

AUS DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG  
PROF. DR. RER. NAT. SUSANNE GRÄSSEL  
EXPERIMENTELLE ORTHOPÄDIE

**Der Einfluss von Semaphorin 3A und seinem Rezeptor Neuropilin-1  
auf artikuläre Chondrozyten bei Gonarthrose**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Johanna Reichart

2020



AUS DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG  
PROF. DR. RER. NAT. SUSANNE GRÄSSEL  
EXPERIMENTELLE ORTHOPÄDIE

**Der Einfluss von Semaphorin 3A und seinem Rezeptor Neuropilin-1  
auf artikuläre Chondrozyten bei Gonarthrose**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Johanna Reichart

2020

Dekan:

Prof. Dr. med. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Susanne Grässel

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Rainer H. Straub

Tag der mündlichen Prüfung:

14. September 2020

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	3
1.1	Die Pathophysiologie von Osteoarthritis .....	3
1.1.1	Veränderungen des Gelenks .....	3
1.1.2	Veränderungen der Chondrozyten .....	4
1.1.3	Wichtige Marker der Chondrozytenbiologie bei OA .....	9
1.2	Der Repulsionsfaktor Semaphorin 3A .....	13
1.3	Der Rezeptor Neuropilin-1 .....	14
1.4	Zielsetzung der Arbeit .....	19
2	Material und Methoden .....	20
2.1	Zellkultur .....	20
2.1.1	Isolierung und Kultivierung von humanen artikulären Chondrozyten .....	20
2.1.2	Transiente Transfektion von humanen artikulären Chondrozyten mit siRNA .....	22
2.2	Molekularbiologische Analysen .....	23
2.2.1	RNA-Isolierung .....	23
2.2.2	cDNA-Synthese .....	25
2.2.3	Quantitative real-time PCR (qPCR) .....	25
2.3	Proteinanalysen .....	27
2.3.1	Proteinisolation aus Chondrozyten .....	27
2.3.2	Proteinisolation aus Überständen .....	28
2.3.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten .....	28
2.3.4	Western Blot-Analyse und semiquantitative Auswertung .....	29
2.4	Funktionelle Assays .....	31
2.4.1	BrdU-Assay .....	32
2.4.2	Caspase-3/7-Assay .....	33
2.4.3	Kristallviolett-Assay .....	33
2.5	Statistische Methoden .....	34
2.6	Histologie .....	34
2.6.1	Kryoschnitte .....	34
2.6.2	Immunfärbung mit Diaminobenzidin (DAB) .....	34
3	Ergebnisse .....	36
3.1	Analyse der Expression von Sema3A und NRP1 in humanen artikulären Chondrozyten .....	36
3.1.1	Genexpression und Proteinproduktion von Sema3A .....	36
3.1.2	Genexpression und Proteinproduktion von NRP1 .....	44
3.2	Effekte der Inhibition von NRP1 auf die Biologie von Chondrozyten von Gonarthrosepatienten .....	48
3.2.1	Knockdown von NRP1 .....	48

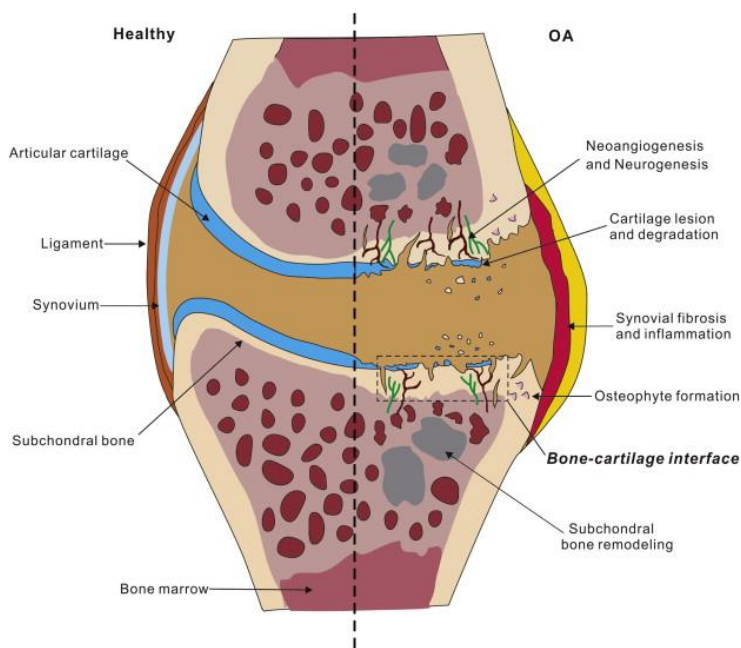
3.2.2	Auswirkungen der NRP1-Inhibition auf OA-Ch im 2D-Kultursystem.....	50
3.2.3	Genexpression nach NRP1-Inhibition im 3D-Kultursystem.....	55
4	Diskussion .....	56
4.1	Sema3A- und NRP1-Expression in arthrotisch verändertem Knorpel.....	56
4.2	Einfluss der Passagenanzahl und des Kultursystems auf die Genexpression von SEMA3A und NRP1 .....	57
4.3	Auswirkungen des NRP1-Knockdowns auf die Biologie von .....	
	OA-Chondrozyten .....	59
4.3.1	Apoptoseverhalten .....	59
4.3.2	Adhäsions- und Ausbreitungsfähigkeit.....	59
4.3.3	Katabole Prozesse.....	61
4.3.4	Hypertrophie .....	63
4.3.5	Proliferationsaktivität .....	64
4.4	Ausblick.....	65
5	Zusammenfassung .....	66
6	Literaturverzeichnis .....	67
7	Anhang .....	81
	Abkürzungsverzeichnis .....	81
	Eidesstattliche Erklärung .....	83
	Danksagung .....	84

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Pathophysiologie von Osteoarthrose

### 1.1.1 Veränderungen des Gelenks

Osteoarthrose (OA) ist die häufigste degenerative Gelenkserkrankung, von der in etwa jeder vierte Erwachsene betroffen ist, und eine der Hauptursachen für chronische Schmerzen und Bewegungseinschränkungen im höheren Erwachsenenalter (Barbour et al. 2017). Dabei handelt es sich nicht einfach nur um Verschleißerscheinungen, sondern vielmehr um den pathophysiologischen Umbau der verschiedenen Gewebetypen im betroffenen Gelenk, welcher durch niedrigschwellige entzündliche Prozesse aufrechterhalten wird. Die wichtigsten Risikofaktoren für OA sind Alter, Geschlecht, Gelenkverletzungen, Übergewicht, genetische Prädisposition sowie mechanische Faktoren wie Fehlstellungen oder physische Überaktivität (Felson et al. 2000; Blagojevic et al. 2010). Trotz dieser multifaktoriellen Genese gleichen sich die pathologischen Veränderungen, die sich in arthrotischen Gelenken beobachten lassen und zu Schmerzen, Deformierungen und Einschränkungen bis hin zum vollständigen Funktionsverlust führen können (Loeser et al. 2012). Dazu gehören der Verlust des Gelenkknorpels, die subchondrale Sklerosierung, die Bildung von Osteophyten, die Entzündung der Synovialmembran sowie die Degeneration von Stützstrukturen wie Bändern und Menisken (Loeser 2010) (Abb. 1).



**Abbildung 1.** Charakteristische Veränderungen bei OA. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zur Läsion und Degradierung des Knorpels, Neueinsprossung von Gefäßen und sensiblen Nervenendigungen, Fibrosierung der Synovia, Bildung von Osteophyten, Sklerosierung des subchondralen Knochens sowie dauerhaften Entzündung des gesamten Gelenks (Yu et al. 2015).

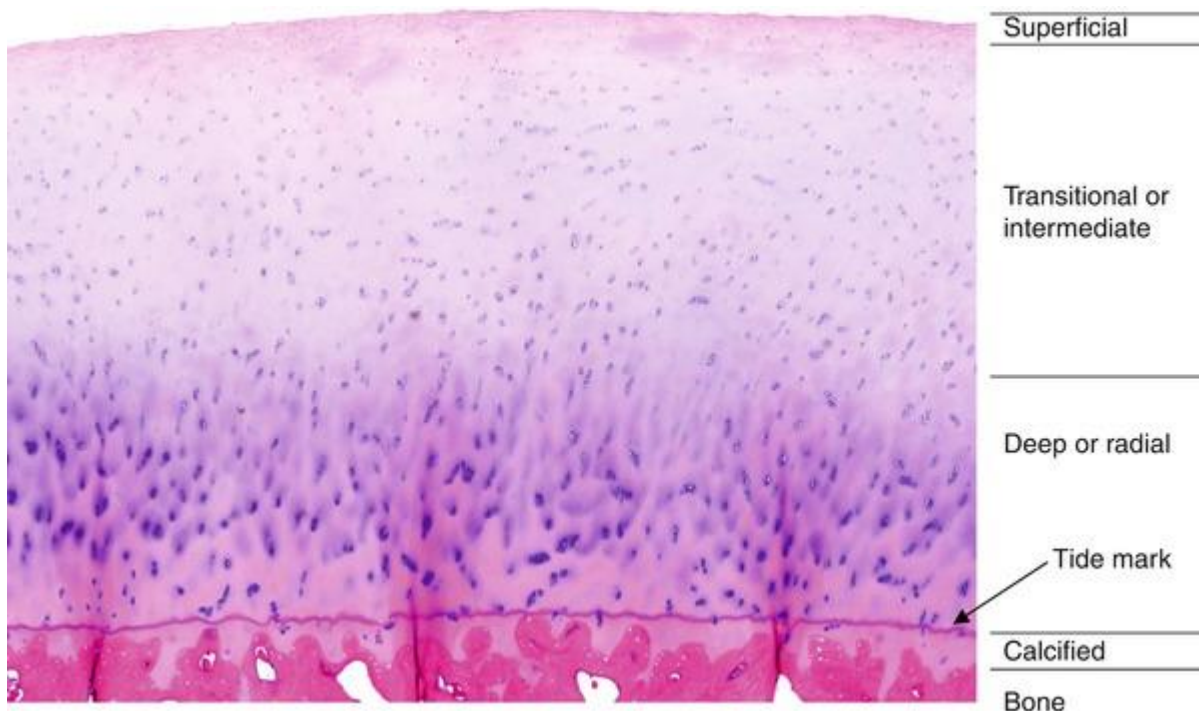
OA ist somit eine Erkrankung, von der das ganze Gelenk betroffen ist. Dabei gibt es abgesehen von Schmerztherapie und operativen Eingriffen im Endstadium noch keine zufriedenstellenden therapeutischen Behandlungen (Di Chen et al. 2017). Die genauen molekularen Mechanismen, welche zur Entstehung und zum Fortschreiten von OA führen, sind zudem noch nicht hinlänglich geklärt. Bei der OA-Pathogenese verändert sich auf zellulärer und molekularer Ebene der physiologischerweise homöostatische hin zu einem überwiegend katabolen Stoffwechsel. Ätiologisch tragen dazu Alterungsprozesse des Knorpels bei, die im höheren Alter in den Chondrozyten durch vermehrten oxidativen Stress ausgelöst werden und zu einer verringerten Reparaturfähigkeit führen (Loeser 2011). Dies bedingt eine verringerte Matrixsynthese zugunsten einer vermehrten Expression von katabolen, matrixabbauenden Matrixmetalloproteinasen (MMPs) (Blaney Davidson et al. 2009). Charakteristisch für OA ist dabei die chronische niedrigschwellige Entzündung, welche das ganze Gelenk betrifft und zu Entwicklung und Fortschreiten der Erkrankung beiträgt (Malfait 2016). Diese entzündlichen Prozesse können z. B. auch durch traumatische Ereignisse wie Sportverletzungen entstehen, bei denen in der Folge Entzündungszellen in das Gelenk einwandern (Lieberthal et al. 2015). Als weiterer Risikofaktor trägt Adipositas nicht nur zu einer erhöhten biomechanischen Belastung der Gelenke bei (Felson 2013), sondern unterhält durch sogenannte Adipokine, welche von den Adipozyten im Fettgewebe sezerniert werden, eine konstante systemische Entzündungsreaktion auf niedrigem Niveau (Conde et al. 2011).

### **1.1.2 Veränderungen der Chondrozyten**

Im Zentrum der Erkrankung steht der unwiederbringliche Verlust des hyalinen Gelenkknorpels. Dieser gewährleistet im Normalfall eine glatte Gelenkoberfläche, welche durch die Minimierung der Reibung ein effizientes Gleiten der artikulierenden Knochen bei Bewegungen ermöglicht. Unterstützt wird dies durch die Synovialflüssigkeit auf der Gelenkoberfläche, welche von den Chondrozyten und den Synovialzellen gebildet wird (Greene et al. 2011). Im gesunden Gelenk lässt sich der Knorpel in vier Lagen aufteilen, bestehend aus einer oberflächlichen, mittleren, tiefen und kalzifizierten Schicht (Abb. 2). Mit der Tiefe nimmt dabei der Proteoglykangehalt zu und die Chondrozyten verändern ihre Form von eher abgeflacht und scheibenförmig hin zu einer rundlichen Gestalt (Poole 1997). Die extrazelluläre Matrix (EZM), in welche die Chondrozyten eingebettet sind, besteht zu bis zu 80 % aus Wasser (Buckwalter



und Mankin 1998). Seine Stabilität erhält der Knorpel durch Kollagennetzwerke. In reifem Gelenkknorpel handelt es sich dabei zum größten Teil um Kollagen Typ II (Fox et al. 2009). Proteoglykane, d.h. hoch-glykosylierte Proteinmonomere, deren wichtigster Vertreter das hydrophile Aggrecan ist, besitzen eine hohe Wasserbindungskapazität und gewährleisten dadurch die Druckelastizität des Knorpels auch bei hohen Belastungen (Kiani et al. 2002).



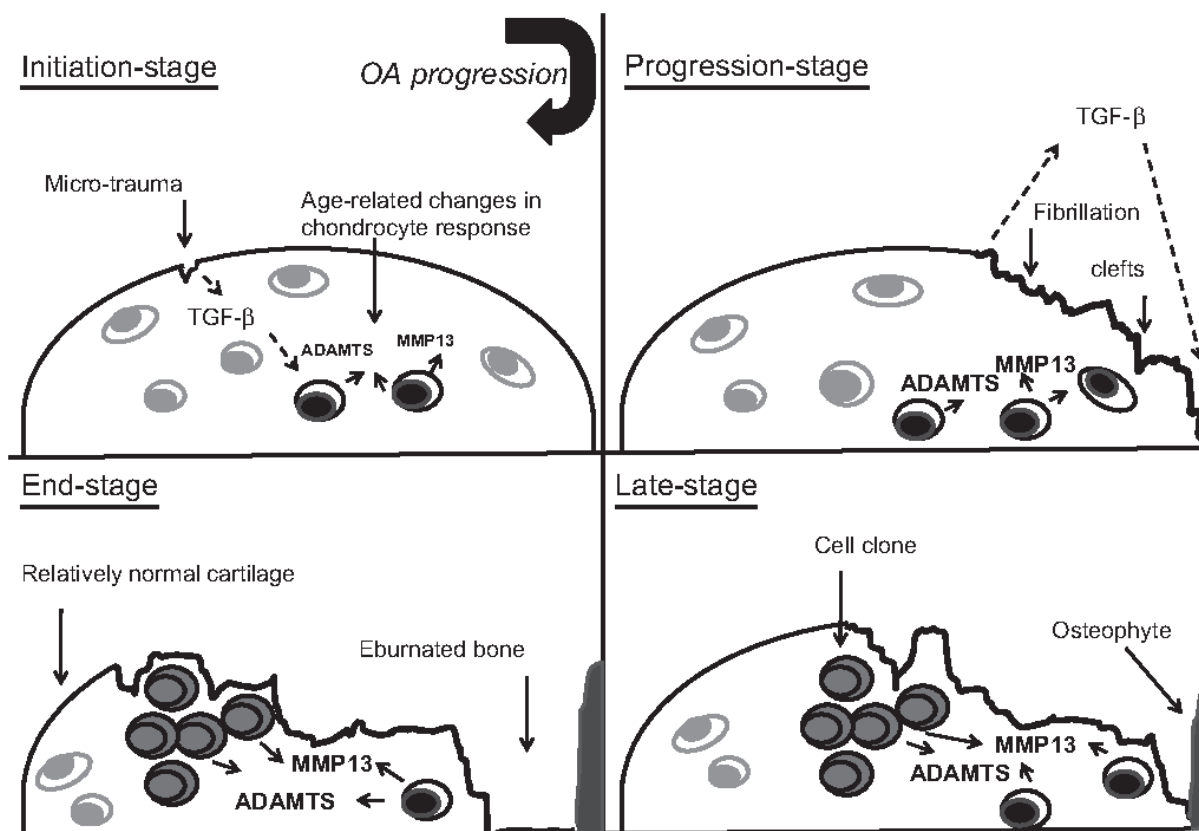
**Abbildung 2.** Die histologische Architektur von Gelenkknorpel. Die Unterteilung in die vier Schichten erfolgt anhand der Zellmorphologie und Anordnung der Kollagenfibrillen, welche arkadenartig vom Knochen in Richtung der Gelenkoberfläche aufsteigen, um knapp unter der Oberfläche parallel zu ihr zu laufen, bevor sie wieder in die Tiefe ziehen. Schicht I: Superficial- bzw. Tangentialzone mit parallel zur Oberfläche ausgerichteten Chondrozyten, die eine kollagenreiche Matrix sezernieren. Schicht II: Intermediär- bzw. Transitionalzone mit rundlichen, gruppiert liegenden Chondrozyten. Schicht III: tiefe bzw. Radiärzone mit länglichen Chondrozyten und hohem Proteoglykangehalt. Schicht IV: Mineralisierungszone als kalzifizierte Übergangszone vom hyalinen Knorpel zum subchondralen Knochen (Jung 2014).

In diesem gesunden, reifen Knorpel, der durch keine äußeren Stressoren beeinträchtigt wird, befinden sich die Chondrozyten in einem ruhenden Zustand, in dem wenig EZM umgesetzt wird (Loeser et al. 2012). Bei OA zeigen sich die ersten Veränderungen an der Oberfläche des Gelenkknorpels, da dort die mechanischen Kräfte, insbesondere die Scherkräfte, am größten sind (Andriacchi et al. 2004). Dieser mechanische Stress verursacht Knorpelläsionen, wobei die Interaktionen zwischen

Chondrozyten und Matrix sowie die metabolischen Reaktionen in Chondrozyten verändert werden (Loeser et al. 2000). Dabei werden die Chondrozyten aktiviert, was zur Zellproliferation in Verbindung mit einer vermehrten Proteoglykansynthese führt, um den für das frühe OA-Stadium charakteristischen Proteoglykanverlust in der EZM zu kompensieren (Malemud 1991). Diese proliferierenden Chondrozyten organisieren sich in Clustern oder Inseln, was auch als *chondrocyte cloning* bezeichnet wird. Dabei regen fokale Reparaturmechanismen die überlebenden Chondrozyten vermutlich zu lokaler Proliferation in den nicht geschädigten Arealen, welche an den Knorpeldefekt angrenzen, an. Die Chondrozyten können jedoch nicht frei migrieren, sodass sie in Chondrozytenclustern verbleiben (Kimura et al. 2010; Quintavalla et al. 2005). Dies wird als Versuch gewertet, dem Knorpelabbau entgegenzuwirken, wobei das Fortschreiten der Erkrankung und sekundäre Entzündungsprozesse beweisen, dass dies im Allgemeinen erfolglos bleibt (Goldring und Marcu 2009). Viele Studien haben gezeigt, dass Chondrozyten von OA-Patienten im Gegensatz zu Chondrozyten nicht von OA betroffener Personen Proliferationsaktivität aufweisen (Sandell und Aigner 2001). Diese Proliferationsaktivität der OA-Chondrozyten könnte auf den besseren Zugang der Chondrozyten zu Proliferationsfaktoren aus der Synovialflüssigkeit zurückzuführen sein, da im Verlauf der OA die Kollagenmatrix Schaden nimmt (Martel-Pelletier 1998) bzw. sich das Kollagennetzwerk auflockert und sich Spalten bilden können (Lee et al. 1993). In der Umgebung dieser Cluster findet sich Collagen Typ X, was normalerweise von hypertrophen Chondrozyten produziert wird (Mark et al. 1992). Hypertrophe Veränderungen von Chondrozyten bei OA wurden bereits in vielen Untersuchungen beobachtet. Darüber hinaus trägt auch Protease-vermittelter Knorpelabbau wesentlich zum Krankheitsprozess bei. Diese Degradierungsprozesse laufen nicht synchron innerhalb des Gelenks ab, das von OA betroffen ist. Die Hemmung von hypertrophen Veränderungen könnte somit ein therapeutisches Ziel sein, um ein Fortschreiten der Erkrankung aufzuhalten (van der Kraan und van den Berg 2012).

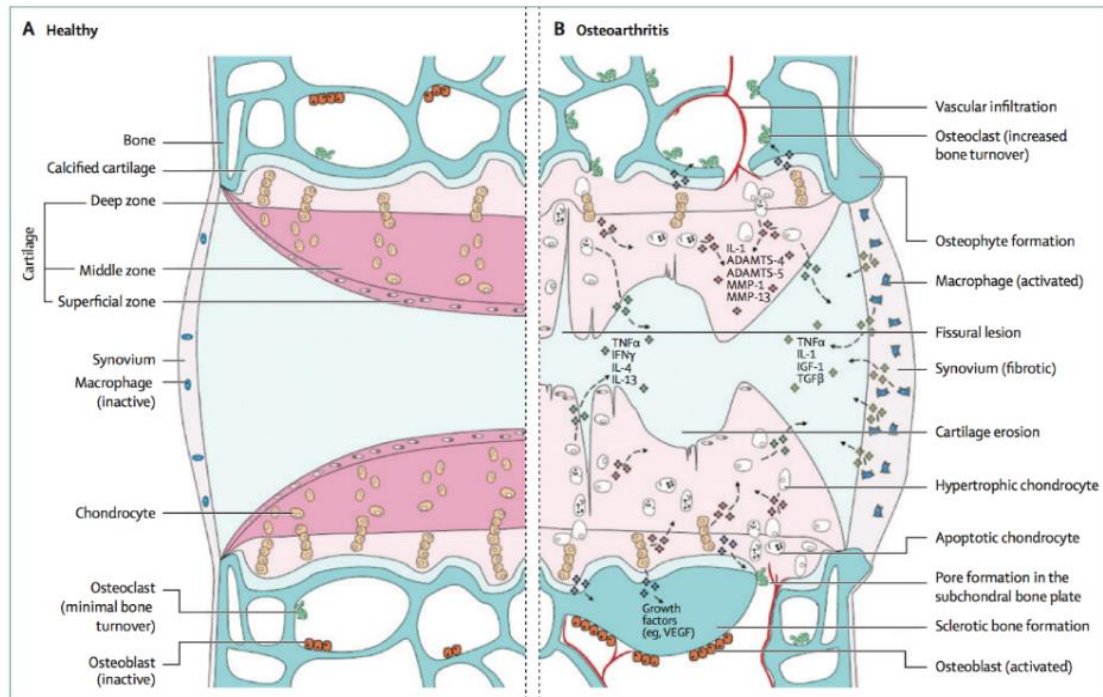
Dieser kurzzeitigen Hyperplasie folgt eine Phase, die durch vermehrte Apoptose und somit Hypozellularität gekennzeichnet ist (Blanco et al. 1998). Beim weiteren Fortschreiten der Erkrankung wird der Abbau der Knorpelmatrix durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) (Goldring 1999, Westacott & Sharif 1996) initiiert. Über den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B stimulieren diese Entzündungsfaktoren (Kapoor et al.

2011) die Expression von Enzymen wie Aggrecanasen, MMPs, darunter insbesondere MMP3 und MMP13 (Goldring 1999, Goldring 2000a, Goldring 2000b, Martel-Pelletier 1998, Westacott & Sharif 1996) sowie verschiedenen Serin- und Cysteinproteinasen (Troeberg und Nagase 2012). Der Matrixabbau in frühen Stadien von Arthrose dürfte dabei dem Aggrecanabbau durch MMP3 und ADAMTS-5 zuzuschreiben sein, gefolgt von einer vermehrten Aktivität von Kollagenasen, insbesondere MMP13 (Di Chen et al. 2017) (Abb. 3). Diese werden zusätzlich durch die gestörte Balance zwischen MMPs und TIMPs, Inhibitoren von MMPs, aktiviert. MMP13 degradiert Kollagen Typ 2 und zerstört dadurch das Kollagennetzwerk. Ist die Knorpelmatrix einmal abgebaut, ist ein Status erreicht, der nicht rückgängig zu machen ist, der sogenannte „Point of no return“. Stattdessen wird sie durch eine minderwertige Reparaturmatrix ersetzt, welche den mechanischen Belastungen, denen sie in Gelenken ausgesetzt ist, nicht Stand hält (Loeser et al. 2012). Den pathophysiologischen Vorgängen bei OA liegt also ein gestörtes Gleichgewicht zwischen dem Abbau und der Reparatur extrazellulärer Matrix zugrunde (Todhunter et al 1996): Obwohl OA-Chondrozyten sowohl anabole wie auch katabole EZM-Gene vermehrt exprimieren (Aigner et al 2006), überwiegt die katabole Aktivität, was zum Verlust von Knorpelgewebe führt (Abb. 3).



**Abbildung 3.** Verschiedene Stadien von OA. Läsionen an der Knorpeloberfläche führen zur Änderung des Chondrozytenphänotyps. Hypertrophe Chondrozyten (schwarz) nehmen eine wichtige Rolle beim Abbau der Knorpelmatrix ein, indem sie u. a. MMP13 und ADAMTS-4 bzw. -5 sezernieren, wohingegen TGF- $\beta$  als chondroprotektiver Faktor im alternden Knorpel sein Signalling von anabol zu katabol ändert. Die hypertrophen Chondrozyten proliferieren und organisieren sich in Inseln („chondrocyte cloning“), was als erfolgloser Versuch gewertet wird, den geschädigten Knorpel zu reparieren (van der Kraan und van den Berg 2012).

Die entzündlichen Prozesse in der OA-Pathogenese stehen zudem in einem engen Zusammenhang mit einer Neovaskularisation bestimmter Knorpelschichten (Bonnet und Walsh 2005). Obwohl es sich bei menschlichem Knorpel um ein avaskuläres Gewebe handelt, scheint insbesondere die Expression des stark angiogenetisch wirkenden Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) zur Einsprossung von Gefäßen in die kalzifizierte und tiefe Schicht des Knorpels zu führen (Murata et al. 2008) (Abb. 4). VEGF findet sich zwar auch in normalem Knorpelgewebe, aber nur Knorpel von OA-Patienten exprimiert die VEGF-Rezeptoren VEGFR-1, VEGFR-2 und Neuropilin-1 (NRP1). Zudem zeigte sich VEGF in verschiedenen Untersuchungen im Kulturmedium von OA-Chondrozyten im Vergleich zu Nicht-OA-Chondrozyten mehrfach erhöht (Duffy et al. 2013; Enomoto et al. 2002). Neben der Anschaltung von katabolen Prozessen in Chondrozyten und Synovialzellen scheint VEGF zum Fortschreiten der Erkrankung beizutragen (Nagao et al. 2017). Dazu gehört im Wesentlichen die Induktion von Entzündungsmediatoren wie IL-1 und IL-6 und MMPs wie MMP1, MMP3, MMP13 in OA-Chondrozyten (Pufe et al. 2004b; Pufe et al. 2004a; Enomoto et al. 2002).



**Abbildung 4.** Signalkaskaden und strukturelle Änderungen in der OA-Pathogenese. Im Verlauf der Erkrankung wird durch Knorpelerosion und MMP- sowie ADAMTS-vermittelte Matrixdegradierung die Oberfläche des hyalinen Gelenkknorpels beschädigt. Dabei hypertrophieren Chondrozyten in der Nähe der betroffenen Areale, bevor eine vermehrte Apoptose der betroffenen Zellen eintritt. Es kommt zur Einsprossung von Gefäßen, Osteophytenbildung und Aktivierung von Osteoklasten und Makrophagen. Diese Prozesse lösen eine konstante Entzündungsreaktion aus. ADAMTS =  $\alpha$  disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like motifs. IL = interleukin. MMP = Matrixmetalloproteinase. TNF = Tumornekrosefaktor. IFN = Interferon. IGF = insulin-like growth factor. TGF = transforming growth factor. VEGF = vascular endothelial growth factor (Glyn-Jones et al. 2015).

### 1.1.3 Wichtige Marker der Chondrozytenbiologie bei OA

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll die Veränderung der Chondrozytenbiologie nach Inhibition von Neuropilin-1, einem Rezeptor, welcher von OA-Chondrozyten an ihrer Oberfläche exprimiert wird, untersucht werden. Dazu wurde die Expression verschiedener Marker bestimmt, welche insbesondere im Hinblick auf OA als charakteristisch für bestimmte phänotypische Veränderungen gelten.

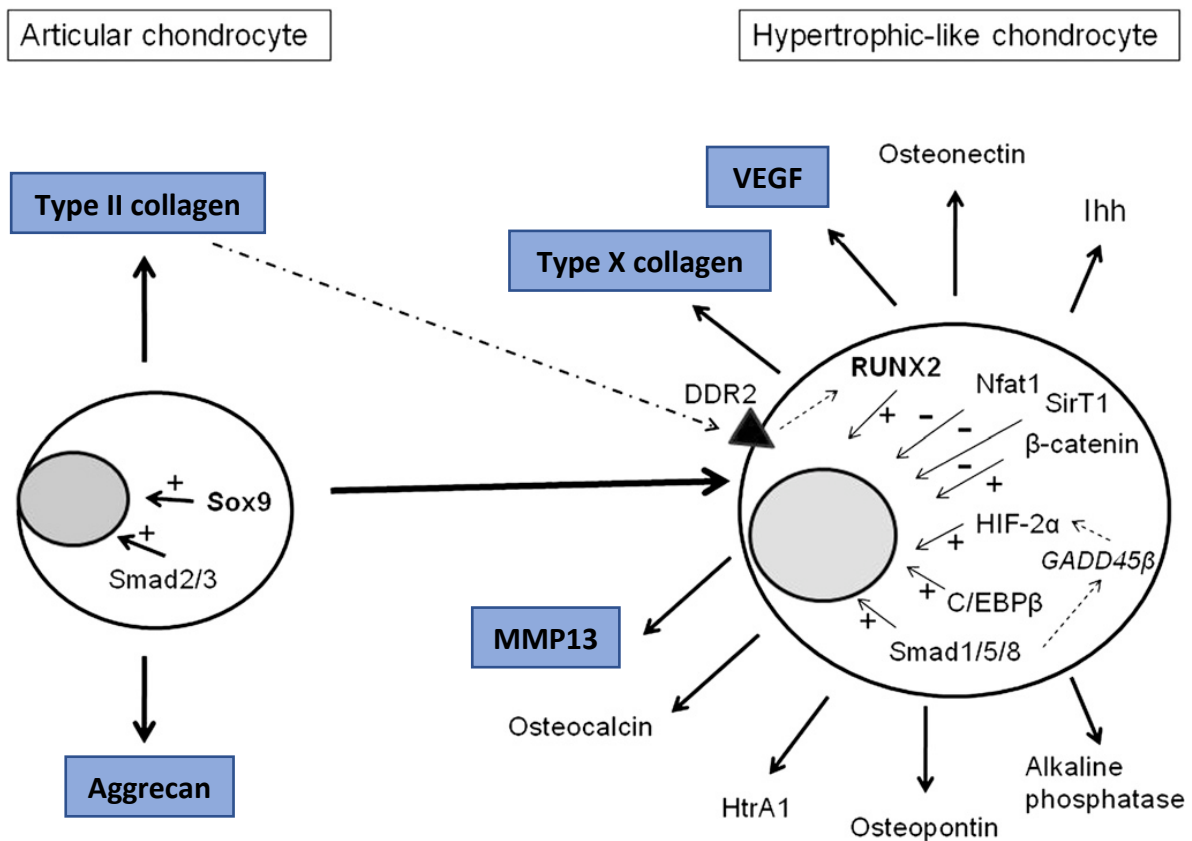
#### 1.1.3.1 Differenzierung und Dedifferenzierung

Reife Chondrozyten exprimieren das für hyalinen Knorpel charakteristische Kollagen Typ II sowie in geringeren Mengen Kollagen Typ IX und XI (Fox et al. 2009). Bei der OA-Pathogenese tragen verschiedene Faktoren zur sogenannten Dedifferenzierung

der Chondrozyten bei, was bedeutet, dass sich der Phänotyp der Chondrozyten verändert und sich dem eines Fibroblasten annähert. Obwohl die Chondrozyten insbesondere im Anfangsstadium von Arthrose nach wie vor sehr aktiv sind, stellen sie die Synthese von Kollagen Typ II und Aggrecan ein und exprimieren stattdessen Kollagen Typ I und III (Benya et al. 1978). Dieses Beispiel illustriert deutlich die Bedeutung der phänotypischen Veränderungen der Chondrozyten, da es zeigt, dass dedifferenzierte Chondrozyten trotz ihrer potenziell hohen Syntheseaktivität weniger knorpelspezifischen Gene exprimieren können und dadurch anabole Prozesse scheitern (Sandell und Aigner 2001). Das membranständige Integrin alpha-10 bindet mit hoher Affinität an Kollagen Typ II und ist mit für die Differenzierung von Chondrozyten verantwortlich (Camper et al. 1998). Ebenfalls eine wesentliche Rolle bei der Chondrozytendifferenzierung spielt Sox9 (SRY-related high-mobility-group box 9), wobei es sich um einen knorpelspezifischen Transkriptionsfaktor handelt (Wang et al. 2014).

### **1.1.3.2 Hypertrophie**

Von den verschiedenen Markern, die für hypertrophe Chondrozyten existieren, sind Kollagen Typ X und MMP13 am besten beschrieben (Nurminskaya und Linsenmayer 1996). Auch VEGF lässt sich mit der Hypertrophie von Chondrozyten assoziieren. Kollagen Typ X wird charakteristischerweise von hypertrophen Chondrozyten exprimiert, die sich in der tiefsten Knorpelschicht der fötalen Wachstumsplatte befinden (Kirsch und Mark 1992). Insbesondere MMP13, aber auch VEGF und Kollagen Typ X, werden jedoch auch in der hypertrophen Initialphase von OA exprimiert und tragen zum Fortschreiten der Erkrankung bei (van der Kraan und van den Berg 2012) (Abb. 5). Bezüglich der Expression von MMP13 darf nicht außer Acht gelassen werden, dass MMP13 nicht nur im Rahmen der Hypertrophie, sondern gerade bei OA auch anderweitig wie z. B. durch Entzündungsprozesse und mechanischen Stress induziert werden kann (Goldring et al. 2011; Loeser 2010).

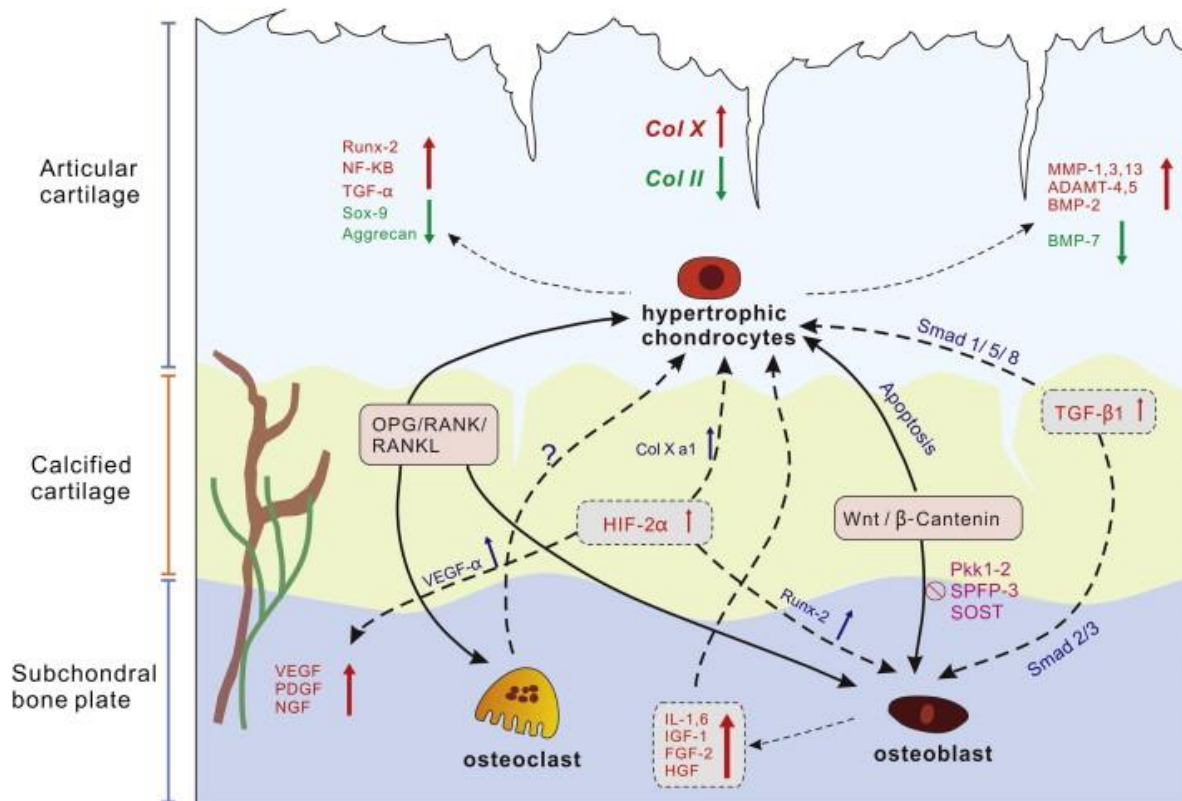


**Abbildung 5.** Faktoren, die in der Initialphase von OA zu einem hypertrophen Phänotyp der Chondrozyten führen bzw. von diesen Chondrozyten produziert werden. MMP13, Kollagen Typ X und VEGF zählen zu den Markern für hypertrophe Chondrozyten. Kollagen Typ II und Aggrecan hingegen werden von hypertrophen Chondrozyten nur noch in stark verringertem Maße exprimiert (van der Kraan und van den Berg 2012).

### 1.1.3.3 Apoptose

In arthrotisch verändertem Knorpel kommt es zu einer deutlich erhöhten Apoptoserate (Aigner et al. 2004), sodass der Knorpel in den fortgeschrittenen Krankheitsstadien zunehmend hypozellulär wird und sich gehäuft leere Lakunen finden (Hwang und Kim 2015). Auch wenn die relativen Auswirkungen der vermehrten Apoptose der Chondrozyten auf den Krankheitsprogress schwierig einzuschätzen sind, handelt es sich dabei um ein wesentliches Merkmal von OA (Abb. 6). Apoptose stellt dabei einen genauestens regulierten Mechanismus des Zelltods dar, welcher von der Zelle autonom reguliert wird (Elmore 2007). Viele der Proteine, welche diesen programmierten Zelltod vermitteln, werden in vitalen Zellen exprimiert. Unter günstigen Bedingungen für die Zelle werden ihre pro-apoptischen Aktivitäten jedoch von bestimmten Vertretern der Bcl-2-Familie unterdrückt (van Delft und Huang 2006). Bcl-2 als wichtigster Vertreter dieser Familie kann der Apoptose durch eine Veränderung

des mitochondrialen Membranpotentials entgegenwirken (Kowaltowski et al. 2002) und somit als Marker für die Apoptoseaktivität in Zellen dienen.



**Abbildung 6.** Zusammenfassung der charakteristischen Veränderungen des Expressionsmusters in OA-Chondrozyten. Die hypertrophen Chondrozyten exprimieren vermehrt Kollagen Typ X (Col X). Die Synthese von Kollagen Typ II (Col II) wird hingegen eingestellt. Auch Sox-9 und Aggrecan als knorpelspezifische Marker werden vermindert exprimiert. Zudem trägt eine erhöhte Apoptoserate zur zunehmenden Hypozellularität des Knorpels bei. Verschiedene Entzündungsmediatoren wie VEGF führen zur Einsprossung von Gefäßen und über die Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen wie MMP13 zur Degradation der Matrix (Yuan et al. 2014).

### 1.1.3.4 Adhäsion und Zellmigration

Zelladhäsion und -migration sind wichtig für physiologische und pathologische Prozesse, u. a. in der Embryogenese, Wundheilung, Angiogenese und Tumormetastasierung (Gehler et al. 2017; Cox et al. 2001). Bei der Zellmigration kommt es über Zell-Substrat-Verbindungen zur Adhäsion der Zelle an das umgebende Stroma sowie eine anschließende erneute Loslösung davon, wodurch die Translokation der Zelle bewirkt wird (Hood und Cheresch 2002). Integrine sind Transmembranrezeptoren, die sich in der Membran gruppieren und organisierte fokale Adhäsionskontakte ausbilden, wobei sie das Zytoskelett durch verschiedene Gerüstproteine mit der EZM



verbinden (Hynes 2002). Um migrieren zu können, müssen die Zellen diese Integrin-vermittelten Adhäsionskomplexe koordiniert auf- und abbauen. Zudem besitzen Integrine eine intrazelluläre Signaltransduktionsfunktion, wodurch Moleküle reguliert werden können, die wichtig für die Zellmotilität sind (Cox und Huttenlocher 1998). Integrine können jedoch auch proinflammatorisch wirken und zum Abbau der Knorpelmatrix bei OA beitragen (Loeser 2014).

VEGFA und MMP13 sind nicht nur Hypertrophiemarker, sondern unterstützen auch die zelluläre Migration. Erhöhte Level von VEGFA und MMP13 gehen in den unterschiedlichen Geweben mit einer vermehrten migratorischen Aktivität einher, indem die Motilität der Zellen durch perizelluläre Lyse erleichtert wird (Herzog et al. 2011; Perrot-Applanat und Di Benedetto 2012; Tzeng et al. 2011). In arthrotisch verändertem Knorpel konnte gezeigt werden, dass VEGF165 durch die Stimulation von MMP1 und MMP3 zu einer stärkeren Migration der Chondrozyten führt. Diese Stimulation wird durch den VEGF-Rezeptor NRP1 vermittelt und durch Semaphorin 3A (Sema3A) antagonisiert (Okubo et al. 2011). Da sowohl Sema3A wie auch der Rezeptor NRP1 in arthrotischem Knorpel vermehrt exprimiert werden und aus diesem Grund Thema dieser Arbeit sind, werden diese im Folgenden genauer charakterisiert.

## **1.2 Der Repulsionsfaktor Semaphorin 3A**

Semaphorine sind eine große Gruppe sezernierter oder membrangebundener Proteine mit über 30 Mitgliedern (Kumanogoh 2015). Ursprünglich als Gruppe von Leitmolekülen für axonales Wachstum entdeckt, die den Kollaps von Wachstumskegeln induzieren (Luo et al. 1993), sind mittlerweile eine Reihe an weiteren physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen bekannt, an denen sie beteiligt sind. Abhängig von den intrinsischen Eigenschaften der Wachstumskegel können sie nicht nur repulsiv, sondern auch attraktiv auf diese wirken (Ding et al. 2007; Wolman et al. 2004; Toyofuku et al. 2008). Zudem nehmen sie eine wichtige Rolle in der Organentwicklung (Hinck 2004), der Vaskularisierung und Angiogenese (Serini et al. 2003), der Tumorprogression (Neufeld und Kessler 2008) sowie in der Entwicklung des Immunsystems bei der Regulierung der Immunantwort ein (Kumanogoh und Kikutani 2013). Alle Semaphorine enthalten eine spezifische ca. 500 Aminosäuren lange extrazelluläre Domäne, welche als Semaphorindomäne bezeichnet wird, eine aminoterminal gelegene sogenannte PSI-Domäne sowie eine carboxyterminal gelegene Domäne, die variabel gestaltet ist und je nach Klasse zusätzliche Sequenzen wie „immunglobulin-like loops“ enthalten kann (Kumanogoh 2015). Semaphorine

können als sezernierte Moleküle, Transmembranproteine oder durch Glykosylphosphatidylinositol (GPI) an der Membran verankert vorliegen. Anhand dieser strukturellen Charakteristika lassen sich alle bekannten Semaphorine sieben verschiedenen Klassen zuordnen (Goodman et al. 1999; Neufeld und Kessler 2008), wobei lediglich die Semaphorine der Klasse 3 sezerniert werden. Bei Sema3A handelt es sich dementsprechend um ein sezerniertes Molekül der Klasse 3 mit einer Immunglobulin-domäne vom C2-Typ.

Als erstes Semaphorin isoliert wurde Sema3A 1990 unter dem Namen Collapsin-1 mit Hilfe eines Kollabierungsassays für Wachstumskegel unter Verwendung von embryonalen Zellmembranen aus Hühnergehirnen (Raper und Kapfhammer 1990; Luo et al. 1993). Es fungiert als Leitmolekül, das die Wachstumsrichtung von Neuronen beeinflusst, indem es auf Axone repulsiv und auf Dendriten attraktiv wirkt (Schloman et al. 2009). Synthetisiert wird Sema3A als membranständige, nicht diffusible Vorform, wobei der sezernierte Anteil von einer Furin-ähnlichen Protease abgespalten wird. Um biologisch aktiv zu sein, scheint Sema3A als Homodimer vorliegen zu müssen, welches über Disulfidbrückenbindungen zwischen Cysteinen entsteht (Adams et al. 1996; Klostermann et al. 1998).

### **1.3 Der Rezeptor Neuropilin-1**

Die Funktion von Semaphorinen wird über ihre Rezeptoren vermittelt. Die meisten Vertreter dieser Gruppe binden an Plexine, einfache Transmembranrezeptoren, die in vier Untergruppen einteilbar sind (Tamagnone et al. 1999). Alle Semaphorine der Klasse 3 bis auf Sema3E binden mit hoher Affinität an Neuropiline, die mit Plexinen der Gruppe A assoziiert sind (He und Tessier-Lavigne 1997; Kolodkin et al. 1997). Die Neuropiline, namentlich NRP1 und NRP2, sind einfache Transmembranrezeptoren, die extrazellulär über zwei komplementbindende Domänen, zwei Koagulationsfaktor FV/FVIII-ähnliche Domänen und eine MAM-Domäne verfügen (Antipenko et al. 2003) (Abb. 8). Da das zytoplasmatische Ende sehr kurz ist, müssen Neuropiline mit den Plexinen der Gruppe A einen Komplex bilden, um Signale übermitteln zu können (Janssen et al. 2012) (Abb. 7).

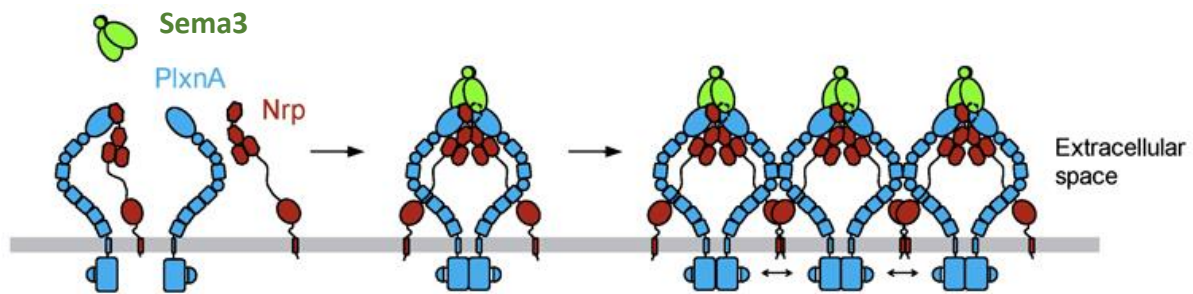


Abbildung 7. Modell des Sema3-PlxnA-Nrp-Komplexes. Sezerniertes Sema3 bindet an den Neuropilin-PlexinA-Komplex, welcher nach Heterodimerisierung das intrazelluläre Signal vermittelt (Janssen et al. 2012). *PlxnA* – PlexinA, *Nrp* – Neuropilin, *Sema3* – Semaphorin3.

Sema3A bindet dabei lediglich an NRP1, nicht jedoch an NRP2 (Chen et al. 1997). Seine Wirkung als Neurotransmitter wird über den Cofaktor PlexinA vermittelt (Takahashi et al. 1999). Genknockouts, Inhibitionsversuche mit Antikörpern und Gentransferstudien haben gezeigt, dass NRP1 für die Funktion von Sema3A notwendig ist (Takahashi et al. 1998, 1999). NRP1 agiert dabei nicht nur als Rezeptor für Semaphorine der Klasse 3, sondern auch als Rezeptor und Korezeptor für eine Vielzahl weiterer extrazellulärer Liganden. Dazu zählen bestimmte Isoformen von VEGF wie VEGF165 und VEGFA, Semaphorine der Klasse IV, Heparin und weitere Wachstumsfaktoren (Mamluk et al. 2002; Chaudhary et al. 2014) (Abb. 8).

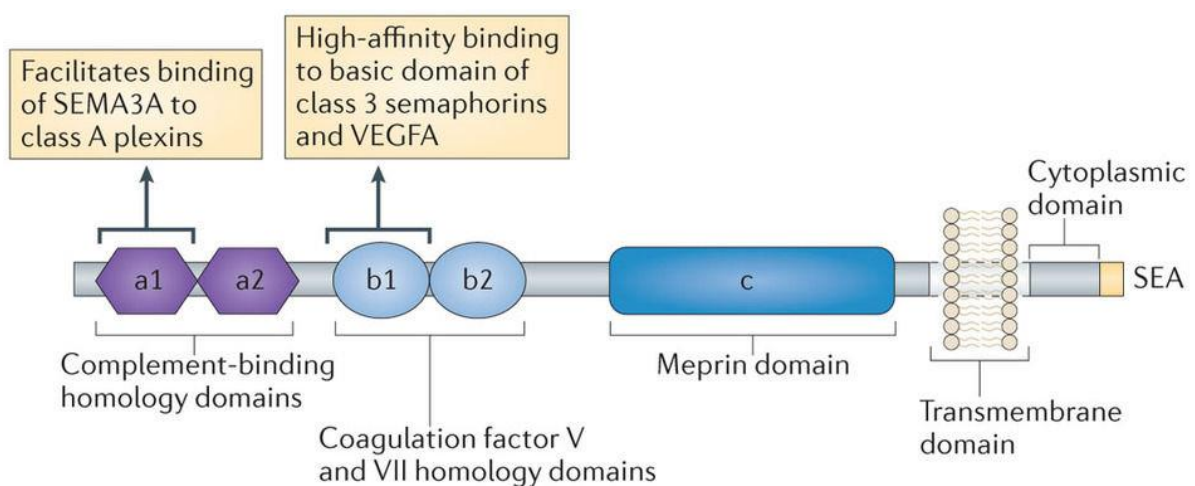
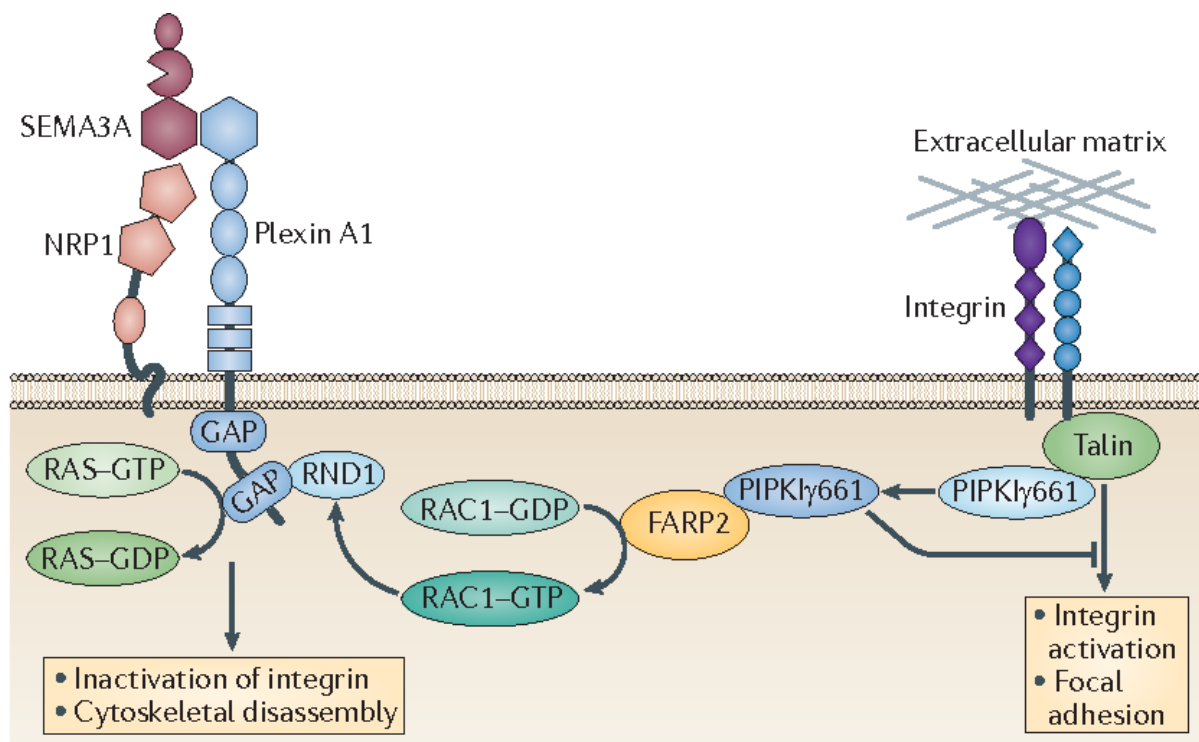


Abbildung 8. Struktur und Bindestellen von Neuropilinen. Neuropiline besitzen extrazellulär zwei aminoternale komplementbindende Domänen (a1 und a2), zwei Koagulationsfaktor FV/FVIII-ähnliche Domänen (b1 und b2) und eine Meprin-Domäne. Die a1-Domäne vereinfacht die Bindung von Sema3A zu den Plexinen der Klasse A, welche als Kofaktoren fungieren. Die b1-Domäne bindet mit hoher Affinität an Klasse 3-Semaphorine und VEGFA (Kumanogoh und Kikutani 2013).

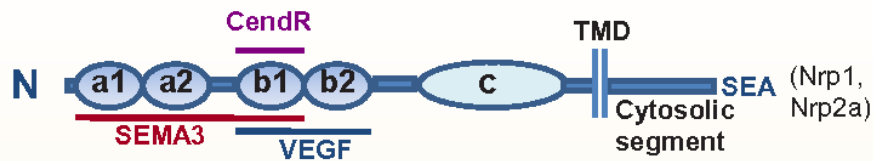
Eine der wichtigsten Funktionen von NRP1 ist die ligandenabhängige Koordination der zellulären Migration, welche in einem vielschrittigen Prozess durch die Bindung an verschiedene Liganden, darunter insbesondere VEGF und Sema3A, reguliert wird (Parker et al. 2012). Auf molekularer Eben kontrolliert NRP dabei die adhäsiven Interaktionen mit der Umgebung und die Reorganisation des Zytoskeletts (Li et al. 2014). Ursprünglich wurde NRP1 als Zelladhäsionsmolekül identifiziert (Takagi et al. 1995) und gezeigt, dass durch die Expression von NRP1 die Adhäsionsfähigkeit von Fibroblasten gesteigert wird (Shimizu et al. 2000). Mittlerweile ist bekannt, dass die zyttoplasmatische Domäne von NRP1 den Umsatz der fokalen Adhäsionskontrakte reguliert und darüber die zelluläre Migration kontrolliert (Seerapu et al. 2013): Die Bindung von Sema3A an den NRP1-PlexinA1-Rezeptorkomplex vermindert die Aktivität der Integrine und wirkt dadurch der fokalen Adhäsion entgegen (Kumanogoh und Kikutani 2013) (Abb. 9).



**Abbildung 9.** Die Bindung von Sema3A an den NRP1-Plexin A1-Rezeptorkomplex vermindert über die intrazelluläre Dissoziation von FARP2 und die Hemmung der Kinaseaktivität von PIPKly661 die Aktivität der Integrine und wirkt dadurch der fokalen Adhäsion entgegen (Kumanogoh und Kikutani 2013).

Die gewebespezifische Funktion von NRP1 wird jedoch durch eine Vielzahl von Faktoren wie der intrazellulären Umgebung der zytoplasmatischen Domäne beeinflusst (Bagci et al. 2009) und vom jeweiligen Transmitter moduliert (Li et al. 2014), sodass der Umbau des Zytoskeletts abhängig vom Transmitter stimuliert oder gehemmt werden kann (Nasarre et al. 2003). NRP1 fungiert somit als vielseitiger (Ko-)Rezeptor, wobei z. B. VEGF und Sema3A bezüglich der Zellmigration antagonistische Effekte aufweisen. NRP1 vermittelt und beeinflusst darüber hinaus eine Vielzahl weiterer Vorgänge. Hierzu zählen unter anderem sowohl die Apoptose als auch die Proliferation von Zellen sowie die Modulierung von Immunantworten (Abb.10). Die Komplexität der Sema3A-Funktion zeigt sich darin, dass Sema3A abhängig von einer großen Bandbreite an externen Faktoren wie dem gewebespezifischen Kontext oder dem Tumorstadium sowohl pro- als auch antiproliferative und -migratorische Wirkungen entfalten kann (Nasarre et al. 2014; Prud'homme und Glinka 2012). Zudem könnte es durch Antagonisierung von VEGF einer Neoangiogenese entgegenwirken, was auch bereits bei anderen Zellen bekannt ist (Maione et al. 2009).

## A. General domain structure of neuropilins



## B. Neuropilin co-receptor functions

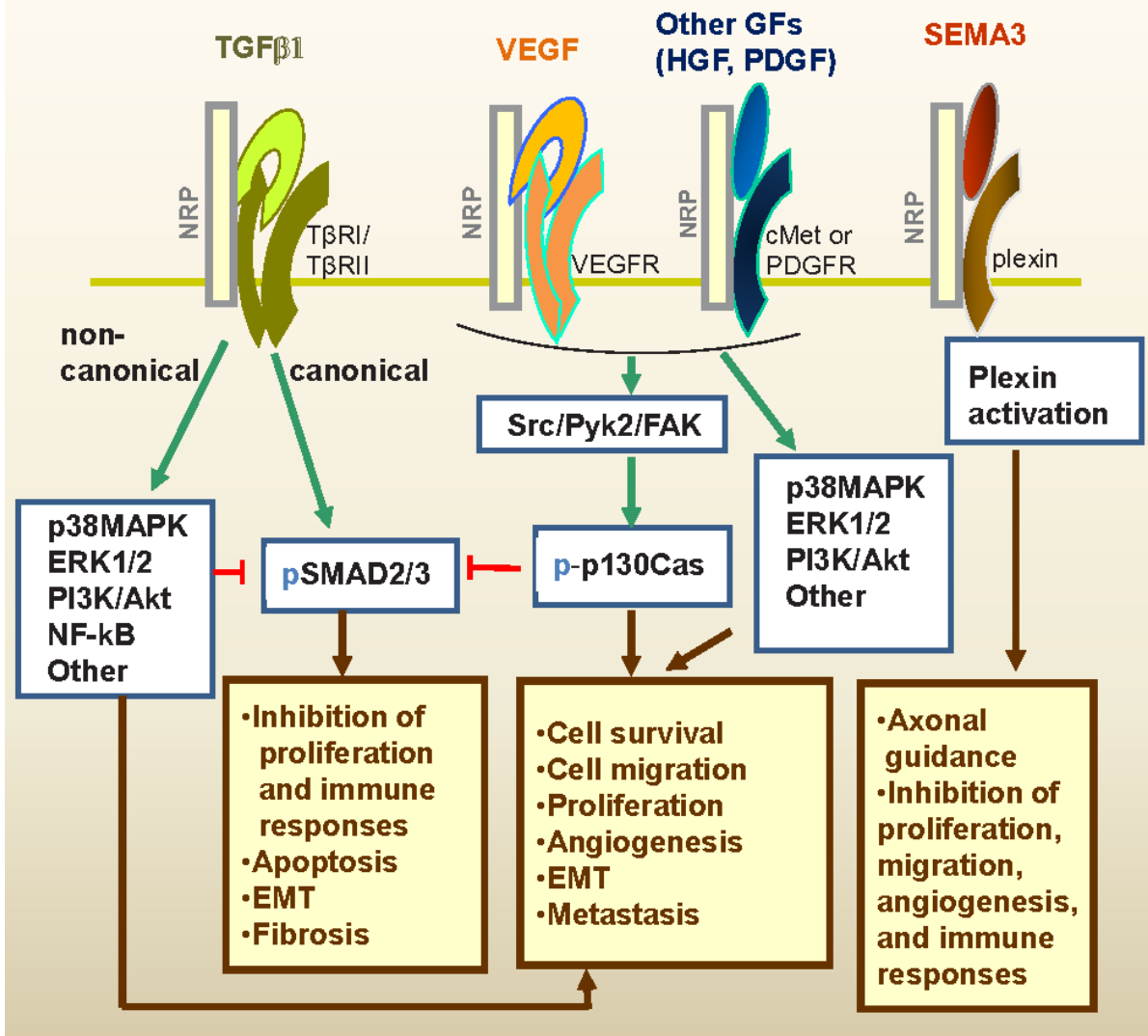


Abbildung 10. Die Funktionen von NRP als Korezeptor. NRP bindet an mindestens 5 verschiedene Hauptgruppen löslicher Transmitter. Dazu zählen TGF- $\beta$ 1, die VEGF-Familie, HGF, PDGF-BB und die Sema3-Familie. VEGF induziert über NRP eine vermehrte Migration und Proliferation sowie Angiogenese, wohingegen Sema3 diese Wirkungen antagonisiert. Somit scheint die Balance zwischen Sema3 und VEGF eine wichtige Determinante in Bezug auf das Verhalten von Zellen zu sein. (Prud'homme und Glinka 2012).

#### 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Sema3A ist ein von verschiedenen Geweben sezernierter Transmitter, welcher ursprünglich als axonales Leitmolekül identifiziert worden ist, jedoch an vielen weiteren physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen beteiligt ist. Es bindet ausschließlich an einen Rezeptorkomplex, in dem NRP1 enthalten ist. NRP1 ist ein einfacher Transmembranrezeptor, der in verschiedenen Geweben vorkommt. Er koordiniert unter anderem den Umbau von Adhäsionskontakten und des Zytoskeletts. Seine gewebsspezifische Funktion wird durch den jeweiligen Liganden und den gewebespezifischen Kontext bestimmt. Da OA- verglichen mit Nicht-OA-Chondrozyten nicht nur Sema3A, sondern auch NRP1 vermehrt exprimieren (Okubo et al. 2011), soll diese Arbeit neue Erkenntnisse liefern, welchen Einfluss Sema3A und sein Rezeptor NRP1 bei OA auf die Physiologie von Chondrozyten nehmen. Da es sich bei OA um die häufigste degenerative Gelenkerkrankung und somit um eine Erkrankung mit entsprechender medizinischer, aber auch wirtschaftlicher Relevanz handelt, ist es von großem Interesse, die damit zusammenhängenden pathophysiologischen Prozesse und deren Ursachen zu verstehen. In dieser Arbeit wird ausschließlich Knorpel von Gonarthrosepatienten verwendet, sodass die Vergleichbarkeit im gewebespezifischen Kontext gewährleistet ist, um folgende Fragen zu beantworten:

1. Wie unterscheidet sich die Gen- und Proteinexpression von Sema3A und NRP1 in arthrotisch verändertem verglichen mit nicht von OA betroffenem Knieknorpel?
2. Wo ist Sema3A in Knieknorpel lokalisiert?
3. Welchen Einfluss nehmen Kultursysteme und Zellpassage auf die Expression von Sema3A und NRP1?
4. Es existieren bestimmte Marker, die in OA-Knorpel charakteristische Expressionsmuster für bestimmte phänotypische Veränderung bezüglich Differenzierungs-, Dedifferenzierungs- und Hypertrophieprozessen aufweisen. Inwieweit werden diese durch NRP1 beeinflusst?
5. Welchen Einfluss nimmt NRP1 auf die Apoptose, Proliferation und Adhäsion von OA-Chondrozyten?

Somit ist es das Ziel dieser Arbeit, ein genaueres Verständnis für die Rolle, die Sema3A und NRP1 in der OA-Pathogenese spielen, zu schaffen und dadurch einen Beitrag zur Aufklärung der pathophysiologischen Mechanismen im Verlauf der OA zu leisten.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Zellkultur**

#### **2.1.1 Isolierung und Kultivierung von humanen artikulären Chondrozyten**

##### **2.1.1.1 Kultivierung im Monolayer (2D-System)**

Die Versuche zu dieser Arbeit wurden mit humanen Chondrozyten (Ch) aus Knieknorpel durchgeführt. Das Ethikvotum der Ethikkommission an der Universität Regensburg hierfür lautet Az: 14-101-0189. Freundlicherweise wurde das Knorpelgewebe, aus welchem die Chondrozyten isoliert wurden, von Drs. med. Robert Springorum und Jens Schaumburger vom Asklepios Klinikum Bad Abbach zur Verfügung gestellt. Dabei wurde ausschließlich Knieknorpel von OA-Patienten verwendet, die sich dort einer endoprothetischen Versorgung unterzogen hatten. Insgesamt wurde vom Asklepios Klinikum in Bad Abbach Knorpel von 29 Patienten bezogen. Das Geschlecht war bei 7 Patienten männlich, bei 16 Patienten weiblich und bei 6 Patienten nicht angegeben. Die Altersspanne lag zwischen 46 bis 81 Jahren, der Altersdurchschnitt bei 67,4 Jahren, der Altersmedian bei 65,5 Jahren, bei 5 Patienten war das Alter unbekannt. Als Quellen für „normalen“ Knieknorpel, welcher nicht von Arthrose betroffen war, dienten Spender aus den USA, bei denen keine Arthrose bekannt war und denen nach ihrem Tod Knorpel aus dem Kniegelenk entnommen wurde. Chondrozyten dieser Spender wurden über eine Kooperation mit Dr. Karin Benz, Fa. Tetec, Reutlingen, bezogen. Weitere Donoren waren Patienten von Prof. Dr. Peter Angele, die nach einem Kniegelenkstrauma am Sporthopaedicum Regensburg operativ versorgt wurden. Insgesamt wurde Knorpel von 7 nicht von OA betroffener Personen untersucht. Davon war einer männlich, 4 weiblich und bei zweien das Geschlecht unbekannt. Die Altersspanne lag zwischen 26 und 57 Jahren, der Altersdurchschnitt bei 46,8 Jahren, der Altersmedian bei 52 Jahren, bei dreien war das Alter nicht bekannt.

Der Knorpel wurde mechanisch zerkleinert und mittels Collagenase Type 2 (Worthington, Lakewood, USA) für 16 Stunden bei 37°C verdaut. Die Chondrozyten wurden anschließend mit einer Dichte von 12.000 bis 17.000 Zellen pro cm<sup>2</sup> in T175-Flaschen (Corning, Corning, USA) ausgesät und mit 25 ml Kulturmedium aus DMEM-F12 Ham (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 10% FKS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und 1% Pen/Strep (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in einem Brutschrank (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die nicht adhärennten Zellen wurden nach 2 bis 3 Tagen durch Mediumwechsel entfernt. Die adhärennten



Chondrozyten wurden bei zweimaligem Mediumwechsel pro Woche bis zu einer Konfluenz von 70 bis 80% expandiert und mit Accutase (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wieder abgelöst. Die Zellen wurden entweder mit 10% DMSO (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in flüssigem Stickstoff eingefroren oder für weitere Versuche erneut ausgesät bzw. direkt verwendet. Ein Teil der Zellen wurde so bis Passage 3 kultiviert.

### **2.1.1.2 Kultivierung in Fibringel (3D-System)**

Um in vivo-ähnliche Kulturbedingungen abzubilden, wurde ein Teil der Zellen in Fibringel kultiviert. Dabei handelt es sich um ein dreidimensionales (3D) Kultursystem, bei dem die Zellen in einer Fibrinmatrix eingebettet sind und durch Diffusion des Kulturmediums durch diese Matrix hindurch versorgt werden. Humane artikuläre Chondrozyten von Patienten mit und ohne Arthrose in Passage 1 als auch mit siRNA transfizierte Zellen (vgl. 2.1.2) in Passage 2 wurden für einen Zeitraum von 7 Tagen in Fibringel kultiviert. Dazu wurden je 2 Mio. Zellen in 10 µl Fibrinogen (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und 18 µl Thrombin (Baxter, Deerfield, USA) resuspendiert und tropfenförmig in die Mitte eines Wells einer 24 well-Platte (Sarstedt, Newton, USA) pipettiert. Die Kultivierung erfolgte unter täglichem Mediumwechsel mit 500 µl chondrogenem Medium:

- DMEM high Glucose (Life Technologies, Carlsbad, USA)
- 1% Pen/Strep
- 0,1 µM Dexamethason (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 40 µg/ml Prolin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 110 µg/ml Pyruvat (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ITS (1:100), (BD, Franklin Lakes, USA)
- 50 µg/ml Ascorbat-2-Phosphat (täglich frisch zugegeben), (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Die Fibringele wurden zur Isolierung von RNA genutzt. Diese wurde nach Ablösen aus der Schale in einer Petrischale mit einem Skalpell (Feather, Osaka, Japan) zerkleinert und in Eppendorf Cups mit 1,5 ml Volumen bei -80°C eingefroren.

## 2.1.2 Transiente Transfektion von humanen artikulären Chondrozyten mit siRNA

### Material:

- NRP1-spezifische siRNA (ON-TARGETplus Human SMARTpool NRP1 siRNA, 5 nmol, Dharmacon, Lafayette, USA)
- non-target siRNA (ON-TARGETplus Non-targeting Pool, 5 nmol, Dharmacon, Lafayette, USA: #D-001810-10-05)
- DharmaFECT 1 Transfection Reagent (Dharmacon, Lafayette, USA: #T-2001-01)

### Methode:

Humane artikuläre Chondrozyten von OA-Patienten in Passage 1 wurden in 6 Well-Platten (Corning, Corning, USA) mit 50.000 bis 65.000 Zellen pro Well in 2 ml Kulturmedium (DMEM-F12 Ham + 10% FKS + 1% Pen/Strep) ausgesät. Bei einer Konfluenz von 40 bis 50%, welche nach 2 bis 3 Tagen erreicht wurde, erfolgte ein Mediumwechsel mit 2 ml DMEM-F12 Ham + 10% FKS ohne Pen/Strep. In diesem antibiotikafreien Milieu wurden die Zellen für 24 Stunden kultiviert, wonach sie bis zu einer Konfluenz von ca. 60 bis 70% expandiert waren und die transiente Transfektion mit siRNA erfolgen konnte. Bei siRNA (small interfering RNA) handelt es sich um einzelsträngige RNA mit einer Länge von 19 bis 25 Basenpaaren. Diese Einzelstränge binden an die dazu komplementäre mRNA und unterbinden damit die Translation der mRNA.

### *Auflistung der eingesetzten siRNA*

<b>siRNA</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
siRNA NRP1	1. CGA UAA AUG UGG CGA UAC U
	2. GGA CAG AGA CUG CAA GUA U
	3. GUA UAC GGU UGC AAG AUA A
	4. AAG ACU GGA UCA CCA UAA A
non-target siRNA	1. UGG UUU ACA UGU CGA CUA A
	2. UGG UUU ACA UGU UGU GUG A
	3. UGG UUU ACA UGU UUU CUG A
	4. UGG UUU ACA UGU UUU CCU A

Für die Transfektion der Zielzellen in einem Well einer 6 Well-Platte wurden 1,5 µl der 20 µM siRNA- bzw. non-target siRNA-Stocklösung in 198,5 µl DMEM-F12 Ham sowie 2 µl Dharmafekt in 198 µl DMEM-F12 Ham in separaten Gefäßen verdünnt. Beide Lösungen wurden jeweils für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend miteinander vermischt und für 20 Minuten erneut bei Raumtemperatur inkubiert. Dem wurde 800 µl DMEM-F12 Ham + 10% FKS hinzugefügt. Nach Absaugen des vorherigen Kulturmediums von den Zellen wurden 1,2 ml des Transfektionsmediums, die 25 nM siRNA NRP1 bzw. non-target siRNA enthielten, in jedes Well pipettiert. Um mögliche Wirkungen auf die Zellen auszuschließen, die nicht auf die Transfektion mit siRNA zurückzuführen sind, wurde ein Teil der Zellen zu Beginn der Versuche als Kontrolle mit siRNA-freiem Transfektionsmedium inkubiert, das lediglich Dharmafekt enthielt. Nach 24 Stunden Inkubation mit dem Transfektionsmedium erfolgte ein Mediumwechsel mit 2 ml Kulturmedium. 2 Tage nach der Transfektion wurde ein Teil der Zellen geerntet, der anhand von molekularbiologischen Analysen (vgl. 2.2) untersucht wurde, ein Teil für die funktionellen Assays (vgl. 2.4) ausgesät und ein Teil in Fibringel (vgl. 2.1.1.2) kultiviert. Die Chondrozyten in Fibringelkultur wurden nach 7 Tagen ebenfalls molekularbiologisch analysiert. Mittels qPCR wurde zunächst der NRP1-Knockdown kontrolliert und anschließend die Expression bestimmter Gene analysiert. Der andere Teil der Zellen wurde 3 Tage nach Transfektion für Proteinanalysen (vgl. 2.3) geerntet und der NRP1-Knockdown durch Western Blot-Analyse überprüft.

## **2.2 Molekularbiologische Analysen**

### **2.2.1 RNA-Isolierung**

#### **2.2.1.1 Chondrozyten in 2D-Kultur (Monolayer)**

Zur Isolierung von Chondrozyten-RNA aus Monolayerkultur wurde der Absolutely RNA Miniprep Kit (Stratagene, La Jolla, USA) gemäß dem leicht modifizierten Protokoll des Herstellers eingesetzt. Nach dem Auftauen der Zellpellets wurden sie mit einem β-Mercaptoethanol-haltigen Lysepuffer versetzt und unter wiederholtem Pipettieren eine homogene Lösung mit niedriger Viskosität erzielt. Anschließend wurde dem Homogenat eine äquivalente Menge an 70% Ethanol (Fischar, Saarbrücken, Deutschland) hinzugefügt. Nach mehrmaligem Vortexen wurde das Homogenat in einen RNA Binding Spin Cup transferiert und die RNA durch Zentrifugation an eine Glasfaser-Substrat-Säule gebunden. Das Filtrat wurde verworfen und der Spin Cup in einem Auffanggefäß platziert. Es folgte ein DNA-Verdau mit einer DNase-Lösung aus

50 µl DNase-Verdauopuffer und 5 µl RNase-freier DNase I für 15 Minuten bei 27°C. Anschließend wurde die Matrix der Säule mehrmals gewaschen mit Hoch- und Niedrig-Salz-Waschpuffer. Nach dem Trocknen wurde die RNA mit 20 µl Elutionspuffer durch Zentrifugation von der Matrix gelöst und die RNA-Konzentration bestimmt (vgl. 2.2.1.3).

### **2.2.1.2 Chondrozyten in 3D-Kultur (Fibringele)**

Für die Isolierung von RNA aus Fibringelen wurde der MasterPure Complete RNA Purification Kit (Epicentre, Madison, USA, vertrieben durch Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) eingesetzt. Die bei -80°C eingefrorenen zerkleinerten Fibringele wurden zum Auftauen auf Eis gelegt. Um die darin enthaltenen Zellen zu lysieren, wurde jedem Fibringel eine Mischung aus 600µl Tissue and Cell Lysis Solution und 2 µl Proteinase K zugegeben. Nach mehreren Inkubationsschritten bei 95°C, wiederholtem Mörsern und Vortexen wurden die Proteine auf Eis mittels MPC Protein Precipitation Reagent gefällt und abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurden mithilfe von Isopropanol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) die gesamten Nukleinsäuren präzipitiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen; das Pellet wurde zur DNA-Präzipitation in einer Lösung aus 195 µl DNase Buffer und 5 µl RNase-Free DNase I resuspendiert, bei 37°C für 20 Minuten inkubiert und die DNA mittels 2x T und C Lysis Solution (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) sowie MPC Protein Precipitation Reagent (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) ausgefällt. Der Überstand wurde in einen frischen Eppendorf Cup überführt und das Pellet verworfen. Die RNA wurde mit Isopropanol präzipitiert und das durch Zentrifugation erhaltene Pellet nach mehrmaligem Waschen mit 70% Ethanol getrocknet, bevor es in RNase-freiem Wasser (H<sub>2</sub>O mol., Appllichem, Maryland Heights, USA) resuspendiert wurde. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte im Anschluss daran.

### **2.2.1.3 Konzentrationsbestimmung und Qualitätsprüfung**

Das NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) misst Absorptionen im Bereich bestimmter Wellenlängen, bestimmt dadurch die Konzentration der RNA und setzt die verschiedenen Absorptionswerte ins Verhältnis, um den Reinheitsgrad der isolierten RNA zu ermitteln. RNA hat sein Absorptionsmaximum bei 260 nm, DNA bei 280 nm. Das Verhältnis von RNA zu DNA sollte für eine optimale Reinheit der RNA zwischen 1,8 und 2,1 liegen. Des Weiteren wird das Verhältnis von RNA zu sonstigen Verunreinigungen wie Proteinen, Ethanol

etc. ermittelt. Dieser 260/230-Quotient sollte über 1 liegen und im Optimalfall etwa 2 sein. 1 µl der Flüssigkeit, in dem die RNA gelöst war, wurde zunächst als Blank aufgetragen. Anschließend wurde pro Probe 1 µl der unverdünnten eluierten RNA auf den Messpunkt aufgetragen und diese analysiert. Gemessen werden können mit dem NanoDrop Spectrophotometer Konzentrationen von 2 bis 3000 ng/µl, wobei Proben mit Werten über 500 ng/µl verdünnt und erneut gemessen wurden, bis darin weniger als 500 ng/µl enthalten waren. Nach der Konzentrationsbestimmung der RNA-Proben wurden diese bei -80°C gelagert.

### **2.2.2 cDNA-Synthese**

Bei der cDNA-Synthese wird RNA in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Der Reaktionsansatz mit 14 µl wurde unter Verwendung des Affinity Script QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) wie folgt pipettiert:

10 µl	cDNA synthesis mastermix (2x)
1,5 µl	oligo(dT)-Primer
1,5 µl	Random Primer
1 µl	Affinity Script RT/RNase Block enzyme mixture

Pro Ansatz wurden dann maximal 6 µl RNA-Lysat zugegeben, dessen RNA-Gehalt zwischen 0,2 µg und 1 µg lag. Die Differenz zu 20 µl wurde mit H<sub>2</sub>O mol. aufgefüllt. Die cDNA-Synthese erfolgte in einem Cycler (Biometra, Göttingen, USA) für zunächst 5 Minuten bei 25°C, um die Anlagerung der Primer zu ermöglichen. Bei 42°C für 15 Minuten wurde die cDNA synthetisiert, was mit einer 5-minütigen Inkubation bei 95°C abgeschlossen wurde. Die kurzfristige Lagerung der cDNA fand bei 4°C, die längerfristige Lagerung bei -20°C statt.

### **2.2.3 Quantitative real-time PCR (qPCR)**

Die Expression der verschiedenen Gene wurde anhand von qPCR untersucht. Durchgeführt wurde diese Analyse mit dem MX3005P QPCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), deren Auswertung mit der MxPro QPCR Software für Mx3000P und Mx3005P QPCR Systeme (Stratagene, La Jolla, USA) erfolgte. Für den Reaktionsansatz mit 25 µl Gesamtvolumen pro Schale wurde der Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) eingesetzt:

12,5 µl	SYBR-Green	
0,375 µl	Rox (Reference Dye, Stammlösung 1:500 verdünnt mit H <sub>2</sub> O mol.)	
0,5 µl	Forward Primer	} 200 nM/Well
0,5 µl	Reverse Primer	
6,125 µl	H <sub>2</sub> O mol.	
5 µl	cDNA	

*Liste der Primer, die für die quantitative real-time PCR verwendet wurden  
(MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland)*

Gen	Primersequenz (5' → 3')	Amplikonlänge [bp]	Tm [°C]	NCBI- Referenznummer
BCL2	fwd: ATG TGT GTG GAG AGC GTC AA	136	57,3	NM_000633.2
	rev: ACA GTT CCA CAA AGG CAT CC		57,3	
COL1A1	fwd: ACG TCC TGG TGA AGT TGG TC	172	59,4	NM_000088
	rev: ACC AGG GAA GCC TCT CTC TC		61,4	
COL2A1	fwd: CCA GAT GAC CTT CCT ACG CC	186	62,5	NM_001844.4 NM_033150.2
	rev: TTC AGG GCA GTG TAC GTG AAC		61,2	
COL3A1	fwd: CTT CTC TCC AGC CGA GCT TC	187	59,5	NM_000090.3
	rev: TGT GTT TCG TGC AAC CAT CC		55,4	
COL10A1	fwd: CCC TCT TGT TAG TGC CAA CC	154	59,4	X72580
	rev: AGA TTC CAG TCC TTG GGT CA		57,3	
GAPDH	fwd: CTG ACT TCA ACA GCG ACA CC	120	59,4	J04038
	rev: CCC TGT TGC TGT AGC CAA AT		57,3	
ITGA10	fwd: GTG TGG ATG CTT CAT TCC AG	92	58,4	NM_003637.4
	rev: GCC ATC CAA GAC AAT GAC AA		56,4	
MMP13	fwd: GAC TGG TAA TGG CAT CAA GGG A	149	60,3	NM_002427
	rev: CAC CGG CAA AAG CCA CTT TA		57,3	
NRP1	fwd: GCC ACA GTG GGA CAG GTG AT	77	60,5	NM_003873.5
	rev: CTA TGA CCG TGG GCT TTT CT		58,4	
SEMA3A	fwd: GGA GAC TTG GTA TGA TTT AGA AGA GG	75	64,6	NM_006080.2

	rev: TGC TGA AAT AGC AGT CGG TTC		59,5	
SOX9	fwd: ACA CAC AGC TCA CTC GAC CTT G	104	62,1	Z46629
	rev: AGG GAA TTC TGG TTG GTC CTC T		60,3	
VEGFA	fwd: CTT GCC TTG CTG CTC TAC	88	56	NM_001025366. 1
	rev: ACC ACT TCG TGA TGA TTC TG		55,3	

Die Proben wurden als Duplikate auf eine 96 Well-PCR-Platte (Kisker GbR, Steinfurt, Deutschland) aufgetragen. Als Normierung für die verschiedenen Proben diente das Haushaltsgen Glycinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die Proben wurden zunächst für 15 Minuten bei 95°C initial denaturiert. Anschließend folgten 40 Zyklen, die sich auf einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 10 Sekunden und einem Annealing- und Elongationsschritt bei 60°C für 30 Sekunden zusammensetzten. In einem letzten Abschnitt mit 1 Minute bei 95°C, 30 Sekunden bei 55°C und 30 Sekunden bei 95°C wurde die Dissoziationskurve mit dem Schmelzpunkt der Primer ermittelt. Dabei handelt es sich um einer primerspezifische Temperatur, bei der sich die Primer von der cDNA lösen. Als Software für die qPCR diente MxPro3005, anhand derer auch ein Teil der Auswertung vorgenommen wurde. Dabei wurden die CT-Werte der Proben nach Relativierung mit der Ladungskontrolle GAPDH mit einem oder mehreren Kalibratoren verglichen. Bei Versuchen mit mehreren Platten wurden die CT-Werte der zu vergleichenden Proben in folgende Formel eingesetzt, wobei RQ den nicht logarithmierten fold change bezeichnet:

$$RQ = \frac{(1+E_{GOI})^{(Ct_{GOI}(\text{calibrator}) - Ct_{GOI}(\text{unknown}))}}{(1+E_{norm})^{(Ct_{norm}(\text{calibrator}) - Ct_{norm}(\text{unknown}))}}$$

## 2.3 Proteinanalysen

### 2.3.1 Proteinisolation aus Chondrozyten

Die bei -80°C eingefrorenen Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut und in einer Mischung aus RIPA-Puffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), einem Protease-Inhibitor (Complete Mini ohne EDTA, 7x (Roche, Penzberg, Deutschland)) und einem

Phosphatase-Inhibitor (PhosphoSTOP), 10x (Roche, Penzberg, Deutschland) lysiert. Dieses Lysat wurde für 20 bis 30 Minuten auf Eis gestellt und alle 5 bis 10 Minuten für 10 Sekunden gevortext. Nach einer Ultraschallbehandlung (Bandelin, Berlin, Deutschland) für 10 Sekunden mit 3 Zyklen wurde das Lysat bei 15700x g für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der klare Überstand mit den löslichen Proteinen in einen frischen Eppendorf-Cup überführt und das enthaltene Gesamtprotein bestimmt (vgl. 2.3.3). Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

### **2.3.2 Proteinisolation aus Überständen**

Proteine serumfreier Überstände wurden mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Dafür wurden pro ml Medium 225 µl 60% TCA (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und 139 µl Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) eingesetzt. Nachdem die Proteine für mind. 20 Minuten auf Eis gefällt worden waren, wurde der Überstand abzentrifugiert und das Pellet mit 100% Ethanol, 70% Ethanol und 100% Aceton (Fischer, Saarbrücken, Deutschland) gewaschen. Danach wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet, in SDS-Ladepuffer resuspendiert (vgl. 2.3.4) und bei -20°C aufbewahrt.

### **2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten**

Die Konzentration des Gesamtproteins wurde anhand eines BCA-Kits (Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)) ermittelt, der auf der Biuret-Reaktion beruht. Dabei wird unter alkalischen Bedingungen  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  reduziert und bildet dann zusammen mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex. Dieser Farbstoff besitzt ein Absorptionsmaximum bei 562 nm und kann somit spektralphotometrisch analysiert werden. Als Proteinstandard wurde bovines Serumalbumin (BSA) verwendet, welches mit Wasser oder PBS zu einer Standardreihe von 0 bis 2000 µg/ml verdünnt wurde. Von einer BCA-Arbeitslösung wurden je 200 µl pro Schale in eine 96 Well-Platte pipettiert. Dieser wurden in Doppelbestimmung sowohl 10 µl jedes Standards als auch jeder zu messenden Probe hinzugefügt. Die eingesetzten Proben wurden vorher 1:10 in  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37°C wurden die Lösungen in Küvetten überführt und bei 560 nm in einem Biophotometer (Eppendorf, Deutschland) gemessen. Anhand einer linearen Kalibrierungskurve, die durch die BSA-Standardreihe definiert wurde, konnte somit die Konzentration des Gesamtproteins in den Proben bestimmt werden.



### 2.3.4 Western Blot-Analyse und semiquantitative Auswertung

Beim Western Blot werden Proteine mittels Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und ein spezifisches Protein anhand einer Antikörper-Reaktion detektiert. Je nach Expression des gesuchten Proteins wurden 50 bis 75 µg Gesamtprotein mit einem SDS- und DTT-haltigen Ladepuffer versetzt.

Ladepuffer (5x):

- 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 (Applichem, Maryland Heights, USA; Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 10 % SDS (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- 0,25 M DTT (Applichem, Maryland Heights, USA)
- 10 % Glycerin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- 0,05 % Bromphenolblau (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

SDS (Natriumdodecylsulfat) dient zur Denaturierung der Proteine und der Maskierung ihrer Eigenladung; DTT (Dithiothreitol) trägt durch die Reduktion von Disulfidbrücken ebenfalls zur Auffaltung der Proteine bei. Die Proben wurden bei 95°C für 5 Minuten erhitzt und auf ein 10- bzw. 12%-iges Gel aufgetragen. Zur Bestimmung der Größe detektierter Proteine wurden 10 µl eines DualColor-Markers (BioRad, Hercules, USA) verwendet.

<b>Trenngel</b>	<b>10%-Gel</b>	<b>12%-Gel</b>
H <sub>2</sub> O (destilliert)	3,95 ml	3,3 ml
30% Bis-Acrylamid	3,35 ml	4,0 ml
1,5 M Tris pH 8,8 + 10% SDS	2,6 ml	2,6 ml
10% Ammoniumpersulfat (APS)	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	4 µl	4 µl
<b>Sammelgel</b>		
H <sub>2</sub> O (destilliert)	1390 µl	
30% Bis-Acrylamid	415 µl	
0,5 M Tris pH 6,8 + 10% SDS	650 µl	
10% Ammoniumpersulfat	25 µl	
TEMED	2 µl	

Bis-Acrylamid: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

APS: Serva, Heidelberg, Deutschland

TEMED: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Die Gelelektrophorese erfolgte mithilfe des BioRad Mini-Protean Tetra System (BioRad, Hercules, USA) bei 80 Volt bis zum vollständigen Übertritt der Proben in das Sammelgel und wurde anschließend bei 120 Volt fortgesetzt, bis im Trenngel das gewünschte Bandenmuster des Markers zu beobachten war. Das Blotting der Proteine auf eine PVDF-Membran (Roche, Penzberg, Deutschland) fand bei 120 mA in Transferpuffer mit 10% Methanol für eine antikörperabhängige Zeit zwischen 1:20 bis 2:00 Stunden statt; zur Blotkontrolle wurde das Gel mit Coomassie (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt. Nach Färben der Membran mit Ponceau S (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), um eine gleichmäßige Übertragung der Proteine zu beurteilen, wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran mit 5% Trockenmilchlösung (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) blockiert. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in 5% Trockenmilchlösung bei 4°C. Nach mehreren Waschschritten mit TBS-T (Tris-buffered Saline (Applichem, Maryland Heights, USA) + Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)) wurde die Membran mit dem HRP (Meerrettichperoxidase)-gekoppelten Sekundärantikörper in 5% Trockenmilchlösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert und die Proteinbanden nach Inkubation mit einem ECL-Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), durch den das HRP-Substrat umgesetzt wird, unter einem Chemielumineszenzgerät (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) detektiert. Wenn die Expression mehrerer Proteine mit ähnlichem Molekulargewicht untersucht wurde, wurde die Membran vor der erneuten Inkubation mit Antikörpern mittels Re-Blot Plus Mild (Chemicon, Temecula, USA) gestrippt.

#### *Liste verwendeter Primärantikörper für Western Blot-Analysen*

<b>Antikörper</b>	<b>Nomen- klatur</b>	<b>Antigen</b>	<b>Ig</b>	<b>Verdünnung für WB</b>	<b>Hersteller</b>
Kaninchen anti- $\beta$ -Aktin	ab8227	$\beta$ -Aktin	polyklonal	1:5000	Abcam
Kaninchen anti-MMP13	ab39012	MMP13	polyklonal	1:6000	Abcam

Ziege anti-NRP	sc7239	NRP1	polyklonal	1:200	Santa Cruz
Kaninchen anti-Sema3A	sc28867	Sema3A	Polyklonal	1:200	Santa Cruz

*Liste verwendeter Sekundärantikörper für Western Blot-Analysen*

<b>Antikörper</b>	<b>Nomenklatur</b>	<b>Primärantikörper</b>	<b>Ig</b>	<b>Verdünnung für WB</b>	<b>Hersteller</b>
Esel anti-Kaninchen IgG-HRP	711-036-152	Kaninchen anti- $\beta$ -Aktin, Kaninchen anti-Sema3A	polyklonal	1:10000	Jackson Immuno Research
Maus anti-Kaninchen IgG-POD	A2074	Kaninchen anti-MMP13	monoklonal	1:30000	Sigma
Esel anti-Ziege IgG-HRP	sc2020	Ziege anti-NRP	polyklonal	1:7000	Santa Cruz

Die Bearbeitung und Auswertung der Bilder erfolgte mit PhotoShop. Zur Quantifizierung wurde die mittlere Pixelintensität der einzelnen Banden mithilfe eines Histogramms ermittelt. Indem die gesuchte Proteinbande jeder Probe auf die  $\beta$ -Aktin-Bande derselben Probe bezogen wurde, konnten mit den derart relativierten Werten die verschiedenen Proben anschließend miteinander verglichen werden. Wurden mehrere OA-Chondrozyten mit mehreren Nicht-OA-Chondrozyten verglichen, wurde dazu jede OA-Bande jeweils zu allen Nicht-OA-Banden in Relation gesetzt und aus diesen Werten ein Mittelwert gebildet. Die so erhaltenen Mittelwerte für die einzelnen OA-Banden wurden in GraphPad als Boxplot dargestellt, wobei alle gesunden auf N = 1 gesetzt wurden. Mittels Mann-Whitney-Test wurde abschließend die Expression von Sema3A in OA-Chondrozyten verglichen mit der in Nicht-OA-Chondrozyten auf Signifikanz geprüft.

## **2.4 Funktionelle Assays**

Die funktionellen Assays wurden eingesetzt, um Unterschiede im Proliferations-, Apoptose- und Adhäsionsverhalten zwischen den NRP1-Knockdown (K.O.-Ch)- und Nicht-Knockdown (Kontroll-Ch)-Zellen zu ermitteln. Dies erfolgte in Mehrfachbestimmungen. Die Werte wurden in einem ELISA-Reader (Tecan Group,

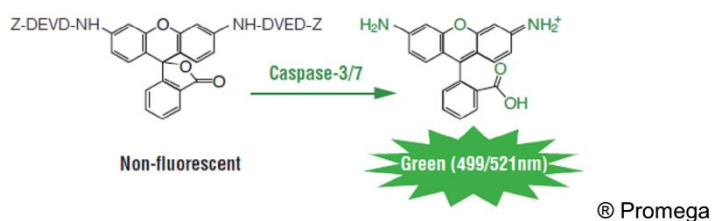
Männedorf, Schweiz) gemessen und gemittelt und nach Bereinigung mit dem Blank miteinander verglichen. Dazu wurde die prozentuale Abweichung des Wertes der NRP1-Knockdown-Chondrozyten von dem der mit non target-siRNA transfizierten Zellen angegeben.

#### **2.4.1 BrdU-Assay**

Zur Bestimmung der Proliferation wurde der BrdU – Cell Proliferation ELISA (Roche, Penzberg, Deutschland) eingesetzt. Die Analyse erfolgte in Dreifachbestimmung. Dazu wurden sowohl von den K.O.-Ch als auch von den Kontroll-Ch jeweils 10.000 Zellen in einem Volumen von 100 µl in drei Wells einer 96 Well-Platte mit komplettem Kulturmedium ausgesät und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit 100 µl FKS-freiem Kulturmedium, um die Proliferation der Zellen vorübergehend zu hemmen. Nach 24 Stunden wurden 10 µl BrdU-Markierlösung hinzugefügt. Diese enthält das Pyrimidinanalogon BrdU (5-Brom-2'-Desoxyuridin), das anstelle von Thymidin in die DNA der proliferierenden Zellen eingebaut wird. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden für 30 Minuten mit 200 µl FixDenat bei Raumtemperatur behandelt. Dadurch wurden die Zellen fixiert und die DNA denaturiert, um dem Antikörper einen leichteren Zugang zum eingebauten BrdU zu ermöglichen. Nach der Abnahme von FixDenat wurden die Zellen für ca. 90 Minuten mit 100 µl Anti-BrdU-POD-Arbeitslösung bei Raumtemperatur inkubiert. Das Antikörperkonjugat wurde abgenommen und ungebundener Antikörper abgewaschen. Zum Detektieren der gebildeten Immunkomplexe wurden 100 µl Substratlösung (Tetramethylbenzidin) in jedes Well pipettiert. Wenn sich nach 5 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur eine deutliche Färbung entwickelt hatte, wurden zum Abstoppen der kolorimetrischen Reaktion 25 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zugegeben und die Absorption der einzelnen Proben im GENios™-Lumineszenzlesegerät bei 450 nm gemessen. Da die Absorptionswerte direkt mit der Menge an neu synthetisierter DNA korrelieren, lässt sich damit das Proliferationsverhalten der Zellen beschreiben.

### 2.4.2 Caspase-3/7-Assay

Für Nachweis und Quantifizierung aktiver Caspasen wurde der Caspase-3/7-Assay von Promega (Fitchburg, USA) benutzt. Dieser Nachweis erfolgte in Dreifachbestimmung. Sowohl von den K.O.-Ch als auch von den Kontroll-Ch wurden jeweils 10.000 Zellen in einem Volumen von 100  $\mu$ l in drei Wells einer 96 Well-Platte mit normalem Kulturmedium ausgesät und in einem Brutschrank bei 37°C für 2 Tage inkubiert. Danach wurden pro Schale 100  $\mu$ l Apo-ONE® Caspase-3/7-Reagens, einer 1:100-Verdünnung des Caspasesubstrats Z-DEVD-R110 mit Caspase-3/7-Puffer, hinzugefügt und die Proben bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Durch die aktivierten Caspasen 3 und 7 erfolgte dabei die Abspaltung des DVED-Peptids vom Substrat Z-DEVD-R110. Bei dem Spaltungsprodukt handelt es sich um fluoreszierendes Rhodamin-110, das bei einer Extinktion von  $485 \pm 20$  nm und einer Emission von  $530 \pm 25$  nm ( $Ex_{max}$  499 nm/ $Em_{max}$  521 nm) gemessen werden kann und



direkt proportional zur Spaltungsaktivität der Caspasen ist. Gemessen wurde 3, 6 und 20 Stunden nach Reagenszugabe.

### 2.4.3 Kristallviolett-Assay

Mithilfe des Kristallviolett-Assays wurden Rückschlüsse auf das Adhäsions- und Ausbreitungsverhalten der Zellen gezogen. Dies erfolgte in Vierfachbestimmung. Dazu wurden sowohl von den K.O.-Ch als auch von den Kontroll-Ch jeweils 10.000 Zellen in vier Wells einer 96 well-Platte in normalem Kulturmedium ausgesät. Das Adhäsionsverhalten der Zellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten miteinander verglichen, d.h. nach 1, 2, 3 und 4 Stunden. Die Zellen wurden nach der Aussaat für den jeweiligen Zeitraum im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Zu den einzelnen Messzeitpunkten erfolgte zunächst die visuelle Überprüfung der Chondrozyten unter dem Lichtmikroskop. Das Medium wurde abgenommen und die Wells mit jeweils 200  $\mu$ l PBS gewaschen, um nicht adhärenente Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die adhärenenten Zellen mit 100  $\mu$ l Glutaraldehyd 1%-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Glutaraldehyd-Lösung abgenommen und die Wells erneut mit 200  $\mu$ l PBS gewaschen. Zum Anfärben der Zellen wurden 150  $\mu$ l 0,02% Kristallviolett (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) pro Schale für 15 Minuten bei Raumtemperatur zugegeben. Danach wurde die

Färbelösung abgenommen und überschüssiges Kristallviolett unter fließendem Leitungswasser abgewaschen. Um das gebundene Kristallviolett wieder zu lösen, wurden 150 µl Ethanol 70% pro Schale zugegeben und die Platten für 3 Stunden auf einem Schüttler inkubiert. Das wieder in Lösung gegangene Kristallviolett wurde abschließend bei 595 nm quantifiziert.

## **2.5 Statistische Methoden**

Für die statistische Auswertung wurde das Computerprogramm GraphPad Prism benutzt. Um Ausreißer in der jeweiligen Stichprobe zu detektieren und auszuschließen, wurde für jede Stichprobe der Ausreißertest nach Grubbs durchgeführt. Um zu berechnen, ob die Unterschiede in der Genexpression und Proteinproduktion von NRP1 und Sema3A signifikant sind, wurden die Gruppen mithilfe des nichtparametrischen Mann-Whitney-Tests miteinander verglichen. Unterschiede zwischen K.O.- und Kontroll-Chondrozyten wurden anhand des nichtparametrischen gepaarten Wilcoxon Signed-Rank Tests auf ihre Signifikanz hin überprüft.

## **2.6 Histologie**

### **2.6.1 Kryoschnitte**

Humanes Knorpelgewebe wurde für 24 Stunden in 4% PFA (Paraformaldehyd, Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert und anschließend bis zum Einbetten in Tissue Tek (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) bei 4°C in PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gelagert. Nach dem Aushärten bei -20°C wurden mit einem Mikrom Mikrotom RM 2155 (Leica, Wetzlar, Deutschland) 10 µm dicke Schnitte hergestellt und auf Objektträger (Superfrost Plus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) aufgebracht.

### **2.6.2 Immunfärbung mit Diaminobenzidin (DAB)**

Mithilfe der DAB-Färbung wurde auf Paraffin- und Kryoschnitten von humanem Knieknorpel Semaphorin 3A und Neuropilin-1 nachgewiesen. Die Paraffinschnitte wurden zunächst mit Roti©-Histol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) für 2 x 10 Minuten und absteigender Ethanolreihe (je 10 Minuten in Ethanol absolut, 96%, 70% und 50%) entparaffiniert und für 10 Minuten in Aqua dest. gewaschen. Um ein Auslaufen der Inkubationslösungen zu verhindern, wurden alle Schnitte mit DAKO-Pen (Dako, Glostrup, Dänemark) umrandet. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Schnitte in PBS gewaschen. Zunächst wurde die endogene Peroxidase für 5 Minuten mit 3% Wasserstoffperoxid (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) bei

Raumtemperatur blockiert. Die enzymatische Demaskierung erfolgte in einer feuchten Kammer bei 37°C mit 0,05% Protease XXIV (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) für 10 Minuten und 0,1% Hyaluronidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) für 90 Minuten. Nach 1-stündiger Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 1% BSA (Cell Sciences, Newburyport, USA) wurden die Schnitte mit dem 1. Antikörper, verdünnt in 1% BSA, über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten 2. Antikörper, der ebenfalls in 1% BSA verdünnt wurde, für 1 Stunde bei 37°C.

*Liste der verwendeten Antikörper für die immunhistochemische Färbung*

<b>1. Antikörper</b>	<b>Isotypkontrolle</b>	<b>Verd.</b>	<b>2. Antikörper</b>	<b>Verd.</b>
NRP1 ( <i>Santa Cruz:</i> #sc-7329)	Normal goat IgG (#sc-2028)	1:200	Donkey anti-goat IgG, biotinyliert (#sc-2042)	1:100
Sema3A (#sc-28867)	Anti-rabbit IgG, polyklonal ( <i>Abcam:</i> #ab27478)	1:50	Swine anti-rabbit, biotinyliert ( <i>DAKO: #E0431</i> )	1:500

Anschließend wurde Streptavidin/HRP (DAKO, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) 1:300 in 1% BSA verdünnt und damit die Schnitte erneut für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Ungebundenes Streptavidin/HRP wurde durch 3 x 5-minütiges Waschen in PBS entfernt. Zur Sichtbarmachung der gebundenen Antikörper wurde für bis zu 10 Minuten mit DAB-Substrat inkubiert, welches die an Streptavidin gebundene HRP (Meerrettichperoxidase) umsetzt. Überschüssiges DAB-Substrat wurde durch Waschen in Aqua dest. entfernt und die Zellkerne mit Hämatoxilin nach Gil III (Merck, Darmstadt, Deutschland) angefärbt. Nach mehrmaligem Waschen in Aqua dest. und 2 x 5 Minuten in PBS wurden die Schnitte mit Glycergel (Dako, Glostrup, Dänemark) eingedeckt.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Analyse der Expression von Sema3A und NRP1 in humanen artikulären Chondrozyten**

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Gen- und Proteinexpression von Sema3A und dessen Rezeptor NRP1 in humanen Chondrozyten des Knieknorpels untersucht. Dazu wurden Chondrozyten aus den Kniegelenken von OA-Patienten isoliert und ihre Expressionsmuster anhand verschiedener Methoden verglichen. Chondrozyten aus gesundem Knorpel dienten als Kontrolle. Der Knorpel, aus dem die Chondrozyten für die Versuche gewonnen wurden, stammt zum einen von Gonarthrosepatienten, die sich in der Asklepios-Klinik Bad Abbach einer endoprothetischen Versorgung unterzogen haben, zum anderen von nicht an Arthrose erkrankten Personen aus den USA, die sich nach ihrem Tod zu wissenschaftlichen Zwecken zur Verfügung gestellt haben, bzw. von Patienten ohne bekannte Arthrose, die nach stattgehabtem Trauma am Universitätsklinikum Regensburg operativ versorgt wurden.

#### **3.1.1 Genexpression und Proteinproduktion von Sema3A**

Um einen Vergleich zwischen Chondrozyten von Personen mit und ohne Gonarthrose ziehen zu können, wurden sowohl die Genexpression wie auch die Proteinbiosynthese von Sema3A analysiert und histologische Untersuchungen vorgenommen.

##### **3.1.1.1 Genexpression von SEMA3A im 2D-Modell**

Die Genexpression von SEMA3A in Chondrozyten von Personen mit und ohne Gonarthrose wurde miteinander verglichen, nachdem alle Zellen unter gleichen Bedingungen als Monolayer bis Passage 1 kultiviert worden waren. Chondrozyten von OA-Patienten (OA-Ch) zeigten verglichen mit Chondrozyten von Donoren, die nicht von OA betroffen waren (N-Ch) tendenziell eine vermehrte Expression von SEMA3A (Abb. 11).



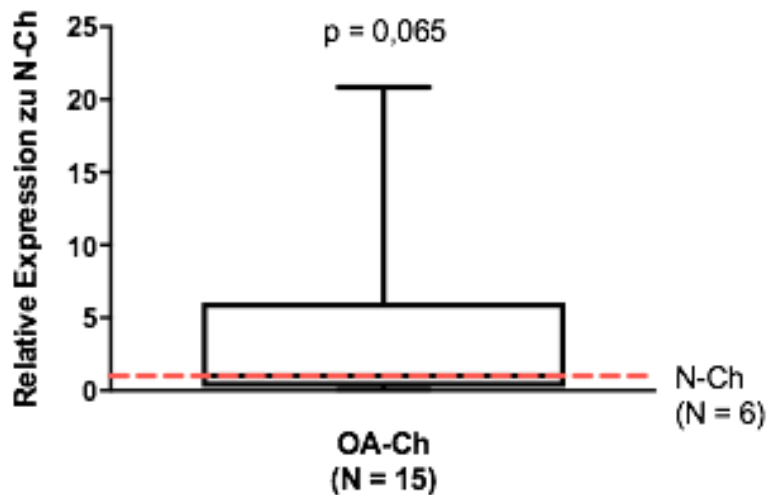


Abbildung 11. Genexpression von SEMA3A in OA-Ch verglichen mit N-Ch (Passage 1, Monolayer-Kultur).

Die beiden Datensätze der N-Ch-Donoren und der OA-Patienten wurden mittels Mann-Whitney-Test miteinander verglichen.

### 3.1.1.2 Genexpression von SEMA3A im 3D-Modell

Da in unterschiedlichen Kultursystemen verschiedene Wachstumsbedingungen gegeben sind, wurden die Chondrozyten zusätzlich zum 2D-Modell auch in einem 3D-Modell in Fibringel kultiviert. Hierbei ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Genexpression von Sema3A zwischen OA-Ch und N-Ch feststellen (Abb. 12).

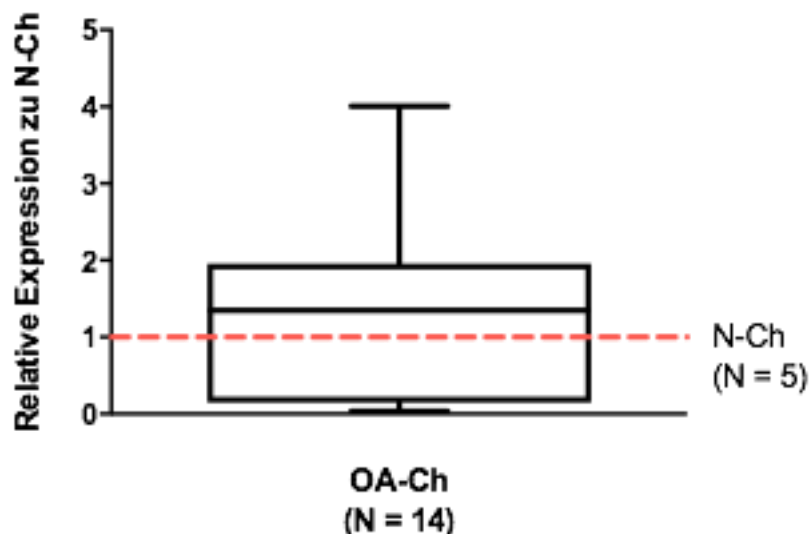
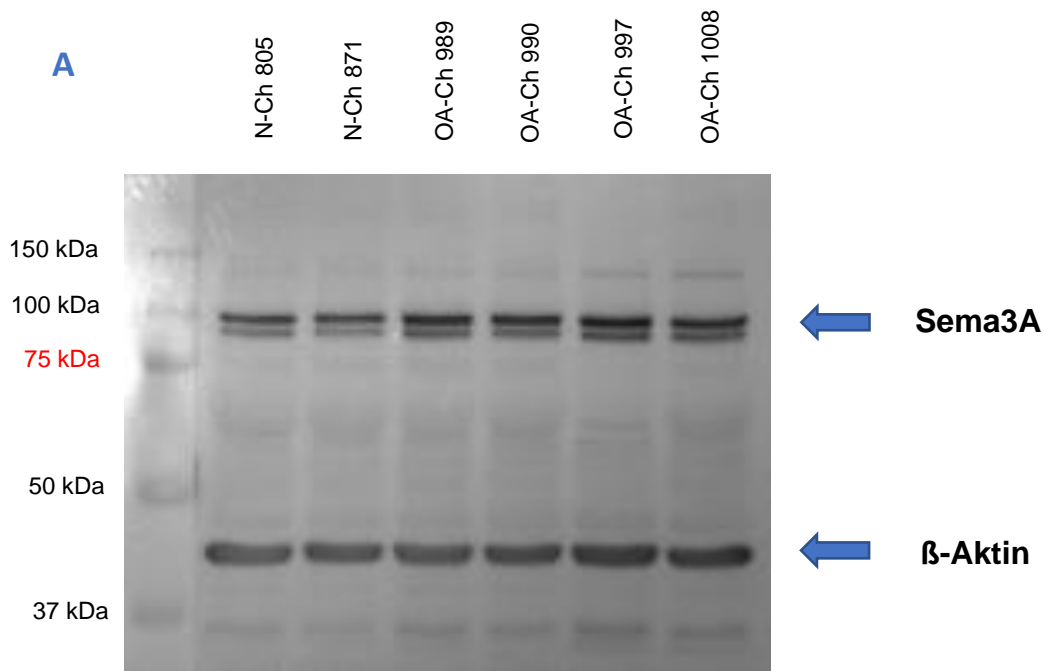


Abbildung 12.

Genexpression von SEMA3A in OA-Ch verglichen mit N-Ch (Passage 1, anschließend Fibringel-Kultur für 7 Tage). Die beiden Datensätze der N-Ch-Donoren und der OA-Patienten wurden mittels Mann-Whitney-Test miteinander verglichen.

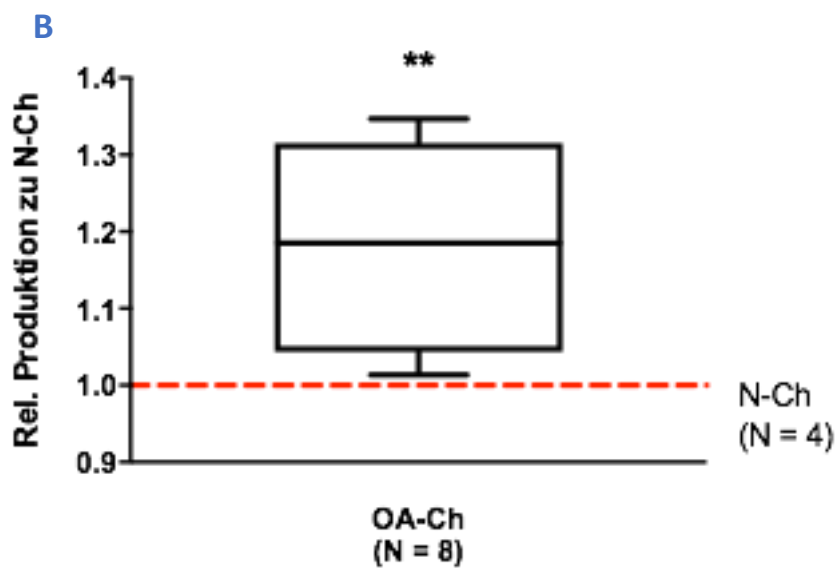
### 3.1.1.3 Proteinproduktion von Sema3A

Um nicht nur die Genexpression von Sema3A, sondern auch die Proteinbiosynthese in N-Ch und OA-Ch vergleichen zu können, wurde diese mittels Western Blot analysiert (Abb. 13A). Die Zellen wurden zuvor zwei Tage als Monolayer in Passage 1 kultiviert.



**Abbildung 13A.** Western Blot für Sema3A mit Proteinlysaten von Chondrozyten von Patienten mit und ohne Gonarthrose aus 2D-Kultur. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin (42 kDa) benutzt. N (N-Ch) = 4, N (OA-Ch) = 8, gezeigt wird ein exemplarischer WB.

Die densitometrische Auswertung der beiden Western-Blots mit Hilfe von PhotoShop CS6 zeigte, dass OA-Ch signifikant mehr Sema3A synthetisieren als N-Ch (Abb. 13B).

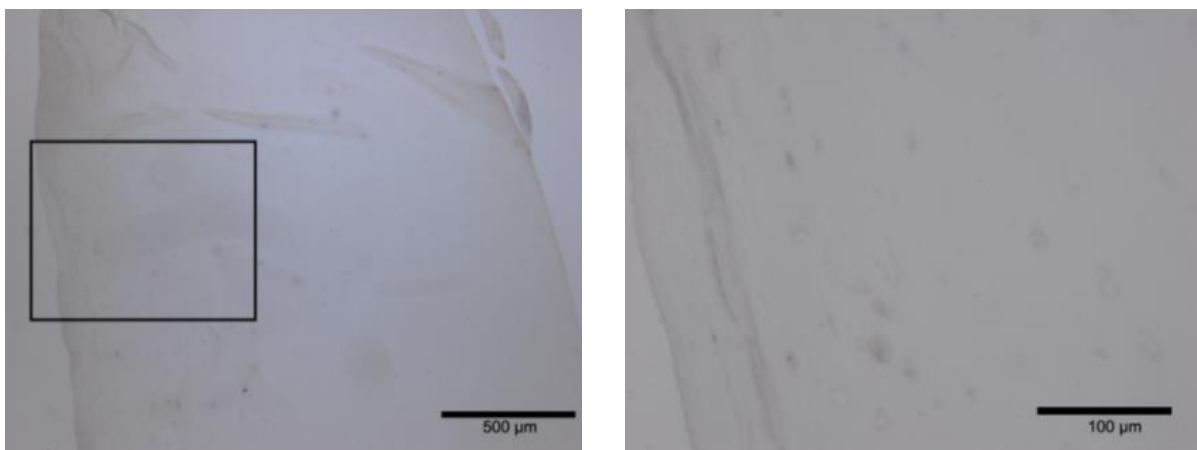


**Abbildung 13B.** Proteinproduktion von Sema3A durch OA-Ch verglichen mit N-Ch in 2D-Kultur nach einer Belichtungszeit von 5 Minuten mittels Mann-Whitney-Test.

### 3.1.1.4 Histologische Auswertung der Sema3A-Synthese

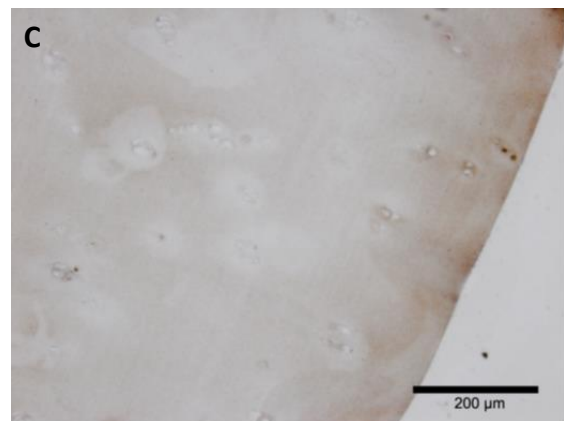
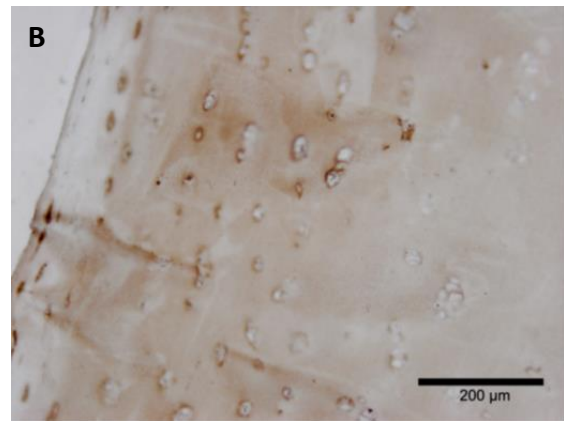
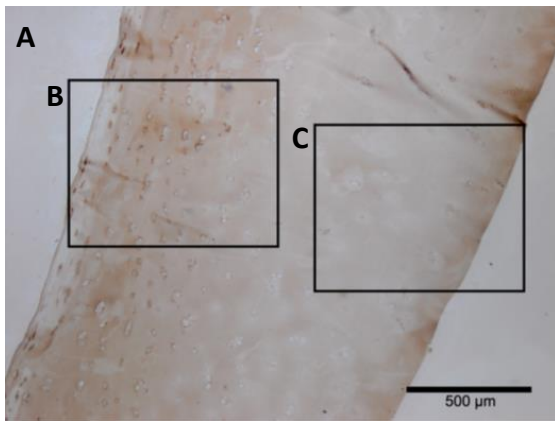
Zusätzlich zur Auswertung anhand von Western Blot wurde die Sema3A-Produktion in Knorpelgewebe von Personen mit und ohne Gonarthrose mittels DAB-Substrat-Färbung immunhistochemisch analysiert.

Zur Überprüfung der Spezifität des 1. Antikörpers für Sema3A wurde die DAB-Substrat-Färbung ohne den 2. Antikörper durchgeführt. Bei dieser Negativkontrolle zeigte sich keine spezifische Färbung (exemplarisch gezeigt in Abb. 14).



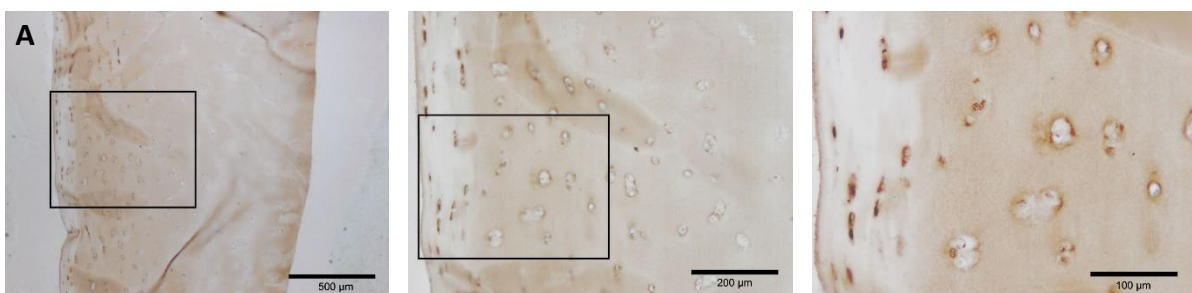
**Abbildung 14.** Negativkontrolle ohne 2. Antikörper für Sema3A in humanem Knorpelgewebe aus dem Kniegelenk. DAB-Färbung. **Linkes Bild** Übersichtsaufnahme in 4-facher Vergrößerung. **Rechtes Bild** Ausschnitt aus dem linken Bild in der tiefen Knorpelschicht, 20-fache Vergrößerung. Links im Bild ist immer die oberflächliche Zone dargestellt, nach rechts hin sind die tieferen Knorpelschichten abgebildet. Dies gilt für alle gezeigten histologischen Abbildungen in dieser Arbeit.

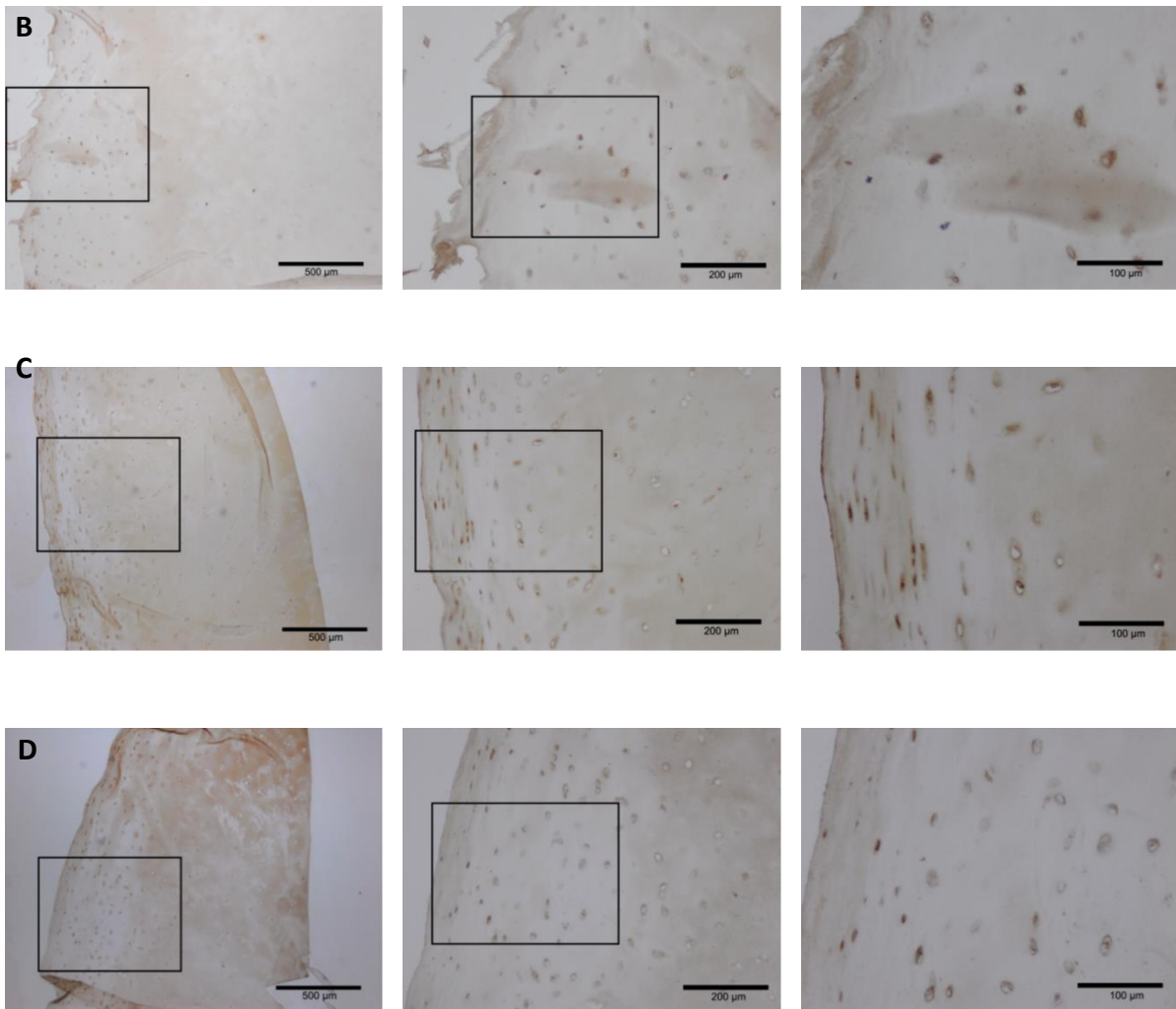
Im Allgemeinen zeigte sich für Sema3A eine deutliche Färbung in Form eines Hofes um die einzelnen Chondrozyten in der oberflächlichen Knorpelschicht (Abb. 15B), wohingegen deren Intensität zur Tiefe hin abnahm, sodass die Anfärbbarkeit der Knorpelhöfe in der tieferen Zone wesentlich geringer ausgeprägt war (Abb. 15C). Dies geht zudem mit einer deutlichen Abnahme der Chondrozytendichte in den tieferen Schichten einher. Diese Verteilung fand sich bei allen Gewebeproben (N = 6), sodass nur ein Schnitt beispielhaft gezeigt wird.



**Abbildung 15.** Immunhistochemische Analyse von Sema3A in humanem Knorpelgewebe aus dem Kniegelenk eines Patienten mit Arthrose. DAB-Färbung. **A** Übersichtsaufnahme in 4-facher Vergrößerung. **B** Oberflächliche Schicht des Gelenkknorpels, 10-fache Vergrößerung. **C** Tiefe Schicht des Gelenkknorpels, 10-fache Vergrößerung.

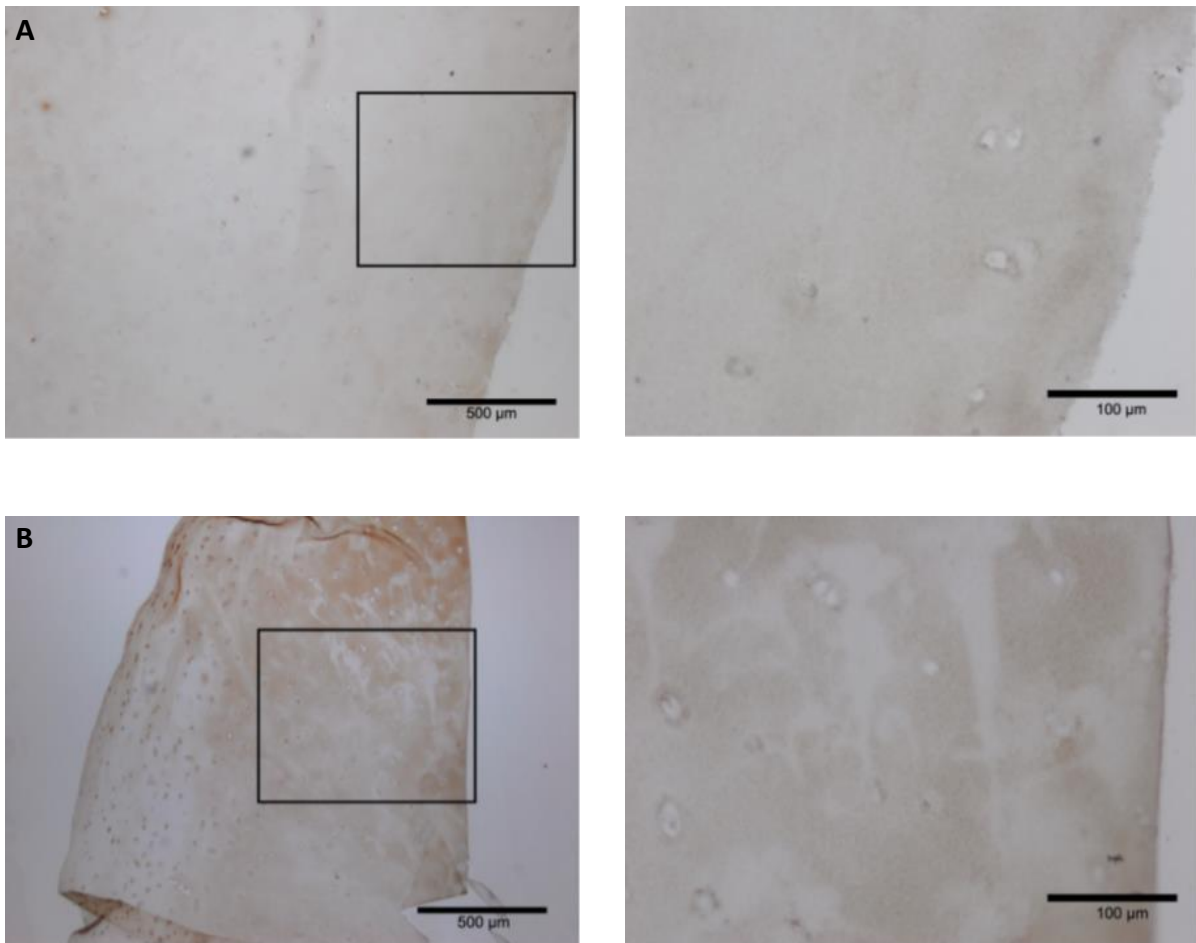
Vergleicht man die beispielhaft ausgewählten OA-Patienten A und B in Abbildung 16 mit den Nicht-OA-Kontrollen C und D, so ist in der oberflächlichen Knorpelschicht keine eindeutige Diskrepanz in der Intensität der Färbung zu erkennen. Um die einzelnen Chondrozyten zeigt sich in allen Schnitten eine deutliche, ringförmige Färbung, deren Intensität sich bei den OA-Patienten A und B nicht wesentlich von der Intensität der gesunden Kontrollen C und D unterscheidet. Diese Beobachtung fand sich bei allen Gewebeproben (N (OA) = 3, N (Nicht-OA) = 3).





**Abbildung 16.** Immunhistochemische Analyse von Sema3A humanem Knorpelgewebe aus dem Kniegelenk in der oberflächlichen Knorpelschicht. DAB-Färbung. **A und B** Patienten mit Gonarthrose. **C und D** Kontrollpersonen ohne Gonarthrose. **Linkes Bild** Übersichtsaufnahme in 4-facher Vergrößerung. **Mittleres Bild** Ausschnitt aus dem linken Bild in der oberflächlichen Knorpelschicht, 10-fache Vergrößerung. **Rechtes Bild** Ausschnitt aus dem mittleren Bild in der oberflächlichen Knorpelschicht, 20-fache Vergrößerung. Abbildungen beispielhaft für N (OA) = 3, N (Nicht-OA) = 3.

Zur Tiefe hin nimmt, wie oben beschrieben, die Dichte der Chondrozyten wie auch die Intensität für Sema3A ab. Beim Vergleich zwischen OA- und Nicht-OA-Patienten zeigte sich dabei, wie beispielhaft gezeigt in Abb. 17, kein wesentlicher Unterschied in der Intensität der Färbung. Diese Beobachtung fand sich ebenfalls bei allen Gewebeproben (N (OA) = 3, N (Nicht-OA) = 3).



**Abbildung 17.** Immunhistochemische Analyse von Sema3A humanem Knorpelgewebe aus dem Kniegelenk in der tiefen Knorpelschicht. DAB-Färbung. **A** Patient mit Gonarthrose. **B** Kontrollperson ohne Gonarthrose. **Linkes Bild** Übersichtsaufnahme in 4-facher Vergrößerung. **Rechtes Bild** Ausschnitt aus dem linken Bild in der tiefen Knorpelschicht, 20-fache Vergrößerung.

Beim Vergleich zwischen Knieknorpel-OA- und Nicht-OA-Donoren ließ sich mittels immunhistochemischer Analyse somit kein Unterschied in der Proteinproduktion von Sema3A feststellen. Da es sich bei histologischen Untersuchungen lediglich um qualitative Beobachtungen handelt, ist es nicht möglich, hiermit eine Quantifizierung vorzunehmen, es lässt sich lediglich eine Aussage über die Lokalisation treffen.

### 3.1.1.5 Genexpression von SEMA3A bei zunehmender Passage

Im Folgenden wurden Versuche durchgeführt, um ein differenzierteres Bild der Expression von SEMA3A zu erhalten. Um Rückschlüsse auf den Einfluss der Passage ziehen zu können, wurde die Genexpression von SEMA3A von Passage 0 bis Passage 3 bei Chondrozyten von OA-Patienten analysiert. Eine Analyse der Genexpression in N-Ch war aufgrund der zu geringen Anzahl an Donoren nicht möglich. Hierbei zeigte

sich, dass SEMA3A durch erneutes Passagieren weniger exprimiert wurde, die Expression von SEMA3A in OA-Ch mit zunehmender Passage also abnahm (Abb. 18).

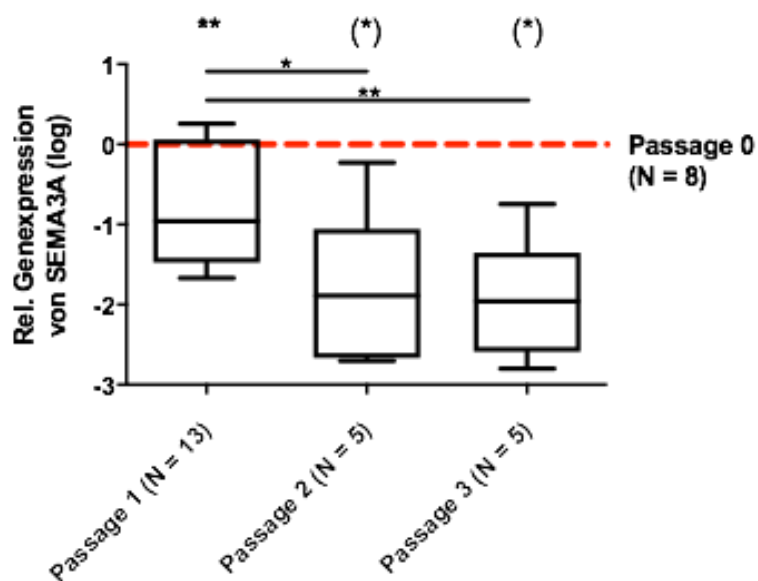


Abbildung 18.

Vergleich der Genexpression von SEMA3A zwischen Passage 0 und Passage 3 in OA-Ch mittels Mann-Whitney-Test. Die rote Linie ( $x = 0$ ) entspricht den als Kalibrator verwendeten Werten von Passage 0. Relativ dazu werden die Werte von Passage 1 bis 3 aufgetragen.

### 3.1.1.6 Genexpression von SEMA3A nach Kultur im 2D- und 3D-Modell im Vergleich

Artikuläre Chondrozyten von Donoren mit und ohne Gonarthrose wurden sowohl als Monolayer wie auch im Fibringel kultiviert (vgl. 3.1.1). Dazu wurden Chondrozyten als Monolayer (2D) bis Passage 1 kultiviert, wobei ein Teil davon anschließend entnommen und für 7 Tage in Fibringel kultiviert wurde (3D).

Um eine Vorstellung vom Einfluss der beiden Kultiviersysteme auf die Genexpression von SEMA3A zu bekommen, wurden Chondrozyten aus 2D- und 3D-Kultur in dieser Hinsicht miteinander verglichen. Dabei zeigte sich bei OA-Ch nach der Kultur in Fibringelen die Expression von SEMA3A im Vergleich zur Monolayerkultur verringert (Abb. 19). Bei N-Ch trat dieser Effekt nicht zutage.

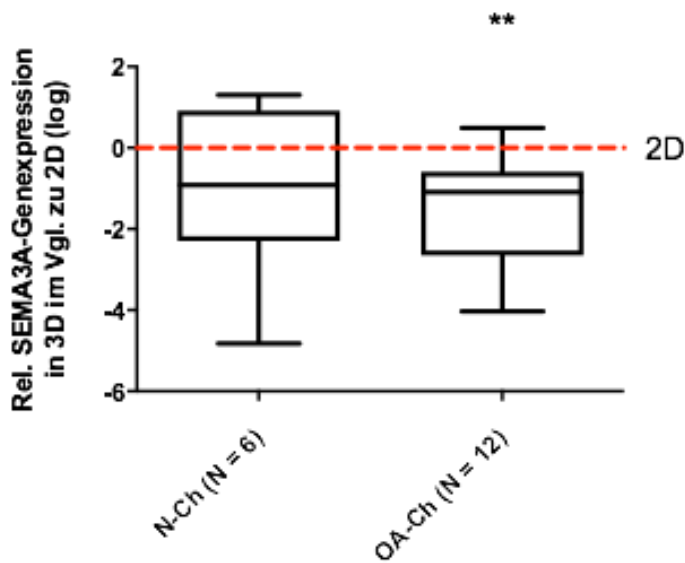


Abbildung 19.

Vergleich der Genexpression von Sema3A zwischen Monolayer (2D)- und Fibringel (3D)-Kultur mittels Mann-Whitney-Test. Die rote Linie ( $x = 0$ ) entspricht den als Kalibrator verwendeten Werten von Chondrozyten aus 2D-Kultur. Relativ dazu werden die Werte von Chondrozyten aus 3D-Kultur aufgetragen.

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

### 3.1.2 Genexpression und Proteinproduktion von NRP1

Analog zu den Versuchen zu SEMA3A wurde auch die Gen- und Proteinexpression des Rezeptors NRP1 analysiert, um auch hier einen Vergleich zwischen Chondrozyten von Personen mit und ohne Gonarthrose ziehen zu können. In immunhistochemischen Färbungen zeigten die eingesetzten Antikörper für NRP1 ein zu unspezifisches Bindungsverhalten, um auswertbare Resultate zu erhalten, sodass hierfür keine Ergebnisse vorliegen. Nachdem der zuvor beim Western Blot eingesetzte Antikörper zeitlich abgelaufen und nicht mehr erhältlich war, gelang es nicht, einen neuen Antikörper zu etablieren.

#### 3.1.2.1 Genexpression von NRP1 im 2D-Modell

Die Genexpression von NRP1 in Chondrozyten von Personen mit und ohne Gonarthrose wurde miteinander verglichen, nachdem alle Zellen unter gleichen Bedingungen als Monolayer bis Passage 1 kultiviert worden waren. OA-Ch zeigten verglichen mit N-Ch eine vermehrte Expression von NRP1 (Abb. 20).



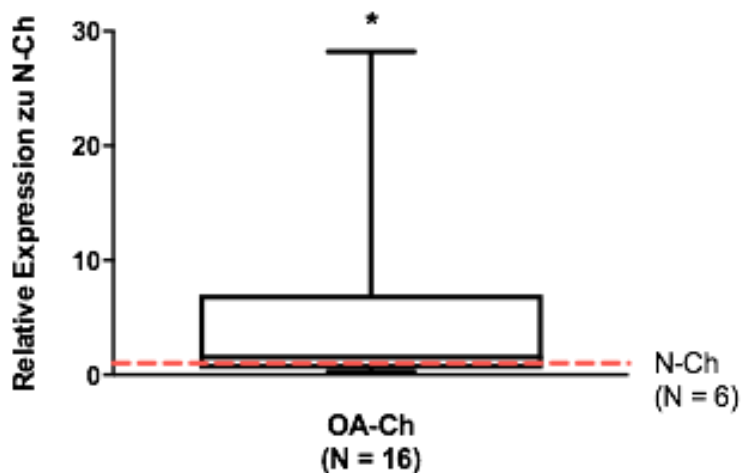


Abbildung 20. Genexpression von NRP1 in OA-Ch verglichen mit N-Ch (Passage 1, Monolayer-Kultur). Die beiden Datensätze der N-Ch-Donoren und der OA-Patienten wurden mittels Mann-Whitney-Test miteinander verglichen.

### 3.1.2.2 Genexpression von NRP1 im 3D-Modell

Da in unterschiedlichen Kultursystemen verschiedene Wachstumsbedingungen gegeben sind, wurden die Chondrozyten zusätzlich zum 2D-Modell auch in einem 3D-Modell in Fibringel kultiviert. Hierbei ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Genexpression von NRP1 zwischen OA-Ch und N-Ch feststellen (Abb. 21).

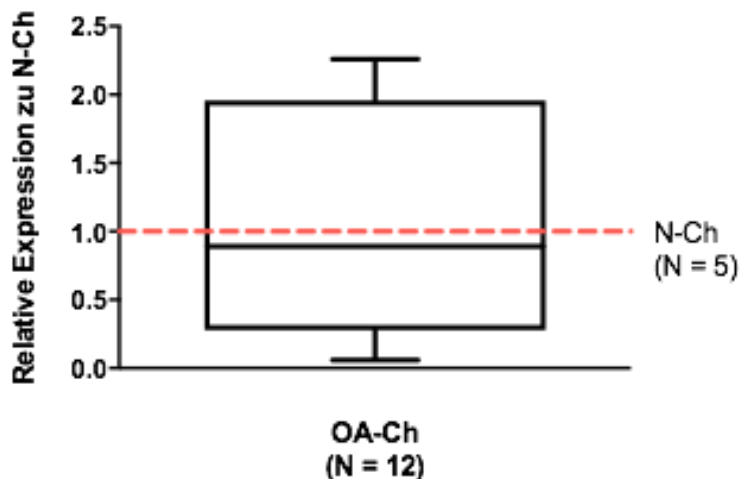
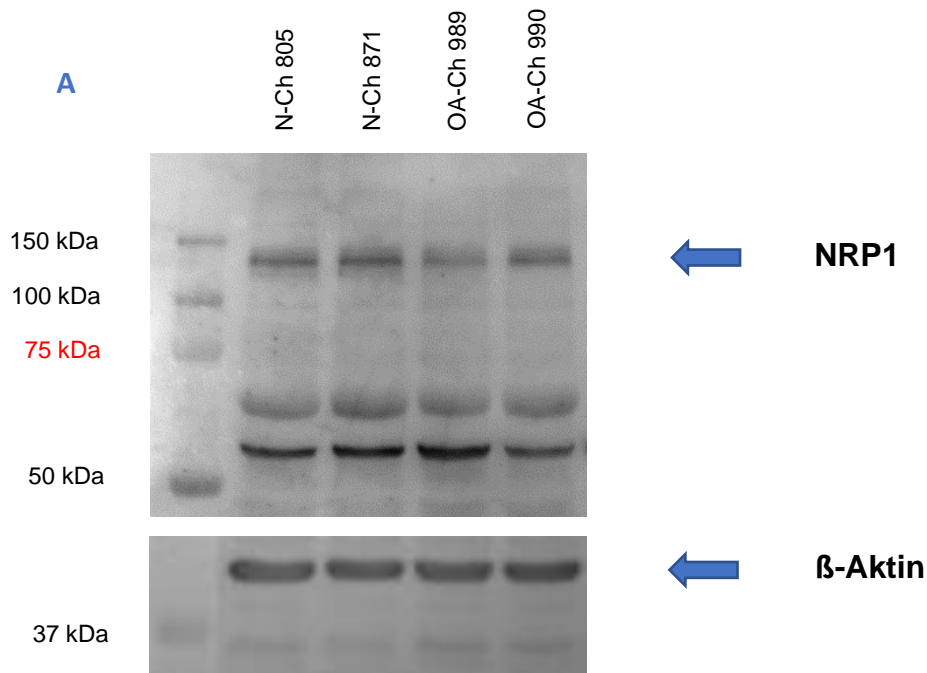


Abbildung 21. Genexpression von NRP1 in OA-Ch verglichen mit N-Ch (Passage 1, anschließend Fibringel-Kultur für 7 Tage). Die beiden Datensätze der N-Ch-Donoren und der OA-Patienten wurden mittels Mann-Whitney-Test miteinander verglichen.

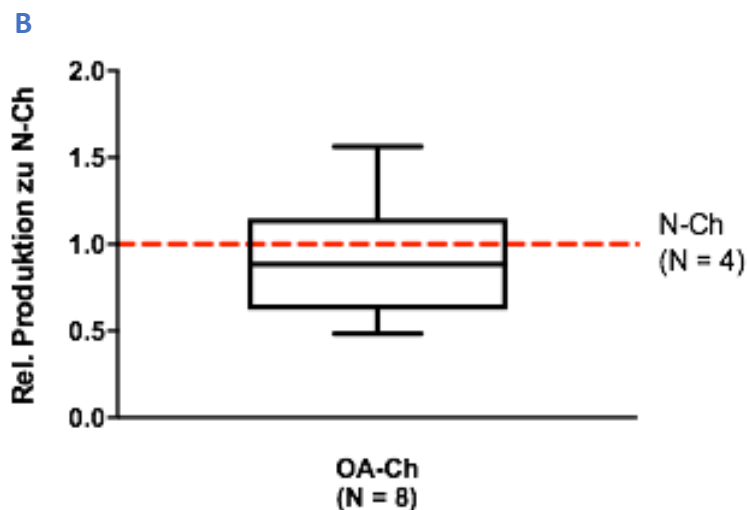
### 3.1.2.3 Proteinproduktion von NRP1

Um nicht nur die Genexpression von NRP1, sondern auch die Proteinbiosynthese in N-Ch und OA-Ch vergleichen zu können, wurde diese mittels Western Blot analysiert (Abb. 22A). Die Zellen wurden dafür zwei Tage als Monolayer kultiviert.



**Abbildung 22A.** Western Blot für NRP1 mit Proteinlysaten von OA-Ch und N-Ch aus 2D-Kultur. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin (42 kDa) benutzt (vgl. Abb. 13a). N (N-Ch) = 4, N (OA-Ch) = 8, gezeigt wird ein exemplarischer WB.

In der densitometrischen Auswertung der Western-Blots mit Hilfe von PhotoShop CS6 zeigte sich kein Unterschied bezüglich der NRP1-Synthese zwischen OA-Ch und N-Ch (Abb. 22B).



**Abbildung 22B.**

Proteinproduktion von NRP1 von OA-Ch verglichen mit N-Ch in 2D-Kultur nach einer Belichtungszeit von 5 Minuten mittels Mann-Whitney-Test.

### 3.1.2.4 Genexpression von NRP1 bei zunehmender Passage

Im Folgenden wurden Versuche analog zu denen bei Sema3A durchgeführt, um ein differenzierteres Bild der Expression von NRP1 zu erhalten. Um Rückschlüsse auf den

Einfluss der Passage ziehen zu können, wurde die Genexpression von NRP1 von Passage 0 bis Passage 3 bei OA-Ch analysiert. Eine Analyse der Genexpression von N-Ch war aufgrund der zu geringen Anzahl an Probanden nicht möglich. Es zeigte sich von Passage 0 bis 3 keine signifikante Änderung in der Genexpression von NRP1 (Abb. 23).

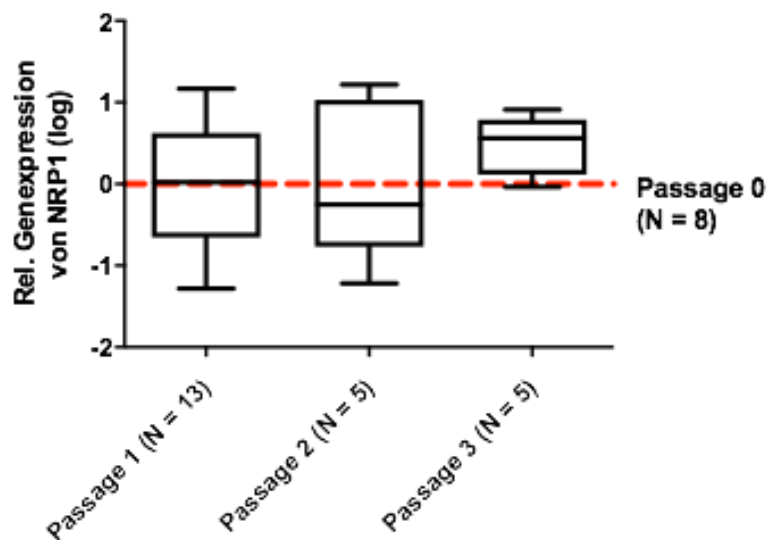


Abbildung 23. Vergleich der Genexpression von NRP1 zwischen Passage 0 und Passage 3 in OA-Ch mittels Mann-Whitney-Test. Die rote Linie ( $x = 0$ ) entspricht den als Kalibrator verwendeten Werten von Passage 0. Relativ dazu werden die Werte von Passage 1 bis 3 aufgetragen.

### 3.1.2.5 Genexpression von NRP1 nach Kultur im 2D- und 3D-Modell im Vergleich

Artikuläre Chondrozyten von Personen mit und ohne Gonarthrose wurden sowohl als Monolayer wie auch im Fibringel kultiviert. Dazu wurden Chondrozyten im Monolayer (2D) bis Passage 1 kultiviert, wobei ein Teil der Zellen anschließend entnommen und für 7 Tage im Fibringel kultiviert wurde (3D).

Um eine Vorstellung vom Einfluss der beiden Kultivierungssysteme auf die Genexpression von NRP1 zu bekommen, wurden Chondrozyten aus 2D- und 3D-Kultur in dieser Hinsicht miteinander verglichen. Dabei zeigte sich bei OA-Ch nach der Kultur in Fibringelen die Genexpression von NRP1 im Vergleich zur Monolayerkultur verringert. Bei N-Ch trat dieser Effekt nicht zutage (Abb. 24).

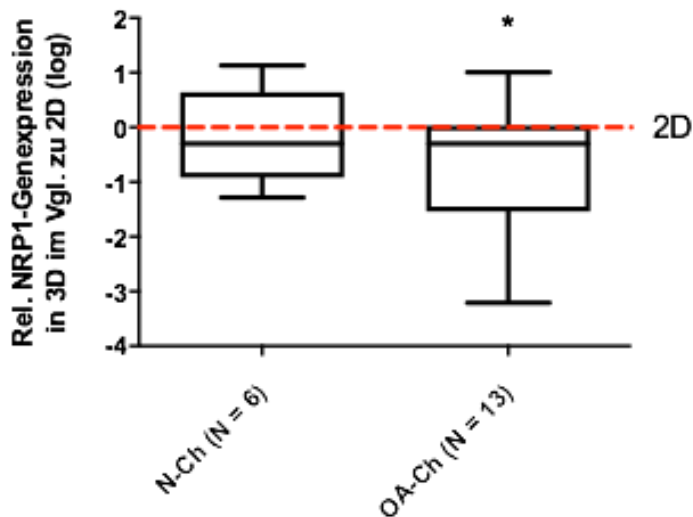


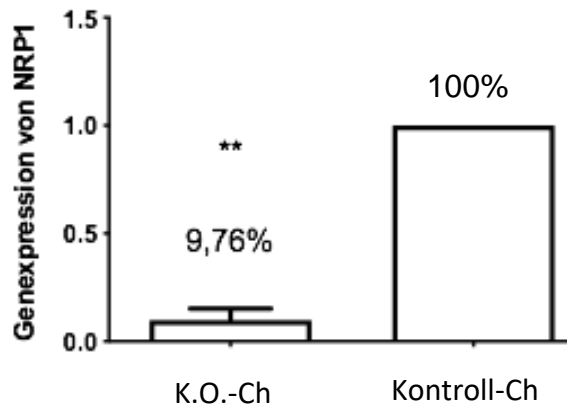
Abbildung 24. Vergleich der Genexpression von NRP1 zwischen Monolayer (2D)- und Fibringel (3D)-Kultur mittels Mann-Whitney-Test. Die rote Linie ( $x = 0$ ) entspricht den als Kalibrator verwendeten Werten von Chondrozyten aus 2D-Kultur. Relativ dazu werden die Werte von Chondrozyten aus 3D-Kultur aufgetragen. \*  $p < 0,05$ .

### 3.2 Effekte der Inhibition von NRP1 auf die Biologie von Chondrozyten von Gonarthrosepatienten

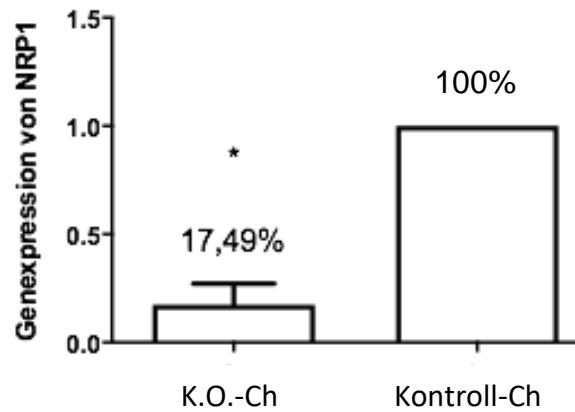
Um die Wirkung von Sema3A bzw. NRP1 auf die Physiologie von Chondrozyten von Gonarthrosepatienten untersuchen zu können, erfolgte ein transienter Knockdown von NRP1, dem Rezeptor für Sema3A, mithilfe von siRNA (small interfering RNA), sodass Sema3A mangels einer spezifischen Rezeptorbindungsstelle nicht mehr an die OA-Ch binden konnte. Für diese Experimente fanden lediglich humane artikuläre Chondrozyten Verwendung, welche aus dem Knieknorpel von Patienten mit Gonarthrose isoliert worden waren.

#### 3.2.1 Knockdown von NRP1

Die Herunterregulierung der Genexpression von NRP1 in OA-Ch in 2D- und 3D-Kultur wurde mittels qPCR überprüft. Dazu wurden OA-Ch als Monolayer kultiviert und für 24 Stunden mit siRNA-Transfektionsmedium inkubiert. Nach weiteren 2 Tagen in 2D-Kultur wurde ein Teil dieser Zellen geerntet, ein anderer Teil für weitere 7 Tage in Fibringel kultiviert (vgl. 3.1.2). Bei Zellen in 2D-Kultur zeigte sich im Durchschnitt ein Knockdown von 90% (Abb. 25). Chondrozyten aus 3D-Kultur wiesen im Mittel eine Herunterregulierung von über 80% auf (Abb. 26).

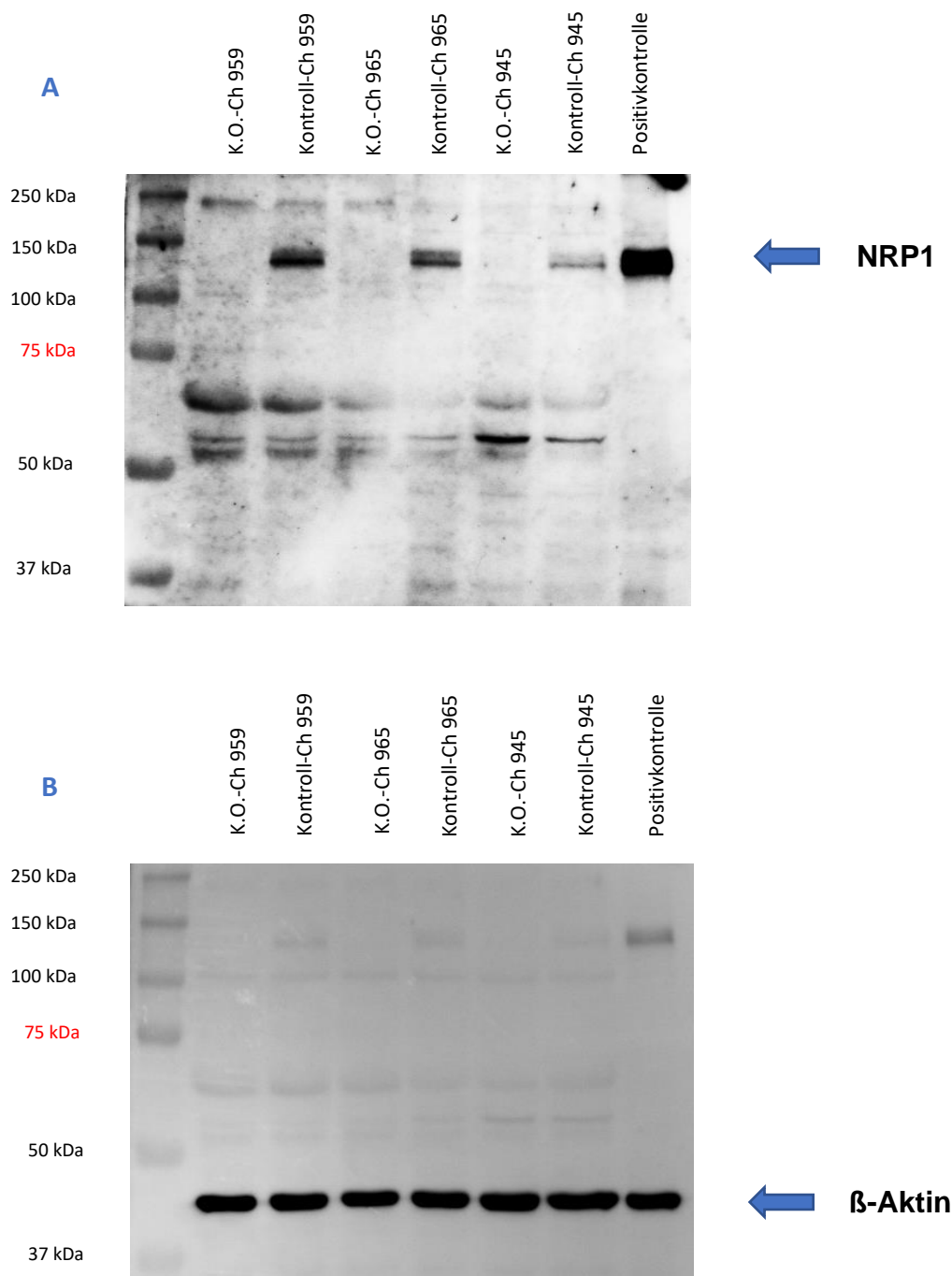


**Abbildung 25. 2D-Kultur** von OA-Ch mit NRP1-Knockdown durch siRNA (K.O.-Ch) verglichen mit OA-Ch ohne NRP1-Knockdown mit non target-siRNA (Kontroll-Ch), N = 10, \*\* p < 0,01.



**Abbildung 26. 3D-Kultur** von OA-Ch mit NRP1-Knockdown durch siRNA (K.O.-Ch) verglichen mit OA-Ch ohne NRP1-Knockdown mit non target-siRNA (Kontroll-Ch), N = 6, \* p < 0,05.

Im Western Blot wurden Proteinlysate von OA-Ch aus 2D-Kultur analysiert. Nach Transfektion mit einer NRP1-spezifischen siRNA konnte in den Knockdown-Zellen kein NRP1 mehr auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abb. 27).



**Abbildung 27.** Western Blot mit Proteinlysaten von K.O.-Ch und Kontroll-Ch aus 2D-Kultur. **A.** Für NRP1 zeigt sich ein vollständiger Knockdown nach Transfektion mit NRP1-spezifischer siRNA. Als Positivkontrolle wurden Lysate der humanen Glioblastom-Zelllinie A-172 verwendet, die bekannterweise NRP1 exprimiert. **B.** Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin. N = 4, gezeigt wird N = 3.

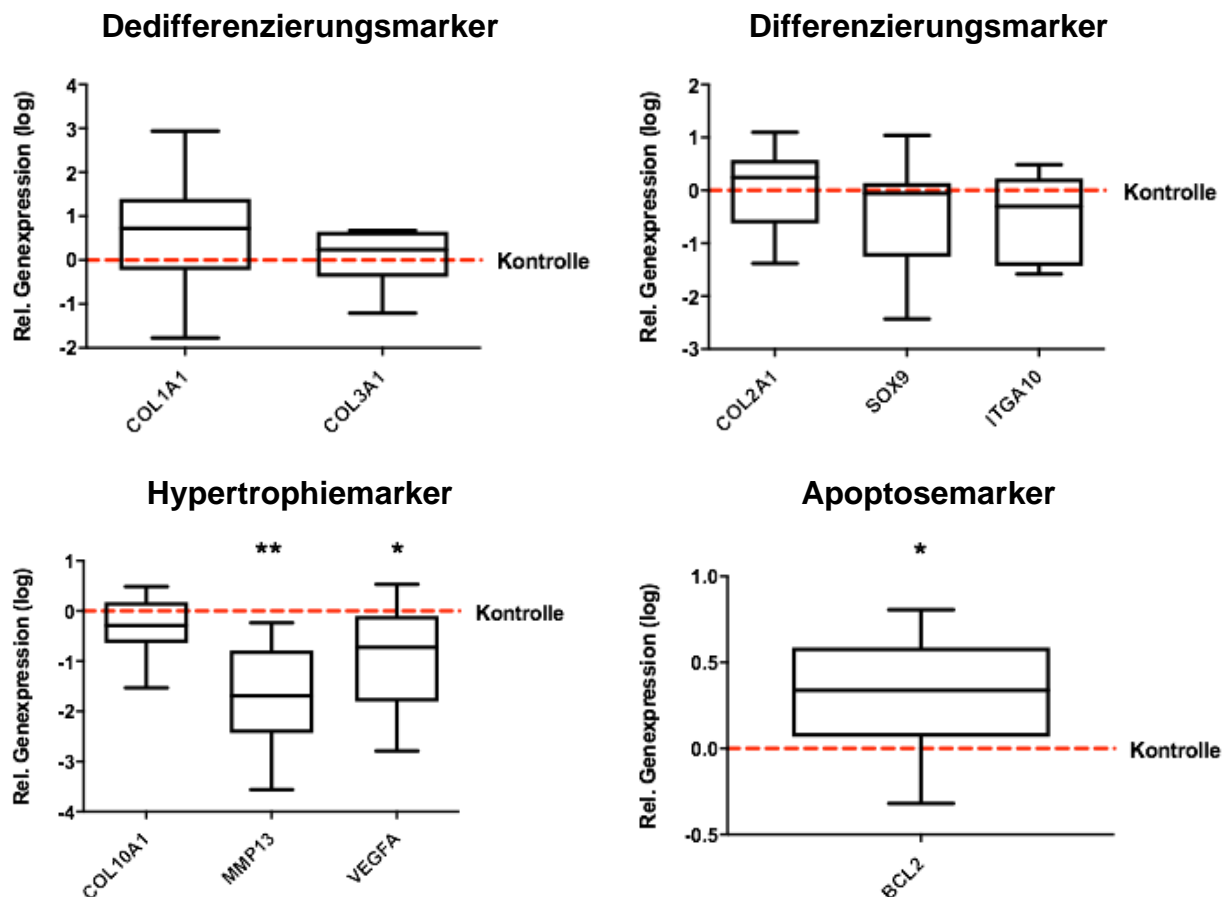
### 3.2.2 Auswirkungen der NRP1-Inhibition auf OA-Ch im 2D-Kultursystem

Nach erfolgreichem Knockdown wurden die Zellen mittels verschiedener Experimente auf Unterschiede in ihrer Biologie analysiert, um so den Effekt von NRP1 und Sema3A

auf artikuläre OA-Ch bestimmen zu können. Als Methoden wurden hierfür qPCR, Western Blot sowie Assays für Proliferation, Adhäsion und Apoptose verwendet. Chondrozyten mit runterreguliertem NRP1 zeigen dabei eine geringere Expression von bestimmten Hypertrophie markern, weniger Proliferation und eine schnellere Adhäsion.

### 3.2.2.1 Genexpression

Nach Inhibition von NRP1 zeigte sich für MMP13 ( $p < 0,01$ ) und VEGFA ( $p < 0,05$ ) eine signifikante Verringerung der Genexpression, wobei es sich in beiden Fällen um Hypertrophie marker handelt. Zudem wurde der Apoptose marker BCL2 verstärkt exprimiert. Für die Genexpression von Kollagen X als weiterer Hypertrophie marker, Kollagen I und III als Dedifferenzierungs-, Kollagen II, SOX9 und ITGA10 als Differenzierungsmarker zeigen sich keine Unterschiede in ihrer Expression (Abb.28).



**Abbildung 28.** Relative Genexpression verschiedener Markergene in OA-Ch, kultiviert in 2D-Monolayer, nachdem zuvor ein siRNA-induzierter NRP1-Knockdown in den Zellen generiert worden war. Die Expression der verschiedenen Gene in K.O.-Ch wurde relativ zur Expression der Kontroll-Ch (Kontrolle) angegeben. Dazu wurden die Werte der Kontroll-Ch auf  $x = 0$  gesetzt (rote Linie) und die Werte der K.O.-Ch als „log fold change“ dazu aufgetragen.  $N = 10$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ .

### 3.2.2.2 Proteinexpression

Nachdem sich bei der Genexpression ein deutlicher Unterschied zwischen NRP1-Knockdown- und Nicht-Knockdown-Zellen bezüglich MMP13 gezeigt hatte, wurde deren Expression auf Proteinebene mittels der Western Blot-Methode analysiert (Abb. 29A). Dabei zeigt sich eine verringerte Expression von MMP13 ( $p < 0,05$ ) nach Knockdown von NRP1 (Abb. 29B). Die in Abb. 29B dargestellte signifikante Änderung des MMP13-Proteinlevels ergibt sich aus der Untersuchung und Zusammenfassung von 6 verschiedenen OA-Ch, bei denen in zwei Fällen ein sehr deutlicher Unterschied bzgl. der MMP13-Expression nach NRP1-Knockdown sichtbar war (Patient 554 und 991), bei den anderen vier OA-Ch dagegen nur eine relativ schwache Veränderung zu detektieren war (Abb. 29A).

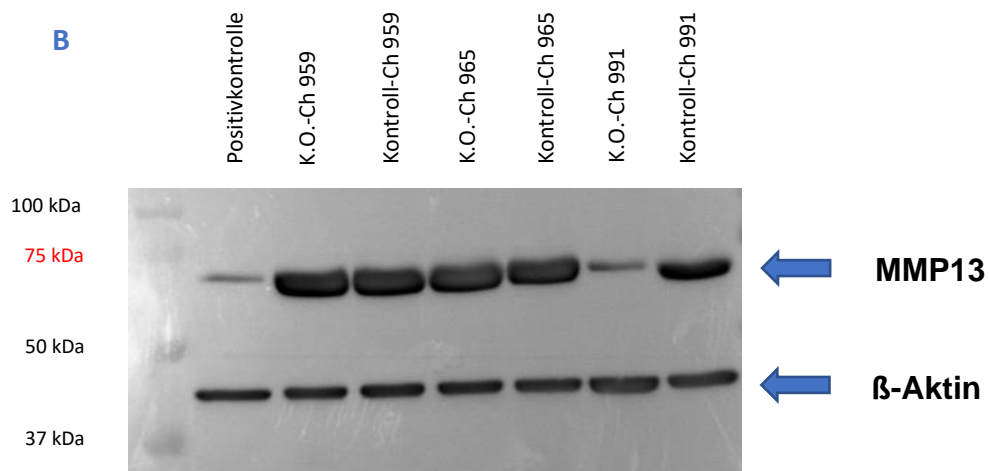
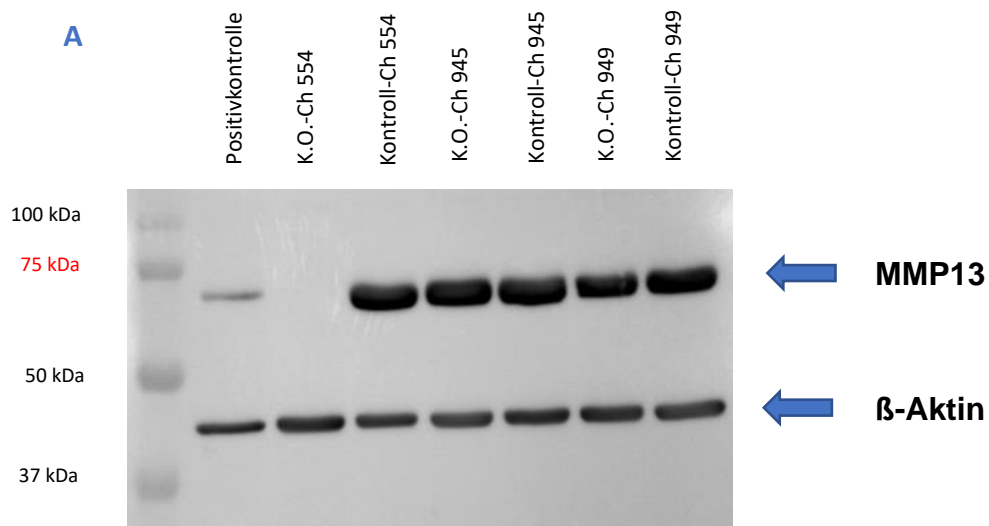




Abbildung 29A. Western Blot für MMP13 mit Proteinlysaten von K.O.-Ch und Kontroll-Ch aus 2D-Kultur. Als Positivkontrolle dienten Chondrozyten, die mit Vitamin D3 für 24 Stunden in einer Konzentration von  $10^{-7}$  stimuliert worden waren; als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin benutzt. Der obere Pfeil kennzeichnet die MMP13-Bande bei 60 kDa, der untere die  $\beta$ -Aktin-Bande bei 42 kDa. N = 6.

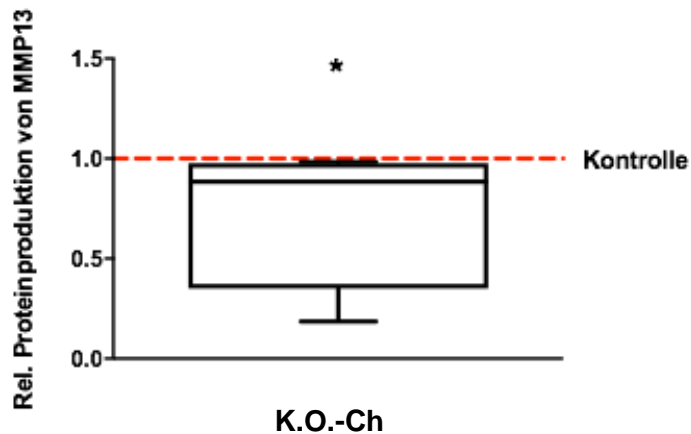


Abbildung 29B. Die Proteinexpression von MMP13 ist in K.O.-Ch im Vergleich zu Kontroll-Ch (Kontrolle) in 2D-Kultur erniedrigt. Nach einer Belichtungszeit von 10 Minuten wurde durch densitometrische Auswertung der Western Blot-Signale das Verhältnis von MMP13 in K. O.-Ch zu Kontroll-Ch bestimmt. N = 6, \*  $p < 0,05$ .

### 3.2.2.3 Proliferation, Apoptose und Adhäsion

#### a) Proliferation

Die Proliferation der Chondrozyten wurde mithilfe eines BrdU-Assays bestimmt, wobei die Menge an eingebautem BrdU linear mit der Proliferationsaktivität der Zellen korreliert. Bei K.O.-Ch zeigte sich die Proliferation im Vergleich zu den Kontroll-Ch signifikant verringert (Abb. 30).

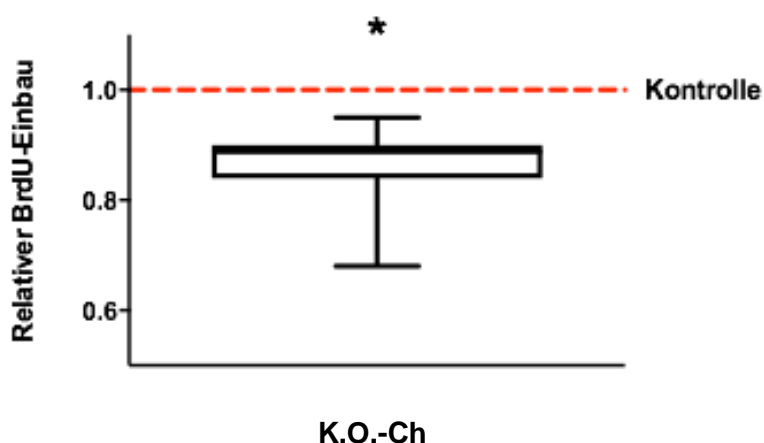


Abbildung 30.

Die Proliferation der K.O.-Ch wurde relativ zu derjenigen der Kontroll-Ch (Kontrolle) angegeben.

N = 7; \*  $p < 0,05$ .

### b) Apoptose

Die Aktivität der Caspasen 3 und 7 wurde mithilfe eines Caspase-Assays ermittelt und zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Es zeigte sich zu keinem Zeitpunkt der Messung ein Unterschied der apoptotischen Aktivität in den NRP1-Knockdown-Zellen verglichen mit den Kontroll-Zellen (Abb. 31).

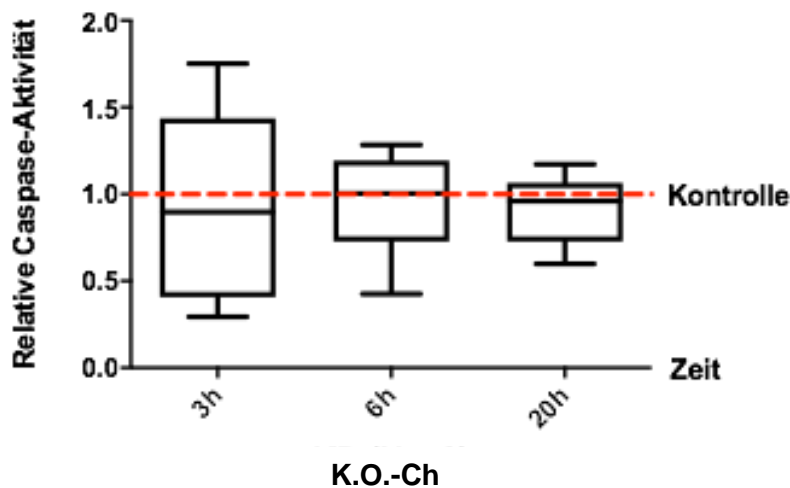


Abbildung 31. Die Caspaseaktivität der K.O.-Ch wurde relativ zu derjenigen der Kontroll-Ch (Kontrolle) angegeben. Die Messung der Caspaseaktivität erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe des Caspase-Substrats. N = 8.

### c) Adhäsions- und Ausbreitungsfähigkeit

Die Adhäsionsfähigkeit der Chondrozyten wurde anhand des Kristallviolett-Assays analysiert. Dazu wurden die adhärenierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Aussaat mit Kristallviolett quantifiziert. Nach 1 und 2 Stunden zeigte sich eine signifikant erhöhte Adhäsion und Ausbreitung der K.O.-Ch im Vergleich zu den Kontroll-Ch (Abb. 32).

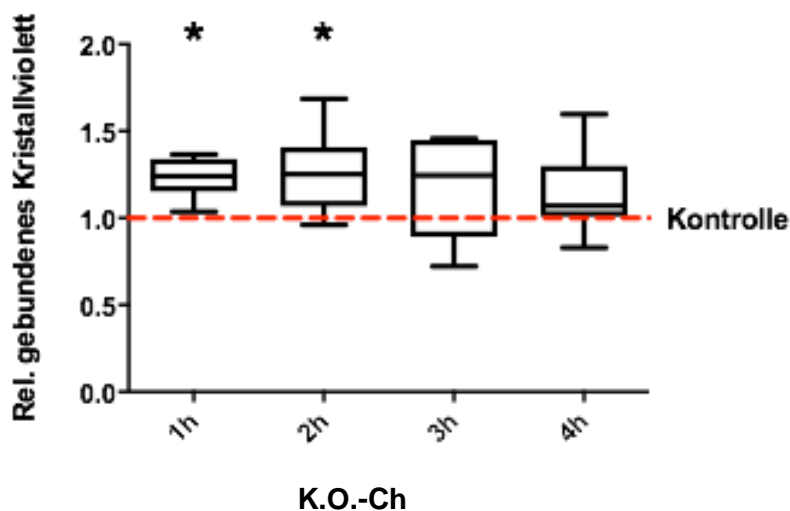
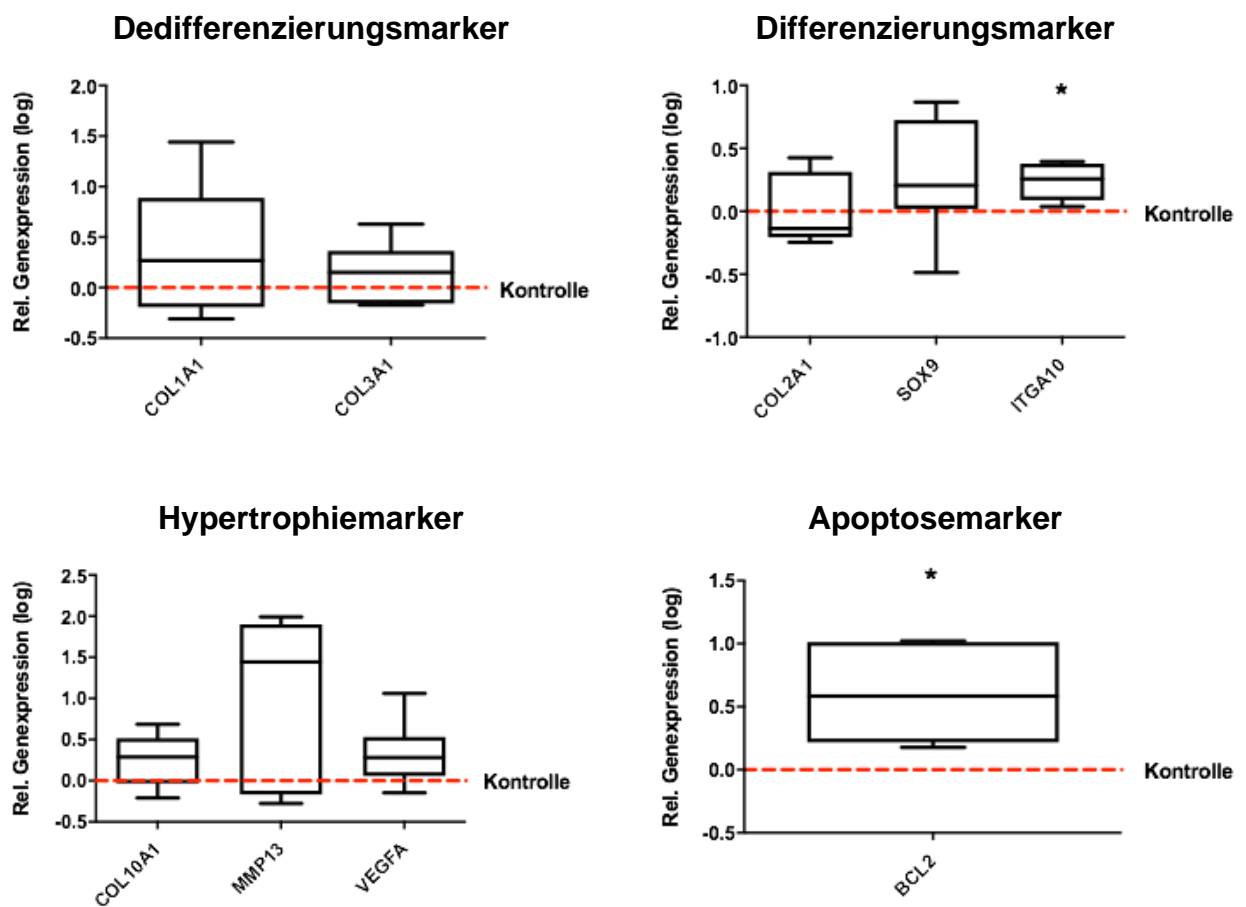


Abbildung 32. Die Adhäsion der K.O.-Ch wurde relativ zu derjenigen der Kontroll-Ch (Kontrolle) angegeben. Die Messung der Adhäsion erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aussaat der Zellen. N = 7 (1h), N = 8 (2h, 3h, 4h); \*  $p < 0,05$ .

### 3.2.3 Genexpression nach NRP1-Inhibition im 3D-Kultursystem

Nach siRNA-induziertem NRP1-Knockdown in 2D-Kultur wurden alle Zellen für 7 Tage in Fibringelen kultiviert. Nach der 3D-Kultur in Fibringelen zeigt sich bei der Genexpression des Adhäsionsmoleküls ITGA10 ( $p < 0,05$ ) und des Anti-Apoptose-Gens BCL2 ( $p < 0,05$ ) eine Induktion in der Genexpression. Für die übrigen Differenzierungsmarker Kollagen II und SOX9, Kollagen I und III als Dedifferenzierungs- sowie Kollagen X, MMP13 und VEGFA als Hypertrophiemarker lassen sich keine Unterschiede in ihrer Genexpression nachweisen (Abb. 33).



**Abbildung 33.** Relative Genexpression verschiedener Markergene in OA-Ch, kultiviert in Fibringelen für 7 Tage (3D-Kultur), nachdem zuvor ein siRNA-induzierter NRP1-Knockdown in den Zellen generiert worden war (in 2D-Kultur). Die Expression der verschiedenen Gene in K.O.-Ch wurde relativ zur Expression der Kontroll-Ch (Kontrolle) angegeben. Dazu wurden die Werte der Kontroll-Ch auf  $x = 0$  gesetzt (rote Linie) und die Werte der K.O.-Ch als „log fold change“ dazu aufgetragen.  $N = 6$ ; \*  $p < 0,05$ .

## 4 Diskussion

### 4.1 Sema3A- und NRP1-Expression in arthrotisch verändertem Knorpel

Wir konnten bestätigen, dass das Level an SEMA3A-mRNA in Chondrozyten von OA-Patienten verglichen mit Probanden ohne Arthrose signifikant erhöht ist (Okubo et al. 2011). In immunhistochemischen Analysen von Okubo et al. hatte Sema3A in Schnitten von arthrotisch verändertem Knorpel ein stärkeres Signal als in normalem Knorpelgewebe gezeigt, wobei sich insbesondere Chondrozyten in der obersten Knorpelschicht anfärben ließen. In den Versuchen zur vorliegenden Arbeit ließ sich zwar kein deutlicher Unterschied in der Intensität der Färbung zwischen OA- und Nicht-OA-Knorpel erkennen, die Verteilung der Sema3A-positiven Zellen im Knorpelgewebe zeigte allerdings ebenfalls in unserer histologischen Auswertung ein ähnliches Muster. So konnte Sema3A insbesondere in der oberflächlichen Schicht nachgewiesen werden, in den tieferen Schichten jedoch zeigte sich nur ein geringes bzw. kein Signal. Der Unterschied der immunhistologischen Ergebnisse zu Sema3A zwischen unseren Versuchen und den von Okubo et al. liegt vermutlich in dem unterschiedlichen Pool an Patientenmaterial begründet. So verwendeten Okubo et al. z. B. als Kontrolle ausschließlich Knorpelgewebe aus Hüftgelenken nach Femurkopffrakturen bei älteren Patienten.

Laut Okubo et al. korrelierte die Expression von Sema3A sowohl mit dem Grad an *chondrocyte cloning* wie auch mit dem Mankin Score, welcher Knorpel anhand histopathologischer Kriterien nach dem Schweregrad der Schädigung durch Arthrose einteilt (Pauli et al. 2012). Da bei den Versuchen zu dieser Arbeit eine Einteilung der histologischen Präparate der OA-Patienten nach dem Mankin Score nicht vorgenommen wurde, war es auch nicht möglich, weniger stark von Arthrose geschädigte Proben auszuschließen. Zudem wurde im Gegensatz zu Okubo et al., welche ihre Versuche mit Knorpel von Knie- und Hüftgelenken durchführten, ausschließlich mit Kniegelenksknorpel gearbeitet. Nichtsdestotrotz zeigte unsere Analyse mittels qPCR tendenziell ebenfalls eine vermehrte Expression von mRNA für Sema3A in Knorpel von OA-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden. Diese Beobachtung ließ sich mithilfe von Western Blot-Analysen bestätigen, welche eine signifikant vermehrte Proteinbiosynthese von Sema3A in OA-Chondrozyten verglichen mit Nicht-OA-Chondrozyten zeigten.

NRP1, welcher als Rezeptor für VEGF und Sema3A fungiert, zeigte sich bei Okubo et al. in immunhistochemischen Untersuchungen in OA-Knorpel von Hüfte und Knie

verglichen mit Nicht-OA-Knorpel aus der Hüfte ebenfalls überexprimiert. Diese Beobachtung deckt sich mit den hier durchgeführten qPCR-Analysen, welche eine signifikant vermehrte Expression der mRNA für NRP1 nachgewiesen haben. Auf Proteinebene ließ sich mittels Western Blot kein Unterschied in der Expression nachweisen.

Zusammengefasst bekräftigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Beobachtungen von Okubo et al., dass sowohl der Sema3A wie auch sein Rezeptor NRP1 in Knorpel von Arthrosepatienten verstärkt exprimiert werden. Das könnte bedeuten, dass dadurch ein Zusammenhang zwischen einer arthrotisch veränderten und proinflammatorischen Umgebung mit einer veränderten Chondrozytenbiologie hergestellt wird bzw. die vermehrte Expression von Sema3A und NRP1 zur Progression von OA beiträgt.

#### **4.2 Einfluss der Passagenanzahl und des Kultursystems auf die Genexpression von SEMA3A und NRP1**

In den Versuchen zu dieser Arbeit zeigte sich, dass SEMA3A im Verlauf der Zellpassagen in immer geringerem Maße exprimiert wird, die Genexpression von SEMA3A bei zunehmender Passage der OA-Chondrozyten also abnimmt. Dies gilt nicht für die Expression von NRP1.

Um Rückschlüsse auf den Einfluss der Passage *in vitro* auf die Expression von SEMA3A und NRP1 ziehen zu können, wurde die Genexpression von Passage 0 bis Passage 3 in Chondrozyten von Gonarthrosepatienten analysiert. Insbesondere das Genexpressionsprofil von OA-Chondrozyten hängt stark von der Passagenanzahl ab, da OA-Chondrozyten ihre Genexpression nach der Isolierung aus Knorpelgewebe und Kultivierung im Monolayerkultursystem über mehrere Passagen stark ändern (Lin et al. 2008) und dabei dedifferenzieren (Benya et al. 1978; Huch et al. 2002). Unsere Ergebnisse verdeutlichen somit die Wichtigkeit, Chondrozyten in niedriger Passage für *in vitro*-Studien an SEMA3A zu verwenden und liefern einen Hinweis auf den Zusammenhang zwischen der SEMA3A-Expression und dem Dedifferenzierungsgrad. Bezüglich der Genexpression von NRP1 hingegen konnte von Passage 0 bis 3 keine signifikante Änderung beobachtet werden. Auch das Kultursystem zeigt Auswirkung auf die Expression von SEMA3A und NRP1. Artikuläre Chondrozyten von Personen mit und ohne Gonarthrose wurden sowohl als Monolayer, wie auch im Fibringel kultiviert. Dazu wurden Chondrozyten als Monolayer (2D-Kultursystem) bis Passage 1 kultiviert, wobei ein Teil davon anschließend entnommen und für 7 Tage in Fibringel kultiviert wurde (3D-Kultursystem). Die Genexpression von SEMA3A und NRP1 von

Chondrozyten aus 2D- und 3D-Kultur zeigte sich bei OA-Patienten nach der Kultur in Fibringel im Vergleich zur Monolayerkultur signifikant verringert. Bei Chondrozyten von nicht an OA erkrankten Personen ließ sich dieser Effekt nicht beobachten. Im Allgemeinen führt die Kultivierung von isolierten Chondrozyten in Monolayerkultur zu einer teilweisen Verschiebung des chondrogenen hin zu einem fibroblastären Phänotyp (Benya et al. 1978; Lin et al. 2006). Es wird versucht, diesem als Dedifferenzierung bezeichneten Phänomen mit verschiedenen Methoden entgegenzuwirken, die meistens mit 3D-Kultursystemen kombiniert werden, da sich der chondrogene Phänotyp im 2D-Kultursystem schlechter erhalten lässt. Beim Versuch, dedifferenzierte Chondrozyten in 2D- und 3D-Kultursystem erneut zu differenzieren, zeigen sich die 3D-Systeme den 2D-Systemen, welche zu einer vermehrten Induktion von Hypertrophie- und Mineralisierungsmarkern führen, überlegen (Caron et al. 2012).

OA-Chondrozyten sind verglichen mit Nicht-OA-Chondrozyten bereits zu einem gewissen Grad dedifferenziert (Sandell und Aigner 2001), die Kultivierung im 3D-System jedoch wirkt der Dedifferenzierung entgegen, bzw. unterstützt die erneute Differenzierung (Caron et al. 2012). Da die Kultivierung von OA-Chondrozyten im 3D-System im Vergleich zum 2D-System zu einer signifikant verringerten Expression von SEMA3A geführt hat, könnte auch dies darauf schließen lassen, dass SEMA3A vermehrt von dedifferenzierten Chondrozyten exprimiert wird. Nicht-OA-Chondrozyten hingegen sind im Vergleich zu OA-Chondrozyten weniger dedifferenziert, sodass die Kultur im 3D-System keine signifikanten Auswirkungen auf die Expression von SEMA3A zu besitzen scheint. Im Allgemeinen lässt sich insbesondere dann, wenn das SEMA3A-Level bereits erhöht war, von einer deutlichen Beeinflussbarkeit der SEMA3A-Expression durch Genexpressions-modulierende Prozesse wie Passagieren und Änderung des Kultursystems sprechen.

Nachdem die Genexpression von NRP1 im Gegensatz zu SEMA3A relativ stabil ist, scheint somit ein geringerer Zusammenhang zwischen der NRP1-Expression und Dedifferenzierungsprozessen zu bestehen. Ergebnisse, welche die Genexpression von Zellen betreffen, lassen sich jedoch nicht ohne weiteres auf die Proteinproduktion übertragen, da im Anschluss an die mRNA-Transkription verschiedenste Regulationsmechanismen wie posttranskriptionale, translationale und degradierende Prozesse die Proteinexpression beeinflussen (Vogel und Marcotte 2012), wobei neuere Studien ergeben haben, dass sich unter Berücksichtigung eines

genspezifischen RNA-Protein-Konversionsfaktors (RNA-to-protein conversion factor) die Anzahl an Proteinkopien relativ gut einschätzen lässt (Edfors et al. 2016). Insbesondere Rezeptoren unterliegen jedoch zusätzlichen Regulationsvorgängen wie Recycling etc. (Cendrowski et al. 2016). Es wäre also noch eine Analyse der Proteinmenge von NRP1 notwendig, um eine tatsächliche Regulation der Rezeptormenge durch das Kultursystem zu postulieren.

### **4.3 Auswirkungen des NRP1-Knockdowns auf die Biologie von OA-Chondrozyten**

#### **4.3.1 Apoptoseverhalten**

Unsere Daten demonstrieren, dass ein temporärer Knockdown von NRP1 keine Auswirkungen auf die Caspaseaktivität von OA-Chondrozyten hat, welche mit der Apoptoserate korreliert. Es zeigte sich, dass OA-Chondrozyten nach NRP1-Knockdown eine signifikant vermehrte Genexpression von BCL2 sowohl im 2D-Modell (27 % im Median) als auch im 3D-Modell (49 % im Median) aufweisen. Bcl-2 kann der Apoptose durch eine Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials entgegenwirken (Kowaltowski et al. 2002). Allerdings handelt es sich bei einer um 27 % im 2D-Modell bzw. um 49 % im 3D-Modell erhöhten Expression nur um eine geringfügige Änderung der Genexpression, welche vermutlich noch im physiologischen Bereich der BCL2-Expression liegt. Für eine genauere Beurteilung müsste somit wiederum die Proteinexpression ermittelt werden. Es wurde zusätzlich die Aktivität der Caspasen 3 und 7 mithilfe eines Caspase-Assays zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt. Dabei zeigte sich in keiner Messung ein Unterschied der apoptotischen Aktivität in den K.O.-Zellen verglichen mit den Kontroll-Zellen. Die Caspasen 3 und 7 sind spezifische Proteasen, die durch Umwelt- und Stressstimuli aktiviert werden und zu den sogenannten Effektorcaspasen zählen. Sie induzieren die Apoptose der Zelle, indem sie zelleigene Strukturproteine wie zum Beispiel das anti-apoptotische Bcl-2 spalten (Kirsch et al. 1999).

#### **4.3.2 Adhäsions- und Ausbreitungsfähigkeit**

Unsere Daten zeigen, dass der Knockdown von NRP1 die Adhäsions- und Ausbreitungsfähigkeit von OA-Chondrozyten erhöht und zu einer vermehrten Genexpression von ITGA10 führt. Im Umkehrschluss verringert NRP1 also die Genexpression von ITGA10 und setzt die Adhäsions- und Ausbreitungsfähigkeit von OA-Chondrozyten herab. Es ist denkbar, dass NRP1 auch die Migration von OA-Chondrozyten beeinflussen könnte, was hier allerdings nicht untersucht wurde.

Die Adhäsions- und Ausbreitungsfähigkeit der Chondrozyten wurde anhand des Kristallviolett-Assays analysiert, wobei das „*cell spreading*“ zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Aussaat mit Kristallviolett nachgewiesen und anschließend quantifiziert wurde. Nach 1 bzw. 2 Stunden zeigte sich eine signifikant erhöhte Adhäsion und Ausbreitung der K.O.-Chondrozyten im Vergleich zu den Kontroll-Chondrozyten. Zudem wurde ITGA10 im 3D-Modell nach NRP1-Knockdown vermehrt exprimiert. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass komplexe Zusammenhänge zwischen der Adhäsionsstärke und der Zellmigration bestehen, indem die Substratkonzentration, die Integrinexpression, die Organisation der Adhäsionskomplexe und die Bindungsaffinität von Integrinen an die extrazelluläre Matrix moduliert wurden (Huttenlocher 1996; DiMilla 1993; Palecek et al. 1997; Gupton und Waterman-Storer 2006). Bei der Migration vermitteln Integrine die dynamische Bildung von Adhäsionskontakten, welche sich abhängig von oben genannten Faktoren bilden und wieder auflösen (Huttenlocher und Horwitz 2011). Da NRP1 in OA-Chondrozyten eine erniedrigte Genexpression von ITGA10 bewirkt, könnte dies die Adhäsions- und Ausbreitungsfähigkeit der Zellen verringern.

ITGA10 ist jedoch nicht nur als Adhäsionsmolekül bekannt, sondern ist auch ein chondrogener Differenzierungsmarker (Hirsch et al. 1997; Kurczyk et al. 2017; Aszodi et al. 2003). 3D-Kultursysteme unterstützen den Erhalt des chondrogenen Phänotyps von Chondrozyten, wohingegen es bei einer Kultur in 2D eher zu einem Verlust von diesem kommt (Caron et al. 2012). Die vermehrte Expression von ITGA10 nach NRP1-Knockdown könnte somit auch auf das Kultursystem zurückzuführen sein, da sich ITGA10 lediglich in OA-Chondrozyten, die in Fibringelen kultiviert wurden, nicht jedoch nach Monolayer-Kultur erhöht zeigt.

Sema3A zählt zu den Faktoren, welche sowohl Integrine selbst (Kumanogoh und Kikutani 2013) wie auch die Integrinfunktion inhibieren (Serini et al. 2003). So setzt Sema3A in Tumorzellen die Ligandenbindungsaktivität von Integrinen herab, was über eine verringerte zelluläre Adhäsion zu einer verminderten Zellmigration führt (Gehler et al. 2017). Dies ist möglicherweise der Erklärungsansatz dafür, dass Sema3A die VEGF-induzierte Migration von OA-Chondrozyten im Rahmen des *chondrocyte cloning* inhibiert (Okubo et al. 2011). Die Vielseitigkeit der Sema3A-Funktion zeigt sich allerdings darin, dass Sema3A abhängig von einer großen Bandbreite an externen Faktoren wie dem gewebespezifischen Kontext sowohl pro- als auch anti-migratorische Wirkungen entfalten kann (Nasarre et al. 2014). Zudem ist der



Zusammenhang zwischen der Adhäsionsstärke und der Zellmigration komplex. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Adhäsionsfähigkeit von OA-Chondrozyten deuten darauf hin, dass NRP1 im gewebe- und krankheitsspezifischen Kontext die Adhäsionsfähigkeit Sema3A-vermittelt über eine veränderte Genexpression von ITGA10 verringern könnte. Diese Beeinflussung des Migrationsverhaltens von OA-Chondrozyten müsste noch anhand von Migrationsassays beurteilt werden.

#### **4.3.3 Katabole Prozesse**

In unseren Versuchen zeigte sich die Genexpression von MMP13 und VEGFA nach Inhibition von NRP1 signifikant verringert. Auch auf Proteinebene ließ sich für K.O.-Chondrozyten im Vergleich zu den Kontroll-Chondrozyten anhand der Western Blot-Methode ein signifikant verringertes Level von MMP13 nachweisen, wobei die Ergebnisse stark patientenabhängig waren. Es ist vorstellbar, dass NRP1 die Expression von MMP13 möglicherweise VEGFA-vermittelt steigert und dadurch katabole Prozesse im Verlauf der Arthrose fördert. Billingham et al. konnten zeigen, dass OA-Chondrozyten verschiedene MMPs synthetisieren, wobei insbesondere die Aktivitäten von MMP3 (Stromelysin), MMP8 (Kollagenase 2) und MMP13 (Kollagenase 3) im Vergleich mit Nicht-OA-Chondrozyten deutlich erhöht sind (Billinghurst et al. 1997; Mitchell et al. 1996). Die Freisetzung von Enzymen wie MMPs, darunter insbesondere MMP3 und MMP13 (Goldring 2000; Martel-Pelletier 1998; Moldovan et al. 1997) führt in Verbindung mit anderen katabolen Vorgängen (Goldring 1999) zum Abbau der Knorpelmatrix. MMP13 hat sich dabei als das Enzym herauskristallisiert, welches bei Arthrose hauptsächlich für den Abbau von Kollagen Typ II verantwortlich ist (Troeberg und Nagase 2012; Billingham et al. 1997) und dadurch das Kollagennetzwerk zerstört (Loeser et al. 2012). Durch diese perizelluläre Proteolyse fördert MMP13 die Migration von Zellen (Lu et al. 2010; Yeh et al. 2009).

Okubo et al. zeigten, dass NRP1 einen Beitrag zum *chondrocyte cloning* zu leisten scheint, indem es in OA-Knorpel die Migration von Chondrozyten fördert. Wie unsere Daten zeigen, stimuliert NRP1 die Expression von MMP13, wodurch es zum Abbau des Kollagennetzwerks und zur Zerstörung der Knorpelmatrix beitragen dürfte. Dabei könnte die vermehrte Expression von MMP13 zu einem gewissen Teil auf die Stimulation durch VEGFA zurückzuführen sein, welches in unseren Versuchen ebenfalls vermehrt exprimiert wird (Pufe et al. 2004a; Enomoto et al. 2002). Diese pathophysiologischen Veränderungen können durch die gesteigerte perizelluläre Fibrillenlyse zum einen zur Degradierung des Knorpelgewebes im Rahmen von

Arthrose beitragen und zum anderen die Migration von OA-Chondrozyten fördern. Ob durch den Knockdown von NRP1 die Migrationsaktivität von OA-Chondrozyten vermindert wird, müsste eigens durch Migrationsassays untersucht werden.

Hier ist anzumerken, dass diese Arbeit nicht zwischen den Wirkungen von Sema3A und VEGF zu differenzieren vermag. Für Sema3A ist als Rezeptor lediglich ein Komplex aus NRP1 und Plexin als Corezeptor beschrieben (Antipenko et al. 2003); für VEGF hingegen dienen, zusätzlich zu NRP1, VEGFR-1 und VEGFR-2 als Rezeptoren. Diese werden zwar nicht in normalem Knorpel exprimiert, finden sich jedoch in Knorpelgewebe von OA-Patienten (Duffy et al. 2013) an derselben Stelle wie Sema3A und NRP1 (Enomoto et al. 2002). Nachdem für die betreffenden Versuche lediglich OA-Chondrozyten Verwendung fanden, ist davon auszugehen, dass nach NRP1-Knockdown die Wirkung von Sema3A auf OA-Chondrozyten aufgehoben sein sollte. Allerdings wird durch den Knockdown von NRP1 auch zu einem Teil der Wirkmechanismus von VEGF blockiert (Lanahan et al. 2013), da NRP1 als Corezeptor von VEGFR2 in vielen Signaltransduktionswegen eine essentielle Rolle spielt (Herzog et al. 2011) und eine Inhibition von NRP1 weitreichende Konsequenzen auf die Wirkung von VEGF besitzt (Lanahan et al. 2013; Herzog et al. 2011; Guo und Vander Kooi 2015).

Okubo et al. differenzierten die Wirkung von Sema3A und VEGF zum einen, indem Chondrozyten mittels VEGF bzw. Sema3A stimuliert wurden. Zum anderen wurde die Wirkung von Sema3A mithilfe des Einsatzes eines selektiven Sema3A-Inhibitors (SM216298), welcher die Bindung von Sema3A an NRP1 blockiert, unterdrückt. Zudem wurde siRNA (silencing RNA) gegen Sema3A eingesetzt. Durch dieses Vorgehen konnten die Wirkungen von Sema3A und VEGF auf OA-Chondrozyten gut voneinander abgegrenzt werden. Der Vorteil der Methode der vorliegenden Arbeit besteht jedoch darin, dass nachvollzogen werden kann, welche Wirkung der Rezeptor NRP1 selbst in arthrotisch verändertem Knorpel auf die Biologie von OA-Chondrozyten ausübt; eine Differenzierung der sowohl agonistischen wie auch antagonistischen Wirkungen von Sema3A und VEGF ist dadurch nicht möglich.

Es wurden bereits VEGF-Spiegel im Kulturmedium von OA-Chondrozyten nachgewiesen, welche im Vergleich zu N-Chondrozyten um ein Vielfaches erhöht waren (Duffy et al. 2013). Diese Annahme lässt vermuten, dass hier ein Mechanismus vorliegt, welcher sich selbst verstärkt und das metabolische Gleichgewicht stört: Wenn pathophysiologisch aufgrund der Erkrankung an Arthrose bereits vermehrt VEGF

exprimiert wird und VEGF zudem über NRP1 die eigene Expression vermehrt induziert, so könnte diese positive Rückkopplung einen selbstverstärkenden Regelkreis induzieren. Dieser könnte dazu beitragen, die katabolen Prozesse, wie sie z. B. über MMP13 vermittelt werden, zu unterhalten. Die Blockade von NRP1 könnte diese Rückkopplung unterbrechen und würde somit einen Ansatzpunkt darstellen, um den katabolen Stoffwechsel in OA-Knorpel einzugrenzen.

#### **4.3.4 Hypertrophie**

Unsere Ergebnisse zeigen, dass NRP1 die Expression von MMP13 und VEGFA in OA-Chondrozyten verstärkt und dadurch zu einem hypertrophen Phänotyp beitragen könnte. Bei MMP13 und VEGFA handelt es sich um Hypertrophiemarker, die nach Knockdown von NRP1 vermindert exprimiert werden. Dies lässt schlussfolgern, dass NRP1 die Expression von MMP13 und VEGFA in arthrotisch verändertem Knorpel fördert.

MMP13 wird nicht nur bei klinisch manifester Arthrose vermehrt exprimiert, sondern bereits in der Initialphase (van der Kraan und van den Berg 2012). In dieser Initialphase kommt es zu Veränderungen, welche zu einem hypertrophen Phänotyp führen. Hypertrophe Chondrozyten exprimieren vermehrt MMP13 und VEGF (Dreier 2010; Goldring et al. 2006), wobei MMP13 ein etablierter Marker für das hypertrophische Stadium in der späten Differenzierungsphase der Chondrozyten im Verlauf der enchondralen Ossifikation ist (Dreier 2010; D'Angelo et al. 2000; Nurminskaya und Linsenmayer 1996). Die Hemmung von hypertrophen Veränderungen könnte somit ein therapeutisches Ziel sein, um ein Fortschreiten der Erkrankung aufzuhalten (van der Kraan und van den Berg 2012). Nichtsdestotrotz darf nicht außer Acht gelassen werden, dass MMP13 nicht nur im Rahmen der Hypertrophie, sondern gerade bei Arthrose auch durch alternative Vorgänge wie z.B. Entzündungsprozesse und mechanischen Stress induziert werden kann (Goldring et al. 2011; Loeser 2010). Zudem zeigte sich in den Versuchen zu dieser Arbeit die Expression des Hypertrophiemarkers Kollagen X nach NRP1-Knockdown unverändert. Außerdem wurden die Versuche mit Chondrozyten durchgeführt, die aus Knorpel im Endstadium von Arthrose entnommen worden waren, wobei die Degradierungsprozesse nicht synchron in allen Zellen eines Gelenks ablaufen, welches von Arthrose betroffen ist (van der Kraan und van den Berg 2012). Somit lässt sich bei den Änderungen der MMP13- und VEGFA-Expression nicht im Speziellen von einer vermehrten Hypertrophie im Initialstadium von Arthrose sprechen, sondern am ehesten ganz

allgemein von pathophysiologischen Änderungen, welche das Fortschreiten des Krankheitsprozesses befördern und durch NRP1 gefördert werden.

#### 4.3.5 Proliferationsaktivität

In den Versuchen zu dieser Arbeit stellte sich heraus, dass nach NRP1-Knockdown die Proliferation von OA-Chondrozyten signifikant gehemmt ist, sodass NRP1 über eine Steigerung der Chondrozytenproliferation in arthrotisch verändertem Knorpel eine wichtige Rolle beim *chondrocyte cloning* einnehmen könnte. Die Proliferation der Chondrozyten wurde mithilfe eines BrdU-Assays bestimmt, wobei die Menge an eingebautem BrdU linear mit der Proliferationsaktivität der Zellen korreliert. Die so gemessene Proliferationsaktivität zeigte sich bei K.O.-Chondrozyten im Vergleich zu den Kontroll-Chondrozyten signifikant verringert. Unsere Versuche zeigten zudem eine verminderte Expression von VEGFA in OA-Chondrozyten nach NRP1-Knockdown. Dies bedeutet, dass NRP1 in OA-Knorpel durch die Induktion von VEGFA möglicherweise eine vermehrte Proliferation bewirken könnte, da VEGFA als bekannter angiogenetischer Faktor zur Proliferation von Endothel- (Rousseau et al. 1997) und Tumorzellen (Perrot-Appianat und Di Benedetto 2012) beiträgt. In Endothelzellen erfolgt diese Stimulation zwingenderweise über die Bindung an NRP1 (Herzog et al. 2011).

Die molekularen Mechanismen, welche *chondrocyte cloning* aufrechterhalten, sind noch nicht vollständig geklärt (Okubo et al. 2011). Die Proliferation der Chondrozyten scheint jedenfalls einer der wesentlichen Mechanismen zu sein, der zur Clusterbildung der Chondrozyten führt, einem Charakteristikum in arthrotisch verändertem Knorpel. Bezüglich der Migrationsaktivität fanden Okubo et al. heraus, dass diese in OA-Chondrozyten durch VEGF verstärkt wird, was mit der Induktion verschiedener MMPs in direkten Zusammenhang gebracht wurde. Sema3A hingegen schien die VEGF-vermittelte Chondrozytenmigration zu hemmen, ohne Einfluss auf die Proliferationsaktivität der OA-Chondrozyten zu nehmen (Okubo et al. 2011). Sema3A und VEGF scheinen somit antagonistische Effekte auf die Migration von OA-Chondrozyten auszuüben. Da die Migrationsaktivität wesentlich durch die MMP-Expression, insbesondere die von MMP13, gesteigert wird (Lu et al. 2010; Yeh et al. 2009), und sich in den Versuchen zur vorliegenden Arbeit eine deutliche Verringerung der MMP13-Expression nach NRP1-Knockdown zeigte, lässt sich annehmen, dass NRP1 in arthrotisch verändertem Knorpel von Liganden aktiviert zu wird, welche

insgesamt eine vermehrte MMP13-Expression induzieren. Das erhöhte Level von MMP13 in OA-Chondrozyten wird durch VEGFA vermittelt (Pufe et al. 2004a; Enomoto et al. 2002). Somit lässt sich vermuten, dass diesbezüglich der Einfluss von VEGFA auf die Biologie der Chondrozyten denjenigen von Sema3A überwiegt. Wie in dieser Arbeit gezeigt, würde eine Blockade von NRP1 in arthrotischem Knorpel zu einer Verminderung der Proliferation und somit wahrscheinlich auch der Migration führen und dadurch dem Versuch der Chondrozyten, geschädigte Areale zu reparieren, entgegenwirken.

#### **4.4 Ausblick**

Die Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit hat gezeigt, dass weitere Versuche zur Beeinflussung der migratorischen Aktivität von OA-Chondrozyten durch NRP1 von Interesse sein könnten. So trägt VEGF nicht nur zur Proliferation, sondern auch zur NRP1-vermittelten Migration (Herzog et al. 2011) von Endothel- (Rousseau et al. 1997) und Tumorzellen bei (Perrot-Applanat und Di Benedetto 2012). Für OA-Chondrozyten existieren bezüglich der Wirkung auf die Migrationsaktivität gegensätzliche Beobachtungen: VEGF<sub>165</sub> stimuliert die Migration via VEGFR-2 (Enomoto et al. 2002), hat jedoch auf Chondrozyten aus gesundem Knorpelgewebe keine Auswirkungen (Mishima und Lotz 2008). Dieser Unterschied könnte darauf zurückzuführen sein, dass N-Chondrozyten weniger VEGF-Rezeptoren exprimieren als OA-Chondrozyten, in welchen die VEGF- und VEGFR-Expression die Defektheilung durch Migration von Chondrozyten befördern soll (Okubo et al. 2011). Dass NRP1 in OA-Chondrozyten die Genexpression von VEGF erhöht, deutet somit darauf hin, dass dadurch die Migration der OA-Chondrozyten unterstützt werden könnte. VEGF stimuliert in Chondrozyten zudem die Produktion von MMPs, insbesondere die von MMP13 (Pufe et al. 2004a; Enomoto et al. 2002). VEGF findet sich zwar auch in normalem Knorpelgewebe, aber nur Knorpelzellen von OA-Patienten exprimieren die VEGF-Rezeptoren VEGFR-1, VEGFR-2 und NRP1. Zum einen lässt sich aus unseren Versuchen also eine Stimulation von VEGFA und MMP13 durch NRP1 in arthrotisch verändertem Knorpel ableiten. Zum anderen könnte das höhere MMP13-Level auch auf die gesteigerte Expression von VEGFA zurückzuführen sein. Weitere Versuche mit VEGFA-spezifischen Antikörpern wären notwendig, um dies zu beweisen. So könnte untersucht werden, inwiefern sich eine Inhibierung von VEGFA auf die Expression von MMP13 auswirkt.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Expression von Semaphorin3A (Sema3A) und seines Rezeptors Neuropilin-1 (NRP1) sowie deren Einfluss auf artikuläre Chondrozyten bei Gonarthrose untersucht. Sema3A wie auch NRP1 werden in Knieknorpel von Arthrosepatienten im Vergleich zu Knieknorpel von Probanden ohne Arthrose verstärkt exprimiert. So weisen OA-Knorpelzellen verglichen mit Nicht-OA-Knorpelzellen erhöhte Level an NRP1- und Sema3A-mRNA sowie eine signifikant vermehrte Proteinbiosynthese von Sema3A auf. Sema3A wird im Gegensatz zu NRP1 mit zunehmender Passage der OA-Chondrozyten weniger exprimiert. Zudem zeigen OA-Chondrozyten nach Kultivierung im 3D-System im Vergleich zum 2D-System eine verringerte Expression von Sema3A und NRP1, bei Nicht-OA-Chondrozyten hat das Kultursystem keinen derartigen Einfluss. Sema3A könnte daher im Zusammenhang mit Dedifferenzierungsprozessen vermehrt exprimiert werden.

Nach dem transienten Knockdown von NRP1 zeigte sich, dass NRP1 keinen Einfluss auf das Apoptoseverhalten von OA-Chondrozyten hat, jedoch katabole Stoffwechselprozesse fördert. So stimuliert NRP1 die Expression von MMP13. Dadurch werden Vorgänge wie der Abbau der extrazellulären Matrix, im Speziellen des Kollagennetzwerks, die insbesondere über MMP13 vermittelt werden, unterhalten. Bei MMP13 und VEGFA handelt es sich zudem um Hypertrophiemarker, deren vermehrte Expression charakteristisch für das Initialstadium von Arthrose ist und dessen Entstehungsprozess fördert und unterhält.

Unsere Versuche beweisen des Weiteren, dass NRP1 die Adhäsionsfähigkeit von OA-Chondrozyten, möglicherweise über eine verringerte Expression von Integrinen, herabsetzt und die Proliferation der Chondrozyten anregt, wodurch es in arthrotisch verändertem Knorpel eine wichtige Rolle beim *chondrocyte cloning* einnehmen könnte. NRP1 wird im OA-Knorpel von Liganden aktiviert, welche insgesamt eine vermehrte MMP13-Expression induzieren. Eine Blockade von NRP1 in arthrotischem Knorpel würde zu einer Verminderung der Proliferation und möglicherweise auch der Migration führen und dadurch dem als *chondrocyte cloning* bezeichneten Versuch des Gelenkknorpels, geschädigte Areale zu reparieren, entgegenwirken. Zum anderen könnte eine solche Inhibition aber, insbesondere durch die verringerte Expression von MMP13, die katabolen Stoffwechselmechanismen eingrenzen, welche zum Abbau der Knorpelmatrix führen, und das Fortschreiten von Arthrose verhindern.

## 6 Literaturverzeichnis

Adams, R. H.; Betz, H.; Püschel, A. W. (1996): A novel class of murine semaphorins with homology to thrombospondin is differentially expressed during early embryogenesis. In: *Mechanisms of development* 57 (1), S. 33–45.

Aigner, Thomas; Kim, Hyun A.; Roach, Helmut I. (2004): Apoptosis in osteoarthritis. In: *Rheumatic diseases clinics of North America* 30 (3), 639-53, xi. DOI: 10.1016/j.rdc.2004.04.002.

Andriacchi, Thomas P.; Mündermann, Anne; Smith, R. Lane; Alexander, Eugene J.; Dyrby, Chris O.; Koo, Seungbum (2004): A framework for the in vivo pathomechanics of osteoarthritis at the knee. In: *Annals of biomedical engineering* 32 (3), S. 447–457.

Antipenko, Alexander; Himanen, Juha-Pekka; van Leyen, Klaus; Nardi-Dei, Vincenzo; Lesniak, Jacob; Barton, William A. et al. (2003): Structure of the Semaphorin-3A Receptor Binding Module. In: *Neuron* 39 (4), S. 589–598. DOI: 10.1016/S0896-6273(03)00502-6.

Aszodi, Attila; Hunziker, Ernst B.; Brakebusch, Cord; Fässler, Reinhard (2003): Beta1 integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis. In: *Genes & development* 17 (19), S. 2465–2479. DOI: 10.1101/gad.277003.

Bagci, T.; Wu, J. K.; Pfannl, R.; Ilag, L. L.; Jay, D. G. (2009): Autocrine semaphorin 3A signaling promotes glioblastoma dispersal. In: *Oncogene* 28 (40), S. 3537–3550. DOI: 10.1038/onc.2009.204.

Barbour, Kamil E.; Helmick, Charles G.; Boring, Michael; Brady, Teresa J. (2017): Vital Signs: Prevalence of Doctor-Diagnosed Arthritis and Arthritis-Attributable Activity Limitation - United States, 2013-2015. In: *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 66 (9), S. 246–253. DOI: 10.15585/mmwr.mm6609e1.

Benya, P. D.; Padilla, S. R.; Nimni, M. E. (1978): Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. In: *Cell* 15 (4), S. 1313–1321.

Billinghurst, R. C.; Dahlberg, L.; Ionescu, M.; Reiner, A.; Bourne, R.; Rorabeck, C. et al. (1997): Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. In: *The Journal of clinical investigation* 99 (7), S. 1534–1545. DOI: 10.1172/JCI119316.

Blagojevic, M.; Jinks, C.; Jeffery, A.; Jordan, K. P. (2010): Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. In: *Osteoarthritis and cartilage* 18 (1), S. 24–33. DOI: 10.1016/j.joca.2009.08.010.

Blanco, Francisco J.; Guitian, Ramn; Vzquez-Martul, Eduardo; Toro, Francisco J. de; Galdo, Fausto (1998): Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis: A possible pathway for osteoarthritis pathology. In: *Arthritis & Rheumatism* 41 (2), S. 284–289. DOI: 10.1002/1529-0131(199802)41:2<284::AID-ART12>3.0.CO;2-T.

Blaney Davidson, Esmeralda N.; Remst, Dennis F. G.; Vitters, Elly L.; van Beuningen, Henk M.; Blom, Arjen B.; Goumans, Marie-Jose et al. (2009): Increase in ALK1/ALK5 ratio as a cause for elevated MMP-13 expression in osteoarthritis in humans and mice. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182 (12), S. 7937–7945. DOI: 10.4049/jimmunol.0803991.

Bonnet, C. S.; Walsh, D. A. (2005): Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. In: *Rheumatology (Oxford, England)* 44 (1), S. 7–16. DOI: 10.1093/rheumatology/keh344.

Buckwalter, J. A.; Mankin, H. J. (1998): Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. In: *Instructional course lectures* 47, S. 477–486.

Camper, L.; Hellman, U.; Lundgren-Akerlund, E. (1998): Isolation, cloning, and sequence analysis of the integrin subunit alpha10, a beta1-associated collagen binding integrin expressed on chondrocytes. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (32), S. 20383–20389.

Caron, M. M. J.; Emans, P. J.; Coolen, M. M. E.; Voss, L.; Surtel, D. A. M.; Cremers, A. et al. (2012): Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes. Comparison of 2D and 3D cultures. In: *Osteoarthritis and cartilage* 20 (10), S. 1170–1178. DOI: 10.1016/j.joca.2012.06.016.

Cendrowski, Jaroslaw; Mamińska, Agnieszka; Miaczynska, Marta (2016): Endocytic regulation of cytokine receptor signaling. In: *Cytokine & Growth Factor Reviews* 32, S. 63–73. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2016.07.002.

Chaudhary, Belal; Khaled, Yazan S.; Ammori, Basil J.; Elkord, Eyad (2014): Neuropilin 1: function and therapeutic potential in cancer. In: *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 63 (2), S. 81–99. DOI: 10.1007/s00262-013-1500-0.



Chen, Hang; Chédotal, Alain; He, Zhigang; Goodman, Corey S.; Tessier-Lavigne, Marc (1997): Neuropilin-2, a Novel Member of the Neuropilin Family, Is a High Affinity Receptor for the Semaphorins Sema E and Sema IV but Not Sema III. In: *Neuron* 19 (3), S. 547–559. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80371-2.

Conde, Javier; Scotece, Morena; Gómez, Rodolfo; Lopez, Veronica; Gómez-Reino, Juan Jesus; Gualillo, Oreste (2011): Adipokines and osteoarthritis: novel molecules involved in the pathogenesis and progression of disease. In: *Arthritis* 2011, S. 203901. DOI: 10.1155/2011/203901.

Cox, Elisabeth A.; Huttenlocher, Anna (1998): Regulation of integrin-mediated adhesion during cell migration. In: *Microsc. Res. Tech.* 43 (5), S. 412–419. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0029(19981201)43:5<412::AID-JEMT7>3.0.CO;2-F.

Cox, Elisabeth A.; Sastry, Sarita K.; Huttenlocher, Anna (2001): Integrin-mediated Adhesion Regulates Cell Polarity and Membrane Protrusion through the Rho Family of GTPases. In: *Molecular Biology of the Cell* 12 (2), S. 265–277.

D'Angelo, M.; Yan, Z.; Nooreyazdan, M.; Pacifici, M.; Sarmant, D. S.; Billings, P. C.; Leboy, P. S. (2000): MMP-13 is induced during chondrocyte hypertrophy. In: *Journal of cellular biochemistry* 77 (4), S. 678–693.

Di Chen; Shen, Jie; Zhao, Weiwei; Wang, Tingyu; Han, Lin; Hamilton, John L.; Im, Hee-Jeong (2017): Osteoarthritis: toward a comprehensive understanding of pathological mechanism. In: *Bone research* 5, S. 16044. DOI: 10.1038/boneres.2016.44.

DiMilla, P. A. (1993): Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength. In: *J Cell Biol* 122 (3), S. 729–737. DOI: 10.1083/jcb.122.3.729.

Ding, Shan; Luo, Jian-hong; Yuan, Xiao-bing (2007): Semaphorin-3F attracts the growth cone of cerebellar granule cells through cGMP signaling pathway. In: *Biochemical and biophysical research communications* 356 (4), S. 857–863. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.03.073.

Dreier, Rita (2010): Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. In: *Arthritis research & therapy* 12 (5), S. 216. DOI: 10.1186/ar3117.

Duffy, Angela M.; Bouchier-Hayes, David J.; Harmey, Judith H. (2013): Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Role in Non-Endothelial Cells: Autocrine Signalling by VEGF: Landes Bioscience.

Edfors, Fredrik; Danielsson, Frida; Hallström, Björn M.; Käll, Lukas; Lundberg, Emma; Pontén, Fredrik et al. (2016): Gene-specific correlation of RNA and protein levels in human cells and tissues. In: *Molecular Systems Biology* 12 (10). DOI: 10.15252/msb.20167144.

Elmore, Susan (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. In: *Toxicologic pathology* 35 (4), S. 495–516. DOI: 10.1080/01926230701320337.

Enomoto, Hiroyuki; Inoki, Isao; Komiya, Koichiro; Shiomi, Takayuki; Ikeda, Eiji; Obata, Ken-ichi et al. (2002): Vascular Endothelial Growth Factor Isoforms and Their Receptors Are Expressed in Human Osteoarthritic Cartilage. In: *The American Journal of Pathology* 162 (1), S. 171–181.

Felson, D. T. (2013): Osteoarthritis as a disease of mechanics. In: *Osteoarthritis and cartilage* 21 (1), S. 10–15. DOI: 10.1016/j.joca.2012.09.012.

Felson, D. T.; Lawrence, R. C.; Dieppe, P. A.; Hirsch, R.; Helmick, C. G.; Jordan, J. M. et al. (2000): Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. In: *Annals of internal medicine* 133 (8), S. 635–646.

Fox, Sophia; Alice J.; Bedi, Asheesh; Rodeo, Scott A. (2009): The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. In: *Sports health* 1 (6), S. 461–468. DOI: 10.1177/1941738109350438.

Gehler, Scott; Compere, Frances V.; Miller, Alex M. (2017): Semaphorin 3A Increases FAK Phosphorylation at Focal Adhesions to Modulate MDA-MB-231 Cell Migration and Spreading on Different Substratum Concentrations. In: *International journal of breast cancer* 2017, S. 9619734. DOI: 10.1155/2017/9619734.

Glyn-Jones, S.; Palmer, A. J. R.; Agricola, R.; Price, A. J.; Vincent, T. L.; Weinans, H.; Carr, A. J. (2015): Osteoarthritis. In: *The Lancet* 386 (9991), S. 376–387. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60802-3.

Goldring, M. B. (1999): The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models. In: *Connective tissue research* 40 (1), S. 1–11.

Goldring, Mary B. (2000): The role of the chondrocyte in osteoarthritis. In: *Arthritis & Rheumatism* 43 (9), S. 1916–1926. DOI: 10.1002/1529-0131(200009)43:9<1916::AID-ANR2>3.0.CO;2-I.

Goldring, Mary B.; Marcu, Kenneth B. (2009): Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. In: *Arthritis research & therapy* 11 (3), S. 224. DOI: 10.1186/ar2592.

Goldring, Mary B.; Otero, Miguel; Plumb, Darren A.; Dragomir, Cecilia; Favero, Marta; El Hachem, Karim et al. (2011): Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. In: *European cells & materials* 21, S. 202–220.

Goldring, Mary B.; Tsuchimochi, Kaneyuki; Ijiri, Kosei (2006): The control of chondrogenesis. In: *Journal of cellular biochemistry* 97 (1), S. 33–44. DOI: 10.1002/jcb.20652.

Goodman, C.S; Kolodkin, A.L; Luo, Y.; Püschel, A.W; Raper, J.A (1999): Unified Nomenclature for the Semaphorins/Collapsins. In: *Cell* 97 (5), S. 551–552. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80766-7.

Greene, George W.; Banquy, Xavier; Lee, Dong Woog; Lowrey, Daniel D.; Yu, Jing; Israelachvili, Jacob N. (2011): Adaptive mechanically controlled lubrication mechanism found in articular joints. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (13), S. 5255–5259. DOI: 10.1073/pnas.1101002108.

Guo, Hou-Fu; Vander Kooi, Craig W. (2015): Neuropilin Functions as an Essential Cell Surface Receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 290 (49), S. 29120–29126. DOI: 10.1074/jbc.R115.687327.

Gupton, Stephanie L.; Waterman-Storer, Clare M. (2006): Spatiotemporal feedback between actomyosin and focal-adhesion systems optimizes rapid cell migration. In: *Cell* 125 (7), S. 1361–1374. DOI: 10.1016/j.cell.2006.05.029.

He, Zhigang; Tessier-Lavigne, Marc (1997): Neuropilin Is a Receptor for the Axonal Chemorepellent Semaphorin III. In: *Cell* 90 (4), S. 739–751. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80534-6.

Herzog, Birger; Pellet-Many, Caroline; Britton, Gary; Hartzoulakis, Basil; Zachary, Ian C. (2011): VEGF binding to NRP1 is essential for VEGF stimulation of endothelial cell migration, complex formation between NRP1 and VEGFR2, and signaling via FAK Tyr407

phosphorylation. In: *Molecular Biology of the Cell* 22 (15), S. 2766–2776. DOI: 10.1091/mbc.E09-12-1061.

Hinck, Lindsay (2004): The versatile roles of "axon guidance" cues in tissue morphogenesis. In: *Developmental cell* 7 (6), S. 783–793. DOI: 10.1016/j.devcel.2004.11.002.

Hirsch, M. S.; Lunsford, L. E.; Trinkaus-Randall, V.; Svoboda, K. K. (1997): Chondrocyte survival and differentiation in situ are integrin mediated. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 210 (3), S. 249–263. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0177(199711)210:3<249::AID-AJA6>3.0.CO;2-G.

Hood, John D.; Cheresch, David A. (2002): Role of integrins in cell invasion and migration. In: *Nature reviews. Cancer* 2 (2), S. 91–100. DOI: 10.1038/nrc727.

Huch, K.; Stöve, J.; Puhl, W.; Günther, K.-P. (2002): Vergleichender Überblick über Verfahren zur Kultivierung artikulärer Chondrozyten. In: *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 140 (02), S. 145–152. DOI: 10.1055/s-2002-31532.

Huttenlocher, A. (1996): Modulation of cell migration by integrin-mediated cytoskeletal linkages and ligand-binding affinity. In: *J Cell Biol* 134 (6), S. 1551–1562. DOI: 10.1083/jcb.134.6.1551.

Huttenlocher, Anna; Horwitz, Alan Rick (2011): Integrins in cell migration. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3 (9), a005074. DOI: 10.1101/cshperspect.a005074.

Hwang, Hyun Sook; Kim, Hyun Ah (2015): Chondrocyte Apoptosis in the Pathogenesis of Osteoarthritis. In: *International journal of molecular sciences* 16 (11), S. 26035–26054. DOI: 10.3390/ijms161125943.

Hynes, Richard O. (2002): Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. In: *Cell* 110 (6), S. 673–687.

Janssen, Bert J. C.; Malinauskas, Tomas; Weir, Greg A.; Cader, M. Zameel; Siebold, Christian; Jones, E. Yvonne (2012): Neuropilins lock secreted semaphorins onto plexins in a ternary signaling complex. In: *Nature structural & molecular biology* 19 (12), S. 1293–1299. DOI: 10.1038/nsmb.2416.

Jung, Chan Kwon (2014): Articular Cartilage: Histology and Physiology. In: A. Ananthram Shetty (Hg.): *Techniques in Cartilage Repair Surgery*, Bd. 35. Unter Mitarbeit von Seok-Jung Kim, Norimasa Nakamura und Mats Brittberg. 1. Aufl. Dordrecht: Springer, S. 17–21.

- Kapoor, Mohit; Martel-Pelletier, Johanne; Lajeunesse, Daniel; Pelletier, Jean-Pierre; Fahmi, Hassan (2011): Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. In: *Nature reviews. Rheumatology* 7 (1), S. 33–42. DOI: 10.1038/nrrheum.2010.196.
- Kiani, Chris; Chen, Liwen; Wu, Yao Jiong; Yee, Albert J.; Yang, Burton B. (2002): Structure and function of aggrecan. In: *Cell research* 12 (1), S. 19–32. DOI: 10.1038/sj.cr.7290106.
- Kimura, Tokuhiko; Okada, Aiko; Yatabe, Taku; Okubo, Masashi; Toyama, Yoshiaki; Noda, Makoto; Okada, Yasunori (2010): RECK is up-regulated and involved in chondrocyte cloning in human osteoarthritic cartilage. In: *The American Journal of Pathology* 176 (6), S. 2858–2867. DOI: 10.2353/ajpath.2010.091003.
- Kirsch, D. G.; Doseff, A.; Chau, B. N.; Lim, D. S.; Souza-Pinto, N. C. de; Hansford, R. et al. (1999): Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (30), S. 21155–21161.
- Kirsch, Thorsten; Mark, Klaus von der (1992): Remodelling of collagen types I, II and X and calcification of human fetal cartilage. In: *Bone and Mineral* 18 (2), S. 107–117. DOI: 10.1016/0169-6009(92)90851-4.
- Klostermann, Andreas; Lohrum, Marion; Adams, Ralf H.; Püschel, Andreas W. (1998): The Chemorepulsive Activity of the Axonal Guidance Signal Semaphorin D Requires Dimerization. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (13), S. 7326–7331. DOI: 10.1074/jbc.273.13.7326.
- Kolodkin, Alex L.; Levengood, Dorothy V.; Rowe, Erica G.; Tai, Yu-Tzu; Giger, Roman J.; Ginty, David D. (1997): Neuropilin Is a Semaphorin III Receptor. In: *Cell* 90 (4), S. 753–762. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80535-8.
- Kowaltowski, Alicia J.; Cosso, Ricardo G.; Campos, Claudia B.; Fiskum, Gary (2002): Effect of Bcl-2 overexpression on mitochondrial structure and function. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (45), S. 42802–42807. DOI: 10.1074/jbc.M207765200.
- Kumanogoh, A. (2015): Semaphorins. A Diversity of Emerging Physiological and Pathological Activities: Springer Japan. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=sbsICQAAQBAJ>.
- Kumanogoh, Atsushi; Kikutani, Hitoshi (2013): Immunological functions of the neuropilins and plexins as receptors for semaphorins. In: *Nat Rev Immunol* 13 (11), S. 802–814. DOI: 10.1038/nri3545.

Kurczyk, Marta; Alberton, Paolo; Farkas, Zsuzsanna; Prein, Carina; Clausen-Schaumann, Hauke; Lundgren-Akerlund, Evy; Aszodi, Attila (2017): FGF-2-driven elevation of integrin alpha 10 enhances ADMSC chondrogenesis. Unter Mitarbeit von Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie, Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und orthopädische Chirurgie und Berufsverband der Fachärzte für Orthopädie.

Lanahan, Anthony; Zhang, Xi; Fantin, Alessandro; Zhuang, Zhen; Rivera-Molina, Felix; Speichinger, Katherine et al. (2013): The Neuropilin 1 Cytoplasmic Domain Is Required for VEGF-A-Dependent Arteriogenesis. In: *Developmental cell* 25 (2), S. 156–168. DOI: 10.1016/j.devcel.2013.03.019.

Lee, D.; Bentley, G.; Archer, C. (1993): The control of cell division in articular chondrocytes. In: *Osteoarthritis and cartilage* 1 (2), S. 137–145. DOI: 10.1016/S1063-4584(05)80029-9.

Li, Xiaobo; Parker, Matthew W.; Vander Kooi, Craig W. (2014): Control of cellular motility by neuropilin-mediated physical interactions. In: *Biomolecular concepts* 5 (2), S. 157–166. DOI: 10.1515/bmc-2013-0035.

Lieberthal, J.; Sambamurthy, N.; Scanzello, C. R. (2015): Inflammation in joint injury and post-traumatic osteoarthritis. In: *Osteoarthritis and cartilage* 23 (11), S. 1825–1834. DOI: 10.1016/j.joca.2015.08.015.

Lin, Zhen; Fitzgerald, Jonathan B.; Xu, Jiake; Willers, Craig; Wood, David; Grodzinsky, Alan J.; Zheng, Ming H. (2008): Gene expression profiles of human chondrocytes during passaged monolayer cultivation. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 26 (9), S. 1230–1237. DOI: 10.1002/jor.20523.

Lin, Zhen; Willers, Craig; Xu, Jiake; Zheng, Ming-Hao (2006): The chondrocyte. Biology and clinical application. In: *Tissue engineering* 12 (7), S. 1971–1984. DOI: 10.1089/ten.2006.12.1971.

Loeser, R. F.; Sadiev, S.; Tan, L.; Goldring, M. B. (2000): Integrin expression by primary and immortalized human chondrocytes: evidence of a differential role for alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins in mediating chondrocyte adhesion to types II and VI collagen. In: *Osteoarthritis and cartilage* 8 (2), S. 96–105. DOI: 10.1053/joca.1999.0277.

- Loeser, Richard F. (2010): Age-related changes in the musculoskeletal system and the development of osteoarthritis. In: *Clinics in geriatric medicine* 26 (3), S. 371–386. DOI: 10.1016/j.cger.2010.03.002.
- Loeser, Richard F. (2011): Aging and osteoarthritis. In: *Current opinion in rheumatology* 23 (5), S. 492–496. DOI: 10.1097/BOR.0b013e3283494005.
- Loeser, Richard F. (2014): Integrins and chondrocyte-matrix interactions in articular cartilage. In: *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 39, S. 11–16. DOI: 10.1016/j.matbio.2014.08.007.
- Loeser, Richard F.; Goldring, Steven R.; Scanzello, Carla R.; Goldring, Mary B. (2012): Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. In: *Arthritis and rheumatism* 64 (6), S. 1697–1707. DOI: 10.1002/art.34453.
- Lu, Dah-Yuu; Leung, Yuk-Man; Cheung, Chi-Wai; Chen, Yun-Ru; Wong, Kar-Lok (2010): Glial cell line-derived neurotrophic factor induces cell migration and matrix metalloproteinase-13 expression in glioma cells. In: *Biochemical pharmacology* 80 (8), S. 1201–1209. DOI: 10.1016/j.bcp.2010.06.046.
- Luo, Yuling; Raible, David; Raper, Jonathan A. (1993): Collapsin. A protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. In: *Cell* 75 (2), S. 217–227. DOI: 10.1016/0092-8674(93)80064-L.
- Maione, Federica; Molla, Fabiola; Meda, Claudia; Latini, Roberto; Zentilin, Lorena; Giacca, Mauro et al. (2009): Semaphorin 3A is an endogenous angiogenesis inhibitor that blocks tumor growth and normalizes tumor vasculature in transgenic mouse models. In: *The Journal of clinical investigation* 119 (11), S. 3356–3372. DOI: 10.1172/JCI36308.
- Malemud, C. J. (1991): Changes in proteoglycans in osteoarthritis: biochemistry, ultrastructure and biosynthetic processing. In: *The Journal of rheumatology. Supplement 27*, S. 60–62.
- Malfait, A. M. (2016): Osteoarthritis year in review 2015: biology. In: *Osteoarthritis and cartilage* 24 (1), S. 21–26. DOI: 10.1016/j.joca.2015.09.010.
- Mamluk, Roni; Gechtman, Ze'ev; Kutcher, Matthew E.; Gasiunas, Nijole; Gallagher, John; Klagsbrun, Michael (2002): Neuropilin-1 binds vascular endothelial growth factor 165,

placenta growth factor-2, and heparin via its b1b2 domain. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (27), S. 24818–24825. DOI: 10.1074/jbc.M200730200.

Mark, K. von der; Kirsch, T.; Nerlich, A.; Kuss, A.; Weseloh, G.; Glückert, K.; Stöss, H. (1992): Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. In: *Arthritis and rheumatism* 35 (7), S. 806–811.

Martel-Pelletier, J. (1998): Pathophysiology of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis and cartilage* 6 (6), S. 374–376. DOI: 10.1053/joca.1998.0140.

Mishima, Yasunori; Lotz, Martin (2008): Chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 26 (10), S. 1407–1412. DOI: 10.1002/jor.20668.

Mitchell, P. G.; Magna, H. A.; Reeves, L. M.; Lopresti-Morrow, L. L.; Yocum, S. A.; Rosner, P. J. et al. (1996): Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. In: *The Journal of clinical investigation* 97 (3), S. 761–768. DOI: 10.1172/JCI118475.

Moldovan, Florina; Pelletier, Jean-Pierre; Hambor, John; Cloutier, Jean-Marie; Martel-Pelletier, Johanne (1997): Collagenase-3 (matrix metalloprotease 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ. In vitro mimicking effect by transforming growth factor  $\beta$ . In: *Arthritis & Rheumatism* 40 (9), S. 1653–1661. DOI: 10.1002/art.1780400915.

Murata, M.; Yudoh, K.; Masuko, K. (2008): The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage: how the angiogenic factor could be involved in the pathogenesis of osteoarthritis? In: *Osteoarthritis and cartilage* 16 (3), S. 279–286. DOI: 10.1016/j.joca.2007.09.003.

Nagao, Masashi; Hamilton, John L.; Kc, Ranjan; Berendsen, Agnes D.; Duan, Xuchen; Cheong, Chan Wook et al. (2017): Vascular Endothelial Growth Factor in Cartilage Development and Osteoarthritis. In: *Scientific Reports* 7 (1), S. 13027. DOI: 10.1038/s41598-017-13417-w.

Nasarre, Patrick; Constantin, Bruno; Rouhaud, Lydie; Harnois, Thomas; Raymond, Guy; Drabkin, Harry A. et al. (2003): Semaphorin SEMA3F and VEGF Have Opposing Effects on Cell Attachment and Spreading. In: *Neoplasia (New York, N.Y.)* 5 (1), S. 83–92.



Nasarre, Patrick; Gemmill, Robert M.; Drabkin, Harry A. (2014): The emerging role of class-3 semaphorins and their neuropilin receptors in oncology. In: *OncoTargets and therapy* 7, S. 1663–1687. DOI: 10.2147/OTT.S37744.

Neufeld, Gera; Kessler, Ofra (2008): The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. In: *Nature reviews. Cancer* 8 (8), S. 632–645. DOI: 10.1038/nrc2404.

Nurminskaya, Maria; Linsenmayer, Thomas F. (1996): Identification and characterization of up-regulated genes during chondrocyte hypertrophy. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 206 (3), S. 260–271. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0177(199607)206:3<260::AID-AJA4>3.0.CO;2-G.

Okubo, Masashi; Kimura, Tokuhiro; Fujita, Yoshinari; Mochizuki, Satsuki; Niki, Yasuo; Enomoto, Hiroyuki et al. (2011): Semaphorin 3A is expressed in human osteoarthritic cartilage and antagonizes vascular endothelial growth factor 165-promoted chondrocyte migration: an implication for chondrocyte cloning. In: *Arthritis and rheumatism* 63 (10), S. 3000–3009. DOI: 10.1002/art.30482.

Palecek, S. P.; Loftus, J. C.; Ginsberg, M. H.; Lauffenburger, D. A.; Horwitz, A. F. (1997): Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. In: *Nature* 385 (6616), S. 537–540. DOI: 10.1038/385537a0.

Parker, Matthew W.; Guo, Hou-Fu; Li, Xiaobo; Linkugel, Andrew D.; Vander Kooi, Craig W. (2012): Function of members of the neuropilin family as essential pleiotropic cell surface receptors. In: *Biochemistry* 51 (47), S. 9437–9446. DOI: 10.1021/bi3012143.

Pauli, C.; Whiteside, R.; Heras, F. L.; Nestic, D.; Koziol, J.; Grogan, S. P. et al. (2012): Comparison of cartilage histopathology assessment systems on human knee joints at all stages of osteoarthritis development. In: *Osteoarthritis and cartilage* 20 (6), S. 476–485. DOI: 10.1016/j.joca.2011.12.018.

Perrot-Applanat, Martine; Di Benedetto, Melanie (2012): Autocrine functions of VEGF in breast tumor cells: adhesion, survival, migration and invasion. In: *Cell Adhesion & Migration* 6 (6), S. 547–553. DOI: 10.4161/cam.23332.

Poole, C. A. (1997): Review. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. In: *J Anatomy* 191 (Pt 1), S. 1–13. DOI: 10.1046/j.1469-7580.1997.19110001.x.

Prud'homme, Gerald J.; Glinka, Yelena (2012): Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. In: *Oncotarget* 3 (9). DOI: 10.18632/oncotarget.626.

Pufe, Thomas; Harde, Viola; Petersen, Wolf; Goldring, Mary B.; Tillmann, Bernhard; Mentlein, Rolf (2004a): Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces matrix metalloproteinase expression in immortalized chondrocytes. In: *The Journal of pathology* 202 (3), S. 367–374. DOI: 10.1002/path.1527.

Pufe, Thomas; Lemke, Angelika; Kurz, Bodo; Petersen, Wolf; Tillmann, Bernhard; Grodzinsky, Alan J.; Mentlein, Rolf (2004b): Mechanical Overload Induces VEGF in Cartilage Discs via Hypoxia-Inducible Factor. In: *The American Journal of Pathology* 164 (1), S. 185–192. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63109-4.

Quintavalla, Joseph; Kumar, Chandrika; Daouti, Sherif; Slosberg, Eric; Uziel-Fusi, Susan (2005): Chondrocyte cluster formation in agarose cultures as a functional assay to identify genes expressed in osteoarthritis. In: *Journal of cellular physiology* 204 (2), S. 560–566. DOI: 10.1002/jcp.20345.

Raper, Jonathan A.; Kapfhammer, Josef R. (1990): The enrichment of a neuronal growth cone collapsing activity from embryonic chick brain. In: *Neuron* 4 (1), S. 21–29. DOI: 10.1016/0896-6273(90)90440-Q.

Rousseau, S.; Houle, F.; Landry, J.; Huot, J. (1997): p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. In: *Oncogene* 15 (18), S. 2169–2177. DOI: 10.1038/sj.onc.1201380.

Sandell, Linda J.; Aigner, Thomas (2001): Articular cartilage and changes in Arthritis: Cell biology of osteoarthritis. In: *Arthritis Res* 3 (2), S. 107. DOI: 10.1186/ar148.

Schlomann, Uwe; Schwamborn, Jens C.; Müller, Myriam; Fässler, Reinhard; Püschel, Andreas W. (2009): The stimulation of dendrite growth by Sema3A requires integrin engagement and focal adhesion kinase. In: *Journal of cell science* 122 (Pt 12), S. 2034–2042. DOI: 10.1242/jcs.038232.

Seerapu, Himabindu Reddy; Borthakur, Susmita; Kong, Nathan; Agrawal, Sudesh; Drazba, Judy; Vasanji, Amit et al. (2013): The cytoplasmic domain of neuropilin-1 regulates focal

adhesion turnover. In: *FEBS Letters* 587 (21), S. 3392–3399. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.08.040.

Serini, Guido; Valdembri, Donatella; Zanivan, Sara; Morterra, Giulia; Burkhardt, Constanze; Caccavari, Francesca et al. (2003): Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function. In: *Nature* 424 (6947), S. 391–397. DOI: 10.1038/nature01784.

Shimizu, Masayuki; Murakami, Yasunori; Suto, Fumikazu; Fujisawa, Hajime (2000): Determination of Cell Adhesion Sites of Neuropilin-1. In: *J Cell Biol* 148 (6), S. 1283–1294.

Takagi, S.; Kasuya, Y.; Shimizu, M.; Matsuura, T.; Tsuboi, M.; Kawakami, A.; Fujisawa, H. (1995): Expression of a cell adhesion molecule, neuropilin, in the developing chick nervous system. In: *Developmental biology* 170 (1), S. 207–222. DOI: 10.1006/dbio.1995.1208.

Takahashi, T.; Nakamura, F.; Jin, Z.; Kalb, R. G.; Strittmatter, S. M. (1998): Semaphorins A and E act as antagonists of neuropilin-1 and agonists of neuropilin-2 receptors. In: *Nature neuroscience* 1 (6), S. 487–493. DOI: 10.1038/2203.

Takahashi, Takuya; Fournier, Alyson; Nakamura, Fumio; Wang, Li-Hsien; Murakami, Yasunori; Kalb, Robert G. et al. (1999): Plexin-Neuropilin-1 Complexes Form Functional Semaphorin-3A Receptors. In: *Cell* 99 (1), S. 59–69. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80062-8.

Tamagnone, Luca; Artigiani, Stefania; Chen, Hang; He, Zhigang; Ming, Guo-li; Song, Hong-jun et al. (1999): Plexins Are a Large Family of Receptors for Transmembrane, Secreted, and GPI-Anchored Semaphorins in Vertebrates. In: *Cell* 99 (1), S. 71–80. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80063-X.

Toyofuku, Toshihiko; Yoshida, Junko; Sugimoto, Tamiko; Yamamoto, Midori; Makino, Nobuhiko; Takamatsu, Hyota et al. (2008): Repulsive and attractive semaphorins cooperate to direct the navigation of cardiac neural crest cells. In: *Developmental biology* 321 (1), S. 251–262. DOI: 10.1016/j.ydbio.2008.06.028.

Troeberg, Linda; Nagase, Hideaki (2012): Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. In: *Biochimica et biophysica acta* 1824 (1), S. 133–145. DOI: 10.1016/j.bbapap.2011.06.020.

Tzeng, Huey-En; Chen, Jui-Ching; Tsai, Chun-Hao; Kuo, Chien-Chung; Hsu, Horng-Chaung; Hwang, Wen-Lee et al. (2011): CCN3 increases cell motility and MMP-13 expression in

human chondrosarcoma through integrin-dependent pathway. In: *Journal of cellular physiology* 226 (12), S. 3181–3189. DOI: 10.1002/jcp.22672.

van Delft, Mark F.; Huang, David C. S. (2006): How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. In: *Cell research* 16 (2), S. 203–213. DOI: 10.1038/sj.cr.7310028.

van der Kraan, P. M.; van den Berg, W. B. (2012): Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? In: *Osteoarthritis and cartilage* 20 (3), S. 223–232. DOI: 10.1016/j.joca.2011.12.003.

Vogel, Christine; Marcotte, Edward M. (2012): Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. In: *Nat Rev Genet* 13 (4), S. 227–232. DOI: 10.1038/nrg3185.

Wang, Z. H.; Li, X. L.; He, X. J.; Wu, B. J.; Xu, M.; Chang, H. M. et al. (2014): Delivery of the Sox9 gene promotes chondrogenic differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in an in vitro model. In: *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 47 (4), S. 279–286. DOI: 10.1590/1414-431X20133539.

Wolman, Marc A.; Liu, Yan; Tawarayama, Hiroshi; Shoji, Wataru; Halloran, Mary C. (2004): Repulsion and attraction of axons by semaphorin3D are mediated by different neuropilins in vivo. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24 (39), S. 8428–8435. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2349-04.2004.

Yeh, Wei-Lan; Lu, Dah-Yuu; Lee, Ming-Jen; Fu, Wen-Mei (2009): Leptin induces migration and invasion of glioma cells through MMP-13 production. In: *Glia* 57 (4), S. 454–464. DOI: 10.1002/glia.20773.

Yu, Xiao-Ming; Meng, Hao-Ye; Yuan, Xue-Ling; Wang, Yu; Guo, Quan-Yi; Peng, Jiang et al. (2015): MicroRNAs' Involvement in Osteoarthritis and the Prospects for Treatments. In: *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2015, S. 236179. DOI: 10.1155/2015/236179.

Yuan, X. L.; Meng, H. Y.; Wang, Y. C.; Peng, J.; Guo, Q. Y.; Wang, A. Y.; Lu, S. B. (2014): Bone-cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: potential pathways and future therapeutic strategies. In: *Osteoarthritis and cartilage* 22 (8), S. 1077–1089. DOI: 10.1016/j.joca.2014.05.023.

## 7 Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

ADAMTS	A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domains
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	copy DNA
COL1A1	Kollagen Typ 1 alpha 1
COL2A1	Kollagen Typ 2 alpha 1
COL10A1	Kollagen Typ 10 alpha 1
DAB	Diaminobenzidin
DEVD	Asparaginsäure-Glutaminsäure-Valin-Asparaginsäure
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
ECL	electrogenenerated chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases
EZM	Extrazelluläre Matrix
FARP2	FERM, ARH/RhoGEF And Pleckstrin Domain Protein 2
FKS	Fötales Kälberserum
FV	Koagulationsfaktor V
FVIII	Koagulationsfaktor VIII
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
Ch	Humane Chondrozyten

HCl	Salzsäure
HGF	Hepatocyte growth factor
HRP	Horseradish peroxidase
IFN	Interferon
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
ITS	Insulin, Transferrin, Selen
ITGA10	Integrin alpha-10
K.O.-Ch	NRP1-Knockdown-Chondrozyten
MAM-Domäne	Meprin, A-5 protein, and receptor protein-tyrosine phosphatase mu
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	messenger ribonucleic acid
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NF- $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
Nicht-OA-Ch	Chondrozyten aus nicht OA-Knorpel
NRP1	Neuropilin-1
NRP2	Neuropilin-2
OA	(Osteo-)Arthrose
OA-Ch	Chondrozyten aus OA-Knorpel
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF-BB	Platelet-derived growth factor BB
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PFA	Paraformaldehyd
PIPKly661	phosphatidylinositol phosphate kinase type 17661
POD	Peroxidase
PSI	N-terminal plexin/semaphorin/integrin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qPCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
R110	Rhodamin-110
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sema3A	Semaphorin 3A

Sema3E	Semaphorin 3E
siRNA	small interfering RNA
SOX9	SRY-related high-mobility-group box 9
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween 20
TBS-T	Tris-buffered Saline + Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	Transforming growth factor
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
WB	Western Blot

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

---

Ort, Datum

---

Johanna Reichart

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuerst gilt mein Dank Frau **Prof. Dr. Susanne Grässel** (Abteilung für Experimentelle Orthopädie am Universitätsklinikum Regensburg) für die Möglichkeit, meine Dissertation in Ihrer Abteilung zu erstellen. Vielen Dank für die Rückmeldungen und die Ratschläge, die ich mir immer wieder zu Verlauf und Planung meiner Doktorarbeit einholen konnte. Die Gelegenheiten, meine Zwischenergebnisse präsentieren zu können, haben den Entstehungsprozess meiner Arbeit maßgeblich begleitet und strukturiert.

Ich bedanke mich bei Herrn **Prof. Dr. Joachim Grifka** (Direktor der Orthopädischen Klinik und Poliklinik der Universität Regensburg im Asklepios-Zentrum Bad Abbach) für die Möglichkeit, an seinem Institut zu promovieren.

Ein großes Dankeschön möchte ich Frau **Dr. Sabine Stöckl** aussprechen für ihre Betreuung, ihre Geduld und ihr Vertrauen in mich, für unzählige Gespräche und ihre Bereitschaft, immer wieder Neues auszuprobieren. Ohne ihre stete Unterstützung, mit der sie mir jederzeit zur Seite gestanden ist, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei dem gesamten Laborteam der Orthopädie und den anderen Mitarbeitern des ZMB im Biopark, die mich so schnell in ihr Team aufgenommen und mich auf verschiedenste Weise unterstützt haben. Insbesondere danke ich Frau **Anja Pasoldt** für ihre herausragende Unterstützung, die zahlreichen Arbeitstechniken und ihre Bereitschaft, Methoden bis ins kleinste Detail auseinanderzunehmen, Frau **Mandy Vogel**, dass sie mich die Wichtigkeit von präzisem und vorausschauendem Arbeiten gelehrt hat, Frau **Dr. Tanja Niedermair** für ihre hilfreichen Ratschläge an manch spätem Abend und Frau **Tanja Späth** für ihr offenes Ohr und ihre humorvolle Unterstützung. Frau **Dr. Ute Mayer** und **Elisabeth Wenig** danke ich für die gemeinsamen Stunden, hilfreichen Gespräche und die gegenseitige freundschaftliche Unterstützung.

Ein großer Dank geht auch an meine Freundinnen **Regina, Maria-Anna, Johanna** und **Antonia**, die mit mir bereits durch viele Höhen und Tiefen gegangen sind. Danke meinem besten Freund **Sebastian**, dessen sachliche und freundschaftliche Unterstützung aus dieser Arbeit nicht wegzudenken ist.

Sehr dankbar bin ich meinem Partner **Max**, der mich von Anfang an durch diese Arbeit begleitet hat und immer an mich geglaubt hat.

Mein größter Dank geht an meine Eltern **Angelika** und **Josef**. Ihre bedingungslose Unterstützung hat es mir ermöglicht, meinen Weg zu gehen.