

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische  
Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zur Auswirkung von CCL25 auf Chondrozyten und  
deren extrazelluläre Matrix im Rahmen eines regenerativen *in situ*  
Therapieansatzes bei Knorpeldefekten

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Luise Lüderitz

aus Berlin

Datum der Promotion: 04.06.2021

## Vorwort

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Luise Lüderitz, Tilo Dehne, Michael Sittinger, Jochen Ringe, Dose-Dependent Effect of Mesenchymal Stromal Cell Recruiting Chemokine CCL25 on Porcine Tissue-Engineered Healthy and Osteoarthritic Cartilage, International Journal of Molecular Sciences, 23. Dezember 2018

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>V</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Arthrose .....	1
1.2 Medikamentöse Therapien .....	2
1.3 Regenerative Therapieansätze mit MSCs.....	3
1.4 Regenerativer Therapieansatz mit Chemokinen.....	5
1.4.1 CCL25 .....	6
1.4.2 Physiologische und pathophysiologische Funktionen.....	7
1.4.3 Rolle bei neoplastischen Erkrankungen .....	8
1.5 Ziel und Fragestellungen dieser Arbeit .....	9
<b>2 Material</b> .....	<b>12</b>
2.1 Geräte.....	12
2.2 Software.....	12
2.3 Kits.....	13
2.4 Verbrauchsmaterial.....	15
2.5 Lösungen und Medien .....	15
2.6 Zytokine und Enzyme.....	17
<b>3 Methodik</b> .....	<b>18</b>
3.1 Zellisolierung.....	18
3.2 Zellzahlbestimmung .....	19
3.3 Subkultivierung vor Migrations-Assay .....	19
3.4 Migrations-Assay.....	20
3.4.1 Durchführung des Migrations-Assays.....	20
3.4.2 Quantifizierung der migrierten Chondrozyten .....	21

3.4.3	Statistische Auswertung des Migrations-Assays.....	22
3.5	3D-Zellkultur .....	23
3.5.1	Stimulation mit CCL25 .....	23
3.5.2	Stimulation mit CCL25 und TNF- $\alpha$ .....	23
3.6	Vitalfärbung.....	23
3.6.1	Fluoreszenzmikroskopie.....	24
3.6.2	Auswertung der Vitalfärbung.....	25
3.7	Safranin O/Fast Green-Färbung.....	26
3.7.1	Quantifizierung der Glykosaminoglykane (GAG).....	26
3.7.2	Statistische Auswertung des GAG-Gehalts.....	28
3.8	RNA-Isolierung .....	28
3.8.1	RNA-Extraktion .....	29
3.8.2	RNA-Präzipitation und DNA-Verdau .....	29
3.8.3	Abschließende Präparation der RNA .....	30
3.8.4	RNA-Konzentrationsbestimmung.....	30
3.8.5	RNA-Reinheit.....	30
3.8.6	RNA-Qualität .....	31
3.9	Genexpressionsanalyse.....	32
3.9.1	Synthese der cRNA .....	32
3.9.2	Aufreinigung und Fragmentierung der cRNA .....	32
3.9.3	Hybridisierung der cRNA .....	34
3.9.4	Analysekontrollen .....	34
3.9.5	Datenauswertung.....	35
3.9.6	Literaturrecherche .....	36
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
4.1	CCL25 induzierte Migration porciner Chondrozyten .....	42
4.2	CCL25 induzierte Chemokinese.....	42

4.3	Chondrozyten-Vitalität nach CCL25-Stimulation.....	43
4.4	Histomorphometrie der 3D-Zellkulturen.....	46
4.5	Genexpressionsanalyse.....	47
4.5.1	Genfunktionen bei 5 nmol/l CCL25.....	48
4.5.2	Genfunktionen bei 500 nmol/l CCL25.....	50
4.5.3	Vergleich des CCL25-induzierten Expressionsprofils.....	51
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>54</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>60</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>69</b>
	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>70</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>71</b>
	<b>Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen.....</b>	<b>72</b>
	<b>Publikationsliste.....</b>	<b>73</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>74</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>75</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ABHD13	Abhydrolase domain containing 13
ACAN	Aggrecan
ACI	Autologe Chondrozyten Implantation
ACKRs	Atypische Chemokinrezeptoren
ACTB	Actin beta
ACTG2	Actin, Gamma 2, Smooth Muscle, Enteric
AD-MSCs	Adipose-derived MSCs
AK	Antikörper
AMIC	Autologe Matrix-induzierte Chondrogenese
ANGPTL2	Angiopoietin-like 2
ANK3	Ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)
APLF	Aprataxin and PNKP like factor
ARFGAP2	ADP ribosylation factor GTPase activating protein 2
BD	Becton Dickinson
BM-MSCs	Bone marrow-derived MSCs
C1H14orf39	Chromosome 1 open reading frame, human C14orf39
CCL25	C-C motif chemokine ligand 25
CCNA2	Cyclin A2
CD	Cluster of Differentiation
CDC5L	Cell division cycle 5-like
CDIPT	CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase
CI	Konfidenzintervall
COL10A1	Collagen, type X, alpha 1
COL1A1	Collagen, type I, alpha 1
COL1A2	Collagen, type I, alpha 2
COL2A1	Collagen, type II, alpha 1
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein
cRNA	Komplementäre Ribonukleinsäure
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
CTSC	Cathepsin C
CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2
DGAT2	Diacylglycerol O-Acyltransferase 2
DIO2	Deiodinase, iodothyronine, type II

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP4	Dipeptidyl-peptidase 4
EEF1A1	Eukaryotic elongation factor 1 alpha 1
EPOR	Erythropoietin receptor
ESPN	Espin
EVs	Extracellular Vesicles
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBS	Fetal bovine serum, Fetales Kälberserum
FBXL4	F-Box and Leucine Rich Repeat Protein 4
FDA	Fluoresceindiacetat
GAG	Glykosaminoglykane
GCOS	Affymetrix GeneChip® Operating Software
GSTA4	Glutathione S-transferase alpha 4
HeLa	Initialen der Spenderin Henrietta Lacks
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen – DR isotype
HMMR	Hyaluronan mediated motility receptor
HP	Haptoglobin
HTRA3	HtrA serine peptidase 3
ID	Identifier
ISCT	International Society for Cellular Therapy
IVT	<i>In vitro</i> Transkription
LEP	Leptin
LIG4	Ligase IV, DNA, ATP-dependent
LMNB1	Lamin B1
MACI	Matrix-induzierte Autologe Chondrozyten Implantation
MARVELD3	MARVEL domain containing 3
MBNL3	Muscleblind-like splicing regulator 3
MEDLINE	Medical Literature Analysis and Retrieval System Online
MF	Mikrofrakturierung
miRNA	MikroRNA
MKKS	McKusick-Kaufman syndrome
MM	Mismatch

MMP-1	Matrix metalloproteinase 1
MMP-13	Matrix metalloproteinase 13
MMP-8	Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)
MMPs	Matrix-Metalloproteasen
mRNA	MessengerRNA
MSCs	Mesenchymale Stromazellen
MTW	Mittelwert
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCOA7	Nuclear receptor coactivator 7
NHEJ	Non-homologous end joining
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PI	Propidiumiodid
PIAP	Inhibitor of apoptosis-like
PLOD1	Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1
PLSCR1	Phospholipid scramblase 1
PM	Perfect match
POSTN	Periostin
PTMA	Prothymosin, alpha
RA	Rheumatoide Arthritis
RAD54L	DNA repair and recombination protein RAD54-Like
RIN	RNA Integrity Number
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, Kulturmedium
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SERPINA3-3	Alpha-1-antichymotrypsin 3
SLC12A1	Solute carrier family 12 member 1
SLR	Signal Log Ratio
SMARCD2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 2
SMCHD1	Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1



SMPD1	Spingomyelin Phosphodiesterase 1
SOD2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TBRG1	Transforming growth factor beta regulator 1
TECK	Thymus-Expressed Chemokine
TIF	Tagged Image File
TMED5	Transmembrane emp24 protein transport domain containing 5
TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
TPM1	Tropomyosin 1
TSPAN12	Tetraspanin 12
TXN	Thioredoxin
UC-MSCs	Umbilical cord-derived MSCs
USP47	Ubiquitin specific peptidase 47
VMP1	Vacuole membrane protein 1
XKR8	XK, Kell blood group complex subunit-related family, member 8
ZNF630	Zinc finger protein 630
ZYG11A	Zyg-11 family member A, cell cycle regulator

## **Zusammenfassung**

**Einleitung** Die Arthrose gilt als weltweit häufigste chronische Gelenkerkrankung und betrifft vorwiegend ältere Patienten. Aktuelle medikamentöse Therapieempfehlungen lindern vor allem Schmerzen, führen jedoch nicht zu einer Regeneration des Knorpelgewebes. Mit einem neuen *in situ* Therapieansatz wird beabsichtigt, endogene mesenchymale Stromazellen (MSCs) mittels C-C Motif Chemokine Ligand 25 (CCL25) in beschädigte oder degenerierte Knorpelbereiche zu rekrutieren, um dort die Regeneration zu unterstützen und zu fördern. Auswirkungen von CCL25 auf gesundes oder degeneriertes Knorpelgewebe sind jedoch bisher nicht bekannt. Ziel der Studie war es, mögliche Auswirkungen verschiedener Konzentrationen des Chemokins auf Chondrozyten und deren kartilaginöse Matrix in einem *in vitro* Modell zu identifizieren.

**Methodik** In der vorliegenden präklinischen Studie wurden isolierte und *in vitro* vermehrte porcine Chondrozyten mit rekombinant humanem CCL25 (0, 0,1, 1, 10, 100, 250, 500, 1000 nmol/l) stimuliert und die Zellmigration untersucht. Des Weiteren wurden porcine Chondrozyten in einem 3D-Knorpelmodell für 7 Tage mit verschiedenen CCL25-Konzentrationen (0, 0,05, 0,5, 5, 50, 500 nmol/l) allein und in Kombination mit 0,6 nmol/l TNF- $\alpha$  stimuliert. Die Auswirkungen auf die Chondrozyten und deren synthetisierte Matrix wurden anhand von fluoreszenzmikroskopischen Vitalitätsbestimmungen, histologischen Proteoglykannachweisen und Genexpressionsanalysen untersucht.

**Ergebnisse** Bei 500 und 1000 nmol/l wurde eine erhöhte und bei 100 nmol/l eine verminderte Anzahl migrierter Chondrozyten *in vitro* im Vergleich zu unstimulierten Chondrozyten beobachtet. Unabhängig von der angewendeten CCL25-Konzentration und Gegenwart von TNF- $\alpha$  wurde eine konstant hohe Vitalität der Chondrozyten in den Kulturen festgestellt. In einem Konzentrationsbereich von 0 – 5 nmol/l zeigten sich keine Alterationen im Proteoglykangehalt der kartilaginösen Matrix. Ab 50 nmol/l wurde eine Reduktion des Glykosaminoglykangehalts ermittelt. Die Kombination mit TNF- $\alpha$  führte nicht zu einer gesteigerten Matrixdegradation. Bei 500 nmol/l CCL25 wurde die Genexpression von *Kollagen Typ II, alpha 1 (COL2A1)* runterreguliert und die von *Matrix-Metalloproteasen (MMP-1, MMP-8, MMP-13)*, Genen des antioxidativen Schutzsystems (*SOD2, TXN*) und Zytokinen (*CXCL2, TNFSF10*) hochreguliert.

**Schlussfolgerung** Insgesamt zeigte sich keine Auswirkung auf die Vitalität der Chondrozyten in den 3D-Kulturen. Hohe CCL25-Konzentrationen könnten im Rahmen einer intraartikulären Anwendung zu einer Degradation der Knorpelmatrix führen.

## **Abstract**

**Background** Osteoarthritis is thought to be the most common chronic joint disease worldwide and affects mainly older patients. Current medical therapy recommendations primarily relieve pain. However, they lack the ability of cartilage tissue regeneration. A new *in situ* therapy approach with C-C motif chemokine ligand 25 (CCL25) intends to recruit endogenous mesenchymal stromal cells (MSCs) to injured or degenerated areas, to support and promote cartilage regeneration. So far, there is no information about the effects of CCL25 on healthy and degenerated cartilage. The aim of this study was to identify possible effects of different concentrations on chondrocytes and their cartilaginous matrix in an *in vitro* model.

**Methods** In this preclinical study, isolated and *in vitro* expanded chondrocytes were stimulated with recombinant human CCL25 (0, 0.1, 1, 10, 100, 250, 500, 1000 nmol/l) and cell migration was investigated. Furthermore, porcine chondrocytes were cultured in a 3D cartilage model and stimulated with different CCL25 concentrations (0, 0.05, 0.5, 5, 50, 500 nmol/l) alone and in combination with 0.6 nmol/l TNF- $\alpha$  for 7 days. The effects on chondrocytes and their synthesized matrix were analysed with fluorescence microscopic viability measurements, histological proteoglycan detection and gene expression profiling.

**Results** At 500 and 1000 nmol/l an increased number of migrated chondrocytes *in vitro* compared with unstimulated chondrocytes was observed. At 100 nmol/l the number of cells decreased. Regardless of the applied CCL25 concentration and the presence of TNF- $\alpha$ , the viability of chondrocytes in culture was constantly high. No alterations in the proteoglycan content were seen in a dose range of 0 to 5 nmol/l. At a concentration of 50 nmol/l a reduction of the glycosaminoglycan content in the cartilaginous matrix was observed. The combination with TNF- $\alpha$  did not lead to an increased matrix degradation. At 500 nmol/l CCL25 the gene expression of *collagen type II, alpha 1 (COL2A1)* was reduced and the expression of *matrix metalloproteinases (MMP-1, MMP-8, MMP-13)*, genes of the antioxidant defence system (*SOD2, TXN*) and cytokines (*CXCL2, TNFSF10*) was increased.

**Conclusion** Overall, no effects on the viability of chondrocytes in 3D culture were observed. Within the context of an intraarticular application, high CCL25-concentrations could probably lead to cartilage matrix degradation.

# 1 Einleitung

## 1.1 Arthrose

Laut einer Studie („Gesundheit in Deutschland aktuell 2012“) des Robert-Koch-Instituts, bejahten 28% der Frauen und 20% der Männer jemals die Diagnose einer Arthrose vom Arzt bekommen zu haben. Dabei sei das Kniegelenk der Befragten am häufigsten betroffen gewesen. Auch wenn die Daten zur Arthroseprävalenz je nach Quelle variieren, wird geschätzt, dass sie die weltweit häufigste chronische Gelenkerkrankung ist.

Die Ursachen für die Entstehung einer Arthrose werden in primär (idiopathisch) und sekundär eingeteilt. Zu den sekundären Ursachen zählen Knorpel- und Kreuzbandverletzungen, Fehlstellungen der Beinachse, Meniskusschäden, intraartikuläre Frakturen, aseptische Knochennekrosen und operative Eingriffe (1). Als Risikofaktoren für die Entwicklung einer Arthrose werden das Alter, die Adipositas, ein weibliches Geschlecht und eine genetische Prädisposition angesehen. Die Krankheitsentstehung und der Verlauf werden durch lokale (z.B. Mikrotraumata, Knorpelatrophie bei Immobilisation) und systemische Faktoren (z.B. Hyperurikämie, Autoimmunerkrankungen) moduliert. Insgesamt kommt es bei einer Arthrose zu einem progredienten Verlust des Knorpelgewebes und zu Veränderungen in den angrenzenden Gelenkstrukturen.

Pathophysiologisch besteht bei der Arthrose ein Ungleichgewicht aus knorpelabbauenden Prozessen und der Knorpelbildung. Das Überwiegen der knorpelabbauenden Prozesse führt zu einer Verminderung der Proteoglykane, einer Freilegung der Kollagenfibrillen, einer Rissbildung und Zerklüftung der Knorpeloberfläche. Die Chondrozyten hypertrophieren und es kommt zur Clusterbildung. Die von der Knorpelmatrix losgelösten Fragmente in der Gelenkflüssigkeit können die Synthese und Freisetzung von Entzündungsmediatoren induzieren. In der Gelenkkapsel kommt es zur Fibrose mit perivaskulärer Infiltration von Immunzellen, Hyperplasie der Synovialmembran und Synovitis (2). In der Synovialflüssigkeit werden nicht nur vermehrt proinflammatorische Zytokine, sondern auch erhöhte Anzahlen von Immunzellen nachgewiesen. Darüber hinaus verbreitert sich die Zone des mineralisierten Knorpels. Im subchondralen Knochengewebe kommt es zu einer Vaskularisierung, Osteophytenentstehung, Geröllzystenformung, Sklerosierung und Abflachung der Knochenplatte. In der subchondralen Substantia spongiosa können vereinzelt Ödeme, Knochenmarkfibrosen, Nekrosen und ein abnormales Trabekelwerk auftreten (3, 4). Anhand der pathophysiologischen Veränderungen in den angrenzenden Gelenkstrukturen wird ersichtlich, warum die Arthrose eine Erkrankung des gesamten Gelenks ist und sich durch verschiedene Symptome wie Gelenkergüsse, akute und chronische Schmerzen, Krepitationen, Gelenkdeformierungen, Gelenksteifigkeit und

Bewegungseinschränkungen äußern kann. Während des chronisch degenerativen Fortschreitens der Arthrose kann es phasenweise zur Besserung oder Aggravation der Beschwerdesymptomatik kommen.

## **1.2 Medikamentöse Therapien**

Dass die Lebenszeitprävalenz der Arthrose mit dem Alter deutlich ansteigt, erschwert die Auswahl und Anwendung medikamentöser Therapien. Ältere Patienten weisen neben einem anderen Risikoprofil (z.B. kardiovaskuläre Vorerkrankungen, Niereninsuffizienz, Multimedikation) auch eine veränderte Pharmakokinetik im Vergleich zu jüngeren Patienten auf.

Systemisch wirkende Medikamente wie Analgetika aus der Gruppe der nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) erhöhen bei Patienten das Risiko für gastrointestinale Blutungen. Dieses Blutungsrisiko kann durch eine gleichzeitige Prophylaxe mit Protonenpumpenhemmern (PPI) reduziert werden. Aus der zusätzlichen PPI-Gabe können sich jedoch weitere unerwünschte Arzneimittelnebenwirkungen wie zum Beispiel eine Hypomagnesiämie ergeben (5). Die potenteren Opioidanalgetika führen während der Einnahme zur anhaltenden Miosis und Obstipation. Letzteres erfordert eine gleichzeitige Medikation mit Laxanzien. Neben der Gefahr einer Abhängigkeit und eines Fehlgebrauchs bei Opioiden kann bei einer dauerhaften Anwendung eine Steigerung der Dosis wegen einer Toleranzentwicklung notwendig werden. Generell ist zu beachten, dass sich eine hohe Anzahl an täglich einzunehmenden Medikamenten negativ auf die Compliance der Patienten auswirkt. Das Alter der Patienten und die unerwünschten Arzneimittelwirkungen führen unter anderem dazu, dass medikamentöse Therapien mit NSAR, Opioiden und Kortikoiden in der aktuellen S2k-Leitlinie „Gonarthrose“ der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie (Stand 18.01.2018) nur für einen kurzen oder befristeten Zeitraum empfohlen werden. Als Alternative zu den kurzzeitig empfohlenen Analgetika wird beispielweise die intraartikuläre Injektion von Hyaluronsäure aufgeführt. Sie kann die Schmerzsymptomatik reduzieren (6), wiederholt appliziert werden (7) und zeigt im Gegensatz zur oralen NSAR-Gabe vorwiegend lokale Nebenwirkungen (8).

Mit den in der Leitlinie aufgeführten medikamentösen Therapiemöglichkeiten (NSAR, Opioiden, Kortikosteroiden, Hyaluronsäure) können zwar Schmerzsymptome reduziert werden, jedoch konnte bisher keine Verbesserung der degenerierten Knorpelstruktur beobachtet werden, was bei Arthrosepatienten eine erneute oder intensiviertere Anwendung der medikamentösen Therapien mit deren Risiken nach Wiederauftreten der Symptome oder bei Symptomverschlechterung impliziert. Nach Ausschöpfung oder Versagen der konservativen Therapien stehen je nach Begleitfaktoren, Leidensdruck, Schweregrad und Ausdehnung der arthrotischen Degeneration verschiedene

gelenkersetzende Verfahren für Patienten zur Verfügung. Die Implantation von Knie- oder Totalendoprothesen (Knie-TEP) kann zu einer Besserung der Schmerzen und der Funktionseinschränkungen führen, jedoch ist bei der Vollprothese ca. jeder fünfte Patient mit dem Behandlungsergebnis unzufrieden (9, 10). Aufgrund der möglichen Komplikationen wie der septischen oder aseptischen Lockerung, Arthrofibrose und Abnutzung des Kunststoffinlays kann zudem eine erneute Operation oder ein Prothesenwechsel notwendig werden. Es wäre daher wünschenswert, die Symptome der Arthrose langfristig lindern zu können und die Notwendigkeit einer invasiven Prothesenversorgung für Patienten hinauszögern oder sogar vermeiden zu können. Dieses Ziel wird bei der Entwicklung regenerativer Therapieansätze verfolgt. Sie beabsichtigen, die Progression des Knorpelverlustes aufzuhalten und die Knorpelbildung zu unterstützen und zu fördern. Durch ambulant durchführbare und lokal wirkende regenerative Therapien könnte die Einnahme systemisch wirkender Medikamente reduziert werden und eine langfristige Symptom- und Funktionsverbesserung erreicht werden. Derzeit können weder die medikamentösen noch die nicht-medikamentösen Therapien den progredienten Knorpelverlust aufhalten, zudem ist die aktuelle leitliniengerechte Auswahl an empfohlenen und lokal wirksamen Medikamenten begrenzt.

### **1.3 Regenerative Therapieansätze mit MSCs**

Einen vielversprechenden regenerativen Therapieansatz stellt die intraartikuläre Injektion von autologen oder allogenen mesenchymalen Stromazellen (MSCs) dar. Als MSCs werden multipotente adulte Stamm-/Vorläuferzellen bezeichnet, die aus verschiedensten humanen Geweben (z.B. Knochenmark, Fettgewebe, Muskelgewebe, Blut) isoliert werden können (11). Sie werden durch mindestens drei Kriterien definiert, die 2006 von der International Society for Cellular Therapy (ISCT) vorgeschlagen wurden: 1) Plastikadhärenz, 2) Expression der Zelloberflächenmoleküle (cluster of differentiation, CD) CD73, CD90, und CD105 und das Fehlen von CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79 $\alpha$  oder CD19, und HLA-DR, 3) Differenzierung in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten *in vitro* (12). Die Definition und Nomenklatur der MSCs wird in wissenschaftlichen Publikationen nicht einheitlich angewendet und unterliegt einem stetigen Wandel. Das liegt unter anderem daran, dass bisher kein alleinstehendes charakteristisches Merkmal oder ein spezieller Marker zur Identifizierung von MSCs aus unterschiedlichen Geweben gefunden wurde. Da die Eigenschaften der Zellen (z.B. Oberflächenmoleküle, Differenzierungspotential) je nach Ort der Isolation variieren, werden die Ursprungsgewebe bei der Bezeichnung meist mit angegeben (13, 14). In der Entwicklung regenerativer Arthrosetherapien spielen MSCs eine zentrale Rolle, da sie in fast allen Gelenkkomponenten

(Gelenkkapsel, Gelenkflüssigkeit, Hoffa-Fettkörper, Bänder, Menisken) nachgewiesen werden konnten (15), ein chondrogenes Differenzierungspotential aufweisen, chondroprotektive Vesikel sezernieren (extracellular vesicles, EVs) (16-18) und immunmodulatorische Effekte induzieren (19). Im Kontext knorpelregenerativer Ansätze gehören MSCs aus dem Knochenmark (bone marrow-derived MSCs, BM-MSCs) bisher zu der am meisten untersuchten Zellpopulation. In klinischen Studien konnte durch intraartikuläre Injektionen von allogenen oder autologen BM-MSCs eine Schmerzreduktion und Regeneration von arthrotisch veränderten Knorpelstrukturen bei Patienten beobachtet werden (20-22). Die Injektion der kultivierten MSCs aus dem Knochenmark scheint zudem ein sicherer Therapieansatz für Patienten zu sein (23, 24). Im Vergleich zur intraartikulären Injektion von Hyaluronsäure weist dieser zellbasierte regenerative Ansatz jedoch auch Nachteile auf. BM-MSCs werden meist durch Beckenknochen-Punktionen unter leichter Sedierung und Lokalanästhesie vom Patienten gewonnen. Darüber hinaus werden die Zellen vor einer intraartikulären Injektion in Kulturflaschen vermehrt. Die notwendigen Schritte für diesen zellbasierten, regenerativen Ansatz sind insgesamt kostenintensiver und zeitaufwendiger als eine alleinige Hyaluronsäure-Applikation. Ähnliches trifft auch für die Verwendung von MSCs aus dem Fettgewebe (adipose-derived MSCs, AD-MSCs) und der Nabelschnur (umbilical cord-derived MSCs, UC-MSCs) zu.

Auch andere knorpelregenerative Ansätze mit MSCs sind in ihrer Vorbereitung und Durchführung komplexer als eine lokale Applikation von Wirkstoffen oder Hyaluronsäure. Ein Beispiel ist die Autologe Matrix-induzierte Chondrogenese (AMIC). Mit diesem Verfahren wird, rein arthroskopisch oder mittels Miniarthrotomie, der subchondrale Knochen an mehreren Stellen eröffnet (Mikrofrakturierung, MF), sodass Blut und mesenchymale Stromazellen aus dem Knochenmark in eine zellfreie Membran im Defektbereich einströmen und koagulieren können. Bei der AMIC kommt es anschließend zur Entstehung von neuem Knorpelgewebe, was jedoch nicht mit einer vollständigen Wiederherstellung des hyalinen Ausgangsgewebes gleichgesetzt werden kann. Dieses bereits in der Klinik etablierte, regenerative Verfahren wird bei Patienten mit einem lokal begrenzten Knorpeldefekt nach akutem Trauma, wiederholten Mikrotraumata oder bei einer frühen fokalen Arthrose eingesetzt (25, 26). Für Patienten mit einer fortgeschritteneren Arthroseerkrankung wird die AMIC nicht empfohlen. Gleiches gilt auch für bereits etablierte regenerative Therapien mit Chondrozyten. Zu diesen Verfahren zählen die Autologe Chondrozyten Implantation (ACI) und die Matrix-induzierte Autologe Chondrozyten Implantation (MACI). Bei der ACI werden Chondrozyten aus weniger druckaufnehmenden Arealen arthroskopisch entnommen und in Monolayerkulturen über einen Zeitraum von mehreren Wochen vermehrt. Danach werden die kultivierten Chondrozyten in einem zweiten Eingriff unter einer

natürliche oder synthetische Membran in fokal beschädigte Knorpelbereiche implantiert. Bei der MACI werden zuvor arthroskopisch gewonnene Chondrozyten kultiviert, in ein dreidimensionales Gerüst übertragen und in einem zweiten Eingriff am Patienten zusammen mit dem Scaffold in den Defektbereich eingebracht.

Neuere regenerative Ansätze mit MSCs zur Behandlung der Arthrose fokussieren sich auf eine intraartikuläre Injektion von Exosomen (27). Exosomen gehören zu den EVs und können von diversen Zelltypen freigesetzt werden. In den neueren Ansätzen werden Exosomen verwendet, die von *in vitro* kultivierten MSCs ins Medium sezerniert und danach aus dem Zellkulturüberstand mittels sequenzieller Zentrifugation isoliert werden. Exosomen werden von einer Lipiddoppelmembran begrenzt, haben einen Durchmesser von ca. 30 – 150 nm und beinhalten Proteine, Lipide und Nukleinsäuren (z.B. mRNA, miRNA) (16, 28). Es wird angenommen, dass Exosomen von den Zielzellen internalisiert und die darin enthaltenen Moleküle aufgenommen werden können. Exosomen werden daher aktuell als Hauptmediatoren der parakrinen Zell-Zell-Kommunikation von MSCs angesehen (29). In präklinischen Studien wurde unter anderem beobachtet, dass eine intraartikuläre Injektion von Exosomen gleichwertige Effekte zeigt wie eine intraartikuläre Injektion von BM-MSCs (17).

Die aufgeführten Beispiele zu den etablierten knorpelregenerativen Therapiemöglichkeiten und Ansätzen mit MSCs zeigen, dass Patienten mit diffusen Knorpeldefekten oder einer fortgeschritteneren Arthrose bisher nicht therapeutisch adressiert werden können und dass die Verfahren mit einer zeit- und kostenintensiven Gewinnung und/oder *in vitro* Kultivierung von Zellen einhergehen.

#### **1.4 Regenerativer Therapieansatz mit Chemokinen**

In Studien konnte beobachtet werden, dass MSCs mit Hilfe von Lockstoffen, wie zum Beispiel Chemokinen und Wachstumsfaktoren mobilisiert werden können. Auch im Rahmen von Gewebeschädigungen wurden verschiedene Chemokine und Chemokinrezeptoren eruiert, die an der Rekrutierung von MSCs beteiligt sind (30, 31). Daher spielen Chemokine zum jetzigen Zeitpunkt eine bedeutende Rolle in der Entwicklung regenerativer Therapieansätze.

Mit chemokinbasierten regenerativen Ansätzen wird beabsichtigt, endogene Stamm- oder Vorläuferzellen aus umliegenden Geweben mittels eines Konzentrationsgradienten in das Zielgewebe zu mobilisieren. Die *In-situ*-Regeneration beispielsweise ist eine neue Generation des Tissue Engineerings. Dabei werden Chemokine mit einem Trägermaterial kombiniert. Das Trägermaterial wird in den Defektbereich eingebracht, um optimale Bedingungen für die rekrutierten Zellen zu schaffen. Zudem soll es den Konzentrationsgradienten des Chemokins



gegenüber der Umgebung aufrechterhalten.

Nach bisherigen Forschungsergebnissen könnte C-C Motif Chemokine Ligand 25 (CCL25) ein potenzieller Kandidat für einen regenerativen *in situ* Therapieansatz für Knorpelschäden und arthrotische Knorpelveränderungen sein. In der Immunhistologie, Durchflusszytometrie und Polymerasekettenreaktion (PCR) konnte die Expression des CCL25-Rezeptors (CCR9) bei undifferenzierten und chondrogen differenzierten MSCs aus dem Knochenmark detektiert werden (32). Zudem induzierten verschiedene CCL25-Konzentrationen (500, 750 und 1000 nmol/l) die gerichtete Migration (Chemotaxis) von MSCs *in vitro* (33). Daneben konnte in Pelletkulturen aus Bandscheibenzellen, die mit CCL25 stimuliert wurden, eine vermehrte Synthese von Glykosaminoglykanen und Kollagen Typ I beobachtet werden (34).

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit ist ein regenerativer *in situ* Therapieansatz in Form einer intraartikulären Applikation von CCL25 und Hyaluronsäure als Trägermaterial. Mit diesem wird angestrebt, endogene MSCs aus verschiedenen Lokalisationen (z.B. Gelenkkapsel, Gelenkflüssigkeit, Hoffa-Fettkörper) in beschädigte oder degenerierte Knorpelbereiche zu mobilisieren, um dort die Regeneration des Knorpelgewebes zu unterstützen und zu fördern (15, 35). Durch diesen *in situ* Therapieansatz könnte die teure und zeitaufwendige Aufbereitung der MSCs vor einer Injektion in die Gelenkhöhle umgangen werden. Weiterhin könnte diese Therapieoption in einem ambulanten Setting durchgeführt werden und die Anzahl der risikobehafteten Eingriffe für den Patienten minimieren.

Im Rahmen einer Proof-of-Concept-Studie konnte gezeigt werden, dass sich die kombinierte intraartikuläre Applikation von Hyaluronsäure und CCL25 im Vergleich zu einer alleinigen Hyaluronsäure-Injektion protektiv auf den Verlust der Proteoglykane und die morphologischen Veränderungen während der Arthroseprogression im Tiermodell auswirkt (36).

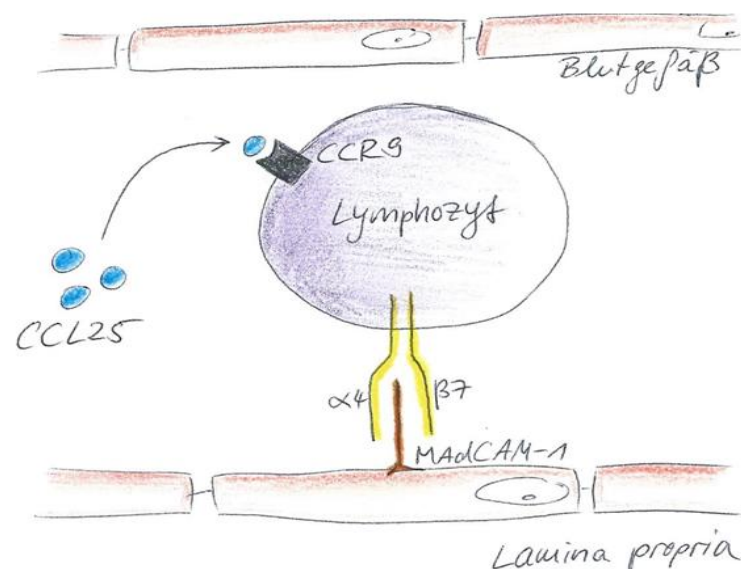
#### **1.4.1 CCL25**

CCL25, unter anderem auch als Thymus Expressed Chemokine (TECK) bezeichnet, gehört zu den Zytokinen und wird aufgrund seiner Cysteinanzahl und -anordnung in der Primärstruktur zu den CC-Chemokinen gezählt. In der Aminosäuresequenz befinden sich zwei aufeinander folgende Cystein-Moleküle am N-terminalen Ende, die jeweils über Disulfidbrücken mit zwei weiteren Cystein-Molekülen innerhalb des Polypeptids verbunden sind (37). Aktuell sind zwei Rezeptoren für CCL25 bekannt, der C-C Motif Chemokine Receptor 9 (CCR9) und der Atypical Chemokine Receptor 4 (ACKR4, auch CCRL1 genannt) (38). Beide gehören zur Familie der membranständigen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Auch wenn atypische Chemokinrezeptoren (ACKRs) eine strukturelle Ähnlichkeit zu den GPCRs aufweisen, kommt es

nach der Chemokinbindung zur G-Protein-unabhängigen Signaltransduktion. Des Weiteren sind sie in der Lage verschiedene Chemokine zu binden. Für den ACKR4 sind aktuell vier Liganden (CCL19, CCL21, CCL25, CXCL13) bekannt (39, 40).

#### 1.4.2 Physiologische und pathophysiologische Funktionen

Die Expression von CCL25 wurde hauptsächlich in dendritischen Zellen des Thymus, Thymusepithelzellen und Epithelzellen des Dünndarms beobachtet (41, 42). Zum einen scheint es innerhalb des Thymusgewebes eine Rolle bei der Migration der heranreifenden T-Lymphozyten zu spielen (43). Zum anderen führt die konstitutive Expressierung von CCL25 im Dünndarm zur Migration von CCR9-positiven T-Lymphozyten in die Lamina propria (44). Es wird angenommen, dass CCL25 in der Schleimhaut des Dünndarms den Zellverkehr der Lymphozyten zwischen dem intravasalen Raum und der Lamina propria reguliert (Abb. 1) (45). Unter normalen Bedingungen wird CCL25 nicht im Dickdarm exprimiert. Bei einer chronischen Entzündung des Dickdarms (Colitis Ulcerosa) jedoch, konnte eine Expression von CCL25 und eine erhöhte Anzahl CCR9-positiver T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Zudem wurde eine Korrelation zwischen der CCL25-Expression und dem endoskopischen Schweregrad der Erkrankung beschrieben (46).



**Abb. 1 Am „Trafficking“ (Zellverkehr) der T-Zellen beteiligte Proteine im Dünndarm.** Das vom Dünndarmepithel gebildete CCL25 bindet an CCR9-positive T-Zellen mit einem  $\alpha 4\beta 7$ -Integrin (gelb) an der Oberfläche. Diese in der Blutbahn zirkulierenden T-Zellen können dann an dem vom Endothel exprimierten Mucosal Vascular Addressin Cell Adhesion Molecule 1 (MAdCAM1) adhären.

Diese Beobachtungen und die Erkenntnis über die am Zellverkehr beteiligten Proteine haben zur Entwicklung und Zulassung von neuen Antikörpern (AK) wie Natalizumab ( $\alpha 4$ -Integrin-AK) und Vedolizumab ( $\alpha 4\beta 7$ -Integrin-AK) für die Therapie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beigetragen (47). CCR9-Inhibitoren wie Vercirnon erzielten bisher noch nicht die erhofften Resultate in den klinischen Studien. Zudem zeigten Untersuchungen bei Mäusen, dass die CCR9/CCL25-Interaktion bei einer Entzündung des Dickdarms protektive Wirkungen haben könnte (48).

Es ist bekannt, dass mehrere Chemokine sowohl konstitutiv exprimiert werden als auch bei Verletzungen, Infektionen oder Entzündungen induziert werden. An den aufgeführten Beispielen zu CCL25 im Thymus und im Gastrointestinaltrakt wird erkennbar, dass es nicht nur im entzündeten, sondern auch im gesunden Gewebe exprimiert wird. Dementsprechend können diesem Chemokin mehrere Funktionen im Körper zugeordnet werden.

Da die Expression von Chemokinen in diversen Zellen durch Zytokine induziert werden kann und sie selbst die Expression von Zytokinen induzieren, wirken Chemokine und ihre Rezeptoren meist als Teil in einem Zytokin-/Chemokinnetzwerk. Darüber hinaus ist mit jedem Jahr die Anzahl der als Chemokine klassifizierten Proteine und das Wissen über deren Rezeptoren, Signalwege und Funktionen gestiegen, was auf eine hohe Komplexität des Chemokinnetzwerkes hindeutet. Sie wirken zudem nicht nur auf Immunzellen, sondern auch auf andere Zelltypen und nehmen an einer Vielzahl von biologischen Prozessen, wie zum Beispiel der Leukozytenmigration, Leukozytendegranulation, Entwicklung von Immunzellen, Angiogenese, Wundheilung und Stammzell-Mobilisierung teil (49-51).

### **1.4.3 Rolle bei neoplastischen Erkrankungen**

Ein weiterer wichtiger Aspekt von Chemokinen ist ihre Beteiligung an der Angiogenese, Proliferation und Metastasierung von Tumoren (52). Im Tumorgewebe von Brustkrebspatientinnen konnte beobachtet werden, dass die Expression bestimmter Chemokinrezeptoren im Vergleich zum normalen Gewebe hoch- oder runterreguliert wurde. Die erhöhte Expressierung von CXCR4 beispielsweise, konnte nicht nur in Zellen des Primärtumors, sondern auch in Lymphknoten-, Lungen- und Lebermetastasen nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass Organe mit einer hohen konstitutiven CXCL12-Expression (Lymphknoten, Lunge, Leber) häufig von einer Brustkrebs-Metastasierung betroffen waren und dass durch den Liganden (CXCL12/SDF1- $\alpha$ ) die *in vitro* Migration der Brustkrebszellen induziert werden konnte (53). In zahlreichen Neoplasien konnten bisher konkrete Expressionsveränderungen von

Chemokinrezeptoren aufgezeigt werden. Auch für CCR9 wurde eine erhöhte Expression in unterschiedlichen Tumorgeweben beschrieben. Dazu zählen unter anderem Ovarialkarzinome (serös-papillär, endometrioid, muzinös), Adeno- und Plattenepithelkarzinome der Lunge (NSCLC) und hepatozelluläre Karzinome (54-56). Es wird angenommen, dass die Interaktion von CCL25 mit CCR9 den PI3K/AKT-Signalweg aktiviert und dadurch anti-apoptotische Prozesse unterstützt werden (57), die wiederum zu einer Chemoresistenz der Tumorzellen beitragen (58-60). Bei Patienten mit Lungenkrebs (NSCLC) konnte eine erhöhte CCL25-Serumkonzentration im Vergleich zu gesunden Patienten, eine Migration von Lungenkrebszellen nach CCL25-Stimulation *in vitro* und eine erhöhte Expression von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) beobachtet werden (61). Dass es zu einer erhöhten Expression von MMPs nach CCL25-Stimulation kommt, wurde auch bei Prostatakarzinom- und Ovarialkarzinomzellen beobachtet (56, 62). Zusammenfassend zeigen diese Beispiele, dass neoplastische Zellen eine veränderte Expression von bestimmten Chemokinrezeptoren aufweisen können und dass Chemokine durch die Aktivierung dieser Chemokinrezeptoren das Gleichgewicht zwischen anti- und pro-tumorösen Reaktionen verschieben können. Innerhalb der Tumormikroumgebung haben Chemokine und ihre Rezeptoren zudem Einfluss auf die Rekrutierung von Immunzellen und stellen alles in allem neue Ziele in der Krebsimmuntherapie dar (63, 64). Dabei stehen derzeit überwiegend Chemokinrezeptor-Inhibitoren im Fokus präklinischer Studien.

### **1.5 Ziel und Fragestellungen dieser Arbeit**

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden im Kontext der Entwicklung eines regenerativen *in situ* Therapieansatzes mit CCL25 und Hyaluronsäure für Knorpelschäden und arthrotische Knorpelveränderungen durchgeführt. Ob und welche Auswirkungen CCL25 auf Chondrozyten und deren Knorpelmatrix hat, ist daher von hoher Relevanz für eine Anwendung des Chemokins in der Gelenkhöhle. Basierend auf den Informationen zu Chemokinen im Allgemeinen und zu CCL25 im gesunden, entzündeten und neoplastischen Gewebe, wurden vor einer beabsichtigten lokalen Applikation von CCL25 in die Gelenkhöhle eine Reihe an Fragen aufgeworfen: Induziert CCL25 in Chondrozyten die Expression weiterer Zytokine und wenn ja welche Auswirkungen könnten diese haben? Werden auch Knorpelzellen durch CCL25 zur Migration angeregt? Kommt es, wie in neoplastischen Zellen beobachtet, nach CCL25-Stimulation von gesunden Knorpelzellen zu einer erhöhten Expression von MMPs und wird dadurch möglicherweise die bestehende Knorpelmatrix degradiert?

Mit den vorhandenen Daten und Informationen zu Beginn dieser Arbeit konnten die möglichen Auswirkungen von CCL25 auf Chondrozyten und deren Knorpelmatrix nicht beurteilt werden. Da

das Chemokin nach bisherigen Ergebnissen jedoch für einen regenerativen *in situ* Therapieansatz geeignet schien, wurde mit den Untersuchungen dieser Arbeit angestrebt, die Auswirkungen von CCL25 auf Chondrozyten und deren synthetisierte extrazelluläre Matrix zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die ersten Untersuchungen zu CCL25 und dessen Auswirkungen auf Knorpelzellen und deren extrazelluläre Matrix porcine Chondrozyten ausgesucht, da porcines Knorpelgewebe in größeren Mengen und in kürzeren zeitlichen Abständen zur Verfügung stand als humanes Knorpelgewebe von gesunden oder arthrotisch veränderten Kniegelenken. Zudem können primäre porcine Chondrozyten in hochdichten 3D-Kulturen über einen längeren Zeitraum kultiviert werden, in welchem sie ihre Morphologie und zellspezifischen Funktionen wie die Kollagen Typ II- und Proteoglykansynthese beibehalten (65). Darüber hinaus wird von den primären porcinen Chondrozyten in den hochdichten 3D-Kulturen eine kartilaginöse Matrix synthetisiert, an dieser eine Degradation der extrazellulären Matrix sowie strukturelle Veränderungen mittels histologischer Färbungen sichtbar gemacht werden können. Zudem konnte gezeigt werden, dass das Genexpressionsmuster von hochdichten porcinen 3D-Kulturen mit den Mustern von porcinem Knorpelgewebe, hochdichten humanen 3D-Kulturen und humanem Knorpelgewebe korreliert. Weiterhin konnten durch die Applikation von TNF- $\alpha$  arthroseähnliche Veränderungen im hochdichten porcinen 3D-Modell initiiert werden (66). Da beabsichtigt wird, CCL25 auch in Gelenken mit arthrotischem Knorpelgewebe anzuwenden, wurde die hochdichte 3D-Kultur aus primären porcinen Chondrozyten als *in vitro* Modell für die ersten Untersuchungen mit CCL25 ausgewählt. Mit dem modifizierten Boyden-Chamber-Assay wurde vorab untersucht, ob rekombinant humanes CCL25 (Dosisbereich 0 – 1000 nmol/l) einen Effekt auf porcine Chondrozyten hat und ob es diese möglicherweise zur gerichteten oder ungerichteten Migration *in vitro* anregen kann.

In bereits veröffentlichten Studien wurde in der Synovialflüssigkeit aus gesunden und arthrotischen Gelenken von Patienten CCL25 nachgewiesen (67), jedoch ist die durchschnittliche Konzentration im Gelenkspalt unter physiologischen und pathologischen Bedingungen unklar. Auch die gemessenen Serumkonzentrationen von Patienten schwanken je nach Publikation stark (61, 68). Daher wurde ein großer Dosisbereich (0 – 500 nmol/l) für die vorliegenden Untersuchungen im porcinen 3D-Modell gewählt, um möglicherweise hohe Konzentrationen in der Gelenkflüssigkeit mit abzudecken und Effekte auf Chondrozyten und deren Matrix zu eruieren. Nach siebentägiger Stimulation mit CCL25 wurde der Proteoglykangehalt mittels Safranin O-Färbung analysiert. Parallel wurden 3D-Kulturen mit CCL25 und TNF- $\alpha$  (0,6 nmol/l) stimuliert und der Proteoglykangehalt nach sieben Tagen mittels Safranin O-Färbung ausgewertet. Zusätzlich wurde die Vitalität der Knorpelzellen in den 3D-Kulturen nach siebentägiger CCL25-

Stimulation (Dosisbereich 0 – 500 nmol/l) mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht, um mögliche zytotoxische Effekte von CCL25 auf porcine Chondrozyten detektieren und quantifizieren zu können. Bereits in mehreren Studien wurde das Expressionsprofil von Chondrozyten aus arthrotischem Knorpelgewebe von Patienten untersucht und publiziert. Um zu eruieren, ob CCL25 an sich eventuell arthroseähnliche Veränderungen hervorruft, wurden die Expressionsprofile der Chondrozyten aus dem 3D-Modell nach CCL25-Stimulation (5 nmol/l, 500 nmol/l) mit publizierten Expressionsdaten von Chondrozyten aus arthrotischem Knorpelgewebe verglichen.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

**Tab. 1 Geräte.**

<b>Anwendung</b>	<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Mikroskop	Olympus CKX41	Olympus
Mikroskop	Olympus CK40,	Olympus
Mikroskop	Olympus CX41	Olympus
Brutschrank	Brutschrank HERA cellTM	Heraeus Instruments
Sterilwerkbank	HERAsafe	Heraeus Instruments
Tischzentrifuge	5810 R	Eppendorf
Mikrotom	CM1900	Leica Biosystems
Rotor-Stator- Homogenisator	TR 12520391	Qiagen Instruments
Photometer	NanoDrop Spektralphotometer ND- 1000	NanoDrop
Elektrophorese	Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies
Elektrophorese	Laborschüttler Model MS3	IKA
Elektrophorese	Chip Vorfüllstation	Agilent Technologies
Thermozykler	Thermocycler PTC-100	MJ Research
Chipscanner	GeneChip® Scanner 3000	Affymetrix
Waschstation	GeneChip® Fluidics Station 450	Affymetrix
Hybridisierungsöfen	GeneChip® Hybridization Oven 645	Affymetrix

### 2.2 Software

**Tab. 2 Software.**

<b>Anwendung</b>	<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Bildaufnahme	ProgResCapturePro V2.8.8	Jenoptik
Bildaufnahme	Software cellSens Entry	Olympus
Bildauswertung	ImageJ 1.43r 2010	National Institutes of Health
Statistik	IBM SPSS Statistics 25.0	International Business Machines Corporation
Datensammlung	Microsoft Excel	Microsoft Corporation
Bildbearbeitung	Adobe Photoshop CS6 64 Bit	Adobe Systems

Bildverarbeitung	ImageJ 1.43r 2010	National Institutes of Health
Photometrie	Software ND-1000V3.7.1	NanoDrop Technologies
Elektrophorese	Bioanalyzer 2100 Expert Software	Agilent Technologies
Mikroarray	FileMaker Pro Advanced 9.0v1	FileMaker Incorporation
Mikroarray	Affymetrix® GeneChip® Command Console® Software (AGCC)	Affymetrix
Mikroarray	Affymetrix GeneChip® Operating Software (GCOS v1.4)	Affymetrix
Datenverwaltung	FileMaker Pro Advanced 9.0v1	FileMaker Incorporation

## 2.3 Kits

**Tab. 3 Kits.**

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Hersteller</b>
Hemacolor® Kit	Hemacolor® Lösung 1 Fixierlösung (Methanol) Hemacolor® Lösung 2 Farbreagenz rot (Azur B) Hemacolor® Lösung 3 Farbreagenz blau (Eosin G) Hemacolor® Puffertabletten pH 7,2	Merck
RNeasy Mini Kit	RNeasy Mini Zentrifugationssäulen Zentrifugationsbecher Sammelgefäß RLT-Puffer RW1-Puffer RPE-Puffer RNase-freies Wasser Quick-Start Protokoll	Qiagen
RNase-Free DNase Set	RNase-freie DNase I (1500 Kunitz Einheiten) RNase-freier RDD-Puffer RNase-freies Wasser	Qiagen
Agilent RNA 6000 Nano Kit	RNA Nano Chips Elektrodenreiniger Eppendorf Safe-Lock Tubes (DNase-/RNase-frei) Spritze	Agilent Technologies



<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Hersteller</b>
	Zentrifugenfilter Agilent RNA 6000 Leiter RNA Nano Farbstoffkonzentrat Agilent RNA 6000 Nano Marker Agilent RNA 6000 Nano Gelmatrix	
3' IVT Amplification Kit Module 1	3' Erststrang-Enzym 3' Erststrang-Puffer 3' Zweitstrand-Enzym 3' Zweitstrang-Puffer 3' IVT Enzym 3' IVT Puffer 3' IVT Biotin Kontrol-RNA (1 mg/mL HeLa total RNA) Nuklease-freies Wasser	Affymetrix
3' IVT Amplification Kit Module 2	3' Fragmentierungspuffer Magnetische Partikel	Affymetrix
GeneChip® Poly-A RNA Control Kit	Poly-A Kontrolle Poly-A Kontroll-Verdünnungspuffer	Affymetrix
GeneChip® Hybridization Control Kit	20X Hybridisierungs-Kontrollen 3 nM Kontroll Oligonuklerotide B2	Affymetrix
GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kit	Prä-Hybridisierungs-Lösung 2X Hybridisierungs-Mix DMSO Nuklease-freies-Wasser Färbelösung 1 Färbelösung 2 Waschpuffer A Waschpuffer B	Affymetrix

## 2.4 Verbrauchsmaterial

**Tab. 4 Verbrauchsmaterial.**

Anwendung	Produktbezeichnung	Hersteller
Migrations-Assay	Chemotaxis-Platten ChemoTx® 106-8	Neuro Probe
Reaktionsgefäße	Eppendorf Safe-Lock Tubes, 2,0 mL	Eppendorf
Objektträger	Super Frost® plus, 25 x 75 x 1 mm <sup>3</sup>	Langenbrinck
Zellsieb	Porengröße 100 µm, Nylon; Falcon®	BD
Spinnerflasche	50 ml	Wheaton
Zentrifugenröhrchen	Falcon-Röhrchen 50 ml	BD
Präzisionswaage	CPA224S-0CE	Sartorius
Einmalskalpell	Feather® Einmalskalpelle	Pfm medical
Magnetrührer	Variomag® Biosystem 4	H+P Labortechnik
Hämocytometer	Neubauer improved	Paul Marienfeld
Kulturflaschen	Falcon Zellkulturflaschen T175	Corning
	Falcon Zellkulturflaschen T75	Corning
	Falcon Zellkulturflaschen T25	Corning
Serologische Pipetten	Falcon Serologische Einweg-Pipetten	BD
Multiwellschale	Falcon Mikrotest 96 Zellkulturplatten	BD
Einbettgeschälchen	Cryomold® Einbettgeschälchen	Sakura
Deckglas	0,13-0,16 mm Dicke	Langenbrinck
Mikroarray-Chips	GeneChip® Porcine Genome Array Array format 100	Affymetrix

## 2.5 Lösungen und Medien

**Tab. 5 Lösungen und Medien.**

Produktbezeichnung	Bestandteile/Konzentration	Hersteller
destilliertes Wasser	H <sub>2</sub> O, pyrogenfrei	Gibco
RPMI 1640 Flüssigmedium mit stabilem Glutamin	300 mg/l L-Glutamin, 2 g/l NaHCO <sub>3</sub> , 25 mM HEPES, 5.5 g/l NaCl, 5 mg/l Phenolrot	Merck
Kulturmedium	500 ml RPMI 1640, 10% FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 170 ng/ml L-	

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Bestandteile/Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
	Ascorbinsäure-2-phosphat	
Hanks gepufferte Salzlösung	ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> , 10 mg/l Phenolrot, 0,35 g/l NaHCO <sub>3</sub>	Merck
Penicillin	10.000 U/ml /	Merck
Streptomycin	10.000 µg/ml	Merck
Ascorbinsäure	L-Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma-Aldrich
FBS	Fetales Kälberserum	Thermo Fisher Scientific
Dulbeccos Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> , 1150 mg/l NaHPO <sub>4</sub> , 200 mg/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
FDA-Gebrauchslösung	3 µg FDA (Sigma-Aldrich) in 1 ml PBS	
PI-Gebrauchslösung	0,1 mg PI (Sigma-Aldrich) in 1ml PBS	
Trypanblau-Lösung	0,4% Trypanblau	Sigma-Aldrich
Ethanol	Ethanol 99%, MEK 1%	Carl Roth
Ethanol	Ethanol 99,9% BAKER ANALYZED™	J.T. Baker
Trypsin/EDTA-Lösung	PBS, 0,5% Trypsin, 0,2% EDTA	Merck
Einbettmedium	Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura
Fast Green-Lösung	0,2% Fast Green FCF (Sigma-Aldrich); 0,3% Essigsäure (Merck), destilliertes Wasser	
Safranin O-Lösung	66% Ethanol (J.T.Baker), 0,7% Safranin O (Sigma-Aldrich); destilliertes Wasser	
Isopropanol	2-Propanol ROTIPURAN® ≥99,8 %,	Carl Roth
Intermedium	Roti®-Histol	Carl Roth
Eindeckmittel	Vitro-Clud®	Langenbrinck
TRI Reagent	Guanidiniumthiocyanat Phenol	Sigma-Aldrich

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Bestandteile/Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
BCP	1-Brom-3-Chlor-Propan	Sigma-Aldrich
Dekontaminationslösung	RNaseZap ®	Ambion

## 2.6 Zytokine und Enzyme

**Tab. 6 Zytokine und Enzyme.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Rekombinant humanes CCL25	300-45	PeproTech
Rekombinant humanes TNF- $\alpha$	690-PT/CF	R&D Systems
Kollagenase Typ 2 CLS 260U/mg	C2-22	Merck
Kollagenase P 1,6 U/mg	11104229	Roche Diagnostics
Hyaluronidase Typ 2	H-2126	Sigma-Aldrich

### **3 Methodik**

#### **3.1 Zellisolierung**

Um Effekte von rekombinant humanem CCL25 und TNF- $\alpha$  auf intraartikuläre Knorpelzellen beobachten zu können, wurde ein etabliertes 3D-Knorpelmodell basierend auf porcinen Chondrozyten genutzt (66). Die porcinen Knorpelzellen wurden zuerst auf eine biologische Reaktion nach CCL25-Stimulaton mit einem Migrations-Assay untersucht und danach der Einfluss auf die extrazelluläre Matrix (EZM) und die Genexpression in der 3D-Kultur.

Für die Zellisolierung wurden vollständige Femurknochen mit intaktem kondylären Knorpel, teilweise noch mit Menisken und Gelenkhaut von einem Fleischereibetrieb mit eigener Schlachtung abgeholt (Fleischerei Staske, Grünauer Straße 63, 12524 Berlin). Das Alter der geschlachteten Hausschweine (*Sus Scrofa domestica*, n = 17 Donoren) lag zwischen drei und sechs Monaten. Während des Transports ins Labor wurden die Knochen verpackt und gekühlt, um die Knorpelflächen vor mechanischem Abrieb und Austrocknung zu schützen. Im Labor wurden die Knorpelflächen freigelegt (Entfernung der Menisken und des Synovialgewebes) und mit PBS gereinigt. Ausgetrocknetes, gefäßreicheres, randständiges, beschädigtes und verfärbtes Knorpelgewebe wurde auf den Femurkondylen belassen. Mit einem Skalpell wurde unter einer Sterilwerkbank hyaliner Knorpel (mind. 3 - 5 Gramm pro Donor) abgetrennt und in einer Petrischale mit Hanks gepufferter Salzlösung gesammelt und gewaschen. Die Knorpelscheiben wurden weiter zerkleinert (2 - 3 mm<sup>2</sup>) und in Spinnerflaschen überführt und mit 30 ml enzymatisch angereichertem Kulturmedium ohne Ascorbinsäure (333,3 U/ml Kollagenase Typ 2, 1 U/ml Kollagenase P, 33,3 U/ml Hyaluronidase Typ 2) für den Matrixabbau überschichtet. So erfolgte der Verdau der EZM auf einem Magnetprüher (120 U/min) für 19 Stunden in einem Begasungsbrutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% relative Luftfeuchtigkeit). Im Anschluss wurde die Zellsuspension unter sterilen Bedingungen durch ein Zellsieb in ein Zentrifugenröhrchen filtriert, um die Chondrozyten von größeren Matrixresten und unverdauten Knorpelstücken zu trennen. Die Zellsuspension wurde mit Hanks gepufferter Salzlösung verdünnt und die Zellen dann abzentrifugiert (561 x g, 10 min, 20°C). Die überstehende Flüssigkeit wurde abgesaugt und das entstandene Zellpellet am Boden der Zentrifugenröhrchen erneut in 50 ml Hanks gepufferter Salzlösung resuspendiert. Zum Schluss wurde die Chondrozytensuspension erneut zentrifugiert (561 x g, 5 min, 20°C), der Überstand verworfen und die Chondrozyten am Röhrchenboden durch Ansaugen und Abgeben von 1 ml RPMI Medium vereinzelt.

### 3.2 Zellzahlbestimmung

Die isolierten Chondrozyten von jedem Donor (n = 17) wurden manuell mit einem Hämocytometer (Neubauer-Kammer) gezählt und die Vitalität mithilfe von Trypanblau bestimmt. Sowohl der Glasträger als auch das Deckglas wurden vorher auf Kratzspuren untersucht und mit 70% Ethanol gereinigt. Beim Anbringen des Deckglases wurde auf die zentrale Positionierung und auf die Entstehung von Newtonringen geachtet. Nach dem Vorbereiten der Neubauer-Kammern, wurden 20 µl der Chondrozytensuspension mit 20 µl Trypanblau-Lösung in einem Reaktionsgefäß gemischt und zügig in die Zählkammer pipettiert. Trypanblau ist ein Farbstoff, der zur Unterscheidung von lebenden und abgestorbenen Zellen genutzt werden kann. Nur die Membran toter Zellen ist für Trypanblau durchlässig, welches dann das Zytoplasma durch eine tiefblaue Färbung markiert (69). Vier große Quadrate (1 mm<sup>2</sup>) wurden im Phasenkontrast bei 10-facher Vergrößerung (Mikroskop CK40, Olympus) ausgezählt und die Zellzahl pro ml mit folgender Formel berechnet (70):

$$\text{Chondrozytenanzahl [ml}^{-1}\text{]} = A * 2 * 10^4$$

10<sup>4</sup> = Kammerfaktor

A = arithmetischer Mittelwert der vier Quadrate

2 = Verdünnungsfaktor der Zellsuspension

Die Vitalität wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{lebende Zellen}}{\text{lebende Zellen} + \text{tote Zellen}} * 100$$

Bei einer Vitalität von 60% oder kleiner, sollten die isolierten Zellen laut Laboranweisung nicht weiter in Versuchen verwendet werden. Bei allen Donoren (n = 17) lag die Vitalität über 60%.

### 3.3 Subkultivierung vor Migrations-Assay

Fünf der insgesamt siebzehn Donoren wurden zufällig für den Migrations-Assay ausgewählt. Die isolierten Chondrozyten der Donoren wurden in einer Monolayer-Kultur in Zellkulturflaschen vermehrt. Von jedem Donor wurden 20.000 frisch isolierte Chondrozyten pro cm<sup>2</sup> in einer Zellkulturflasche mit Kulturmedium ausgesät und mit leicht geöffnetem Schraubverschluss im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% relative Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Die Morphologie,

Adhärenz und Konfluenz der Chondrozyten wurde täglich unter dem Mikroskop (CK40, Olympus) kontrolliert. Bei einer Adhärenz der Zellen erfolgte der Mediumwechsel mit Kulturmedium alle 48 h. Bei einer Konfluenz von 70-80% wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung passagiert. Zuerst wurde das Medium abgenommen und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Die Flaschen wurden je nach Größe mit einer entsprechenden Menge Trypsin (175 cm<sup>2</sup> - 7ml, 75 cm<sup>2</sup> - 4 ml, 25 cm<sup>2</sup> - 1,5 ml) befüllt und während der Einwirkzeit von 5-7 min im Brutschrank aufbewahrt. Noch haftende Chondrozyten wurden nach der Einwirkzeit durch leichtes Klopfen von den Oberflächen gelöst und die Enzymreaktion durch die Zugabe von Medium (Bsp. 175 cm<sup>2</sup> - Flasche 14 ml Kulturmedium) abgebrochen. Die Chondrozytensuspension wurde dann in ein Zentrifugenröhrchen überführt und wie in Kapitel 3.1 und 3.2 beschrieben zentrifugiert, gezählt und wieder entsprechend der Kulturflaschenoberflächen ausgesät. Für den Migrations-Assay wurden subkultivierte Chondrozyten nach drei erfolgten Passagen verwendet.

### **3.4 Migrations-Assay**

Mit einem Migrations-Assay kann eine chemotaktische oder chemokinetische Zellbewegung als Reaktion auf verschiedene CCL25-Konzentrationen untersucht werden.

#### **3.4.1 Durchführung des Migrations-Assays**

Dazu wurde ein modifizierter Boyden-Chamber-Assay durchgeführt, bei dem der Aufbau aus einer transparenten Polystyrol-Kunststoffplatte mit 96 Vertiefungen (Wells), einer Polycarbonat-Filtermembran und einer Kunststoffabdeckung besteht. Die Vertiefungen stellen die untere Kammer des Boyden-Chamber-Assays dar. Befüllt werden die Vertiefungen mit einem Volumen von 37,5 µl (RPMI mit 0,1% FBS), welches unterschiedliche CCL25-Konzentrationen enthält (1000 nmol/l, 500 nmol/l, 250 nmol/l, 100 nmol/l, 10 nmol/l, 1 nmol/l, 0,1 nmol/l, 0 nmol/l). Auf die befüllten Vertiefungen wird eine Filtermembran gelegt. Sie enthält Poren mit einem Durchmesser von 8 µm, damit ist die Membran für aktiv bewegende Zellen passierbar. Anschließend werden je Well 30.000 porcine Chondrozyten in 40 µl RPMI-Medium mit 0,1% FBS auf die Membran pipettiert. Während der Inkubationszeit von 20 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> schützt die Polystyrol-Kunststoffabdeckung das Medium mit den darin enthaltenen Zellen vor dem Verdunsten.

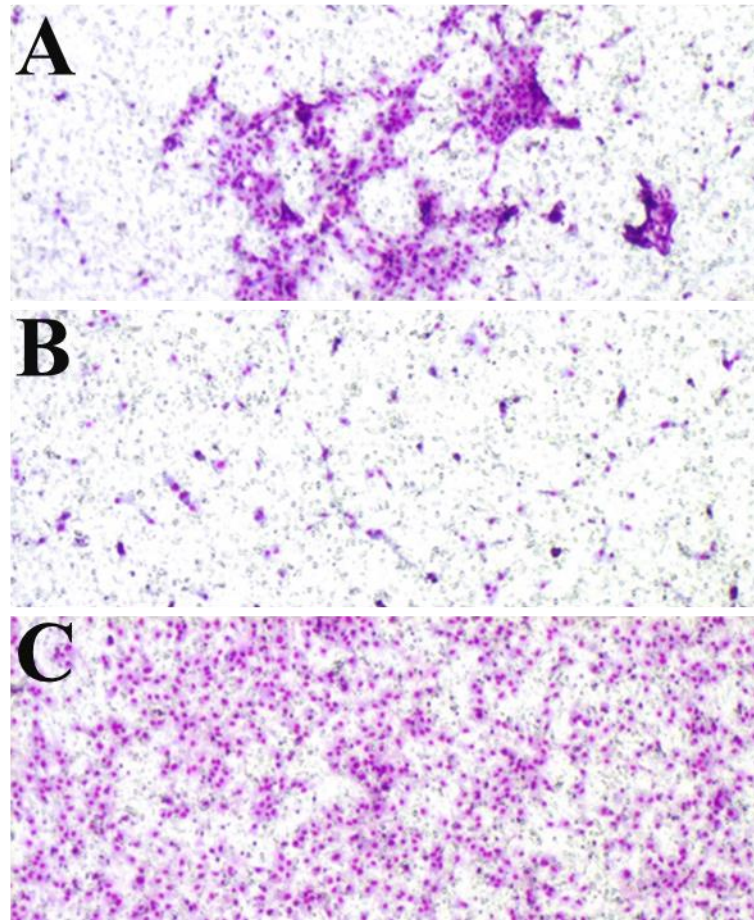
Neben einer Negativkontrolle mit 0 nmol/l CCL25, wurde auch eine Positivkontrolle mit 20%igen RPMI-Medium in den unteren Kammern durchgeführt. Um zwischen einer ungerichteten und einer gerichteten Zellbewegung differenzieren zu können, wurde für die Konzentration von 500

nmol/l eine Chemokinese-Kontrolle ergänzt. Sowohl die untere Kammer als auch das Medium auf der Membran enthielten dabei eine Konzentration von 500 nmol/l CCL25.

### **3.4.2 Quantifizierung der migrierten Chondrozyten**

Nach der Inkubationszeit wurde die Filtermembran von der Kunststoffplatte abgenommen und für 3 min in 100%iges Methanol gelegt, um adhärenente Zellen auf der Polycarbonatmembran zu fixieren. Chondrozyten besitzen die Eigenschaft nach der Migration an der Membranunterseite haften zu bleiben. Die Zellen auf der Oberseite (nicht migriert) werden mit einem in Chemotaxispuffer benetzten Wattestäbchen entfernt. Um die Zellen für die Zählung mikroskopisch sichtbar zu machen, folgt eine Färbung mit einer Azur B-Lösung für 1,5 min und einer Eosin G-Lösung für 1 min (Hemacolor® Schnellfärbekit). Die beiden Farbstoffe bilden einen Eosin G-Azur B-DNA-Komplex, der die Zellkerne rotviolett erscheinen lässt. Die Kerne der Chondrozyten heben sich optisch vom blauviolett angefärbten Zytoplasma ab (Abb. 2). Nicht gebundene Farbstoffreste wurden mit Chemotaxispuffer (pH-Wert 7,2) ausgewaschen. Mittig der Membranflächen wurde eine Aufnahme in 4-facher Vergrößerung mit einem Hellfeldmikroskop (Olympus CKX41) angefertigt und im TIF-Format gespeichert (ProgResCapturePro V2.8.8 Software). Dabei entspricht das aufgenommene Bild 14,6% der gesamten Wellfläche. Zum manuellen Zählen wurde die Datei im ImageJ-Programm geöffnet und mit dem Cell Counter Plugin die einzelnen Zellen markiert. Die Anzahl der markierten Chondrozyten pro Aufnahme wurde in einer Exceltabelle „CTX\_Manual Count“ notiert. Für die Auswertung wurde die Anzahl der Zellen nicht auf die gesamte Wellfläche hochgerechnet, weil beim Mikroskopieren auffiel, dass sich die Chondrozyten an der Unterseite der Membran vermehrt in der Mitte des Wells sammeln und die Randbereiche zellärmer sind. Zudem bildeten manche Chondrozyten dichte Zellnester in der Wellmitte aus, während im Randbereich nur vereinzelt Chondrozyten zu sehen waren (Abb. 2 A), was die Zellzahl bei einer Hochrechnung auf die Gesamtfläche erhöhen würde.





**Abb. 2 Aufnahmen aus der Wellmitte mit angefärbten porcinen Chondrozyten.**  
**A** ungleichmäßige Verteilung mit Bildung von Zellnestern in der Wellmitte. **B** gleichmäßige Verteilung in der Wellmitte. **C** gleichmäßige Verteilung in der Wellmitte bei einer Serumkontrolle.

### 3.4.3 Statistische Auswertung des Migrations-Assays

Insgesamt wurde der modifizierte Boyden-Chamber-Assay für fünf zufällig ausgewählte Donoren durchgeführt. An jedem Donor ( $n = 5$ ) wurden zehn verschiedene Konzentrationen getestet (1000, 500, 250, 100, 10, 1, 0,1, 0 nmol/l als Negativkontrolle, 500 nmol/l Chemokinese-Kontrolle, Positivkontrolle). Dabei wurde jede Konzentration als Triplets pipettiert, sodass immer drei Messwerte für die Auswertung zur Verfügung standen. In der Auswertung mit SPSS (IBM SPSS Statistics 25.0) wurde dann mit den Mittelwerten aus den drei Messwerten jedes Donors und jeder Bedingung gerechnet. Die graphische Darstellung zeigt den Mittelwert aller Donoren mit einem Konfidenzintervall von 95%. Aufgrund der wenigen Donoren ( $n \leq 30$ ) wird eine nicht-parametrische Verteilung angenommen. Als statistischer Test wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für abhängige Stichproben angewendet. Da sich die Bewegung der Zellen in Gegenwart

von Zytokinen sowohl steigern als auch verringern könnte, wurde ein zweiseitiger Hypothesentest durchgeführt. Bei einem p-Wert  $< 0,05$  wurde die Nullhypothese abgelehnt. Die beschriebene Auswertung wurde auch für den Vergleich zwischen Chemokinese-Kontrolle und 500 nmol/l CCL25 und der Negativkontrolle angewendet.

### **3.5 3D-Zellkultur**

Nach der Isolation und Zellzahlbestimmung wurden die Chondrozyten von 12 der insgesamt 17 Donoren für vier Experimente ( $n = 4$ ) zufällig ausgewählt. Für ein Experiment wurden Zellen von drei zufällig ausgewählte Donoren zu gleichen Anteilen in Kulturmedium gepoolt. Danach wurden jeweils  $6 \times 10^5$  in 200  $\mu$ l Kulturmedium gepoolten Chondrozyten in die Vertiefungen der Multiwellschalen pipettiert und abgedeckt für 14 Tage im Brutschrank inkubiert. Randständige Vertiefungen sowie Vertiefungen zwischen unterschiedlichen Konzentrationen wurden freigelassen. Das Kulturmedium wurde alle 24 h gewechselt. Innerhalb der ersten 14 Tage konnten sich die Chondrozyten am Boden absetzen, adhären und bereits eine makroskopisch sichtbare, dünne Matrix synthetisieren (Pellets).

#### **3.5.1 Stimulation mit CCL25**

Nach 14 Tagen wurden die Pellets für 7 Tage mit fünf verschiedenen CCL25-Konzentrationen im Kulturmedium stimuliert (0 nmol, 0,05 nmol/l, 0,5 nmol/l, 5 nmol/l, 50 nmol/l, 500 nmol/l CCL25). In einem Experiment wurden für eine Konzentration vier Pellets für die RNA-Isolation, ein Pellet für die Safranin-Färbung und ein Pellet für die Vitalfärbung angezüchtet. Der Mediumwechsel erfolgte alle 24 h.

#### **3.5.2 Stimulation mit CCL25 und TNF- $\alpha$**

Parallel wurde die gleiche Anzahl an Pellets für 7 Tage mit sechs verschiedenen CCL25-Konzentrationen im Kulturmedium (0 nmol, 0,05 nmol/l, 0,5 nmol/l, 5 nmol/l, 50 nmol/l, 500 nmol/l) in Kombination mit 0,6 nmol/l TNF- $\alpha$  stimuliert. Der Mediumwechsel erfolgte ebenfalls alle 24 h.

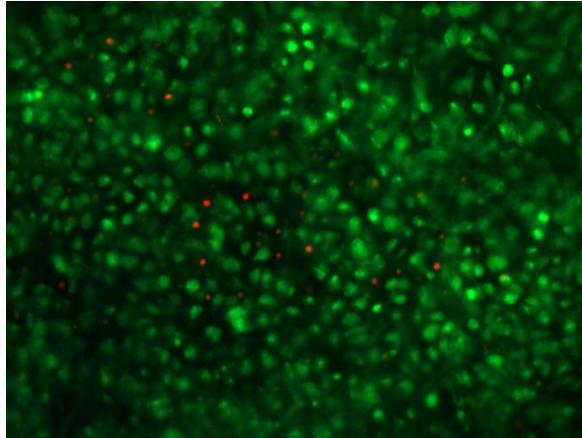
### **3.6 Vitalfärbung**

Um lebende und tote Chondrozyten in den 3D-Kulturen nach Stimulation mit verschiedenen CCL25-Konzentrationen (0 nmol/l, 0,05 nmol/l, 0,5 nmol/l, 5 nmol/l, 50 nmol/l, 500 nmol/l) ohne und mit TNF- $\alpha$  (0,6 nmol/l) zu markieren, erfolgte eine Doppelfärbung mit

Fluoresceindiacetat (FDA) und Propidiumjodid (PI). Dafür wurden die 3D-Zellkulturen von den 96-Well-Platten gelöst und in einzelne Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Pellets dreimal mit 1,5 ml PBS gespült und für 15 min mit 500 µl FDA-Gebrauchslösung gefärbt. FDA kann über die Zellmembran lebender Zellen diffundieren und wird im Zytoplasma durch Esterasen gespalten. Das entstandene grün-fluoreszierende Fluorescein kann nicht durch die intakte Membran lebender Zellen rausdiffundieren. Somit eignet sich FDA zur Markierung des Zytoplasmas lebender Zellen (71). Nach der Reaktionszeit von 15 min wurden die einzelnen Pellets zweimal mit PBS gewaschen, um Fluorochromreste zu entfernen, und für 2 min mit 500 µl PI-Gebrauchslösung versetzt. PI kann die intakte Membran lebender Zellen nicht passieren. Bei apoptotischen oder nekrotischen Zellen verändert sich die Zellmembranstruktur, welche dann für PI durchlässig wird. Dieser rot-fluoreszierende Farbstoff interkaliert mit den Basen der DNA-Stränge und markiert folglich die Zellkerne der zu untersuchenden Chondrozyten (72). Nach der Reaktionszeit wurden die Pellets noch zweimal mit PBS gewaschen. Alle beschriebenen Schritte fanden bei Raumtemperatur, im Dunkeln und unter unsterilen Bedingungen statt.

### **3.6.1 Fluoreszenzmikroskopie**

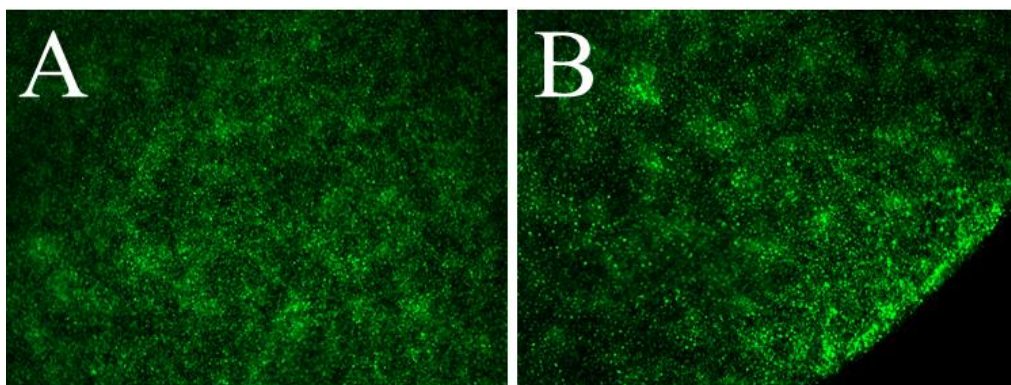
Die Pellets wurden einzeln auf einen Objektträger gelegt und mit dem Fluoreszenzmikroskop CKX41 (Olympus) analysiert (Abb. 3). Da die Absorptionsmaxima von Fluorescein bei 494 nm und von PI nach der Interkalation bei 535 nm liegen, wurde ein Blaufilter (460-490 nm) für die simultane Anregung verwendet. Mit dem verwendeten Sperrfilter wurden Wellenlängen unter 520 nm und somit auch das Anregungslicht blockiert. Tote Zellen fluoreszierten aufgrund des Emissionsmaximums nach der Interkalation von PI rot (617 nm), während lebende Zellen aufgrund des Emissionsmaximums von Fluorescein grün fluoreszierten (520 nm).



**Abb. 3 Pellet mit Vitalfärbung.** Aufnahme von einem Pellet mit dem Fluoreszenzmikroskop aus Experiment 2 in 10-facher Vergrößerung. Zu sehen sind die rot-fluoreszierenden Zellkerne toter Chondrozyten und das grün-fluoreszierende Zytoplasma lebender Chondrozyten.

### 3.6.2 Auswertung der Vitalfärbung

Da sich in der 3D-Kultur deutlich mehr Zellen als beim Migrations-Assay befanden, wurden die Zellen automatisch gezählt. Dafür wurden von jedem Pellet zwei Aufnahmen in 4-facher Vergrößerung, eins vom Rand und eins von der Mitte, angefertigt (Abb. 4). Diese bildeten jeweils 5-10% der Pelletoberfläche ab und wurden mit der Bildaufnahme-Software ProgResCapturePro V2.8.8 im TIF-Format gespeichert.



**Abb. 4 Pelletaufnahmen nach Vitalfärbung.** Zwei Aufnahmen von Pellets mit Lebend-Tod-Färbung aus Experiment 2 in 4-facher Vergrößerung. **A** Aufnahme von der Mitte der Pelletoberfläche. **B** Aufnahme vom Rand der Pelletoberfläche.

Die Aufnahmen wurden im ImageJ 1.43r Programm geöffnet und die Chondrozyten mit dem Analyzer Plugin im RGB-Modus automatisch separat im grünen und roten Kanal gezählt. Die

Anzahl der rot-fluoreszierenden Zellen und der grün-fluoreszierenden Zellen wurden in der Exceldatei „HV PiFDA Auswertung LL“ notiert. In der graphischen Darstellung ist der Mittelwert der Vitalität aus den zwei Aufnahmen eines Pellets abgetragen. Die Vitalität wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Vitalität [\%]} = \left( \frac{\text{Anzahl grüner Zellen}}{\text{Anzahl roter Zellen} + \text{Anzahl grüner Zellen}} \right) * 100$$

### **3.7 Safranin O/Fast Green-Färbung**

Nach siebentägiger Stimulation mit unterschiedlichen CCL25-Konzentrationen (0 nmol/l, 0,05 nmol/l, 0,5 nmol/l, 5 nmol/l, 50 nmol/l, 500 nmol/l) allein oder in Kombination mit TNF- $\alpha$  (0,6 nmol/l) wurden die Pellets vorsichtig aus den Vertiefungen der Multiwellschalen herausgelöst und mit einem Einmalskalpell in der Mitte geteilt. Die Hälften wurden in Einbettmedium positioniert und über flüssigem Stickstoff (-170°C) gefroren. Die Probenlagerung erfolgte bei -80°C. Vor dem Herstellen der Gefrierschnitte (Schnittdicke 8  $\mu\text{m}$ ) am Mikrotom wurden die Proben für 24 h bei -20°C gelagert.

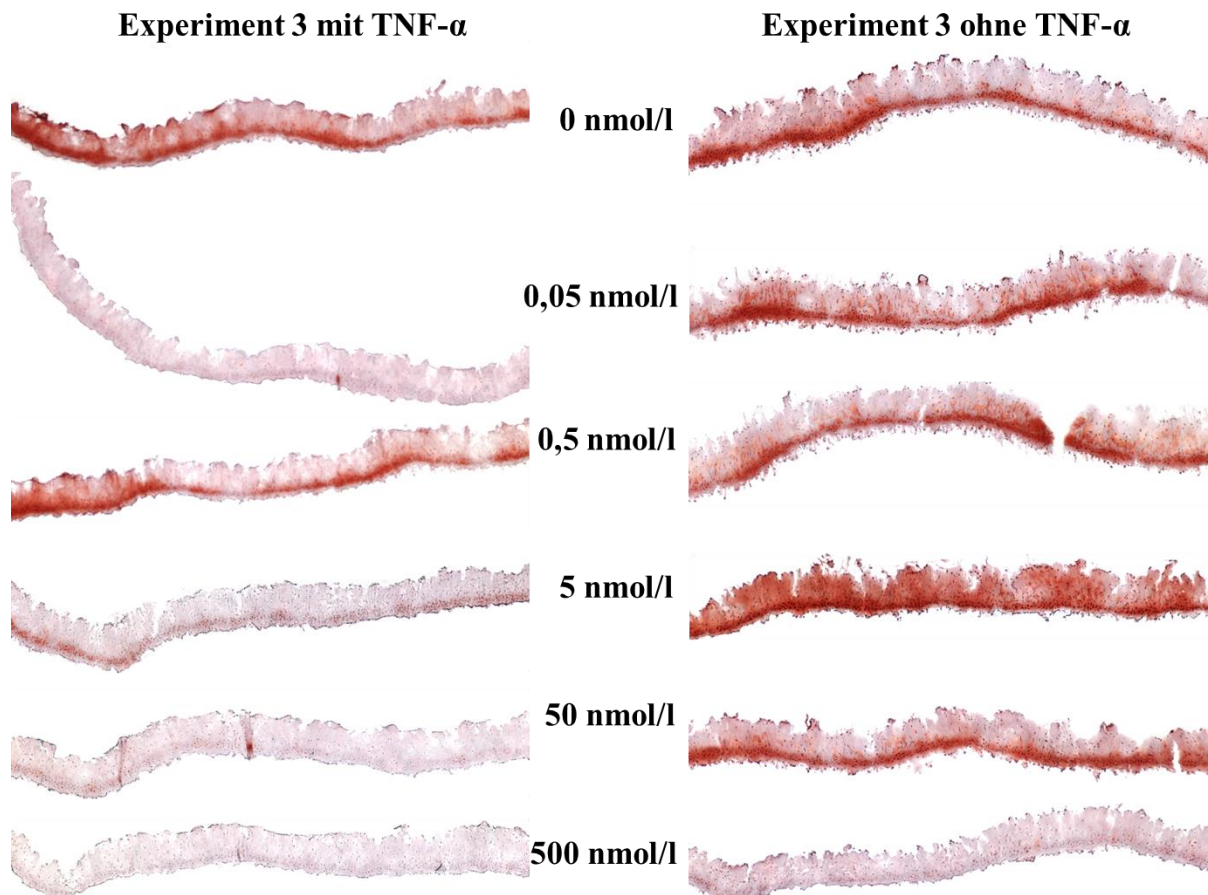
Die Pelletschnitte wurden vor der Färbung für 15 min bei Raumtemperatur auf den Glasobjektträgern getrocknet und anschließend für 5 min mit 92%igem Ethanol gewaschen und fixiert. Danach wurden die Glykosaminoglykane (GAG) für 20 min mit Safranin O-Lösung angefärbt und die Farbstoffreste wiederholt mit Leitungswasser ausgewaschen. Proteinreiche Zellstrukturen wurden für 1 min mit einer Fast Green-Lösung gefärbt und mehrmals mit Leitungswasser gewaschen. Die gefärbten Pelletschnitte wurden nun mit Isopropanol entwässert und fixiert (5 min 96% Isopropanol, 5 min 100% Isopropanol). Zum Schluss wurden die Präparate für 2 min in ein Intermedium (Roti®-Histol) gestellt und mit einem Eindeckmittel (Vitro-Clud®) unter dem Deckglas haltbar gemacht. Alle Schritte der Färbung wurden bei Raumtemperatur und unter dem Abzug durchgeführt.

#### **3.7.1 Quantifizierung der Glykosaminoglykane (GAG)**

In der histomorphometrischen Analyse wurde Safranin O-Lösung verwendet, weil die Intensität der Färbung mit dem GAG-Gehalt in der Knorpelmatrix korreliert (73, 74). Für jede Konzentrationen wurde versucht, zwei Objektträger mit insgesamt sechs Gefrierschnitten herzustellen. Aufgenommen wurden die Präparate in 4-facher Vergrößerung mit dem Mikroskop Olympus CX41 und dem Programm Software cellSens Entry (Olympus). Die Aufnahmen wurden im TIF-Format gespeichert. Damit bei der Pixelauswertung Rückstände, Bläschen oder



Schmutzpartikel auf den Objektträgern nicht mit ausgewertet werden, wurden die Pellets mit dem Programm Adobe Photoshop ausgeschnitten, auf einen weißen Hintergrund kopiert und erneut im TIF-Format gespeichert (Abb. 5).



**Abb. 5 Pelletschnitte nach Safranin O/Fast Green-Färbung.** Aufnahmen von einzelnen repräsentativen Pelletschnitten nach siebentägiger Stimulation mit verschiedenen CCL25-Konzentrationen (0 nmol/l, 0,05 nmol/l, 0,5 nmol/l, 5 nmol/l, 50 nmol/l, 500 nmol/l) allein oder in Kombination mit TNF- $\alpha$  (0,6 nmol/l) aus Experiment 3. **Links** Stimulation mit CCL25 und TNF- $\alpha$ . **Rechts** Stimulation mit CCL25.

Die Aufnahmen wurden mit dem Programm ImageJ 1.43r weiterverarbeitet. Jedem Pixel wurden entsprechend dem Rot-Grün-Blau-Farbraum (RGB-Farbraum) Werte zugeordnet. Ein schwarzes Pixel wird mit den Werten 0/0/0, ein weißes Pixel mit den Werten 255/255/255 und ein rotes Pixel zum Beispiel mit den Werten 240/30/80 beschrieben. Ein optimal rotes Pixel hätte die Werte 255/0/0. Sind die Werte der drei Farbanteile annähernd gleich oder übereinstimmend, erscheint

der Bildpunkt grau bzw. gräulich. Für eine Aufnahme von einem gefärbten Pelletschnitt wurde am Ende ein Rotwert für die Quantifizierung des GAG-Gehalts berechnet. Zuerst wurde definiert, wann ein Pixel rot ist. Ein Pixel wurde als rot gewertet, wenn das Zweifache des Rotanteils größer war als die Summe aus dem Grün- und dem Blauanteil ( $2 \times \text{Rotanteil} > \text{Grünanteil} + \text{Blauanteil}$ ). Der Grenzwert von 2 wurde durch das Testen von verschiedenen Grenzwerten ermittelt. Je kleiner der Grenzwert, desto weniger Pixel wurden als rot gewertet. Je größer der Grenzwert, desto mehr Pixel wurden als rot gewertet. Danach wurde aus den drei Farbanteilwerten für jedes rot gewertete Pixel ein Einzelwert gebildet ( $\text{Einzelwert} = 2 \times \text{Rotanteil} - \text{Grünanteil} - \text{Blauanteil}$ ). Der niedrigste mögliche Einzelwert war 1 und der höchste 510. Zum Schluss wurde der durchschnittliche Rotwert für einen angefärbten Pelletschnitt mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Rotwert} = \frac{\text{Summe der Einzelwerte aller roten Pixel}}{\text{Anzahl aller Pixel} - \text{weiße Pixel}}$$

Das Vorgehen basiert auf einer bereits publizierten Arbeit mit 3D-Zellkulturen aus porcinen Chondrozyten (66).

### 3.7.2 Statistische Auswertung des GAG-Gehalts

In einem Experiment wurden in der Regel für eine Konzentration sechs Pelletschnitte ausgewertet. Diese sechs Rotwerte wurden zusammen mit den Rotwerten aus den restlichen Experimenten ( $n_{\text{gesamt}} = 4$ ) in einem Box-Plot graphisch dargestellt. Im Diagramm wurde farblich zwischen den 3D-Kulturen mit alleiniger (CCL25) und kombinierter (CCL25 und TNF- $\alpha$ ) Stimulation unterschieden. Die Ausreißer wurden mit den zugehörigen Rotwerten beschriftet. Beim Übertragen der Gefrierschnitte auf den Objektträger konnte es zu Stauchungen oder Faltenbildungen in den Präparaten kommen, welche nach dem Färben mit Safranin O stärker angefärbt waren. Ein anderer Grund für Ausreißer nach oben bei den Rotwerten könnten auch Temperaturschwankungen im Mikrotom gewesen sein, wodurch die Schnittdicke der Präparate variieren kann. Durch Rissbildung beim Gefrieren des Einbettmediums, Bläschen im Einbettmedium oder einer sehr dünnen extrazellulären Matrix der Pelletschnitte konnten nicht von jeder Probe sechs Schnitte für die Auswertung hergestellt werden.

## 3.8 RNA-Isolierung

Aus den Experimenten ( $n = 4$ ) wurden von den Konzentration 0, 5, 500 nmol/l CCL25 ohne TNF jeweils vier 3D-Zellkulturen aus den Multiwellschalen entnommen und für eine

Genexpressionsanalyse weiterverarbeitet. Zu diesem Zeitpunkt waren die Pellets sieben Tage lang mit den aufgeführten Konzentrationen von CCL25 stimuliert worden. Für die RNA-Isolierung wurden die Proben in beschrifteten 4,5 ml Kryoröhrchen mit flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C im Tiefkühler gelagert.

### **3.8.1 RNA-Extraktion**

Zuerst wurden die extrazelluläre Matrix, die Zellwände und die Zellorganellen mit einem TissueRuptor unter Zugabe von 1 ml TRI-Reagent mechanisch und chemisch aufgeschlossen. Die Proben wurden während des Zellaufschlusses unter dem Abzug auf Eis gelagert. TRI-Reagent ist eine Lösung, in der Guanidiniumthiocyanat und Phenol enthalten sind. Ersteres denaturiert die Ribonukleinasen und verhindert somit die Degradation der intakten RNA in den Proben. Letzteres führt zu einer Denaturierung von Proteinen. Die denaturierten Proteine sind später als Interphase zwischen der wässrigen und organischen Phase sichtbar. Danach wurden die Proben mit 133 µl 1-Brom-3-chlorpropan als Alternative zum denaturierenden Chloroform versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden die Lösungen in den Reaktionsgefäßen für 60 min (bei 4°C, 13.000 g) zentrifugiert. Dadurch wurden die Lösungen in eine obere wässrige, RNA-enhaltende Phase, eine Interphase und eine untere organische, phenol- und chlorpropanhaltige Phase aufgetrennt. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und der Rest verworfen. Alle weiteren Schritte entsprechen denen des RNeasy Mini Kits (Qiagen).

### **3.8.2 RNA-Präzipitation und DNA-Verdau**

Für die weitere Aufbereitung der RNA wurde zur wässrigen Phase das gleiche Volumen an 70%igem Ethanol dazugegeben. Davon wurden maximal 700 µl abpipettiert und in Zentrifugationssäulen mit einer Silikamembran gegeben. Nach der Zentrifugation (15 s, 10.000 g) wurde der Durchfluss in den Zentrifugationsbechern verworfen und der Vorgang solange wiederholt, bis das Ausgangsvolumen aufgebraucht wurde. Um eine Verunreinigung mit DNA zu vermeiden, wurde ein weiterer Reinigungsschritt mit Desoxyribonuklease I (DNase I) durchgeführt. Zuerst wurden 350 µl RW1-Puffer durch die Silikamembran zentrifugiert (15 s, 10.000 g) und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurden 10 µl DNase-Lösung (Enzymaktivität von 2,7 Kunitz Einheiten/µl) mit 70µl RDD-Puffer gemischt, direkt auf die Silikamembran aufgetragen und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden 350µl RW1-Puffer in die Zentrifugationssäulen gegeben und die Silikamembranen für 15 s bei 10.000 g gewaschen.



### **3.8.3 Abschließende Präparation der RNA**

Bevor die RNA von der Silikamembran eluiert werden konnte, wurde die Silikamembran zweimal mit RPE-Puffer gewaschen (15s, 10.000 g), um Ethanolreste zu entfernen, und der Durchfluss in den Zentrifugationsbecher jeweils verworfen. Die Zentrifugationssäulen wurden in ein neues Sammelgefäß überführt und für 1 min zentrifugiert, um Puffer- und Durchflussreste zu entfernen. Zum Schluss wurden die Zentrifugationssäulen in ein neues Sammelgefäß gesteckt und die RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert (1 min, 10.000 g). Die Zentrifugationssäulen mit der Silikamembran wurden verworfen und die RNA in den Sammelgefäßen auf Eis gelagert.

### **3.8.4 RNA-Konzentrationsbestimmung**

Um die Konzentration der Nukleinsäurelösungen in den Proben zu bestimmen, wurde eine photometrische Messung mit dem NanoDrop Spektrophotometer durchgeführt. Die aromatischen Ringe der Basen Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin (DNA) und Uracil (RNA) besitzen individuelle Absorptionsmaxima. Nukleinsäuren besitzen daher ein daraus entstandenes Absorptionsmaximum, welches für DNA und RNA bei 260 nm liegt. Für die Messung wurden jeweils 1,5 µl von den Proben entnommen und auf den Messsockel pipettiert. Durch die NanoDrop Software wurde dann die Nukleinsäurekonzentration mit einer modifizierten Beer-Lambert-Gleichung berechnet.

### **3.8.5 RNA-Reinheit**

Nach Messung der einzelnen Proben wurden deren Absorptionsspektren mit der NanoDrop Software abgebildet. Ein typisches Nukleinsäurespektrum hat einen Tiefpunkt bei einer Wellenlänge von 230 nm und einen Hochpunkt bei 260 nm. Bei Verunreinigungen der Proben mit Proteinen kommt es zu einem zusätzlichen Absorptionsextrem, welches bei 280 nm liegt. Um die Reinheit der Proben hinsichtlich einer Verunreinigung mit Proteinen zu ermitteln, wurde ein Quotient aus der Absorption bei 260 und 280 nm gebildet (Reinheitsverhältnis). Auch Extraktionsrückstände, wie zum Beispiel Phenol und Guanidiniumthiocyanat verändern das Nukleinsäurespektrum. Restmengen von diesen Extraktionsreagenzien bewirken eine Veränderung der Absorption bei 230 nm, wodurch eine Verunreinigung aus dem Quotienten der Absorption bei 260 und 230 nm abgeleitet werden kann. Eine RNA-Lösung gilt als rein, wenn der Quotient einen Wert von 2,0 annimmt.

### 3.8.6 RNA-Qualität

Die Qualität der isolierten RNA wurde mittels Mikrochip-Kapillargelelektrophorese untersucht. Hierbei wurden die verschieden langen rRNA-Fragmente (28S, 18S, 5S) gefärbt, aufgetrennt und analysiert. RNA-Proben mit einem 28S-18S-Verhältnis von 2:1 gelten als wenig degradiert. Bei der rRNA-Degradation kommt es zu einem schnelleren Abbau der 28S-RNA in kleinere Fragmente, wodurch sich das 28S-18S-Verhältnis verändert. Zudem wird mit der Agilent 2100 Expert Software ein RIN-Wert (RNA Integrity Number) von 1 bis 10 berechnet. Hierzu wurden verschiedene Bereiche (Pre-, 5S-, Fast-, Inter-, Precursor-, Post-Region) und Peaks (Low-Marker, High-Marker, 28S, 18S) des Elektropherogramms in den Algorithmus der Software einbezogen. Ein RIN-Wert von 1 steht für degradierte RNA und ein RIN-Wert von 10 für intakte RNA.

Für die Untersuchung der RNA-Qualität wurde der Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies) und das RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) verwendet. Zuerst wurden die Elektroden des Bioanalyzers 2100 mit 350 µl RNaseZap und 350 µl RNase-freien Wasser gereinigt und die Vorfüllstation für die Mikrochips vorbereitet. Danach wurde die RNA 6000 Nano Gelmatrix durch einen Filter zentrifugiert (10 min, 1500 g), davon 65 µl in RNase-freie Reaktionsgefäße abpipettiert und mit 1 µl RNA 6000 Nano Farbstoffkonzentrat gemischt. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurden 9 µl der Gelmatrix-Farbstoffmischung mit der Vorfüllstation in den RNA Nano Chip gepresst. Der RNA 6000 Nano Marker (jeweils 5 µl) wurde in die Vertiefungen für die RNA-Proben und die RNA-Leiter pipettiert. Bevor die RNA-Proben (jeweils 1 µl) und die RNA-Leiter (1 µl) in die Vertiefungen pipettiert wurden, wurden diese für 2 min bei 70°C denaturiert. Nachdem die Vertiefungen befüllt wurden, wurde der RNA Nano Chip für 60 s geschüttelt (IKA Vibrationsmischer), mit dem Bioanalyser 2100 analysiert und mit der Software Bioanalyser 2100 Expert das 28S-18S-Verhältnis und der RIN-Wert berechnet (Tab. 7).

**Tab. 7 28S-18S-Verhältnis/RIN der RNA-Proben nach RNA-Isolierung.**

Konzentration	Experiment	Experiment	Experiment	Experiment
CCL25 (nmol/l)	1	2	3	4
500	2,4/*	2,3/9,7	2,3/9,5	2,1/9,3
5	2,7/9,1	2,4/9,3	2,3/9,6	2,0/9,8
0	2,5/9,5	2,4/9,8	2,2/9,8	2,8/10

\* kein RIN-Wert berechnet

### **3.9 Genexpressionsanalyse**

Nachdem die RNA aus den 3D-Kulturen der Experimente ( $n = 4$ ) für die Konzentrationen 0, 5, 500 nmol/l CCL25 ohne TNF isoliert wurde, wurden die RNA-Proben gepoolt. Dazu wurden die RNA-Mengen der Pellets, die mit derselben Konzentration von CCL25 und TNF-alpha stimuliert wurden, zu gleichen Anteilen in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Für die Genexpressionsanalyse wurde der DNA-Mikroarray (GeneChip® Porcine Genome Array) von Affymetrix verwendet, auf dessen Glasplatten Oligonukleotide mit einer Länge von 25 Basen synthetisiert wurden. An diese auf der Oberfläche gebundenen Oligonukleotide konnten die aus den gepoolten RNA-Proben generierten cRNA-Fragmente simultan hybridisieren und durch deren vorherige Markierung anschließend detektiert werden. So können Veränderungen der Genexpression in den Chondrozyten als Reaktion auf unterschiedliche CCL25-Konzentrationen zu einem bestimmten Zeitpunkt (nach siebentägiger Stimulation) erfasst werden, indem durch paarweise Vergleiche signifikante Unterschiede in der Intensität der Markierung gesucht werden. Laut Herstellerangaben können mit dem Porcine Genome Array 23.256 Transkripte von circa 20.201 Sus-Scrofa-Genen ausgelesen werden. Die aufwändige Durchführung der Analyse nach Herstellerprotokoll erfolgte bis zum Speichern der detektierten Daten durch eine erfahrene medizinisch-technische Assistentin (Anja Fleischmann). Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der Genexpressionsanalyse zusammengefasst wiedergegeben.

#### **3.9.1 Synthese der cRNA**

Zuerst wurde eine Erststrang-cDNA synthetisiert. Dafür wurden die gepoolten RNA-Proben mit einem T7-Oligo(dT)-Primer und einer reversen Transkriptase für 2h bei 42°C und für 2 min bei 4°C im Thermocycler inkubiert. Danach folgte die Synthese einer Doppelstrang-cDNA durch eine DNA-Polymerase und gleichzeitig die Degradation der in den Proben enthaltenen RNA mit RNase H. Dafür wurden die Proben für eine Stunde bei 16°C, dann für 10 min bei 65°C und abschließend für 2 min bei 4°C im Thermocycler inkubiert. Im nächsten Schritt wurde im Rahmen einer *in vitro* Transkription (IVT) eine mit Biotin markierte cRNA mittels T7-RNA-Polymerase hergestellt. Die Reaktionsgefäße wurden für 4 Stunden bei 40°C im Thermocycler inkubiert und anschließend auf Eis gelagert.

#### **3.9.2 Aufreinigung und Fragmentierung der cRNA**

Nach der cRNA-Synthese wurden Enzyme, Salze, anorganisches Phosphat und ungebundene

Nukleotide aus den Proben entfernt. Dafür wurden 100µl einer vorbereiteten Lösung mit magnetischen Partikeln in die cRNA-Proben pipettiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit banden die magnetischen Partikel an die in den Proben enthaltene cRNA. Danach wurden die magnetischen Partikel mit Hilfe eines Magnetstands am Rand der Reaktionsgefäße gesammelt. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Nach mehreren Wasch-Schritten mit 80%igem Ethanol wurden die Reaktionsgefäße vom Magnetstand genommen und mit Nuklease-freiem Wasser (65°C) befüllt und für eine Minute inkubiert. Mit diesem Schritt wurden die magnetischen Partikel von der cRNA gelöst. Die Proben wurden abschließend wieder auf den Magnetstand überführt, um die magnetischen Partikel am Rand der Reaktionsgefäße zu sammeln. Der Überstand mit der darin enthaltenen gereinigten cRNA wurde dann in ein neues Nuklease-freies Reaktionsgefäß pipettiert und auf Eis gelagert.

Vor der Fragmentierung wurde die cRNA-Konzentration und die Reinheit der einzelnen Proben mit dem NanoDrop Spektrophotometer bestimmt (Tab. 8).

**Tab. 8 Ergebnisse der Konzentrations- und Reinheitsanalyse.**

Konzentration	cRNA	cRNA	Absorptionsquotient	
CCL25 (nmol/l)	(ng/µl)	(µg/25,6 µl)*	260/280	260/230
500	1127,9	29,34	2,07	2,35
5	1056,4	27,47	2,07	2,34
0	968,9	25,19	2,06	2,36

\* Gesamt-cRNA-Konzentration

Im letzten Schritt vor der Hybridisierung mit den Oligonukleotiden wurde die cRNA fragmentiert. Dies soll die Reaktionskinetik während der Hybridisierung auf dem GeneChip® verbessern. Dafür wurden jeweils 468,75 ng/µl cRNA aus den Proben für die Fragmentierungsreaktion entnommen und in ein neues, auf Eis gelagertes, Nuklease-freies Reaktionsgefäß pipettiert. Nachdem die Fragmentierungsreagenzien dazugegeben wurden, wurden die Lösungen für 35 min bei 94°C und dann für 2 min bei 4°C inkubiert. Durch die Fragmentierung wurden cRNA-Fragmente mit durchschnittlich 60 bis 200 Nukleotiden erzeugt. Vor der Fragmentierung bestanden die cRNA-Fragmente aus 250 bis 5.500 Nukleotiden.

### 3.9.3 Hybridisierung der cRNA

Zunächst wurden die Chips mit einer Prä-Hybridisierungslösung befüllt und für 30 min im Hybridisierungssofen bei 45°C und 60 U/min inkubiert. Währenddessen wurde der Hybridisierungs-Mastermix zu den cRNA-Proben pipettiert und die Reaktionsgefäße im Thermocycler inkubiert (5 min bei 99°C, 5 min bei 45°C). Die Prä-Hybridisierungslösung wurde aus den Mikroarray-Chips entfernt, mit den vorher inkubierten cRNA-Proben befüllt und die Öffnungen mit Klebeetiketten verschlossen. Die Chips wurden nachfolgend in der Rotisserie des Hybridisierungssofens befestigt und für 16 h (45°C, 60 U/min) inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Chips mit Waschpuffer A befüllt und in der Wasch- und Färbestation (Fluidics Station 450, Affymetrix) positioniert, in dieser gewaschen und die cRNA mit einer Streptavidin-Phycoerythrin-Verbindung gefärbt. Der gebundene Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin besitzt mehrere Absorptionsmaxima (496, 546 und 565 nm) und ein Emissionsmaximum bei 578 nm und wird daher für die Detektion der cRNA mit dem Mikroarray-Scanner angewendet (GeneChip® Scanner 3000, Affymetrix). Alle Vorgänge wurden nach den Angaben in den Herstellerprotokollen ausgeführt (Manual Target Preparation for GeneChip® 3' Expression Arrays User Guide, GeneChip® Expression Wash, Stain, and Scan User Guide for Cartridge Arrays, GeneChip® Fluidics Station 450 User Guide AGCC, GeneChip® Command Console® User Guide).

### 3.9.4 Analysekontrollen

Während der Genexpressionsanalyse wurden verschiedene Kontrollen mitgeführt. Auch diese wurden, wie in den Herstelleranleitungen beschrieben, umgesetzt. Als Reagenzienkontrolle diente eine genau vorgegebene Menge einer Kontroll-RNA aus HeLa-Zellen, welche nach der IVT-Reaktion eine Menge von mehr als 15 µg cRNA als Endprodukt erzeugen sollte.

Ein weiterer Kontrollschritt erfolgte durch die Verwendung einer definierten Menge von RNA mit poly(A)-Schwanz. Diese wurde vor der Erststrangsynthese zu den Proben pipettiert, um die cRNA-Synthese, Biotinmarkierung und Hybridisierung zu überprüfen. Sie bestand aus *in vitro* Transkripten der Plasmid-Gene (*dap*, *lys*, *phe*, *thr*, *trp*) des Bakteriums *Bacillus subtilis* (75). Diese banden ebenfalls an die dafür vorgesehenen komplementären Oligonukleotide auf den Mikroarray-Chips und wurden bei jeder Probe mitdetektiert.

Weiterhin wurde die cRNA-Konzentration und -Reinheit der synthetisierten, nicht-fragmentierten cRNA mit dem NanoDrop Spektrophotometer überprüft. Im Herstellerhandbuch (Manual Target Preparation for GeneChip® 3' Expression Arrays User Guide) wurde ein Absorptionsquotient (260/280) zwischen 1,7 und 2,1 empfohlen. Wie in Tabelle 8 dargestellt, zeigten alle Proben eine

der Empfehlung entsprechende Reinheit. Auch die benötigte Gesamt-cRNA-Konzentration von mindestens 12 µg/25,6 µl für die Fragmentierung konnte für alle Proben erreicht werden.

Zusätzlich wurden bei allen Probenansätzen Hybridisierungs-Kontrollen aus dem GeneChip® Hybridization Control Kit mitgeführt. Dieses Kit enthielt biotinylierte und fragmentierte cRNA von prokaryotischen Genen (*Escherichia coli*) der Biotinsynthese (*bioB*, *bioC*, *bioD*) und einem Gen (*cre*) der Bakteriophage P1. Zudem wurden B2 Kontroll-Oligonukleotide verwendet, welche als Positivkontrolle dienten und an den Rändern des Microarray-Chips hybridisierten. Dabei entstanden verschiedene Muster (Arrayname, Schachbrettmuster in den Ecken, hell-dunkel-alternierende Randmarkierung), welche von der Affymetrix® GeneChip® Command Console® Software (AGCC) verwendet wurde, um ein Gitter über das gescannte Arraybild zu legen. Die beschriebenen Kontrollen befanden sich bei jeder Probe mit im Hybridisierungs-Mastermix.

Auch die Integrität der Ausgangs-RNA, cDNA und cRNA wurde mit Hilfe von Haushaltsgen-Transkripten (*GAPDH*, *ACTB*, *EEF1A1*) und Kontroll-Transkripten (*CTLA4*, *EPOR*, *LEP*) überprüft. Dafür befanden sich auf den Chips Oligonukleotide, welche an die 5'-Region hybridisierten und dazu korrespondierende Oligonukleotide, welche an die 3'-Region hybridisierten. Aus den Signalintensitäten der korrespondierenden Kontrollen wurde ein 3'/5'-Quotient berechnet.

### 3.9.5 Datenauswertung

Die Daten der Mikroarray-Chips wurden mit der Affymetrix GeneChip® Operating Software (GCOS) organisiert und analysiert. Die Auswertung folgte den Anleitungen und Empfehlungen des Herstellerhandbuchs *GeneChip® Expression Analysis Data Analysis Fundamentals*. Die Proben mit den CCL25-Konzentrationen 5 und 500 nmol/l wurden mit der Kontroll-Probe (0 nmol/l CCL25) für die Datenauswertung verglichen.

Die unterschiedlichen Algorithmen für die Datenanalyse mit der GCOS-Software beziehen sich im Kern auf die Intensitäten eines Probensatzes (probe set), welcher aus mindestens 11 Probenpaaren besteht (Probe pairs). Die Transkripte eines Gens konnten an 11 Bereiche auf der Glasplatte mit komplementären Oligonukleotiden (perfect match, PM) und an 11 Bereiche mit nicht komplementären Oligonukleotiden, welche in der Mitte eine inkorrekte Base besaßen (mismatch, MM), binden. Für die Analyse wurden die Intensitäten der Probenpaare (PM<sub>n</sub> und MM<sub>n</sub>) miteinander verglichen und verschiedene Werte berechnet.

Im ersten Schritt der Auswertung wurden den Transkripten durch einen GCOS-Algorithmus qualitative Merkmale beruhend auf dem *Affymetrix Statistical Algorithm* zugeordnet und danach für die weitere Analyse gefiltert. Bei einem Detection call wird ein Transkript entweder als

anwesend (Present), abwesend (Absent) oder grenzwertig (Marginal) eingestuft. Beim Vergleich zweier Proben wurde darauf geachtet, dass bei der Suche nach signifikant erhöhter Genexpression die Transkripte in der CCL25-Probe als Present eingestuft waren. Entsprechend wurde für die Suche nach signifikant erniedrigter Genexpression darauf geachtet, dass den Transkripten in der Kontroll-Probe ein Present zugeordnet war.

Im zweiten Schritt wurden die Intensitäten der zu vergleichenden Proben mit Hilfe eines weiteren qualitativen Merkmals beschrieben und gefiltert. Dafür wurde mit einem separaten statistischen Algorithmus für jedes Transkript ein sogenannter Change call berechnet. Die Transkripte, denen die qualitativen Merkmale Zunahme (Increase) und Abnahme (Decrease) zugeschrieben wurden, wurden für die weitere Analyse verwendet.

Im letzten Schritt wurden die Genexpressionsunterschiede durch einen weiteren Algorithmus berechnet. Der Signal Log Ratio (SLR) ist ein quantitatives Merkmal, mit dem die Veränderungen der Transkriptmengen beschrieben werden können. Ein negativer Wert steht für eine verminderte Transkriptmenge und ein positiver Wert für eine erhöhte Transkriptmenge. Zum Beispiel steht ein SLR von 1 für eine Verdopplung der Transkriptmenge und eine SLR -1 für eine Halbierung. Ein SLR von 0 steht für keine Veränderung des Transkriptionslevels. Für die weitere Auswertung wurden Transkripte ausgewählt, die einen SLR von  $\leq -0,7$  und  $\geq 0,7$  aufwiesen.

Jeder Probensatz wurde in der Datenauswertung durch eine Probe Set ID repräsentiert. Mit den Probe Set IDs können die Sequenzen der Oligonukleotide, die auf dem Chip des Herstellers synthetisiert waren, identifiziert werden. Die zu den Probe Set IDs gehörenden Informationen wurden mit Hilfe des NetAffx Annotation File (Porcine Annotations, CSV format, Release 35, Affymetrix) um weitere Informationen wie Zugangsnummern der Sequenzen (Accession Numbers) in der GenBank (Open Access Sequenzdatenbank, NCBI) ergänzt (76). Darüber hinaus wurden den Sequenzen Gen-Symbole und Gen-Titel über eine Transkriptom-Datenbank (UniGene, NCBI) zugeordnet. Die Daten der Probensätze und des NetAffx Annotation File wurden mit Hilfe der Datenverwaltungssoftware FileMaker Pro Advanced 9.0v1 zusammengeführt. Die Datenbank wurde anschließend auch für die Abfrage der Kriterien (Detection call, Change call und SLR) genutzt. Probensätze, die alle drei Kriterien erfüllten, wurden mit der Datenverwaltungssoftware ausgelesen und in eine Excel-Tabelle importiert.

### **3.9.6 Literaturrecherche**

Nach Anwendung der Auswahlkriterien (Detection call, Change call und SLR) wurden insgesamt 191 Probe Set IDs ausgelesen, deren Transkriptmengen durch CCL25 im Vergleich zur Kontrolle hoch- oder runterreguliert wurden. Um Informationen über die Funktionen der unterschiedlich

exprimierten Gene zu recherchieren, wurde die MEDLINE-Datenbank (Medical Literature Analysis and Retrieval System Online, NCBI) via PubMed (NCBI) und die GeneCards®-Datenbank (Weizmann Institute of Science) für eine Recherche genutzt. Für die Suche nach relevanten wissenschaftlichen Artikeln wurden die Suchbegriffe Apoptose (apoptosis), Knorpel (cartilage), Chondrozyten (chondrocytes), Inflammation (inflammation) und Arthrose (osteoarthritis) jeweils in Kombination (boolescher Operator „AND“) mit dem Gen-Symbol in der Freitextsuche von PubMed verwendet. Wenn keine Artikel mit Bezug auf das jeweilige Gen-Symbol angezeigt wurden, wurde die Freitextsuche mit den in der GeneCards®-Datenbank aufgeführten Alternativnamen wiederholt (Bsp. Gen-Symbol LEPREL4 - Alternativname SC65). Wenn erneut keine Artikel gefunden wurden, wurde nur das Gen-Symbol als Begriff für die Freitextsuche verwendet. Zum Zeitpunkt der Recherche (November 2016, 4 Wochen lang) wurden 255 wissenschaftliche Artikel gesichtet. Für 24 Gensymbole konnten keine Artikel oder Funktionen gefunden werden. Die recherchierten Genfunktionen wurden in insgesamt 12 Kategorien (Stress, Genexpression, Proliferation/Differenzierung, Inflammation, DNA-Reparatur, Apoptose, Verschiedenes, Signalkaskade, Metabolismus, Zytoskelett, Entwicklung des Bewegungsapparates, Bestandteil der EZM) eingeordnet. Alle Gensymbole und deren Kategorisierungen, sind in der Tabelle 9 aufgeführt.

**Tab. 9 Übersicht aller regulierten Gene und Kategorisierungen.**

Probe set ID	Gen-Symbol	CCL25 Konzentration			
		5 vs. 0 nmol/l		500 vs. 0 nmol/l	
		SLR	Kategorie*	SLR	Kategorie*
Ssc.7443.1.A1_at	AASDHPPT	0,4		1,2	T1
Ssc.3696.1.A1_at	ABHD13	2,3	W1	2,1	W1
Ssc.3393.2.A1_a_at	ACER3	0,3		0,7	M1
Ssc.10316.1.S1_at	ACTG2	-0,6		-1,4	K2
Ssc.19059.1.A1_at	AGTR1	-0,3		-0,9	S2
Ssc.17348.1.S1_at	AKAP13	0,9		0,7	S1
Ssc.21101.1.S1_at	ALAS1	-0,3		-0,7	W2
Ssc.3848.1.S1_at	AMDHD2	-0,7	M2	-0,2	
Ssc.9278.1.A1_at	ANGPTL2	-0,6		-0,9	I2
Ssc.13587.2.S1_at	ANK3	3,4		3,5	K1
Ssc.10815.1.A1_at	APLF	0,4		0,8	Z1
Ssc.23514.2.S1_at	ARFGAP2	-1,5	W2	-0,7	
Ssc.19604.1.S1_at	B3GNTL1	-0,9		-1,1	W2
Ssc.24732.1.S1_at	BBS5	0,6		0,8	W1
Ssc.22958.1.S1_a_at	BTBD1	0,3		0,7	P1
Ssc.12643.1.A1_at	C14H22orf39	-0,2		-0,7	W2
Ssc.1870.1.S1_at	C1GALT1	0,2		0,7	M1
Ssc.13619.1.A1_at	C1H14orf39	0,7	W1	1,4	W1



**CCL25 Konzentration**

Probe set ID	Gen-Symbol	5 vs. 0 nmol/l		500 vs. 0 nmol/l	
		SLR	Kategorie*	SLR	Kategorie*
Ssc.22168.1.A1_at	C2H19orf52	0		-1,2	W2
Ssc.29690.1.A1_at	C2H19orf57	1,2	W1	0,9	
Ssc.5352.1.A1_at	C9H1orf27	0,6		0,7	W1
Ssc.11149.2.S1_at	CA9	-0,2		-0,7	X2
Ssc.1530.1.S1_at	CCDC71	-0,5		-0,7	W2
Ssc.23877.1.S1_at	CCNA2	-2,1	P2	0,1	
Ssc.19068.1.A1_at	CDC5L	1	P1	0,5	
Ssc.21033.2.S1_at	CDIPT	-0,7	S2	-0,8	S2
Ssc.18574.1.A1_at	CELF2	0,9	T1	1,1	
Ssc.14308.1.S1_at	CENPC	0,1		0,8	P1
Ssc.11310.2.A1_at	CHRD1	-0,3		-0,9	W2
Ssc.8335.1.S1_at	CLDN11	-0,3		-0,9	C2
Ssc.9013.1.S1_at	CNN1	-0,2		-1	K2
Ssc.16016.1.S1_at	COL2A1	-0,2		-0,7	C2
Ssc.4345.1.S2_at	COL4A1	-0,2		-0,9	C2
Ssc.4345.1.S1_at	COL4A1	-0,5		-0,9	
Ssc.3467.1.S1_at	COL4A2	-0,2		-0,7	C2
Ssc.10453.1.S1_at	CP	0,1		0,7	M2
Ssc.24452.1.S1_at	CREBRF	0,4		0,8	T1
Ssc.24529.1.S1_at	CRYGS	0,4		0,9	C1
Ssc.28471.2.S1_at	CSNK1E	-0,1		-0,7	P2
Ssc.8528.1.A1_at	CTSC	0,8	W1	0,2	
Ssc.24520.1.A1_at	CWF19L2	0,1		0,7	W1
Ssc.19692.1.S1_at	CXCL2	0,6		2,2	I1
Ssc.23427.1.A1_at	CYB561	-0,3		-0,7	M2
Ssc.22082.2.A1_at	DAB1	0,6		0,9	W1
Ssc.3820.2.S1_a_at	DECR2	0,4		0,7	W1
Ssc.15379.1.S1_at	DGAT2	-0,1		-1,5	M2
Ssc.16796.1.S1_at	DGCR14	-1,4		-0,8	T2
Ssc.26333.1.S1_at	DIO2	1,9	M1	1	
Ssc.16236.1.S1_at	DPP4	0		0,7	I1
Ssc.4267.2.S1_at	EFEMP2	-0,4		-0,7	C2
Ssc.19629.2.S1_s_at	EGR1	0,2		0,9	T1
Ssc.16460.1.S1_at	EGR1	0,2		1,1	
Ssc.22107.2.A1_at	EIF4E	0,5		0,8	T1
Ssc.30548.1.A1_at	ELMOD2	0,6		1,2	W1
Ssc.16570.1.S1_at	ELN	-0,3		-0,8	C2
Ssc.23869.1.A1_at	EPYC	0,4		0,9	C1
Ssc.7447.2.S1_at	ERGIC2	0,5		0,7	M1
Ssc.26615.1.A1_at	ESPN	-1,7	K2	-0,9	
Ssc.19907.1.S1_at	F3	-0,4		-0,9	C2
Ssc.29341.1.A1_at	FBXL4	0,9	M1	0,2	
Ssc.4628.1.S1_at	FBXO2	-0,5		-0,9	M2
Ssc.1555.1.A1_at	FOS	0,2		1,4	P1
Ssc.30282.1.A1_at	FPGT	0,3		0,9	M1
Ssc.14532.1.S1_at	FUT8	0,3		0,8	M1

**CCL25 Konzentration**

Probe set ID	Gen-Symbol	5 vs. 0 nmol/l		500 vs. 0 nmol/l	
		SLR	Kategorie*	SLR	Kategorie*
Ssc.16225.1.S1_at	GHR	0,4		0,9	X1
Ssc.27884.1.A1_at	GSTA4	0,3		3,7	V1
Ssc.28481.1.A1_at	GPN3	0,7	S1	0,5	
Ssc.26173.1.S1_at	GTPBP10	0,3		0,7	S1
Ssc.30893.1.A1_at	GULP1	0,4		0,8	W1
Ssc.30485.1.A1_at	HLTF	0,1		0,8	T1
Ssc.8790.1.A1_at	HMGCS1	1	M1	1,2	
Ssc.26770.1.S1_at	HMMR	-2,6	I2	-1,4	
Ssc.1810.1.A1_at	HOXD3	0,5		1,2	T1
Ssc.37.1.S1_at	HP	-0,1		0,7	I1
Ssc.5169.1.A1_at	HTRA3	-0,1		-0,7	A2
Ssc.30752.2.A1_at	IFIT1	0,7	I1	0,5	
Ssc.6790.1.A1_at	IMPACT	0,5		0,7	W1
Ssc.9142.1.A1_at	ITGA1	0,3		0,7	C1
Ssc.1377.1.A1_at	ITGA8	0		-0,7	
Ssc.29185.1.A1_at	ITGA8	-0,2		-0,7	C2
Ssc.324.3.S1_a_at	JAK2	0,3		1,3	S1
Ssc.4677.1.A1_at	JMJD1C	0,5		0,8	T1
Ssc.10881.1.S1_at	JUNB	-0,2		0,8	T1
Ssc.11405.1.A1_at	KCNE3	0		-0,8	W2
Ssc.4351.2.S1_at	KIAA0196	0,4		0,7	W1
Ssc.26172.1.S1_at	LEPREL4	-0,4		-0,7	C2
Ssc.2462.1.A1_at	LIG4	3		2,8	Z1
Ssc.21730.1.S1_at	LMNB1	0		-1,3	K2
Ssc.4693.2.S1_at	LRP6	0,2		0,7	W1
Ssc.4693.3.S1_a_at	LRP6	0,4		1,1	
Ssc.4693.3.S1_at	LRP6	0,2		0,7	
Ssc.3340.1.A1_at	LUC7L3	0,4		0,7	W1
Ssc.4581.1.A1_at	MAK16	0,2		0,7	W1
Ssc.18271.3.S1_at	MAPK8IP1	-0,7	W2	-0,4	
Ssc.27434.1.S1_at	MARVELD3	4,9	C1	2,9	
Ssc.7528.2.S1_at	MBNL3	0,9	T1	0,8	T1
Ssc.9096.1.S1_at	MDFIC	0,6		0,7	T1
Ssc.6969.1.A1_at	MDM1	0,3		0,7	K1
Ssc.7515.1.A1_at	METTL15	0,2		1	W1
Ssc.20385.1.S1_at	MKKS	1,3	K1	1,2	K1
Ssc.16013.1.S1_at	MMP1	0,3		1	C1
Ssc.16053.1.S1_at	MMP-13	0,6		1	C1
Ssc.12431.1.A1_at	MMP8	1	C1	1,6	C1
Ssc.7885.1.A1_at	MRS2	-0,3		0,7	M1
Ssc.15607.1.S1_at	MTX1	-0,5		-0,8	W2
Ssc.21954.2.A1_at	NAGLU	-0,9	C2	-0,1	
Ssc.6822.1.A1_at	NCOA7	1,2	S1	0,9	S1
Ssc.22386.1.S1_at	NDUFA5	1	M1	1,2	
Ssc.30611.1.A1_at	NKTR	0,2		0,7	W1
Ssc.25023.1.S1_at	NUF2	0,1		1	P1

**CCL25 Konzentration**

Probe set ID	Gen-Symbol	5 vs. 0 nmol/l		500 vs. 0 nmol/l	
		SLR	Kategorie*	SLR	Kategorie*
Ssc.24707.1.S1_at	OGT	0,3		0,7	W1
Ssc.4156.1.A1_at	OTUD6B	0,6		0,7	W1
Ssc.3086.1.S1_at	OXCT1	0,5		0,8	M1
Ssc.30255.2.S1_at	PCF11	0,4		0,8	T1
Ssc.5780.2.S1_at	PCNX	0		1	W1
Ssc.3996.1.A1_at	PDLIM1	-0,4		-0,7	W2
Ssc.18340.1.A1_at	PEBP4	-0,6		-0,9	W2
Ssc.5471.1.A1_at	PEX11A	0,8		1	M1
Ssc.16110.1.A1_at	PIAP	0,1		0,8	A1
Ssc.29424.1.A1_at	PLEKHA5	0,3		0,7	
Ssc.23519.2.S1_at	PLOD1	-0,7	C2	-0,8	C2
Ssc.23929.1.A1_at	PLSCR1	0,9	M1	0,9	M1
Ssc.30737.1.A1_s_at	PNPT1	1,1	T1	0,2	
Ssc.7788.1.A1_at	POLR3E	0,7	T1	-0,2	
Ssc.7266.1.A1_at	POSTN	0,3		1	C1
Ssc.20438.1.S1_at	PTGFR	0,5		1	S1
Ssc.12809.5.A1_at	PTMA	-0,7	W2	-1	W2
Ssc.21900.2.A1_at	RAD54L	-1,4		-1	Z2
Ssc.8506.1.A1_at	RBM25	0,8		1,3	T1
Ssc.17331.1.S1_at	RBM4	-0,7	T2	-0,5	
Ssc.12193.1.S1_at	REEP3	0,5		0,7	P1
Ssc.30546.1.A1_at	REEP3	0,4		0,9	
Ssc.10952.1.S1_at	REEP5	0,7	W1	0,9	
Ssc.5498.1.A1_at	RGS16	-0,1		0,7	S1
Ssc.5978.1.S1_at	RHBDD2	-0,9		-1,1	W2
Ssc.19183.1.S1_at	RHOF	-0,7		-0,9	S2
Ssc.22298.1.A1_at	RICTOR	0,3		0,8	X1
Ssc.4216.2.S1_at	RNPEP	-0,4		-0,8	M2
Ssc.7054.2.A1_at	RPL10A	-0,6		-0,8	M2
Ssc.7111.1.A1_at	RRM2	-0,4		-0,7	M2
Ssc.31172.3.S1_at	SDC1	-0,1		-0,7	C2
Ssc.14306.1.S1_at	SECISBP2L	0,2		0,8	T1
Ssc.13661.1.A1_at	SEMA4F	1,6	W1	0,2	
Ssc.3917.1.S1_at	SERPINA3-3	-0,4		-2,3	X2
Ssc.5072.2.S1_at	SGTA	-0,5		-1	W2
Ssc.23145.1.A1_at	SHMT2	0,7		1	M1
Ssc.13399.1.A1_at	SLC12A1	4,9	W1	2	
Ssc.24556.2.S1_a_at	SLC35F5	0,7		1,2	W1
Ssc.6408.1.A1_at	SMARCD2	-1,9		1,8	T1
Ssc.24133.1.S1_at	SMCHD1	3,4	T1	3	
Ssc.13020.1.A1_at	SMIM15	0,4		0,8	W1
Ssc.28938.1.A1_at	SMIM15	0,6		0,7	
Ssc.3927.3.S1_at	SMPD1	-1,2	M2	-2	M2
Ssc.13295.1.A1_at	SNX25	0,4		0,9	S1
Ssc.3706.1.S1_at	SOD2	0,4		1,4	V1
Ssc.3706.1.S2_at	SOD2	0,3		1,1	

<b>CCL25 Konzentration</b>					
		<b>5 vs. 0 nmol/l</b>		<b>500 vs. 0 nmol/l</b>	
<b>Probe set ID</b>	<b>Gen-Symbol</b>	<b>SLR</b>	<b>Kategorie*</b>	<b>SLR</b>	<b>Kategorie*</b>
Ssc.17042.1.A1_at	SOD2	0,3		1	
Ssc.2850.2.S1_a_at	TANGO2	-0,7	M2	-0,4	
Ssc.30973.1.A1_at	TBRG1	1,1	P1	0,4	
Ssc.11559.1.A1_at	THBS3	-0,3		-1,1	C2
Ssc.11559.2.A1_at	THBS3	-0,6		-0,7	
Ssc.2552.1.A1_at	THSD7A	-0,4		0,7	W1
Ssc.13867.1.S1_at	TMED5	0,7	M1	1	M1
Ssc.5660.1.A1_at	TMEM106B	0,7	W1	0,7	
Ssc.10752.1.A1_at	TMEM65	0,3		0,7	W1
Ssc.31207.1.S1_at	TMPO	0,6		1	W1
Ssc.9683.1.A1_at	TNFSF10	0,5		1,2	A1
Ssc.12829.1.A1_at	TNFSF10	0		1,1	
Ssc.12185.1.A1_at	TPM1	-0,8	K2	-0,9	
Ssc.13606.1.A1_at	TRPM7	0,5		0,7	S1
Ssc.21942.2.S1_at	TSKU	-0,8	W2	-1,1	
Ssc.6783.1.S1_at	TSPAN12	0,7	W1	0,8	W1
Ssc.26272.1.S1_at	TSPAN9	-0,2		-0,7	W2
Ssc.31113.1.S1_at	TTC14	0,3		0,7	W1
Ssc.6696.1.S1_at	TXN	0,4		0,7	V1
Ssc.2073.1.A1_at	UCHL1	-0,3		-0,7	M2
Ssc.1046.1.A1_at	UHRF1BP1L	0,9		1	W1
Ssc.10129.1.S1_at	USP47	0,4		0,7	Z1
Ssc.9269.1.S1_at	VMP1	0,4		0,9	A1
Ssc.2376.2.S1_at	WDR18	-0,2		-0,7	W2
Ssc.3884.1.S1_at	WDR34	-0,5		-0,8	W2
Ssc.27896.1.S1_at	WDR36	0,4		0,9	W1
Ssc.24595.1.S1_at	WNT5B	-0,8		-0,8	X2
Ssc.18083.1.A1_at	XKR8	-0,2		-0,9	A2
Ssc.19217.1.A1_at	ZNF280C	0,5		0,7	T1
Ssc.19284.1.A1_at	ZNF300	0,3		0,7	T1
Ssc.18650.1.S1_at	ZNF568	1,1		0,8	T1
Ssc.13347.1.A1_at	ZNF630	1,4	T1	1,8	T1
Ssc.25130.1.A1_at	ZYG11A	4,4	P1	0,4	

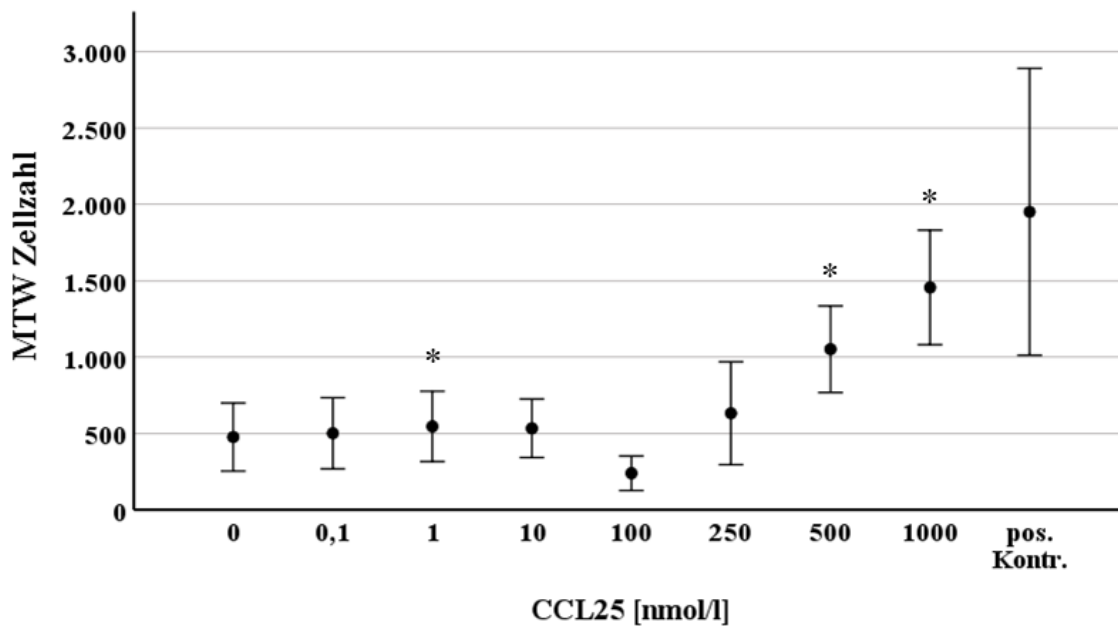
\*A = Apoptose, C = Bestandteil der EZM, I = Inflammation, K = Zytoskelett, M = Metabolismus, P = Proliferation/Differenzierung, S = Signalkaskade, T = Genexpression, V = Stress, W = Verschiedenes, X = Entwicklung des Bewegungsapparates, Z = DNA-Reparatur, 1 = hochreguliert, 2 = runterreguliert

Die Expressionsdaten nach siebentägiger Stimulation der Chondrozyten mit CCL25 (5 nmol/l und 500 nmol/l) in den 3D-Kulturen wurden zudem mit den Expressionsdaten von Chondrozyten aus arthrotisch veränderten Knorpelproben von Patienten verglichen. Als Datenquelle wurden zwei Publikationen, in denen die Expressionsdaten von insgesamt 1427 Genen veröffentlicht und zugänglich gemacht wurden, verwendet (77, 78).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 CCL25 induzierte Migration porciner Chondrozyten

Ob rekombinant humanes CCL25 porcine Chondrozyten aktivieren kann, wurde mit einem Migrations-Assay überprüft. Wenn kein Konzentrationsgradient zwischen der Unter- und Oberseite der Membran vorhanden war (0 nmol/l = Negativkontrolle), migrierten  $476 \pm 223$  (Mittelwert  $\pm$  95% CI) Zellen. Bei den Konzentrationen 0,1 nmol/l, 1 nmol/l und 10 nmol/l blieb die Anzahl der migrierten Zellen annähernd konstant. Bei einer Konzentration von 100 nmol/l reduzierte sich die Anzahl der Chondrozyten an der Membranunterseite auf  $239 \pm 113$  und nahm bei höheren Konzentrationen wieder zu. Ab einer Dosis von 500 nmol/l verdoppelte sich die Anzahl der migrierten Zellen ( $1052 \pm 283$ ) im Vergleich zur Negativkontrolle und erreichte ein Maximum bei einer Konzentration von 1000 nmol/l ( $1456 \pm 375$ ).



**Abb. 6 Reaktion porciner Chondrozyten (n = 5) auf rekombinant humanes CCL25 im Migrations-Assay.** Dargestellt sind die Mittelwerte der migrierten Zellen (MTW Zellzahl), die getesteten CCL25-Konzentrationen in nmol/l und die Positivkontrolle (pos. Kontr.). Die Fehlerbalken entsprechen dem Konfidenzintervall (95% CI). \* zeigt ein signifikantes Ergebnis im Vergleich mit der Negativkontrolle (0 nmol/l) beim Wilcoxon-Test an ( $p$ -Wert  $< 0,05$ ).

### 4.2 CCL25 induzierte Chemokinese

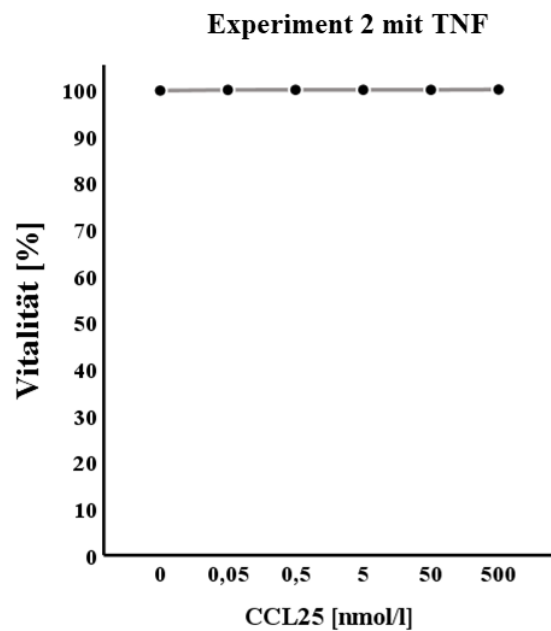
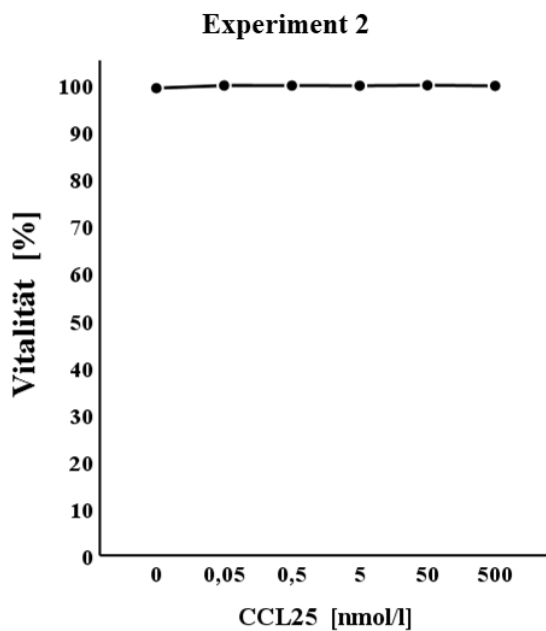
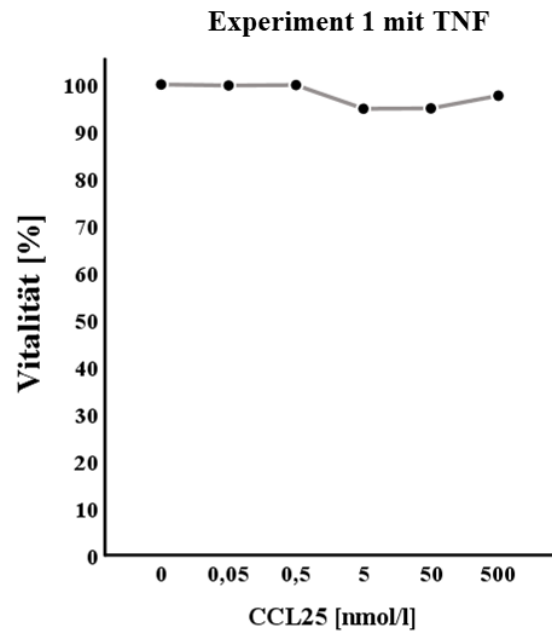
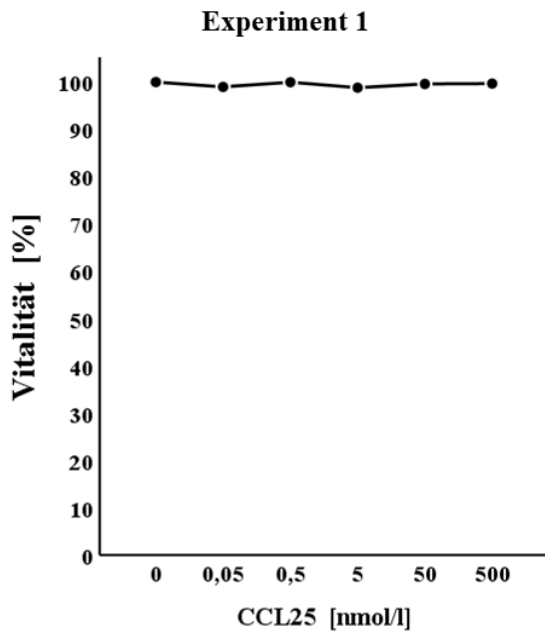
Um zwischen einer gerichteten und ungerichteten Zellbewegung differenzieren zu können, wurde

für 500 nmol/l bei allen Donoren (n = 5) im Migrations-Assay eine Chemokinese-Kontrolle mitgeführt. Dabei wurde ein Konzentrationsgradient zwischen oberer Membranseite und unterer Kammer vermieden, indem auf beiden Seiten eine Konzentration von 500 nmol/l bestand. In der Chemokinese-Kontrolle migrierten  $1046 \pm 358$  (Mittelwert  $\pm$  95% CI) Chondrozyten. Zum Vergleich waren es bei einem Konzentrationsgradienten von 500 nmol/l ( $1052 \pm 283$ ,  $p = 0,893$ ). Da die Zahlen der migrierten Zellen annähernd gleich sind, scheint CCL25 eine ungerichtete Zellbewegung zu induzieren.

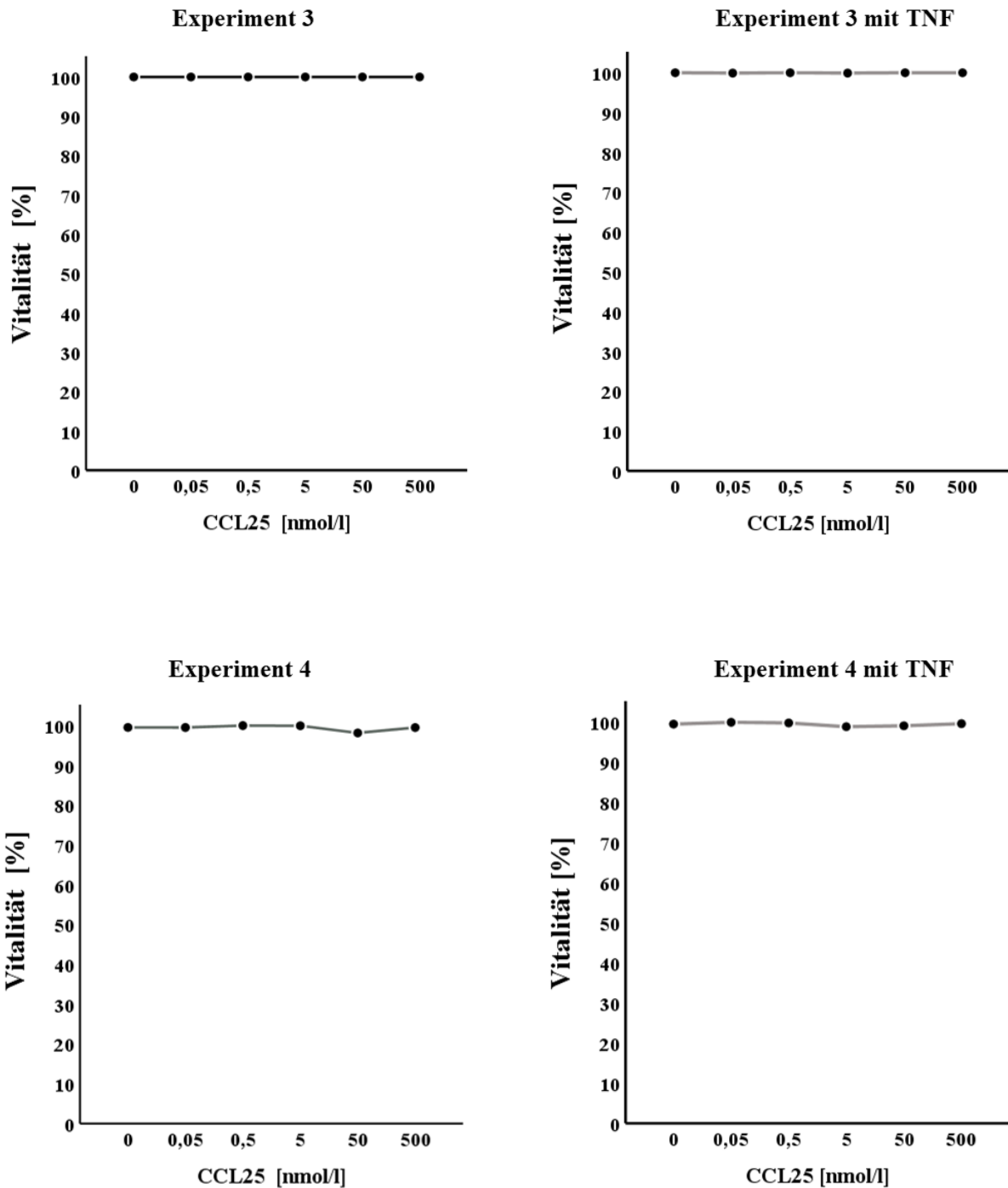
### **4.3 Chondrozyten-Vitalität nach CCL25-Stimulation**

Sieben Tage lang wurden die Chondrozyten in der 3D-Kultur mit verschiedenen CCL25-Konzentrationen (0 nmol/l, 0,05 nmol/l, 0,5 nmol/l, 5 nmol/l, 50 nmol/l, 500 nmol/l) stimuliert. Im Anschluss wurde die Vitalität der Chondrozyten mit einer Lebend-Tod-Färbung analysiert. Für alle Konzentration in den vier Experimenten wurde eine Vitalität zwischen 98 und 100% gemessen (Abb. 7 und 8).

Als CCL25 mit TNF- $\alpha$  (0,6 nmol/l) kombiniert über sieben Tage gegeben wurde, zeigte sich ebenfalls eine hohe Anzahl vitaler Chondrozyten in den Lebend-Tod-Färbungen. Für alle CCL25-Konzentrationen, auch bei den höheren Konzentrationen von 50 und 500 nmol/l, in den vier Experimenten lag die Vitalität zwischen 95 und 100% (Abb. 7 und 8).



**Abb. 7 Vitalität der Chondrozyten in den Experimenten 1 und 2.** Vitalität der Chondrozyten in Pelletkulturen nach Stimulation mit CCL25 (0 nmol/l, 0,05 nmol/l, 0,5 nmol/l, 5 nmol/l, 50 nmol/l, 500 nmol/l) für 7 Tage. **Links** Experimente 1 und 2 mit CCL25 stimulierten Chondrozyten. **Rechts** Experimente 1 und 2 mit CCL25 und TNF- $\alpha$  (0,6 nmol/l) stimulierten Chondrozyten.

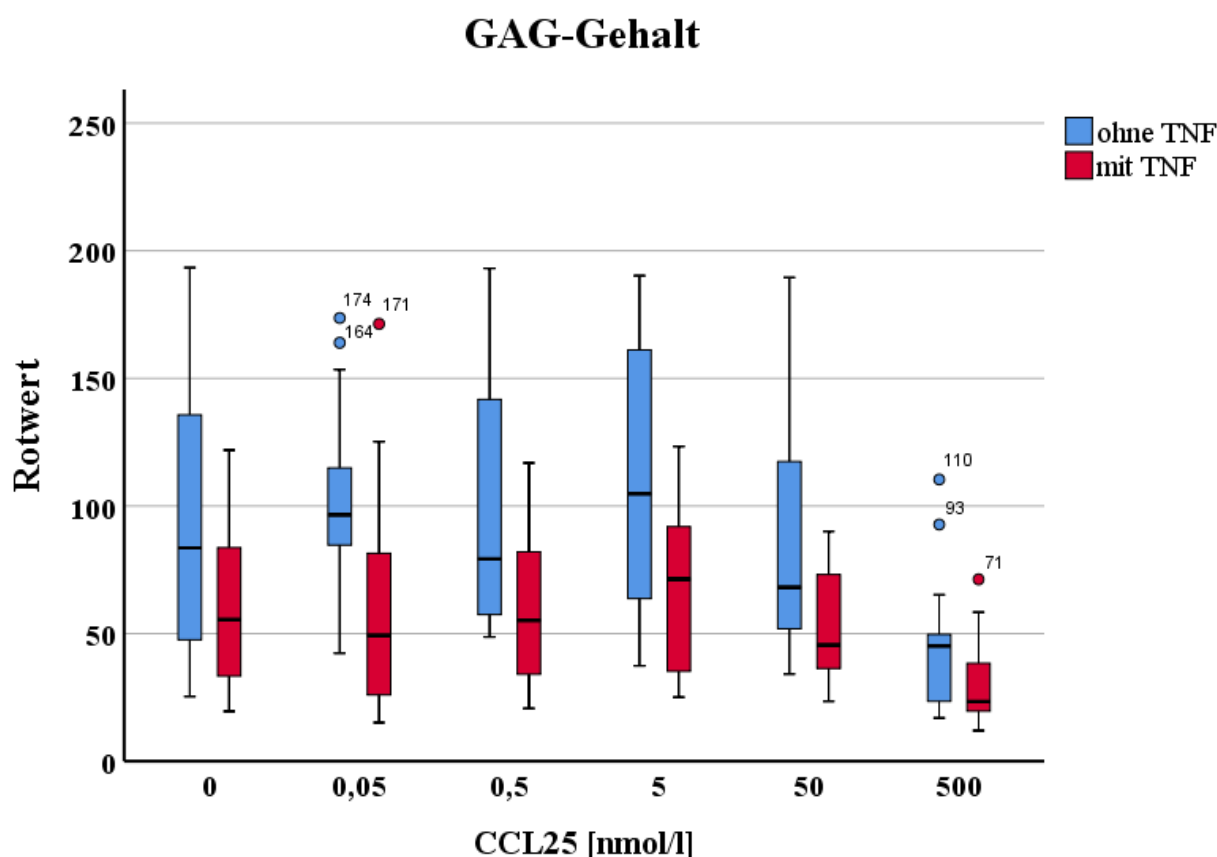


**Abb. 8 Vitalität der Chondrozyten in den Experimenten 3 und 4.** Vitalität der Chondrozyten in Pelletkulturen nach Stimulation mit CCL25 (0 nmol/l, 0,05 nmol/l, 0,5 nmol/l, 5 nmol/l, 50 nmol/l, 500 nmol/l) für 7 Tage. **Links** Experimente 3 und 4 mit CCL25 stimulierten Chondrozyten. **Rechts** Experimente 3 und 4 mit CCL25 und TNF- $\alpha$  (0,6 nmol/l) stimulierten Chondrozyten.



#### **4.4 Histomorphometrie der 3D-Zellkulturen**

Um die Auswirkungen von verschiedenen CCL25-Konzentrationen (0 nmol/l, 0,05 nmol/l, 0,5 nmol/l, 5 nmol/l, 50 nmol/l, 500 nmol/l) auf Knorpelgewebe zu untersuchen, wurde der GAG-Gehalt in den 3D-Zellkulturen nach siebentägiger Stimulation gemessen. Makroskopisch unterschieden sich die Pellets in den Multiwellschalen nicht. Beim Vorbereiten der Proben für die Gefrierschnitte fiel auf, dass die Pellets bei einer Konzentration von 500 nmol/l, auch in Kombination mit TNF- $\alpha$ , weniger stabil, dünner und leichter zu schneiden waren. Bei den Kontrollpellets (0 nmol/l CCL25 ohne TNF- $\alpha$ ) lag der Rotwert bei  $101 \pm 64$  (MTW  $\pm$  SD) und blieb bis zu einer Konzentration von 5 nmol/l stabil ( $109 \pm 56$ ). Ab 50 nmol/l CCL25 ohne TNF- $\alpha$  reduzierte sich der Rotwert auf  $86 \pm 50$ . Ein Minimum an GAG wurde bei einer Konzentration von 500 nmol/l gemessen ( $45 \pm 18$ ). Generell zeigten mit CCL25 stimulierte Pellets im Vergleich zu den mit CCL25 und TNF- $\alpha$  stimulierten Pellets eine stärkere Safranin O-Färbung, was auch grafisch anhand der Rotwerte in Abbildung 9 dargestellt wird. Die Kombination von CCL25 und TNF- $\alpha$  zeigte keine Vervielfältigung der GAG-Reduktion oder eine komplette Degradation der extrazellulären Matrix.



**Abb. 9 GAG-Gehalt.** GAG-Gehalt aller 3D-Zellkulturen aus den Experimenten 1-4 nach siebentägiger Stimulation mit verschiedenen CCL25-Konzentrationen ohne TNF- $\alpha$  (0 nmol/l, 0,05 nmol/l, 0,5 nmol/l, 5 nmol/l, 50 nmol/l, 500 nmol/l; blaue Box-Plots) und in Kombination mit TNF- $\alpha$  (0,6 nmol/l, rote Box-Plots). Bis zu einer Konzentration von 5 nmol/l mit und ohne TNF- $\alpha$  zeigte sich ein stabiler GAG-Gehalt in der synthetisierten extrazellulären Matrix der kultivierten Chondrozyten. Bei einer Konzentration von 50 nmol/l verringerte sich der GAG-Gehalt. Die niedrigsten Rotwerte wurden bei 500 nmol/l gemessen.

#### 4.5 Genexpressionsanalyse

Um Genexpressionsunterschiede nach siebentägiger Stimulation mit CCL25 zu ermitteln, wurden die Daten der Probe Sets aus drei Mikroarrays ausgewertet. Dabei wurden die Genexpressionsdaten nach Stimulation mit 5 nmol/l und 500 nmol/l CCL25 jeweils mit den Genexpressionsdaten der Kontrolle 0 nmol/l CCL25 verglichen. In der Gesamtheit wurde in den Chondrozyten die Expression von 177 Genen durch die Stimulation mit CCL25 beeinflusst. Darunter waren 14 Gene (*ABHD13*, *C1H14orf39*, *CDIPT*, *MBNL3*, *MKKS*, *MMP-8*, *NCOA7*, *PLOD1*, *PLSCR1*, *PTMA*, *SMPD1*, *TMED5*, *TSPAN12*, *ZNF630*), die sowohl durch 5 nmol/l als

auch durch 500 nmol/l CCL25 reguliert wurden. Für alle Gene wurde eine Literaturrecherche durchgeführt, um die Genfunktionen zu kategorisieren und graphisch darzustellen.

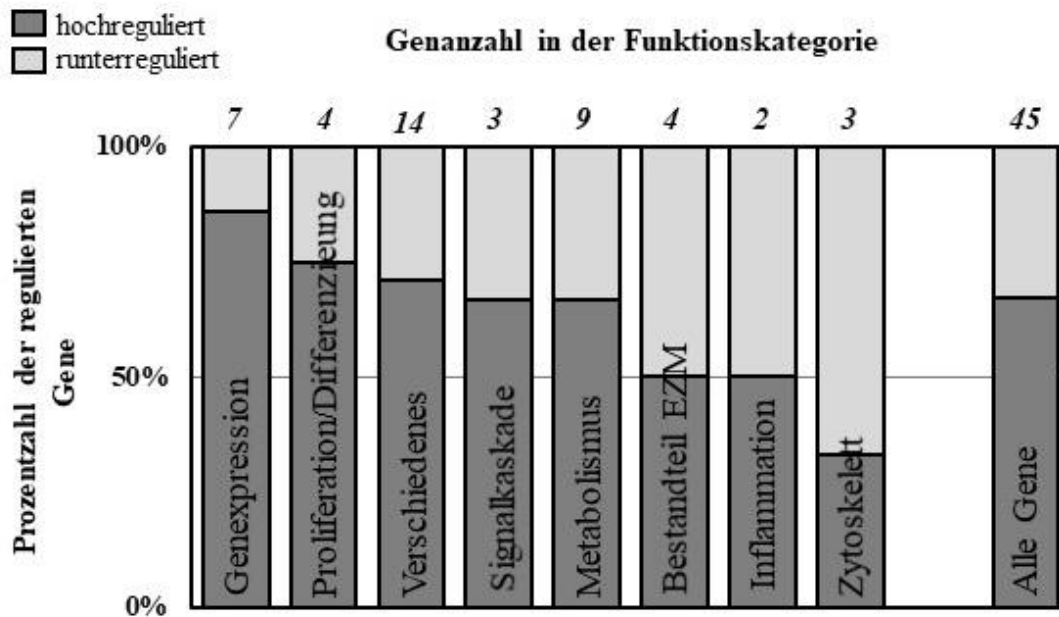
#### **4.5.1 Genfunktionen bei 5 nmol/l CCL25**

Nach siebentägiger Stimulation der Chondrozyten mit 5 nmol/l CCL25 in den 3D-Kulturen wurde im Rahmen der Arrayanalyse eine veränderte Expression von insgesamt 45 Genen detektiert. Davon wurden die Transkriptmengen von 30 Genen gesteigert und von 15 Genen gemindert.

Die höchste Anzahl regulierter Gene nach CCL25-Stimulation befanden sich in den Funktionskategorien „Genexpression“ und „Metabolismus“. In der Kategorie „Verschiedenes“ wurden Gen-Symbole eingeordnet, zu deren Funktionen keine Informationen vorhanden oder aufgrund einer Vielzahl an Funktionen eine Kategorisierung nicht möglich war.

Der Funktionskategorie „Inflammation“ wurden die Gene *Hyaluronan mediated motility receptor (HMMR, SLR -2,6)* und *Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (IFIT1, SLR 0,7)* zugeordnet. Die Literaturrecherche ergab eine Quelle, in der eine erhöhte Expression von *HMMR* bei Patienten mit Arthrose beschrieben wurde (79). In der durchgeführten Arrayanalyse nach Stimulation mit 5 nmol/l CCL25, zeigte sich jedoch eine verminderte Genexpression von *HMMR* in den Chondrozyten.

Weiterhin wurden Expressionsunterschiede von vier Genen (*CCNA2, CDC5L, ZYG11A, TBRG1*) in der Kategorie „Proliferation/Differenzierung“ nach CCL25-Stimulation detektiert. Deren Funktionen werden in der Literatur mit regulatorischen Effekten im mitotischen Zellzyklus assoziiert (80, 81). Von diesen wurden *CDC5L* (SLR 1), *TBRG1* (SLR 1,1), *ZYG11A* (SLR 4,4) hoch- und *CCNA2* (SLR -2,1) runterreguliert.



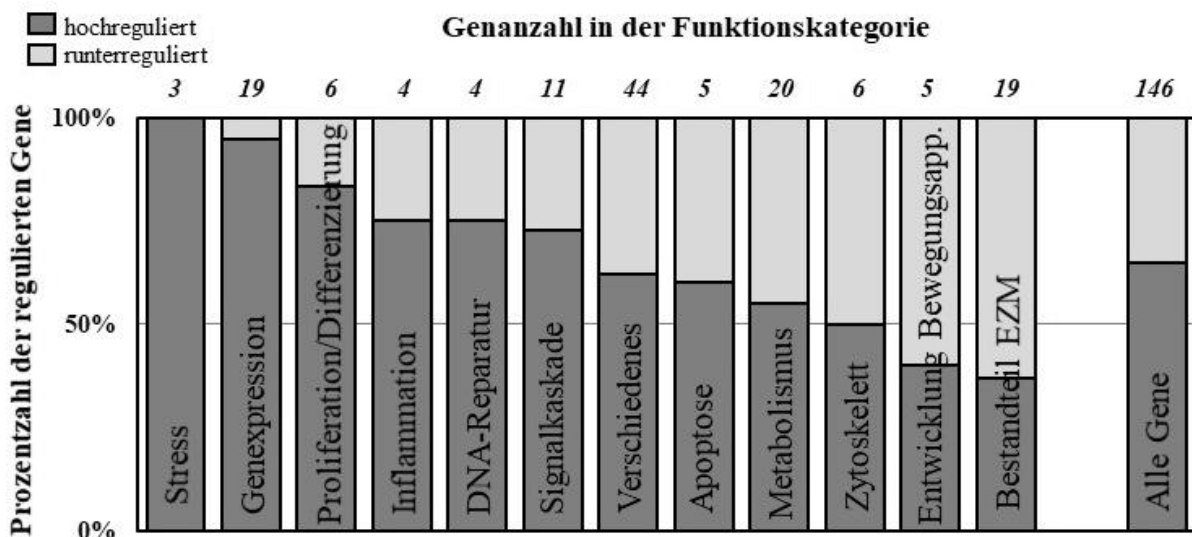
**Abb. 10 Genfunktionen nach Stimulation mit 5 nmol/l CCL25.** Einordnung der 45 unterschiedlich exprimierten Gene nach siebentägiger CCL25-Stimulation (5 nmol/l) in Funktionskategorien mittels Literaturrecherche. Die dunkelgrauen Balken markieren den prozentualen Anteil der hochregulierten Gene innerhalb einer Funktionskategorie. Die hellgrauen Balken stellen den Anteil der runterregulierten Gene dar. Oberhalb der Balken kann die Anzahl aller Gene in einer Funktionskategorie abgelesen werden. Insgesamt konnten die Gene in 8 Funktionskategorien aufgeteilt werden.

Die Gene *Abhydrolase domain containing 13* (*ABHD13*, SLR 2,3), *Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1* (*SMCHD1*, SLR 3,4), *Zyg-11 family member A, cell cycle regulator* (*ZYG11A*, SLR 4,4), *MARVEL domain containing 3* (*MARVELD3*, SLR 4,9) und *Solute carrier family 12 member 1* (*SLC12A1*, SLR 4,9) zeigten den höchsten Anstieg der Exprimierung nach CCL25 Stimulation.

Im Gegensatz dazu wurde die Expression der Gene *Sphingomyelin phosphodiesterase 1* (*SMPD1*, SLR -1,2), *ADP ribosylation factor GTPase activating protein 2* (*ARFGAP2*, SLR -1,5), *Espin* (*ESPN*, SLR -1,7), *Cyclin A2* (*CCNA2*, SLR -2,1) und *Hyaluronan mediated motility receptor* (*HMMR*, SLR -2,6) am stärksten gesenkt. In der Literatur wurden erhöhte Level der *SMPD1* mit einer verminderten Kollagen Typ 2 Expression in Zusammenhang gebracht (82). In den hier durchgeführten Experimenten kam es durch die Stimulation mit 5 nmol/l CCL25 zu einer verminderten Expression von *SMPD1* und zu einer unveränderten *COL2A1* Expression.

#### 4.5.2 Genfunktionen bei 500 nmol/l CCL25

Nach siebentägiger Stimulation der Chondrozyten mit 500 nmol/l CCL25 wurde die Expression von insgesamt 146 Genen verändert. Davon wurden die Transkriptmengen von 94 Genen erhöht und von 52 Genen gesenkt. Im Vergleich zur 5 nmol/l Konzentration führte die höchste der angewendeten CCL25-Konzentrationen in den Experimenten zu einer circa dreifachen Menge an hoch- und runterregulierten Genen. Die bisherigen Funktionskategorien wurden bei der Auswertung um vier neue Kategorien (Stress, DNA-Reparatur, Apoptose, Entwicklung des Bewegungsapparates) erweitert. Neben einer Anzahl von 44 Genen, die keiner Kategorie zugeordnet werden konnten, wurden bei 500 nmol/l CCL25 die meisten unterschiedlich exprimierten Gene den Funktionskategorien „Metabolismus“, „Genexpression“ und „Bestandteil EZM“ zugeordnet.



**Abb. 11 Genfunktionen nach Stimulation mit 500 nmol/l CCL25.** Einordnung der 146 unterschiedlich exprimierten Gene nach siebentägiger CCL25-Stimulation (500 nmol/l) in Funktionskategorien mittels Literaturrecherche. Die grauen Balken markieren die prozentualen Anteile der regulierten Gene innerhalb einer Funktionskategorie. Oberhalb der Balken kann die Anzahl aller Gene in einer Funktionskategorie abgelesen werden. Insgesamt konnten die Gene in 12 Funktionskategorien aufgeteilt werden.

In die Kategorie „Stress“ wurden drei Gene, *glutathione S-transferase alpha 4* (*GSTA4*, SLR 3,7), *superoxide dismutase 2* (*SOD2*, SLR 1,4) und *thioredoxin* (*TXN*, SLR 0,7), eingeordnet. Für alle

konnte ein Anstieg der Expression nach der Stimulation mit 500 nmol/l CCL25 eruiert werden. In der Literatursuche wurden mehrere Quellen angezeigt, die eine verminderte SOD2-Expression in Proben von arthrotischem Knorpelgewebe beobachteten (83, 84). Eine erhöhte Expression der SOD2 wurde in Synovialmembran-Proben von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) beschrieben (85). Ähnliches wurde in der Literatur auch über die TXN-Expression in der Synovialmembran von Patienten mit RA berichtet (86). Für *GSTA4* wurde Literatur angezeigt, die antioxidative und antiapoptotische Effekte des Enzyms in arthrotischem Knorpel beobachtete (87). Vier Gene konnten der Funktionskategorie „DNA-Reparatur“ zugeordnet werden. Davon wurden *Ubiquitin specific peptidase 47 (USP47, SLR 0,7)*, *DNA ligase 4 (LIG4, SLR 2,8)*, *Aprataxin and PNKP like factor (APLF, SLR 0,8)* vermehrt und *DNA repair and recombination protein RAD54-Like (RAD54L, SLR -1)* vermindert exprimiert.

Des Weiteren wurde durch 500 nmol/l CCL25 die Exprimierung von fünf Genen beeinflusst (*HTRA3 SLR -0,7*, *PIAP SLR 0,8*, *TNFSF10 SLR 1,2*, *VMP1 SLR 0,9*, *XKR8 SLR -0,9*), die in der Literatur mit dem Prozess der Apoptose in Verbindung gebracht wurden (88-91). Davon wurde für *Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10 (TNFSF10, SLR 1,2)* in mehreren Quellen über pro-apoptotische Effekte in Chondrozyten berichtet (92, 93).

Bei der Stimulation mit 500 nmol/l verdoppelte sich die Genanzahl in der Kategorie „Inflammation“ im Vergleich zur Stimulation mit 5 nmol/l CCL25. Bis auf *Angiopoietin-like 2 (ANGPTL2, SLR -0,9)* wurden die Transkriptmengen von *Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2, SLR 2,2)*, *Dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4, SLR 0,7)* und *Haptoglobin (HP, SLR 0,7)* hochreguliert. Für *CXCL2* konnten in der Literaturrecherche Artikel zur Expression im Rahmen der Arthrose gefunden werden. Unter anderem wurde eine erhöhte Expression von *CXCL2* in arthrotischem Knorpelgewebe mittels Mikroarray- und PCR-Analyse nachgewiesen (77).

Durch 500 nmol/l CCL25 stieg die Expression von *Ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G) (ANK3, SLR 3,5)*, *Ligase IV, DNA, ATP-dependent (LIG4, SLR 2,8)*, *Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2, SLR 2,2)*, *Abhydrolase domain containing 13 (ABHD13, SLR 2,1)* und *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 2 (SMARCD2, SLR 1,8)* am meisten an. Im Gegensatz dazu sank die Expression von *Alpha-1-antichymotrypsin 3 (SERPINA3-3, SLR -2,3)*, *Sphingomyelin Phosphodiesterase 1 (SMPD1, SLR -2)*, *Diacylglycerol O-Acyltransferase 2 (DGAT2, SLR -1,5)*, *Actin, Gamma 2, Smooth Muscle, Enteric (ACTG2, SLR -1,4)* und *Lamin B1 (LMNB1, SLR -1,3)* am stärksten.

#### **4.5.3 Vergleich des CCL25-induzierten Expressionsprofils**

In den Chondrozyten, die mit 5 nmol/l CCL25 stimuliert wurden, wurde die Exprimierung von 45

Gene verändert. Diese Expressionsdaten wurden mit den Expressionsdaten von 1427 Genen, die in Chondrozyten aus arthrotischem Knorpelgewebe detektiert wurden, verglichen.

Sieben Gen-Symbole (*ABHD13*, *CDC5L*, *CTSC*, *DIO2*, *FBXL4*, *NCOA7*, *TPM1*) wurden in beiden Expressionsprofilen gefunden. Davon wurden die Transkriptmengen von *Abhydrolase domain containing 13* (*ABHD13*, SLR 2,3), *Cathepsin C* (*CTSC*, SLR 0,8), *Deiodinase, iodothyronine, type II* (*DIO2*, SLR 1,9) und *Nuclear receptor coactivator 7* (*NCOA7*, SLR 1,2) in beiden Expressionsprofilen hochreguliert. Die Expression der restlichen drei Gene (*CDC5L*, *FBXL4*, *TPM1*) wurde in den Chondrozyten aus arthrotischem Knorpelgewebe in die entgegengesetzte Richtung reguliert.

In den Chondrozyten, die mit 500 nmol/l CCL25 induziert wurden, wurde die Expressionsprofile von 146 Genen hoch- und runterreguliert. Deren Expressionsdaten wurden mit den Daten von 1427 unterschiedlich exprimierten Genen in Chondrozyten aus arthrotischem Knorpelgewebe verglichen. Insgesamt wurden 23 Gen-Symbole in beiden Expressionsprofilen gefunden (Tab. 10).

**Tab. 10 In den Expressionsprofilen übereinstimmende Gen-Symbole.**

<b>Gen-Symbol</b>	<b>Gen-Titel</b>	<b>SLR</b>	<b>Wie in a.K. reguliert?</b>
AASDHPPT	aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase	1,2	nein
ABHD13	abhydrolase domain containing 13	2,1	ja
ANGPTL2	angiopoietin-like 2	0,9	nein
COL2A1	collagen, type II, alpha 1	-0,7	ja
COL4A2	collagen, type IV, alpha 2	-0,7	nein
CSNK1E	casein kinase 1, epsilon	-0,7	nein
CWF19L2	CWF19-like 2, cell cycle control ( <i>S. pombe</i> )	0,7	nein
CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	2,2	ja
DAB1	disabled homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )	0,9	nein
GTPBP10	GTP-binding protein 10 (putative)	0,7	nein
JAK2	Janus kinase 2	1,3	nein
MMP-1	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	1	ja
MMP-13	matrix metalloproteinase 13 precursor	1	ja
NCOA7	nuclear receptor coactivator 7	0,9	ja
OGT	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase	0,7	nein
POSTN	periostin, osteoblast specific factor	1	ja
SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	1,4	nein
THBS3	thrombospondin 3	-1,1	nein
TMPO	thymopoietin	1	nein
TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	1,2	ja
TXN	thioredoxin	0,7	ja
USP47	ubiquitin specific peptidase 47	0,7	nein

<b>Gen-Symbol</b>	<b>Gen-Titel</b>	<b>SLR</b>	<b>Wie in a.K. reguliert?</b>
ZNF568	zinc finger protein 568	0,8	nein

SLR- Signal Log Ratio, a.K.- arthrotischem Knorpelgewebe

Davon wurden neun Gene (*ABHD13*, *COL2A1*, *CXCL2*, *MMP-1*, *MMP-13*, *NCOA7*, *POSTN*, *TNFSF10*, *TXN*) in beiden Expressionsprofilen in die gleiche Richtung reguliert. Die Expression der restlichen 14 Gene, stimmte mit der Expression in Chondrozyten aus arthrotischem Knorpelgewebe nicht überein, da sie in die entgegengesetzte Richtung reguliert wurden.



## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal Auswirkungen von CCL25 auf Chondrozyten und deren extrazelluläre Matrix für einen regenerativen *in situ* Therapieansatz bei Knorpelschäden und arthrotischen Knorpelveränderungen untersucht. Wie bei humanen MSCs *in vitro* bereits beobachtet, stieg auch bei höheren CCL25-Konzentrationen die Zahl der migrierten Chondrozyten an. Eine Konzentration von 100 nmol/l, führte zu einer verminderten Anzahl migrierter Zellen. Dass CCL25 nicht nur die Migration von Zellen induzieren, sondern auch vermindern kann, deckt sich mit Beobachtungen bei humanen MSCs *in vitro* (33). Mit den hier durchgeführten Experimenten zur Migration konnte gezeigt werden, dass CCL25 nicht nur einen Effekt auf neoplastische Zellen, MSCs und Bandscheibenzellen (33, 34, 62), sondern auch Chondrozyten hat und diese zur Migration *in vitro* anregen kann. Ein Rückschluss auf eine mögliche migratorische Wirkung von CCL25 in der Gelenkflüssigkeit kann jedoch nicht ohne Weiteres gezogen werden, da sich Chondrozyten *in vivo* nicht in einer Suspension befinden, sondern von einer hyalinen Knorpelmatrix umgeben werden und mit dieser verankert sind.

Neben der Migration wurde erstmalig die Vitalität der Chondrozyten nach siebentägiger Stimulation mit verschiedenen CCL25 Konzentrationen im porcinen 3D-Modell untersucht. Bei allen 3D-Kulturen, wurde eine hohe Vitalität nach CCL25-Stimulation festgestellt, auch nach kombinierter Gabe mit TNF- $\alpha$ . Zusammenfassend blieb die Vitalität der Knorpelzellen innerhalb der 3D-Kulturen über einen weiten Dosisbereich annähernd konstant. Ob und welchen Einfluss CCL25 auf die Vitalität anderer Zelltypen hat, die von der Gelenkflüssigkeit versorgt werden oder an diese grenzen (Meniskuszellen, Tendinozyten, Synoviozyten), wurde in bisherigen Publikationen und in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht und sollte in zukünftigen Studien thematisiert werden.

Da eine intraartikuläre Applikation von CCL25 in die Gelenkhöhle im Rahmen eines regenerativen *in situ* Therapieansatzes angestrebt wird, wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen von CCL25 auf die synthetisierte Knorpelmatrix untersucht. Nachdem eine kartilaginöse EZM von den Chondrozyten der 3D-Kulturen synthetisiert wurde, wurden die Knorpelzellen für sieben Tage mit verschiedenen CCL25-Konzentrationen induziert. Mögliche Alterationen der Matrix wurden mittels Safranin O-Färbung untersucht und computergestützt ausgewertet. Bis zu einer Konzentration von 5 nmol/l zeigte sich ein stabiler GAG-Gehalt der 3D-Kulturen. Ab einer Konzentration von 50 nmol/l reduzierte sich der GAG-Gehalt und sank bei 500 nmol/l auf ein Minimum. Der höchste GAG-Gehalt zeigte sich interessanterweise nicht bei den Kontrollen, sondern bei einer Stimulation mit 5 nmol/l in den Experimenten ohne und in den Experimenten mit kombinierter TNF- $\alpha$ -Gabe. Auch in der Proof-of-Concept-Studie fiel auf, dass die mittlere der

drei angewendeten CCL25-Konzentration in der Hyaluronsäure den protektivsten Effekt hinsichtlich der Arthroseprogression hatte (36). Ebenso konnte in einer anderen Arbeit mit Pelletkulturen aus Bandscheibenzellen eine stärkere Safranin O-Färbung der EZM nach einer Stimulation mit 10 ng/ml (0,7 nmol/l) aufgezeigt werden (34). Höhere CCL25-Konzentrationen führten auch dort nicht zu einer stärkeren Safranin O-Färbung. Bezogen auf Chondrozyten und deren synthetisierte Matrix, gaben die gemessenen Werte für den GAG-Gehalt in der vorliegenden Arbeit erste Hinweise auf mögliche Komplikationen im Rahmen einer intraartikulären Anwendung von hohen CCL25-Dosen.

Wichtig waren zudem die Werte nach einer kombinierten Gabe von TNF- $\alpha$  und CCL25. Dabei führte TNF- $\alpha$  zu einem generell niedrigeren Level an GAG, jedoch schien es durch CCL25 nicht zu einer Aggravation der EZM-Alterationen gekommen zu sein. Da zu Beginn dieser Arbeit weder die notwendige Dauer der Applikation für den angestrebten regenerativen *in situ* Therapieansatz, noch die möglichen Auswirkungen einer Stimulation mit hohen Konzentrationen bekannt waren, wurde ein kurzer Zeitraum von sieben Tagen mit einem Applikationsintervall von 24 Stunden gewählt. Ob ein längerer Zeitraum mit einem anderen Stimulationsintervall (Bsp. 48 Stunden, wöchentlich, monatlich) die Auswirkungen auf die kartilaginöse Matrix reduzieren würde, bleibt offen. Da sich bei hohen Konzentrationen Alterationen der EZM zeigten, sollte vor weiteren Versuchen mit einer intraartikulären CCL25-Applikation die durchschnittliche Konzentration im Gelenk unter physiologischen und pathologischen Bedingungen ermittelt werden, um zu hohe Werte und damit einen möglichen Verlust an Knorpelmatrix zu vermeiden.

Eine Limitation dieser Arbeit ist die fehlende Konzentrationsbestimmung von CCL25 in FBS, welches für die Kultivierung der Chondrozyten genutzt wurde. Zudem wäre ein Nachweis von CCR9 auf humanen Chondrozyten in gesundem und arthrotischem Knorpelgewebe ein Informationsgewinn hinsichtlich der CCR9-Expression im gesunden und pathologisch veränderten Gelenk gewesen.

Mit der Microarray-Analyse wurde zum ersten Mal die Genexpression in Chondrozyten nach Stimulation mit 5 nmol/l und 500 nmol/l CCL25 untersucht. Dabei wurde in den Chondrozyten, die mit 5 nmol/l induziert wurden, die Expression von insgesamt vier Genen verändert, die mit der Zellzyklusregulation in Verbindung gebracht werden können (*CCNA2*, *CDC5L*, *TBRG1*, *ZYG11A*). Davon wurde bei *CDC5L* eine erhöhte Expression detektiert. Das gleichnamige Protein wird in somatischen Zellen ubiquitär exprimiert und scheint an der prä-mRNA-Prozessierung und der Progression des Zellzyklus in der M-Phase beteiligt zu sein (94-96). Unter den verändert exprimierten Genen war auch *ZYG11A*, dessen Expression durch CCL25 um ein Vielfaches hochreguliert wurde. In einer Untersuchung zu *ZYG11A* wurde gezeigt, dass die Expression einen

Einfluss auf den Zellzyklus, die Migration und die Proliferation von NSCLC-Zellen hat (97). Es wurde beobachtet, dass eine Inhibierung von *ZYG11A*, zu einem erhöhten Anteil von NSCLC-Zellen in der G1-Phase führte. Auch die Expression von *TBRG1* wurde in den untersuchten Chondrozyten durch CCL25 hochreguliert. In Studien konnte beobachtet werden, dass es ubiquitär exprimiert wird, den Zellzyklus in der G1-Phase arretieren kann und eine anti-proliferative Wirkung hat (98). Neben den hochregulierten Genen, wurde bei *CCNA2* eine runterregulierte Expression detektiert. In Untersuchungen wurde gezeigt, dass eine Inhibierung von *CCNA2* zu einer Arretierung in der G2-Phase führt und es eine Rolle in der Progression der S-Phase spielt (99, 100). Inwieweit CCL25 eine Auswirkung auf den Zellzyklus und damit auf die Proliferation von Chondrozyten haben könnte, kann mit den vorliegenden Expressionsergebnissen jedoch nicht geklärt werden. Zum einen, weil die meisten Zellzyklus-Proteine phasenabhängig reguliert werden und zum Zeitpunkt der komparativen Datenanalyse nicht bekannt war, in welcher Zyklusphase sich die Chondrozyten in den Kontrollkulturen befanden. Zum anderen können die Ergebnisse nur schwer eingeordnet werden, weil die publizierten Informationen zu den hoch- und runterregulierten Genen implizieren, dass durch CCL25 nicht nur proliferative, sondern auch anti-proliferative Signalwege in den Chondrozyten angestoßen werden. Interessanterweise kam es nach einer Stimulation mit 500 nmol/l nicht zu einer veränderten Expressierung dieser vier Gene. Ob CCL25 eine Auswirkung auf den Zellzyklus und damit auf die Proliferation von Chondrozyten hat, könnte in zukünftigen Arbeiten betrachtet werden.

Die Stimulation mit 500 nmol/l CCL25 führte in den Chondrozyten zu einer weitaus größeren Anzahl von verändert exprimierten Genen. Bei der Auswertung viel auf, dass die Expression der Matrix-Metalloproteasen *MMP-1*, *MMP-8* und *MMP-13* in den Chondrozyten hochreguliert wurde. Alle drei MMPs zählen ihrer Struktur nach zu den typischen MMPs und werden nach ihrer Synthese in den extrazellulären Raum sekretiert. MMP-1 und MMP-13 können Kollagen Typ 2, welches überwiegend in der hyalinen Knorpelmatrix vorkommt, degradieren und werden in Chondrozyten aus arthrotischem Knorpelgewebe vermehrt exprimiert (101, 102). Die Expressionsdaten deuten darauf hin, dass CCL25 die Expression von MMPs beeinflussen könnte, was mit den Beobachtungen bei Krebszellen konform gehen würde. In den Arbeiten mit Krebszellen wurde durch CCL25 eine Vielzahl an MMPs induziert (*MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-8*, *MMP-9*, *MMP-10*, *MMP-11*, *MMP-13*) (56, 62). Zudem wurde bei 500 nmol/l die Expression von *COL2A1* runterreguliert. Die Degradation der kartilaginösen Matrix durch MMPs und die verminderte Synthese von Kollagen Typ II könnten daher zwei mögliche Ursachen für die Alterationen in der histomorphometrischen Analyse ab einer Konzentration von 50 nmol/l CCL25 gewesen sein.

Eins der hochregulierten Gene nach einer Stimulation mit 500 nmol/l war auch *CXCL2* (*C-X-C Motif Chemokine Ligand 2*). Es gehört zur Familie der Chemokine und ist unter anderem für das „Trafficking“ von Neutrophilen zwischen Knochenmark, Gefäßsystem und peripher entzündetem Gewebe von Bedeutung (103, 104). Auch bei humanen MSCs führte die Stimulation mit einer Konzentration von 1.000 nmol/l CCL25 zu einer vermehrten Expression von *CXCL2* in der Genexpressions- und PCR-Analyse (33). Nicht nur bei Patienten mit rheumatoider Arthritis, sondern auch bei Patienten mit Arthrose kann eine Entzündung der Gelenkkapsel präsent sein, welche mit einer Hyperplasie und Zellinfiltration (Makrophagen, T-Lymphozyten, Mastzellen) einhergeht (105). Auch in der Gelenkflüssigkeit von Arthrose-Patienten konnten diverse Immunzellen wie zum Beispiel Neutrophile, T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und Mastzellen nachgewiesen werden (106). Die bisherigen und aktuellen Resultate berücksichtigend, scheint CCL25 die Expression von Zytokinen wie *CXCL2* in Chondrozyten induzieren zu können. Dadurch könnte es nach einer intraartikulären Injektion von hohen CCL25-Dosen indirekt zur Rekrutierung von Neutrophilen kommen, was möglicherweise bestehende Entzündungsprozesse verstärken könnte. Gegen diese Annahme könnte die erhöhte Expression der *MMP-8* bei 5 und 500 nmol/l in den Chondrozyten sprechen. In einer Studie wurde beobachtet, dass *MMP-8*-defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine höhere Anzahl von Neutrophilen und einen schwereren Arthritisverlauf zeigten (107). Es ist bekannt, dass MMPs nicht nur an der Degradation von EZM-Komponenten beteiligt sind. Sie erfüllen darüber hinaus immunregulatorische Aspekte, indem sie beispielsweise Chemokine direkt degradieren und dadurch inaktivieren, oder die Spaltprodukte der Chemokine indirekt als Chemokinrezeptor-Antagonisten wirken. Darüber hinaus wird angenommen, dass MMPs auf diese Weise sogar Entzündungsprozesse abschwächen können (108).

Des Weiteren kam es bei einer Stimulation mit 500 nmol/l zu einer veränderten Expression von Genen, die mit der DNA-Reparatur und dem oxidativen Zellstress in Verbindung gebracht werden können. Beispielsweise wurde die Expression der *LIG4* (*Ligase 4*) durch 500 nmol/l CCL25 hochreguliert. Das Enzym ist an der nicht-homologen DNA-Reparatur bei Doppelstrangbrüchen (Non-homologous end joining, NHEJ) in somatischen Zellen und an der V(D)J-Rekombination in Lymphozyten beteiligt (109, 110). Korrespondierend dazu können Patienten mit einer Funktionsbeeinträchtigung der *LIG4* (*Ligase 4-Syndrom*) neben vielfältigen Symptomen einen Immundefekt aufweisen und zeigen ein erhöhtes Risiko für das Auftreten maligner Erkrankungen (111, 112). Die NHEJ findet nach Literaturangaben in allen Zellzyklusphasen, jedoch hauptsächlich in der G0- und G1-Phase, statt (113, 114). Ursachen für DNA-Doppelstrangbrüche sind unter anderem ionisierende Strahlung und reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen

species, ROS) (113). Interessanterweise führte die Stimulation mit 500 nmol/l auch zur vermehrten Expression von *SOD2* (*Superoxid-Dismutase 2*) und *TXN* (*Thioredoxin*). Die gleichnamigen Proteine können entstandene ROS wie Hyperoxid-Anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) wieder entfernen und sind daher Teil des antioxidativen Schutzsystems von Zellen (115). Es wird angenommen, dass ein gestörtes Gleichgewicht zwischen der ROS-Produktion und dem ROS-Abbau durch das antioxidative Schutzsystem zur Degradation der EZM beiträgt (116). Beispielsweise konnte in Studien nachgewiesen werden, dass Chondrozyten aus arthrotischem Knorpelgewebe eine runterregulierte *SOD2*-Expression aufzeigen (83, 117, 118). Ob es in den Chondrozyten nach Stimulation mit 500 nmol/l CCL25 zu einer erhöhten ROS-Produktion und dadurch indirekt zur EZM-Degradation und Doppelstrangbrüchen gekommen sein könnte, kann mit den durchgeführten Experimenten dieser Arbeit nicht geklärt werden. Eine Runterregulation von Genen des antioxidativen Schutzsystems wurde bei 500 nmol/l nicht beobachtet. Insgesamt fällt in der Genexpressionsanalyse auf, dass es bei der niedrigeren CCL25-Dosis von 5 nmol/l nicht zu einer veränderten Expression von Genen kam, die mit der DNA-Reparatur und dem oxidativen Zellstress assoziiert wurden.

Verschiedene Zytokine wie  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\beta$  und  $IL-6$  werden als wichtige Mediatoren in der Pathogenese der Arthrose angesehen (119). In der Mikroarray-Analyse dieser Arbeit konnte kein Einfluss von CCL25 auf die Expression dieser Zytokine beobachtet werden. Da Zytokine an sich in der Lage sind, arthroseähnliche Veränderungen hervorzurufen, wurden die Expressionsprofile der Chondrozyten nach Stimulation mit 5 und 500 nmol/l CCL25 mit publizierten Expressionsdaten anderer Arbeitsgruppen von Chondrozyten aus arthrotischem Knorpelgewebe verglichen. Insgesamt stimmten bei 5 nmol/l sieben Gen-Titel überein. Davon wurden 57% der Gene ähnlich wie in arthrotischem Knorpelgewebe hoch- oder runterreguliert. Bei der höheren CCL25-Konzentration stimmten 23 Gen-Titel mit den veröffentlichten Genen überein, jedoch sank hier der Anteil ähnlich regulierter Gene auf 39%. Der Vergleich der Profile zeigt, dass durch CCL25 auch Gene reguliert wurden, die in arthrotischem Knorpelgewebe verändert exprimiert werden. Dabei führte eine Konzentration von 500 nmol/l zu einer höheren Anzahl ähnlich regulierte Gene.

Durch die Mikroarrayanalyse konnten zahlreiche Informationen über verändert exprimierte Gene in den stimulierten Chondrozyten gewonnen werden. Auch kleinere Expressionsveränderungen können einen Einfluss auf die Chondrozyten und deren synthetisierte Matrix haben. Jedoch werden diese durch die Aufzählung der am stärksten hoch- und runterregulierten Gene nicht berücksichtigt. Zudem stellen auch fehlende Veränderungen, wie zum Beispiel bei *ACAN*, *COL10A1*, *COL1A1*, *COL1A2* und *COMP*, wichtige Informationen dar, welche nicht weiter in

Tabellen oder Figuren abgebildet wurden. Für manche Gene konnten zudem nur wenige, widersprüchliche oder keine Informationen zu deren Funktionen in der Literatur gefunden werden, was zu einer Anzahl von insgesamt 58 Genen in der Kategorie „Verschiedenes“ geführt hat. Zu diesen Genen fehlen daher zum jetzigen Zeitpunkt Informationen hinsichtlich der möglichen Auswirkungen von CCL25 in Chondrozyten. Eine weitere Limitation dieser Arbeit ist die geringe Anzahl an Donoren, jedoch geben die Ergebnisse erste Indizien für mögliche Auswirkungen von CCL25 auf Chondrozyten und deren EZM, was für den angestrebten regenerativen *in situ* Therapieansatz von Bedeutung ist.

Ob eine lokale Applikation von CCL25 für Tumorpatienten Gefahren birgt, kann mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht beantwortet werden, da sich die Experimente vor allem auf die Auswirkungen von CCL25 auf Chondrozyten und deren synthetisierte Knorpelmatrix in einem *in vitro* Modell fokussieren. Dies sollte jedoch bei weiteren Studien mit CCL25 hinterfragt werden, da eine Vielzahl an Chemokinen und Chemokinrezeptoren in neoplastischem Gewebe verändert exprimiert werden und an der Proliferation und Metastasierung von Tumoren beteiligt sein können.

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass CCL25 eine *in vitro* Migration von Knorpelzellen induzieren kann. Weiterhin konnte bei allen angewendeten Konzentrationen eine hohe Vitalität der Chondrozyten in den 3D-Kulturen beobachtet werden. Bei der höchsten Dosis jedoch, zeigte sich eine erhöhte Expression von Genen, die mit der Apoptose von Zellen assoziiert werden können. In einem Dosisbereich von 0 bis 5 nmol/l konnte ein stabiler Gehalt an Proteoglykanen beobachtet werden. Die Auswirkungen auf die extrazelluläre Matrix waren von der verwendeten CCL25-Dosis abhängig. Die höchste Konzentration von 500 nmol/l führte zu einem Verlust an Proteoglykanen und zu einer vermehrten Expression von Kollagenasen. Die Untersuchungen geben erste Erkenntnisse über mögliche negative Effekte bei einer Anwendung von hohen CCL25-Konzentrationen im Rahmen eines regenerativen *in situ* Therapieansatzes in der Gelenkhöhle.

## Literaturverzeichnis

1. Thomas AC, Hubbard-Turner T, Wikstrom EA, Palmieri-Smith RM. Epidemiology of Posttraumatic Osteoarthritis. *J Athl Train*. 2017;52(6):491-6.
2. Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, Conaghan PG, Cooper C, Goldring MB, Goldring SR, Jones G, Teichtahl AJ, Pelletier JP. Osteoarthritis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16072.
3. Zanetti M, Bruder E, Romero J, Hodler J. Bone marrow edema pattern in osteoarthritic knees: correlation between MR imaging and histologic findings. *Radiology*. 2000;215(3):835-40.
4. Klement MR, Sharkey PF. The Significance of Osteoarthritis-associated Bone Marrow Lesions in the Knee. *J Am Acad Orthop Surg*. 2019;27(20):752-9.
5. Jaynes M, Kumar AB. The risks of long-term use of proton pump inhibitors: a critical review. *Ther Adv Drug Saf*. 2019;10:2042098618809927.
6. Bellamy N, Campbell J, Robinson V, Gee T, Bourne R, Wells G. Viscosupplementation for the treatment of osteoarthritis of the knee. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006(2):CD005321.
7. Raman R, Henrotin Y, Chevalier X, Migliore A, Jerosch J, Montfort J, Bard H, Baron D, Richette P, Conrozier T. Decision Algorithms for the Retreatment with Viscosupplementation in Patients Suffering from Knee Osteoarthritis: Recommendations from the EUROpean VIScosupplementation CONsensus Group (EUROVISCO). *Cartilage*. 2018;9(3):263-75.
8. Bhandari M, Bannuru RR, Babins EM, Martel-Pelletier J, Khan M, Raynauld JP, Frankovich R, McLeod D, Devji T, Phillips M, Schemitsch EH, Pelletier JP. Intra-articular hyaluronic acid in the treatment of knee osteoarthritis: a Canadian evidence-based perspective. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2017;9(9):231-46.
9. Drexler M, Dwyer T, Chakraverty R, Farno A, Backstein D. Assuring the happy total knee replacement patient. *Bone Joint J*. 2013;95-B(11 Suppl A):120-3.
10. Gunaratne R, Pratt DN, Banda J, Fick DP, Khan RJK, Robertson BW. Patient Dissatisfaction Following Total Knee Arthroplasty: A Systematic Review of the Literature. *J Arthroplasty*. 2017;32(12):3854-60.
11. Brown C, McKee C, Bakshi S, Walker K, Hakman E, Halassy S, Svinarich D, Dodds R, Govind CK, Chaudhry GR. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019;13(9):1738-55.
12. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
13. Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell*. 2012;10(6):709-16.
14. Mizuno M, Katano H, Mabuchi Y, Ogata Y, Ichinose S, Fujii S, Otabe K, Komori K, Ozeki N, Koga H, Tsuji K, Akazawa C, Muneta T, Sekiya I. Specific markers and properties of synovial

mesenchymal stem cells in the surface, stromal, and perivascular regions. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):123.

15. Barry F, Murphy M. Mesenchymal stem cells in joint disease and repair. *Nat Rev Rheumatol.* 2013;9(10):584-94.

16. Zhang S, Chuah SJ, Lai RC, Hui JHP, Lim SK, Toh WS. MSC exosomes mediate cartilage repair by enhancing proliferation, attenuating apoptosis and modulating immune reactivity. *Biomaterials.* 2018;156:16-27.

17. Cosenza S, Ruiz M, Toupet K, Jorgensen C, Noel D. Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis. *Sci Rep.* 2017;7(1):16214.

18. Mendt M, Rezvani K, Shpall E. Mesenchymal stem cell-derived exosomes for clinical use. *Bone Marrow Transplant.* 2019;54(Suppl 2):789-92.

19. Barry F. MSC Therapy for Osteoarthritis: An Unfinished Story. *J Orthop Res.* 2019;37(6):1229-35.

20. Jo CH, Lee YG, Shin WH, Kim H, Chai JW, Jeong EC, Kim JE, Shim H, Shin JS, Shin IS, Ra JC, Oh S, Yoon KS. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells.* 2014;32(5):1254-66.

21. Orozco L, Munar A, Soler R, Alberca M, Soler F, Huguet M, Sentis J, Sanchez A, Garcia-Sancho J. Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study. *Transplantation.* 2013;95(12):1535-41.

22. Vega A, Martin-Ferrero MA, Del Canto F, Alberca M, Garcia V, Munar A, Orozco L, Soler R, Fuertes JJ, Huguet M, Sanchez A, Garcia-Sancho J. Treatment of Knee Osteoarthritis With Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Randomized Controlled Trial. *Transplantation.* 2015;99(8):1681-90.

23. Peeters CM, Leijns MJ, Reijman M, van Osch GJ, Bos PK. Safety of intra-articular cell-therapy with culture-expanded stem cells in humans: a systematic literature review. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013;21(10):1465-73.

24. Lamo-Espinosa JM, Mora G, Blanco JF, Granero-Molto F, Nunez-Cordoba JM, Lopez-Elio S, Andreu E, Sanchez-Guijo F, Aquerreta JD, Bondia JM, Valenti-Azcarate A, Del Consuelo Del Canizo M, Villaron EM, Valenti-Nin JR, Prosper F. Intra-articular injection of two different doses of autologous bone marrow mesenchymal stem cells versus hyaluronic acid in the treatment of knee osteoarthritis: long-term follow up of a multicenter randomized controlled clinical trial (phase I/II). *J Transl Med.* 2018;16(1):213.

25. Dall'Oca C, Cengarle M, Costanzo A, Giannini N, Vacchiano A, Magnan B. Current concepts in treatment of early knee osteoarthritis and osteochondral lesions; the role of biological augmentations. *Acta Biomed.* 2017;88(4S):5-10.

26. Zhang W, Ouyang H, Dass CR, Xu J. Current research on pharmacologic and regenerative therapies for osteoarthritis. *Bone Res.* 2016;4:15040.



27. Toh WS, Lai RC, Hui JHP, Lim SK. MSC exosome as a cell-free MSC therapy for cartilage regeneration: Implications for osteoarthritis treatment. *Semin Cell Dev Biol.* 2017;67:56-64.
28. Phinney DG, Pittenger MF. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells.* 2017;35(4):851-8.
29. Lai RC, Chen TS, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. *Regen Med.* 2011;6(4):481-92.
30. Schenk S, Mal N, Finan A, Zhang M, Kiedrowski M, Popovic Z, McCarthy PM, Penn MS. Monocyte chemotactic protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor. *Stem Cells.* 2007;25(1):245-51.
31. Ji JF, He BP, Dheen ST, Tay SS. Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem Cells.* 2004;22(3):415-27.
32. Ullah M, Eucker J, Sittinger M, Ringe J. Mesenchymal stem cells and their chondrogenic differentiated and dedifferentiated progeny express chemokine receptor CCR9 and chemotactically migrate toward CCL25 or serum. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(4):99.
33. Binger T, Stich S, Andreas K, Kaps C, Sezer O, Notter M, Sittinger M, Ringe J. Migration potential and gene expression profile of human mesenchymal stem cells induced by CCL25. *Exp Cell Res.* 2009;315(8):1468-79.
34. Stich S, Moller A, Cabraja M, Kruger JP, Hondke S, Endres M, Ringe J, Sittinger M. Chemokine CCL25 Induces Migration and Extracellular Matrix Production of Anulus Fibrosus-Derived Cells. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8).
35. Andreas K, Sittinger M, Ringe J. Toward in situ tissue engineering: chemokine-guided stem cell recruitment. *Trends Biotechnol.* 2014;32(9):483-92.
36. Ringe J, Hemmati-Sadeghi S, Frohlich K, Engels A, Reiter K, Dehne T, Sittinger M. CCL25-Supplemented Hyaluronic Acid Attenuates Cartilage Degeneration in a Guinea Pig Model of Knee Osteoarthritis. *J Orthop Res.* 2019;37(8):1723-9.
37. Yung SC, Murphy PM. Antimicrobial chemokines. *Front Immunol.* 2012;3:276.
38. Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J.* 2018;285(16):2944-71.
39. Ulvmar MH, Hub E, Rot A. Atypical chemokine receptors. *Exp Cell Res.* 2011;317(5):556-68.
40. Nibbs RJ, Graham GJ. Immune regulation by atypical chemokine receptors. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(11):815-29.
41. Wurbel MA, Philippe JM, Nguyen C, Victorero G, Freeman T, Wooding P, Miazek A, Mattei MG, Malissen M, Jordan BR, Malissen B, Carrier A, Naquet P. The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *Eur J Immunol.* 2000;30(1):262-71.

42. Kunkel EJ, Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J, Boisvert J, Roberts AI, Ebert EC, Vierra MA, Goodman SB, Genovese MC, Wardlaw AJ, Greenberg HB, Parker CM, Butcher EC, Andrew DP, Agace WW. Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J Exp Med.* 2000;192(5):761-8.
43. Uehara S, Song K, Farber JM, Love PE. Characterization of CCR9 expression and CCL25/thymus-expressed chemokine responsiveness during T cell development: CD3(high)CD69+ thymocytes and gammadeltaTCR+ thymocytes preferentially respond to CCL25. *J Immunol.* 2002;168(1):134-42.
44. Habtezion A, Nguyen LP, Hadeiba H, Butcher EC. Leukocyte Trafficking to the Small Intestine and Colon. *Gastroenterology.* 2016;150(2):340-54.
45. Papadakis KA, Prehn J, Nelson V, Cheng L, Binder SW, Ponath PD, Andrew DP, Targan SR. The role of thymus-expressed chemokine and its receptor CCR9 on lymphocytes in the regional specialization of the mucosal immune system. *J Immunol.* 2000;165(9):5069-76.
46. Trivedi PJ, Bruns T, Ward S, Mai M, Schmidt C, Hirschfield GM, Weston CJ, Adams DH. Intestinal CCL25 expression is increased in colitis and correlates with inflammatory activity. *J Autoimmun.* 2016;68:98-104.
47. Sands BE. Leukocyte Anti-Trafficking Strategies: Current Status and Future Directions. *Dig Dis.* 2017;35(1-2):13-20.
48. Wurbel MA, Le Bras S, Ibourk M, Pardo M, McIntire MG, Coco D, Geha RS, Fiebiger E, Snapper SB. CCL25/CCR9 interactions are not essential for colitis development but are required for innate immune cell protection from chronic experimental murine colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2014;20(7):1165-76.
49. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:217-42.
50. Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol.* 2001;2(2):95-101.
51. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol.* 2002;30(9):973-81.
52. Chow MT, Luster AD. Chemokines in cancer. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(12):1125-31.
53. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* 2001;410(6824):50-6.
54. Zhong Y, Jiang L, Lin H, Li B, Lan J, Liang S, Shen B, Lei Z, Zheng W. Expression of CC chemokine receptor 9 predicts poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Diagn Pathol.*

2015;10:101.

55. Zhang Z, Qin C, Wu Y, Su Z, Xian G, Hu B. CCR9 as a prognostic marker and therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 2014;31(4):1629-36.
56. Johnson EL, Singh R, Singh S, Johnson-Holiday CM, Grizzle WE, Partridge EE, Lillard JW, Jr. CCL25-CCR9 interaction modulates ovarian cancer cell migration, metalloproteinase expression, and invasion. *World J Surg Oncol.* 2010;8:62.
57. Li B, Wang Z, Zhong Y, Lan J, Li X, Lin H. CCR9-CCL25 interaction suppresses apoptosis of lung cancer cells by activating the PI3K/Akt pathway. *Med Oncol.* 2015;32(3):66.
58. Johnson-Holiday C, Singh R, Johnson EL, Grizzle WE, Lillard JW, Jr., Singh S. CCR9-CCL25 interactions promote cisplatin resistance in breast cancer cell through Akt activation in a PI3K-dependent and FAK-independent fashion. *World J Surg Oncol.* 2011;9:46.
59. Sharma PK, Singh R, Novakovic KR, Eaton JW, Grizzle WE, Singh S. CCR9 mediates PI3K/AKT-dependent antiapoptotic signals in prostate cancer cells and inhibition of CCR9-CCL25 interaction enhances the cytotoxic effects of etoposide. *Int J Cancer.* 2010;127(9):2020-30.
60. Johnson EL, Singh R, Johnson-Holiday CM, Grizzle WE, Partridge EE, Lillard JW, Jr., Singh S. CCR9 interactions support ovarian cancer cell survival and resistance to cisplatin-induced apoptosis in a PI3K-dependent and FAK-independent fashion. *J Ovarian Res.* 2010;3:15.
61. Gupta P, Sharma PK, Mir H, Singh R, Singh N, Kloecker GH, Lillard JW, Jr., Singh S. CCR9/CCL25 expression in non-small cell lung cancer correlates with aggressive disease and mediates key steps of metastasis. *Oncotarget.* 2014;5(20):10170-9.
62. Singh S, Singh UP, Stiles JK, Grizzle WE, Lillard JW, Jr. Expression and functional role of CCR9 in prostate cancer cell migration and invasion. *Clin Cancer Res.* 2004;10(24):8743-50.
63. Mollica Poeta V, Massara M, Capucetti A, Bonocchi R. Chemokines and Chemokine Receptors: New Targets for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2019;10:379.
64. Zlotnik A, Burkhardt AM, Homey B. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(9):597-606.
65. Lubke C, Ringe J, Krenn V, Fernahl G, Pelz S, Kreuzsch-Brinker R, Sittlinger M, Paulitschke M. Growth characterization of neo porcine cartilage pellets and their use in an interactive culture model. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13(6):478-87.
66. Schlichting N, Dehne T, Mans K, Endres M, Stuhlmüller B, Sittlinger M, Kaps C, Ringe J. Suitability of porcine chondrocyte micromass culture to model osteoarthritis in vitro. *Mol Pharm.* 2014;11(7):2092-105.
67. Endres M, Andreas K, Kalwitz G, Freymann U, Neumann K, Ringe J, Sittlinger M, Haupl T, Kaps C. Chemokine profile of synovial fluid from normal, osteoarthritis and rheumatoid arthritis patients: CCL25, CXCL10 and XCL1 recruit human subchondral mesenchymal progenitor cells. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18(11):1458-66.

68. Laudanski P, Lemancewicz A, Kuc P, Charkiewicz K, Ramotowska B, Kretowska M, Jasinska E, Raba G, Karwasik-Kajszczyk K, Kraczkowski J, Laudanski T. Chemokines profiling of patients with preterm birth. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:185758.
69. Schmitz S, Desel C. Kombinierte Zellzählung und Vitaltest mit Trypanblau im Häemocytometer. In: *Der Experimentator - Zellbiologie*. 1. Auflage, Heidelberg: Springer Spektrum; 2018, S. 140.
70. Gstraunthaler G, Lindl T. Vitalfärbung zur Testung auf Lebensfähigkeit von Zellen. In: *Zell- und Gewebekultur - Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. 7. Auflage, Berlin: Springer Spektrum; 2013, S. 130-1.
71. Nixdorf-Bergweiler B. Markierung von lebenden Zellen mit Fluoresceindiacetat. In: *Romeis - Mikroskopische Technik*. 19. Auflage, Heidelberg: Springer Spektrum; 2015, S. 290-1.
72. Gudrun L. Fluorochrome. In: *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2. Auflage, Wien: Springer-Verlag; 2012, S. 274-5.
73. Kiviranta I, Jurvelin J, Tammi M, Saamanen AM, Helminen HJ. Microspectrophotometric quantitation of glycosaminoglycans in articular cartilage sections stained with Safranin O. *Histochemistry*. 1985;82(3):249-55.
74. Camplejohn KL, Allard SA. Limitations of safranin 'O' staining in proteoglycan-depleted cartilage demonstrated with monoclonal antibodies. *Histochemistry*. 1988;89(2):185-8.
75. Causton H, Quackenbush J. Exogenous ('spiked-in') controls. In: *Microarray Gene Expression Data Analysis: A Beginner's Guide*. 1. Auflage, United Kingdom: John Wiley and Sons; 2003, S. 24.
76. Feichtinger J. Annotation. In: *Computational Medicine: Tools and Challenges*. 1. Auflage, Wien: Springer; 2012, S. 65.
77. Karlsson C, Dehne T, Lindahl A, Brittberg M, Pruss A, Sittlinger M, Ringe J. Genome-wide expression profiling reveals new candidate genes associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(4):581-92.
78. Zhong L, Huang X, Karperien M, Post JN. Correlation between Gene Expression and Osteoarthritis Progression in Human. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7).
79. Dunn S, Kolomytkin OV, Waddell DD, Marino AA. Hyaluronan-binding receptors: possible involvement in osteoarthritis. *Mod Rheumatol*. 2009;19(2):151-5.
80. Giotti B, Chen SH, Barnett MW, Regan T, Ly T, Wiemann S, Hume DA, Freeman TC. Assembly of a parts list of the human mitotic cell cycle machinery. *J Mol Cell Biol*. 2019;11(8):703-18.
81. Reed SM, Hagen J, Tompkins VS, Thies K, Quelle FW, Quelle DE. Nuclear interactor of ARF and Mdm2 regulates multiple pathways to activate p53. *Cell Cycle*. 2014;13(8):1288-98.

82. Gilbert SJ, Blain EJ, Duance VC, Mason DJ. Sphingomyelinase decreases type II collagen expression in bovine articular cartilage chondrocytes via the ERK signaling pathway. *Arthritis Rheum.* 2008;58(1):209-20.
83. Scott JL, Gabrielides C, Davidson RK, Swingle TE, Clark IM, Wallis GA, Boot-Handford RP, Kirkwood TB, Taylor RW, Young DA. Superoxide dismutase downregulation in osteoarthritis progression and end-stage disease. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(8):1502-10.
84. Gavriilidis C, Miwa S, von Zglinicki T, Taylor RW, Young DA. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis is associated with down-regulation of superoxide dismutase 2. *Arthritis Rheum.* 2013;65(2):378-87.
85. Chang X, Cui Y, Zong M, Zhao Y, Yan X, Chen Y, Han J. Identification of proteins with increased expression in rheumatoid arthritis synovial tissues. *J Rheumatol.* 2009;36(5):872-80.
86. Jikimoto T, Nishikubo Y, Koshiba M, Kanagawa S, Morinobu S, Morinobu A, Saura R, Mizuno K, Kondo S, Toyokuni S, Nakamura H, Yodoi J, Kumagai S. Thioredoxin as a biomarker for oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Mol Immunol.* 2002;38(10):765-72.
87. Vaillancourt F, Fahmi H, Shi Q, Lavigne P, Ranger P, Fernandes JC, Benderdour M. 4-Hydroxynonenal induces apoptosis in human osteoarthritic chondrocytes: the protective role of glutathione-S-transferase. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(5):R107.
88. Suzuki J, Denning DP, Imanishi E, Horvitz HR, Nagata S. Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. *Science.* 2013;341(6144):403-6.
89. Damgaard RB, Gyrd-Hansen M. Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins in regulation of inflammation and innate immunity. *Discov Med.* 2011;11(58):221-31.
90. Qian Q, Zhou H, Chen Y, Shen C, He S, Zhao H, Wang L, Wan D, Gu W. VMP1 related autophagy and apoptosis in colorectal cancer cells: VMP1 regulates cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;443(3):1041-7.
91. Glaza P, Osipiuk J, Wenta T, Zurawa-Janicka D, Jarzab M, Lesner A, Banecki B, Skorko-Glonek J, Joachimiak A, Lipinska B. Structural and Functional Analysis of Human HtrA3 Protease and Its Subdomains. *PLoS One.* 2015;10(6):e0131142.
92. Pettersen I, Figenschau Y, Olsen E, Bakkelund W, Smedsrod B, Sveinbjornsson B. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces apoptosis in human articular chondrocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;296(3):671-6.
93. Lee SW, Lee HJ, Chung WT, Choi SM, Rhyu SH, Kim DK, Kim KT, Kim JY, Kim JM, Yoo YH. TRAIL induces apoptosis of chondrocytes and influences the pathogenesis of experimentally induced rat osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(2):534-42.
94. Graub R, Lancero H, Pedersen A, Chu M, Padmanabhan K, Xu XQ, Spitz P, Chalkley R, Burlingame AL, Stokoe D, Bernstein HS. Cell cycle-dependent phosphorylation of human CDC5 regulates RNA processing. *Cell Cycle.* 2008;7(12):1795-803.
95. Qiu H, Zhang X, Ni W, Shi W, Fan H, Xu J, Chen Y, Ni R, Tao T. Expression and Clinical

Role of Cdc5L as a Novel Cell Cycle Protein in Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis Sci.* 2016;61(3):795-805.

96. Mu R, Wang YB, Wu M, Yang Y, Song W, Li T, Zhang WN, Tan B, Li AL, Wang N, Xia Q, Gong WL, Wang CG, Zhou T, Guo N, Sang ZH, Li HY. Depletion of pre-mRNA splicing factor Cdc5L inhibits mitotic progression and triggers mitotic catastrophe. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1151.

97. Wang X, Sun Q, Chen C, Yin R, Huang X, Wang X, Shi R, Xu L, Ren B. ZYG11A serves as an oncogene in non-small cell lung cancer and influences CCNE1 expression. *Oncotarget.* 2016;7(7):8029-42.

98. Tompkins VS, Hagen J, Frazier AA, Lushnikova T, Fitzgerald MP, di Tommaso A, Ladeveze V, Domann FE, Eischen CM, Quelle DE. A novel nuclear interactor of ARF and MDM2 (NIAM) that maintains chromosomal stability. *J Biol Chem.* 2007;282(2):1322-33.

99. Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.* 1992;11(3):961-71.

100. Zindy F, Lamas E, Chenivresse X, Sobczak J, Wang J, Fesquet D, Henglein B, Brecht C. Cyclin A is required in S phase in normal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;182(3):1144-54.

101. Rose BJ, Kooyman DL. A Tale of Two Joints: The Role of Matrix Metalloproteases in Cartilage Biology. *Dis Markers.* 2016;2016:4895050.

102. Troeberg L, Nagase H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1824(1):133-45.

103. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:659-702.

104. Girbl T, Lenn T, Perez L, Rolas L, Barkaway A, Thiriot A, Del Fresno C, Lynam E, Hub E, Thelen M, Graham G, Alon R, Sancho D, von Andrian UH, Voisin MB, Rot A, Nourshargh S. Distinct Compartmentalization of the Chemokines CXCL1 and CXCL2 and the Atypical Receptor ACKR1 Determine Discrete Stages of Neutrophil Diapedesis. *Immunity.* 2018;49(6):1062-76 e6.

105. de Lange-Brokaar BJ, Ioan-Facsinay A, van Osch GJ, Zuurmond AM, Schoones J, Toes RE, Huizinga TW, Kloppenburg M. Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012;20(12):1484-99.

106. Kriegova E, Manukyan G, Mikulkova Z, Gabcova G, Kudelka M, Gajdos P, Gallo J. Gender-related differences observed among immune cells in synovial fluid in knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2018;26(9):1247-56.

107. Cox JH, Starr AE, Kappelhoff R, Yan R, Roberts CR, Overall CM. Matrix metalloproteinase 8 deficiency in mice exacerbates inflammatory arthritis through delayed neutrophil apoptosis and reduced caspase 11 expression. *Arthritis Rheum.* 2010;62(12):3645-55.

108. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of

inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(8):617-29.

109. Pannunzio NR, Watanabe G, Lieber MR. Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* 2018;293(27):10512-23.

110. Tomkinson AE, Naila T, Khattri Bhandari S. Altered DNA ligase activity in human disease. *Mutagenesis.* 2020;35(1):51-60.

111. Altmann T, Gennery AR. DNA ligase IV syndrome; a review. *Orphanet J Rare Dis.* 2016;11(1):137.

112. Chistiakov DA. Ligase IV syndrome. *Adv Exp Med Biol.* 2010;685:175-85.

113. Curtin NJ. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(12):801-17.

114. Bolderson E, Richard DJ, Zhou BB, Khanna KK. Recent advances in cancer therapy targeting proteins involved in DNA double-strand break repair. *Clin Cancer Res.* 2009;15(20):6314-20.

115. Bolduc JA, Collins JA, Loeser RF. Reactive oxygen species, aging and articular cartilage homeostasis. *Free Radic Biol Med.* 2019;132:73-82.

116. Loeser RF, Collins JA, Diekman BO. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(7):412-20.

117. Aigner T, Fundel K, Saas J, Gebhard PM, Haag J, Weiss T, Zien A, Obermayr F, Zimmer R, Bartnik E. Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54(11):3533-44.

118. Ruiz-Romero C, Calamia V, Mateos J, Carreira V, Martinez-Gomariz M, Fernandez M, Blanco FJ. Mitochondrial dysregulation of osteoarthritic human articular chondrocytes analyzed by proteomics: a decrease in mitochondrial superoxide dismutase points to a redox imbalance. *Mol Cell Proteomics.* 2009;8(1):172-89.

119. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(1):33-42.

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 Am „Trafficking“ (Zellverkehr) der T-Zellen beteiligte Proteine im Dünndarm. ....	7
Abbildung 2 Aufnahmen aus der Wellmitte mit angefärbten porcinen Chondrozyten.....	22
Abbildung 3 Pellet mit Vitalfärbung. ....	25
Abbildung 4 Pelletaufnahmen nach Vitalfärbung.....	25
Abbildung 5 Pelletschnitte nach Safranin O/Fast Green-Färbung. ....	27
Abbildung 6 Reaktion porciner Chondrozyten (n = 5) auf rekombinant humanes CCL25 im Migrations-Assay....	42
Abbildung 7 Vitalität der Chondrozyten in den Experimenten 1 und 2.....	44
Abbildung 8 Vitalität der Chondrozyten in den Experimenten 3 und 4.....	45
Abbildung 9 GAG-Gehalt. ....	47
Abbildung 10 Genfunktionen nach Stimulation mit 5 nmol/l CCL25.....	49
Abbildung 11 Genfunktionen nach Stimulation mit 500 nmol/l CCL25.....	50



## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 Geräte. ....	12
Tabelle 2 Software. ....	12
Tabelle 3 Kits. ....	13
Tabelle 4 Verbrauchsmaterial. ....	15
Tabelle 5 Lösungen und Medien. ....	15
Tabelle 6 Zytokine und Enzyme. ....	17
Tabelle 7 28S-18S-Verhältnis/RIN der RNA-Proben nach RNA-Isolierung. ....	31
Tabelle 8 Ergebnisse der Konzentrations- und Reinheitsanalyse. ....	33
Tabelle 9 Übersicht aller regulierten Gene und Kategorisierungen. ....	37
Tabelle 10 In den Expressionsprofilen übereinstimmende Gen-Symbole. ....	52

## **Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Luise Lüderitz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zur Auswirkung von CCL25 auf Chondrozyten und deren extrazelluläre Matrix im Rahmen eines regenerativen *in situ* Therapieansatzes bei Knorpeldefekten“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Luise Lüderitz hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation: Luise Lüderitz, Tilo Dehne, Michael Sittinger and Jochen Ringe, Dose-Dependent Effect of Mesenchymal Stromal Cell Recruiting Chemokine CCL25 on Porcine Tissue-Engineered Healthy and Osteoarthritic Cartilage, International Journal of Molecular Sciences, 2018

Beitrag im Einzelnen:

- Eigenständige Planung der Experimente mit Unterstützung durch Dr. Ringe, Dr. Dehne und Prof. Sittinger
- Durchführung des Migrations-Assays mit MSCs und der Experimente mit porcinen Chondrozyten im *in vitro* 3D-Modell (Vitalfärbung, Safranin O/Fast Green-Färbung, RNA-Isolierung)
- Verfassen des Manuskripts gemeinsam mit Dr. Ringe - Hauptanteil an Zusammenfassung, Einleitung, Methodik und Diskussion
- Erstellen der Graphik für die Annotationsanalyse
- Einreichen des Manuskripts und das Umsetzen von Änderungen im Rahmen des Reviewprozesses

Die Ergebnisse der Vitalfärbung dieser Dissertation wurden in der Abbildung 2 A-C der Publikation präsentiert. Aus den Aufnahmen der mit Safranin O gefärbten 3D-Kulturen entstand die Abbildung 3 A. Des Weiteren wurden die Aufnahmen für die statistische Auswertung der durchschnittlichen Intensität in Abbildung 3 B verwendet. Die publizierten Ergebnisse der PCR- (Abbildung 3 C) und Genexpressionsanalyse (Abbildung 4) basieren auf den Experimenten 1 - 4 der vorliegenden Arbeit mit dem 3D-Modell aus porcinen Chondrozyten.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **Publikationsliste**

Lüderitz L, Dehne T, Sittinger M, Ringe J

**Dose-Dependent Effect of Mesenchymal Stromal Cell Recruiting Chemokine CCL25 on Porcine Tissue-Engineered Healthy and Osteoarthritic Cartilage.**

Int J Mol Sci. 2018 Dec 23;20(1):52.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Michael Sittinger für die Überlassung des Themas und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe für Tissue Engineering. Darüber hinaus möchte ich mich für seinen fachlichen Rat, seine stete Unterstützung und das Vertrauen während der gesamten Zeit im Labor und während der Anfertigung des Papers und der Dissertation bedanken.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Ing. Tilo Dehne für seine Geduld und Zeit, die er während der Arbeit im Labor neben weiteren Projekten und Studenten für mich hatte, bedanken. Seine fachlichen Anregungen, konstruktiven Kritiken und seine sorgfältige Unterstützung bei der Planung, Umsetzung und Auswertung der experimentellen Arbeit haben zu einem großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Ing. Jochen Ringe für seine Anregungen, konstruktiven Kritiken, fachliche Begleitung und Unterstützung bei der Umsetzung der experimentellen Arbeit und der wissenschaftlichen Publikation bedanken.

Mein ausdrücklicher Dank gilt Ingrid Semjonow für Ihre scheinbar grenzenlose Energie, Zuspruch, Kritik und Unterstützung im Labor. Bei Anja Fleischmann, Samuel Vetterlein, Dr. Michaela Endres, Dr. Philipp Krüger und Heike Augst möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima, die Unterstützung, Hilfsbereitschaft, das Verständnis und den Rückhalt bedanken.

Daneben möchte ich mich herzlich für die schönen Momente mit den Studenten David Hartzke, Anke Möller, Alexander Balß und Shabnam Hemmati-Sadeghi im Labor bedanken.