von Osteophyten [Arden 2008, Samuels 2008] und Geröllzysten [Arden 2008]. Einhergehend mit der Veränderung des Knochens reagiert auch das Synovium auf den Knorpelverlust. Es wird dicker, nimmt an Masse zu und mitunter kommt es auch zu Entzündungen [Arden 2008, Samuels 2008]. Ausgelöst werden diese Veränderungen wahrscheinlich durch die Knorpel-Abbauprodukte, die sich in

der Synovialflüssigkeit sammeln. Das so veränderte Synovium reagiert darauf mit einer vermehrten Produktion von Synovialflüssigkeit was zu einer Schwellung des Gelenks führt [Arden 2008]. Bislang wurde die Osteoarthrose als zwangsläufig fortschreitender, degenerativer Erkrankungsverlauf betrachtet. Durch neuere Studien kann jedoch ausgegangen werden, dass es sich um einen dynamischen Prozess mit episodischem Verlauf und verschiedenartigen Erkrankungen bei der Entstehung handelt [Haq 2003]. Bei der optischen Betrachtung der Knorpelfläche eines Gelenkes lassen sich die in Tabelle 3 dargestellten Stadien des Verlaufs der Osteoarthrose einteilen. Die makroskopischen Veränderungen sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

Tabelle 3: Makroskopische Einteilung des Verlaufs der Osteoarthrose mit dem Collins Score nach Muehleman 1997

Stadium	Veränderungen
0	keine morphologischen Veränderungen
1	beginnende Fibrillierung, Veränderungen an der Knorpeloberfläche (abblättern von Knorpel, oberflächliche Vertiefungen, Riefen, Beulen) ohne Veränderung in der Oberflächengeometrie
2	ausgeprägte Fibrillierung und Rissbildung, Veränderungen an der Knorpeloberfläche (abblättern, Vertiefungen, Beulen), beginnende unwesentliche Hyperplasie und kleine Osteophyten
3	ausgedehnte Fibrillierung und Rissbildung, deutliche Osteophyten und bis zu 30 % der Knorpelfläche sind bis zum subchondralen Knochen erodiert
4	markante Osteophyten, Vorsprünge oder Stufen im Gelenkspalt, mehr als 30 % der Knorpeloberfläche sind bis zum subchondralen Knochen erodiert und deutliche Veränderungen in der Gelenkgeometrie

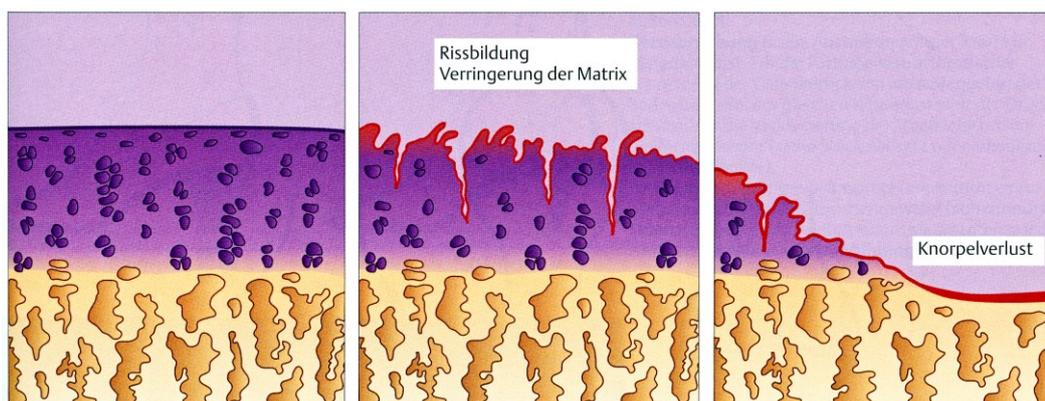


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Knorpeldestruktion bis hin zum vollständigen Knorpelverlust [Niethard 2005]

Bei der Osteoarthrose werden 2 Arten unterschieden, solche die lokal oder generalisiert ohne bekannte Ursache auftreten (primäre Arthrosen) und solche bei denen Traumata oder Entzündungen zu Grunde liegen (sekundäre Arthrosen) [Haq 2003, Niethard 2005].

Die Entstehung einer primären Osteoarthrose kann verschiedene Ursachen haben. Es wird eine altersbedingte Veränderung des artikulären Knorpels mit einhergehender verminderter Zellvitalität beschrieben. Darüberhinaus wird von einer zunehmenden Verschlechterung der

Stoffwechselsituation der Chondrozyten ausgegangen [Erggelet 2001]. Eine weitere Ursache zur Entstehung einer Osteoarthrose ist in der Immobilisierung eines Gelenkes zusehen. Dabei wird angenommen, dass sich die Chondrozyten durch die Unterbrechung der Nährstoffversorgung in einem Schock-Zustand befinden und dadurch unter anderem auch die Reparaturmechanismen des Knorpels außer Kraft gesetzt werden [Haq 2003].

Im gesunden Knorpel herrscht ein Gleichgewicht zwischen IL-1 β und dem IL-1R Antagonisten. Bei der Osteoarthrose verschiebt sich dieses Gleichgewicht in Richtung des katabolen IL-1 β [Pfander 2004]. Die daraus resultierende vermehrte Ausschüttung von Metalloproteinasen, vor allem MMP-2, -11 und -13 [Aigner 2002] und ADAMTS [Aigner 2006] kann nicht mehr durch die TIMPs kompensiert werden, da diese weniger exprimiert werden [Aigner 2001]. Das Zusammenspiel dieser Ereignisse führt zum Abbau von Kollagenen und Proteoglykanen. Von einer Beteiligung des Synoviums bei der Osteoarthrose wird ausgegangen. Die Synovialzellen produzieren vermehrt IL-1 und TNF- α und induzieren damit eine weitere Produktion von Metalloproteinasen [Aigner 2002, Haq 2003, Honorati 2002] und den Verlust von Glukosaminoglykanen aus der Extrazellulärmatrix [Aigner 2002, Little 1999]. Der Verlust an Proteoglykanen [Sandell 2001] hat zur Folge, dass die Knorpelmatrix an Druck- und Zugsteifigkeit verliert [Hudelmaier 2001, Bank 2000] und Ödeme und Schwellungen auftreten [Imhof 1997]. An diesen Stellen expandieren die Chondrozyten klonal und migrieren zu den Grenzen der Schwellungen [Huber 2000]. Dort bilden sie Kollagen Typ 9 [Poole 1997] und versuchen somit die Kollagen Typ 2 Fibrillen im Netzwerk zu stabilisieren und dem Matrixabbau entgegenzuwirken.

Die hypertrophen Chondrozyten der Knorpelmatrix produzieren bei der Osteoarthrose Syndekan-4. Dieses kann ADAMTS-5 nicht nur durch direkte Interaktion aktivieren, sondern auch durch die Regulation der MMP-3 Synthese [Echtermeyer 2009]. Ebenso ist eine Aktivierung von ADAMTS-4 durch Syndekan-1 beschrieben [Gao 2004]. Eine Expression von Osteocalcin, einem Marker für Osteoblasten, ist bei hyperthrophen Chondrozyten in osteoarthritischem Knorpel beschrieben. Dabei konnte ein proportionaler Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Osteoarthrose und der Expression von Osteocalcin gefunden werden [Pulig 2000]. Werden ältere oder osteoarthritische Chondrozyten mit Fragmenten des Fibronektins (Abbauprodukte der Extrazellulärmatrix) stimuliert, resultiert dies in einer IL-7 Produktion. Da artikuläre Chondrozyten einen IL-7 Rezeptor auf der Zelloberfläche exprimieren, kommt dies einer Signaltransduktion zur vermehrten MMP-13 Produktion und einem damit einhergehenden Matrixabbau gleich [Long 2008]. Die durch IL-1 α und IL-1 β induzierte Matrixdegeneration durch MMP-1, -3, -13 und ADAMTS-4 kann durch eine Stimulation mit Hyaluronsäure supprimiert werden [Julovi 2004, Yatabe 2009]. Die Arbeitsgruppe um Fan [Fan 2009] hat einen weiteren Signalweg der IL-1 β -vermittelten MMP-13 Expression über die Reduktion von p130cas und heat shock protein (HSP) 90 β beschrieben.

Zusammenfassend ist für die Osteoarthrose ein Matrixabbau durch MMP-2, -11, -13 und ADAMTS-4 & 5 verantwortlich, einhergehend mit einer verminderten Expression der MMP-Inhibitoren. Durch die Zunahme an Syndekan-4 wird ein Matrixabbau stimuliert, ebenso wirkt sich die Stimulation der Chondrozyten mit IL-7 aus.

Zudem sind eine Vielzahl von Risikofaktoren, die an der Entstehung einer Osteoarthrose beteiligt sein können, beschrieben. Dazu zählen neben den genetischen Faktoren auch Umweltfaktoren wie Adipositas und Muskelschwäche oder aber Verletzungen [Arden 2008].

Genetische Faktoren

Viele der möglichen Gene im Zusammenhang mit einer Osteoarthrose konnten auf den Chromosomen 2q, 4, 16 [Haq 2003] und 9q, 11q [Spector 2004] gefunden werden. Dabei kodieren diese Gene häufig Sequenzen für Proteine der Extrazellulärmatrix [CRTM, CRTL, Kollagen Typ 2, 9 und 11; Haq 2003, Spector 2004], für anabole [BMP2, GDF5; Haq 2003 / IGF-1, TGF- β ; Spector 2004 / IL-1R Antagonist, Valdes 2009] oder für katabole Faktoren [IL-1, -6 und -10; Valdes 2009].

Ein Zusammenhang zwischen der Entstehung der Osteoarthrose und bestimmten HLA-Einzelmerkmalen wurde bereits von vielen Arbeitsgruppen untersucht. Es konnte sowohl für HLA-A1B8 [Patrick 1989, odds ratio 2,4] als auch für HLA-DR2 [Moos 2002, odds ratio 1,58; Riyazi 2003, odds ratio 2,4] eine Assoziation mit dem Entstehen einer Osteoarthrose festgestellt werden.

Umweltfaktoren

Ab einem Alter von 50 Jahren nimmt, im Vergleich zu Männern, das Risiko der Frauen an Osteoarthrose zu erkranken deutlich zu. Es wird davon ausgegangen, dass der sinkende Östrogenspiegel in der Menopause ein Auslöser ist [Haq 2003].

Ein erhöhtes Risiko haben auch Patienten die an Adipositas leiden [Cooper 2000, Samuels 2008, Karlson 2003]. Bei diesen steigt die Wahrscheinlichkeit an Osteoarthrose zu erkranken, wenn sich ihr body mass index um zwei (≈ 5 kg) erhöht. Bei Reduktion des Körpergewichts um 5 kg sinkt bei übergewichtigen Frauen das Risiko, an Knie-Arthrose zu erkranken, um 50 % [Haq 2003].

Ebenso scheint ein Zusammenhang zwischen einem Vitamin-Mangel (Vitamin C und D) und einem dreifach erhöhten Risiko zur Entwicklung einer Knie-Arthrose zu bestehen [Haq 2003]. Bakterien und Viren als Auslöser für die Osteoarthrose wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen kontrovers diskutiert. Die Arbeitsgruppe um Aslan wies bei Osteoarthrosepatienten das Parvovirus B19 (PVB19) in der Synovialflüssigkeit nach und zeigte einen direkten Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Viruspartikeln und dem Osteoarthrosegrad [Aslan 2008].

1.1.3.2 Therapie

Bei der Osteoarthrose werden verschiedene Therapieansätze beschrieben. Dabei wird oft mit einer nichtpharmakologischen Therapie begonnen und diese bei Verschlechterung des Krankheitsverlaufs um eine pharmakologische Therapie erweitert. Bei einem großflächigen Gelenkknorpelverschleiß oder schwerwiegenden Traumata bleibt oft nur die Möglichkeit eines Gelenkersatzes. [Haq 2003]

Der mit Abstand wichtigste Faktor das Fortschreiten der Osteoarthrose zu verlangsamen, ist Sport. Durch die Bewegung der betroffenen Gelenke wird versucht der Schwächung der Muskeln oder dem Abbau von Muskelmasse als Folge der eingeschränkten Bewegung entgegenzuwirken. Durch Sport kann es zu einer Gewichtsreduktion kommen und so zu einer Entlastung der Hüft- und Kniegelenke [Arden 2008].

Bei der pharmakologischen Therapie werden neben Paracetamol auch nicht-steroidale Entzündungshemmer verabreicht. Eine andere Methode der Therapie stellt die Injektion von Corticoiden und Hyaluronsäure in das Gelenk dar [Arden 2008, Haq 2003]. Die orale Gabe von Glukosaminosulfaten führte im Vergleich zur Placebo-Gruppe zu keiner Verbesserung der Osteoarthrose [Hughes 2002].

Zu einer operativen Therapie der Osteoarthrose wird meist nur dann gegriffen, wenn die pharmakologischen Therapien nicht mehr ansprechen und die Patienten aufgrund der Schmerzen massive Einschränkungen im täglichen Leben haben [Arden 2008]. Dabei werden verschiedene Eingriffe zur Verbesserung der Gelenkmechanik und Gelenkbiologie sowie die Gelenkplastiken und der Gelenkersatz unterschieden [Niethard 2005].

Zu den Verbesserungen der Gelenkbiologie, bei bis zu 2 cm² großen Knorpeldefekten, wird die Pridie-Bohrung gezählt. Dabei wird die erodierte Gelenkfläche durch Bohrungen verletzt, die Einsprossung von Blutgefäßen aus dem darunter liegenden Knochen angeregt und die Bildung eines Ersatzknorpels (Faserknorpel) ermöglicht [Niethard 2005, Scharf 2009]. Eine andere Methode zur Verbesserung der Gelenkbiologie, auch bei großen Knorpeldefekten, stellt die autologe Chondrozytentransplantation (ACT) dar. Dabei wird dem Patienten Knorpel außerhalb der Knorpeldefekte entnommen, die Chondrozyten werden im Labor vermehrt und in einer weiteren Operation dem Patienten an den Knorpeldefekten implantiert [Madry 2009, Scharf 2009]. Ebenso ist es möglich ganze Knochen-Knorpel-Transplantate an die beschädigten Gelenkstellen einzubringen. Dafür wird an einer nicht-belasteten Stelle des Gelenks ein Zylinder ausgestanzt und in die zuvor vorbereitete Stelle eingebracht. Dort verwächst der eingebrachte Zylinder mit dem restlichen Gewebe [Scharf 2009]. Weitere Forschungsvorhaben widmen sich der lokalen Applikation entzündungshemmender Cytokine und der genetischen Veränderung der Knorpelzellen [Haq 2003, Madry 2007]. Gelenkplastiken und gelenkversteifende Maßnahmen der Hüft und Kniegelenke kommen nur noch selten

zur Anwendung. Der Gelenkersatz stellt bei vielen Patienten mit schwerer Osteoarthrose der Hüft- und Kniegelenke die letzte Lösung dar [Arden 2008, Niethard 2005].

1.2 Rho-Proteine

1.2.1 Gruppe der Rho-Proteine und Funktion in der Zelle

Die RhoB-GTPasen, mit bislang 22 bekannten Genen, gehören zur Familie der kleinen GTPasen und werden in allen eukaryotischen Zellen exprimiert. Sie liegen in zwei Formen in der Zelle vor, zum einen als inaktive, GDP-gebundene und zum anderen als aktive, GTP-gebundene Form. Der Wechsel vom inaktiven in den aktiven Zustand wird durch die guanine nucleotide exchange factors (GEFs) durch den Austausch von GDP durch GTP am Protein ermöglicht. Durch diese Aktivierung können die GTPasen mit ihren Effektorproteinen interagieren. Die Inaktivierung der GTPasen wird durch die GTPase-activating proteins vermittelt. Um eine spontane Aktivierung der GDPasen zu verhindern, binden guanine nucleotide dissociation inhibitors (GDIs) an die GDP-gebundene Form [Jaffe 2005, Heasman 2008].

Die Rho-GTPasen sind an der Regulation vieler verschiedener zellulärer Prozesse beteiligt, dazu zählen neben dem Zellzyklus, der Migration und Morphogenese auch die Aktin- und Myosin-Zytoskelett-Organisation und die Genexpression [Jaffe 2005, Heasman 2008, Fritz 1995].

RhoB reguliert verschiedene intrazelluläre Signalwege. Dazu zählt die negative Regulation der TGF- β Signalweiterleitung [Engel 1998], aber auch der Transport des internalisierten EGF-Rezeptors [Gampel 1999, Lajoie-Mazenc 2007]. Die Aktivierung von RhoB kann zum einen durch Wachstumsfaktoren und DNA-Schäden [Fritz 1995], aber auch durch Hitzestress [Li 2011] erfolgen. Das RhoB-Protein liegt in der Zelle im Gleichgewicht auf zwei Arten vor, zum einen als farnesyliertes RhoB (RhoB-F) und zum anderen als geranylgeranyliertes RhoB (RhoB-GG) [Prendergast 2001]. Die Art der posttranslationalen Modifikation ist entscheidend für die zelluläre Lokalisation, so ist das RhoB-F vor allem in der Plasmamembran zu finden und das RhoB-GG in endozytotischen Vesikeln [Milia 2005].

1.2.2 Stand der Forschung

Bei der GTPase RhoB handelt es sich um einen Tumorsupressor [Heasman 2008] dessen Expression in verschiedenen Tumoren reduziert ist. Die Steuerung der Expression erfolgt durch das Ras Protein [Mazieres 2007, Jiang 2004] via Akt und PkB-Kinasen [Soundararajan 2008]. Befindet sich eine Zelle in einer Stresssituation kann die GTPase RhoB verschiedene Funktionen ausführen. Zum einen wird bei DNA-Schäden, welche zu neoplastischen Zellen führten, durch das Protein RhoB die Apoptose der Zellen induziert [Liu 2001], zum anderen können sich Zellen nach einem Hitzeschock auch durch die RhoB-Expression vor einer Apoptosein-

duktion schützen [Li 2011]. Die Apoptose kann auf verschiedene Arten vermittelt werden, zum einen durch die Interaktion von TNFAIP1 mit RhoB [Kim 2009], zum anderen über den Effektor mDia [Prendergast 2001].

Über die Expression von RhoB in Chondrozyten ist nur wenig publiziert. Gebhard und Kollegen beschreiben die Reduktion von RhoB mRNA in Chondrozyten von osteoarthritischem Knorpel im Vergleich zu gesundem Knorpel [Gebhard 2004]. In der Arbeit von Mahr wird ein Zusammenhang zwischen der Osteoarthrose und RhoB auf DNA-Ebene (Einzelbasen-Austausch, cis-reguliertes Gen) beschrieben [Mahr 2005].

1.3 Adenoviren

1.3.1 Grundlagen

Die Gruppe der Adenoviridae lässt sich in 5 Genera unterteilen, die Aviadenoviren (Vögel), die Mastadenoviren (Säuger), die Atadenoviren (Reptilien, Säuger, Vögel), die Siadenoviren (Amphibien, Vögel) und die Ichtadenoviren (Stör). Die humanen Adenoviren gehören zur Gattung der Mastadenoviren und die 54 Virustypen werden in 7 Spezies (A-G) eingeteilt [Doerr 2009].

Tabelle 4: Übersicht über die humanen Adenoviren nach Doerr 2009 und Heim 2009

Spezies	Typen
A	12, 18, 31
B1	3, 7, 16, 21, 50
B2	11, 14, 34, 35
C	1, 2, 5, 6
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 2-30, 32, 33, 36, 37-39, 42-49, 51, 53, 54
E	4
F	40, 41
G	52

Die humanen Adenoviren besitzen eine lineare doppelsträngige DNA, die in einem unbehüllten ikosaedrischen Proteinkapsid verpackt ist. Letzteres ist aus Hexonen aufgebaut und an jeder Ecke sitzt eine Pentonbasis mit einem Fiber-Protein. Für die Adsorption der Adenoviren an die Zelloberfläche ist der Fiber-Knopf von entscheidender Bedeutung [Heim 2009, Doerr 2009].

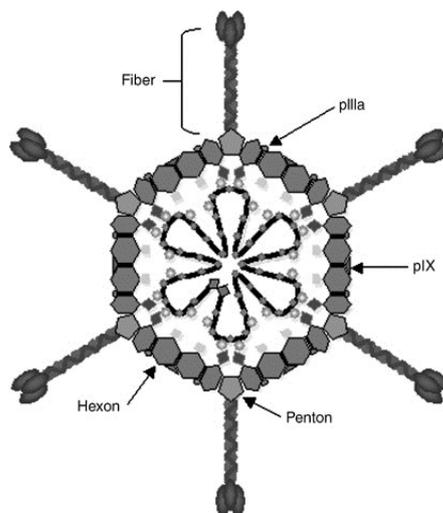


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Adenovirus mit dem Kapsid aus Pentonbasis, Hexon und Fiber mit Knopf und DNA-Strang im Zentrum [Glasgow 2006]

Nach der Adsorption und Internalisierung der Adenoviren werden die ersten viralen Proteine gebildet. Dazu gehören die Proteine der E1A und E1B-Regionen, welche für den effizienten Ablauf der viralen Replikation zuständig sind. Die Proteine der E2-Region beinhalten die virale DNA-Polymerase und das Terminale Protein, die der E3-Region sind an der Immunevasion beteiligt. In der späten Phase findet die virale DNA-Replikation statt und die Strukturproteine werden exprimiert. Die Nachkommenviren werden in der Zelle zusammgebaut und nach deren Lyse, durch das in der E3-Region kodierte Death-Protein, freigesetzt [Doerr 2009]. Bei der viralen Replikation erfolgt keine Integration in das Wirtsgenom [Heim 2009], jedoch sind „latente“ Adenovirusinfektionen vor allem bei den Typen 1, 2 und 5 der Spezies C beschrieben [Doerr 2009].

Für die Infektion der Wirtszellen ist die Adsorption der Adenoviren an die Zelloberfläche von entscheidender Bedeutung. Bislang sind drei verschiedene Oberflächenstrukturen beschrieben, an welchen die Fiber-Knöpfe der Adenoviren binden können. Der Coxsackievirus-Adenovirus Rezeptor (CAR) wird von allen Adenoviren, außer denen der B-Spezies, zur Infektion einer Zelle benötigt [Arnberg 2002, Stewart 2003]. Die Adenoviren 3, 7, 11 und 35 der B-Spezies binden an den Kofaktor CD46 [Sirena 2004, Segerman 2003, Fleischli 2007], ebenso die Adenoviren 37 und 49 der D-Spezies [Fleischli 2007]. Die Oberflächenrezeptoren CD80 und CD86 können von allen Adenoviren der B-Spezies zur Infektion einer Zelle benutzt werden [Short 2006]. Die Fiber-Knöpfe der Adenoviren 8, 19a und 37 der Spezies D sind positiv geladen und nutzen, außer dem CAR, auch Glykane mit Sialinsäure-Resten zur Infektion von Zellen [Arnberg 2000a, Arnberg 2000b].

Die Adsorption der Adenoviren mit den Fiber-Knöpfen an die Rezeptoren der Zelloberfläche ist für die Internalisierung der Adenoviren nicht ausreichend. Hierfür ist eine zusätzliche Interaktion zwischen der Pentonbasis mit einer konservierten Integrinbindestelle (Arginin-

Glycin-Asparaginsäure, RGD-Motiv) und den Vitronektin-bindenden Integrinen der Zelloberfläche nötig [Stewart 2003, Lord 2006]. Die Adenoviren 40 und 41 der F-Spezies exprimieren dieses RGD-Motiv an der Pentonbasis nicht und werden nur verzögert in die Zellen via Integrine aufgenommen [Stewart 2003, Albinsson 1999].

An der Rezeptor-vermittelten Endozytose der Adenoviren sind auch andere Proteine beteiligt, so auch die Rho GTPasen und p130^{cas}. Befinden sich die aufgenommenen Adenoviren in den frühen Endosomen der Zelle, können sie dem Abbau in späten Endosomen und Lysosomen entgehen. Voraussetzung ist eine Interaktion zwischen adenoviraler Pentonbasis und zellulären $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen [Stewart 2003].

1.3.2 Klinik, Diagnostik und Therapie

Viele der humanen Adenoviren infizieren mehr als nur ein Organsystem und können eine Reihe von Erkrankungen auslösen. Die häufigsten Infektionen durch Adenoviren betreffen den Respirations-, Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt und die Augen [Doerr 2009]. So lösen die Adenoviren der B1-Spezies vor allem Infektionen des oberen Verdauungstrakts aus, die der B2-Spezies sind für Infektionen der Nieren und der Harnwege verantwortlich [Sirena 2004, Fleischli 2007]. Die Typen 8, 19 und 37 der D-Spezies sind vor allem Auslöser der Keratokonjunktivitis epidemica [Segerman 2003]. Die Adenoviren der F-Spezies sind ausschließlich für Gastroenteritis im Kleinkindalter verantwortlich [Heim 2009]. Obwohl die humanen Adenoviren weltweit endemisch sind, wird immer wieder von regional begrenzten epidemischen Ausbrüchen einiger Adenovirustypen berichtet. So wird unter anderem von dem Ausbruch einer nosokomialen epidemischen Keratokonjunktivitis 2006 in Valparaíso (Chile) [Nercelles 2010], von einer akuten Gastroenteritis (verursacht durch den Typ 41) in einem Kindergarten in Portugal im Herbst 2008 [Gonçalves 2010] und von dem Ausbruch akuter Atemwegsinfekte bei Kindern mit teils tödlichem Ausgang 2004 in Lissabon (verursacht durch den Typ 3 und einem neuen rekombinanten Typ7/3) berichtet [Rebello-de-Andrade 2010].

Die Übertragung der Adenoviren von Mensch zu Mensch erfolgt durch direkten Kontakt, Tröpfcheninfektion oder Schmierinfektion [Doerr 2009, Heim 2009]. Jeder Mensch wird in seinem Leben mehrfach mit Adenoviren, auch unterschiedlichen Typs, in Kontakt kommen und produziert Antikörper gegen die entsprechenden Typen [Heim 2009].

Eine Adenovirusinfektion kann auf verschiedenen Wegen diagnostiziert werden. Zum einen kann mittels der Elektronenmikroskopie und der PCR nachgewiesen werden, ob es sich um Adenoviren handelt, zum anderen kann über Serodiagnostik, Typisierung und spezifische PCR-Reaktionen auch der spezielle Adenovirustyp ermittelt werden [Friedman 2008, Doerr 2009, Heim 2009].

Als Prophylaxe werden viruzide Desinfektionsmittel und die Isolation hochinfektöser Patienten empfohlen [Friedman 2008, Doerr 2009, Heim 2009]. Eine abgesicherte antivirale Therapie ist nicht verfügbar [Heim 2009], jedoch wird bei besonders gefährdeten immunsupprimierten Patienten die Anwendung der Virusstatika Cidofovir, Didanosine und Ribavirin beschrieben [Friedman 2008, Doerr 2009].

1.3.3 Adenoviren in der Gentherapie

In der Gentherapie wird der Gentransfer mit Adenoviren (Serotypen 2 und 5) erfolgreich durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass noch verschiedene Hürden in der Anwendung von Adenovirus-basierten Vektoren zu nehmen sind. Dazu gehören die angeborene und erworbene Immunität gegen Adenoviren. Zu den Folgen der ausgelösten Immunreaktion zählen unter anderem die verkürzte Genexpressionsdauer und gravierende Nebenwirkungen [Dharmapuri 2009, Palmer 2005]. Die Adenovirus-basierten Vektoren wurden besonders im letzten Jahrzehnt weiterentwickelt. Begonnen wurde mit der ersten Generation, welche sich durch die Deletion der E1 Region und einer damit verbundenen Replikationsdefizienz auszeichnete. Diese lösten jedoch bei der systemischen Anwendung eine Immunantwort aus und führten nur zu einer transienten Genexpression [Dharmapuri 2009, Palmer 2005, Vorburger 2002]. Aus diesem Grund wurden die Vektoren weiterentwickelt und es folgte die zweite Generation. Bei dieser wurden zudem die E2A, E3 und E4 Gene deletiert. So sollte die Immunantwort möglichst vermieden werden. Es zeigte sich, dass die Toxizität reduziert war und die Genexpressionsdauer verlängert werden konnte [Vorburger 2002]. Die dritte Generation stellen unter anderem die adenoviralen Vektoren dar, bei denen die Sequenzen aller viralen Proteine deletiert wurden. Für die Replikation dieser Vektoren wird ein „Helper“ Vektor benötigt mit den entsprechenden viralen Proteinen benötigt [Dharmapuri 2009, Palmer 2005, Vorburger 2002]. Des Weiteren gibt es chimäre Vektoren, welche die Vorteile von retroviralen und adenoviralen Vektoren vereinen [Bilbao 1997].

Eine andere Möglichkeit die vorhandene Immunität gegen die häufigen Adenovirustypen zu umgehen, ist die Verwendung von seltenen Adenoviren, wie die Typen 3, 7, 11 und 35 der B-Spezies. Diese können die Zielzellen über das ubiquitär exprimierte CD46 infizieren und die Transduktionseffizienz wird nicht durch vorhandene Antikörper gegen den Typ 5 beeinflusst [Sakurai 2007].

2. Materialien und Methoden

2.1 Spender

Der verwendete Knorpel stammte von insgesamt 46 Patienten verschiedener Kliniken: der *Klinik für Orthopädie* und der *Chirurgischen Klinik und Poliklinik* des Universitätsklinikums Rostock. Der in dieser Arbeit verwendete Knorpel fiel während chirurgischer Eingriffe – die Patienten unterzogen sich einer Hüft- bzw. Knieendoprothese – an. Es wurde ausschließlich Gewebe verwendet, welches nach dem Eingriff verworfen worden wäre. Die Genehmigung der Ethikkommission des Universitätsklinikums Rostock liegt vor. Nach der Entnahme des Femurkopfes wurde dieser steril in PBS bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Aus der Klinik für Orthopädie wurde von 6 Patienten weiblichen und 9 Patienten männlichen Geschlechts ($70,3 \pm 8,8$ Jahre [Mittelwert \pm Standardabweichung]) der Knorpel des Kniegelenks verwendet. Ebenso wurde von 30 Patienten weiblichen, 6 Patienten männlichen Geschlechts ($70,6 \pm 14,1$ Jahre) und einem Patienten ohne Angabe von Daten der Knorpel des Femurkopfes verwendet.

2.2 Produkte, Chemikalien, technische Geräte und Werkzeuge

Tabelle 5: Kits und Chemikalien

Kit/Chemikalie	Hersteller
Agarose	Serva
Acrylamid-Bisacrylamid	Carl Roth
7-Aminoactinomycin (7-AAD)	eBioscience
ϵ -Aminocapronsäure	Sigma-Aldrich
Ameisensäure	Merck
Albumin Fraktion V, bovine (BSA)	Carl Roth
Alginat	Sigma-Aldrich
Amaxa [®] Human Chondrocyte Nucleofector [®] Kit	Lonza (vorher Amaxa)
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Annexin-V-PE (AnV:PE)	Immunotools
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich
AutoMACS Running Buffer	Miltenyi Biotec
AutoMACS Rinsing Solution	Miltenyi Biotec
BSA	Sigma-Aldrich
BSA-Stocklösung, 0,1 mg/ml	Bio-Rad
Brefeldin-A	Sigma-Aldrich
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck
Chondroitin-6-sulfat	Sigma-Aldrich
Complete (Tabletten)	Roche

Kit/Chemikalie	Hersteller
L-Cysteinhydrochlorid	Fluka
DCTS Quickstart MasterMix	Beckman Coulter
DMEM + GlutaMAX	Gibco
DMMB	Serva
100bp und 10 kb DNA- Ladder	Carl Roth
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Ethanol, reinst und vergällt	Apotheke des Universitätsklinikums Rostock
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA
Ficoll-Trennlösung	GE Healthcare
Formalin, 40%	Merck
β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich
Glycin	Carl Roth
Glycerol	Carl Roth
Kalbsthymus DNA	Sigma-Aldrich
Kanamycinsulfat	Sigma-Aldrich
Kollagenase, Typ 2 (CLS-2)	Worthington
Salzsäure, rauchend	Merck
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
High Fidelity MasterMix, 2x	Roche
HEPES	Calbiochem
HEPES-Puffer	Gibco
Hoechst 33258 (Bisbenzimid)	Fluka
Humanes Serum	Applied Biosystems
Invisorb SpinBlood Mini Kit	Invitek
Insulin-Transferin-Selenin (ITS) (100x)	Genaxxon
Ionomycin	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Fluka
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Methanol	J.T.Baker
Natriumacetat	Merck
Natriumazid (NaN ₃)	Carl Roth
Natriumchlorid (0,9 %, steril)	Apotheke des Universitätsklinikums Rostock
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumcitrat	Merck
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich
Natriumformiat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriumhydroxid (Plätzchen)	Merck
Natriumpyruvat	
Natriumorthovanadat	
Nicht-essenzielle Aminosäuren (NEAA), 100x	Gibco

Kit/Chemikalie	Hersteller
NP-40	Calbiochem
Papain	Roche
PBS (steril)	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Gibco
PMA	Sigma-Aldrich
Phenol:Chloroform:IAA (25:24:1; pH 6.6/7.9)	Invitrogen (vorher Ambion)
Prolin	Sigma-Aldrich
PageRuler, markiert und unmarkiert	Fermentas
Pronase	Calbiochem
Ponceau S	Serva
Quick Start Kit (Sequenzierung)	Beckman Coulter
RPMI 1640 + GlutaMAX	Gibco
RNeasy Mini Kit	Qiagen
SDS	Carl Roth
TEMED	Serva
Thimerosal	Fluka
TNF- α ELISA	eBioscience
Tris Base	Carl Roth
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA, 0,05 %	Gibco
Tween 20	Carl Roth

Tabelle 6: Restriktionsenzyme

Bezeichnung	Puffer		Hersteller
Hind III	Red	10 U/ μ l	Fermentas
Kpn I	KpnI+	10 U/ μ l	Fermentas
PmeI	Blue	5 U/ μ l	Fermentas
PacI	NEB1	10 U/ μ l	NEB BioLabs

Tabelle 7: Antikörper für Durchflusszytometrie und Immunodetektion

Spezifität	Klon/Isotyp	Konjugat	Hersteller	Proteingröße
GAPDH	6C5/ Maus, IgG ₁	-	Abcam	
RhoB	Kaninchen IgG	-	Santa Cruz Biotec	
RhoB	Kaninchen IgG	PE	Santa Cruz Biotec	
Kollagen 2	Kaninchen, polyklonal	-	Abcam	150 kDa
MMP13	Kaninchen, polyklonal	-	Abcam	
Syndekan4	Kaninchen, polyklonal	-	Abcam	
TIMP1	Kaninchen, monoklonal	-	Abcam	
Maus IgG + IgM	Ziege	Biotin	Dianova	
Kaninchen IgG	Ziege	Biotin	Dianova	
Steptavidin	-	POX	Dianova	

Tabelle 8: Geräte und Werkzeuge

Gerät/Werkzeug	Hersteller
7900HT Fast Real-Time PCR Systems	Applied Biosystems
8-Kanal-Pipette	Eppendorf
Absaugpumpe Vacumat 130	H-Saur
Auslaufpipetten 5, 10, und 25 ml wattiert, steril verpackt	Greiner Bio One
CEQ 8800 Sequenzierer	Beckman Coulter
Durchflusszytometer, FACS-Calibur	BD
Feinwaage Sartorius Basic	Sartorius
Filterspitzen, 10, 20, 200, und 1000 µl	Nerbe Plus
GeneAmp PCR Systems 9700	Applied Biosystems
Gewebekulturschale, 6 und 12 well	Greiner Bio One
Heizblock HBT-1	HLC
Inkubator Forma Scientific	Labotec
Invers-Lichtmikroskop	Nikon
Kühlzentrifuge MegaFuge 1.0R	Heraeus
Magnetrührer MR-3001	Heidolph
Microtiterplatte, 96 well, flach	Greiner Bio One
Mini-VE complete (SDS-PAGE)	Pharmacia Biotech
Monovette, EDTA, 7,5 ml	Sarstedt
Multidish, 12 well UpCell Surface	Nunc
NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher
Nucleofector®	Lonza (vorher Amaxa)
Omnifix® 5 und 10 ml, Luer Lock, Solo	B. Braun
Petrischale, Ø 10 cm	Greiner Bio One
pH-Meter pH211	Hanna Instruments
Photometer SmartSpec 3000	Bio-Rad
Pipetierhilfe „Pipetboy“	Integra Biosciences
Pipetten; 10, 20, 100, 200 und 1000 µl	Gilson
Plattenschüttler Polymax 1040	Heidolph
Polypropylen-Röhrchen, konisch; 15 und 50 ml	Greiner Bio One
PowerPac 200	Bio-Rad
Reaktionsgefäße, 0,2 ml für die PCR	Carl Roth
Reaktionsgefäße, 1,5 und 0,65 ml	Carl Roth
Reaktionsgefäße, 2 ml	Carl Roth
Ritips®professional (Dispenser-Tips), 10 ml	Ritter Medical Care
Safelock® Tubes, 1,5 ml	Eppendorf
Spritzenfilter, Porengröße 0,25 µm, steril	Carl Roth
Sterilbank, HeraSafe	Thermo Fisher
Tecan Infinite 200 Reader	Tecan Group Ltd.
Tischzentrifuge BioFuge Fresco	Heraeus
Transblot SD, Semi-Dry transfer cell	Bio-Rad
UV-Transluminator	MWG-Biotech
Vacuum Concentrator	Bachofer
Vortexer ReaxTop	Heidolph

Gerät/Werkzeug	Hersteller
Waage BP3100P	Sartorius
Wasserbad	GFL
Zellkulturflasche, 25 und 75 cm ² , Schräghals	Greiner Bio One
Zellkulturschale, Ø 10 cm	Greiner Bio One

2.3 Lösungen

Tabelle 9: Für diese Arbeit hergestellte Lösungen.

Lösung	Zusammensetzung
Alginate-Lösung	1,2% (w/v) Alginate in 0,9% NaCl
Alginate-Lysepuffer	150 mM NaCl und 55 mM Natriumcitrat, pH 6,8
Blockmilch	1x TBS, 5% (w/v) Magermilchpulver, 1% (w/v) BSA und 0,02% (w/v) Thimerosal [4°C]
CaCl ₂ -Puffer	100 mM CaCl ₂
Chondrozytenmedium	DMEM, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% HEPES, 0,31 mM Ascorbinsäure, 2,0 mM Prolin und 1% ITS
Chondrozyten-Detachment-Puffer	Chondrozytenmedium mit 1 mg/ml Kollagenase 2 und 1 mg/ml Pronase
DNA-Probenpuffer	30% Glycerol, 0,1 M Na ₂ EDTA, 1% (w/v) SDS und 0,25% (w/v) Bromphenolblau
DMMB-Lösung	0,8 mg DMMB in 0,25 ml Ethanol lösen, Zugabe von 0,1 ml Ameisensäure und 0,1 g Natriumformiat, auf 50 ml mit Aqua dest. auffüllen [dunkel]
DNA-Standard	100 ng/µl Kalbsthymus DNA in 1x PBS
Essigsäure	1% Eisessig
ε-Puffer	40 mM ε-Aminocapronsäure, 25 mM Tris-Base und 20% Methanol, pH 9,4
FACS-Puffer	1x PBS, 5 g/l BSA und 1 g/l Natriumazid
Glukosaminoglykan-Standard	1 mg/ml Chondroitin-6-sulfat in Natriumacetat-Puffer [-20°C]
Hoechst-Stocklösung	1 mg/ml Hoechst 33258 [4°C, dunkel]
Hoechst-Färbepuffer	0,1 µg/ml Hoechst 33258 in 1x TEN Puffer [frisch ansetzen]
HT-Puffer	300 mM Tris-Base und 20% Methanol, pH 10,4
Kanamycin-Lösung	300 mg/ml Kanamycin
Knorpelverdau-Puffer	30 mg/ml Kollagenase 2 in 1x PBS
Kristallviolett-Färbelösung	0,05% (w/v) Kristallviolett
Laufpuffer	0,25 M Tris-Base, 1% SDS und 1,92 M Glycerin
LT-Puffer	25 mM Tris-Base und 20% Methanol, pH 10,4
Natriumacetat-Puffer	0,05 M Natriumacetat, pH 6,8
NZY ⁺ broth Medium	10 g/l Pepton (aus Casein), 5 g/l Hefeextrakt und 5 g/l NaCl; nach dem Autoklavieren Zugabe von 12,5 mM MgCl ₂ , 12,5 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose
NZY ⁺ broth/ Kanamycin	100 ml NZY ⁺ broth mit 10 mg/ml Kanamycin
Papainverdau-puffer, 2x	10 mM L-Cysteinhydrochlorid, 10 mM Na ₂ EDTA und 250 µg/ml Papain [-20°C]
Paraformaldehyd-Puffer (PFA)	4% Paraformaldehyd in 1x PBS, pH 7,4

Lösung	Zusammensetzung
PBS, 10x	80 g/l NaCl, 2 g/l KCl, 14,4 g/l Na ₂ HPO ₄ und 2,4 g/l KH ₂ PO ₄ 1x PBS auf pH 7,4 einstellen
Protein-Probenpuffer, 5x	312,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% (w/v) SDS, 325 mM DTT, 4 g/L Bromphenolblau und 50% (w/v) Glycerol
RIPA Puffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% (w/v) NP-40, 0,5 % (w/v) Na-Desoxycholat und 0,1% (w/v) SDS [filtrieren, 4°C]
RIPA complete	10 ml RIPA Puffer mit 1 mM DTT, 1 mM Na ₃ VO ₄ , 40 mM β-Glycerophosphat und 1 complete Tablette [-20°C]
SOC-Medium A	5 g Hefeextrakt, 20 g Trypton, 0,6 g NaCl, 0,2 g KCl, 20 g Glucose in 950 ml Wasser lösen und autoklavieren
SOC-Medium B	20,33 g MgCl ₂ ·6H ₂ O und 24,65 g MgSO ₄ in 100 ml Wasser lösen und autoklavieren
SOC-Medium	950 ml SB-Medium mit 10 ml SOC-Medium B
SB-Medium A	12 g Pepton aus Casein, 24 g Hefeextrakt und 4 ml Glycerin in 950 ml Wasser lösen und autoklavieren
SB-Medium B	4,6 g KH ₂ PO ₄ und 32,9 g K ₂ HPO ₄ in 100 ml Wasser lösen und autoklavieren
SB-Medium	950 ml SB-Medium A mit 50 ml SB-Medium B
TAE-Puffer, 50x	242 g/l Tris-Base, 57,1 ml/l Eisessig und 37,2 g/l Na ₂ EDTA
TBS-Puffer, 10x	0,5 M Tris-Base und 1,5 M NaCl, pH 7,4
TEN-Puffer	100 mM Tris-Base, 1 mM Na ₂ EDTA und 0,1 mM NaCl, pH 7,4
Tris-HCl	50 mM Tris Base, pH 8,0
Tris-HCl (Sammelgel)	1 M Tris Base, pH 6,8
Tris-HCl (Trenngel)	1 M Tris Base, pH 8,9
Waschpuffer	1x TBS, 0,1% (w/v) BSA, 0,05% Tween 20 und 0,02% (w/v) Thimerosal

2.4 PCR- und TaqMan-Primer

Tabelle 10: PCR-Primer

Bezeichnung	Sequenz
Sal I Forward (SalF)	5'-NNN NNG GAT CCA TGG CGG CCA TCC GCA AG-3'
Hind III Reverse (HindR)	5'-CAA GGT GCT ATG AGG GCC GCG TCG ACN NNN N-3'
RhoB 2 Forward (2F2)	5'-GTG GGA CAC GGC GGG CCA-3'
RhoB 2 Reverse (2R2)	5'-GACGTC ATT CTC ATG TGC TT-3'
RhoB 3 Forward (3F2)	5'-CTG CGC AGC GAC GAG CAT GT-3'
RhoB 3 Reverse (3R2)	5'-AAG CAG GAA CCC GTG CGC A-3'

Tabelle 11: TaqMan gene expression assays (20x Mix von Primern und Sonde) von Applied Biosystems

Bezeichnung	Gen	Bestellnr.
ACAN	Aggrecan	Hs00153936_m1
ADAMTS5	ADAMTS5	Hs00199841_m1
COL2A1	Kollagen Typ 2, pro-alpha 1	Hs01060345_m1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	Hs99999905_m1
IL7	Interleukin 7	Hs00174202_m1
MMP3	Matrix-Metalloproteasen 3	Hs00968305_m1
MMP13	Matrix-Metalloproteasen 13	Hs00942589_m1
SDC4	Syndekan 4	Hs00161617_m1
TIMP1	Tissue inhibitor of metalloproteinases 1	Hs00171558_m1
TIMP3	Tissue inhibitor of metalloproteinases 3	Hs00165949_m1
TNC	Tenascin C	Hs01115665_m1

2.5 Expressionsvektoren und Adenoviren

Tabelle 12: Gekaufte und in der Arbeitsgruppe hergestellte Vektoren

Bezeichnung	Promotor	Markergen	Größe [kb]	Hersteller
pAdTrack CMV RhoB	CMV	GFP	9,8	S. Mahr, AG Müller-Hilke
pmaxCloning	CMV	GFP	2,9	Lonza
pmaxCloning RhoB	CMV	GFP	3,4	eigene Herstellung
pAdEasy-1	CMV	GFP	33,5	Agilent Technologies
pAdEasy1 RhoB	CMV	GFP	36,1	eigene Herstellung

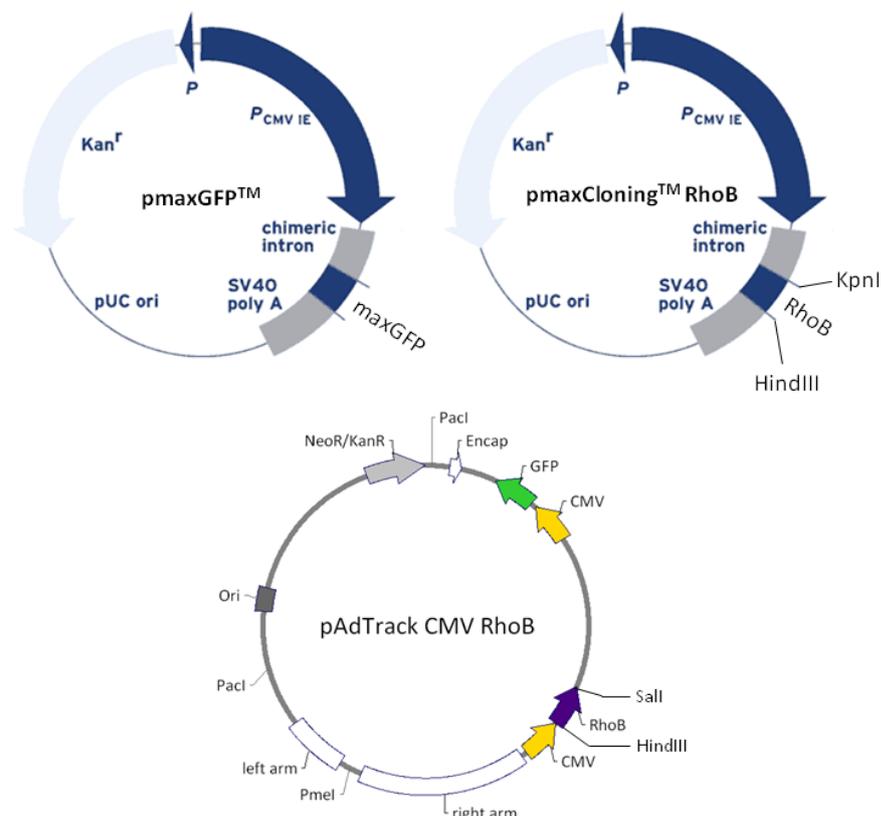


Abbildung 6: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Tabelle 13: rekombinierte Adenoviren

Bezeichnung	Promotor	Markergen	Hersteller
AdEGFP (Typ 5)	CMV	EGFP	AG Vektorologie
AdEGFP/RhoB	CMV	EGFP	eigene Herstellung

Tabelle 14: Wildtyp Adenoviren und Immunseren, bereitgestellt von der MHH Hannover, Adenovirusreferenz-Labor, Prof. Heim

Bezeichnung	Spezies	Kopien [1/ml]	TCID50 [1/ml]	Neutralisationstiter des Immunserums
Adenovirus 11	B2	$9,3 \cdot 10^{11}$	$1,8 \cdot 10^9$	640
Adenovirus 34	B2	$2,4 \cdot 10^{10}$	$1,8 \cdot 10^8$	640
Adenovirus 35	B2	$1,1 \cdot 10^{12}$	$7,5 \cdot 10^8$	640
Adenovirus 3	B1	$8,8 \cdot 10^{11}$	$1,0 \cdot 10^{11}$	2560
Adenovirus 16	B1	$2,5 \cdot 10^{10}$	$2,9 \cdot 10^5$	320
Adenovirus 21	B1	$3,1 \cdot 10^{11}$	$5,6 \cdot 10^8$	320

2.6 Software

Tabelle 15: Programme der verschiedenen Hersteller.

Programm	Version	Hersteller	verwendet für
CEQ 8800	9.0.25	Beckman Coulter	Sequenzierung
Sequence Detection Systems (SDS)	2.3	Applied Biosystems	Realtime RT-PCR
RQ-Manager	1.2	Applied Biosystems	Realtime RT-PCR
GraphPad Prism	5	GraphPad Software, Inc.	Statistische Auswertung
XnView	1.95.4	Pierre-e Gougelet	Bildbearbeitung
ClustalX	2.0.10	Conway Institute UCD Dublin	Auswertung der Sequenzierungsdaten
Visual Cloning 2000	2000s	Redasoft	Darstellung der Plasmide
WinMDI	2.9	Joseph Trotter	Auswertung der FACS-Daten

2.7 Herstellung eines RhoB-Expressionsvektors

2.7.1 Transformation kompetenter Zellen

Die Transformation der kompetenten *E. coli* Zellen XL10-Gold wurde wie in der Arbeitsvorschrift des XL10-Gold® Ultracompetent Cells Kits durchgeführt. Durch einen Hitzeschock (42°C, 30 Sekunden) konnte die Plasmid-DNA (5 ng) oder ein Ligationsansatz (2 µl) in die *E. coli* Zellen eingebracht werden. Zwischen 50 µl und 100 µl der transformierten Bakterien wurden auf Agarplatten mit Selektionsantibiotikum (Kanamycin) ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank (37°C) inkubiert.

2.7.2 Validierung der Transformation

Um zu überprüfen, ob die Transformationen erfolgreich waren, wurden von jedem Transformationsansatz einzelne Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte in eine Starterkultur (3-5 ml NZY⁺ broth/ Kanamycin) überführt und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert.

2.7.2.1 Plasmidaufreinigung mit der QuickLyse Miniprep-Methode

Für die Isolierung von Plasmid-DNA zum Screening nach positiven Klonen fand das Kit der Firma Qiagen Verwendung. Die Plasmidisolierung von einzelnen Klonen erfolgte mit 2 ml der Starterkultur. Wurde die Plasmid-DNA aus Pools von je 4 Klonen isoliert, so wurde pro Klon 0,5 ml der Starterkultur eingesetzt. Nach Arbeitsvorschrift der Firma wurden die Bakterien lysiert und auf eine QuickLyse Säule gegeben. Dort erfolgte die Bindung der Plasmid-DNA an die Anionen-Austauscher-Membran. Verunreinigungen wie RNA, Proteine und Kohlenhydrate konnten durch Waschschriffe entfernt werden. Mit einem Puffer, der eine hohe Salzkonzentration hatte, konnte dann die gereinigte Plasmid-DNA von der Säule eluiert werden. Die Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit erfolgte am NanoDrop. Bei einer gut gereinigten DNA-Probe lag das Verhältnis der Absorptionen 260/280 nm bei 1,7 oder höher. Die Plasmid-DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.7.2.2 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die aufgereinigten Plasmide wurden mit den Restriktionsenzymen KpnI und HindIII links und rechts von der codierenden DNA des Proteins RhoB geschnitten. Da beide Enzyme in unterschiedlichen Puffer arbeiten, wurden die enzymatischen Reaktionen sequenziell durchgeführt. Im ersten Spaltungsansatz wurden 10 µg DNA mit 10 µl des 10x Puffers KpnI⁺ und 5 µl des Enzyms KpnI (25 U) vermischt, auf ein Gesamtvolumen von 100 µl mit Aqua dest. aufgefüllt und für 3 Stunden bei 37°C im Schüttler inkubiert. Zur Umpufferung des Systems, für die

Spaltung mit der zweiten Restriktionsendonuklease, wurde die DNA durch Zugabe von 100 µl Isopropanol und 20 µl 3 M Natrium-Acetat-Puffer gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 15 min pelletiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet durch Zugabe von 200 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt und der Abnahme des Überstandes wurde das DNA-Pellet an der Luft getrocknet (5 Minuten) und in 85 µl Aqua dest. resuspendiert. Zur DNA wurden 10 µl des 10x Puffers Red und 5 µl des Enzyms HindIII (50 U) gegeben und bei 37°C für 3 Stunden auf dem Schüttler inkubiert. 1 µl der Spaltungsansätze wurden auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen und die Spaltung überprüft.

2.7.2.3 Agarosegelelektrophorese

Verwendung fanden Agarosegele (1 bis 2%, Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer) denen 4 µl Ethidiumbromid auf 100 µl Gel zugesetzt wurde. Aufgetragen wurden 1-20 µl der PCR-Produkte, der Plasmid-DNAs oder des Spaltungsansatzes, vermischt mit 6x Ladepuffer. Zusätzlich wurde ein DNA-Größenstandard aufgetragen. Die Auftrennung der DNA erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 90 V für bis zu 90 Minuten. Die Banden wurden mit Hilfe eines UV-Transluminators sichtbar gemacht und mittels einer LCD-Kamera fotografiert.

2.7.3 Ligation von Insert und Plasmidvektor

2.7.3.1 Plasmidisolierung mit der Qiagen-Methode

Um ausreichende Mengen des pAdTrackCMV RhoB Plasmids herzustellen wurden, ausgehend von zuvor positiv getesteten Klonen, größere Kulturen angeimpft. 3 µl der jeweiligen Starterkultur wurden in 30 ml NZY⁺ broth/ Kanamycin überführt und über Nacht bei 37°C im Schüttler bei 250 rpm inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA mit dem Kit QIAfilter Plasmid Midi und dem EndoFree Plasmid Buffer Set der Firma Qiagen.

Wie in der Arbeitsvorschrift beschrieben, erfolgte die Plasmidisolierung aus 30 ml Kulturen. Die Bakterien wurden im alkalischen Milieu lysiert und in einem Inkubationsschritt von Endotoxinen befreit. Das so entstandene Zelllysate wurde auf eine QIAGEN-tip Säule gegeben. In Gegenwart geringer Salzkonzentration band die Plasmid-DNA spezifisch an die Anionen-Austauscher-Membran, Verunreinigungen wie RNA, Proteine und Kohlenhydrate ließen sich durch Waschschriffe entfernen. Mit einem Puffer hohe Salzkonzentration konnte die DNA von der Säule eluiert werden. In einem weiteren Schritt wurde die DNA aufkonzentriert und durch eine Isopropanol-Präzipitation entsalzt. Die DNA-Konzentration und Reinheit wurden am NanoDrop bestimmt. Die Plasmid-DNA wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.7.3.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Plasmide pAdTrackCMV RhoB und pmaxCloning wurden mit den Enzym KpnI und HindIII gespalten (s. Kapitel 2.7.2.2) und 1 µl der Spaltansätze wurden auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen und die Spaltung überprüft. Zum Aufreinigen des RhoB-Fragments wurde der gesamte Spaltansatz auf ein 1,5% Agarosegel aufgetragen und die spezifische RhoB-Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Um die DNA-Fragmente aus dem Agarosegel zu isolieren, wurde das QIAEXII Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Zuerst wurde die Agarose aufgelöst und danach die DNA an die QIAEX II Kieselgelpartikel in Gegenwart chaotropischer Salze selektiv gebunden. Verunreinigungen wie Agarose und Salze konnten in verschiedenen Waschschritten entfernt werden. Zum Eluieren der DNA wurden 20 µl Wasser verwendet. Um die Ausbeute an DNA im Eluat zu erhöhen, wurde die eluierte DNA erneut mit den Kieselgelpartikeln inkubiert und zentrifugiert. Das Eluat wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Zur Überprüfung der Extraktion wurden 1 µl des Eluats auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen.

Die Ligation des RhoB-Fragments mit dem geschnittenen pmaxCloning Vektor erfolgte mit der T4 DNA Ligase, welche die Formation der Phosphodiesterbindungen zwischen den 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylenden katalysierte.

Der Ligationsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

2,0 µl	10 x Ligationspuffer
13,6 µl	RhoB-Fragment
0,5 µl	T4 DNA Ligase (5 U/µl)
1,0 µl	geschnittenes Plasmid (0,5 µg)
3,4 µl	H ₂ O

Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Ligase inaktiviert (65°C für 10 Minuten), die kompetenten XL-10 Gold *E. coli* Zellen mit dem Ligationsmix transformiert und die Bakterien auf Agarplatten mit Selektionsantibiotikum ausgestrichen. Die Kultur erfolgte bei 37°C und die Validierung der Transformation erfolgte wie in Kapitel 2.7.2 beschrieben. Wurde nach der Spaltung mit Restriktionsendonukleasen ein positiver Pool gefunden, erfolgte die Validierung für jeden einzelnen Klon des Pools wie oben beschrieben. Von einem validierten Klon wurde mit der Qiagen-Methode (s. Kapitel 2.7.3.1) eine größere Menge Plasmid-DNA isoliert.

2.8 Herstellung von RhoB-Adenoviren

Für die Herstellung eines Adenovirus mit dem RhoB-Insert wurde neben einem Plasmid mit dem Genom des humanen Adenovirus 5 Serotyps ohne E1 und E3 (pAdEasy1 Vektor, Ampizillin-Resistenz) auch ein Plasmid mit dem RhoB-Insert (pAdTrack CMV RhoB, Kanamycin-Resistenz) benötigt.

Um die beiden Arme für die homologe Rekombination des pAdTrackCMV RhoB Plasmids freizulegen, wurde dieses mit PmeI linearisiert. Nun konnte die Rekombination mit dem pAdEasy1 Plasmid erfolgen. Dies geschah durch Transfektion beider Plasmide in Zellen des *E. coli* Stamms BJ5183. Nach erfolgreicher homologer Rekombination verlor das nun entstandene Plasmid pAdEasy1-RhoB seine Ampizillin-Resistenz und trug nur noch die Kanamycin-Resistenz. Um einen Klon mit rekombiniertem Plasmid zu isolieren, mussten viele Klone nach der Selektion auf Kanamycin-haltigen Agarplatten isoliert und durch Spaltung mit Restriktionsenzymen untersucht werden. War ein solcher Klon gefunden, musste er zur weiteren DNA-Gewinnung in einen rekombinationsdefizienten *E. coli* Stamm (XL10-Gold) retransformiert werden. Die nach der DNA-Aufreinigung gewonnenen Plasmide wurden zuerst mit PacI linearisiert und konnten dann zur Virusproduktion in HEK293 Zellen durch Transfektion eingebracht werden. Durch wiederholte Infektion von HEK293 Zellen mit den RhoB-Adenoviren konnte ein Virus-Stock angelegt und für die Transduktionsversuche verwendet werden. Um sicher zu stellen, dass die produzierten Adenoviren das RhoB-Insert trugen und zu einer Expression des RhoB-Proteins führten, wurden die Sequenz und die Proteinexpression nach Transduktion von HEK293 und HL1299 Zellen überprüft.

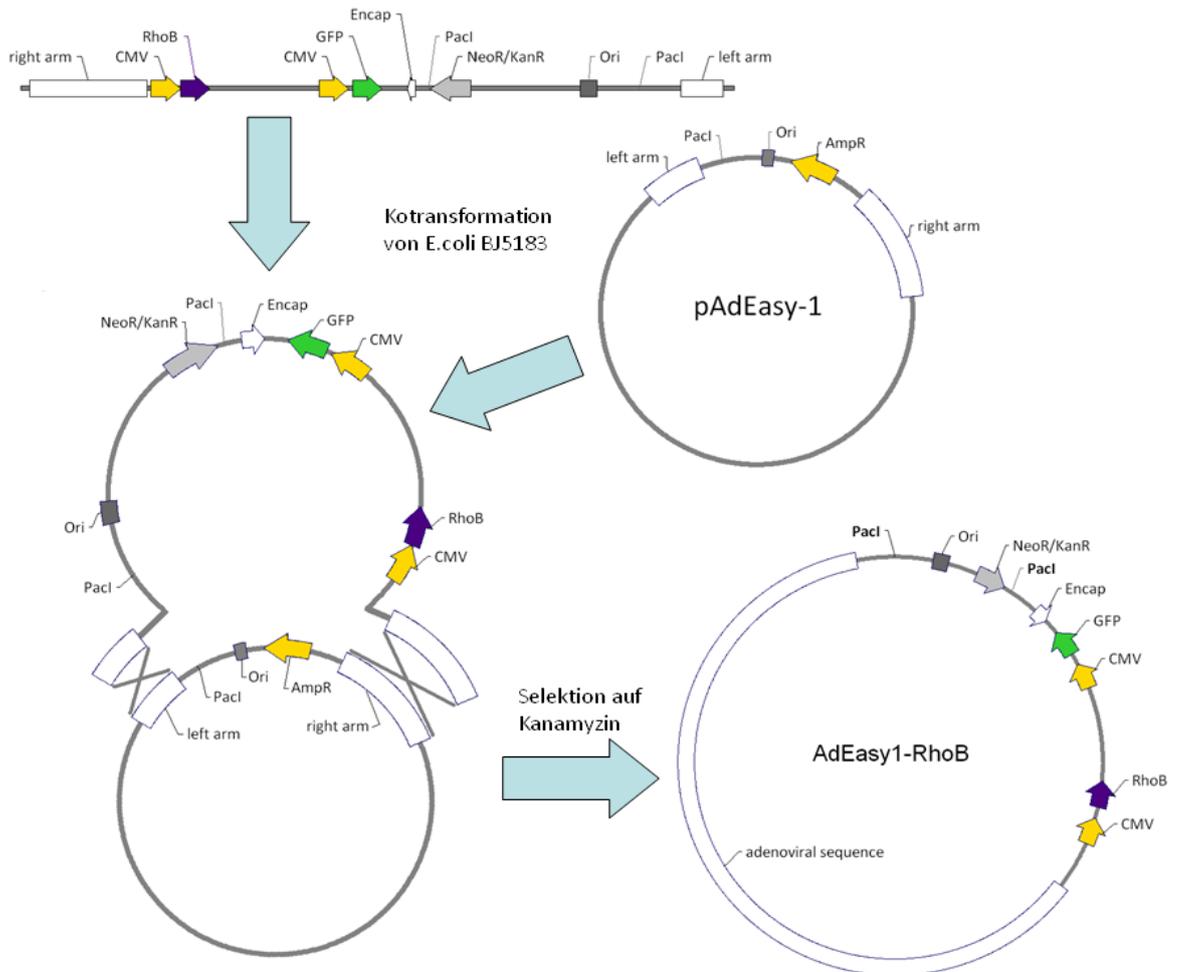


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Homologen Rekombination zur Herstellung des rekombinanten RhoB-Adenovirus Vektors. Das linearisierte pAdTrack CMV RhoB Plasmid wurde zusammen mit dem pAdEasy-1 Plasmid in den E. coli BJ5183 Stamm eingebracht. Bei einer erfolgreichen homologen Rekombination besaß das AdEasy1-RhoB Plasmid nur noch die Kanamycinresistenz. Modifiziert nach Herstellerangaben [AdEasy™ Adenoviral Vector System, Agilent Technologies]

2.8.2 Produktion von Adenoviren

Die Linearisierung der BJ-x Klone wurde mit 10 µg Plasmid-DNA und 20 U Pacl (s. Kapitel 2.7.2.2) durchgeführt.

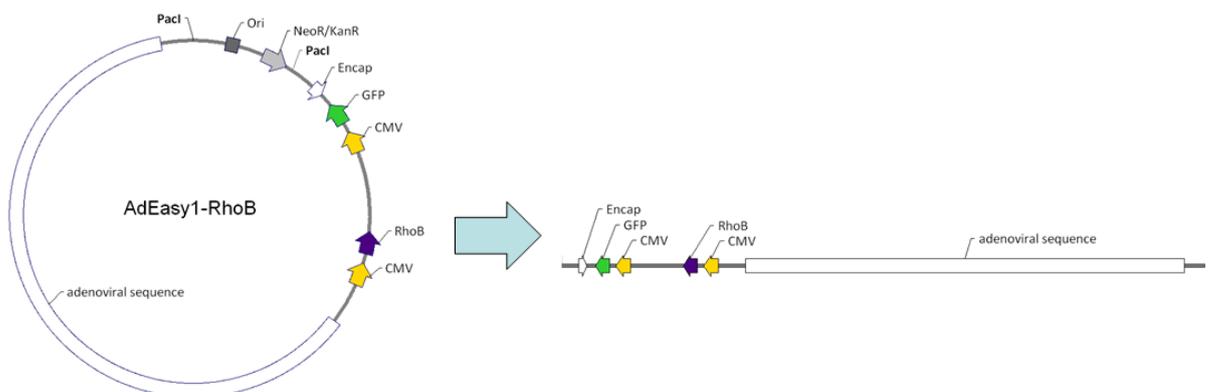


Abbildung 9: Linearisierung des rekombinierten RhoB-Adenovirus Vektors zur Virusproduktion. Modifiziert nach Herstellerangaben [AdEasy™ Adenoviral Vector System, Agilent Technologies]

2.8.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Aufreinigung des Spaltungsansatzes erfolgte mittels einer Phenol-Chloroform-Extraktion. Dafür wurde der Spaltungsansatz auf 400 µl mit Aqua dest. aufgefüllt und das gleiche Volumen Phenol:Chloroform:IAA zugegeben. Nachdem für 10 Sekunden auf dem Vortexer gemischt wurde, erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 14.000 rpm und 4°C für 10 min. Die obere Phase mit der linearisierten DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl Phenol:Chloroform:IAA versetzt und gemischt. Nach dem erneuten Zentrifugieren wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit Natriumacetat (Endkonzentration 0,3 M) versetzt, nach Zugabe von 1 ml absolutem Ethanol gemischt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 30 Minuten zentrifugiert und die DNA pelletiert. Das DNA-Pellet wurde einmal mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 20 µl TE-Puffer resuspendiert.

2.8.2.2 Transfektion mit dem Effectene Transfection Reagent

Die Transfektion der HEK293 Zellen erfolgte in Doppelansätzen in 6 cm Schalen. Dafür wurden 10 µg der aufgereinigten AdEasy1-RhoB Plasmid-DNA mit 150 µl Puffer EC versetzt und nach Zugabe von 8 µl der Enhancer Lösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 25 µl Effectene und erneuter Inkubation wurde 1 ml Medium zu den Ansätzen gegeben. Diese Lösung wurde dann auf die 70-80 % konfluenten HEK293 Zellen getropft und bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.8.2.3 Vermehrung der AdEGFP/RhoB Adenoviren in HEK 293 Zellen

Die Produktion der AdEGFP/RhoB Adenoviren in den HEK 293 Zellen führte zur Zerstörung ebendieser und es bildeten sich große Lücken im Zellrasen (nach 7-10 Tagen). Zu diesem Zeitpunkt konnten die Zellen mit einem Zellschaber von der Oberfläche gelöst und in ein 15 ml Röhrchen überführt werden. Anschließend wurden die Zellen bei 1200 rpm und 4°C für 10 Minuten pelletiert, das Zellpellet in 2 ml PBS (+Mg/+Ca)/ 10% Glycerin resuspendiert, und die Zellen durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im Wasserbad aufgeschlossen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt befanden sich die produzierten Adenoviren im Überstand. Dieser wurde zu den Zellen in einer neuen 6 cm Schale gegeben. Nach einigen Tagen ist der Cytopathische Effekt, das Abkugeln und Ablösen der Zellen, deutlich sichtbar und die Zellen konnten erneut durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen aufgeschlossen werden. Der Überstand nach dem Aufschließen wurde bei -80°C für eine weitere Adenovirusproduktion gelagert (Kennzeichnung mit „3. Runde“). Um eine große Menge Adenovirus herzustellen, wurden acht 15 cm Schalen mit HEK293 Zellen mit je 10 µl des Adenovirus der „3. Runde“ infiziert und bis zum Cytopathischen Effekt kultiviert. Die Zellen wurden geerntet und die Zellpellets von acht Schalen wurden in 1 ml der

PBS(+/+)/Glycerin-Lösung resuspendiert und wie oben beschrieben aufgeschlossen. Der Überstand wurde mit High Titer (AdEGFP/RhoB) gekennzeichnet und bei -80°C gelagert.

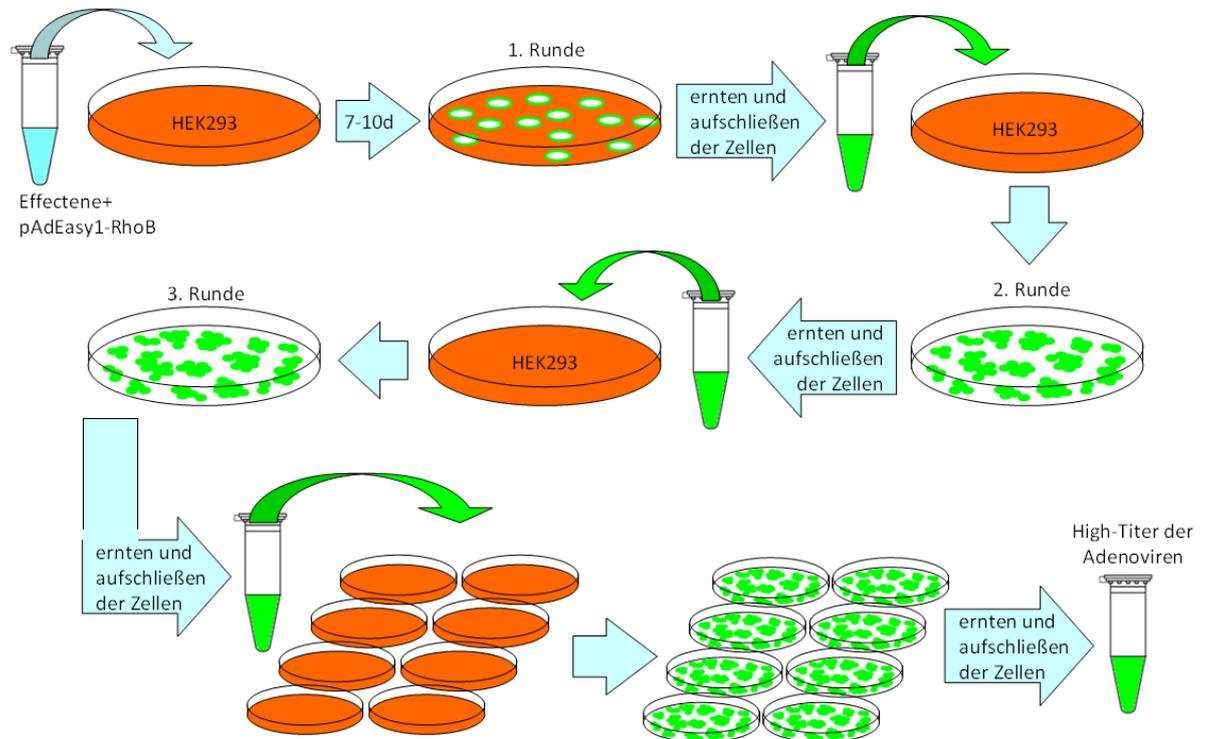


Abbildung 10: Ablauf der Adenovirusproduktion in HEK293 Zellen von der Transfektion bis zum High-Titer. Zellen die Adenovirus produzieren sind grün dargestellt, da diese im Fluoreszenzmikroskop als grün-fluoreszierende Zellen auf Grund der GFP-Produktion zu erkennen sind.

2.8.3 Validierung der produzierten Adenoviren

Die Überprüfung der produzierten rekombinierten RhoB-Adenoviren erfolgte auf DNA- und auf Proteinebene. Dafür wurden zwei 6 cm Schalen mit HEK293 und H1299 Zellen mit je $1\ \mu\text{l}$ der Adenoviren der „3. Runde“ infiziert und die Zellen nach 72 Stunden geerntet. Eines der beiden Zellpellets wurde zur DNA-Isolierung verwendet, das andere zur Zelllyse für den Proteinnachweis. Mit der isolierten DNA erfolgte der Nachweis des RhoB-Inserts in der PCR und die Sequenzierung des RhoB-Inserts. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE nach Größe getrennt und im Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Mittels Immundetektion mit spezifischen Antikörpern erfolgte der Nachweis des RhoB-Proteins. Sowohl für die Protein- als auch für die DNA-Überprüfung wurden geeignete Kontrollen mitgeführt.

2.8.3.1 Nachweis der Produktion von RhoB-Protein im Western Blot

2.8.3.1.1 Proteinisolierung

Für die Lyse der Zellen wurde das Zellpellet in $300\ \mu\text{l}$ RIPA complete resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Zum Pelletieren unlöslicher Zellbestandteile erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei $10.000\ \text{rpm}$ und 4°C für 5 Minuten.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration im Bradford Assay wurde eine BSA-Standardreihe angesetzt. Dafür wurden die in Tabelle 16 aufgeführten Ansätze benötigt.

Tabelle 16: BSA-Standardreihe für den Bradford Assay

BSA-Gehalt, µg	BSA-Stock, µl	RIPA complete, µl	Aqua dest., µl
0,0	0	2	798
0,5	5	2	793
1,0	10	2	788
2,0	20	2	778
4,0	40	2	758
6,0	60	2	738
8,0	80	2	718
10,0	100	2	698

Zur Bestimmung des Proteingehalts der Proben wurde 1-5 µl des Überstandes in ein Reaktionsgefäß gegeben und auf 800 µl mit Aqua dest. aufgefüllt. Anschließend wurden 200 µl des Bradford Reagenz zu allen Standards und Proben gegeben, gevortext, anzentrifugiert und nach Ablauf von 5 Minuten Inkubation in Küvetten überführt. Die Absorptionsmessung erfolgte am Photometer SmartSpec 3000 mit dem Programm „Bradford“. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt.

2.8.3.1.2 SDS-PAGE, Western Blot und Immunodetektion

Von jedem zu untersuchenden Zelllysate wurden 20-50 µg Gesamtprotein mit Probenpuffer versetzt, so dass eine Verdünnung des Probenpuffers von 1:5 erfolgte. Vor dem Auftragen auf das SDS-Gel wurden alle Proben für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Zur späteren Bestimmung der Bandengrößen bei der Immunodetektion wurden 6 µl Größenmarker, markiert bzw. unmarkiert, mitgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem diskontinuierlichen Lämmli-Gel mit einem 4,5 % Sammelgel und einem 10 bzw. 12 % Trenngel.

Tabelle 17: Zusammensetzung der Lämmli-Gele für den RhoB-Nachweis.

Die mit * markierten Reagenzien wurden erst kurz vor dem Gießen des Gels zugegeben, um eine zu frühe Polymerisation zu verhindern.

Reagenz	Trenngel 12 %	Sammelgel 4,5 %
Acrylamid/Bis-Acrylamid [ml]	8	1,50
Tris/HCl (Sammelgel) [ml]		1,25
Tris/HCl (Trenngel) [ml]	8	
Aqua dest. [ml]	4	7
10% SDS [µl]	216	100
10% APS [µl] *	160	100
TEMED [µl] *	20	10

Die Gelelektrophorese wurde in einer Mini-VE Kammer bei 200 V und 30 mA (konstant) durchgeführt. Nachdem die Bromphenolfront das Ende des Gels erreicht hatte, wurde der Lauf beendet und die Proteine des Gels im Western Blot auf eine zuvor mit Isopropanol

aktivierte PVDF Membran geblottet. Für den Semi-Dry Blot im TransBlot SD wurde der in Abbildung 11 dargestellte Sandwichaufbau verwendet.

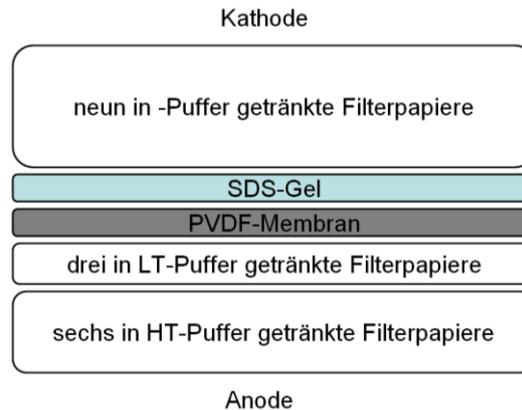


Abbildung 11: Sandwichaufbau im Western Blot.

Nach zwei Stunden bei 25 V wurde der Blot gestoppt und die Membran in Ponceau S gefärbt, anschließend getrocknet und eingescannt. Dies ermöglichte einen ersten Überblick über die Qualität des Blottens und bot die Möglichkeit, die Banden des ungefärbten Größenstandards auf der Membran zu markieren. Um bei der Immunodetektion unspezifische Antikörperbindungen an die Membranoberfläche zu vermeiden, wurde die Membran nach dem erneuten Aktivieren mit Isopropanol, in Blockmilch über Nacht bei 4°C geblockt. Am nächsten Tag wurde die Membran für zwei Stunden im primären Antikörper (verdünnt in Blockmilch) auf dem Schüttler bei Raumtemperatur geschwenkt. Um ungebundenen Antikörper wieder von der Membran zu waschen, erfolgten vier fünfminütige Waschschrte mit Waschpuffer. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde mit dem sekundären, biotinylierten Antikörper (verdünnt in Blockmilch) geschwenkt. Nach erneutem Waschen mit Waschpuffer wurde die Membran für eine Stunde mit Streptavidin-POX (verdünnt in Blockmilch) geschwenkt. Nach einem letzten Waschschrte wurde das Chemilumineszenz-Substrat zur Membran gegeben und für 5 Minuten im Dunkeln geschwenkt. Um beim späteren Auflegen von Röntgenfilmen eine Benetzung derselben zu vermeiden, wurde die Membran in Folie eingeschweißt. In einer Filmkassette wurden im Dunkelraum lichtsensitive Filme aufgelegt. Nach verschiedenen Belichtungszeiten wurden die Filme entwickelt und auf ausreichende Signalstärke überprüft. Die Belichtungszeiten lagen bei GAPDH zwischen 5 und 30 Sekunden, bei den anderen Proteinen zwischen Minuten und Stunden.

Tabelle 18: Verdünnung der verwendeten Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Proteingewicht
RhoB	1:200	25 kDa
GAPDH	1:5.000	37 kDa
Maus IgG + IgM*Biotin	1:10.000	
Kaninchen IgG*Biotin	1:20.000	
Streptavidin*POX	1:10.000	

2.8.3.2 Überprüfung des RhoB-Inserts auf DNA-Ebene

2.8.3.2.1 DNA-Isolierung

Das Zellpellet wurde in 300 µl PBS resuspendiert und die DNA-Isolierung erfolgte durch Phenol-Chloroform-Extraktion (s. Kapitel 2.8.1). Das DNA-Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer resuspendiert und am NanoDrop vermessen.

2.8.3.2.2 RhoB-PCR

Zum Nachweis des RhoB-Inserts in den produzierten RhoB Adenoviren erfolgte die Amplifikation der folgenden, verschieden großen Teile des Inserts:

Tabelle 19: Primerkombinationen für den Nachweis des RhoB-Inserts

Bezeichnung	Primerkombination	Fragmentgröße
C	2F2 + 3R2	251 bp
D	SalF + HindR	621 bp
E	SalF + 2R2	261 bp
F	SalF + 3R2	431 bp
G	2F2 + HindR	439 bp
H	3F2 + HindR	249 bp



Abbildung 12: Lage der verwendeten Primer in der Sequenz des RhoB-Inserts.

Die PCR-Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

- 12,5 µl 2x High Fidelity MasterMix
- 0,3 µl Forward Primer, 50 µM
- 0,3 µl Reverse Primer, 50 µM
- 200 ng DNA
- Aqua dest. auf 25 µl

Die PCR-Reaktion wurde im AB 7900 mit dem folgenden Temperaturprofil durchgeführt:

95°C	10 min	
95°C	45 sek.	40x
65°C	45 sek.	
72°C	45 sek.	
72°C	5 min	
4°C	∞	

Zur Überprüfung der PCR-Reaktion wurden 2 µl des PCR-Ansatzes mit 2 µl 2x Ladepuffer gemischt und auf einem 1% Agarosegel aufgetragen.

2.8.3.2.3 Sequenzierung des RhoB-Inserts

Um bei der Sequenzierung möglichst den gesamten Bereich des RhoB-Inserts abzudecken, erfolgte diese mit den PCR-Fragmenten „F“ und „G“. Diese wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Elution der aufgereinigten PCR-Fragmente erfolgte in 30 µl EB-Puffer. 2 µl des Eluats wurden auf einem 2 % Agarosegel mit verschieden stark verdünnten Größenmarkern aufgetragen, um den DNA-Gehalt abschätzen zu können.

Für die Sequenzierung nach Sangers Kettenabbruchmethode wurde das Quick Start Kit von Beckman Coulter verwendet. Bei einer Fragmentgröße von ≈ 450 bp wurden 15 ng des aufgereinigten PCR-Produkts in der Reaktion eingesetzt. Vor dem Ansetzen der Sequenzierungsreaktion erfolgte die Denaturierung des PCR-Produktes mit dem für die Reaktion benötigten Wasser bei 65°C für 5 min. Die Sequenzierung wurde im folgenden Ansatz durchgeführt:

15 ng	PCR-Produkt (F bzw. G)
1,5 µl	3,2 µM Primer (SalF, 2R2, 2F2 oder HindR)
4 µl	DTCS Quick Start Master Mix
	Aqua dest. auf 10 µl

Die Reaktion erfolgte im AB 7900 mit dem folgenden Temperaturprofil:

95°C	20 sek.	35x
50°C	20 sek.	
60°C	4 min	
4°C	∞	

Die bei der Kettenabbruchmethode nach Sanger erhaltenen DNA-Stücke wurden nach Herstellerangaben mit einer Ethanol-fällung gereinigt und anschließend in 30 µl SLS Lösung resuspendiert. Nach Überführung in eine für den Sequenzierer geeignete Platte wurden die in SLS-Lösung resuspendierten DNA-Pellets mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und in den CEQ 8800 Sequenzierer geladen und ausgewertet. Der Vergleich mit der Originalsequenz erfolgte im Programm ClustalX.

2.9 Zellkultur

2.9.1 Anzucht und Passagieren von Zelllinien

Tabelle 20: Zelllinien mit dem dazugehörigen Medium.

	Zelllinie	Medium	Zusätze
HEK293	Humane embryonale Nieren Zelllinie, transformiert mit Adenovirus 5	RPMI+GlutaMAX	10 % FCS 1 % Pen/Strep
H1299	Humane Lungen Adenokarzinoma Zelllinie	RPMI+GlutaMAX	10 % FCS 1 % Pen/Strep
A549	Humane Lungenkarzinoma Zelllinie	DMEM+GlutaMAX	5 % FCS 1 % Pen/Strep

Die Kultur der Zelllinien (Tabelle 20) erfolgte im Brutschrank mit 37°C und 5% CO₂. Die Kultur der H1299 Zellen wurde in der AG Vektorologie durchgeführt. Die Erhaltungskultur der A549 und HEK293 Zellen erfolgte in T75 Flaschen. Bei ≈ 80 % Konfluenz wurden die Zellen trypsiniert und auf 3 Flaschen aufgeteilt (passagiert). Für die Transduktion von H1299 und HEK293 Zellen mit dem RhoB Adenovirus wurden 4·10⁵ Zellen pro Vertiefung einer 6-well Platte ausgesät.

2.9.2 Isolierung primärer Chondrozyten

2.9.2.1 Chondrozyten aus dem Kniegelenknorpel

Die für die Transfektionsversuche verwendeten Chondrozyten wurden aus dem artikulären Knorpel des Kniegelenks isoliert. Zuerst wurden die Knorpelstücke in 1 mm³ Stücke geschnitten, für 15 min in 5 ml Trypsin angedaut und anschließend unter Schütteln bei 37°C in Knorpelverdauerpuffer inkubiert. Nach 16 h enzymatischem Verdaus der Extrazellulärmatrix wurde die Einzelzellsuspension über ein 40 µm Zellsieb in ein neues 50 ml Röhrchen filtriert. Nach Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml frischem Chondrozytenmedium resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer bestimmt.

2.9.2.2 Chondrozyten aus dem Knorpel des Femurkopfes

Die für die Transduktionsversuche verwendeten Chondrozyten wurden aus dem artikulären Knorpel des Femurkopfes isoliert. Nachdem der Knorpel vom Femurkopf mit einem Skalpell abgetragen wurde, erfolgte die Aufarbeitung wie beim Kniegelenknorpel.

2.10 Transfektion von Chondrozyten

Ein schematischer Überblick über die einzelnen Schritte von der Knorpelaufarbeitung über die Transfektion bis hin zur anschließenden Analytik ist in Abbildung 13 dargestellt.

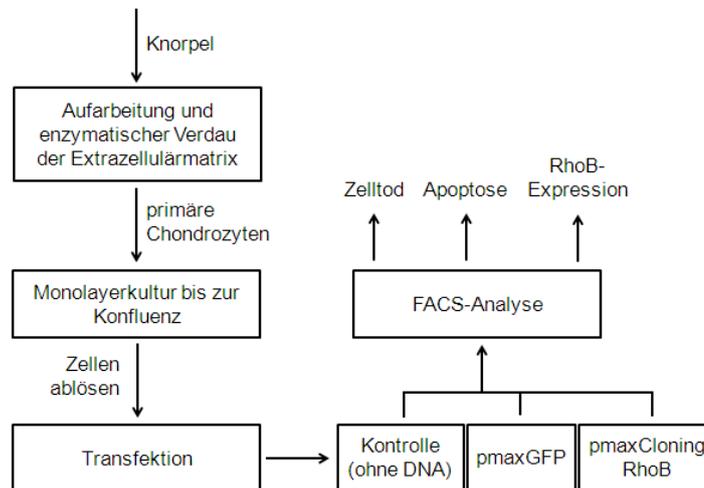


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Arbeitsabläufe der Transfektion

Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Chondrozyten in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt und bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz (8 bis 12 Tage) wurden das alte Medium abgesaut und 10 ml Chondrozyten-Detachment-Medium zu den Zellen gegeben. Dieses bewirkte nicht nur das Ablösen der Zellen, sondern auch den Abbau der Extrazellulärmatrix als Voraussetzung zur Transfektion. Nach 3 bis 5 Stunden bei 37°C hatten sich die Zellen abgelöst und es konnte die Zellzahl mit der Neubauerzählkammer bestimmt werden.

Für jeden Transfektionsansatz wurden 0,5 – 1·10⁶ Zellen benötigt. Die Zellsuspension wurde auf 3 Reaktionsgefäße aufgeteilt, durch Zugabe von 500 µl PBS gewaschen und bei 3500 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 100 µl Chondrocyte Nukleofector Solution resuspendiert und entsprechend den Ansätzen wurden keine DNA, 5 µg pmaxGFP oder 5 µg pmaxCloning RhoB hinzugegeben. Jede Suspension wurde in eine Amaxa Küvette überführt und mit dem Programm U-028 behandelt. Nach der Transfektion wurde mittels Pasteurpipette 500 µl warmes Medium (20 % Serum) zu den jeweiligen Zellen gegeben, die Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, entsprechend dem Versuchansatz auf Zellkulturplatten aufgeteilt und in Chondrozytenmedium mit 20 % Serum kultiviert. Das Gesamtvolumen pro Vertiefung betrug dabei 2 ml.

Nach 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit Chondrozyten-Detachment-Medium abgelöst und die Zellsuspension in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt konnte der Überstand verworfen und das Zellpellet in 300 µl Annexin-

V-Bindepuffer resuspendiert werden. Auf vier 1,5 ml Reaktionsgefäße wurden je 75 µl der Zellsuspension aufgeteilt und verschiedene Färbungen durchgeführt.

Zum ersten Ansatz, für die Bestimmung der toten Zellen, wurden zur Zellsuspension 5 µl 7AAD gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von 200 µl PFA-Puffer für 15 Minuten fixiert. Nach Zentrifugation bei 3500 rpm für 5 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert.

Zum zweiten Ansatz, für die Bestimmung der apoptotischen Zellen, wurden 5 µl AnnexinV:PE zur Zellsuspension gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Fixierung wie beim ersten Ansatz.

Zum dritten Ansatz, als ungefärbte Kontrolle, wurden die Zellen wie beim ersten Ansatz fixiert und nach der Zentrifugation mit 200 µl 90 % Methanol für 15 Minuten permeabilisiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Zellpellet in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert.

Zum vierten Ansatz, für die Bestimmung der RhoB-exprimierenden Zellen, wurden die Zellen wie im dritten Ansatz fixiert und permeabilisiert. Zu den resuspendierten Zellen wurden 10 µl α -RhoB:PE gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Zellpellet in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert.

Die verschiedenen Ansätze wurden im Durchflusszytometer analysiert.

2.11 Transduktion mit Adenoviralen Vektoren

2.11.1 Chondrozytentransduktion

Zur Untersuchung des Einflusses einer Adenovirusinfektion auf die Matrixproduktion von Chondrozyten wurden diese mit dem 10- oder 50-fachen an Adenoviruspartikeln (AdEGFP; Adenovirus 35) inkubiert (*multiplicity of infection* (MOI) von 10 oder 50). Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei 37°C und 5 % CO₂. Eine unbehandelte Kontrolle wurde bei allen Versuchen mitgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde ein Zehntel der Zellsuspension in eine 12 well Platte überführt (nur bei AdEGFP). Diese Zellen wurden adhärent und es konnte über den gesamten Kulturzeitraum die GFP-Expression der transduzierten Chondrozyten verfolgt werden. Die restliche Zellsuspension wurde direkt in 3D-Kultur überführt.

2.11.1.1 Monolayerkultur

Die Chondrozyten wurden in den 12-well-Platten bis zur Konfluenz kultiviert und dann in 6-well-Platten umgesetzt. Nachdem in diesen ebenfalls Konfluenz erreicht war, wurden die Chondrozyten in T75-Zellkulturflaschen umgesetzt und erneut bis zur Konfluenz kultiviert. Nach dieser Expansion der dedifferenzierten Chondrozyten wurden diese geerntet und zum Redifferenzieren in die 3D-Kultur überführt.

2.11.1.2 3D-Kultur in Alginat

Die Zell-Adenovirus-Suspension nach Transduktion wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in Alginatpuffer mit einer Zellzahl von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml resuspendiert. Nachdem die Zell-Alginat-Lösung in 3 ml CaCl_2 pro well einer 6-well-Platte eingetropfelt wurde und für 10 Minuten zum Aushärten inkubiert wurde, wurde der Puffer mit einer sterilen Glaspasteurpipette abgesaugt. Nach zweimaligem Waschen mit 3 ml steriler Kochsalzlösung für 10 Minuten wurden 3 ml Medium zugegeben. Die Chondrozyten wurden dann bei 37°C und 5 % CO_2 für 28 Tage (Adenovirus 35 für 14 Tage) kultiviert; ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage.

2.11.2 Untersuchung der Matrixproduktion

2.11.2.1 Alginatlyse

Nachdem die Chondrozyten für 28 Tage in 3D kultiviert wurden, wurden die Alginatkügelchen in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und die Alginatmatrix durch Zugabe von 1,5 ml Alginat-Lysepuffer aufgelöst. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Zellsuspension zentrifugiert (4000 rpm, Tischzentrifuge) und das Zellpellet erneut mit 1,5 ml Alginat-Lysepuffer für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation wurde das Pellet in 200 μl 1x PBS resuspendiert. Überschüssiges Alginat, welches den colorimetrischen Nachweis von Glukosaminoglykanen (GAG) stören würde, sollte nun gewaschen sein. Zum DNA-Nachweis wurden 20 μl der Zellsuspension in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen Papainverdaupuffer versetzt und bei 60°C für 24 Stunden inkubiert. Die restliche Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C bis zur Analyse gelagert. Das Pellet wurde entweder zur RNA- oder zur Proteinisolierung verwendet.

2.11.2.2 RNA-Isolierung und Realtime PCR

Das Zellpellet wurde in 600 μl RLT+ β -ME resuspendiert und die RNA-Isolierung erfolgte nach der Arbeitsvorschrift von Qiagen mit dem Rneasy Mini Kit. Die RNA wurde mit 30 μl Rnase-freiem Wasser eluiert und der RNA-Gehalt am NanoDrop bestimmt. Anschließend wurde die Reinheit der RNA am Agilent 2100 bioanalyzer mittels eines Agilent RNA 6000 Pico Kits nach Herstellerangaben ermittelt.

Die cDNA-Transkription erfolgte im 20 μl Ansatz mit 500 ng RNA mittels des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits von Applied Biosystems. Die umgeschriebene cDNA wurde innerhalb eines Tages in der Realtime PCR zur Amplifikation der in Tabelle 11 aufgelisteten Gene eingesetzt. Dabei wurde 1 μl cDNA im 10 μl Realtime PCR Ansatz eingesetzt. Dieser setzte sich wie folgt zusammen:

5,0 μl 2x TaqMan[®] Gene Expression Master Mix
 0,5 μl 20x PCR Primer/Sonde Mix
 1,0 μl cDNA
 3,5 μl H₂O

Die Realtime PCR wurde im AB 7900 mit dem folgenden Temperaturprofil durchgeführt:

50°C	2 min	
95°C	10 min	
95°C	15 sek.	45x
60°C	60 sek.	

Die Auswertung der Realtime PCR erfolgte mit dem RQ Manager 1.2. Dabei wurde die Wasserprobe als „Calibrator“ eingesetzt. Anschließend wurde die Genexpression in der unbehandelten Kontrolle mit der in der adenovirusinfizierten Probe (normiert auf das Haushaltsgen GAPDH) verglichen. Dazu wurde die $\Delta\Delta C_T$ -Methode angewandt. Alle Realtime PCR Reaktionen wurden in Triplikaten durchgeführt.

2.11.2.3 Quantifizierung des DNA-Gehalts

Dazu wurde der Papainverdauansatz mit dem Bisbenzimidazol-Farbstoff Hoechst 33258 versetzt und fluorimetrisch gegen eine Standardreihe aus Kalbsthymus-DNA gemessen [modifiziert nach [Skodacek 2005](#)].

Für die Standardreihe wurden aus der 100 ng/ μl Stocklösung der Kalbsthymus-DNA die folgenden Verdünnungen angesetzt: 20 ng/ μl , 10 ng/ μl , 5 ng/ μl , 2,5 ng/ μl , 1,25 ng/ μl , 0,625 ng/ μl und 0,313 ng/ μl . Von den Proben wurden 1:3 Verdünnungen angesetzt. Die Verdünnung der Standards und Proben erfolgte in halbkonzentriertem Papainverdauopuffer.

Von den Standards und den Proben wurden je 5 μl in eine 96-well Platte überführt und mit 200 μl Hoechstfärbelösung versetzt. Die Messung erfolgte am Tecan Infinite 200 Reader. Dabei wurde die Emission bei 458 ± 10 nm gemessen (Exzitation bei 358 ± 5 nm). Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt.

2.11.2.4 Quantifizierung der Glukosaminoglykane

Zum Nachweis von sulfatierten Glukosaminoglykanen (sGAG) wurden die Überstände nach der Alginatlyse mit 1,9-Dimethylmethylenblau (DMMB) versetzt und photometrisch gegen eine Standardreihe aus Chondroitin-6-sulfat gemessen [modifiziert nach [Skodacek 2005](#)].

Für die Standardreihe wurden aus der 1 mg/ml Stocklösung des Chondroitin-6-sulfats die folgenden Verdünnungen angesetzt: 250 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 62,5 $\mu\text{g/ml}$, 31,3 $\mu\text{g/ml}$, 15,6 $\mu\text{g/ml}$ und 7,8 $\mu\text{g/ml}$. Von den Proben wurden 1:2 und 1:10 Verdünnungen angesetzt. Die Verdünnung der Standards und der Proben erfolgte in Natriumacetat-Puffer.

Von den Standards und den Proben wurden je 10 μl in eine 96-well Platte überführt und mit 200 μl DMMB-Lösung versetzt. Die Messung erfolgte am Tecan Infinite 200 Reader bei einer

Wellenlänge von 540 ± 5 nm. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. Um den sGAG-Gehalt der Proben vergleichen zu können, wurde das Verhältnis von sGAG-Gehalt und DNA-Gehalt bestimmt und anschließend auf die Kontrolle normiert.

2.11.2.5 Proteinisolierung und Western Blot

Die Zellpellets nach der Alginatlyse wurden in RIPA-complete resuspendiert, inkubiert und im Bradford Assay auf ihren Proteingehalt hin getestet. Anschließend erfolgte die Auftrennung von 30 μ g Gesamtprotein in einem 10 % Lämmli-Gel (Tabelle 21) und die Immunodetektion mit den in Tabelle 22 angegebenen Antikörpern.

Tabelle 21: Zusammensetzung der Lämmli-Gele für die Untersuchung des Matrixumbaus.

Die mit * markierten Reagenzien wurden erst kurz vor dem Gießen des Gels zugegeben, um eine zu frühe Polymerisation zu verhindern.

Reagenz	Trenngel 10 %	Sammelgel 4,5 %
Acrylamid/Bis-Acrylamid [ml]	7	1,50
Tris/HCl (Sammelgel) [ml]		1,25
Tris/HCl (Trenngel) [ml]	8	
Aqua dest. [ml]	5	7
10% SDS [μ l]	216	100
10% APS [μ l] *	160	100
TEMED [μ l] *	20	10

Tabelle 22: Verdünnung der verwendeten Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Proteingewicht
GAPDH	1:5000	37 kDa
Kollagen 2	1 μ g/ml	95 kDa
MMP13	1 μ g/ml	46 kDa
Syndekan 4	1 μ g/ml	24 kDa
TIMP1	1 μ g/ml	23 kDa
Maus IgG + IgM*Biotin	1:10.000	
Kaninchen IgG*Biotin	1:20.000	
Streptavidin*POX	1:10.000	

2.12 Neutralisationstests

In diesen Tests wurden Antikörper, welche nach einer Adenovirusinfektion im Serum der Spender zu finden waren, mit verschiedenen Adenoviren inkubiert. Die vorhandenen Antikörper banden an die Adenoviren. Nachdem diese Antikörper-Adenovirus-Lösung auf A549 Zellen gegeben wurde, wurde die Wirkung der Adenoviren auf die Zellen neutralisiert. Es konnten keine Zellen infiziert werden und es blieb ein intakter Zellrasen bestehen. Durch eine vorherige sequenzielle Verdünnung des Serums, konnte der vorhandene Antikörpertiter ermittelt werden. Es war bei entsprechend hoher Verdünnung des Serums keine Bindung von Antikörpern an Adenoviren mehr möglich und die Adenoviren konnten den Zellrasen infizieren und sich ungehindert vermehren. Nun entstanden Löcher im Zellrasen und im späteren Verlauf war der Cytopathische Effekt (CPE) am kompletten Zellrasen zu sehen. Dieser zeichnete sich durch das Abkugeln der Zellen, Löcher im Zellrasen bis hin zu einem kompletten Ablösen des Zellverbandes aus. Bei allen Versuchen wurden verschiedene Kontrollen in den Versuch eingebunden. Dazu gehörte die *Zellkontrolle* bei der Zellen ohne Serum und ohne Adenovirus zur Kontrolle des Zellwachstums kultiviert wurden. Des Weiteren die *Adenoviruskontrolle*, Zellen ohne Serum aber mit Adenovirus, zur Bestimmung des Versuchsendes. War bei der Adenoviruskontrolle ein kompletter CPE eingetreten, konnten die dazugehörigen Ansätze abgelesen werden. Die *Immunserumkontrolle*, Zellen mit einem Serum mit Antikörpern und Adenovirus, diente als Kontrolle für eine erfolgte Neutralisation der Adenoviren.

Zum Aussäen der Zellen in die 96 well Platten, wurden die Zellen einer konfluenten T75 Zellkulturflasche mit 4 ml Trypsin gelöst, die Reaktion mit 6 ml Medium mit 2 % FCS gestoppt und 9 ml in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die verbliebene Zellsuspension wurde auf 10 ml mit Medium mit 5 % FCS aufgefüllt und die Zellen weiterkultiviert. Die Zellsuspension im 50 ml Röhrchen wurde auf 52 ml mit Medium mit 2 % FCS aufgefüllt und zu 100 µl pro Vertiefung einer 96-well Platten (insgesamt 5 Platten) aufgeteilt. Die Platten wurden anschließend im Brutschrank inkubiert. Wurde die Konfluenz erreicht, konnte der Neutralisationstest gestartet werden.

Dafür erfolgte die Verdünnung der Patientenseren (1:2) und der Immunseren (1:50) mit Medium ohne FCS und die anschließende Hitzeinaktivierung von 500 µl der verdünnten Seren bei 56°C für 30 Minuten. 25 µl der verdünnten Seren wurden wie in Abbildung 14 und Abbildung 15 dargestellt in 96-well Platten aufgetragen und sequentiell mit Medium ohne FCS verdünnt.

	S1			S2			S3			S4		
1:2												
1:4												
1:8												
1:16												
1:32												
1:64												
1:128												
1:256												

Abbildung 14: Verdünnungsschema der Patientenserum S1 bis S4 für den Neutralisationstest.

	Immuneserum+ Adenovirus			Adenovirus-kontrolle			Zellkontrolle			Zellkontrolle		
1:50												
1:100												
1:200												
1:400												
1:800												
1:1600												
1:3200												
1:6400												

Abbildung 15: Verdünnungsschema des Immuneserums auf einer Kontrollplatte mit Adenoviruskontrolle und Zellkontrolle.

Anschließend wurden 25 µl Adenoviruslösung mit 3600 TCID₅₀/ml zugegeben, gemischt und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Diese Serum-Adenovirus-Lösung wurde in die vorbereiteten Zellplatten überführt und weiter bei 37°C inkubiert.

3. Ergebnisse

3.1 Herstellung eines RhoB-Expressionsvektors

Vorversuche in der Arbeitsgruppe mit einer humanen Chondrosarcoma-Zelllinie [Mahr submitted] haben gezeigt, dass die Überexpression des RhoB-Proteins zur Apoptose dieser Zellen führte. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, primäre humane Chondrozyten mit einem RhoB-Plasmid zu transfizieren, somit eine Überexpression des Proteins zu erreichen und die Auswirkungen auf die Chondrozyten zu untersuchen.

Die Transfektion der Chondrozyten sollte mit den von der Firma Amaxa erhältlichen Lösungen, speziell für humane Chondrozyten, und dem Nucleofector durchgeführt werden. Für die Transfektion mit dem System von Amaxa ist die Verwendung eines speziellen Plasmids, dem pmaxCloning Plasmid, erforderlich. Aus diesem Grund musste das RhoB-Gen aus dem vorliegenden pAdTrack CMV RhoB Plasmid ausgeschnitten und in ein für die Transfektion geeignetes Plasmid umklontiert werden. Dafür wurde zuerst eine ausreichende Menge an pAdTrack CMV RhoB Plasmid-DNA mit der Qiagen Methode isoliert und anschließend das RhoB-Fragment aus dem Plasmid mit Restriktionsendonukleasen (s. Kapitel 2.7.2.2) ausgeschnitten. Nachdem der Spaltungsansatz auf einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt wurde, erfolgte die Isolation der RhoB-Bande aus dem Agarosegel und deren Aufreinigung. Zur Überprüfung des aufgereinigten Fragments wurde dieses, wie in Abbildung 16 dargestellt, auf einem 1,5 % Agarosegel mit einem Größenmarker aufgetrennt. Das aufgereinigte DNA-Fragment hatte eine Größe von ≈ 600 bp und entsprach dem RhoB-Insert (gerahmter Bereich).

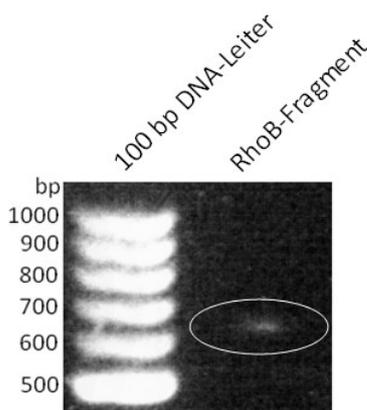


Abbildung 16: aufgereinigtes RhoB-Fragment des pAdTrack CMV RhoB Plasmid im 1,5 % Agarosegel nach Spaltung mit KpnI und HindIII.

Vor einer Ligation des RhoB-Fragments mit dem pmaxCloning Plasmid, wurde die Spaltung des Plasmids mit den selbigen Restriktionsendonukleasen (s. Kapitel 2.7.2.2) durchgeführt. Anschließend erfolgte die Ligation mit der T4 DNA Ligase. Nach Transformation des *E. coli* XL10 Gold Stammes mit dem Ligationsansatz wurden am folgenden Tag

20 Klone isoliert. Mittels der QuickLyse Miniprep-Methode wurde aus 5 Pools von je vier Klonen die Plasmid-DNA isoliert und mit HindIII linearisiert. Anschließend erfolgte die in Abbildung 17 dargestellte Auftrennung in einem 1,5 % Agarosegel. Bei den Pools 1 bis 3 konnte sowohl das 3000 bp große linearisierte Ausgangsplasmid pmaxCloning (gestrichelte Linie) als auch das 3500 bp große ligierte pmaxCloning RhoB Plasmid (durchgehende Linie) nachgewiesen werden. Da bei den Pools 4 und 5 nur das 3000 bp große linearisierte Ausgangsplasmid pmaxCloning nachgewiesen werden konnte, wurden diese verworfen.

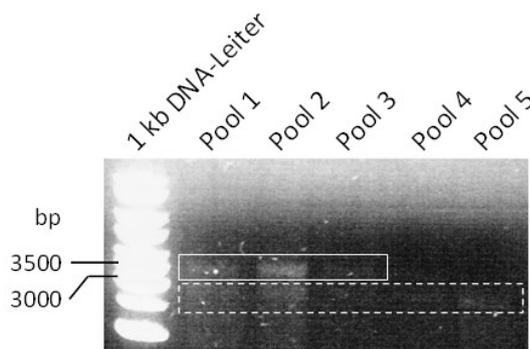


Abbildung 17: Auftrennung der mit HindIII linearisierten Plasmid-DNAs nach Ligation im 1,5 % Agarosegel. Die 3500 bp großen Fragmente sind mit durchgehender Linie hervorgehoben, die 3000 bp großen mit gestrichelter.

Die weitere Überprüfung der einzelnen Klone eines Pools erfolgte mit der QuickLyse Miniprep-Methode. Anschließend wurde das RhoB-Fragment ausgeschnitten und die Auftrennung in einem 1,5 % Agarosegel, wie in Abbildung 18 dargestellt, durchgeführt. Nur in den Klonen 6 und 8 (aus Pool 2) wurde das nach erfolgreicher Ligation eingebaute RhoB-Insert, durch die Spaltung ausgeschnitten (gerahmter Bereich) und im Agarosegel aufgetrennt.

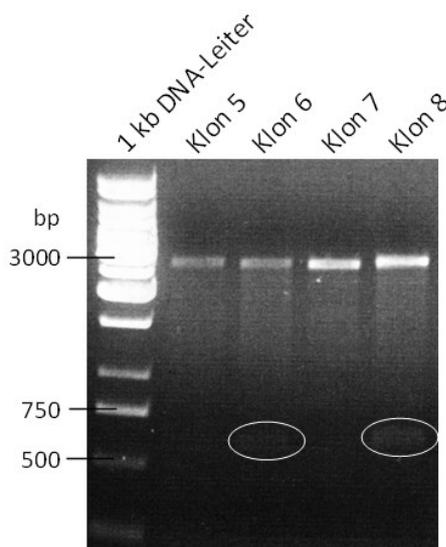


Abbildung 18: Auftrennung der einzelnen Klone des Pools 2 nach Spaltung mit KpnI und HindIII im 1,5 % Agarosegel.

Im nächsten Schritt erfolgte die Plasmid-Isolierung aus Klon 8 nach der Qiagen-Methode; Klon 6 wurde verworfen.

Um sicher zu stellen, dass die Umklonierung des RhoB-Fragments zu einem funktionalen Plasmid führte, wurden sowohl das Ausgangsplasmid pAdTrack CMV RhoB als auch das pmaxCloning RhoB Plasmid in HEK 293 Zellen eingebracht. Dafür erfolgte die Transfektion von 80 % konfluenten Zellen in Schalen mit der Plasmid-DNAs (15 cm / 2 µg in Abweichung zu Kapitel 2.8.2.2) bzw. ohne DNA mit dem Effectene Transfection Reagent. Der Nachweis des RhoB-Proteins erfolgte 48 h nach Transfektion der Zellen. Dafür wurden die Zellen abgeschabt und aufgeschlossen (s. Kapitel 2.8.3.1.1). In der SDS-PAGE (s. Kapitel 2.8.3.1.2) wurden 50 µg Gesamtprotein aufgetrennt; der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte im Western Blot (s. Kapitel 2.8.3.1.2). Die Immunodetektion von RhoB (Abbildung 19) zeigte in beiden Fällen eine deutliche Zunahme des RhoB-Proteins nach der Transfektion. Die Zunahme war nach Transfektion mit dem pmaxCloning RhoB Plasmid größer als nach Transfektion mit dem pAdTrack CMV RhoB Plasmid.

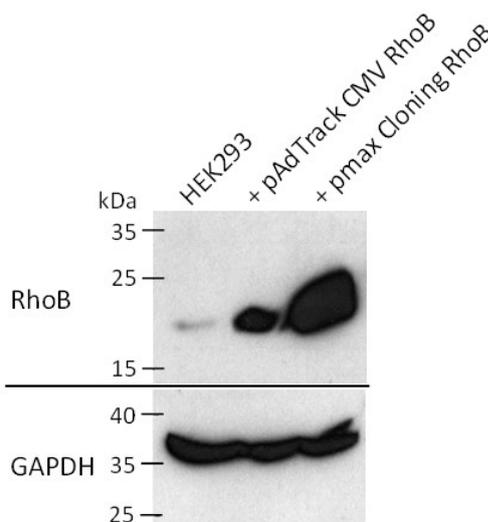


Abbildung 19: Transfektion von HEK293 Zellen mit den verschiedenen RhoB-Plasmiden. 48 h nach Transfektion mit dem Effectene Transfection Kit erfolgte die Proteinisolierung; 50 µg Gesamtprotein wurden in der SDS-PAGE (12 % Trenngel) aufgetrennt und im Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Immunodetektion wurde mit den angegebenen Antikörpern durchgeführt.

3.2 Transfektion von Chondrozyten

Für die Transfektion der primären humanen Chondrozyten mit dem pmaxCloning RhoB Plasmid wurden die aus dem Kniegelenkknorpel isolierten Chondrozyten von insgesamt 15 Spendern zunächst im Monolayer bis zur Konfluenz kultiviert und vor der Transfektion enzymatisch abgelöst. Für die Transfektion wurden $0,5$ bis $1,0 \cdot 10^6$ Zellen in jeden Transfektionsansatz eingesetzt; die Transfektion erfolgte, wie in Kapitel 2.10 beschrieben. Nach Kultur der transfizierten Chondrozyten für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ wurden in der Durchflusszytometrie die Anteile der toten (7AAD-Färbung) und der apoptotischen Zellen (AnV:PE-Färbung) bestimmt, sowie die intrazelluläre RhoB-Expression. Parallel erfolgte die Bestimmung der Transfektionseffizienz in den mit pmxGFP transfizierten Chondrozyten (s. Tabelle 23).

Tabelle 23: Übersicht über die Spender und die Transfektionseffizienz (TE) der Chondrozyten 24 h nach Transfektion.

Nr.	Geschlecht	Geburtsjahr	Monolayer- kultur [d]	TE [%]
1	weibl.	1940	11	1,00
2	männl.	1950	12	29,57
3	weibl.	1947	3	12,10
4	männl.	1931	5	7,00
5	weibl.	1936	9	20,17
6	weibl.	1938	12	10,22
7	weibl.	1930	11	27,60
8	männl.	1935	11	5,20
9	weibl.	1929	9	6,01
10	männl.	1934	8	9,00
11	weibl.	1928	10	45,40
12	männl.	1942	11	3,20
13	weibl.	1947	12	1,42
14	männl.	1959	11	2,77
15	weibl.	1935	12	42,98

Exemplarisch sollen nun die Durchflusszytometrie-Ergebnisse für die Chondrozyten mit der größten Transfektionseffizienz (Nr. 11) dargestellt werden.

Die Transfektion mit pmaxGFP führte bei diesen Chondrozyten (s. Abbildung 20) zu einer Transfektionseffizienz von 45,4 % im Vergleich zur Kontrolle, Chondrozyten transfiziert ohne Plasmid-DNA.

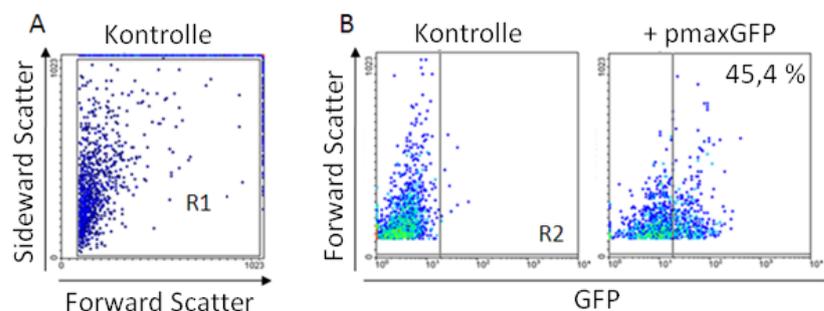


Abbildung 20: Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektionseffizienz anhand der GFP⁺-Zellen nach 24 h. Die Auswertung der GFP⁺ Zellen erfolgte nur mit den in **A** dargestellten Zellen der Region R1. In **B** sind die GFP-exprimierenden Chondrozyten dargestellt. Die GFP⁺-Zellen befinden sich in Region R2. Die GFP-Expression der mit pmaxGFP transfizierten Chondrozyten berechnet sich, indem von der jeweiligen GFP-Expression die der Kontrolle abgezogen wird.

Zum Nachweis von apoptotischen Zellen wurde das fluoreszenzmarkierte Annexin V (AnV:PE) verwendet. Dieses bindet spezifisch an apoptotische Zellen und die daraus resultierende Fluoreszenzmarkierung der Chondrozyten (s. Abbildung 21) ist detektierbar. Dabei fiel auf, dass es zu einem Anstieg der Apoptose bei allen Chondrozyten nach Transfektion kam. Der Anteil an apoptotischen Zellen betrug bei der Kontrolle 51,0 % und durch die Verwendung von Plasmid-DNA, pmaxGFP oder pmaxCloning RhoB, steigt dieser Anteil um weitere 11,3 % bzw. 11,0 %.

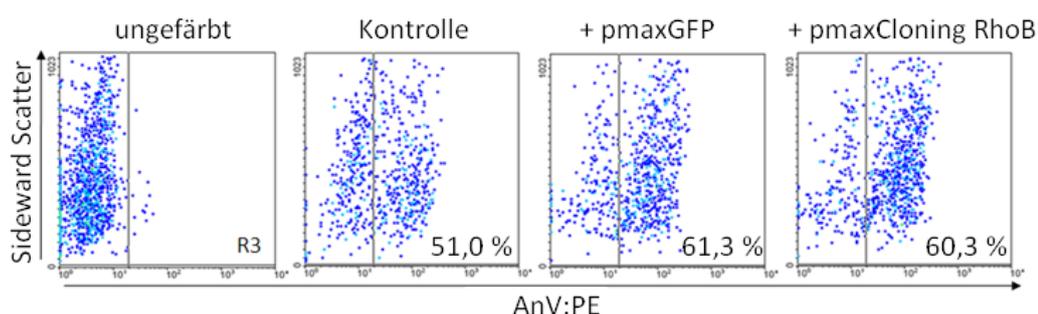


Abbildung 21: Durchflusszytometrische Bestimmung der Anteile an apoptotischen Zellen 24 h nach Transfektion. Die Auswertung der AnV:PE-Expression erfolgt wie in **Abbildung 20** mit den in Region R1 befindlichen Zellen. Eine ungefärbte Probe wird als Negativkontrolle bei der Färbung mitgeführt, welche von den Ergebnissen der gefärbten Proben abgezogen wurde.

Der Nachweis der toten Zellen erfolgte durch Inkubation der Chondrozyten mit dem Farbstoff 7AAD, welcher sich ausschließlich in toten Zellen ohne intakte Zellmembran anreichern kann. Durch den Vorgang der Transfektion der Chondrozyten starben 13,8 % der untersuchten Chondrozyten (Kontrolle). Ein Anstieg des Zelltods auf 18,2 % war durch Transfektion mit dem pmaxGFP Plasmid festzustellen. Den stärksten Einfluss auf den Zell-

tod hatte jedoch die Transfektion mit dem pmaxCloning RhoB Plasmid mit einem Anstieg auf 32,5 % (s. Abbildung 22).

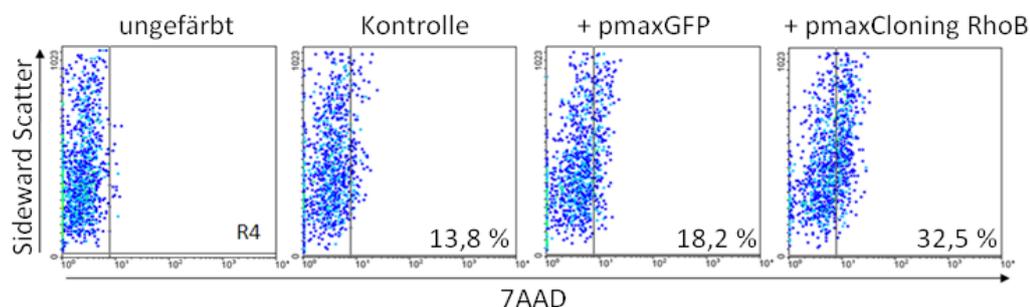


Abbildung 22: Durchflusszytometrische Bestimmung der Anteile an toten Zellen 24 h nach Transfektion. Die Auswertung der AnV:PE-Expression erfolgt wie in **Abbildung 20** mit den in Region R1 befindlichen Zellen. Eine ungefärbte Probe wird als Negativkontrolle bei der Färbung mitgeführt, welche von den Ergebnissen der gefärbten Proben abgezogen wurde.

Für den intrazellulären Nachweis der RhoB-Expression kam ein fluoreszenzmarkierter Antikörper zum Einsatz. Durch die Transfektion mit dem pmaxCloning RhoB Plasmid konnte keine Zunahme der RhoB-Expression festgestellt werden (s. Abbildung 23).

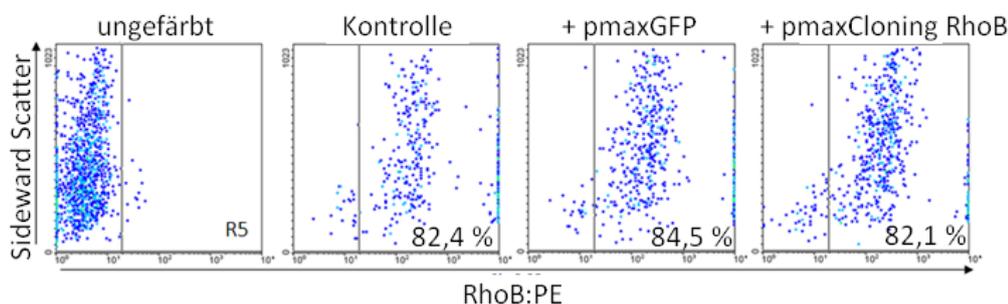


Abbildung 23: Durchflusszytometrischer Nachweis der intrazellulären RhoB-Expression 24 h nach Transfektion. Die Auswertung der AnV:PE-Expression erfolgt wie in **Abbildung 20** mit den in Region R1 befindlichen Zellen. Eine ungefärbte Probe wird als Negativkontrolle bei der Färbung mitgeführt, welche von den Ergebnissen der gefärbten Proben abgezogen wurde.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass nur bei etwa einem Fünftel der transfizierten Chondrozyten eine ausreichend hohe Transfektionseffizienz (> 25 %, s. Tabelle 23) für die Auswertung erreicht werden konnte. Zudem war nach Transfektion mit dem pmaxCloning RhoB Plasmid keine Zunahme der RhoB-Expression festzustellen. Aus diesen Gründen wurden die Versuche, Chondrozyten durch Transfektion zur Überexpression von RhoB zu verändern, eingestellt.

3.3 Herstellung der RhoB Adenoviren

3.3.1 Homologe Rekombination zur Herstellung des AdEasy1-RhoB Plasmids

Eine Überexpression des RhoB Proteins unter Verwendung eines adenoviralen Vektorsystems sollte in den nächsten Versuchen getestet werden. Dafür musste das pAdTrack CMV RhoB Plasmid mit dem pAdEasy 1 Plasmid homolog rekombiniert werden. Nach erfolgreicher Rekombination konnte das somit entstandene pAdEasy-1 RhoB Plasmid in HEK293 Zellen transfiziert werden und die Adenovirusherstellung begonnen werden. Für die homologe Rekombination musste das pAdTrack CMV RhoB Plasmid zuerst mit PmeI linearisiert werden, um so die beiden Arme für die Rekombination freizulegen. In Abbildung 24 ist die Linearisierung des ≈ 10.000 bp großen pAdTrack CMV RhoB Plasmids dargestellt.

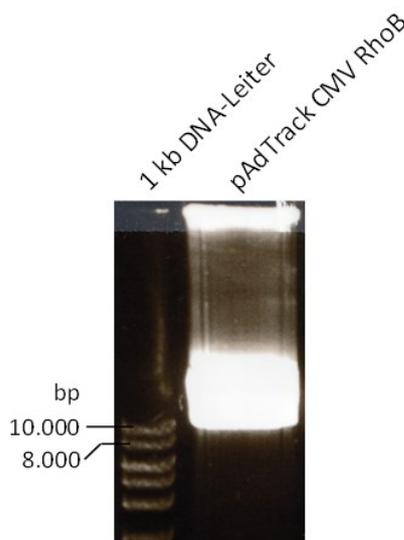


Abbildung 24: Linearisiertes pAdTrack CMV RhoB Plasmid nach Linearisierung mit PmeI und Auftrennung im 1 % Agarosegel.

Die Extraktion und Aufreinigung des aus dem Agarosegel ausgeschnittenen linearisierten Plasmids erfolgte mit dem QIAEX II Kit. Nach der homologen Rekombination in BJ5183 *E. coli* Zellen und Selektion auf kanamycinhaltigen Agarplatten, wurden 40 Klone isoliert und in je 5 ml SB-Medium über Nacht bei 37°C kultiviert. Mit der QuickLyse Miniprep Methode erfolgte die Plasmid-DNA Isolation.

Die RhoB-DNA wurde in der PCR mit der Primerkombination D amplifiziert und der PCR-Ansatz in dem in Abbildung 25 exemplarisch dargestellten Agarosegel aufgetrennt. Das 621 bp große RhoB-Fragment konnte in 39 von 40 Klonen nachgewiesen werden.

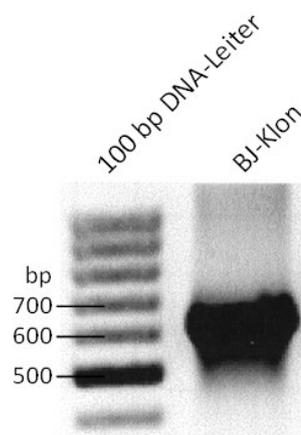


Abbildung 25: Nachweis der RhoB-Sequenz mit der Primerkombination D in einem BJ-Klonen im 1 % Agarosegel.

Um sicherzustellen, dass die amplifizierte RhoB-DNA aus dem rekombinierten Plasmid und nicht aus dem pAdTrack CMV RhoB Plasmid stammte, erfolgte die Spaltung der isolierten DNA mit HindIII. Eine einzelne Bande von ≈ 10.000 bp Größe im Agarosegel nach Spaltung konnte nur dann nachgewiesen werden, wenn der Klon das pAdTrack CMV RhoB Plasmid beinhaltet und es zu einer Linearisierung des Plasmids kam. Bei einem mit dem rekombinierten Plasmid transfizierten Klon musste ein wie in Abbildung 26 dargestelltes Bandenmuster entstehen.

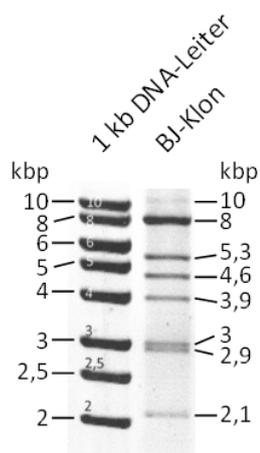


Abbildung 26: Bandenmuster eines erfolgreich homolog rekombinierten BJ-Klons nach Spaltung mit der Restriktionsendonuklease HindIII und Auftrennung im 1 % Agarosegel.

Von den zuvor in der RhoB-PCR positiv getesteten 39 Klonen konnte das wie in Abbildung 26 dargestellte Bandenmuster nach HindIII-Spaltung nur bei zwei Klonen (BJ-1 und BJ-18) nachgewiesen werden.

3.3.2 Retransformation des pAdEasy-1 RhoB Plasmids in *E. coli* XL10-Gold

Die homolog rekombinierten Klone (BJ-1 und BJ-18) wurden in XL10-Gold *E. coli* Zellen retransformiert und anschließend auf kanamycinhaltigen Agarplatten kultiviert. Am folgenden Tag wurden je 4 Klone isoliert und in je 5 ml Starterkulturen über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach der QuickLyse Miniprep Methode; eine Spaltung mit der Restriktionsendonuklease HindIII schloss sich an. Nur zwei der 8 Klone wiesen das typische Bandenmuster des pAdEasy-1 RhoB Plasmids auf (BJ-1-2 und BJ-1-3) und nur einer der Klone (BJ-1-3) wurde für die Isolation von ausreichend Plasmid-DNA für die Transfektion von HEK293 Zellen verwendet.

3.3.3 Produktion von AdEGFP/RhoB Adenoviren in HEK 293 Zellen

Nach der Isolierung der Plasmid-DNA des BJ-1-3 Klons mit der Qiagen-Methode erfolgte die Linearisierung mit der Restriktionsendonuklease PacI. Die Isolation der linearisierten Plasmid-DNA erfolgte mit einer Phenol-Chloroform Extraktion direkt aus dem Spaltungsansatz (s. Kapitel 2.8.2). Anschließend erfolgte die Transfektion von HEK 293 Zellen mit der Plasmid-DNA mit Hilfe des Effectene Transfection Reagent (s. Kapitel 2.8.2). Während der Adenovirusproduktion wurde die GFP-Expression im Fluoreszenzmikroskop (Abbildung 27) verfolgt.

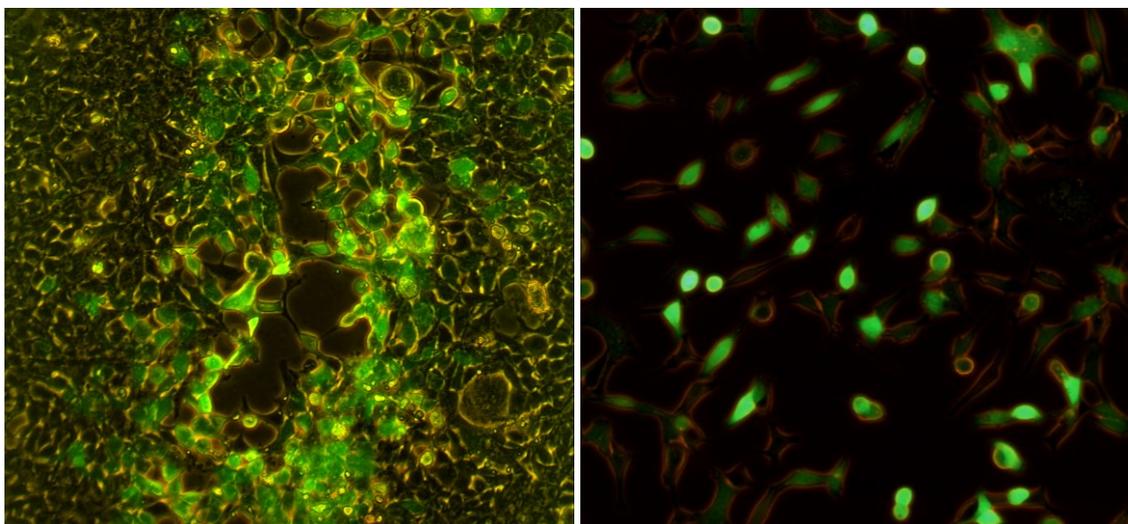


Abbildung 27: Überwachung der GFP-Expression der mit den BJ-1-3 Klonen transfizierten HEK 293 Zellen im Fluoreszenzmikroskop. Links ist eine Aufnahme von HEK293 Zellen in der 2. Runde der Adenovirusproduktion zu sehen. Rechts ist eine Aufnahme in der 3. Runde der Adenovirusproduktion abgebildet. Originalvergrößerung 200x.

Nach der 3. Runde der HEK293 Infektion lag der High Titer des BJ-1-3 Klons (AdE-GFP/RhoB) vor und konnte für die weitere Adenovirusproduktion oder für Transduktionsversuche eingesetzt werden.

3.3.4 Überprüfung der hergestellten AdEGFP/RhoB Adenoviren

Um sicher zu stellen, dass die hergestellten Adenoviren nach einer Transfektion in den infizierten Zellen die Expression des RhoB-Proteins auslösen, erfolgte die Transduktion von H1299 Zellen mit anschließendem Nachweis der Proteinexpression im Western Blot. Wie in Abbildung 28 dargestellt, führte die Transduktion mit dem RhoB Adenovirus zu keiner RhoB-Expression. Bei den mit pmaxCloning RhoB und pAdTrack CMV RhoB transfizierten HEK293 Zellen war eine deutliche RhoB-Expression nachweisbar.

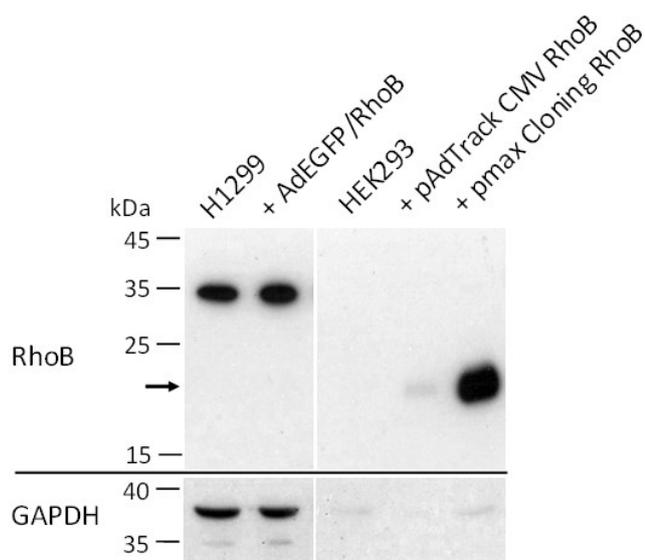


Abbildung 28: Transduktion von H1299 Zellen mit AdEGFP/RhoB Adenoviren. 24 h nach Transduktion mit 1 μ l AdEGFP/RhoB erfolgte die Proteinisolierung; 30 μ g Gesamtprotein wurden in der SDS-PAGE (12 % Trenngel) aufgetrennt und im Western Blot auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Immunodetektion wurde mit in der Abbildung angegebenen Antikörpern durchgeführt. Als Kontrolle für die erfolgreiche RhoB Expression wurden 30 μ g Gesamtprotein der für den Western Blot in **Abbildung 19** gewonnen Proteinisolate aufgetragen. Die erwartete Größe des RhoB Proteins ist mit \rightarrow markiert.

Um zu gewährleisten, dass die Sequenz der RhoB-DNA vollständig und ohne Mutationen war, wurde die Sequenzierung des RhoB-Gens durchgeführt. Dafür wurde zuvor durch Phenol-Chloroform-Extraktion die Virus-DNA aus 300 μ l High Titer isoliert und im Anschluss daran zwei Teilstücke des Gens in der PCR (Primerkombinationen F und G) amplifiziert und im Agarosegel aufgetrennt. Die Aufreinigung der PCR-Fragmente erfolgte mit dem QIAEX II Kit; die anschließende Überprüfung im Agarosegel ist in Abbildung 29 dargestellt.

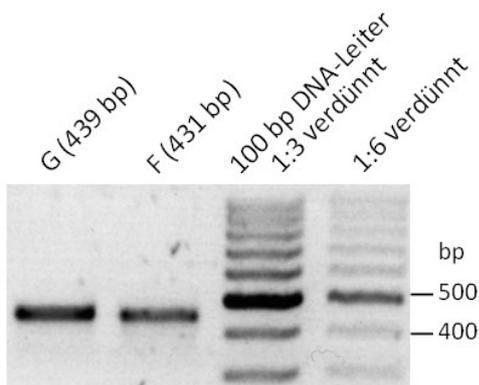


Abbildung 29: Auftrennung der aufgereinigten Fragmente G und F im 1 % Agarosegel zur Mengenabschätzung für die Sequenzierung. Zusammen mit den aufgereinigten Fragmenten werden Verdünnungen der 100 bp DNA-Leiter mit definierter DNA-Konzentration aufgetragen. Dabei hat das 500 bp Fragment der 1:3 Verdünnung eine Konzentration von ≈ 40 ng DNA pro μ l und das der 1:6 Verdünnung eine Konzentration von ≈ 30 ng DNA pro μ l.

Die beiden Fragmente wurden dann in die Sequenzierungsreaktion mit je einem Primer eingesetzt. Eine Übersicht der nach den Reaktionen erhaltenen DNA-Sequenzen der RhoB-DNA ist in Abbildung 30 dargestellt. Es konnten nach der Sequenzierung keine Veränderungen in der RhoB-DNA-Sequenz nachgewiesen werden. Eine Veränderung der Sequenz als Ursache für die fehlende RhoB-Expression nach Transduktion konnte damit ausgeschlossen werden.

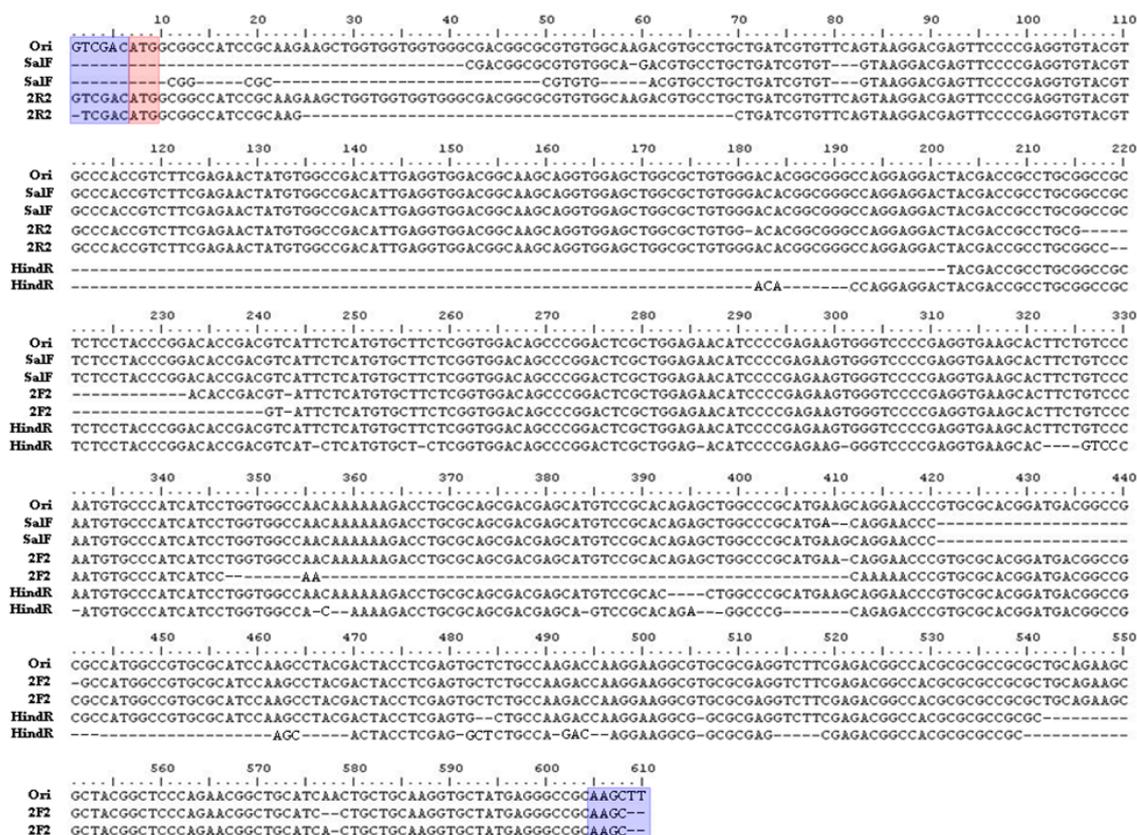


Abbildung 30: Übersicht der DNA-Sequenzen der RhoB-Fragmente mit den angegebenen Primern. Die Sequenzierung erfolgte mit dem Primer SalF oder 2R2 für das Fragment F oder mit dem Primer 2F2 oder HindR für das Fragment G. Blau markiert sind die Restriktionsschnittstellen Sall zu Beginn sowie HindIII am Ende der Sequenz und rot markiert ist das Start-Codon.

3.4 Transduktion von Chondrozyten mit AdEGFP

Vorversuche in der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass Chondrozyten auf eine Infektion mit rekombinanten GFP Adenoviren 5 mit einer veränderten Matrixproduktion reagieren. Die Transduktion der primären Chondrozyten erfolgte direkt nach der Isolierung aus dem Knorpel. Chondrozyten wurden aus Knorpelmaterial von insgesamt 12 Spendern isoliert. Nach der Transduktion mit dem 10- bzw. 50-fachen an rekombinantem Adenovirus (MOI 10 bzw. 50) wurden 90 % der Zellen in Alginat zur 3D-Kultur eingebettet und 10 % im Monolayer zur Expansion und Überprüfung der GFP-Expression kultiviert. Nach zwei Passagen im Monolayer erfolgte die Einbettung der expandierten Chondrozyten ebenfalls in Alginat zur 3D-Kultur. Der Ablauf der Transduktionsexperimente mit den anschließenden Analyse-Verfahren ist in Abbildung 31 dargestellt.

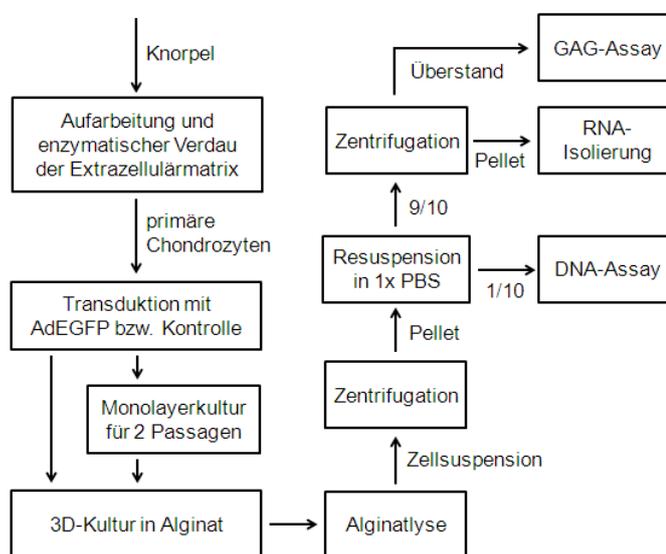


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Arbeitsabläufe der Transduktion

3.4.1 Nachverfolgung der Transgen-Expression

In Abbildung 32 ist das Fluoreszenzsignal der GFP-Expression von transduzierten Chondrozyten dargestellt. Sowohl während der Monolayerkultur (A) als auch am Ende der 3D-Kultur in Alginate (B) konnte eine MOI-abhängige GFP-Expression festgestellt werden.

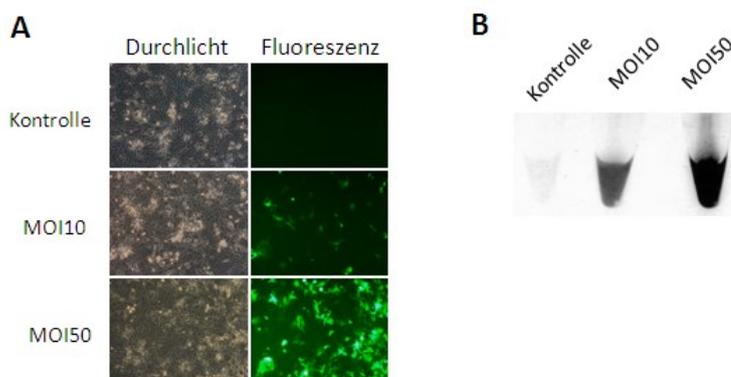


Abbildung 32: Nachweis der GFP-Expression von Chondrozyten. **A** repräsentative Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen (Originalvergrößerung 200x) einer Chondrozytenkultur im Monolayer 12 Tage nach Transduktion. **B** repräsentatives Fluoreszenzsignal der Chondrozytensuspension isoliert aus der Alginatematrix nach 4-wöchiger 3D-Kultur und vorheriger 6-wöchiger Expansion im Monolayer.

3.4.2 Matrixproduktion nach 3D-Kultur

Wie in Abbildung 33 dargestellt, führte die 3D-Kultur von transduzierten Chondrozyten, isoliert aus gesundem Knorpel oder Knorpel mit mildem Osteoarthrose-Score, zu einer nicht-signifikanten Zunahme der Matrixproduktion. Gemessen wurde ein Anstieg der Matrixproduktion bei MOI 10 transduzierten Chondrozyten um 34,0 %, bei MOI 50 um 92,6 %. Im Unterschied dazu kam es zu einer signifikanten Zunahme der Matrixproduktion, wenn die MOI 50 transduzierten Chondrozyten vor der Alginatekultur im Monolayer expandiert wurden. Gemessen wurde ein Anstieg um 286,9 % ($p=0,0019$) im Vergleich zur Kontrolle. Die der Alginatekultur vorangehende Expansion im Monolayer führte unter MOI 50 zu einer signifikanten Zunahme der Matrixproduktion ($p=0,0034$).

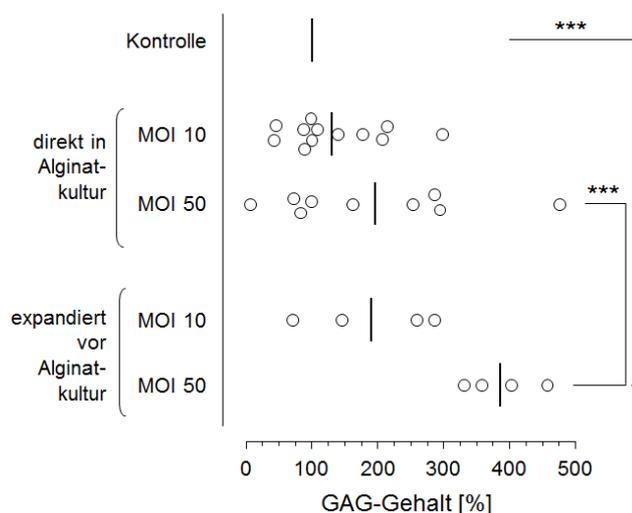


Abbildung 33: Nachweis der Matrixproduktion nach 28 Tagen 3D-Kultur von transduzierten Chondrozyten in Abhängigkeit vom Differenzierungszustand. Dargestellt ist der auf den DNA-Gehalt normalisierte GAG-Gehalt, wobei die Kontrolle auf 100 % gesetzt wurde. GAG- und DNA-Assays wurden in Triplikaten durchgeführt und die Mediane bestimmt. Jedes Symbol repräsentiert den Mittelwert der Ergebnisse von zwei Transduktionsexperimenten und pro Gruppe ist der Mittelwert (vertikale Linie) dargestellt. Für die statistische Auswertung von Unterschieden zwischen transduzierten und nicht-transduzierten Chondrozyten wurde der one-sample t-Test verwendet. Der paired t-Test wurde für den Vergleich zwischen den verschiedenen Transduktionsexperimenten verwendet. *** $p \leq 0,005$

Während der Monolayerkultur in der Expansion kam es auch zur Veränderung des Phentyps, vom nicht-adhärenenten hin zu einem adhärenenten, fibroblasten-ähnlichen mit spindelförmigen Zellen. Nach der zweiten Passage wurden die Chondrozyten gezählt und in Alginate zur 3D-Kultur eingebettet. Dabei zeigte sich, dass die Transduktion zu einer geringeren Zellzahl während der Monolayerkultur führte (Abbildung 34). Von den $6 \cdot 10^5$ ausgesäten Zellen zu Beginn der Monolayerkultur wurden bei den MOI 10 oder MOI 50 transduzierten Chondrozyten nur 73 % ($4,4 \cdot 10^5$ Zellen) bzw. 60 % ($3,6 \cdot 10^5$ Zellen) der Zellen am Ende der zweiten Passage gezählt. Wohingegen die Monolayerkultur der nicht-transduzierten Chondrozyten zu einer Expansion auf 126 % ($7,5 \cdot 10^5$ Zellen) führte. Allerdings erreichten keine der Veränderungen statistische Signifikanz.

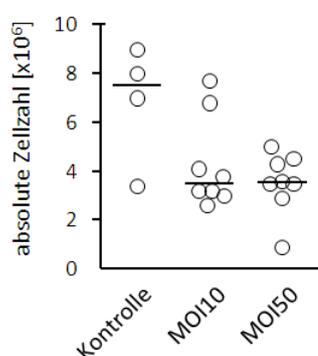


Abbildung 34: Zellzahl von transduzierten Chondrozyten nach zwei Passagen in Monolayerkultur zur Expansion. Jedes Symbol repräsentiert den Mittelwert von zwei Transduktionsversuchen und pro Gruppe ist der Median (waagerechte Linie) dargestellt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Mann Whitney Test.

3.4.3 Genexpressionsveränderungen nach 3D-Kultur

Die zuvor beobachtete Zunahme der Matrixproduktion von transduzierten, expandierten und in Alginat kultivierten Chondrozyten sollte hinsichtlich Veränderungen auf mRNA-Ebene in der quantitativen Realtime-PCR untersucht werden. Dafür wurde die Expression solcher Gene untersucht die am Knorpelmetabolismus beteiligt sind. Es handelte es sich um die Gene für Kollagen Typ 2 (COL2A1) und Aggrecan (ACAN) als Hauptkomponenten der Knorpelmatrix, um die Gene für MMP3, MMP13 und ADAMTS5 als proteolytische Enzyme, verantwortlich für den Matrixabbau, und um die Gene für TIMP1 und TIMP3 welche Inhibitoren von MMPs bzw. ADAMTS' sind.

In Abbildung 35 sind die Veränderung auf mRNA-Ebene nach Transduktion mit AdEGFP, Expansion im Monolayer und 3D-Kultur in Alginat dargestellt. Durch die Transduktion der Chondrozyten mit MOI 10 oder MOI 50 kam es zu einem 8,7-fachen bzw. 24,3-fachen Anstieg der mRNA-Expression von Kollagen Typ 2 verglichen mit nicht-transduzierten Kontrollen (Abbildung 35A). Ebenso kam es zu einem 2,8-fachen Anstieg der Aggrecan mRNA-Expression bei MOI 50 transduzierten Chondrozyten (Abbildung 35B). Ausgehend von diesen Daten ist von einer direkten Korrelation zwischen MOI und der erhöhten anabolen Aktivität nach Transduktion, Expansion und 3D-Kultur auszugehen.

Während die Aggrecanase ADAMTS5 und ihr Antagonist TIMP3 in der mRNA-Expression unverändert bleiben, zeigt sich bei der Kollagenase MMP13 und deren Antagonist TIMP1 eine verminderte mRNA-Expression. Die Transduktion mit MOI 10 oder MOI 50 führte zur signifikanten Reduktion der MMP13 mRNA-Expression auf 30,3 % ($p=0,0055$) bzw. 17,9 % ($p=0,0084$). Ebenso konnte eine signifikante Reduktion der TIMP1 mRNA-Expression auf 47,6 % ($p=0,0009$) und 34,5 % ($p=0,017$) nach MOI 10 bzw. MOI50 Transduktion der Chondrozyten beobachtet werden. Gleichzeitig veränderte sich das Verhältniss zwischen TIMP1 und MMP13. Durch die Transduktion mit MOI 10 oder MOI 50 stieg dieses Verhältnis zu Gunsten von TIMP1 um das 2,1- bzw. 1,8-fache, verglichen mit nicht-transduzierten Kontrollen.

Zusammenfassend lässt sich die erhöhte Matrixproduktion der transduzierten Chondrozyten zum einen als Folge einer erhöhten Kollagen Typ 2 Expression und zum anderen als Folge der verringerten proteolytischen Aktivität durch Kollagenasen als Resultat des in Richtung des Antagonisten (TIMP1) verschobenen Verhältnisses erklären.

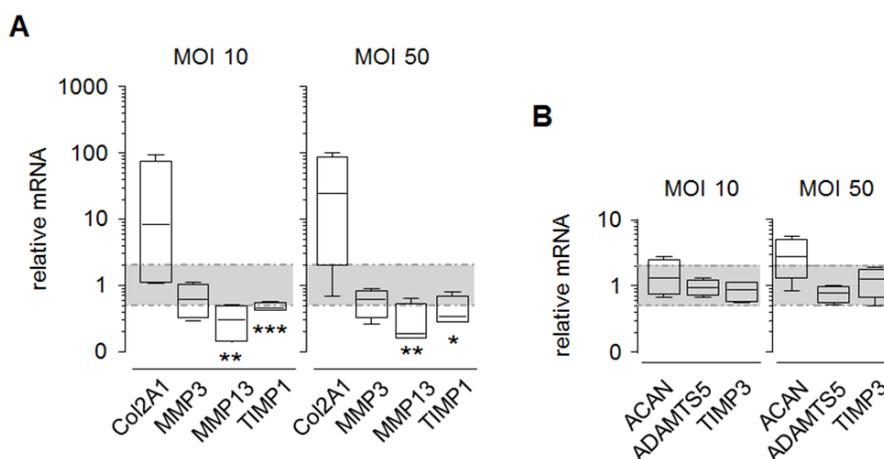


Abbildung 35: Genexpression nach 3D-Kultur von zuvor mit rekombinantem Adenovirus transduzierten und expandierten Chondrozyten in der Realtime PCR. Die Genexpression von den Genen (A) Kollagen Typ 2 (COL2A1), MMP3, MMP13 und TIMP1, und (B) Aggrekan (ACAN), ADAMTS5 und TIMP3 wurde mit der quantitativen Real-time PCR gemessen. Die Genexpression ist als Veränderung der mRNA-Expression nach Adenovirusinfektion im Vergleich zur Kontrolle mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet. Dargestellt ist die relative Genexpression, normalisiert auf das Gen GAPDH. Jede Probe (n=4) wurde in Triplikaten gemessen und der Median berechnet. Die Ergebnisse der Genexpressionsmessungen wurden mit dem Boxplot (10-90 %) und dem Median (waagerechte Linie) dargestellt. Ein Anstieg oder eine Verringerung der RNA-Expression um weniger als das 2-fache wurde als Hintergrundschwankung bewertet. Die Berechnung der statistischen Veränderungen in der RNA Expression erfolgte mit dem one-sample t-Test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$

3.5 Neutralisationstests

Um die mögliche Beteiligung einer Adenovirusinfektion an der Pathogenese der Osteoarthritis zu untersuchen, wurden die Seren von an Osteoarthritis (OA) oder Rheumatoide Arthritis (RA) erkrankten Patienten im Neutralisationstest verglichen. Pro Gruppe wurden 30 Seren untersucht, welche in Alter und Geschlecht vergleichbar waren. Die Seren der an RA erkrankten Patienten wurden als Kontrollgruppe gewählt, da bei diesen das Vorhandensein einer Osteoarthritis ausgeschlossen werden konnte. Bei den Neutralisationstests wurde auf das Vorhandensein von Antikörper gegen Adenoviren der B-Spezies getestet. Es wurden die drei häufigsten (Adenoviren 11, 34 und 35) und die drei seltensten (Adenoviren 3, 16 und 21) Vertreter der B-Spezies untersucht.

Zwischen den Seren von OA- und RA-Patienten konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Antikörpertiter für häufige (Abbildung 36A) oder seltene (Abbildung 36B) Adenoviren der B-Spezies festgestellt werden. Somit ist von einem vergleichbar häufigen Kontakt der beiden Patientengruppen mit diesen Adenoviren auszugehen. Die höchsten Antikörpertiter konnten in beiden Gruppen für die seltenen Adenoviren der B-Spezies nachgewiesen werden. Die niedrigsten Antikörpertiter konnten, sowohl bei den OA- als auch bei den RA-Patienten, für die Adenoviren Typ 34 gemessen werden. Bei 27 von 30 der OA- bzw. 23 von 30 der RA-Patienten konnten keine Antikörper gegen diesen Typ nachgewiesen werden.

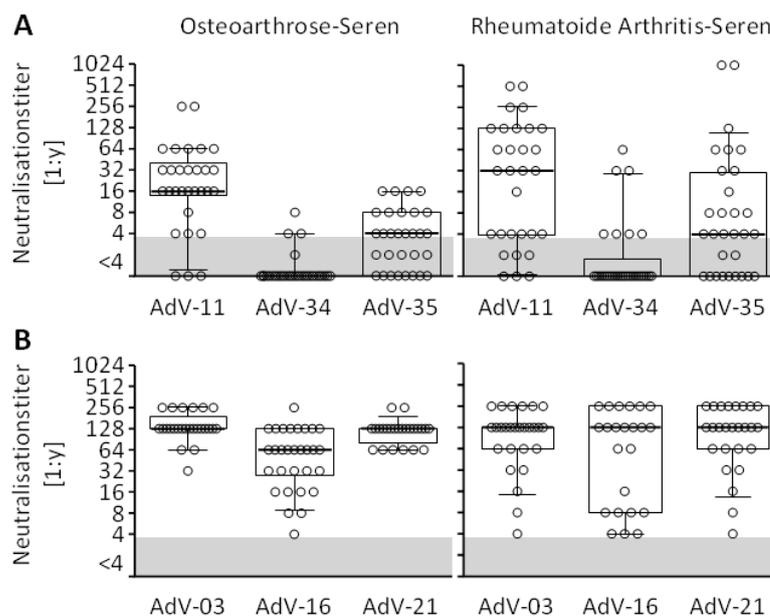


Abbildung 36: Bestimmung der Neutralisationstiter von häufig und selten auftretenden Adenoviren der B-Spezies. 30 Seren wurden im Neutralisationstest hinsichtlich ihres Antikörpertiters gegen **A** die drei häufigsten und **B** gegen die drei seltensten Vertreter der B-Spezies getestet. Ab einem Neutralisationstiter von 1:4 konnte von einem Kontakt mit dem entsprechenden Adenovirus, welcher zu einer Antikörperreaktion geführt hat, ausgegangen werden. Jedes Symbol repräsentiert ein Serum, für jeden untersuchten Serotyp ist der Median mit dem Boxplot (10-90 %) dargestellt.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das mit der Osteoarthritis assoziierte Gen RhoB in primären Chondrozyten durch Transfektion oder adenovirale Transduktion zu überexprimieren und anschließend die Auswirkungen auf Zelltod, Apoptose und Transgenexpression zu erfassen. In diesem Zusammenhang erfolgte auch die genauere Untersuchung der transgenen Chondrozyten auf deren Fähigkeit zur Matrixproduktion, sowohl auf Proteinebene im GAG-Assay als auch auf mRNA-Ebene in der Realtime RT-PCR.

4.1 *Gentransfer durch Transfektion mit RhoB-Plasmiden*

Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe zeigten bereits, dass die Überexpression des RhoB-Proteins in einer Chondrosarcoma-Zelllinie zu einer vermehrten Apoptose der Zellen führte [Mahr 2005]. Im Gegensatz dazu bestand das Augenmerk der vorliegenden Arbeit im Effekt der RhoB-Überexpression in primären Chondrozyten.

Für die Transfektion dieser Zellen kam das AMAXA Chondrocyte Nucleofector Kit der Firma Lonza (vormals AMAXA) zum Einsatz. Den Ausschlag für die Wahl dieser Methode gaben die Forschungsergebnisse der Arbeitsgruppe um Haaq. In deren Versuchen wurde eine Transfektionseffizienz von über 70 % (GFP) und einen 95 %igen Knock-down der GAPDH-DNA [Haaq 2008] erreicht.

Das für die Transfektion der primären Chondrozyten benötigte Plasmid pmaxCloning RhoB konnte erfolgreich durch Umklonierung aus dem Plasmid pAdTrackCMV RhoB hergestellt werden. Nachdem die Validierung des hergestellten Plasmids pmaxCloning RhoB in HEK293 Zellen erfolgreich verlaufen war, sollten in einem nächsten Schritt primäre Chondrozyten mit diesem Plasmid transfiziert werden. Dafür wurde die Transfektion unter anderem mit einem Kontrollplasmid auf Wirksamkeit und Effizienz im experimentellen Rahmen geprüft. Jedoch zeigte sich, auch bei Verwendung verschiedener Transfektionsparameter, dass diese Methode zu keiner ausreichend hohen Transfektionseffizienz (≥ 50 % der eingesetzten Zellen) führte. Somit wurden weitere Versuche eingestellt.

4.2 *Gentransfer durch Transduktion mit AdEGFP/RhoB*

Verschiedene andere Forschungsgruppen beschrieben einen erfolgreichen Gentransfer in Chondrozyten bei Verwendung von adenoviralen Vektoren [Dinser 2001, Hidaka 2001, Li 2004, Oberholzer 2007, Santangelo 2010]. Zur Überexpression des Proteins RhoB in primären Chondrozyten sollte nun ein adenoviraler Vektor verwendet werden. Nach der Herstellung des Adenovirus AdEGFP/RhoB wurden H1299 Zellen zur Validierung des Adenovirus transduziert. Dabei konnte im Fluoreszenzmikroskop die Expression des GFP-

Proteins nachgewiesen werden, jedoch war auf Proteinebene keine Expression des Transgens festzustellen.

Die Ursachen der fehlenden Proteinexpression können sowohl im RhoB-Insert selbst als auch auf Transkriptions- oder Translationsebene zu finden sein:

Auf Genebene sind sowohl das Fehlen des kompletten Inserts als auch Mutationen in der Gensequenz vorstellbar. Um das Fehlen des RhoB-Inserts im Adenovirusgenom auszuschließen, wurde während der Herstellung des adenoviralen Vektors überprüft, ob das typische Bandenmuster des homolog rekombinierten Vektors nach Spaltung mit einem Restriktionsenzym vorlag. Bei dem zur Produktion der Adenoviren in den HEK 293 Zellen verwendeten Vektor verlief der Nachweis positiv. Durch die Sequenzierung des RhoB-Inserts im Adenovirusgenom konnte das vollständige Gen nachgewiesen werden; Mutationen in der Gensequenz oder an den Restriktionsschnittstellen in unmittelbarer Nähe zum Stop-Codon waren nicht vorhanden.

Zur Transkription, sowohl des Kontrollgens GFP als auch des zu untersuchenden Gens RhoB, muss die DNA-abhängige RNA-Polymerase an den Promotor binden. In beiden Fällen handelte es sich um den CMV-Promotor. Die Transkription des Kontrollgens GFP verlief in den Zellen erfolgreich und sie produzierten das fluoreszierende GFP-Protein. Die Proteinexpression des zu untersuchenden Gens RhoB war jedoch nicht nachweisbar. Die fehlende Proteinexpression kann Folge von Veränderungen am CMV-Promotor der RhoB-beinhaltenen Kassette, von Inaktivierung des CMV-Promotors durch DNA-Methylasen bzw. Histon Deacetylasen [Choi 2005, Brooks 2004] oder von fehlender Aktivierung des Promotors durch NFκB [Löser 1998] sein. Diese Vorgänge am Promotor führen zu einer aktiven Abschaltung des Gens (Gen-Stillegung) und verhindern die Transkription dessen. Das Auftreten solcher Veränderungen ist vorstellbar, da in verschiedenen Arbeiten ein Zusammenhang zwischen der RhoB-Proteinexpression und einer Apoptoseinduktion beschrieben wurde [Liu 2001, Mahr 2005].

Nach Transkription der mRNA erfolgt die Translation. Für die erfolgreiche Initiation der Translation ist eine bestimmte Nukleinbasenfolge in unmittelbarer Nähe des Start-Codons der mRNA, die sogenannte Kozak-Sequenz, von entscheidender Bedeutung [Kozak 1987]. So muss sich vor dem ATG in dritter Position entweder die Base A oder G und direkt nach dem ATG die Base G befinden. Eine andersartige Reihenfolge könnte eine Ursache der fehlenden Proteinexpression sein. Die zwingend benötigte Kozak-Sequenz ist aber im RhoB-Insert nachzuweisen und damit kann ein Fehler in der Initiation der Translation als Erklärung für eine mangelnde Proteinexpression ausgeschlossen werden.

Sollte die Stillegung der RhoB-beinhaltenen Expressionkassette die Folge einer Schutzreaktion der HEK 293 Zellen bei der Adenovirusherstellung sein, besteht die Möglichkeit, das RhoB-Gen mit einem induzierbaren Promotor zu koppeln. Dadurch könnte erreicht werden, dass die RhoB-Expression erst bei den Zielzellen einsetzen würde. Die Arbeits-

gruppe um Couderc zeigte, dass sich ein funktionaler rekombinanter RhoB-exprimierender Adenovirus herstellen lässt. Diese Gruppe verwendete einen Cumate-induzierbaren Promotor (CMV5(CuO)) [Couderc 2008] und transfizierte das homologe-kombinierte RhoB-Plasmids in HEK 293 cymR Zellen. Diese Zelllinie wurde benötigt, um die Aktivierung des Promotors durch Repression des Cumate Operators (CuO) zu verhindern. Somit war es dieser Gruppe gelungen rekombinante Adenoviren herzustellen, die erst in den Zielzellen das RhoB-Gen exprimieren.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die fehlende RhoB-Proteinexpression wahrscheinlich auf Veränderungen am CMV-Promotor zurückzuführen ist. Für die Herstellung eines adenoviralen Vektors mit dem RhoB-Gen ist die Verwendung eines induzierbaren Promotors zu empfehlen.

4.3 Knorpel-spezifische Matrixproduktion von Chondrozyten nach Transduktion mit AdEGFP

Zu den modernen Behandlungsmethoden von Knorpeldefekten zählt die autologe Chondrozyten Transplantation (ACT). Die bei dieser Operation transplantierten Chondrozyten bilden neuen Knorpel ähnlich dem des Gelenks; der neugebildete Knorpel verfügt jedoch nicht über die wichtigste Eigenschaft des Gelenkknorpels, die Elastizität [Madry 2007]. Unter der Zielsetzung zu transplantierte Chondrozyten so zu verändern, dass sie eine dem Gelenkknorpel möglichst ähnliche Matrix bilden, wurden bereits in verschiedenen Arbeitsgruppen Untersuchungen durchgeführt [Dinser 2001, Hidaka 2001, Li 2004, Oberholzer 2007, Santangelo 2010]. Selbige nutzten dabei adenovirale Vektoren für die Proteinüberexpression. Bisher liegen nur wenige Forschungsergebnisse zum primären Effekt einer adenoviralen Transduktion auf die Matrixproduktion der primäre Chondrozyten vor. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Chondrozyten das Transgen GFP bis zu 13 Wochen exprimieren. Diese Expressionsdauer war doppelt so lang, wie die von anderen Gruppen beobachtete [Dinser 2001] und konnte durch sehr niedrige MOIs [10 bzw. 50] erreicht werden. Die Transgenexpression anderer Gruppen war nur durch den Einsatz vergleichsweise hoher MOIs von 100 bis 3000 [Gelse 2001, Oberholzer 2007, Dinser 2001, Li 2004] erfolgreich.

Jedoch führt die Transduktion der primären Chondrozyten mit dem Adenovirus AdEGFP zu einer nichtsignifikant geringeren Zellausbeute in der Expansionsphase im Vergleich zu Kontrollen. Die Ursache kann in einer verringerten Proliferationsrate oder in einer Zunahme des Zelltods nach Transduktion liegen.

In der vorliegenden Arbeit wurden enzymatisch isolierte artikuläre Chondrozyten transduziert, im Monolayer expandiert und in Alginat in 3D kultiviert. Unabhängig davon, ob die Chondrozyten aus gesundem Knorpel oder aus solchem mit niedrigem Osteoarthrose-Score isoliert wurden, führte diese Prozedur neben erhöhten mRNA-Leveln der anabolen Gene (Kollagen Typ 2, Aggrecan) auch zu einer vermehrten Proteoglycan Produktion. Diese Veränderungen könnten als Folge der GFP-Gen oder GFP-Proteinexpression aufgetreten sein. Die Arbeitsgruppe um Müller zeigte bereits 2008, dass die Transduktion von humanen artikulären Chondrozyten mit einem leeren Ad5 Vektor (MOI 5000) nicht nur zu leicht erhöhten mRNA-Leveln von Kollagen Typ 2 und Aggrecan binnen 24 Stunden führte, sondern auch zu einer erhöhten Kollagen Typ 2 Proteinexpression nach zweiwöchiger Alginatkultur [Müller 2008a, Müller 2008b]. Die Arbeitsgruppe führte die erhöhten mRNA- und Proteinlevel auf einen stabilisierten differenzierten Phentyp der Chondrozyten zurück. Mit der in dieser Arbeit durchgeführten Kombination aus Transduktion, Expansion im Monolayer und 3D-Kultur in Alginat konnte jedoch eine signifikant erhöhte Proteoglycanproduktion beobachtet werden. Dafür kann eine Stabilisierung des Phentyps sicher eine der Ursachen sein, jedoch nicht die signifikante Veränderungen erklären. Eine andere mögliche Erklärung zur vermehrten Matrixproduktion kann durch eine adenovirusbedingte Produktion von Zytokinen durch die transduzierten Chondrozyten und eine dadurch parakrin stimulierte Matrixproduktion verursacht werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass die Genexpression für das katabole MMP-13 und das protektive TIMP-1 signifikant reduziert ist. Ein Gleichgewicht zwischen den MMPs, ADAMTS' und deren antagonistischen TIMPs ist für die Knorpel-Homeostase von Bedeutung [Lee 2003]. Mit der Kombination von Transduktion, Expansion und 3D Kultur konnte eine Verschiebung des Verhältnisses zwischen MMP-13 und TIMP-1 in Richtung von TIMP-1 erreicht werden. Dies kann sich protektiv auf die Chondrozyten und den Knorpel auswirken und dem Knorpelabbau entgegenwirken.

Die erhöhte Proteoglycanproduktion von transduzierten Chondrozyten nach Expansion und 3D Kultur könnte eine Folge der durch die Expansion verlängerten Kulturdauer sein. Jedoch zeigten Untersuchungen während der zusätzlichen Zeit der Expansion im Monolayer dass die Chondrozyten einen fibroblastenähnlichen Phentyp aufwiesen. Solche Veränderungen des Phentyps führen zu einer verminderten Expression der chondrozytenspezifischen Proteine Kollagen Typ 2 und Aggrecan und zu einer vermehrten Expression von Fibroblasten-spezifischen Proteinen, Kollagen Typ 1 und Tenascin [Huch 2002,

Cheng 2011]. Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Matrixproduktion keine Folge der zusätzlichen Expansion im Monolayer ist.

Der beschriebene positive Effekt auf die Chondrozyten, vermutlich hervorgerufen durch die Kombination aus Transduktion, Expansion und 3D Kultur, könnte auch durch die Redifferenzierung der Chondrozyten während der 3D Kultur in Alginat [Bonaventure 1994, Häuselmann 1994] erklärt werden. Die Kultur von dedifferenzierten Chondrozyten in 3D Strukturen (Agarosehydrogele, Alginat oder Kollagen) stimuliert nicht nur die Redifferenzierung [Barlic 2008, Takahasi 2007] sondern auch die Matrixproduktion, die vermehrte Expression Chondrozyten-spezifischer Gene und die Zellproliferation [Lin 2008]. Es konnte gezeigt werden, dass die transduzierten Chondrozyten nach der Monolayerkultur für zwei Passagen und anschließender 3D Kultur in Alginat über eine vermehrte anabole und eine reduzierte katabole Aktivität verfügten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombination aus adenoviraler Transduktion, Expansion im Monolayer und anschließender 3D Kultur in Alginat eine Erhöhung der Effizienz autologen Chondrozyten Transplantation durch Bereitstellung einer wesentlich produktiven Zellpopulation. Somit kann nicht nur ein potentielles Transgen über eine lange Zeit exprimiert werden, sondern die Kombination führt auch zu chondroprotektive Effekten, wie gesteigerter Expression anaboler Gene und vermehrter Matrixproduktion.

4.4 Neutralisationstests

In der Gentherapie werden Gentransfers mit rekombinierten Adenoviren vor allem der Serotypen 2 und 5 durchgeführt. Verschiedene Sicherheitsmaßnahmen (Replikationsdefizienz und Deletion der Bereiche E1 und E3) wurden bei der Herstellung solcher adenoviraler Vektoren ergriffen. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse wurden bei der Transduktion von Chondrozyten mit einem rekombinanten Adenovirus basierend auf dem Serotyp 5 gewonnen. Vorversuche in Kooperation mit Prof. Dr. Heim (MHH Hannover) konnten zeigen, dass die Infektion von Chondrozyten auch mit anderen Serotypen erfolgreich ist. Die höchste Effizienz konnte bei Infektion mit Adenoviren der B-Spezies nachgewiesen werden.

Für den Erfolg einer adenoviraler Gentherapie ist keine oder nur eine geringe Immunantwort des Patienten eine entscheidende Voraussetzung. Die bislang am häufigsten verwendeten adenoviralen Vektoren basieren auf den Serotypen 2 und 5. Diese zählen nicht nur zu den häufigsten Adenoviren, sondern ein Großteil der Bevölkerung hatte schon

einmal Kontakt mit diesen Serotypen. Dabei kommt es unter anderem zur Produktion von Antikörpern gegen diese. Wird bei diesen Personen eine adenovirale Gentherapie durchgeführt, kann es nun zu einer Immunreaktion zwischen den vorhandenen Antikörpern und den adenoviralen Vektoren kommen. Dies kann eine Unwirksamkeit der Gentherapie zur Folge haben, bis hin zu unerwarteten Nebenwirkungen. In den durchgeführten Neutralisationstests erwies sich der Adenovirustyp 34 am geeignetsten; bei nur drei von 30 Osteoarthrose-Patienten konnten Antikörper mit sehr geringem Titer nachgewiesen werden. Würde dieser Serotype für eine adenovirale Gentherapie in Betrachtung gezogen werden, kann auf Grund des nicht vorhandenen oder nur sehr niedrigen Antikörpertiters eine deutliche Sicherheit bei der Gentherapie bewirkt werden. In weiteren Versuchen wären neben dem Einsatz dieses Serotyps für den Gentransfer in Chondrozyten als auch ein Einfluss auf die Matrixproduktion der transduzierten Chondrozyten nach kombinierter Kultur im Monolayer und in Alginat zu überprüfen.

5. Zusammenfassung

Eine aktuelle Therapie zur Verbesserung der Gelenkbiologie bei der Osteoarthrose stellt die autologe Chondrozytentransplantation (ACT) dar. Dabei werden dem Patienten Knorpelproben aus einem gesunden Areal des Gelenkknorpels entnommen, die Chondrozyten enzymatisch isoliert, anschließend *in vitro* vermehrt und in einer weiteren Operation in die Knorpeldefekte implantiert. Die transplantierten Chondrozyten bilden neuen Knorpel ähnlich dem des Gelenks welcher jedoch nicht über die wichtigste Eigenschaft des Gelenkknorpels, die Elastizität, verfügt [Madry 2007].

Verschiedene Arbeitsgruppen haben Untersuchungen mit der Zielsetzung zu transplantierende Chondrozyten so zu verändern, dass sie eine dem Gelenkknorpel möglichst ähnliche Matrix bilden, durchgeführt [Dinser 2001, Hidaka 2001, Li 2004, Oberholzer 2007, Santangelo 2010]. Selbige nutzten dabei adenovirale Vektoren für die Proteinüberexpression. Bisher liegen nur wenige Forschungsergebnisse zum primären Effekt einer adenoviralen Transduktion auf die Matrixproduktion der primären Chondrozyten vor. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Chondrozyten das Transgen GFP bis zu 13 Wochen exprimieren, doppelt solange, wie die von anderen Gruppen beobachtete [Dinser 2001]. Zudem konnte die lange Transgenexpression mit sehr niedrigen MOIs [10 bzw. 50] erreicht werden, im Gegensatz zu den vergleichsweise hohen MOIs von 100 bis 3000 [Gelse 2001, Oberholzer 2007, Dinser 2001, Li 2004] anderer Arbeitsgruppen.

In der vorliegenden Arbeit wurden enzymatisch isolierte artikuläre Chondrozyten transduziert, im Monolayer expandiert und in Alginat in 3D kultiviert. Unabhängig davon, ob die Chondrozyten aus gesundem Knorpel oder aus solchem mit niedrigem Osteoarthrose-Score isoliert wurden, führte diese Prozedur neben erhöhten mRNA-Leveln der anabolen Gene (Kollagen Typ 2, Aggrecan) auch zu einer vermehrten Proteoglycan Produktion.

In der vorliegenden Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass die Genexpression für das katabole MMP-13 und das protektive TIMP-1 signifikant reduziert ist. Ein Gleichgewicht zwischen den MMPs, ADAMTS' und deren antagonistischen TIMPs ist für die Knorpel-Homeostase von Bedeutung [Lee 2003]. Mit der Kombination von Transduktion, Expansion und 3D Kultur konnte eine Verschiebung des Verhältnisses zwischen MMP-13 und TIMP-1 in Richtung von TIMP-1 erreicht werden. Dies kann sich protektiv auf die Chondrozyten und den Knorpel auswirken und dem Knorpelabbau entgegenwirken.

Es konnte gezeigt werden, dass die transduzierten Chondrozyten nach der Monolayerkultur für zwei Passagen und anschließender 3D Kultur in Alginate über eine vermehrte anabole und eine reduzierte katabole Aktivität verfügten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombination aus adenoviraler Transduktion, Expansion im Monolayer und anschließender 3D Kultur in Alginate eine Erhöhung der Effizienz der autologen Chondrozyten Transplantation durch Bereitstellung einer wesentlich produktiveren Zellpopulation darstellt. Somit kann nicht nur ein potentiell Transgen über eine lange Zeit exprimiert werden, sondern die Kombination führt auch zu chondroprotektive Effekten, wie gesteigerter Expression anaboler Gene und vermehrter Matrixproduktion.

Für den Erfolg einer adenoviraler Gentherapie ist keine oder nur eine geringe Immunantwort des Patienten eine entscheidende Voraussetzung. Bislang werden adenovirale Vektoren basierend auf den Serotypen 2 und 5 verwendet. Da diese nicht nur zu den häufigsten Adenoviren zählen und ein Großteil der Bevölkerung schon einmal Kontakt mit diesen Serotypen hatte, kommt es zu einer Antikörperproduktion gegen diese beim Patienten. Wird bei diesen Personen eine adenovirale Gentherapie durchgeführt, kann es nun zu einer Immunreaktion zwischen den vorhandenen Antikörpern und den adenoviralen Vektoren kommen. Dies kann eine Unwirksamkeit der Gentherapie zur Folge haben, bis hin zu unerwarteten Nebenwirkungen. In Kooperation mit Prof. Dr. Heim (MHH Hannover) wurde die Infektion von humanen Chondrozyten untersucht, wobei die Adenoviren der B-Spezies die höchste Effizienz zeigten. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob Vertreter der B-Spezies als geeignete Vektoren für die Gentherapie in Frage kommen. In den durchgeführten Neutralisationstests erwies sich der Adenovirustyp 34 am geeignetsten; bei nur drei von 30 Osteoarthrose-Patienten konnten Antikörper mit sehr geringem Titer nachgewiesen werden. Würde dieser Serotyp für eine adenovirale Gentherapie in Betrachtung gezogen werden, kann auf Grund des nicht vorhandenen oder nur sehr niedrigen Antikörpertiters die Sicherheit bei der Gentherapie deutlich verbessert werden.

In weiteren Versuchen wären sowohl der Einsatz dieses Serotyps für den Gentransfer als auch der Einfluss auf die Matrixproduktion der transduzierten Chondrozyten nach kombinierter Kultur im Monolayer und in Alginate zu untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

- Aigner T / Zien A / Gehrsitz A / Gebhard PM / McKenna L (2001) Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA-array technology. *Arthritis Rheum* 44:2777-2789
- Aigner T / Kurz B / Fukui N / Dandell L (2002) Roles of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 14:578-584
- Aigner T / Soeder S / Haag J (2006) IL-1 β and BMPs: Interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration. *European Cells and Materials* 12:49-56
- Albinsson B / Kidd AH (1999) Adenovirus type 41 lacks RGD α_v -integrin binding motif on the penton base and undergoes delayed uptake in A549 cells. *Virus Res* 64:125-136
- Arden E / Arden N / Hunter D: Osteoarthritis. Oxford · New York. Oxford University Press, 2008
- Arnberg N / Edlund K / Kidd AH / Wadell G (2000 a) Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor. *J Virol* 74:42-48
- Arnberg N / Kidd AH / Edlund K / Olfat F / Wadell G (2000 b) Initial interactions of subgenus D adenoviruses with A549 cellular receptors: sialic acid versus $\alpha(v)$ integrins. *J Virol* 74:7691-7963
- Arnberg N / Pring-Akerblom P / Wadell G (2002) Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor on Chang C cells. *J Virol* 76:8834-8841
- Aslan B / Serin MS / Aslan G / Kalaci A / Yanat AN / Tezcan S / Emekdas G (2008) Detection of parvovirus B19 in synovial fluids of patients with osteoarthritis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 60:381-385
- Ayad S / Boot-Handford R / Humphries M / Kadler K / Shuttleworth A: The Extracellular Matrix FactsBook. San Diego · London · Boston · New York · Sydney · Tokyo · Toronto. Academic Press, 2. Auflage 1998
- Bank RA / Soudry M / Maroudas A / Mizrahi J / TeKoppele JM (2000) The increased swelling and instantaneous deformation of osteoarthritic cartilage is highly correlated with collagen degradation. *Arthritis Rheum* 43:2202-2210
- Baragi VM / Fliszar CJ / Conroy MC / Ye Q-Z / Shipley JM / Welgus HG (1994) Contribution of the C-terminal domain of metalloproteinases to binding by tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Biol Chem* 269:12692-12697
- Barlic A / Drobnic M / Malicev E / Kregar-Vilekonja N (2008) Quantitative analysis of gene expression in human articular chondrocytes assigned for autologous implantation. *J Orthop Res* 26:847-853
- Benninghoff A / Drenckhahn D (Hrsg.) Anatomie: Band 1. München · Jena. Urban & Fischer, 16. Auflage 2003
- Bilbao G / Feng M / Rancourt C / Jackson WH / Curiel DT (1997) Adenoviral/retroviral vector chimeras. A novel strategy to achieve high-efficiency stable transduction in vivo. *FASEB J* 11:624-634

- Butler GS / Aptes SS / Willenbrock F / Murphy G (1999) Human tissue inhibitor of metalloproteinase 3 interacts with both the N- and C-terminal domains of gelatinases A and B. *J Biol Chem* 274:10846-10851
- Brittberg M / Lindahl A / Nilsson A / Ohlsson C / Isaksson O / Peterson L (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocytes transplantation. *N Engl J Med* 331:889-895
- Brooks AR / Harkins RN / Wang P / Qian HS / Liu P / Rubanyi GM (2004) Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med* 6:395-404
- Cheng T / Maddox NC / Wong AW / Rahnama R / Kuo AC (2011) Comparison of gene expression patterns in articular cartilage and dedifferentiated articular chondrocytes. *J Orthop Res*
- Chubinskaya S / Hakimiyan A / Pacione C / Yanke A / Rappoport L / Aigner T / Rueger DC / Loeser RF (2007) Synergistic effect of IGF-1 and OP-1 on matrix formation by normal and OA chondrocytes cultured in alginate beads. *Osteoarthr Cartilage* 15:421-430
- Choi KH / Basma H / Singh J / Cheng PW (2005) Activation of CMV promoter-controlled glycosyltransferase and β -galactosidase glycogenes by butyrate, trichostatin A, and 5-Aza-2'-deoxycytidine. *Glycoconj J* 22:63-69
- Couderc B / Pradines A / Rafii A / Golzio M / Deviers A / Allal C / Berg D / Penary M / Teissie J / Favre G (2008) In vivo restoration of RhoB expression leads to ovarian tumor regression. *Cancer Gene Ther* 15:456-464
- Cooper C / Snow S / McAlindon TE / Kellingray S / Stuart B / Coggon D / Dieppe PA (2000) Risk factors for the incidence and progression of radiographic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 43:995-1000
- Dharmapuri S / Peruzzi D / Aurisicchio L (2009) Engineered adenovirus serotypes for overcoming anti-vector immunity. *Expert Opin Biol Ther* 9
- Dinser R / Kreppel F / Zaucke F / Blank C / Paulsson M / Kochanek S / Maurer P (2001) Comparison of long-term transgene expression after non-viral and adenoviral gene transfer into primary articular chondrocytes. *Histochem Cell Biol* 116:69-77
- Durigova M / Troeberg L / Nagase H / Roughley PJ / Mort JS (2011) Involvement of ADAMTS5 and hyaluronidase in aggrecan degradation and release from OSM-stimulated cartilage. *European Cells and Materials* 21:31-45
- Doerr HW / Gerlich WH: *Medizinische Virologie. Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen.* Stuttgart · New York. Georg Thieme Verlag, 2. Auflage 2009
- Echtermeyer F / Bertrand J / Dreier R / Meinecke I / Neugebauer K / Fuerst M / Lee YJ / Song YW / Herzog C / Theilmeier G / Pap T (2009) Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis. *Nature Medicine* 15:1072-1076
- Engel ME / Datta PK / Moses HL (1998) RhoB is stabilized by transforming growth factor β and antagonizes transcriptional activation. *J Biol Chem* 273:9921-9926
- Ergelet C / Steinwachs M: *Gelenknorpeldefekte.* Darmstadt. Steinkopff Verlag Darmstadt, 2001

- Evans CH / Ghivizzani SC / Oligino TA / Robbins PD (2001) Future of adenoviruses in the gene therapy of arthritis. *Arthritis Res* 3:142-146
- Fan Z / Tardif G / Hum D / Duval N / Pelletier J-P / Martel-Pelletier J (2009) Hsp90 β and p130^{cas}. Novel regulatory factors of MMP-13 expression in human osteoarthritic chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 68:976-982
- Fleischli C / Sirena D / Lesage G / Havenga MJE / Cattaneo R / Greber UF / Hemmi S (2007) Species B adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 35 share similar binding sites on the membrane cofactor protein CD46 receptor. *J Gen Virol* 88:2925-2934
- Friedman AD / McKenna SO: Adenoviruses. In: Barton LL / Friedman NR / Friedman AD / Kenna SO: The neurological manifestations of pediatric infectious diseases and immunodeficiency syndromes. *Infectious disease*, Totowa New York: Humana Press, 2008, S. 127-133
- Fritz G / Kaina B / Aktories K (1995) The Ras-related small GTP-binding protein RhoB is immediate-early inducible by DNA damaging treatments. *J Biol Chem* 270:25172-25177
- Gampel A / Parker PJ / Mellor H (1999) Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase RhoB. *Current Biology* 9:955-958
- Gray H: *Anatomy of the human Body*, Philadelphia: Lea & Febiger, 1918; Bartleby.com, 2000. www.bartleby.com[107]
- Gao G / Plaas A / Thompson VP / Jin S / Zuo F / Sandy JD (2004) ADAMTS4 (aggrecanase-1) activation on the cell surface involves C-terminal cleavage by glycosylphosphatidyl inositol-anchored membrane type 4-matrix metalloproteinase and binding of the activated proteinase to chondroitin sulphate and heparin sulphate on syndecan-1. *J Biol Chem* 279:10042-10051
- Gebhard PM / Soder S / Bau B / Aigner T (2004) Down-regulation of the GTPase RhoB might be involved in the pre-apoptotic phenotype of osteoarthritic chondrocytes. *Front Biosci* 9:827-833
- Gelse K / Jiang Q-J / Aigner T / Ritter T / Wagner K / Pöschl E / von der Mark K / Schneider H (2001) Fibroblast-mediated delivery of growth factor complementary DNA into mouse joints induces chondrogenesis but avoids the disadvantages of direct viral gene transfer. *Arthritis Rheum* 44:1943-1953
- Glasgow JN / Everts M / Curiel DT (2006) Transductional targeting of adenovirus vectors for gene therapy. *Cancer Gene Ther* 13:830-844
- Gonçalves G / Gouveia E / Mesquita JR / Almeida A / Ribeiro A / Rocha-Pereira J / Nascimento MSJ (2010) Outbreak of acute gastroenteritis caused by adenovirus type 41 in a kindergarten. *Epidemiol Infect* page 1-4
- Hall BK: *Bone and Cartilage. Developmental and Evolutionary Skeletal Biology*. San Diego. Elsevier Academic Press, 2005
- Haq I / Murphy E / Dacre J (2003) Osteoarthritis. *Postgrad Med J* 79:377-383
- Haag J / Voigt R / Soeder S / Aigner T (2008) Efficient non-viral transfection of primary human adult chondrocytes in a high-throughput format. *Osteoarthr Cartilage* 17:813-817
- Heasman SJ / Ridley AJ (2008) Mammalian Rho GTPases. New insights into their functions from in vivo studies. *Nature* 690:690-701

- Heim A: Humane Adenoviren. In: Neumeister B / Geiss HK / Braun RW / Kimmig P: Mikrobiologische Diagnostik. Bakteriologie – Mykologie – Virologie – Parasitologie, Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag, 2. Auflage 2009, S. 785-793
- Hidaka C / Quitoriano M / Warren RF / Crystal RG (2001) Enhanced matrix synthesis and in vitro formation of cartilage-like tissue by genetically modified chondrocytes expression BMP-7. *J Orthop Res* 19:751-758
- Honorati MC / Bovara M / Cattini L / Piacentini A / Facchini A (2002) Contribution of interleukin 17 to human cartilage degeneration and synovial inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthr Cartilage* 10:799-807
- Huber M / Trattnig S / Lintner F (2000) Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. *Invest Radiol* 35:573-580
- Huch K / Stöve J / Puhl W / Günther KP (2002) Review and comparison of culture-techniques for articular chondrocytes. *Z Orthop* 140:145-152 (german)
- Hudelmaier M / Glaser C / Hohe J / Englmeier K-H / Reiser M / Putz R / Eckstein F (2001) Age-related changes in the morphology and deformational behavior of knee joint cartilage. *Arthritis Rheum* 44:2556-2561
- Hughes R / Carr A (2002) A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of glucosamine sulphate as an analgesic in osteoarthritis of the knee. *Rheumatology* 41:2539-2547
- Imhof H / Breitenseher M / Kainberger F / Trattnig S (1997) Degenerative joint disease. Cartilage of vascular disease? *Skeletal Radiol* 26:398-403
- Jaffe AB / Hall A (2005) Rho GTPases. *Biochemistry and biology. Annu Rev Cell Dev Biol* 21:247-269
- Jiang K / Sun J / Cheng J / Djeu JY / Wei S / Sebt S (2004) Akt mediates Ras downregulation of RhoB, a suppressor of transformation, invasion, and metastasis. *Mol Cell Biol* 24:5565-5576
- Julovi SM / Yasuda T / Shimizu M / Hiramitsu T / Nakamura T (2004) Inhibition of interleukin-1beta stimulated production of matrix metalloproteinases by hyaluronan via CD44 in human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 50:516-525
- Kamasani U / DuHadaway JB / Alberts AS / Prendergast GC (2007) mDia function is critical for the cell suicide program triggered by farnesyl transferase inhibition. *Cancer Biol Ther* 6:1422-1427
- Karlson EW / Mandl LA / Awew GN / Sangha O / Liang MH / Grodstein F (2003) Total hip replacement due to osteoarthritis. The importance of age, obesity and other modifiable risk factors. *Am J Med* 114:93-98
- Kim D-M / Chung K-S / Choi S-J / Jung Y-J / Park S-K / Han G-H / Ha J-S / Song K-B / Choi N-S / Kim H-M / Won M / Seo Y-S (2009) RhoB induces apoptosis via direct interaction with TNFAIP1 in HeLa cells. *Int J Cancer* 125:2520-2527
- Kozak M (1987) An analysis of 5'-noncoding sequence from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 15:8125-8148
- Lajoie-Mazenc I / Tovar D / Penary M / Lortal B / Allart S / Favard C / Brihoum M / Pradines A / Favre G (2008) MAP1A light chain-2 interacts with GTP-RhoB to control epidermal growth factor (EGF)-dependent EGF receptor signalling. *J Biol Chem* 283:4155-4164

- Lee YJ / Lee EB / Kwon YE / Lee JJ / Cho WS / Kim HA / Song YW (2003) Effect of estrogen on the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3, and MMP-13 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in osteoarthritic chondrocytes. *Rheumatol Int* 23:282-288
- Li Y / Tew SR / Russell AM / Gonzalez KR / Hardingham TE / Hawkins RE (2004) Transduction of passaged human articular chondrocytes with adenoviral, retroviral, and lentiviral vectors and the effects on enhanced expression of SOX9. *Tissue Eng* 10:575-584
- Li YD / Liu YP / Cao DM / Yan YM / Hou YN / Zhao JY / Yang R / Xia ZF / Lu J (2011) Induction of small G protein RhoB by non-genotoxic stress inhibits apoptosis and activates NF- κ B. *J Cell Physiol* 226:729-738
- Lin YJ / Yen CN / Hu YC / Wu YC / Liao CJ / Chu IM (2009) Chondrocytes culture in three-dimensional porous alginate scaffolds enhanced cell proliferation, matrix synthesis and gene expression. *J Biomed Mater Res A* 88:23-33
- Little CB / Flannery CR / Hughes CE / Mort JS / Roughley PJ / Dent C / Caterson B (1999) Aggrecanase versus matrix metalloproteinases in the catabolism of the interglobular domain of aggrecan in vitro. *Biochem J* 344:61-68
- Liu A / Cerniglia GJ / Bernhard EJ / Prendergast GC (2001) RhoB is required to mediate apoptosis in neoplastically transformed cells after DNA damage. *PNAS* 98:6192-6197
- Long D / Blake S / Song X-Y / Lark M / Loeser RF (2008) Human articular chondrocytes produce IL-7 and respond to IL-7 with increased production of the matrix metalloproteinase-13. *Arthritis Res Ther* 10:R23-R33
- Lord R / Parsons M / Kirby I / Beavil A / Hunt J / Sutton B / Santis G (2006) Analysis of the interaction between RGD-expressing adenovirus type 5 fiber knob domains and $\alpha_v\beta_3$ integrin reveals distinct binding profiles and intracellular trafficking. *J Gen Virol* 87:2497-2505
- Löser P / Jennings GS / Strauss M / Sandig V (1998) Reactivation of the previously silenced cytomegalovirus major immediate-early promoter in the mouse liver. Involvement of Nfkap-paB. *J Virol* 72:180-190
- Madry H / Weimer A / Kohn D / Cucciarini M (2007) Tissue-Engineering zur Knorpelreparatur verbessert durch Gentransfer. *Der Orthopäde* 36:236-247
- Madry H (2009) Molekulare Therapie von Knorpeldefekten. *Trauma und Berufskrankheit* 11[Suppl1]:55-59
- Mahr S: Identifizierung und Charakterisierung regulatorischer Gen-Polymorphismen bei der humanen Arthrose, Dissertation Uni Rostock 2005
- Mahr S / Burmester G-R / Hilke D / Göbel U / Grützkau A / Häupl T / Hauschild M / Koczan D / Krenn V / Neidel J / Perka C / Radbruch A / Thiesen H-J / Müller B (2006) Cis- and trans-acting gene regulation is associated with osteoarthritis. *Am J Hum Genet* 78:793-803
- Mahr S / Jonas L / Lorenz P / Müller B: Overexpression of RHOB promotes apoptosis in the chondrocyte-like cell line SW1353 (manuscript submitted)
- Marlow LA / Reynolds LA / Cleland AS / Cooper SJ / Gumz ML / Kurakata S / Fujiwara K / Zhang Y / Sebo T / Grant C / McIver B / Wadsworth JT / Radisky DC / Smallridge RC / Copland JA (2009) Reactivation of suppressed RhoB is a critical step for the inhibition of anaplastic thyroid cancer growth. *Cancer Res* 69:1536-1544

- Mazières J / Tovar D / He B / Nieto-Acosta J / Marty-Detraves C / Clanet C / Pradines A / Jablons D / Favre G (2007) Epigenetic regulation of RhoB loss of expression in lung cancer. *BMC Cancer* 7:220-227
- Milia J / Teyssier F / Dalenc F / Ader I / Delmas C / Pradines A / Lajoie-Mazenc I / Baron R / Bonnet J / Cohen-Jonathan E / Favre G / Toulas C (2005) Farnesylated RhoB inhibits radiation-induced mitotic cell death and controls radiation-induced centrosome overduplication. *Cell Death Differ* 12:492-501
- Moos V / Menard J / Sieper J / Sparmann M / Müller B (2002) Association of HLA-DRB1*02 with osteoarthritis in a cohort of 106 patients. *Rheumatology* 41:666-669
- Muehleman C / Bareither D / Huch K / Cole AA / Kuettner KE (1997) Prevalence of degenerative morphological changes in the joints of the lower extremity. *Osteoarthr Cartilage* 5:23-37
- Müller RD / John T / Kohl B / Oberholzer A / Gust T / Hostmann A / Hellmuth M / LaFace D / Hutchins B / Laube G / Veh RW / Tschöcke SK / Ertel W / Schulze-Tanzil G (2008a) IL-10 overexpression differentially affects cartilage matrix gene expression in response to TNF- α in human articular chondrocytes in vitro. *Cytokine* 44:377-385.
- Müller RD / John T / Kohl B / Feldner A / Zreiqat H / Ertel W / LaFace D / Hutchins B / Oberholzer A / Schulze-Tanzil G (2008b) Cartilage-specific matrix and integrin expression in three-dimensional articular chondrocyte cultures overexpressing human interleukin 10. *CMI* 1:21-32.
- Murphy G / Lee MH (2005) What are the roles of metalloproteinases in cartilage and bone damage? *Ann Rheum Dis* 64:iv44-iv47
- Nercelles PM / Peirano LN / Herrera RO / Rivero PB / Márquez LP (2010) Brote de queratoconjuntivitis epidémica en un Servicio de Oftalmología. A nosocomial outbreak of epidemic keratoconjunctivitis. *Rev Chil Infect* 27:534-538
- Niethard FU / Pfeil J: Orthopädie. Duale Reihe, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 5. Auflage 2005
- Oberholzer A / John T / Kohl B / Gust T / Müller RD / La Face D / Hutchins B / Zreiqat H / Ertel W / Schulze-Tanzil G (2007) Adenoviral transduction is more efficient in alginate-derived chondrocytes than in monolayer chondrocytes. *Cell Tissue Res* 328:383-390
- Palmer DJ / Ng P (2005) Helper-dependent adenoviral vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther* 16:1-16
- Patrick M / Manhire A / Ward AM / Doherty M (1989) HLA-A, B antigens and α_1 -antitrypsin phenotypes in nodal generalised osteoarthritis and erosive osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 48:470-475
- Pfander D / Heinz N / Rothe P / Carl H-D / Swoboda B (2004) Tenascin and aggrecan expression by articular chondrocytes is influenced by interleukin 1 β . A possible explanation for the changes in matrix synthesis during osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 63:240-244
- Pullig O / Weseloh G / Ronneberger D / Käkönen S / Swoboda B (2000) Chondrocyte differentiation in human osteoarthritis. Expression of osteocalcin in normal and osteoarthritic cartilage and bone. *Calcif Tissue Int* 67:230-240
- Poole CA (1997) Articular cartilage chondrons. Form, function and failure. *J Anat* 191:1-13
- Prendergast GC (2001) Actin' up. RhoB in cancer and apoptosis. *Nature* 1:162-168

- Rebello-de-Andrade H / Pereira C / Gíria M / Prudêncio E / Brito MJ / Calé E / Taveira N (2010) *J Clin Microbiol* 48:1391-1396
- Riyazi N / Spee J / Huizinga TWJ / Schreuder GMT / Vries de RRP / Dekker FW / Kloppenburg M (2003) HLA class II is associated with distal interphalangeal osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 62:227-230
- Sakurai F / Kawabata K / Mizuguchi H (2007) Adenovirus vectors composed of subgroup B adenoviruses. *Curr Gene Ther* 7:229-238
- Samulels J / Krasnokutsky S / Abramson SB (2008) Osteoarthritis. A tale of tree tissues. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases* 66:244-250
- Sandell LJ / Aigner T (2001) Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction. *Arthritis Res* 3:107-113
- Santangelo KS / Baker SA / Nuovo G / Dyce J / Bartlett JS / Bertone AL (2010) Detectable reporter gene expression following transduction of adenovirus and adeno-associated virus serotype 2 vectors within full-thickness osteoarthritic and unaffected canine cartilage in vitro and unaffected guinea pig cartilage in vivo. *J Orthop Res* 28:149-155
- Scharf H-P / Rüter A / Pohlemann T / Marzi I / Kohn D / Günther K-P: Orthopädie und Unfallchirurgie. Facharztwissen nach der neuen Weiterbildungsordnung, München Jena: Urban & Fischer, 2009
- Segerman A / Atkinson JP / Marttila M / Dennerquist V / Wadell G / Arnberg N (2003) Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor. *J Virol* 77:9183-9191
- Shayakhmetov DM: Efficacy, Toxicity, and Immunogenicity of Adenoviral Vectors. In: Hunt KK / Vorburger SA / Swisher SG: Gene therapy for cancer. Cancer drug discovery and development, Totowa NJ: Humana Press, 2007, S. 23-38
- Short JJ / Vasu C / Holterman MJ / Curiel DT / Pereboev A (2006) Members of adenovirus species B utilize CD80 and CD86 as cellular attachment receptor. *Virus Res* 122:144-153
- Sirena D / Lilienfeld B / Eisenhut M / Kälin S / Boucke K / Beerli RR / Vogt L / Ruedl C / Bachmann MF / Greber UF / Hemmi S (2004) The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3. *J Virol* 78:4454-4462
- Skodacek D: Der Einfluß von IGF-1 und TGF- β 2 auf Tissue-Engineerten humanen Septumknorpel. Eine Experimentelle Untersuchung, Dissertation München 2005
- Soundararajan M / Turnbull A / Fedorov O / Johansson C (2008) RhoB can adopt a Mg²⁺ free conformation prior to GEF binding. *Proteins* 72:498-505
- Spector TD / MacGregor AJ (2004) Risk factors in osteoarthritis. *Genetics. Osteoarthr Cartilage* 12:39-44
- Stewart PL / Dermody TS / Nemerow GR: Structural basis of nonenveloped virus cell entry. In: Chiu W / Johnson JE: Advances in protein chemistry. Volume 64 Virus structure, San Diego London, Elsevier Academic Press, 2003, S. 455-491
- Stratmann B / Farr M / Tschesche H (2001) Characterisation of C-terminally truncated human tissue inhibitor of metalloproteinases-4 expressed in *Pichia pastoris*. *Biol Chem* 382:987-991

Troeberg L / Fushimi K / Scilabra SD / Nakamura H / Dive V / Thøgersen IB / Enghild JJ / Nagase H (2009) The C-terminal domain of AMAMTS-4 and ADMATS-5 promote association with N-TIMP-3. *Matrix Biol* 28:463-469

Valdes AM / Spector TD (2009) The genetic predisposition to osteoarthritis. *IBMS BoneKey* 6:181-189

Vorburger SA / Hunt KK (2002) Adenoviral gene therapy. *The Oncologist* 7:46-59

Wang W-M / Ge G / Lim NH / Nagase H / Greenspan DS (2006) TIMP-3 inhibits the procollagen N-proteinase ADAMTS-2. *Biochem J* 398:515-519

Welsch U (Hrsg.): *Lehrbuch Histologie*. München. Urban & Fischer, 2003

Yatabe T / Mochizuki S / Takizawa M / Chijiwa M / Okada A / Kimura T / Fujita Y / Matsumoto H / Toyama Y / Okada Y (2009) Hyaluronan inhibits expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 68:1051-1058

7. Anhang

Tabelle 24: Herstellerverzeichnis

Hersteller	Firmensitz
Abcam	Cambridge, Großbritannien
Agilent Technologies	Böblingen
Applied Biosystems	Foster City, CA, USA
Bachofer	Reutlingen
B. Braun	Melsungen
BD	Heidelberg
Beckman Coulter	Fullerton, CA, USA
Bio-Rad	München
Calbiochem	La Jolla, CA, USA
Carl Roth	Karlsruhe
Dianova	Hamburg
eBioscience	Frankfurt
Eppendorf	Hamburg
Fermentas	St. Leon-Rot
Fluka	Buchs, Schweiz
GE Healthcare	München
Genaxxon	Biberach
GFL	Burgwedel
Gibco	Paisley, Großbritannien
Gilson	Limburg-Offheim
Greiner Bio One	Frickenhausen
Hanna Instruments	Kehl am Rhein
Heraeus	Buckinghamshire, Großbritannien
Heidolph	Schwabach
HLC	Bovenden
H-Saur	Reutlingen
Immunotools	Friesoythe
Integra Biosciences	Fernwald
Invitek	Berlin
Invitrogen (vorher Ambion)	Darmstadt
J.T.Baker	Deventer, Niederlande
Labotec	Göttingen
Lonza (vorher Amaxa)	Köln
Merck	Darmstadt
Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
NEB BioLabs	Frankfurt a.M.
Nerbe Plus	Winsen/Luhe
Nikon	Japan
Nunc	Langenselbold
PAA	Pasching, Österreich

Hersteller	Firmensitz
Pharmacia Biotech	San Francisco, CA, USA
Qiagen	Hilden
Ritter Medical Care	Schwabmünchen
Roche	Mannheim
Santa Cruz Biotec	Heidelberg
Sarsteadt	Nümbrecht
Sartorius	Göttingen
Serva	Heidelberg
Sigma-Aldrich	Steinheim
Tecan Group Ltd.	Männedorf, Schweiz
Thermo Fisher Scientific	Schwerte
Worthington	Lakewood, NJ, USA

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. Brigitte Müller-Hilke für die Überlassung des interessanten Themas, der Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die ständige kompetente Betreuung dieser experimentellen Untersuchung und ihre große Hilfsbereitschaft und Geduld.

In Fragen zu Zellkulturtechniken und Proteinnachweisen standen mir Eva Lorbeer-Rehfeld, Nadine Born und Dr. Peter Lorenz stets hilfreich zur Seite, wofür ich mich hiermit ausdrücklich bedanken möchte. Ebenso gilt mein ausdrücklicher Dank Ildikó Tóth und Dr. Dirk Koczan für die Beantwortung der vielen Fragen zu RNA-Isolierung, Transkription und der Realtime PCR.

Professor Albert Heim, Gabriele Harste und Sebastian Darr aus der Adenoviren Arbeitsgruppe der Abteilung für Virologie an der MHH Hannover möchte ich ausdrücklich für die Bereitstellung der Wildtyp-Adenoviren, die hervorragende Einweisung in die Kunst der Neutralisationstests und die Beantwortung verschiedenster Fragen zu den Adenoviren danken.

Anke Schmidt und Anja Stoll aus der Vektorologie standen mir bei der Adenovirusherstellung und Transduktion von HEK293 und H1299 Zellen mit rekombinanten Adenoviren immer hilfreich zur Seite, wofür ich mich bedanken möchte. Bei Frau Prof. Dr. Dr. Pützer möchte ich mich ausdrücklich für die Bereitstellung der Kontroll-Adenoviren und die hilfreichen Diskussionen bedanken.

Dorothea Frenz aus dem Institut für Experimentelle Chirurgie gilt mein Dank für die kompetente und liebevolle Unterstützung und die vielen Tipps bei der Immunhistochemie.

Für die fortwährende Versorgung mit Knorpel möchte ich mich ausdrücklich bei Doris Hansmann, Katrin Lochner und Anika Jonitz aus dem Forschungslabor für Biomechanik und Implantattechnologie und dem Team des OP-Saals 2 der Chirurgischen Klinik und Poliklinik bedanken.

Juliane Pasold und Robby Engelmann sowie dem gesamten Team des Instituts für Immunologie gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme und die angenehme Arbeitsatmosphäre unter der diese Arbeit entstanden ist. Ebenso gilt Martina Sombetzi und Ulrike Krüger mein ausdrücklicher Dank für die vielen anregenden Diskussionen und das offene Ohr bei allen großen und kleinen Sorgen.

Ein großes Dankeschön gilt natürlich allen Patienten, ohne deren Beteiligung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zuletzt gilt mein herzlichster Dank meiner Familie, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Steigerung der Matrixproduktion von humanen artikulären Chondrozyten durch eine Kombination aus adenoviraler Transduktion, Expansion im Monolayer und 3D-Kultur in Alginat“

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Hamburg, den 08.08.2012

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Diana Pohle, geb. Vautz

Geburtsdatum: 05.12.1983

Geburtsort: Gera

Ausbildung

1995 - 2002 Gymnasium „Georg-Christoph-Lichtenberg“, Gera

07.06.2002 Allgemeine Hochschulreife, Abitur (Note 1,9)

2002 - 2006 Studium der Biotechnologie an der Fachhochschule Gießen-Friedberg

21.08.2006 Diplomprüfung, Dipl.-Ing. (FH) (Note 1,7)

2008 - 2012 Promotion am Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Rostock

Hamburg, den 08.08.2012

Publikationen

Pohle D / Kasch R / Herlyn P / Bader R / Mittlmeier T / Pützer BM / Müller-Hilke B (2012)
Adenoviral transduction supports matrix expression of alginate cultured articular chondrocytes. *Biotechnol Bioeng* 109:2402-2408