

Aus der Klinik für Allgemeine, Unfall-, Hand und Plastische Chirurgie
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Böcker

**Untersuchung der putativen Interaktion
der Hyaluronansynthase mit dem Aktinzytoskelett
in humanen mesenchymalen Stammzellen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Eva Nikola Sylvie Hofbauer
aus Blaubeuren

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Böcker

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Susanne Mayer
Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med.dent. Christoph Pautke

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Veronika Schönitzer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACP, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 11.06.2015

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Knochenhomöostase | 1 |
| 1.2 Humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs)..... | 3 |
| 1.3 Lentiviraler Gentranfer | 5 |
| 1.4 Vorkommen, Struktur und Eigenschaften von Hyaluronan (HA) | 6 |
| 1.5 Struktur, Mechanismus und Regulation der Hyaluronansynthase..... | 7 |
| 1.6 Funktionen von Hyaluronan und seinen Rezeptoren | 10 |
| 1.7 Rolle von HA in der Knochenbildung..... | 10 |
| 1.8 HA und Knochenerkrankungen | 12 |
| 1.9 Zielsetzung..... | 13 |
| | |
| 2. Material und Methoden | 15 |
| 2.1 Material | 15 |
| 2.1.1 Chemikalien und sonstige Substanzen | 15 |
| 2.1.2 Puffer und Lösungen..... | 17 |
| 2.1.3 Enzyme | 20 |
| 2.1.4 Antikörper..... | 20 |
| 2.1.4.1 Primärantikörper..... | 20 |
| 2.1.4.2 Sekundärantikörper..... | 21 |
| 2.1.5 Medien | 21 |
| 2.1.5.1 Medien für Bakterienkulturen | 21 |
| 2.1.5.2 Medien und sonstige Materialien für Zellkulturen..... | 21 |
| 2.1.6 Organismen..... | 22 |
| 2.1.6.1 Bakterien..... | 22 |
| 2.1.6.2 Zellen und Zelllinien | 23 |
| 2.1.7 Oligonukleotide | 24 |
| 2.1.7.1 PCR-Primer..... | 24 |
| 2.1.7.2 Sequenzierprimer..... | 25 |
| 2.1.8 Gene und Vektoren | 26 |
| 2.1.9 Standards..... | 26 |
| 2.1.10 Kits | 27 |
| 2.1.11 Geräte | 27 |
| 2.1.12 Software | 28 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 2.2 | Methoden | 29 |
| 2.2.1 | Mikrobiologische Methoden..... | 29 |
| 2.2.1.1 | Kultivierung von Bakterienkulturen..... | 29 |
| 2.2.1.2 | Konservierung von Bakterienkulturen | 30 |
| 2.2.2 | Molekularbiologische Methoden..... | 30 |
| 2.2.2.1 | Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> | 30 |
| 2.2.2.2 | Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA | 30 |
| 2.2.2.3 | Restriktionsverdau von DNA | 31 |
| 2.2.2.4 | Gelelektrophorese..... | 31 |
| 2.2.2.5 | DNA-Extraktion aus Agarosegelen..... | 32 |
| 2.2.2.6 | Die Polymerasekettenreaktion (PCR) | 32 |
| 2.2.2.6.1 | Die Standard-PCR | 33 |
| 2.2.2.6.2 | Die Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) | 34 |
| 2.2.2.6.3 | Die Kolonie-PCR mit <i>E.coli</i> | 34 |
| 2.2.2.7 | Klonierung | 35 |
| 2.2.2.7.1 | Die Klenow-Reaktion..... | 35 |
| 2.2.2.7.2 | Dephosphorylierung von Vektor-Enden (CIPen) | 36 |
| 2.2.2.7.3 | Ligation von DNA-Fragmenten..... | 36 |
| 2.2.2.7.4 | Homologe Rekombination | 37 |
| 2.2.2.7.5 | Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen | 37 |
| 2.2.2.7.6 | Transformation in <i>E.coli</i> -Zellen..... | 38 |
| 2.2.2.7.7 | DNA-Sequenzierung | 39 |
| 2.2.3 | Virale Transformation..... | 39 |
| 2.2.3.1 | Herstellung der Lentiviren in 293FT-Zellen | 39 |
| 2.2.3.2 | Transduktion der hMSCs..... | 40 |
| 2.2.3.3 | P24-Antigen-ELISA | 41 |
| 2.2.4 | Zellkulturmethoden..... | 41 |
| 2.2.4.1 | Kultivierung von hMSCs | 41 |
| 2.2.4.2 | Passagieren von hMSCs..... | 42 |
| 2.2.4.3 | Zählen von hMSCs..... | 42 |
| 2.2.4.4 | Vereinzelung von Zellklonen | 42 |
| 2.2.4.5 | Konservierung und Auftauen von hMSCs | 43 |
| 2.2.5 | Proteinbiochemische Methoden | 43 |
| 2.2.5.1 | Proteinisolierung aus hMSCs | 43 |

| | | |
|---------------------------|--|----|
| 2.2.5.2 | Proteinkonzentrationsbestimmung (BCA Protein Assay) | 44 |
| 2.2.5.3 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) | 44 |
| 2.2.5.4 | Western Blot..... | 45 |
| 2.2.6 | Aktivitätsbestimmung der Hyaluronansynthase..... | 46 |
| 2.2.6.1 | Hyaluronan-ELISA | 46 |
| 2.2.6.2 | Aktivitätsassay mit bHABC..... | 47 |
| 2.2.7 | Immunodetektion von Proteinen in hMSCs | 48 |
| 2.2.7.1 | Immunfluoreszenz-Färbung mit CD44- und HAS-Antikörpern..... | 48 |
| 2.2.7.2 | Aktin-Färbung mit Phalloidin | 49 |
| 2.2.8 | Fluoreszenzmikroskopie | 50 |
| 2.2.9 | Statistik..... | 50 |
| 3. Ergebnisse..... | 51 | |
| 3.1 | Klonierungsstrategien | 51 |
| 3.1.1 | Klonierung von pLenti4.3-HAS1-eGFP | 52 |
| 3.1.2 | Klonierung von pLenti4.3-HAS2-eGFP | 53 |
| 3.1.3 | Klonierung von pLenti4.3-HAS3-eGFP | 54 |
| 3.1.4 | Klonierung von pLenti4.3-Lifeact-mRFPuby..... und pLenti6.3-Lifeact-mRFPuby | 55 |
| 3.2 | Analyse der Expression der HAS-eGFP in SCP1-HAS-eGFP | 56 |
| 3.2.1 | Nachweis der Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS.. | 56 |
| 3.2.2 | Nachweis der Expression auf RNA-Ebene..... | 57 |
| 3.2.3 | Nachweis der Expression auf Proteinebene..... | 58 |
| 3.3 | Untersuchung der Funktionalität der HAS-eGFP | 59 |
| 3.3.1 | Untersuchung der Funktionalität der HAS-eGFP | 59 |
| | mit Hyaluronan-ELISA..... | 59 |
| 3.3.2 | Untersuchung der Aktivität der HAS-eGFP mittels Aktivitätsassay | 60 |
| 3.4 | Untersuchung der Lokalisation der HAS-eGFP..... | 62 |
| 3.4.1 | Lokalisation der HAS-eGFP in der Zellmembran | 63 |
| 3.4.2 | Kolokalisation der HAS-eGFP mit dem Aktinzytoskelett | 67 |
| 3.5 | Untersuchung der mit Lifeact-mRFPuby transduzierten SCP1 | 70 |
| 3.6 | Untersuchung der doppeltransduzierten hMSCs..... | 72 |

| | |
|---|------------|
| 4. Diskussion..... | 75 |
| 4.1 Herstellung der Zelllinien..... | 75 |
| 4.2 Expressionsstudien | 76 |
| 4.3 Die Enzymaktivität der HAS-eGFP..... | 79 |
| 4.4 Lokalisation der HAS-eGFP in der Plasmamembran | 82 |
| 4.5 Interaktion der HAS-eGFP mit dem Aktinzytoskelett..... | 83 |
| 4.6 Ausblick..... | 88 |
| 5. Zusammenfassung / Abstract | 90 |
| 6. Literaturverzeichnis | 94 |
| 7. Abkürzungsverzeichnis | 108 |
| Danksagung..... | 111 |

1. Einleitung

1.1 Knochenhomöostase

Im gesunden Knochen liegt eine Homöostase vor, d.h. es besteht ein Gleichgewicht zwischen fortwährendem Knochenabbau und Knochenaufbau. Dieser Knochenumbau ist ein kontinuierlicher Prozess des Knochengewebes, der ein Leben lang stattfindet. Der Umbau erfolgt in fünf Phasen: Einleitung, Resorption, Umschaltphase, Formation und Mineralisierung der Matrix (s. Abb. 1). Bei den für den Knochenumbau verantwortlichen Knochenzellen werden vier Zelltypen unterschieden: Vorläuferzellen, Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten. Die Vorläuferzellen, aus denen sich die Osteoblasten bilden, sind mesenchymale Stammzellen, die zeitlebens im Knochen vorliegen und sich durch eine hohe Proliferationsrate und multipotente Differenzierungsfähigkeit auszeichnen. Die Osteoblasten sind die Zellen des Aufbauprozesses von Knochengewebe. Sie entstehen unter Einfluss bestimmter Transkriptions- und Differenzierungsfaktoren, wie z.B. Runx-2 und Osterix, aus den mesenchymalen Stammzellen (Nakashima et al. 2002, Otto et al. 1997). Sie synthetisieren Bestandteile der nichtmineralisierten Knochenmatrix (Osteoid). Aus den Osteoblasten entwickeln sich Osteozyten. Diese sind vollständig von Knochensubstanz umschlossen und stehen über ihre in Kanalikuli liegenden Fortsätze miteinander in Verbindung. Zusammen mit den Osteoblasten beeinflussen die Osteozyten die Mineralisation des Knochengewebes und übernehmen somit eine zentrale Rolle im Kalziumstoffwechsel. Die Osteoklasten wiederum dienen dem Abbauprozess von Knochengewebe. Sie entstehen, anders als Osteoblasten, aus Zellen des mononukleären Phagozytensystems, das der Hämatopoiese zugerechnet wird. Über die Interaktion von eingewanderten Monozyten mit membranständigen oder löslichen Liganden, wie z.B. M-CSF (macrophage colony stimulating factor) und RANKL (receptor activator of nuclear factor κ B ligand) kommt es zu einer Signaltransduktionskaskade, welche zur Fusion der Monozyten und damit zu deren Differenzierung in aktive Osteoklasten führt. Eine genaue Regulierung des Auf- und Abbaus ist für die Knochenhomöostase essenziell. Störungen des Knochenumbaus können zu Osteopathien wie Osteoporose oder Osteopetrosis führen (Böcker et al. 2008a). Die Osteoklastogenese wird über Osteoblasten, Osteozyten und sogenannte Lining-Cells (terminal differenzierte

Osteoblasten, welche die Knochenmatrix umgeben) reguliert. So können sie über M-CSF1 die Proliferation der Osteoklasten-Vorläuferzellen anregen (Wiktor-Jedrzejczak et al. 1990, Yoshida et al. 1990, Hagenaars et al. 1989) und über die Expression von RANKL die Fusionierung und somit Aktivierung von Osteoklasten induzieren (Palmqvist et al. 2002, Dougall et al. 1999, Yasuda et al. 1998). Im Gegensatz dazu können sie aber auch die Kaskade zur Aktivierung von Osteoklasten über den Faktor Osteoprotegerin (OPG) unterdrücken und so vor Knochenabbau schützen (Bucay et al. 1998, Simonet et al. 1997). Der Knochenabbau dauert in einem Osteon (Grundbaustein des Lamellenknochens) von Beginn bis Ende etwa 2-4 Wochen (Lerner 2006, Harada und Rodan 2003). Die sogenannte Umschaltphase verbindet die Knochenresorption mit der darauffolgenden Formationsphase. Diese Phase wird von Faktoren eingeleitet, die beim Verdau der Matrix durch Osteoklasten freigesetzt werden. Dies sind Wachstumsfaktoren der Familien TGF- β (transforming growth factor) und IGF (insulin like growth factor) wie z.B. BMP-2 (bone morphogenic protein) und FGF-2 (fibroblast like growth factor). Sie induzieren eine Einwanderung der mesenchymalen Stammzellen und deren Differenzierung in Osteoblasten (Sims und Gooi 2008, Ponte et al. 2007). Die Aufbauphase benötigt mit 4-6 Monaten deutlich mehr Zeit als die Resorption (Lerner 2006, Harada und Rodan 2003).

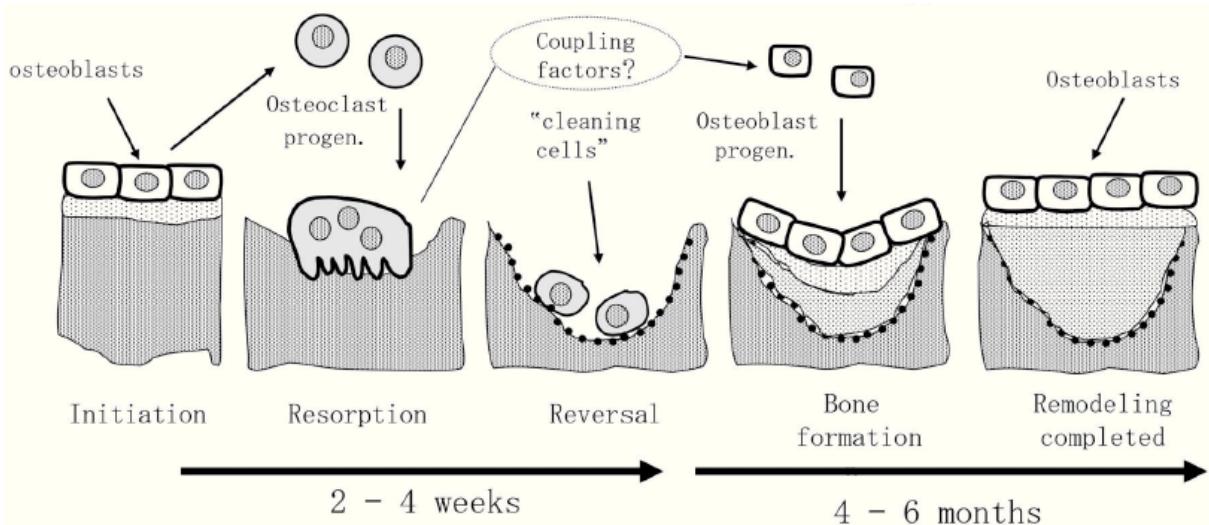


Abb. 1: Zeichnung des Knochenumbaus. Dargestellt sind die Phasen des Knochenabbaus und Knochenaufbaus sowie die daran beteiligten Zellen (Lerner 2006).

Ein Osteoklast baut zehnmal mehr Knochensubstanz ab, als von einem Osteoblasten gebildet wird. Für die Homöostase müssen somit entsprechend mehr

Osteoblasten als Osteoklasten vorhanden sein. Zudem gibt es noch viele weitere Faktoren, die eine Rolle im Knochenumbau spielen, zum Beispiel Parathormon, Östrogen, Calcitonin, Glukokortikoide, $1,25(\text{OH})_2\text{-VitaminD}_3$ sowie mechanische Beanspruchung. Ein regelrechter Ablauf der Knochenformation ist auch eine Grundvoraussetzung für die Heilung von Frakturen. Vor allem die Einwanderung der mesenchymalen Stammzellen in das Defektgebiet und die dortige Differenzierung in Osteoblasten ist dafür essenziell (Shapiro 2008, Niedzwiedzki et al. 1993).

1.2 Humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs)

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) sind undifferenzierte, multipotente Vorläuferzellen. Sie werden als adulte Stammzellen bezeichnet, weil sie im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen aus unterschiedlichen Geweben des erwachsenen Menschen isoliert werden können. Die drei Haupteigenschaften einer Stammzelle sind die Fähigkeit zur Selbstreplikation (Teilung in identische Tochterzellen), die Hierarchie (Unfähigkeit der Rückdifferenzierung zur Stammzelle) und die Plastizität (Differenzierung in unterschiedliche Gewebetypen). Für hMSCs wird davon die Plastizität als wichtigste Eigenschaft beschrieben (Delorme et al. 2006). Embryonale Stammzellen können in alle Zelltypen differenzieren (Totipotenz), hMSCs hingegen nur in bestimmte Richtungen (Multipotenz) (s. Abb. 2). Der Beginn und die Richtung der Differenzierung können über bestimmte Einflussfaktoren induziert werden. Darunter sind Botenstoffe wie Zytokine und diverse Wachstumsfaktoren bekannt. Aber auch Faktoren wie Zelldichte, räumliche Organisation und mechanische Kräfte beeinflussen die Differenzierung (Pittenger et al. 1999, Caplan 1991). Die hMSCs differenzieren vor allem in Gewebe mesodermalen Ursprungs wie Knochen (Aslan et al. 2006, Bruder et al. 1998), Knorpel (Bernardo et al. 2007, Wakitani et al. 1994), Fett (Prockop 1997, Rogers et al. 1995), Muskel (Kadivar et al. 2006, Ferrari et al. 1998) und Sehne (Awad et al. 1999, Young et al. 1998). In weiteren Studien konnte aber auch eine Differenzierung in ektodermalem Gewebe wie neurale Zellen (Temple 2001, Kopen et al. 1999) sowie endodermalem Gewebe wie Hepatozyten (Ong et al. 2006, Kang et al. 2005) oder Hautzellen (Deng et al. 2005) beobachtet werden.

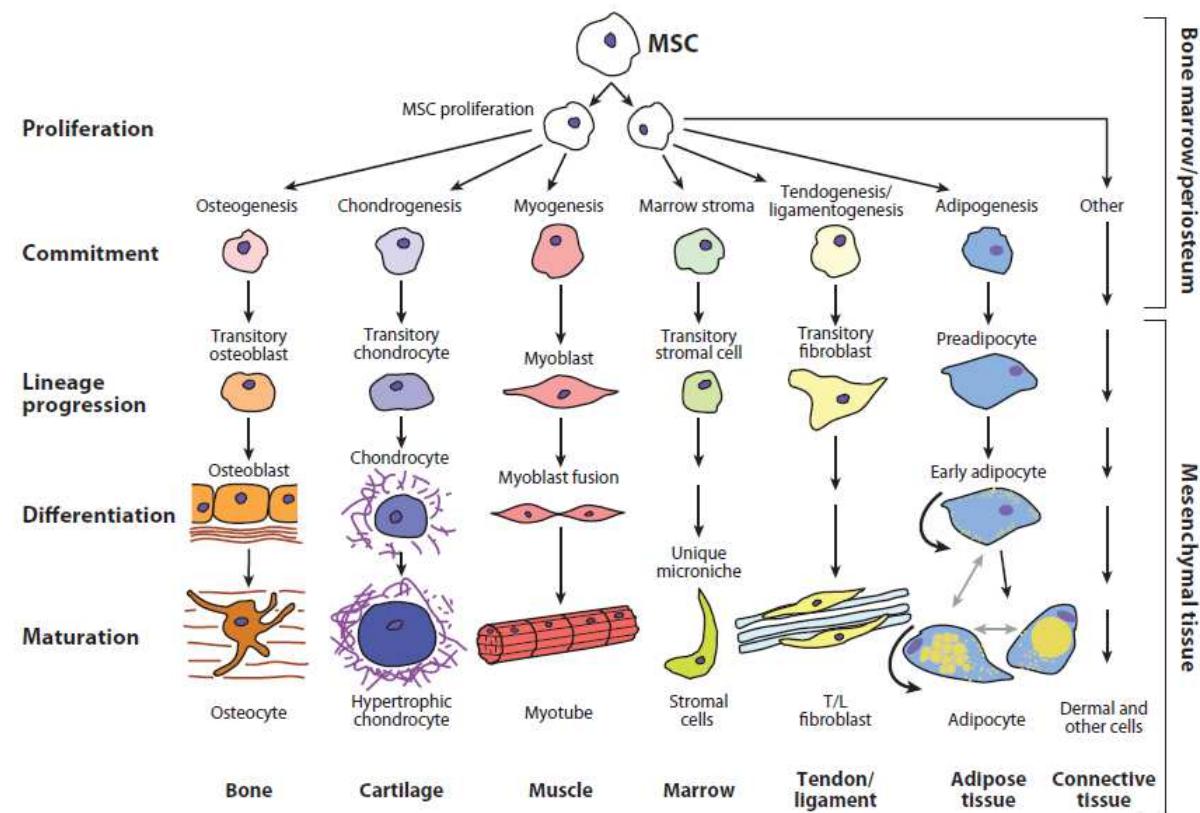


Abb. 2: Differenzierungspotenzial der mesenchymalen Stammzellen. MSCs aus dem Knochenmark können sich unter anderem zu Knochen, Knorpel, Muskel, Sehne oder Fettgewebe entwickeln (Singer und Caplan 2011).

Friedenstein et al. beschrieben 1966 erstmals aus dem Knochenmark isolierte Zellen, welche an Plastikoberflächen adhärieren können, die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen und sich osteogen differenzieren lassen. Später fand man heraus, dass diese hMSCs auch aus vielen anderen Geweben isoliert werden können. Darunter sind zum Beispiel Fettgewebe, Periost, trabekulärer Knochen, Muskelgewebe, peripheres Blut und Nabelschnurblut (Docheva et al. 2007). Es ist bekannt, dass hMSCs eine wichtige physiologische Rolle bei Reparatur, Regeneration und Erhalt von Knochen und anderen Geweben spielen. Der genaue Ablauf und die Regulation *in vivo* sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Dies ist Gegenstand in der Forschung anhand geeigneter Modellsysteme mit hMSCs *in vitro* und *in vivo* (Caplan 2005). Bereits in den 1990er Jahren entstand die Idee, dass patienteneigene hMSCs als Reparaturmaterial in der Therapie von Knochen- und Knorpeldefekten eingesetzt werden könnten (Caplan 1991). Gafni et al. (2004) beschreiben zwei Eigenschaften als das große Potenzial von hMSCs bei der Heilung von Knochen- und Knorpeldefekten. Sie wandern, angelockt von lokalen Faktoren, gezielt in das Defektgebiet ein und können dort osteogen oder chondrogen

differenzieren. Zweitens können sie auch umliegende Zellen zur Proliferation und Regeneration stimulieren. Bisher wurde frisch isoliertes Knochenmark in großen Knochendefekten für eine bessere und schnellere Heilung eingesetzt. Da die hMSCs jedoch nur einen winzigen Teil der Zellen in dem aspirierten Knochenmark ausmachen, wurden Methoden zur Isolierung und Vermehrung der Stammzellen entwickelt. Heute wird im Tissue-Engineering daran gearbeitet, eine Optimierung von Knochenleitschienen durch die Besiedelung mit isolierten hMSCs zu erzielen. Solche wurden bereits in Tiermodellen (Kon et al. 2000, Bruder et al. 1998) bei Defekten langer Röhrenknochen eingesetzt und auch schon auf den Menschen übertragen (Panetta et al. 2009, Quarto et al. 2001). Ein weiterer Bereich für den therapeutischen Einsatz von hMSCs besteht in der Gentherapie. Bei genetischen Erkrankungen, wie zum Beispiel der Osteogenesis Imperfecta, sollen mutierte Wirtszellen durch gesunde allogene hMSCs oder gentherapeutisch veränderte autogene hMSCs ersetzt werden (Evans 2012, Bobis et al. 2006). Ein anderer Ansatz nutzt die hMSCs, um Reparaturmechanismen im Defektgebiet zu stimulieren oder Abbaumechanismen zu hemmen. Dafür können isolierte hMSCs genetisch so verändert werden, dass sie bestimmte Wachstumsfaktoren oder therapeutisch wirksame Proteine bilden (Phillips et al. 2007, Heyde et al. 2007, Caplan und Bruder 2001). Es wurden zum Beispiel hMSCs hergestellt, die rekombinantes humanes BMP-2 (bone morphogenic protein-2) bilden (Meinel et al. 2006, Gazit et al. 1999). Es ist weiterhin erforderlich, Erkenntnisse über die genauen Mechanismen der hMSCs in der Defektheilung zu gewinnen. Die entscheidende Herausforderung bleibt, die daraus entstehenden Ideen so zu perfektionieren, dass sie tatsächlich ein klinischer Bestandteil in der Therapie von Knochendefekten werden können.

1.3 Lentiviraler Gentransfer

Wie oben angesprochen, bieten genetisch veränderte hMSCs eine Möglichkeit für den therapeutischen Einsatz von Gewebedefekten bzw. können vorerst als Modellsystem für Untersuchungen dienen. Gentransfer bezeichnet das Einbringen fremder DNA in Wirtszellen, um so die Expression eines bestimmten Proteins zu beeinflussen. Dafür gibt es virale und nicht-virale Methoden (physikalisch und chemisch). Beide haben Vor- und Nachteile, die für jedes Studiendesign individuell beurteilt werden müssen. Drei Hauptkriterien muss aber jede Methode erfüllen: das

Transgen muss durch die Plasmamembran in den Nukleus transportiert werden, das Transgen muss vor der Degradierung durch intrazelluläre Nukleasen geschützt werden und die Methode darf keinen schädlichen Effekt auf die Zelle haben (Gao et al. 2007). Oligino et al. (2000) geben eine Übersicht über die zur Verfügung stehenden viralen Vektoren mit ihren Vor- und Nachteilen. Dies sind Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren, Herpes Simplex-Viren und Retroviren. In dieser Studie wurde das lentivirale Gentransfersystem ausgewählt. Lentiviren basieren auf dem humanen Immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV-1) und gehören in eine spezialisierte Klasse der Retroviren. Ihr großer Vorteil gegenüber onkoretroviralen Vektoren besteht darin, dass sie nicht nur sich teilende Zellen, sondern auch ruhende Zellen stabil und effizient transduzieren können (Roe et al. 1993, Cohen 1996). Zusätzlich – und im Hinblick auf die Gentherapie wichtig – haben lentivirale Vektoren die Vorteile, dass sie relativ große Gene übertragen können, dass sie eine nur geringe Entzündungs- und Immunantwort auslösen und dass sie durch den festen Einbau in das Genom der Wirtszelle zu einer stabilen Langzeitexpression des Transgens führen (Kofron und Laurencin 2006, Wilson 2004, Gamradt und Lieberman 2004). Ein Nachteil der Lentiviren ist, dass durch die Insertion des Transgens Proto-Onkogene aktiviert werden könnten und die Wirtszellen damit maligne entarten. Um dieses Risiko zu verringern, werden selbstinaktivierende Vektoren verwendet und zusätzlich können in diese regulierende Promotoren eingebaut werden (Beard et al. 2007a, Beard et al. 2007b). Mehrere Studien konnten zeigen, dass in hMSCs mittels lentiviralem Gentransfersystem eine besonders hohe Transduktionseffizienz und Transgenexpression erreicht werden kann (Xia et al. 2005, Davis et al. 2004, Zhang et al. 2002). Zudem werden dabei weder die Differenzierungsfähigkeit noch die Proliferation der hMSCs beeinträchtigt (Van Damme et al. 2006, Kim et al. 2005, Zhang et al. 2002). Die Tatsache, dass Lentiviren auch sich nicht teilende Zellen transduzieren können, ist vor allem bei Verwendung von hMSCs wichtig, da diese zum Teil ruhend vorliegen (Conget und Minguell 1999).

1.4 Vorkommen, Struktur und Eigenschaften von Hyaluronan (HA)

Hyaluronan (HA, früher auch Hyaluronsäure) ist in allen Geweben und Flüssigkeiten von Wirbeltieren zu finden. In der Ratte wurde die Hälfte des gesamten Hyaluronans in der Haut vorgefunden, ein Viertel im Skelett sowie seinen verbindenden Strukturen

wie Gelenken und Bändern und der Rest verteilt auf Muskeln und innere Organe (Fraser et al. 1997). Die gleichen Verhältnisse lassen sich auch auf den Menschen übertragen. HA ist hauptsächlich ein extrazelluläres und mit der Zelloberfläche assoziiertes Glykosaminoglykan. Das große, negativ geladene, unverzweigte Polymer besteht aus sich wiederholenden Disacchariden aus D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Glukosamin ($[-\beta(1,4)\text{-GlcUA-}\beta(1,3)\text{-GlcNAc-}]_n$) (s. Abb. 3).

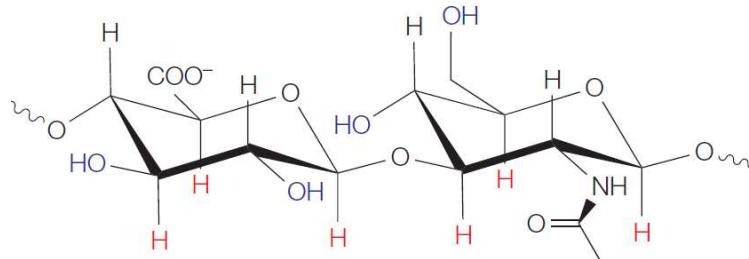


Abb. 3: Struktur von Hyaluronan, bestehend aus sich wiederholenden Disacchariden aus D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Glukosamin ($[-\beta(1,4)\text{-GlcUA-}\beta(1,3)\text{-GlcNAc-}]_n$). Das Polymer besitzt geladene Carboxyl-Gruppen (COO^-) auf der einen und hydrophobe Wasserstoffatome (in Rot) auf der anderen Seite (Toole 2004).

Unter normalen physiologischen Umständen besteht eine HA-Kette aus 2.000-25.000 Disacchariden, was einer molekularen Masse von $10^6\text{-}10^7$ Da und einer Länge von 2-25 μm entspricht. Im Gegensatz zu anderen Glykosaminoglykanen ist HA nicht sulfatiert, nicht an ein Kernprotein gebunden und wird nicht im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat, sondern über Synthasen in der Plasmamembran synthetisiert. Durch die gegenseitige Abstoßung der Carboxylgruppen kann das HA-Molekül in Lösungen expandieren und ein großes Volumen einnehmen. Dies zeigt sich in seinen hydrodynamischen Eigenschaften, vor allem in Bezug auf die Viskosität und die Fähigkeit, Wasser zu binden (Toole 2004).

1.5 Struktur, Mechanismus und Regulation der Hyaluronansynthase

Hyaluronansynthasen (HAS) sind die für die Synthese von HA verantwortlichen Enzyme. Sie sind komplexe Membranproteine mit sieben transmembranen Domänen. Der N- und C-Terminus sowie die große zentrale Domäne liegen im Inneren der Zelle (Weigel et al. 1997) (s. Abb. 4). Von der zentralen Domäne wird vermutet, dass sie das aktive Zentrum des Enzyms trägt (DeAngelis und Weigel 1994). Anders als bei bakterieller HAS wird bei der Wirbeltier-HAS die HA-Kette am

nichtreduzierenden Ende der Kette verlängert (Tlapak-Simmons et al. 2005). HA wird an der Innenseite der Zellmembran synthetisiert und dann entweder innerhalb der Zelle gehalten, in die extrazelluläre Matrix ausgestoßen oder verbleibt gebunden an die HAS an der Zellmembran (Bastow et al. 2008). Wie das HA letztlich exportiert wird, ob über ABC-Transporter oder auf andere Weise, wird kontrovers diskutiert (Thomas und Brown 2010, Schulz et al. 2007).

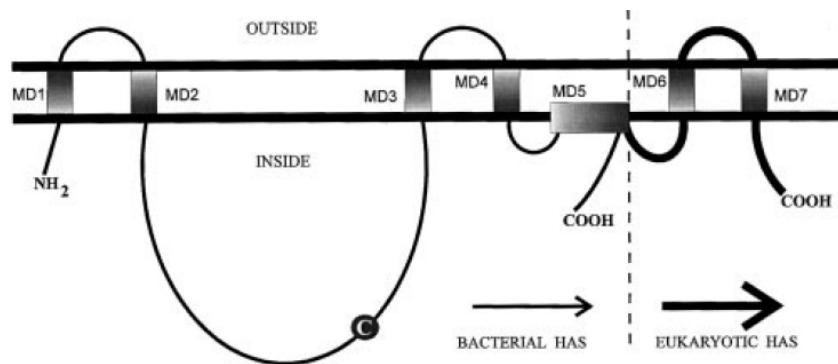


Abb. 4: Modell der 3D-Struktur von HAS. Dargestellt sind die sieben transmembranären Domänen, die intrazellulär liegende zentrale Domäne sowie der intrazelluläre N- und C-Terminus des Proteins (Weigel et al. 1997).

Bei Säugetieren sind drei Isoformen bekannt: HAS1, HAS2 und HAS3. Diese zeigen eine hohe Homologie in ihrer Sequenz und Struktur. Sie unterscheiden sich aber in ihrer Stabilität, ihrer Syntheserate und der Länge des HA, das sie produzieren (Itano et al. 1999). HAS1 und HAS2 produzieren ein großes HA mit einem Molekulargewicht von 2×10^5 - 2×10^6 Da. HAS3 dagegen produziert kürzere HA-Ketten mit einem Molekulargewicht von nur 1×10^5 - 10^6 Da. Sie wurde jedoch als deutlich aktiver als HAS1 und HAS2 erkannt (Calabro et al. 2002). Die Kettenlänge und Syntheserate hängen allerdings auch vom Zelltyp ab (Allison und Grande-Allen 2006). Durch das an die Synthasen gebundene HA wird eine Art perizellulärer HA-Mantel gebildet. Zellen, die mit HAS1 transduziert wurden, zeigen einen signifikant schmaleren HA-Mantel als die HAS2- und HAS3-Zellen (Itano et al. 1999). Die Expressionsmuster der drei Isoformen unterscheiden sich je nach Gewebe. Im Folgenden wird nur auf die Verteilung in Knochen- und Knorpelzellen eingegangen. Über Osteoblasten wird berichtet, dass sie HAS2 und HAS3 exprimieren (Adams et al. 2006, Nishida et al. 2005). In Chondrozyten ist HAS2 die Hauptisoform, aber auch HAS3 kommt in geringen Mengen vor (Albrecht et al. 2009, Adams et al. 2006). Ob es eine Expression von HAS1 in Osteoblasten und Chondrozyten gibt, wird

kontrovers diskutiert (Albrecht et al. 2009, Calabro et al. 2002, Recklies et al. 2001, Hiscock et al. 2000, Takada et al. 1999). In Synovialzellen (Recklies et al. 2001) und Knochenvorläuferzellen aus Patienten mit Multiplem Myelom wurde HAS1 jedoch stark exprimiert vorgefunden (Calabro et al. 2002). Eine Expressionsstudie über HAS in hMSCs zeigte, dass alle drei Isoformen exprimiert werden, davon HAS2 am stärksten und HAS3 am schwächsten (Qu et al. 2014).

Die genaue Regulation der HAS ist noch nicht bekannt. Vermutet wird ein multifaktorieller Prozess, der individuell für das jeweilige HAS-Isoenzym bzw. Gewebe abläuft. Bisher wurde eine Regulation durch externe Signale beschrieben z.B. über Wachstumsfaktoren wie TGF- β 1 (transforming growth factor β 1) und KGF (keratinocyte growth factor) sowie über Zytokine wie IL-1 β (Interleukin 1 β) und Interferon γ (Karvinen et al. 2003, Sayo et al. 2002, Recklies et al. 2001). Rilla et al. (2005) konnten zeigen, dass die HAS nur in ihrer Lokalisation in der Plasmamembran aktiv ist und vermuten zudem, dass erst die Aktivierung der HAS ihren Einbau in die Plasmamembran induziert und sie nur so lange dort verbleibt, wie sie auch aktiv HA synthetisiert. Der intrazellulär gelagerte Pool an HAS ermöglicht eine schnelle Aktivierung der HAS. Karousou et al. (2010) beschreiben eine Regulation der HAS2-Aktivität über Ubiquitinierung und Bildung von Dimeren. Andere Studien berichten von einer Steuerung der HAS-Aktivität über Phosphorylierung durch Proteinkinase A und K (Goentzel et al. 2006, Suzuki et al. 1995). Da Enzyme der gleichen Enzymfamilie oft ähnliche Regulationsmechanismen aufweisen, kann versucht werden, bekannte Mechanismen auf andere Mitglieder zu übertragen und dort nachzuweisen. Die HAS gehört wie die Chitinsynthase und die Cellulosesynthase zu der GT2-Familie der Glycosyltransferasen (Richmond und Somerville 2000, Watanabe und Yamaguchi 1996). Von der Cellulosesynthase und der Chitinsynthase ist bekannt, dass sie in Wechselwirkung mit dem Zytoskelett stehen. Die Myosin-Chitinsynthase wird über eine direkte Interaktion ihrer Myosindomäne mit dem Aktinzytoskelett reguliert (Weiss et al. 2006). Von Cellulosesynthasen ist nicht bekannt, wie sie genau in Wechselwirkung mit dem Zytoskelett treten, jedoch wurde beobachtet, dass sie sich entlang der Mikrotubuli in der Plasmamembran bewegen (Gutierrez et al. 2009).

1.6 Funktionen von Hyaluronan und seinen Rezeptoren

HA ist nicht nur das biologische Schmiermittel in Geweben und Gelenken, für das es lange Zeit gehalten wurde, sondern es nimmt auch Einfluss auf zahlreiche Vorgänge in unterschiedlichen Geweben. Es kann zelluläre Vorgänge regulieren, indem es die Makro- und Mikroumgebung der Zellen beeinflusst oder indem es direkt über Rezeptoren an die Zellen bindet (Chen und Abatangelo 1999). Die drei Hauptrezeptoren für Interaktionen mit HA sind die Oberflächenrezeptoren CD44 (cluster of differentiation 44), RHAMM (receptor for hyaluronan mediated motility) und ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1). Die Interaktion mit CD44 bewirkt eine Zellaktivierung, Zellmigration, Zellproliferation sowie Aufnahme und Abbau von HA. Die Expression von RHAMM und Bindung an HA beeinflusst die Zellbewegung. Die Wechselwirkung von HA und ICAM-1 wirkt bei der Einleitung von Entzündungsreaktionen mit (Toole 2004, Chen und Abatangelo 1999). So scheint hochmolekulares HA positiven Einfluss auf den Ablauf akuter Entzündungen nehmen zu können (Jiang et al. 2005). Außerdem kann durch die Aufrechterhaltung einer HA-reichen Umgebung die Zellmigration, Zellproliferation und der Umbau der extrazellulären Matrix gefördert werden (Itano et al. 2002, Evanko et al. 1999). Es wird auch beschrieben, dass HA die Fähigkeit besitzt, über Rezeptoren, welche mit dem Zytoskelett interagieren, direkten Einfluss auf die Zellmotilität zu nehmen (Bourguignon et al. 2001). Weiter reguliert HA das Zellverhalten während der Embryonalentwicklung (Li et al. 2007, Toole 2001), bei Heilungsprozessen in verschiedenen Geweben, insbesondere Knochen und Haut (Baldini et al. 2010, Ballini et al. 2009, Baier Leach et al. 2003, Pienimäki et al. 2001), bei Entzündungen (McKee et al. 1996), bei der Angiogenese (Raines et al. 2011, Savani et al. 2001) und der Tumorentstehung (Stern 2003, Toole und Hascall 2002).

1.7 Rolle von HA in der Knochenbildung

In der Skelettkontrolle hat HA verschiedene Aufgaben. Während der Gliedmaßenentwicklung bietet eine Hyaluronan-reiche Matrix das richtige Milieu für die Migration von mesenchymalen Zellen zur Gliedmaßenanlage. Außerdem hilft die Hyaluronan-reiche Matrix bei der Induktion der Chondrogenese, indem sie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen verhindert (Ishida et al. 1997). Hyaluronan ist

auch bei der Ausbildung der Gelenkhöhle und beim longitudinalen Knochenwachstum entscheidend (Moffatt et al. 2011). Im adulten Knorpelgewebe organisiert Hyaluronan die Matrix. Es bindet an Aggrecan, das dadurch in hohen Konzentrationen vorliegt und so dem Knorpel unter Druckbelastung hohe Widerstandsfähigkeit und Dehnbarkeit verleiht. Zudem scheint HA auch eine Rolle beim Knochenumbau einzunehmen, indem es das Verhalten der Osteoklasten, Osteoblasten und Osteozyten beeinflussen kann (Salbach et al. 2012, Bastow et al. 2008, Prince 2004) (s. Abb. 5). Über die Interaktion mit CD44 kann HA die Osteoblasten-vermittelte Osteoklastogenese und die Befestigung der Osteoklasten an Oberflächen hemmen (Fujii et al. 2003, Spessotto et al. 2002, Zimmerman et al. 2002, Sterling et al. 1998). Außerdem kann exogenes HA die RANKL-induzierte Knochenresorption durch Osteoklasten stoppen und deren Migration an die Resorptionsstelle behindern (Chang et al. 2007, Prince 2004). Die jeweilige Beeinflussung der Zellfunktion scheint von den verschiedenen Längen der HA-Ketten abzuhängen. Es gibt Studien, die beschreiben, dass HA einen Einfluss auf die Rekrutierung, Proliferation und Differenzierung von Prä-Osteoblasten hat (Zou et al. 2008, Itoh et al. 2001). Der genaue osteoinduktive Effekt ist aber noch unklar. Außerdem wird vermutet, dass HA eine Funktion in der Regulierung der Knochenmineralisation hat (Huang et al. 2003, Boskey und Dick 1991).

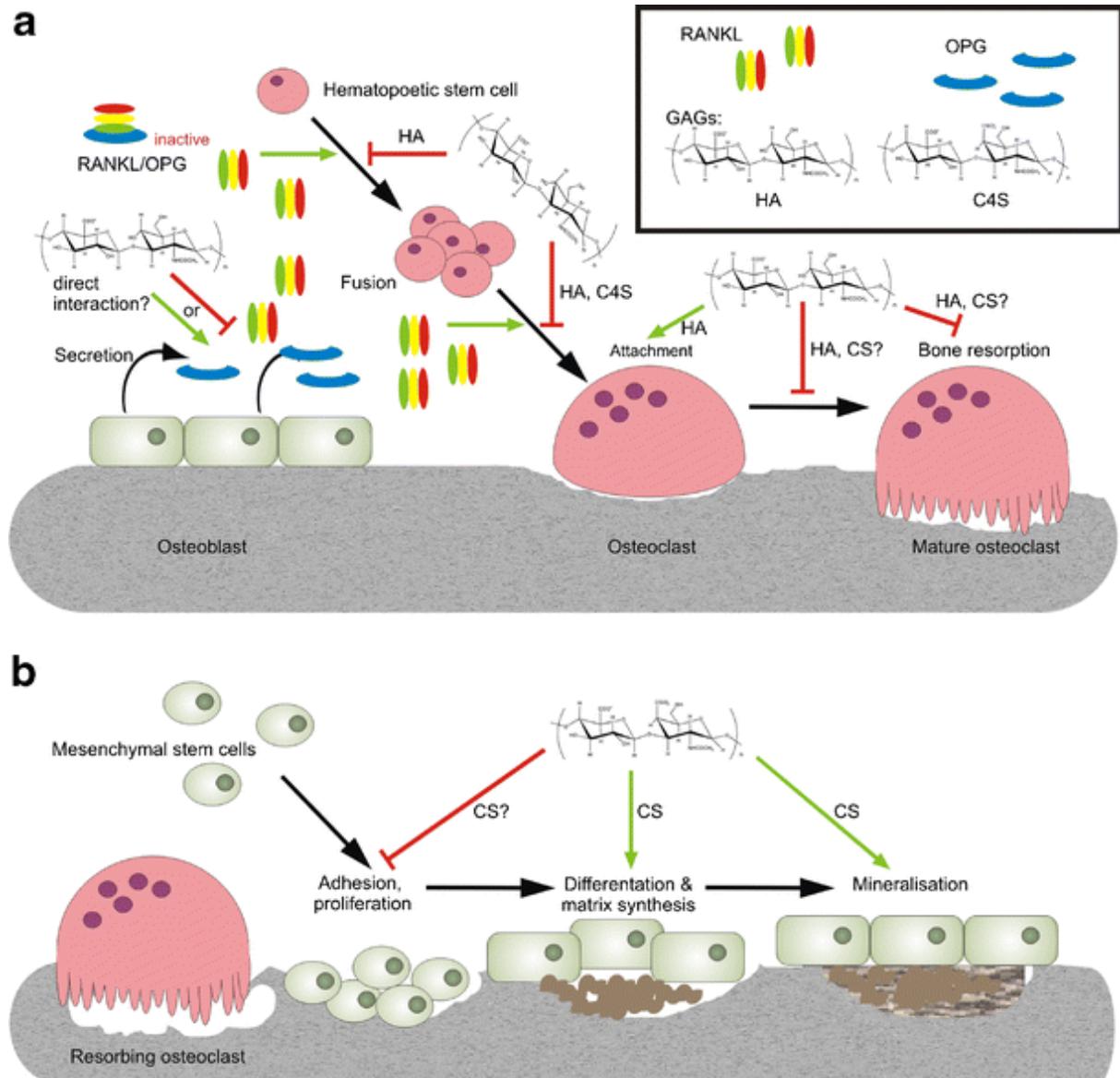


Abb. 5: Zelluläre und molekulare Interaktion von HA im Knochenumbau. HA spielt eine Rolle bei der Bildung, Differenzierung und Funktion von Osteoklasten und Osteoblasten. GAGs Glykosaminoglykane, CS Chondroitinsulfat, C4S Chondroitin-4-Sulfat, HA Hyaluronan, OPG Osteoprotegerin, RANKL Receptor Activator of NF- κ B Ligand (Salbach 2012).

1.8 HA und Knochenerkrankungen

HA scheint bei diversen Knochenerkrankungen eine Rolle zu spielen. In hMSCs aus Patienten mit Multiplem Myelom ist die Expression von HAS1 stärker und von HAS2 schwächer als in gesunden hMSCs (Calabro et al. 2002). Bei den Patienten dieser Tumorerkrankung kommt es zu Knochenbrüchen durch Auflösung des Knochengewebes. Die Knochen von Patienten mit Osteogenesis Imperfecta enthalten 1,5 bis 3 Mal so viel Hyaluronan wie gesunder Knochen (Oohira und

Nogami 1989). Bei der Untersuchung des Genexpressionsmusters in osteoporotischen und seneszenten hMSCs wurde eine verminderte Expression des HA-Rezeptors RHAMM und der Hyaluronansynthasen HAS1 und HAS2 nachgewiesen (Benisch et al. 2012). Dies könnte eine Erklärung für die eingeschränkte Motilität und Rekrutierbarkeit der osteoporotischen Zellen sein und damit die erschwerete Frakturheilung bei Osteoporosepatienten zur Folge haben. Die exakten Aufgaben und Mechanismen von HA im adulten Knochen und in der Knochenhomöostase sind noch unbekannt. Diese zu verstehen ist Gegenstand aktueller Forschung (Salbach et al. 2012) und entscheidend für die Entwicklung neuer Therapieansätze. Beispielsweise spielt HA eine große Rolle bei der Entwicklung von Gewebe-Scaffolds für eine verbesserte Frakturheilung (Unterman et al. 2012). In unserer alternden Bevölkerung wächst der Bedarf an Knochenersatzmaterialien unter anderem, weil der Prozentsatz der an Osteoporose erkrankten Personen ansteigt (Mathieu et al. 2006).

1.9 Zielsetzung

Die oben für Chitin- und Cellulosesynthasen beschriebene Regulation durch eine Interaktion der Enzyme mit dem Zytoskelett ist auch für die HAS denkbar und kann durch geeignete Versuchsmodelle untersucht werden. Kultti et al. beschreiben bereits einen Zusammenhang zwischen HAS und dem Aktinzytoskelett. Überexprimierte, GFP-getaggte HAS3 und HAS2 aus Maus führen in verschiedenen Zelltypen zur Ausbildung von Mikrovillus-ähnlichen Ausstülpungen. Aktive HAS, Aktin und perizelluläres HA sind für die Ausbildung und Stabilisierung der Ausstülpungen verantwortlich. CD44 und RHAMM sind jedoch nicht nötig (Kultti et al. 2006). Bisher ist aber noch nicht bekannt, ob und wie die HAS mit dem Aktinzytoskelett interagieren.

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein Modellsystem in humanen mesenchymalen Stammzellen für die Untersuchung der putativen Interaktion der HAS mit dem Zytoskelett zu entwickeln. Dafür sollten hMSCs hergestellt werden, die jeweils HAS1-eGFP, HAS2-eGFP und HAS3-eGFP stabil und funktionell exprimieren. Mittels konventioneller Klonierungsmethoden sollten die Sequenzen der drei HAS-Isoformen mit einem eGFP-Tag fusioniert und in den Vektor pLenti4.3/V5-DEST eingefügt werden. Mit dem eGFP-Tag kann einerseits die HAS-Expression direkt mittels

Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden und andererseits die Lokalisation der HAS in der Zelle untersucht werden. Mit dem pLenti4.3/V5-DEST-Vektor können Lentiviren hergestellt werden, welche ein optimales Gentransfersystem für die Transduktion von hMSCs bieten. Die Überexpression der HAS-eGFP sollte auf RNA-Ebene mittels RT-PCR und auf Proteinebene mittels Western Blot untersucht werden. Für den Nachweis der Funktionalität der HAS sollte zum einen das in den Zellüberstand sekretierte HA mittels ELISA quantifiziert werden. Zum anderen sollte dafür ein Aktivitätsassay im Labor neu etabliert werden, bei dem HA mit dem biotinylierten Hyaluronanbindeprotein (bHABC) gefärbt wird. Wie oben beschrieben müssen die HAS, um funktionell zu sein, in die Plasmamembran eingebaut werden. Diese Lokalisation sollte mittels Immunfluoreszenz gegen die HAS-eGFP sowie den Oberflächenmarker CD44 zur Färbung der Membran untersucht werden. Zudem sollte die Kolokalisation von HAS und Aktin mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden. Dafür wurde in fixierten Zellen das Aktinzytoskelett durch Phalloidin gefärbt. Parallel dazu sollten mit den gleichen Klonierungs- und Transduktionsmethoden doppelgefärbte hMSCs hergestellt werden, bei denen neben den HAS auch das F-Aktin fluoreszenzmarkiert wurde. Dies sollte durch das Protein Lifeact-mRFPuby, welches F-Aktin in lebenden und fixierten Zellen färben kann, erreicht werden. Mittels Timelapse-Fluoreszenzmikroskopie sollte *in vitro* untersucht werden, ob die HAS in der Plasmamembran entlang der F-Aktin-Filamente wandern.

Die in diesem Projekt hergestellten Zellen sollen folglich als Modellorganismus für die Untersuchung der möglichen regulativen Interaktion der HAS mit dem Aktinzytoskelett dienen. Genaue Erkenntnisse über diesen Regulationsmechanismus können Impulse für neue Therapieansätze für Krankheiten liefern, bei denen HA eine wichtige Rolle spielt. Insbesondere bei Patienten mit Osteoporose ist durch solche Therapieansätze eine verbesserte Heilung bei Frakturen zu erwarten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und sonstige Substanzen

| Stoffbezeichnung | Hersteller/Bezugsquelle |
|--|---|
| Acrylamide Mix | Fluka, Steinheim |
| Agar | BD (Becton Dickinson), Heidelberg |
| Agarose | Biozym, Hessisch Oldendorf |
| Alexa Fluor 546 Phalloidin | Invitrogen, Darmstadt |
| Ampicillin Natriumsalz | Roth, Karlsruhe |
| APS | Roth, Karlsruhe |
| Bacto-Agar | BD, Heidelberg |
| Bacto-Hefeextrakt | BD, Heidelberg |
| Bacto-Trypton | BD, Heidelberg |
| bHABC | Merck, Darmstadt |
| Blasticidin | Invitrogen, Darmstadt |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | Roth, Karlsruhe |
| Bromphenolblau | Merck, Darmstadt |
| CaCl ₂ | Merck, Darmstadt |
| DABCO | Fluka, Steinheim |
| DAPI | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Merck, Darmstadt |
| dNTP Mix | Roche, Penzberg |
| Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung (D-PBS) | PAA, Pasching, Österreich / Biochrom, Berlin |
| EDTA | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| EGTA | Roth, Karlsruhe |
| Essigsäure | Merck, Darmstadt |
| Ethanol | Merck, Darmstadt |
| Ethidiumbromid | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| ExtrAvidin(TM)-Peroxidase | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Fetales Kälberserum (FBS) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |

| | |
|---|--------------------------------|
| Formaldehyd | Merck, Darmstadt |
| Gel-Ladepuffer, 6x Blue Dye | New England BioLabs, Frankfurt |
| Geneticin | Life Technologies, Darmstadt |
| Glycerol | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Glycin | Roth, Karlsruhe |
| Glycerin | Roth, Karlsruhe |
| HCl | Merck, Darmstadt |
| HEPES | Roth, Karlsruhe |
| Hyaluronidase | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Image-iT FX Signal Enhancer | Life Technologies, Darmstadt |
| KAc | Merck, Darmstadt |
| Kanamycin | Roth, Karlsruhe |
| KCl | Roth, Karlsruhe |
| Lumiata Classico/Crescendeo Western HRP | Millipore, Billerica, USA |
| Substrate | |
| Magnesiumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| MEM-NEAA | Life Technologies, Darmstadt |
| Methanol | Merck, Darmstadt |
| MgCl ₂ | Roth, Karlsruhe |
| Milchpulver | Merck, Darmstadt |
| MnCl ₂ | Roth, Karlsruhe |
| MOPS/NaOH | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Mowiol | Calbiochem, Darmstadt |
| NaCl | Merck, Darmstadt |
| NaDOC | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| NaF | Merck, Darmstadt |
| NEBuffer | New England BioLabs, Frankfurt |
| Paraformaldehyd | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| PCR-Puffer ± MgCl ₂ | Roche, Penzberg |
| Penicillin-Streptomycin-Lösung | PAA, Pasching, Österreich |
| PIPES | Fluka, Steinheim |
| Protease-Inhibitor | Roche, Penzberg |
| Pyruvat | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| SDS | Roth, Karlsruhe |

| | |
|--|------------------------------|
| SOC Medium | Invitrogen, Darmstadt |
| TEMED | Roth, Karlsruhe |
| Tris-Base | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Tris-HCl | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Triton X-100 | Fluka, Steinheim |
| Trypsin-EDTA (10x) | PAA, Pasching, Österreich |
| Tween 20 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Uridine 5'-Diphosphoglucuronsäure- | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Trinatriumsalz | |
| Uridine 5'-Diphospho-N-Acetylglucosamin- | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Natriumsalz | |
| Wasserstoffperoxid | Merck, Darmstadt |
| X-Gal | Roth, Karlsruhe |
| Zeiss Immersionsöl | Pulch + Lorenz, March |
| Zellkulturmedium D-MEM high Glucose | PAA, Pasching, Österreich |
| Zellkulturmedium α-MEM high Glucose | Life Technologies, Darmstadt |
| Zeocin | Invitrogen, Darmstadt |
| β-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| 3,3'-Diaminbenzidine | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |

2.1.2 Puffer und Lösungen

10x Laupuffer:

0,25 M Tris-Base
1,92 M Glycin
1% SDS

10x Blotpuffer:

0,25 M Tris-Base
1,92 M Glycin
auf pH 8,3 einstellen

1x Blotpuffer:

10% 10x Blotpuffer
20% Methanol

4x Laemmli-Puffer:

200 mM Tris-HCl pH 6,8
40% Glycerol
10% SDS
30% β -Mercaptoethanol
0,02% Bromphenolblau

Waschpuffer (TBS-Tween20):

10 mM Tris-HCl pH 7,4
150 mM NaCl
0,05% Tween 20

Blockierlösung:

5% Milchpulver
in Waschpuffer

Stripping-Puffer:

100 mM β -Mercaptoethanol
2% SDS
62,5 mM Tris-HCl pH 6,8

50x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer):

242 g Tris-Base
57,1 ml reine Essigsäure
100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
ad 1 l mit H_2O , auf pH 8,3 einstellen

PHEM:

6 mM PIPES
25 mM HEPES
10 mM EGTA
3 mM MgCl₂

RIPA-Puffer:

0,1% SDS
1% NaDOC
1% Triton X-100
50 mM Tris-HCl pH 8,2
150 mM NaCl
10 mM EDTA
20 mM NaF

Mowiol-Lösung:

6 g Glycerin
2,4 g Mowiol
6 ml H₂O dest.
12 ml 0,2 M Tris-HCl pH 8
0,024 g DABCO

Tfb I:

30 mM KAc
50 mM MnCl₂
100 mM KCl
15% (v/v) Glycerin
mit 2 M HCl auf pH 5,8 einstellen

Tfb II:

10 mM MOPS/NaOH
75 mM CaCl₂
10 mM KCl
15% (v/v) Glycerin

2.1.3 Enzyme

| | |
|--|-------------------------------------|
| CIP Enzym (Calf Intestine alkaline Phosphatase) | New England BioLabs, Frankfurt/Main |
| FastStart High Fidelity Enzyme Blend (mit proof-reading) | Roche, Penzberg |
| FastStart Taq DNA Polymerase (ohne proof-reading) | Roche, Penzberg |
| Hyaluronidase | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Klenow Enzym | New England BioLabs, Frankfurt/Main |
| LR Clonase II Enzymmix | Invitrogen, Darmstadt |
| Quick Ligase (Quick T4 DNA Ligase) | New England BioLabs, Frankfurt/Main |
| Restriktionsendonukleasen | New England BioLabs, Frankfurt/Main |
| RNAse freie DNase | Qiagen, Hilden |
| Transkriptor Reverse Transkriptase | Roche, Penzberg |

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Primärantikörper

| Antikörper | Wirt | Firma |
|-----------------------|-----------|-------------------------------------|
| Anti-CD44 (1998-1) | Kaninchen | Epitomics, Burlingame, USA |
| Anti-CD44 (156-3C11) | Maus | Cell Signaling Techn., Danvers, USA |
| Anti-HAS2 (AP5687c) | Kaninchen | Abgent, San Diego, USA |
| Anti-β-Aktin | Maus | Santa Cruz Biotech., Heidelberg |
| Anti-HAS3 (266-281) | Kaninchen | Sigma-Aldrich, St.Louis, USA |
| Anti-GFP Epitope Tag | Kaninchen | Dianova, Hamburg |
| Anti-HAS1 (ab 128321) | Kaninchen | Abcam, Cambridge, USA |

2.1.4.2 Sekundärantikörper

| Antikörper | Wirt | Firma |
|------------------------------------|-------|---------------------------------|
| Alexa Fluor 546 donkey-anti-rabbit | Esel | Invitrogen, Darmstadt |
| Alexa Fluor 488 donkey-anti-rabbit | Esel | Invitrogen, Darmstadt |
| Alexa Fluor 546 donkey-anti-mouse | Esel | Invitrogen, Darmstadt |
| Anti-mouse-HRP | Ziege | Rockland, Gilbertsville, USA |
| Anti-rabbit-HRP | Ziege | Santa Cruz Biotech., Heidelberg |

2.1.5 Medien

2.1.5.1 Medien für Bakterienkulturen

LB₀-Medium: 1% NaCl
 0,5% Bacto-Hefeextrakt
 1% Bacto-Trypton
 ad 1 l H₂O, auf pH 7,2-7,5 einstellen
 autoklavieren

LB_{Amp}-Medium: LB steril ad 100 µg/ml Ampicillin
 LB_{Kan}-Medium: LB steril ad 100 µg/ml Kanamycin
 LB-Platten: jeweiliges Medium mit 1,6% Agar

2.1.5.2 Medien und sonstige Materialien für Zellkulturen

Medium für 293FT: 10% FBS
 1% Penicillin/Streptomycin
 0,1 mM MEM-NEAA
 1 mM Pyruvat
 in D-MEM high Glucose
 ± 500 µg/ml Geneticin

Medium für hMSCs und SCP1:

10% FBS
 1% Penicillin/Streptomycin
 in α-MEM high Glucose
 ± Zeocin (0,1 mg/ml) und/oder Blasticidin (0,01 mg/ml)

Einfriermedium: 10% DMSO

20% FBS
 70% α- MEM

Zellkulturmaterialien

| | Bezugsquelle |
|---|-----------------------------|
| μ-Slide VI ^{0.4} | Ibidi, Martinsried |
| Glasobjekträger Typ AA00000102E | Menzel-Gläser, Braunschweig |
| Quadriperm | Starstedt, Nürnberg |
| Zellkulturflaschen 25, 75, 150, 225 cm ² | Nunc, Wiesbaden |
| Zellkulturplatten 6, 24, 48 Well | Nunc, Wiesbaden |

2.1.6 Organismen

2.1.6.1 Bakterien

DH5-α chemisch kompetente *E.coli* (Invitrogen, Karlsruhe):

Genotyp: fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17

One Shot Stbl3 chemisch kompetente *E.coli* (Invitrogen, Karlsruhe):

Genotyp: F- mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 p_{roA2} rpsL20(StrR) xyl-5 λ- leu mtl-1 endA1+

One Shot Top10 chemisch kompetente *E.coli* (Invitrogen, Karlsruhe):

Genotyp: F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15Δ lacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG

XL1-Blue chemisch kompetente *E.coli* (Agilent Technologies):

Genotyp: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1lac [F' proAB lacIqZ\DeltaM15 Tn10 (Tetr)]$

2.1.6.2 Zellen und Zelllinien

293FT-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe):

Zelltyp: Genetisch modifizierte humane embryonale Nierenzellen

Beschreibung: Diese Zelllinie wurde aus der humanen 293F primären embryonalen Nierenzelllinie gewonnen und mit humanem Adenovirus Typ 5 DNA transformiert (Graham et al. 1977). Sie exprimiert konstitutiv das große T-Antigen von SV40. Dies sind epitheliale, adhärente, einschichtig wachsende Zellen. Die 293FT Zelllinie ist besonders gut geeignet für die Produktion von lentiviralen Vektoren.

hMSC-Zellen (Lonza, Köln):

Zelltyp: Humane mesenchymale Stammzellen

Beschreibung: Diese Zelllinie wurde aus humanem Knochenmark gewonnen. Die hMSC-Zellen wachsen einschichtig und haben eine Fibroblasten-ähnliche Zellmorphologie. Die Zellen wurden positiv getestet für CD29, CD44, CD105 und CD166, negativ für CD14, CD34 und CD45. Außerdem wurde die Fähigkeit der Zellen überprüft, in die osteogene, chondrogene und adipogene Linie zu differenzieren.

SCP1-Zellen (ExperiMed, München):

Zelltyp: Humane mesenchymale Stammzellen

Beschreibung: Die SCP1-Zellen sind immortalisierte hMSC-Zellen. Sie exprimieren stabil das Gen hTERT (human telomerase reverse transcriptase), wodurch der Alterungsprozess mit Wachstumsarrest verhindert wird. Dabei ist weder eine Veränderung des Karyotyps, des Stammzellcharakters noch eine erhöhte Tumorgenese aufzuweisen (Böcker et al. 2008b).

SCP1-HAS1-eGFP D6, SCP1-HAS2-eGFP und SCP1-HAS3-eGFP E6:

Beschreibung: Diese Zelllinien wurden in dieser Studie selbst hergestellt. Dafür wurden SCP1-Zellen über den lentiviralen Gentransfer jeweils mit HAS1-eGFP, HAS2-eGFP oder HAS3-eGFP transduziert. Die stabile Expression beider Gene wurde auf RNA- und Proteinebene nachgewiesen. Die Selektion besonders geeigneter Klone erfolgte anhand der Expressionsrate und Fluoreszenzintensität des eGFP-Tags.

SCP1-mock:

Beschreibung: Diese Zelllinie wurde in dieser Studie selbst hergestellt und diente als Negativkontrolle gegenüber den mit HAS-eGFP transduzierten SCP1-Zellen. Diese Zellen wurden nur mit einem Leervektor transduziert.

hMSC-HAS1-eGFP-Lifeact-mRFPruby und hMSC-HAS3-eGFP-Lifeact-mRFPruby:

Beschreibung: Diese Zelllinien wurden in dieser Studie selbst hergestellt. Hier erfolgte eine Doppeltransduktion der hMSCs mit dem Lifeact-mRFPruby und dem HAS1-eGFP bzw. HAS3-eGFP über das lentivirale Gentransfersystem.

2.1.7 Oligonukleotide**2.1.7.1 PCR-Primer**

Die Primer für die Klonierungsarbeiten und analytische RT-PCR wurden von Life Technologies, Darmstadt, hergestellt.

| Bezeichnung | Sequenz (von 5' nach 3') | T _M /°C |
|----------------|------------------------------|--------------------|
| HAS1_XmnI_for | GAACCAATTGATGAGACAGGACGCGGCC | 57,3-68 °C |
| HAS1_Xhol_rev | CTCGAGCACCTGGACGCGGTAG | 57,3-68 °C |
| HAS2_BamHI_for | GGATCCATGCATTGTGAGAGGTTTC | 51,9-56,4°C |
| HAS2_BamHI_rev | GGATCCTACATCAAGCACCATGTC | 51,9-56,4°C |
| HAS3_Ncol_for | CCATGGCGGTGCAGCTGACG | 60 °C |
| HAS3_Ncol_rev | CCATGGACTGCTCTAGAACGTG | 60 °C |

| | | |
|-----------|---------------------------|-------|
| HAS1_for | GAATCCTGGTCAGCTCCTAAG | 55 °C |
| HAS1_rev | AAACTGCTGCAAGAGGTTATTCCCT | 55 °C |
| HAS2_for | CATAAAGAAAGCTCGAACACG | 55 °C |
| HAS2_rev | ACTGCTGAGGAATGAGATCCAG | 55 °C |
| HAS3_for | GACGACAGCCCTGCGTGT | 58 °C |
| HAS3_rev | TTGAGGTCAGGGAAAGGAGAT | 58 °C |
| GAPDH_for | CAACTACATGGTTACATGTT | 50 °C |
| GAPDH_rev | GCCAGTGGACTCCACGAC | 50 °C |

2.1.7.2 Sequenzierprimer

Die Sequenzierarbeiten und die Primerherstellung wurden von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, durchgeführt.

| Plasmid | Primername | Sequenz (von 5' nach 3') |
|-------------------------|--|--|
| pENTR11-HAS1-eGFP | pENTattL2rev HAS1_for pENTRfw | ACATCAGAGATTTGAGACACGGGC GAATCCTGGTCAGCTCCTAAG CTACAAACTCTCCTGTTAGTTAG |
| TOPO-HAS1 | M13 uni (-43) M13 rev (-49) | AGGGTTTCCCAGTCACGACGTT GAGCGGATAACAATTTCACACAGG |
| pENTR11-HAS2-eGFP | HAS2_fw pENTRfw pEGFPN1rev pENTattL2rev | CATAAAGAAAGCTCGAACACG CTACAAACTCTCCTGTTAGTTAG GTCCAGCTGACCAGGATG ACATCAGAGATTTGAGACACGGGC |
| pENTR11-HAS3-eGFP | pENTRfw pENTattL2rev | CTACAAACTCTCCTGTTAGTTAG ACATCAGAGATTTGAGACACGGGC |
| pENTR11-Lifeact-mRFPuby | pENTRfw SeqL-B | CTACAAACTCTCCTGTTAGTTAG CATCAGAGATTTGAGACAC |
| pLenti4.3-HAS1-eGFP | CMVmin v5epitoperev | CGCCATCCACGCTTTTG CGTACAATCGAGACCGAGGGAGAGG |
| pLenti4.3-HAS2-eGFP | CMVmin v5epitoperev | CGCCATCCACGCTTTTG CGTACAATCGAGACCGAGGGAGAGG |
| pLenti4.3-HAS3-eGFP | CMVmin v5epitoperev | CGCCATCCACGCTTTTG CGTACAATCGAGACCGAGGGAGAGG |

| | | |
|---------------------------|------------------------|---|
| pLenti4.3-Lifeact-mRFPuby | CMVmin v5epitoperev | CGCCATCCACGCTTTTG CGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGG |
| pLenti6.3-Lifeact-mRFPuby | CMVmin v5epitoperev | CGCCATCCACGCTTTTG CGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGG |

2.1.8 Gene und Vektoren

| Gen/Vektor | Größe | Bezugsquelle |
|---|--------|--|
| pCMV-SPORT6-HAS 1 (BC035837.1; Klonname: IRATp970E0956D) | 6,5 kb | Source BioScience LifeSciences, Nottingham, UK |
| pCR-BluntII-TOPO-HAS2 (BC109071.1; Klonname: IRCMp5012E0230D) | 5,9 kb | Source BioScience LifeSciences, Nottingham, UK |
| pCMV-SPORT6-HAS3 (BC021853.1; Klonname: IRATp970E0841D) | 5,6 kb | Source BioScience LifeSciences, Nottingham, UK |
| pBK-CMV-Lifeact-mRFPuby | 4,7 kb | Geschenk von PD Dr. Attila Aszodi, ExperiMed, München |
| pENTR11 | 2,7kb | Invitrogen, Darmstadt |
| pENTR11-eGFP | 3kb | ExperiMed, München |
| pLenti4.3/V5-DEST | 9,4kb | ExperiMed, München |
| pLenti6.3/V5-DEST | 9,4kb | Invitrogen, Darmstadt |
| PCR2.1-TOPO | 3,9kb | Invitrogen, Darmstadt |
| pUC19 | 2,7kb | Invitrogen, Darmstadt |

2.1.9 Standards

| | |
|--------------------------|-----------------------------|
| 100bp DNA-Ladder Mix | Peqlab, Erlangen |
| 250bp DNA-Ladder Mix | Invitrogen, Darmstadt |
| GeneRuler 1kb DNA-Ladder | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| Protein Standard | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |

2.1.10 Kits

| | |
|--|---------------------------------------|
| Endo-Free Plasmid Mini Kit II | Qiagen, Hilden |
| Gateway LR Clonase II Enzyme Mix | Invitrogen, Darmstadt |
| HIV-1 P24-ELISA Kit | ZeptoMetrix Corporation, Buffalo, USA |
| Lipofectamine Reagent | Invitrogen, Darmstadt |
| Micro BCA Protein Assay Kit | Thermo Scientific, Schwerte |
| NucleoSpin Extract II Kit | Macherey-Nagel, Düren |
| Quick Ligation Kit | New England BioLabs, Frankfurt/Main |
| RNeasy Mini Kit mit QiaShredder | Qiagen, Hilden |
| TECO Human Hyaluronansäure Test, TE1017 Kit | TECOmedical GmbH, Bünde |
| TOPO TA Cloning Kit | Invitrogen, Darmstadt |
| Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit | Roche, Penzberg |
| ViraPower Lentiviral Expression System | Invitrogen, Darmstadt |

2.1.11 Geräte

| | |
|--|-----------------------------------|
| Analysewaage | Sartorius, Göttingen |
| Brutschrank für Bakterien | Memmert, Schwabach |
| Brutschrank für Zellkulturen, Typ HERAcell 240 i | Thermo Scientific, Schwerte |
| Bunsenbrenner, Typ Fireboy eco | Integra Biosciences, Fernwald |
| Dampfsterilisator | H+P Labortechnik, Oberschleißheim |
| Durchflusszytometer FACSCalibur | BD, Heidelberg |
| Elektrophorese Spannungsquelle | Peqlab, Erlangen |
| Elektrophorese-Gel Entwickler | Vilber Lourmat, Eberhardzell |
| Elektrophoresekammer | Peqlab, Erlangen |
| Entwickler für Westernblot-Membran, Typ ImageQuant LAS 4000 mini | GE Healthcare, München |
| Feinwaage, Typ 770 | Kern, Balingen |
| Magnetrührer mit Heizplatte | Axon, Kaiserslautern |
| Mikropipetten, PIPETMAN Classic | Glison, Middleton, USA |
| Mikroskop AxioObserver.Z1, AxioCam MRm | Zeiss, Oberkochen |

| | |
|---|--------------------------------------|
| Mikroskop Axiovert S100, AxioCam ICc3 | Zeiss, Oberkochen |
| Mikrotiterplatten-Photometer, Multiscan FC | Thermo Scientific, Schwerte |
| Mini-Trans-Blot Elektrophoresekammer | Bio-Rad, München |
| Mischer Vortex-Genie 2 | Scientific Industries, New York, USA |
| Nanodrop Spektralphotometer Typ | Peqlab, Erlangen |
| Neuerbauer Zählkammer | Brand, Wertheim |
| PCR Thermocycler, Typ DNA Engine Peltier Thermo Cycler | Bio-Rad, München |
| pH-Meter | WTW Inolab, Weilheim |
| Pipetboy | Hirschmann, Eberstadt |
| Plattformschüttler mit Inkubator 1000 | Heidolph, Schwabach |
| Plattformschüttler, Rotamax 120 | Heidolph, Schwabach |
| Spannungsquelle für Western Blot | Consort, Turnhout, Belgien |
| Thermomixer, Typ comfort mit Thermoblock | Eppendorf, Hamburg |
| Tischzentrifuge für Reaktionsgefäße | neoLab, Heidelberg |
| Tischzentrifuge, Typ Biofuge pico | Heraeus, Hanau |
| UV-Leuchttisch | Vilber Lourmat, Eberhardzell |
| Wasserbad | GFL, Burgwedel |
| Zellkultur-Mikroskop, Typ Diavert | Leitz, Wetzlar |
| Zellkultur-Zentrifuge, Typ Univ. 16R | Hettich, Tuttlingen |
| Zentrifuge, Typ Jouan BR 4 | Thermo Scientific, Schwerte |

2.1.12 Software

| Software | Anwendung |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| Adobe Illustrator CC (Version 17.1) | Bildbearbeitung |
| Adobe Photoshop CC (Version 14.0) | Bildbearbeitung |
| BioEdit | Sequenzanalyse |
| Carl Zeiss Axio Vision SE64 Rel. 4.8 | Bildaufnahme und -bearbeitung |
| FlowJo FACS analysis software 7.7 | FACS-Auswertung |
| GraphPad Prism 5.02 | BCA- / ELISA-Auswertung, Statistik |
| Clone Manager (Version 9) | Klonierungsarbeiten |

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

Für die molekularbiologischen Arbeiten wurden vier Arten von *E.coli*-Stämmen verwendet: DH5α-, One Shot Stbl3-, TOP10- und XL1-Blue-Zellen. Die mikrobiologischen Arbeiten wurden, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.2.1.1 Kultivierung von Bakterienkulturen

Die verwendeten *E.coli*-Stämme wurden auf zwei Arten kultiviert: entweder auf Agarplatten nach Transformation oder Ausstrich aus einer Glycerinkultur, oder in Flüssigmedium, beispielsweise vor einer Plasmidisolierung. Für beides wurde LB-Medium sowohl mit als auch ohne Agar selbst hergestellt und autoklaviert. Nach Abkühlung wurde je nach Bedarf und der Resistenz des Plasmids das Antibiotikum Ampicillin oder Kanamycin in einer Konzentration von 100 µg/ml dazugegeben.

Das Ausplattieren eines Transformationsansatzes auf Agarplatten erfolgte mit einem Drygalskispatel, welcher vorher in 70%iges Ethanol getaucht und danach abgeflammt wurde. Um Bakterien aus einer Glycerinkultur zu kultivieren, wurde mit einer sterilen Pipettenspitze etwas Material entnommen und nach Art des „Drei-Ösen-Ausstrichs“ auf die Platte aufgetragen. Die Platten wurden über Kopf im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert. Bei 4 °C und mit Parafilm versiegelt können sie mehrere Wochen aufbewahrt werden.

Für eine Flüssigkultur wurde mit einer abgeflammtten Impföse eine einzelne Kolonie oder ein Teil eines zuvor auf einer Agarplatte kultivierten Reinstreiches von der Agarplatte entnommen und in 5 ml flüssigem LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum für mindestens 12 h bei 190 rpm und 37 °C geschüttelt. Die Rundröhren für die Flüssigkultur wurden nur zu $\frac{1}{3}$ gefüllt und hatten einen luftdurchlässigen Deckel, um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten.

2.2.1.2 Konservierung von Bakterienkulturen

Zur Konservierung von einzelnen Transformanden wurden Glycerinkulturen angelegt. Dafür wurde eine Einzelkolonie in 3 ml entsprechendem LB-Selektionsmedium über Nacht bei 37 °C und 190 rpm kultiviert. Es wurden 828 µl dieser Suspension mit 172 µl 87%igem Glycerin in einem Einfrier-Reaktionsgefäß gründlich gemischt, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Von den *E.coli*-Klonen, die das gewünschte Plasmid enthielten, wurden mehrere Einzelkolonien als Reinstrich für ca. 8 h bei 37 °C kultiviert. Ein Teil dieses Reinstriches wurde in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und über Nacht kultiviert. Durch mehrfaches Abzentrifugieren in einem 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde die Übernachtkultur geerntet. Für die Isolierung der Plasmide im analytischen Maßstab wurde mit dem NucleoSpin Extract II Kit (s. 2.1.10) nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Die Eluierung erfolgte mit 100 µl Elutionslösung.

Für die Transfektion wurde eine größere Menge an Plasmid-DNA in endotoxinfreiem Wasser benötigt. Dafür wurde eine 5 ml Vorkultur nach ca. 6 h in 45 ml LB-Medium überführt und über Nacht kultiviert. Die Isolierung erfolgte mit dem Endo-Free Plasmid Mini Kit II (s. 2.1.10) mit einem für das größere Kulturvolumen angepassten Protokoll. Dabei wurde auf mehreren Säulchen getrennt aufgereinigt, die Eluierung mit jeweils 100 µl endotoxinfreiem Wasser durchgeführt und die Eluate am Ende vereinigt.

Die Plasmide wurden bei -20 °C aufbewahrt oder direkt verwendet.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Dabei wurde die Extinktion der Proben-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen (OD₂₆₀). Eine Extinktion von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA

bzw. 40 µg ssRNA/ml. Die Reinheit der Probe gegenüber Proteinen oder Phenol kann durch den Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ angegeben werden. Wenn dieser bei 1,8-2 liegt, ist die DNA bzw. RNA rein und geeignet für die weitere Verwendung.

2.2.2.3 Restriktionsverdau von DNA

Mit dem Restriktionsverdau kann zu analytischen Zwecken ein Plasmid identifiziert werden oder zu präparativen Zwecken das gewünschte DNA-Fragment aus dem Vektor geschnitten werden. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, welche die Phosphodiesterbindungen in der DNA hydrolysieren können. Die spezifischen Schnittstellen sind meist palindromische Basenabfolgen, die je nach Enzym entweder glatte DNA-Strang-Enden („blunt ends“) oder am 5'- oder 3'-Ende überhängende Einzelstränge („sticky ends“) bilden. Da sich überhängende Enden leichter ligieren lassen, wurden für die Klonierung, sofern möglich, entsprechende Enzyme ausgewählt. Für den analytischen Verdau wurden mit Hilfe des Programmes Clone Manager Enzyme mit solchen Schnittstellen ausgewählt, die das Plasmid in genau definierte, gut zu unterscheidende Fragmente schnitten. Somit durften nur Plasmide mit positiver Klonierung die richtigen Fragmentlängen aufweisen.

Für den präparativen Ansatz wurden 4 µg Plasmid, 2 µl Enzym (20-25 U), 10% Puffer (NEBuffer, passend zum jeweiligen Enzym) und je nach Bedarf des Enzyms 1% BSA eingesetzt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 60 µl aufgefüllt. Wurde ein Doppelverdau durchgeführt, d.h. wurden gleichzeitig zwei verschiedene Enzyme eingesetzt, dann mussten diese dieselben Puffer- und Temperaturbedingungen aufweisen. Die Ansätze wurden für 2 h bei 37 °C inkubiert.

Für den analytischen Ansatz wurden 600 ng Plasmid, 1 µl Enzym, 10% Puffer, je nach Bedarf 1% BSA und Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl eingesetzt. Die Ansätze wurden für 1h bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.4 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten. Damit können DNA-Fragmente durch die Bestimmung ihrer Länge identifiziert

werden. Es erfolgte die Auftrennung von Plasmiden nach dem Restriktionsverdau und von PCR-Produkten zu analytischen oder präparativen Zwecken. Die Agarose wurde mit 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) aufgekocht, je nach Größe der gesuchten Fragmente in einer Konzentration von 1-2%. Um die DNA später unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde Ethidiumbromid (6 µl/ 100 ml Gel) in das flüssige Gel gegeben. Um das Auftragen der DNA-Lösungen in die Geltaschen zu ermöglichen und um besser verfolgen zu können, wie weit die Banden schon gelaufen waren, wurden sie mit Gelladepuffer 6x Blue Dye versetzt. Um die Fragmentlänge abschätzen zu können, wurde immer ein DNA-Standard mitaufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet. Je nach Gelgröße erfolgte der Lauf bei 80-120 V bis zur genügenden Auftrennung. Die Banden wurden unter UV-Licht (254 nm bei analytischen Proben und 366 nm bei präparativen Proben) detektiert.

2.2.2.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die auf dem Gel aufgetrennten präparativen Ansätze wurden zum Schutz vor Pyrimidindimer-Bildung unter energieärmerem, 366 nm langwelligem UV-Licht analysiert. Das jeweils gewünschte DNA-Fragment, linearisierte Plasmid oder PCR-Produkt wurde mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Aus diesem Gelstück wurde mithilfe des NucleoSpin Extract II Kits nach Angaben des Herstellers die DNA extrahiert. Die Eluierung erfolgte mit 15 µl des im Kit enthaltenen Elutionspuffers.

2.2.2.6 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit der PCR (engl.: polymerase chain reaction) lassen sich unmessbar kleine Mengen an DNA amplifizieren. Die PCR wurde zu analytischen und präparativen Zwecken eingesetzt.

2.2.2.6.1 Die Standard-PCR

Standard-Ansätze:

| Komponente | Analytisch | Präparativ |
|---|-----------------------------|----------------------------|
| Template DNA | 100 ng | 200 ng |
| 10x Reaktionspuffer mit MgCl ₂ | 2,5 µl | 5 µl |
| Nukleotid-Mix (dNTPs) (10mM) | 0,5 µl | 1 µl |
| Sense-Primer (10pM/µl) | 1 µl | 2 µl |
| Antisense-Primer (10pM/µl) | 1 µl | 2 µl |
| Taq-DNA-Polymerase (mit/ohne proof-reading) | 0,25 µl (2,5 U/Reaktion) | 0,5 µl (2,5 U/Reaktion) |
| PCR-Wasser | ad 25 µl | ad 50 µl |

Alle Ansätze wurden in 0,2 ml-PCR-Reaktionsgefäß auf Eis angesetzt. Die Primer für die präparativen Ansätze wurden selbst designt und von Eurofins MWG Operon hergestellt. Für die analytischen Ansätze wurden Primer, die mehrfach in der Literatur beschrieben werden, ausgesucht und ebenfalls von Eurofins MWG Operon hergestellt. Um im präparativen Ansatz eine möglichst fehlerfreie DNA-Amplifikation zu erreichen, wurde eine Taq-Polymerase mit Korrekturlesefunktion (proof-reading) verwendet; zu analytischen Zwecken wurde eine Taq-Polymerase ohne diese Eigenschaft verwendet. Bei manchen analytischen Ansätzen wurde durch Zusatz von 0,25 µl DMSO eine bessere Amplifikation erreicht. Bei allen PCR-Reaktionen wurde eine Negativkontrolle zur Überprüfung der Qualität mitangesetzt. Dafür wurde das Template durch PCR-Wasser ersetzt.

Die Amplifizierung im Thermocycler erfolgte nach einem Standardprogramm. Die Annealing-Temperatur wurde jeweils durch das Primerpaar bestimmt. Die Elongationszeit wurde an die Polymerisationsfähigkeit des Enzyms und die Länge des zu amplifizierenden DNA-Templates angepasst.

Bei der Klonierung der Gene HAS1 und HAS2 wurde die Annealingtemperatur bei jedem Zyklus erhöht, um eine immer spezifischere Primer-Bindung zu erzielen. Für die HAS1-Primer wurde eine Anfangstemperatur von 57,3 °C gewählt. Über 15 Zyklen hinweg wurde jeweils um 0,7 °C erhöht und danach erfolgten 10 Zyklen bei einer Endtemperatur von 68 °C. Bei HAS2 wurde mit 51,9 °C begonnen, über 15 Zyklen um je 0,3 °C erhöht und abschließend erfolgten 10 Zyklen bei 56,4 °C.

Standardprogramm:

| | | |
|--------------------------------|----------|-------------|
| Initiale Denaturierung | 95 °C | 4 min |
| Denaturierung | 95 °C | 30 sec |
| Primer-Annealing (individuell) | 50-68 °C | 30 sec |
| Elongation | 72 °C | 1-3 min |
| Zyklen | | 25-40 |
| End-Elongation | 72 °C | 10 min |
| Kühlung | 4 °C | unlimitiert |

Die Ansätze wurden entweder bei -20 °C bis zu einer Woche aufbewahrt oder direkt, mit 6x Blue Dye Gelladepuffer versetzt und mittels Gelelektrophorese analysiert (s. 2.2.2.4).

2.2.2.6.2 Die Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Um die Expression eines bestimmten Gens in Zellen nachzuweisen, kommt die RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR) zum Einsatz. Dabei wird in einem ersten Schritt die aus den Zellen isolierte RNA mithilfe des Reverse-Transkriptase-Enzyms in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wird anschließend als Template für die PCR verwendet.

Die RNA-Isolierung erfolgte aus hMSCs einer konfluent bewachsenen T25-Flasche mit Hilfe des RNeasy Mini Kits nach Angaben des Herstellers, einschließlich des optionalen DNase-Verdaus. Die Konzentration der RNA wurde bestimmt (s. 2.2.2.2) und 1 µg für die cDNA-Synthese eingesetzt. Diese erfolgte nach Angabe des Herstellers mit dem Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (s. 2.1.10). Es wurden die im Kit enthaltenen „Random Hexamer Primer“ verwendet. Die so entstandene cDNA wurde in einer 1:10 Verdünnung mit PCR-Wasser für analytische PCR-Ansätze eingesetzt.

2.2.2.6.3 Die Kolonie-PCR mit *E.coli*

Die Kolonie-PCR ist eine Methode zur Detektion positiver Transformanden aus einer Vielzahl von Kolonien nach einer Ligationsreaktion und Transformation. Hierfür

wurden die Einzelkolonien mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und nummeriert auf einer Agarplatte ausgestrichen. Der an der Pipettenspitze haftende Rest wurde in 30 µl PCR-Wasser in einem 0,2 ml-PCR-Reaktionsgefäß abgestreift und gut resuspendiert. Durch 5 min Aufkochen bei 94 °C im Thermocycler wurden die Bakterienzellen lysiert. Währenddessen wurde ein Master-Mix angesetzt, bestehend aus 10 µl 5x PCR-Puffer oder 5 µl 10x Puffer, 0,5 µl 10 mM dNTPs, je 2,5 µl sense- und antisense-Primer, 0,5 µl Taq-Polymerase und PCR-Wasser ad 20 µl, jeweils multipliziert mit der Anzahl der zu testenden Proben. Davon wurden je 20 µl zu der Zellsuspension gegeben. Die PCR-Reaktion erfolgte nach dem Standardprogramm mit Anpassung der Annealing-Temperatur an die Primer und mit 40 Zyklen.

Zur Analyse wurden je 20 µl der Proben mit 4 µl 6x Blue Dye Gelladepuffer versetzt und auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt (s. 2.2.2.4). Aus dem Reinstrich der als positiv detektierten Transformanden konnte dann das Plasmid isoliert werden.

2.2.2.7 Klonierung

Eine Klonierung ist die Einführung eines DNA-Fragmentes in einen Vektor. In Form eines stabilen Klons kann das DNA-Fragment vielfach vermehrt und weiter modifiziert werden.

In dieser Arbeit wurden als DNA-Fragmente sowohl PCR-Produkte als auch Fragmente aus einem Restriktionsverdau verwendet. Als Vektoren dienten PCR2.1-TOPO, pENTR11, pLenti4.3/V5-DEST und pLenti6.3/V5-DEST.

2.2.2.7.1 Die Klenow-Reaktion

Idealerweise wurden das DNA-Fragment und der Vektor mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten, so dass komplementäre, überhängende Enden entstanden, welche eine einfache Ligation ermöglichen. Nicht immer waren solche geeigneten Schnittstellen vorhanden. In diesem Fall war es nötig, aus nicht kompatiblen, überhängenden Enden von Vektor und Insert glatte Enden zu generieren, da diese beliebig ligierbar sind. Dies geschah mithilfe des Klenow-Enzyms, einem Fragment der DNA-Polymerase I aus *E.coli*. Es besitzt zum einen

5'→3' Polymerase-Aktivität, d.h. 5'-Überhänge werden aufgefüllt, zum anderen 3'→5' Exonuklease-Aktivität, d.h. 3'-Überhänge werden geglättet.

Für den Klenow-Ansatz wurde der geschnittene Vektor bzw. das Insert nach Aufreinigung aus dem Gel (15 µl) eingesetzt. Es wurden 4 µl NEB-Puffer 2, 9,9 µl dNTPs (100 µM), 1 µl Klenow-Enzym und Wasser ad 40 µl dazugegeben und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um das Enzym abzustoppen, wurden 0,8 µl EDTA (Endkonzentration 10 mM) zugegeben und 20 min bei 75 °C inkubiert. Die anschließende Aufreinigung erfolgte mit dem NucleoSpin Extract II Kit (s. 2.1.10) nach Angaben des Herstellers. Beim späteren analytischen Restriktionsverdau musste beachtet werden, dass bei glatten Enden das Insert in beiden Orientierungen vorliegen kann.

2.2.2.7.2 Dephosphorylierung von Vektor-Enden (CIPen)

Wenn der Vektor einfach geschnitten wird, also kompatible Enden hat oder zwei glatte Enden, dann können die Enden miteinander ligieren anstatt mit dem Insert. Um die Wahrscheinlichkeit der Selbstligation zu verringern, können die DNA-Enden durch das CIP-Enzym („calf intestine alkaline phosphatase“) dephosphoryliert werden. Dafür wurde der gesamte Ansatz des restriktionsverdauten Vektors (ca. 15 µl nach Gelextraktion), 1 µl CIP-Enzym und 1-2 µl 10x NEBuffer 3 (ad 17 µl) für 1h bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Aufreinigung erfolgte mit dem NucleoSpin Extract II Kit (s. 2.1.10) nach Angaben des Herstellers.

2.2.2.7.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Welche Menge an Insert und Vektor für den Ligationsansatz einzusetzen ist, wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Masse}_{\text{Insert}}[\text{ng}] = \frac{5 \times \text{Masse Vektor}[\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Insert}}[\text{bp}]}{\text{Länge}_{\text{Vektor}}[\text{bp}]}$$

Zu Insert und Vektor wurden 10 µl 2x QuickLigase Puffer, Wasser ad 20 µl und 1 µl Quick Ligase dazugegeben (Quick Ligation Kit, s. 2.1.10), gemischt, kurz zentrifugiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ligationsansatz wurde direkt für die Transformation verwendet oder bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.2.7.4 Homologe Rekombination

Für den Gentransfer musste das Zielgen aus dem Klonierungsvektor pENTR11 in den Expressionsvektor pLenti4.3/V5-DEST bzw. pLenti6.3/V5-DEST mittels homologer Rekombination integriert werden. Dieser enthält einen CMV-Promotor (für die konstitutive Expression vom Zielgen), eine RSV-Promotor (für die Produktion der viralen mRNA) und LTR-Sequenzen (HIV-1 truncated 5' LTR: für die virale Verpackung und reverse Transkription der viralen mRNA und ΔU3/HIV-1 truncated 3' LTR: für die virale Verpackung. Aus Biosicherheitsgründen inaktiviert sich die 5' LTR-Sequenz selbst).

Für die homologe Rekombination macht man sich zu Nutze, dass zwischen den Doppelstranghelices zweier Vektoren bestimmte Genabschnitte ausgetauscht werden können. Voraussetzung hierfür ist eine Übereinstimmung, d.h. Homologie des DNA-Abschnittes an beiden Seiten des zu tauschenden Genabschnittes. Bei den verwendeten Vektoren sind dies die so bezeichneten attL- und attL2-Sequenzen auf Seiten des Zielgens im pENTR11-Vektor und die attR1- bzw attR2-Sequenzen auf Seiten des Zielortes im pLenti4.3/V5-DEST Vektor.

Für die Reaktion wurden 150 ng des Eingangsvektors, in diesem Falle pENTR11 mit dem Zielgen, sowie 150 ng des Zielvektors, in diesem Falle pLenti4.3/V5-DEST, und endotoxin-freies Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 8 µl angesetzt. Dazu wurden 2 µl des LR Clonase II Enzym-Mixes gegeben, welcher vorher 2 min auf Eis aufgetaut und kurz gevortext wurde. Der Ansatz wurde durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt und 60 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend musste die Rekombinationsreaktion gestoppt werden, indem 1 µl Protein-K-Lösung dazugegeben und 10 min bei 37 °C inkubiert wurde. Mit 2-3 µl des Ansatzes wurde direkt die Transformation in Stbl3 kompetente *E.coli* durchgeführt (siehe 2.2.2.7.5.).

2.2.2.7.5 Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

Kompetent sind Zellen, wenn sie frei vorliegende DNA aufnehmen können. Diese Fähigkeit ist Voraussetzung für die Transformation, welche bei den Klonierungsarbeiten der Plasmide durchgeführt wurde. *E.coli*-Bakterien sind von sich aus nicht kompetent, sondern erlangen diese Fähigkeit erst durch besondere Behandlung. Hier wurde die Calciumchlorid-Behandlung verwendet.

Dafür wurden XL1-Blue-Zellen auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Davon wurden Vorkulturen in je 4 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 190 rpm geschüttelt. Danach wurden je 750 µl dieser Vorkultur in 50 ml LB-Medium angeimpft. Bei einer OD_{578nm}= 0,6 wurden die Zellen geerntet und in sterile, auf Eis gekühlte Falcons überführt. Bei 4000 rpm wurden die Bakterien für 10 min zentrifugiert und das Zellpellet (aus 50 ml Vorkultur) in je 15 ml eisgekühltem Tfb I durch Vortexen resuspendiert. Darauf folgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis und Zentrifugation für 5 min bei 2000 rpm. Zu diesen Pellets wurden je 2 ml eisgekühltes Tfb II gegeben und durch vorsichtiges Schwenken in Eiswasser resuspendiert. Diese Suspension wurde in je 200 µl-Aliquots in vorgekühlten Cryo-Tubes aufgeteilt und sofort in flüssigem N2 schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.2.7.6 Transformation in *E.coli*-Zellen

Die Transformation erfolgte mit dem Hitzeschock-Verfahren. Die kompetenten *E.coli*-Stämme wurden auf Eis aufgetaut. Die Transformation von pENTR- und TOPO-Vektoren erfolgte in DH5α-, diejenige von pLenti-Vektoren in Stbl3-Zellen. Der gesamte Ligationsansatz bzw. 2-3 µl des Rekombinations-Ansatzes wurden zu 50 µl Zellen zugegeben und für 30 min im Eisbad inkubiert, wobei mehrmals vorsichtig geschwenkt wurde. Danach erfolgte der Hitzeschock für 90 sec bzw. für 30 sec bei Stbl3-Zellen, bei 42 °C im Wasserbad und anschließender Abkühlung auf Eis. Versetzt mit 500 µl vorgewärmtem SOC-Medium wurde der Ansatz 45 min bei 37 °C inkubiert. Mit einem sterilen Drygalskispatel wurden je 20 µl, 180 µl und der Rest auf je einer Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Je nach der vorhandenen Resistenz des Plasmids wurde zur Selektion eine Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgewählt. Als Positivkontrolle wurde derselbe Vorgang mit 10 pg pUC19-Vektor durchgeführt.

Erfolgte die Transformation mit einem PCR2.1-TOPO-Vektor, wurde zur Detektion von positiven Transformanden das Blau-Weiß-Screening genutzt. Durch das in diesem Vektor enthaltene β-Galaktosidase-Gen (lacZ) können die Bakterien die farblose Substanz X-Gal, welche vor der Ausplattierung der Bakterien auf die Agarplatten gleichmäßig verteilt wurde, in einen blauen Indigofarbstoff umwandeln. Die Schnittstelle für das Insert liegt genau im lacZ-Gen, d.h. wenn das Insert

eingebaut wurde, geht diese Fähigkeit verloren. Positive Transformanden bilden folglich weiße Kolonien.

2.2.2.7.7 DNA-Sequenzierung

Für den Auftrag bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg) wurden 15 µl Probe mit einer Konzentration von 50-100 ng/ µl verlangt. Wenn möglich wurden Standard-Primer der Firma verwendet, in Einzelfällen wurden eigene Sequenzierprimer entworfen. Bei Eurofins waren Leselängen von bis zu 1100 Basen möglich. Die Sequenzen wurden mit dem Programm BioEdit analysiert.

2.2.3 Virale Transformation

Alle virologischen Arbeiten und die Handhabung der Viren wurden gemäß der gültigen Gentechnikgesetze der Regierung von Oberbayern und den Sicherheitsvorschriften der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) durchgeführt. Die virologischen Arbeiten wurden in einem S2-Labor des Max-von-Pettenkofer Instituts am Lehrstuhl für Virologie (Leitung: Prof. Koszinowski), Pettenkoferstr. 9a, 80336 München, durch Frau Dr. rer. nat. Veronika Schönitzer durchgeführt.

2.2.3.1 Herstellung der Lentiviren in 293FT-Zellen

Die Transfektion ist das Einbringen von fremdem Genmaterial in Form von DNA oder RNA in eukaryotische Zellen. In diesem Fall wurde die klonierte pLenti-Plasmid-DNA mithilfe des Lipofectamine 2000 Transfektionsreagens (s. 2.1.10) in 293FT-Zellen eingebracht. Hierzu wurde das Kit ViraPower Lentiviral Expression System (s. 2.1.10) benutzt, um in diesen Zellen die Produktion der Lentiviren zu ermöglichen, welche in einem weiteren Schritt das Zielgen in die Zellen übertragen. Erst wurden 293FT-Zellen in einer T-225-Flasche mit D-MEM Medium bis zu 90%iger Konfluenz kultiviert. Dann wurden die Zellen trypsinisiert, gezählt und in einer Dichte von 1,2 x 10⁶ Zellen/ml mit Opti-MEM I Medium plus 10% FBS resuspendiert. Dieses Medium enthielt keine Antibiotika. Für jede Transfektion wurden in sterilen 14 ml

Reaktionsgefäß folgende Ansätze hergestellt: 142,8 µl LipofectamineTM 2000 mit 5,9 ml Opti-MEM I Medium (ohne FBS) und separat dazu 35,7 µg ViraPower lentiviral packaging Mix, 11,9 µg des jeweiligen pLenti4.3/V5-Expressionsplasmids und 5,9 ml Opti-MEM I Medium (ohne FBS). Beide Ansätze wurden vorsichtig gemischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann vereint und wieder vorsichtig gemischt. Anschließend wurde dieser Ansatz 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich die DNA-Lipofectamine-Komplexe bilden konnten. Dieser Ansatz wurde in eine T-225 Flasche mit 19,8 ml Opti-MEM I Medium (plus 10% FBS) und 19,8 ml der 293FT-Zellsuspension ($23,76 \times 10^6$ Zellen gesamt) gegeben. Durch leichtes Rütteln der Flasche wurde alles gut gemischt und für 6 h bei 37 °C in den CO₂-Inkubator gestellt. Nach 6 h wurde das Medium entfernt und durch 21 ml Kulturmedium ohne Geneticin ersetzt. Nach 48 h wurde das Medium, das jetzt die Viren enthielt, geerntet und bei 3000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert, um Zellreste zu sedimentieren. Der Überstand wurde durch einen 0,22 µm-Filter filtriert und so entweder sofort verwendet oder in Aliquots bei -80 °C gelagert. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren wurde vermieden. Die Viren bleiben bis zu zwei Jahren stabil.

2.2.3.2 Transduktion der hMSCs

In dieser Arbeit wurden zwei Linien von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) mit Hilfe des Lentiviruses transduziert. Dies sind die hTERT-immortalisierten hMSCs (SCP1-Zellen) und ursprüngliche hMSCs. Die SCP1-Zellen wurden nur mit einem Zielgen (HAS-eGFP) transduziert, da diese im Voraus schon einmal transduziert worden waren (mit dem hTERT-Gen). Für die Doppeltransduktion (HAS-eGFP und Lifeact-mRFPuby) wählten wir deshalb bisher untransduzierte hMSCs. Die Zellen wurden in einer T-75-Flasche bis zu einer Konfluenz von 70-80% für SCP1 und 50% für hMSCs kultiviert. Sie wurden anschließend mit 5 ml Kulturmedium (mit allen Zusätzen) plus 16 µg/ml Polybrene für 30 min bei 37 °C im CO₂-Inkubator inkubiert. Erst direkt vor der Transduktion wurde der Lentivirus-Überstand aufgetaut und 5 ml davon zu den Zellen gegeben. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C im CO₂-Inkubator erfolgte ein Mediumwechsel. Nach weiteren 24 h Inkubation wurde mit der Selektion begonnen. Dafür wurde das Kulturmedium mit einem Antibiotikum versetzt, hier mit Zeocin im Verhältnis 1:1000 (100 µg/ml).

Für 8-10 Tage erfolgte täglich ein Mediumwechsel und die Zellen wurden je nach Konfluenz mehrfach gesplittet.

2.2.3.3 P24-Antigen-ELISA

Die frisch transduzierten Zellen wurden erst dann in das S1-Labor übernommen, als sicher gestellt war, dass im Überstand kein Virus mehr vorhanden war. Hierfür wurde ein P24-ELISA mit dem Überstand nach Angaben des Herstellers durchgeführt (s. 2.1.10).

2.2.4 Zellkulturmethoden

Die drei Zelltypen 293FT-, hMSC- (humane mesenchymale Stammzellen) und SCP1-Zellen wurden wie im Folgenden beschrieben kultiviert.

2.2.4.1 Kultivierung von hMSCs

Die Zellen wurden im Zellkultur-Inkubator bei 37 °C und einer feuchten 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert. Je nach Verwendungszweck und benötigter Zellzahl wurden sie in T25-, T75-, T225-Zellkulturflaschen oder in Wellplatten kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte zweimal die Woche mit folgenden Medien:

| Medium für SCP1/hMSCs | | Medium für 293FT | |
|------------------------------|---------------------|---|--------------------|
| α-MEM, high Glucose | 500 ml | D-MEM, high Glucose | 500 ml |
| FBS (fetales Rinderserum) | 10% | FBS (fetales Rinderserum) | 10% |
| Penicillin/Streptomycin | 1% | Penicillin/Streptomycin | 1% |
| Zeozin und/oder Blasticidin | 1:1000 100 µg/ml | Geneticin | 1:100 500 µg/ml |
| | | Pyruvat | 1 mM |
| | | NEAA (nichtessenzielle Aminosäuren) | 0,1 mM |

2.2.4.2 Passagieren von hMSCs

Bei einer Konfluenz von ca. 90% wurden die Zellen passagiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, um Mediumreste, welche die Funktion des Trypsins behindern können, zu entfernen. Um die Zellen von der Oberfläche zu lösen, wurden sie für 5 min bei 37 °C mit 1x Trypsin/EDTA inkubiert (2 ml für T25, 3 ml für T75, 5 ml für T225). Sobald durch leichtes Klopfen alle Zellen gelöst werden konnten, wurde die Trypsinierung durch Zugabe der doppelten Menge an Kulturmedium im Verhältnis zu Trypsin abgestoppt. Die Zellen wurden darin gut resuspendiert und nach vorgegebenen Zelldichten in neuen Kulturflaschen ausgesät oder für andere Zwecke verwendet.

2.2.4.3 Zählen von hMSCs

Das Zählen der Zellen erfolgte mithilfe der Neuerbauer-Zählkammer. Aus einer gut gemischten Zellsuspension wurden je 10 µl luftblasenfrei in eine Zählkammer gefüllt. Unter dem Mikroskop wurden die vier Quadranten von zwei Kammern ausgezählt. Zellen, die auf der oberen und linken Linie lagen, wurden mitgezählt, jene auf der unteren und rechten Linie nicht. Die Zellzahl pro ml wird berechnet, indem man den Mittelwert der zwei Kammern durch vier teilt und mit dem Faktor 10^4 multipliziert.

2.2.4.4 Vereinzelung von Zellklonen

Da nach der Transduktion nicht alle Zellen das gewünschte Gen enthielten, mussten sie vereinzelt werden. Dafür wurde die Zellsuspension so stark verdünnt, dass in den 250 µl, die in ein Well einer 48-Well-Platte gegeben wurden, theoretisch nur eine Zelle sein sollte. Da die Zellen stabil transduziert sind, wird das Gen an die Tochterzellen weitergegeben. Das fluoreszierende Protein eGFP, das an das C-terminale Ende der Hyaluronansynthasen fusioniert wurde, ermöglicht eine Selektion der positiven Klone. Die besten Zellklone wurden schrittweise in größeren Kulturgefäßen expandiert. Zur Bestätigung der positiven Selektion wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Hierzu wurde eine Zellsuspension in PBS hergestellt (2500 Zellen/µl) und diese mittels der Methode der fluoreszenzbasierten

Durchflusszytometrie analysiert (Gerät: FACSCalibur von BD, Excitations-Laserstrahl: 488nm; Fluoreszenzfilter: 530/30).

2.2.4.5 Konservierung und Auftauen von hMSCs

Die Zellen wurden trypsinisiert und gezählt und dann für 5 min bei 500x g zentrifugiert. Währenddessen wurde das Einfriermedium (s. 2.1.5.2) hergestellt und vorgekühlt. Das Medium wurde vollständig abgesaugt und das Zellpellet wurde in Einfriermedium mit einer Zelldichte von 1×10^6 - 1×10^7 Zellen/ml kurz resuspendiert. In die vorgekühlten Kryoröhrchen wurde jeweils 1 ml Zellsuspension gefüllt und diese sofort in Trockeneis gegeben. Die Lagerung erfolgte im Stickstofftank.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen in ein 37 °C Wasserbad gehalten und die gesamte Zellsuspension in eine Zellkulturflasche mit vorgewärmtem Medium gegeben. Nachdem die Zellen über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden und adhären auf der Oberfläche waren, wurde das Medium erneuert.

2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.2.5.1 Proteinisolierung aus hMSCs

Die Proteinisolierung erfolgte aus Zellen einer vollgewachsenen T75-Flasche. Diese wurden trypsinisiert, geerntet und bei 500 rpm 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen gut in 5 ml PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand entfernt. In 2,5 ml RIPA-Puffer wurde $\frac{1}{4}$ einer Protease-Inhibitor-Tablette gelöst und auf Eis gekühlt. Das Zellpellet wurde vorsichtig in eiskaltem RIPA-Puffer resuspendiert (für ca. 2×10^6 Zellen wurden je 100 µl RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitor eingesetzt), in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach diesem Schritt konnte die Probe bei -80 °C für wenige Tage gelagert werden. Für die Weiterarbeit wurde die Probe auf Eis aufgetaut. Durch das Detergenz im RIPA-Puffer und durch das Einfrieren und Wiederauftauen wurden die Zellen lysiert. Durch Zentrifugation bei 10.000x g für 10 min bei 4 °C wurden die unlöslichen Zellreste pelletiert und der Überstand, welcher dem kompletten Zelllysat entspricht, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bei allen Schritten wurde das Zelllysat auf Eis aufbewahrt; gelagert wurden die Proben bei -80 °C.

2.2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung (BCA Protein Assay)

Die Proteinkonzentration im Zelllysat wurde mit dem Micro BCA Protein Assay Kit (s. 2.1.10) nach Anweisungen des Herstellers ermittelt. Sie wurde anhand einer Standardkurve berechnet, welche für jeden Test neu aufgestellt wurde. Dafür wurde mit einem BSA-Standard aus dem Kit und destilliertem H_2O als Lösungsmittel eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die Messungen erfolgten bei 450 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (s. 2.1.11).

2.2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Der Acrylamidgehalt im Trenngel wird der Proteingröße angepasst (in dieser Arbeit 8%).

Zusammensetzung der Gele:

| | Trenngel 8% (10 ml) | Sammelgel 5% (5 ml) |
|-------------------|------------------------|------------------------|
| H_2O | 3,34 ml | 3,44 ml |
| 1M Tris (pH 8,8) | 3,75 ml | - |
| 1M Tris (pH 6,8) | - | 630 μ l |
| 10% SDS | 100 μ l | 50 μ l |
| 10% APS | 100 μ l | 50 μ l |
| 30% Acrylamid-Mix | 2,70 ml | 830 μ l |
| TEMED | 6 μ l | 5 μ l |

Diese Mengenangaben reichen für ein Gel mit den Maßen 7,5 cm x 8,5 cm und 1,5 mm Dicke oder 2 Gele mit 0,75 mm Dicke.

Die aufgetragene Proteinmenge (40 μ g) wurde mit RIPA-Puffer auf gleiches Volumen aufgefüllt, mit 4x Laemmli versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Danach wurde sie in Eiswasser abgekühlt, kurz abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Um das Molekulargewicht der Proteinbanden abschätzen zu können, wurde ein Protein-Standard (s. 2.1.9) mitaufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten

Stromstärke von 50 mA für ca. 1 h (bei einem Gel der Dicke 1,5 mm) in 1x Laufpuffer, bis die blaue Farbfront aus dem Gel herausgelaufen war. Danach wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel für den Western Blot verwendet.

2.2.5.4 Western Blot

Bei dem Western Blot wurden die Proteine, die zuvor im SDS-PAGE aufgetrennt wurden, in einer Mini-Trans-Blot Kammer (s. 2.1.11) auf eine Trägermembran übertragen und auf dieser durch Immunodetektion nachgewiesen. Die PVDF-Membran wurde auf die benötigte Größe zurechtgeschnitten, 5-30 min in Methanol eingelegt, kurz mit destilliertem H₂O gewaschen und 10 min in 1x Blotpuffer gelegt. Zwei Fleece-Schwämmchen, vier zurechtgeschnittene Filterpapiere und das Gel wurden in 1x Blottingpuffer eingelegt. Beim Aufbau des sogenannten Blotsandwichs wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen den Schichten bildeten. Es wurde bei einer konstanten Spannung von 40 V über Nacht geblottet. Um eine Überhitzung der Apparatur zu verhindern, wurde ein Kühlakku in den Tank gegeben und bei 4 °C geblottet.

Für die Immundetektion wurde die Membran zuerst für 1h in 5% Milchpulver, gelöst in TBS-Tween (0,05% Tween20), unter Schütteln inkubiert. Hierdurch wurden unspezifische Proteinbindungsstellen blockiert. Der jeweilige Antikörper wurde nach Angaben des Herstellers in 5%iger Milchlösung verdünnt. Die Membran wurde mit 3 ml der Primärantikörperlösung in einer Plastiktasche eingeschweißt und über Nacht bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde die Membran 3 x 15 sec und 2 x 10 min unter Schütteln in TBS-Tween gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls in Milchlösung verdünnt und mit der Membran 1-1,5 h in einer Plastiktasche eingeschweißt inkubiert. Anschließend wurde die Membran nochmals 3 x 15 sec und 2 x 10 min in TBS-Tween gewaschen.

Die Entwicklung erfolgte mit ImageQuant LAS 4000 mini (s. 2.1.11). Die Membran wurde auf dem Entwicklungstisch platziert und 500-1000 µl Entwicklungslösung (s. 2.1.1) darauf getropft. Die Stärke der Entwicklungslösung und die Zeit der Messungen wurden individuell angepasst. Eine andere Möglichkeit zur Entwicklung der Membran stellte die Röntgenentwicklung dar. Diese wurde angewandt, um sehr schwache Banden stärker darstellen zu können. Gelagert wurden die Membranen für

wenige Wochen bei 4 °C, wobei sie durch genügend TBS-Tween vor Austrocknung geschützt werden mussten.

Sollte die Membran mehrfach (höchstens 3-4x) verwendet werden, wurden die gebundenen Antikörper durch das sogenannte Strippen entfernt. Dazu wurde die Membran in ca. 20 ml Stripping-Puffer in einem dicht verschlossenen Zylindergefäß bei 50 °C unter langsamer Drehung für 30 min inkubiert. Danach wurde sie 2 x 10 min unter Schütteln in reichlich TBS-Tween gewaschen. Die Immunodetektion wurde anschließend mit der Blockierlösung beginnend wiederholt.

Verwendete Verdünnung der Primärantikörper:

Anti-β-Aktin mouse 1:10000 (s. 2.1.4.1)

Anti-HAS3 rabbit 1:1000 (s. 2.1.4.1)

Anti-GFP Epitope Tag rabbit 1:2000 (s. 2.1.4.1)

Anti-HAS1 rabbit 1:500 (s. 2.1.4.1)

Verwendete Verdünnung der Sekundärantikörper:

Anti-mouse-HRP 1:20000 (s. 2.1.4.2)

Anti-rabbit-HRP 1:4000 (s. 2.1.4.2)

2.2.6 Aktivitätsbestimmung der Hyaluronansynthase

2.2.6.1 Hyaluronan-ELISA

Das von der Hyaluronansynthase in den Zellüberstand sekretierte Hyaluronan wurde mittels ELISA quantifiziert. In einer 24-Well-Platte wurden pro Well 9.500 Zellen ausgesät. Von jedem Zelltyp wurden Duplikate angelegt. Um der Hyaluronansynthase genügend Substrat für die Synthese des Hyaluronans zu bieten, wurde dem üblichen Kulturmedium Uridine 5'-Diphospho-N-Acetylglucosamin Natriumsalz und Uridine 5'-Diphosphoglucuronsäure Trinatriumsalz jeweils in einer Konzentration von 2,5 mM zugegeben. Das Medium wurde nach 48 h abgenommen und bildete das Probenmaterial für den ELISA. Es wurde der TECO Human Hyaluronansäure Test TE1017 (s. 2.1.10) verwendet. Bei diesem bindet ein Hyaluronan-spezifisches biotinyliertes Bindungsprotein an Hyaluronan, welches an die Mikrotiterplatte gebunden ist, sofern dieses nicht bereits durch in den Proben

enthaltenes Hyaluronan abgefangen wird. Die Intensität der nachfolgenden Farbreaktion ist hierbei also umgekehrt proportional zur Konzentration an Hyaluronan in der Probe. Der Test wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Alle Testansätze wurden immer in Doppelbestimmung ausgeführt. Für jeden Durchgang wurde eine Standardkurve generiert. Hierfür wurden die im Kit enthaltenen Standards von 0-1500 ng/ml verwendet. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 450 nm mit dem Mikrotiterplatten-Photometer Typ Multiscan FC 357 (s. 2.1.11). Um die Syntheseleistung der verschiedenen Zelltypen mit ihren jeweiligen Isoformen der Hyaluronansynthase quantitativ vergleichen zu können, wurden die Zellen in jedem Well trypsinisiert und gezählt (s. 2.2.4.3).

2.2.6.2 Aktivitätsassay mit bHABC

Durch den Aktivitätsassay mit dem biotinylierten Hyaluronanbindekomplex (bHABC) wurde gezeigt, dass die Hyaluronansynthase, welche in die Zellmembran integriert ist, tatsächlich auch aktiv ist. Dieser Assay wurde im Labor etabliert unter Anlehnung an vorangegangene Verwendungen von bHABC (Rilla et al. 2005, Karvinen et al. 2003). Hierfür wurde in einer 24-Well-Platte derselbe Versuchsaufbau wie für den HA-ELISA (s. 2.2.6.1) angelegt. Nach 48 h der Kultivierung wurde jedes Well mit 500 µl PBS ausgewaschen und die Zellen in 2%igem Paraformaldehyd für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Pro Zelllinie wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Vor der Permeabilisierung wurde bei dieser das extrazelluläre Hyaluronan durch 10 min Inkubation mit Hyaluronidase bei 37 °C verdaut.

Danach wurde mit 500 µl 0,3% Triton X-100, gelöst in 1%igem BSA, für 30 min permeabilisiert. Das bHABC wurde in Wasser gelöst und in 1%igem BSA auf eine Konzentration von 5 µg/ml verdünnt. Je Well wurden 200 µl dieser Arbeitslösung dazugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Das gebundene bHABC wurde mit ExtrAvidin-Peroxidase und 3,3'-Diaminbenzidine sichtbar gemacht. Die ExtrAvidin-Peroxidase wurde in PBS auf 40 µg/ml verdünnt und je 200 µl für 1 h in die Wells gegeben. Zu 5 ml PBS mit pH 7,2 (der pH-Wert ist hier wichtig, ein pH < 7,2 führt zu verminderter Färbeintensität, ein pH > 7,6 führt zu hoher Hintergrundfärbung) wurden je 250 µl 1% 3,3'-Diaminbenzidine und 0,3% Wasserstoffperoxid gegeben und gut gemischt. Von dieser Arbeitslösung wurden 500 µl in jedes Well gegeben und es zeigte sich sofort eine braune Färbung. Nach 3-5 min wurde die Reaktion mit Wasser

abgestoppt und noch ein- bis zweimal mit Wasser gewaschen. Die Zellen wurden bei 10x und 20x Vergrößerung mit dem Mikroskop Axiovert S100 und der Kamera AxioCam ICc3 (s. 2.1.11) abgebildet.

2.2.7 Immunodetektion von Proteinen in hMSCs

2.2.7.1 Immunfluoreszenz-Färbung mit CD44- und HAS-Antikörpern

Für die Immunfluoreszenz wurden die jeweiligen Zellen über 48 h auf sterilen Objektträgern kultiviert. Je Objektträger wurden hierzu 20.000 Zellen in 500 µl Kulturmedium ausgesät und nach ca. 3 h mit weiteren 5 ml Medium aufgefüllt, sobald sie sich abgesetzt hatten. Die Objektträger wurden 3 x 5 min mit PBS (mit Mg²⁺/Ca²⁺) gewaschen, dann erfolgte die Fixierung der Zellen mit 4% Formaldehyd in PBS für 10 min. Danach wurde wieder 3 x 5 min mit PBS (ab jetzt ohne Mg²⁺/Ca²⁺) gewaschen und mit einem wasserabweisenden Dako-Stift die einzelnen Felder aufgezeichnet. Um eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers zu verhindern, wurden die Zellen für eine Stunde mit BSA blockiert. Dafür wurde auf jedes Feld je nach Größe 200-500 µl 3% BSA, in PBS gelöst, gegeben. Das BSA wurde abgeklopft und dann wurde mit dem Primärantikörper für eine Stunde in der Feucht-/Dunkelkammer inkubiert. Die Konzentration des Primärantikörpers erfolgte nach Angaben des Herstellers. Gelöst wurde in 0,1% BSA und das Volumen wurde so gewählt, dass das Feld überall gut bedeckt war (100-200 µl). Danach wurde wieder für 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls nach Angaben des Herstellers in 0,1% BSA verdünnt, auf die Zellen gegeben und auch für eine Stunde in der Feuchtkammer inkubiert. Dann wurde wieder 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Die Nuclei wurden mit 1:10.000 in PBS verdünntem DAPI für 5 min gefärbt. Anschließend wurde wie zuvor mit PBS gewaschen. Auf einem Deckgläschen wurden je 80 µl Mowiol gleichmäßig verteilt und dieses luftblasenfrei auf den Objektträger aufgelegt. Über Nacht wurden die Objektträger in der Feuchtkammer im Kühlschrank gelagert und am nächsten Morgen wurden die Ränder mit transparentem Nagellack versiegelt.

Für jede Zelllinie und für jede Färbung wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Bei dieser wurde statt dem Primärantikörper nur 0,1% BSA auf das jeweilige Feld gegeben. Alle anderen Schritte wurden identisch durchgeführt. Alle Schritte erfolgten,

soweit nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur. Um die beste Farbintensität zu erhalten, erfolgte das Mikroskopieren direkt am Folgetag, wobei die gefärbten Objektträger in der Feuchtkammer bei 4 °C ca. 2 Wochen aufgehoben werden konnten.

Verwendete Verdünnungen der Primärantikörper:

Anti-CD44 rabbit 1:50 (s. 2.1.4.1)

Anti-CD44 mouse 1:200-400 (s. 2.1.4.1)

Anti-HAS2 rabbit 1:50-75 (s. 2.1.4.1)

Verwendete Verdünnungen der Sekundärantikörper:

Alexa Fluor 546 donkey-anti-rabbit 1:500 (s. 2.1.4.2)

Alexa Fluor 488 donkey-anti-rabbit 1:500 (s. 2.1.4.2)

Alexa Fluor 546 donkey-anti-mouse 1:500 (s. 2.1.4.2)

2.2.7.2 Aktin-Färbung mit Phalloidin

Zur Darstellung des Aktinzytoskeletts wurde die Färbung mit Phalloidin durchgeführt. Das Phalloidin bindet spezifisch an filamentäres F-Aktin. Das Besiedeln der Objektträger und die Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten wie unter 2.2.7.1 beschrieben. Die Fixierung erfolgte hier mit 3,7% Formaldehyd in PHEM (pH 6,1) (s. 2.1.2) für 20 min. Es folgten ein Waschschnitt und anschließend die Permeabilisierung mit 0,1% TritonX-100 für 2 min. Wieder wurde gewaschen und dann mit dem Dako-Stift die Felder aufgezeichnet. Auf jedes Feld wurden 2-4 Tropfen eines Image Enhancers (Image-iT FX Signal Enhancer, Life Technologies) gegeben und für 30 min inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden je Feld 200 - 500 µl Phalloidin (Alexa Fluor 546) in einem Verhältnis 1:10 in 1% BSA auf die Zellen gegeben. Nach einer 20-minütigen Inkubation in der Feucht-Dunkel-Kammer und einem weiteren Waschschnitt erfolgten die DAPI-Färbung und das Eindeckeln mit Mowiol wie in 2.2.7.1 beschrieben. Das Mikroskopieren fand am nächsten Tag statt.

2.2.8 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine Methode der Lichtmikroskopie zur Darstellung bestimmter Strukturen einer Zelle. Fluoreszierende Stoffe werden durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und strahlen selbst ein Licht anderer Wellenlänge ab. Dieses abgestrahlte, schwächere Licht kann durch spezielle Filter hervorgehoben werden. Manche Stoffe sind selbst fluoreszent (z.B. das hier verwendete eGFP-Protein) andere können mit Fluoreszenzfarbstoffen spezifisch angefärbt werden. Das Mikroskopieren erfolgte mit dem Mikroskop Axio Observer.Z1 (Zeiss) und der Kamera AxioCam MRm (Zeiss). Es wurden drei verschiedene Fluoreszenzfilter benutzt: der grüne GFP- (Ex. BP 450-490 nm, Em. LP 515 nm), der blaue DAPI- (Ex. BP 360/51 nm, Em. BP 450-475 nm) und der rote Cy3-Filter (Ex. BP 545/25 nm, Em. BP 605/70 nm). Es wurden die Objektive „Plan-Apochromat 20x/0.80 Ph 2“ und „Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil“ verwendet. Die Einstellungen der Belichtungszeit wurden als Erstes so reguliert, dass in den Negativkontrollen kein Signal detektiert werden konnte und im Verlauf für alle Aufnahmen beibehalten.

Mit diesem Mikroskop wurden außerdem Videos im Zeitraffer-Modus aufgenommen (Timelapse). Da die doppeltransduzierten hMSCs zwei eigenfluoreszierende Proteine, eGFP (als Fusionstag an den Hyaluronansynthasen) und mRFPuby (als Fusionstag an Lifeact), enthalten, mussten sie weder fixiert noch gefärbt werden und konnten lebendig aufgenommen werden. Es wurden Videos über 40 min mit einer Aufnahme alle 30 sec und Videos über 5 min mit Aufnahmen alle 5 sec gemacht. Bei den Aufnahmen wurde die Software AxioVision SE64 Rel. 4.8. (s. 2.1.12) verwendet.

2.2.9 Statistik

Die statistische Auswertung quantitativer Messungen erfolgte mit der Software GraphPad Prism 5.0 (s. 2.1.12). Um Ergebnisse auf statistische Signifikanz zu untersuchen, wurde der Student's t-Test für unverbundene Proben angewendet. Ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. Die Experimente wurden in mindestens zwei unabhängigen Durchgängen und jeweils in Duplikaten durchgeführt. Die Balkendiagramme stellen die Mittelwerte mit der Standardabweichung dar.

3. Ergebnisse

3.1 Klonierungsstrategien

In der vorliegenden Arbeit wurden vier verschiedene Plasmide kloniert: jeweils eines mit den HAS-Isoformen 1, 2 und 3, um deren Überexpression in den Zellen zu erzielen, sowie ein weiteres mit dem Lifeact-mRFPRuby-Gen, um F-Aktin in lebenden Zellen darzustellen. Um die Zellen direkt für Experimente im Fluoreszenzmikroskop einsetzen zu können, wurden die HAS-Gene C-terminal mit dem Fluoreszenzgen eGFP fusioniert. Aus demselben Grund enthält das Lifeact-Gen einen C-terminalen mRFPRuby-Tag. Als Negativkontrolle diente der pLenti4.3-mock. Bei diesem Vektor, der bereits im Labor vorhanden war, war die komplette Expressionskassette (attR1-Stelle, ccdB-Gen, CMV-Promotor und attR2-Stelle) entfernt worden. Damit sollte beurteilt werden, welchen Einfluss die Prozedur der Transduktion auf die Zellphysiologie hat.

3.1.1 Klonierung von pLenti4.3-HAS1-eGFP

Das zu klonierende HAS1-Gen wurde als Plasmid in einer Bakterienkultur bei Source BioScience LifeSciences erworben (IRATp970E0956D). Der benötigte Abschnitt wurde mittels PCR amplifiziert. Über die verwendeten Oligonukleotide wurde am 5'-Ende des PCR-Produkts eine XmnI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine Xhol-Schnittstelle eingeführt. Anschließend wurde das PCR-Produkt über seine Adenin-Überhänge am 3'-Ende in das Plasmid PCR2.1-TOPO ligiert. Als nächster Schritt erfolgte die Klonierung in den Vektor pENTR11. Für die Klonierung der eGFP-Sequenz wurde diese aus dem im Labor bereits vorhandenen Vektor pENTR11-eGFP mit den Enzymen BamHI und Xhol ausgeschnitten und in den Vektor pENTR11-HAS1 ligiert. Zur Kontrolle der richtigen Orientierung und der HAS1-eGFP-Sequenz erfolgten Restriktionsverdaue mit den Enzymen Ncol (3724 bp + 1017 bp) und BsrBI (2875 bp + 1153 bp + 713 bp) sowie eine Sequenzierung. Im letzten Schritt wurde die HAS1-eGFP-Sequenz in den Zielvektor pLenti4.3/V5-DEST(Zeo) homolog rekombiniert (s. Abb. 6). Der Kontrollverdau erfolgte mit den Enzymen Pvul (4774 bp + 2637 bp + 1788 bp + 1045 bp) und Pvull (6955 bp + 2513 bp + 776 bp). Die homologe Rekombination wurde durch Sequenzierung an den Rekombinationsstellen des pLenti4.3-HAS1-eGFP überprüft.

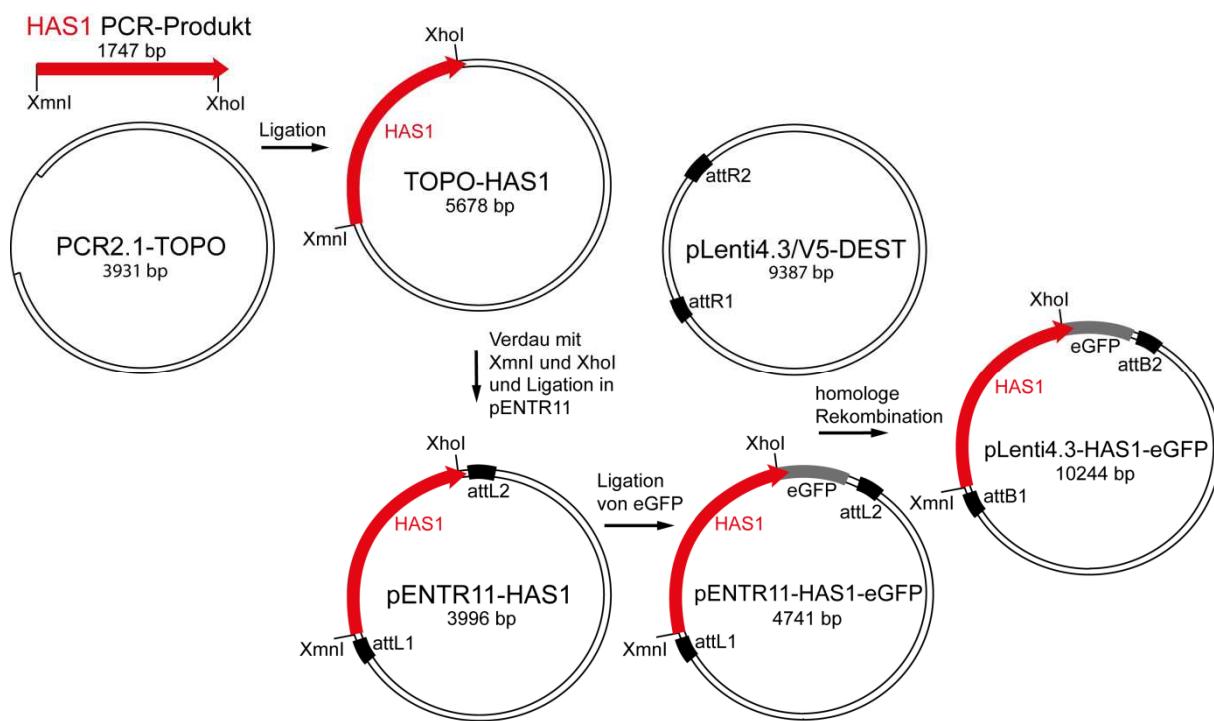


Abb. 6: Klonierungsstrategie des Plasmids pLenti4.3-HAS1-eGFP

3.1.2 Klonierung von pLenti4.3-HAS2-eGFP

Das zu klonierende HAS2-Gen wurde ebenfalls bei Source BioScience LifeSciences erworben (IRCMp5012E0230D). Das mittels PCR amplifizierte Gen wurde in das Plasmid PCR2.1-TOPO ligiert. Die Primer enthielten an beiden Enden des HAS2-Gens Überhänge zur Generierung von Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease BamHI. Eine erste Selektion des richtigen Klons erfolgte mit dem Blue/White-Screening auf X-Gal. Zur genaueren Kontrolle wurden ein Restriktionsverdau und eine Kolonie-PCR auf dem Plasmid TOPO-HAS2 durchgeführt. Aus einem passenden Klon wurde die HAS2-Sequenz herausgeschnitten und in den Vektor pENTR11-eGFP ligiert. Der Kontrollverdau von pENTR11-HAS2-eGFP erfolgte mit den Enzymen BamHI (3039 bp + 1662 bp) und HinclI (3459 bp + 1242 bp). Im letzten Schritt wurde nun die HAS2-eGFP-Sequenz in den Expressionsvektor pLenti4.3/V5-DEST(Zeo) homolog rekombiniert (s. Abb. 7). Mittels Kolonie-PCR wurden scheinbar passende Klone ermittelt und diese weiter mittels Restriktionsverdau mit den Enzymen DralII (9045 bp + 1159 bp) und BamHI (8426 bp + 1662 bp + 116 bp) analysiert. Anschließend wurde das Plasmid pLenti4.3-HAS2-eGFP mittels Sequenzierung kontrolliert.

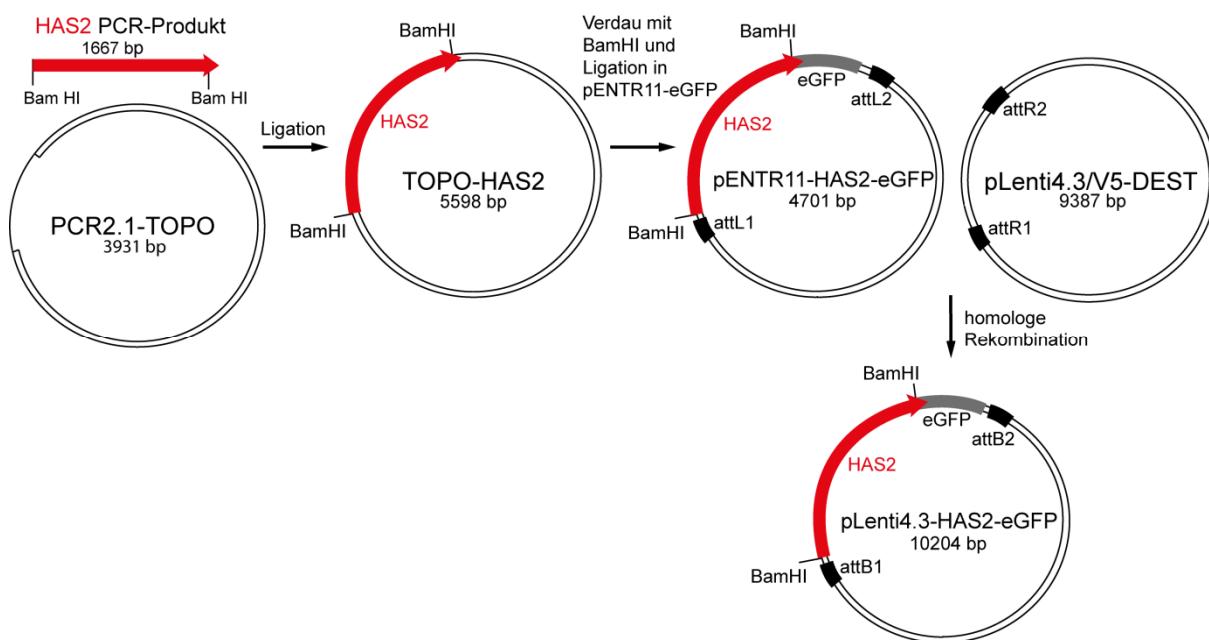


Abb. 7: Klonierungsstrategie des Plasmids pLenti4.3-HAS2-eGFP

3.1.3 Klonierung von pLenti4.3-HAS3-eGFP

Das Ursprungsplasmid, welches das HAS3-Gen codiert, wurde aus einem *E.coli*-Bakterienstamm isoliert (Source BioScience LifeSciences, IRATp970E0841D). Die HAS3-Sequenz wurde mittels PCR amplifiziert. Die dafür entworfenen Primer führten an beiden Enden des HAS3-Gens Ncol-Schnittstellen ein. Über die Adenin-Überhänge am 3'-Ende wurde das PCR-Produkt in das Plasmid PCR2.1-TOPO ligiert. Durch Kolonie-PCR und Restriktionsverdau wurde ein passender Klon ermittelt. Aus diesem Plasmid wurde mit dem Enzym Ncol die HAS3-Sequenz herausgeschnitten und in den Vektor pENTR11-eGFP ligiert. Der Kontrollverdau von pENTR11-HAS3-eGFP erfolgte mit den Enzymen Ncol (3008 bp + 852 bp) und PstI (2660 bp + 1200 bp). Im letzten Schritt wurde die HAS3-eGFP-Sequenz durch homologe Rekombination in den Expressionsvektor pLenti4.3/V5-DEST(Zeo) kloniert (s. Abb. 8). Die Klone wurden durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen BamHI und EcoRI sowie durch eine PCR kontrolliert. Die anschließende Sequenzierung von pLenti4.3-HAS3-eGFP bestätigte die Richtigkeit des Plasmids.

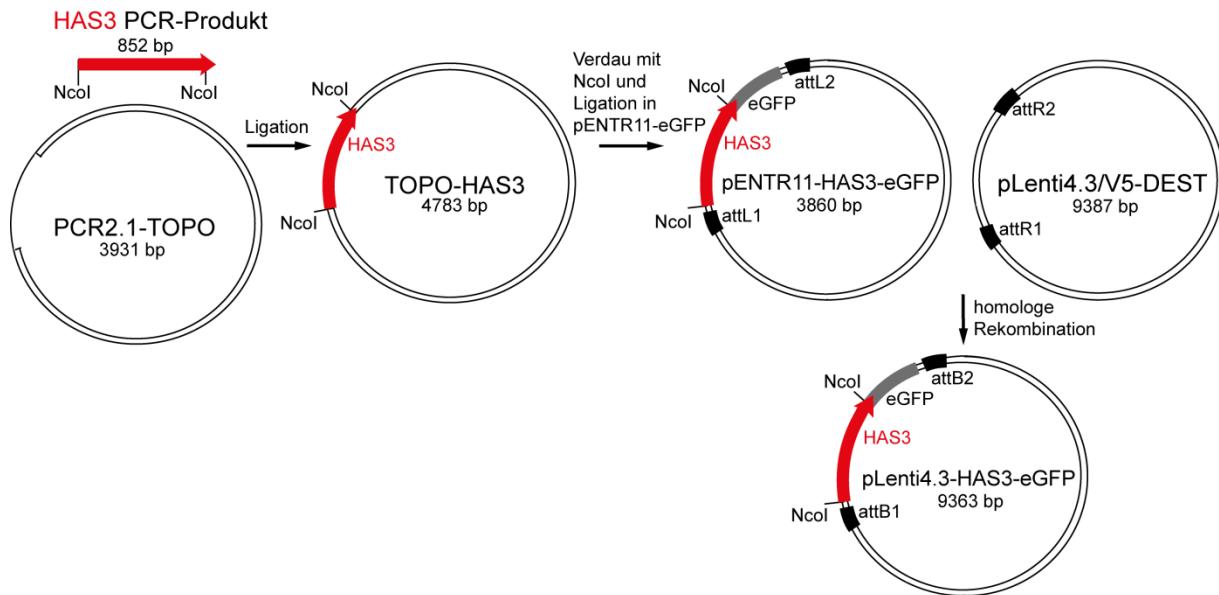


Abb. 8: Klonierungsstrategie des Plasmids pLenti4.3-HAS3-eGFP

3.1.4 Klonierung von pLenti4.3-Lifeact-mRFPruby und

pLenti6.3-Lifeact-mRFPruby

Das Gen Lifeact-mRFPruby wurde als Plasmid pBK-CMV-Lifeact-mRFPruby von PD Dr. Attila Aszodi freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Lifeact-mRFPruby-Sequenz wurde zuerst über die EcoRI- und NotI-Schnittstellen in den Vektor pENTR11 ligiert. Bei der folgenden Sequenzierung wurde bemerkt, dass direkt vor dem Lifeact-Startcodon eine ATG-Sequenz vorhanden war, welche zur Translation eines falschen Proteins führen könnte. Deshalb wurde das Plasmid modifiziert, indem mit dem Enzym XmnI dieser störende Sequenzabschnitt herausgeschnitten wurde. Zur Kontrolle wurden Verdaue mit den Enzymen HinclI und Asel (jeweils 3062 bp) sowie eine Sequenzierung durchgeführt. Im letzten Schritt wurde die Lifeact-mRFPruby-Sequenz durch homologe Rekombination jeweils in die Zielvektoren pLenti4.3/V5-DEST(Zeo) und pLenti6.3/V5-DEST(Bla) eingeführt (s. Abb. 9). Der Kontrollverdau erfolgte mit den Enzymen BspHI (4130 bp + 3420 bp + 1008 bp) und DralII (7399 bp + 1159 bp) für pLenti4.3 und mit SfoI (5687 bp + 2871 bp) und NotI (6016 bp + 2542 bp) für den pLenti6.3/V5-DEST. Sowohl pLenti4.3/V5-Lifeact-mRFPruby als auch pLenti6.3/V5-Lifeact-mRFPruby wurden zur Überprüfung sequenziert.

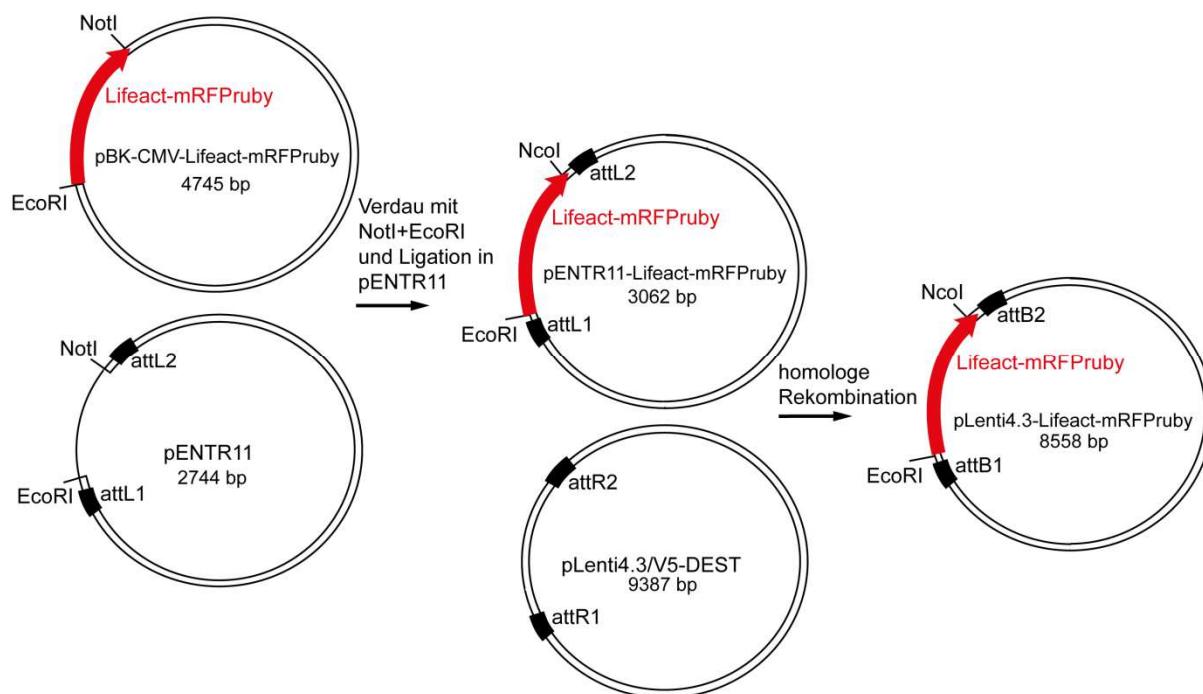


Abb. 9: Klonierungsstrategie des Plasmids pLenti4.3-Lifeact-mRFPruby

3.2 Analyse der Expression der HAS-eGFP in SCP1-HAS-eGFP

Nach der Transduktion der hTERT-immortalisierten hMSCs (SCP1-Zellen) mittels lentiviralen Gentransfers wurde die Expression der transgenen HAS-eGFP sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene untersucht.

3.2.1 Nachweis der Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS

Da die hier transduzierten HAS-Gene mit einem eGFP-Tag kloniert wurden, konnte die erfolgreiche Transduktion in einem ersten Schritt direkt mittels der Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Die genauere Transduktionseffizienz wurde mittels FACS-Analyse quantifiziert. Um Kulturen mit möglichst hoher Transduktionseffizienz, d.h. mit hohem Anteil an eGFP-positiven Zellen zu erhalten, wurden die Zellklone vereinzelt (s. 2.2.4.4). Aus 48 Kolonien wurden direkt mit der Fluoreszenzmikroskopie diejenigen bestimmt, welche die stärkste Fluoreszenz zeigten. Die sechs besten Kolonien wurden weiterkultiviert und expandiert. Daraus wurden wieder anhand der Fluoreszenzintensität die drei besten mikroskopisch ausgewählt und diese mittels FACS-Analyse quantitativ untersucht. Der Klon mit der höchsten Fluoreszenz wurde weiter kultiviert und für nachfolgende Versuche eingesetzt. In der FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zur Negativkontrolle SCP1-mock in der Zelllinie SCP1-HAS1-eGFP D6 der Anteil an grün fluoreszierenden Zellen bei 97,9% lag. Die Expressionsrate der Zelllinie SCP1-HAS3-eGFP E6 lag bei 99% (s. Abb. 10). Trotz der geringfügig niedrigeren Transduktionseffizienz wurde der Klon E6 dem Klon B7 vorgezogen, da er eine etwas stärkere Fluoreszenzintensität gezeigt hatte. Die Zellen SCP1-HAS2-eGFP zeigten sowohl unter dem Mikroskop als auch in der FACS-Analyse keine messbare Fluoreszenz. Das HAS2-eGFP konnte aber auf RNA- und Proteinebene mittels RT-PCR und Western Blot nachgewiesen werden (s. 3.2.2 und 3.2.3). Dies beweist eine erfolgreiche Transduktion und Expression des Proteins. Die nicht vereinzelten SCP1-Lifeact-mRFP-Pruby-Zellen zeigten in der FACS-Analyse ein Fluoreszenzsignal bei 42,2% der Zellen. Da diese Zellen nur unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden sollten, wurden keine Zellklone gepickt.

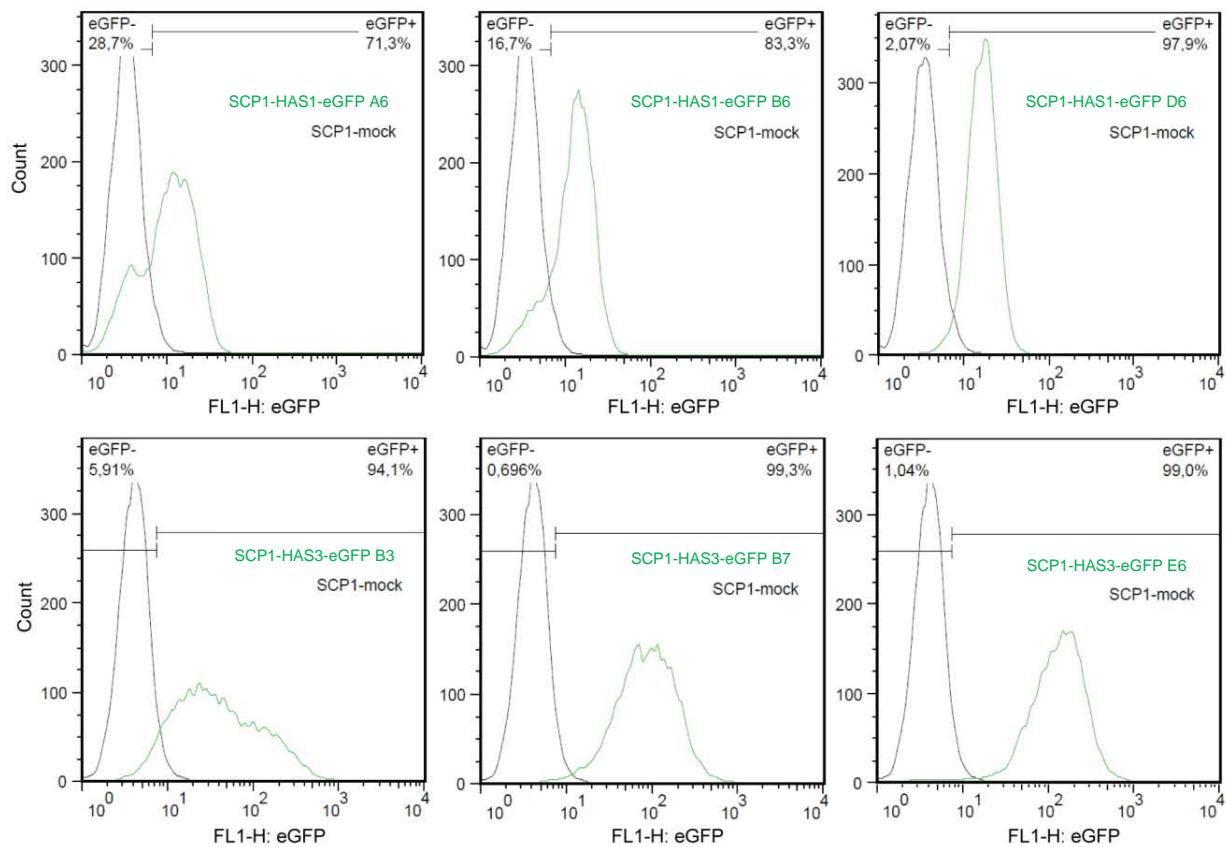


Abb. 10: Ergebnisse der FACS-Analyse von den jeweils drei gepickten Klonen der Zelllinien SCP1-HAS1-eGFP und SCP1-HAS3-eGFP.

3.2.2 Nachweis der Expression auf RNA-Ebene

Des Weiteren wurde die Expression der HAS-Gene mittels RT-PCR untersucht. Um die Überexpression in den transduzierten Zellen SCP1-HAS1-eGFP A6, B6 und D6, SCP1-HAS2-eGFP und SCP1-HAS3-eGFP B3, B7 und E6 darzustellen, wurde die Zelllinie SCP1-mock als Kontrolle verwendet. Die Normierung der eingesetzten cDNA-Menge erfolgte über die Expression des Haushaltsgens GAPDH. Es zeigte sich eine starke Expression der Gene HAS1-eGFP, HAS2-eGFP und HAS3-eGFP in den jeweiligen transduzierten Zelllinien (s. Abb. 11). Bei Verwendung von Primern, die spezifisch in den verschiedenen HAS-Sequenzen binden, wurden in der mock-Zelllinie keine Banden für die Gene HAS1 und HAS3 gesehen. Die Bande für HAS2, die sich schwächer als in der transduzierten Zelllinie darstellt, deutet auf eine endogene Expression der HAS2 in den unbehandelten SCP1-Zellen (hMSCs) hin. Um sicherzugehen, dass die transgenen HAS-eGFP-Gene exprimiert wurden, wurde deshalb zusätzlich die PCR mit Primern, die spezifisch in der eGFP-Sequenz binden,

untersucht. Die starken Banden in den drei HAS-Zelllinien, die nicht in den SCP1-mock nachzuweisen sind, beweisen die Expression der transgenen HAS-eGFP.

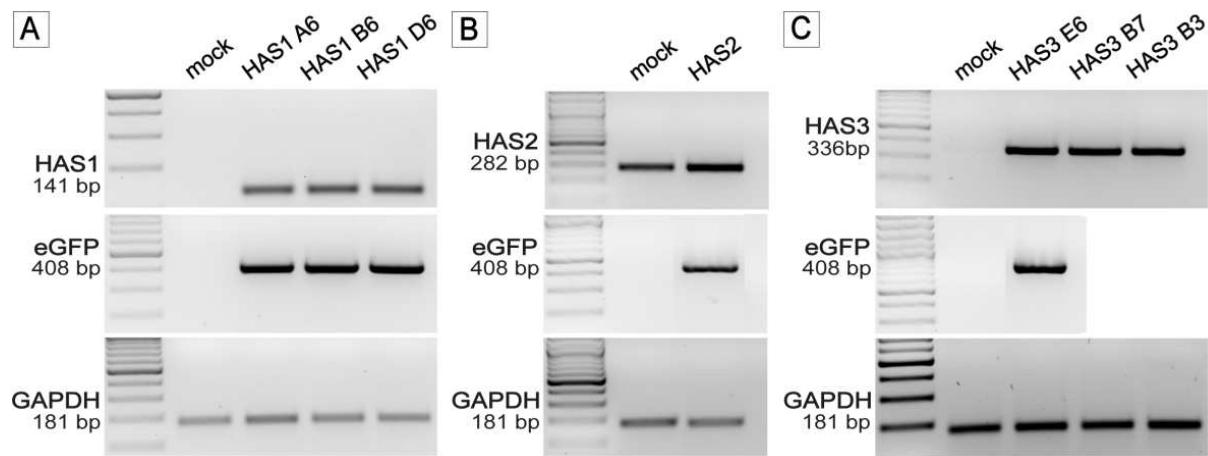


Abb. 11: Untersuchung der HAS-Expression auf RNA-Ebene mittels RT-PCR. Gezeigt wird die Expression der verschiedenen HAS-eGFP unter Verwendung eines in der HAS-Sequenz und eines in der eGFP-Sequenz bindenden Primerpaars und GAPDH (Normierung) in den Zelllinien SCP1-HAS1-eGFP (**A**), SCP1-HAS2-eGFP (**B**) und SCP1-HAS3-eGFP (**C**). Jede Zelllinie steht in direktem Vergleich mit der Kontrollzelllinie SCP1-mock. In den HAS-Zelllinien sind starke Banden für das jeweilige HAS-Gen in der richtigen Größe zu sehen. Die SCP1-mock zeigen ausschließlich eine Bande für HAS2, allerdings schwächer als in der transduzierten Zelllinie. Die Expression des eGFP-Tags zeigt sich in den transduzierten Zelllinien und nicht in SCP1-mock. Die Größen der DNA-Banden sind angegeben.

3.2.3 Nachweis der Expression auf Proteinebene

Ein weiterer Nachweis der HAS-eGFP-Expression erfolgte mittels Western Blot. Es wurden jeweils 40 µg Protein eingesetzt. Detektiert wurden die Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen HAS1, 2, 3 und gegen den eGFP-Tag (s. Abb 12). Die erwartete Proteingröße beträgt für HAS1-eGFP 92 kDa, für HAS2-eGFP 90 kDa und für HAS3-eGFP 58 kDa. Als Ladekontrolle wurde das Haushaltsprotein β-Aktin mit einer Größe von 42 kDa bei jeder Zelllinie detektiert. Bei SCP1-HAS3-eGFP konnte das Protein HAS3-eGFP sowohl mit dem Antikörper Anti-HAS3 als auch mit dem Antikörper Anti-GFP Epitope Tag detektiert werden. Bei der entsprechenden mock-Zelllinie wurde keine Bande gesehen. In SCP1-HAS1-eGFP konnte das HAS1-Protein mit dem Antikörper Anti-HAS1 detektiert werden, ebenfalls war keine Bande bei SCP1-mock sichtbar. Das HAS2-Protein ließ sich über seinen eGFP-Tag mit dem

Antikörper anti-GFP Epitope Tag nachweisen. Da sich die Bande nur sehr schwach darstellte, wurde von dieser Membran eine Röntgenaufnahme angefertigt.

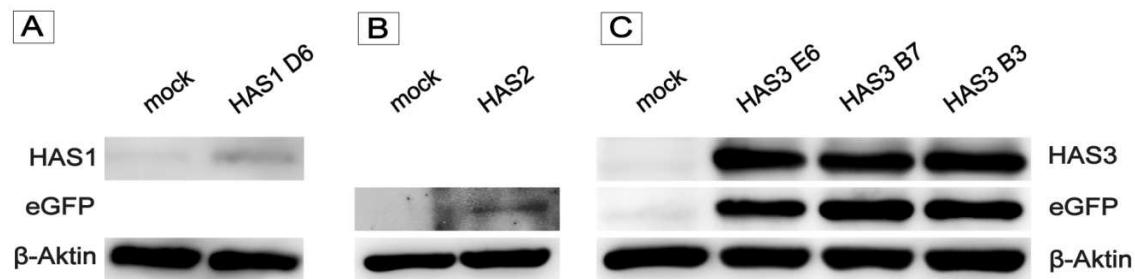


Abb. 12: Western Blot-Analyse der HAS-eGFP-Expression zum Nachweis auf Proteinebene. Gezeigt werden die Zelllinien SCP1-HAS1-eGFP D6 (**A**), SCP1-HAS2-eGFP (**B**) und SCP1-HAS3-eGFP (E6, B7, B3) (**C**) jeweils im Vergleich zu SCP1-mock. Das Haushaltsprotein β -Aktin wird in allen Zelllinien dargestellt. Mit spezifischen Antikörpern wurden die Proteine HAS1-eGFP und HAS3-eGFP bei den jeweiligen transduzierten Zellen nachgewiesen. Ebenfalls wurden die Proteine HAS2-eGFP und HAS3-eGFP über Antikörper gegen ihren eGFP-Tag nachgewiesen. Bei den entsprechenden SCP1-mock zeigt sich jeweils keine Bande.

3.3 Untersuchung der Funktionalität der HAS-eGFP

3.3.1 Untersuchung der Funktionalität der HAS-eGFP mit Hyaluronan-ELISA

Die Funktionalität der HAS-eGFP wurde über ihre Enzymaktivität untersucht. Mit einem für Hyaluronan spezifischen ELISA konnte die Menge des sezernierten Hyaluronans im Medium quantitativ gemessen werden. Die Messung erfolgte nach 48 h Inkubation der Zellen in einem Medium, dem die Substrate für die Hyaluronansynthese, Uridine 5'-Diphospho-N-Acetylglucosamin Natriumsalz und Uridine 5'-Diphosphoglucuronsäure Trinatriumsalz, zugesetzt wurden. In Vorversuchen wurde die geeignete Konzentration an Substratzusätzen ermittelt. Dafür wurden Uridine 5'-Diphospho-N-Acetylglucosamin Natriumsalz sowie Uridine 5'-Diphosphoglucuronsäure Trinatriumsalz dem Medium in verschiedenen Konzentrationen (1 mM, 2,5 mM, 5 mM) zugegeben. Außerdem wurden in einer Testreihe HA-Oligosaccharide in einer Konzentration von 1 mM zugegeben, da vermutet wurde, dass diese möglicherweise als Polymeraseprimer für die Hyaluronansynthese notwendig sind. Die beste Hyaluronanausbeute wurde allerdings ohne HA-Oligosaccharide und ab einer Konzentration von 2,5 mM für die Substrate erzielt. Nach Abnahme des Mediums wurde in jedem Well die Zellzahl

bestimmt. Die Ergebnisse werden als Hyaluronanmenge in ng, berechnet auf die Synthese von 10.000 Zellen, angegeben, um so die Syntheseleistung der verschiedenen Zelllinien quantitativ vergleichen zu können. Es erfolgten zwei unabhängige Versuchsreihen ($n=2$) mit jeweils vier Replikaten einer jeden Zellreihe ($r=4$). Jede Probe wurde im ELISA als Duplikat durchgeführt. Die mit HAS1-, HAS2- und HAS3-eGFP transduzierten Zellen zeigen jeweils eine statistisch signifikant höhere Hyaluronanproduktion gegenüber der mock-Zelllinie (s. Abb. 13). Die Zelllinie SCP1-HAS3-eGFP E6 zeigt die höchste Ausbeute an Hyaluronan. Eine Zelle mit überexprimierter HAS3-eGFP produziert 2,8-mal so viel Hyaluronan wie eine Zelle der Linie SCP1-mock. Die Zellen der Linie SCP1-HAS1-eGFP D6 erreichen die 1,8-fache und SCP1-HAS2-eGFP die 1,9-fache Hyaluronankonzentration im Vergleich zu SCP1-mock-Zellen.

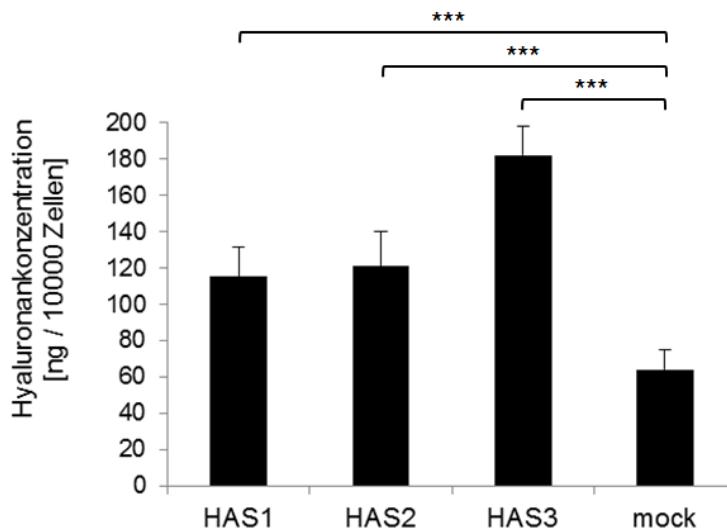


Abb. 13: Hyaluronan-ELISA aus dem Medium der Zelllinien SCP1-HAS1-eGFP D6, SCP1-HAS2-eGFP, SCP1-HAS3-eGFP E6 und SCP1-mock. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Die mit HAS transduzierten SCP1-Zellen zeigen im Vergleich zu SCP1-mock eine deutlich gesteigerte Hyaluronansynthese pro 10.000 Zellen. ($p<0,0001$)

3.3.2 Untersuchung der Aktivität der HAS-eGFP mittels Aktivitätsassay

Das in diesem Assay verwendete biotinylierte Hyaluronanbindeprotein bHABC (biotinylated hyaluronan binding complex) bindet spezifisch an Hyaluronan. Sowohl HA an der Zellmembran, welches noch an die HAS gebunden ist, als auch intrazelluläres HA kann so gefärbt werden. Es wurden die Zelllinien SCP1-HAS1-eGFP D6, SCP1-HAS2-eGFP, SCP1-HAS3-eGFP E6 und SCP1-mock nach 48 h

Kultivierung in 24-Wellen gefärbt. Pro Zelllinie wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, bei welcher das HA mittels Hyaluronidase verdaut wurde. Die braune HA-Färbung stellt sich über die ganze Zelle verteilt dar. Die kräftigste Färbung befindet sich im Zellkörper. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Zelllinien, in denen eine der HAS-eGFP-Isoformen überexprimiert wird, eine stärkere Braufärbung zeigen als die SCP-mock-Zelllinie. In den Negativkontrollen ist der Zellkern unspezifisch gefärbt (s. Abb. 14).

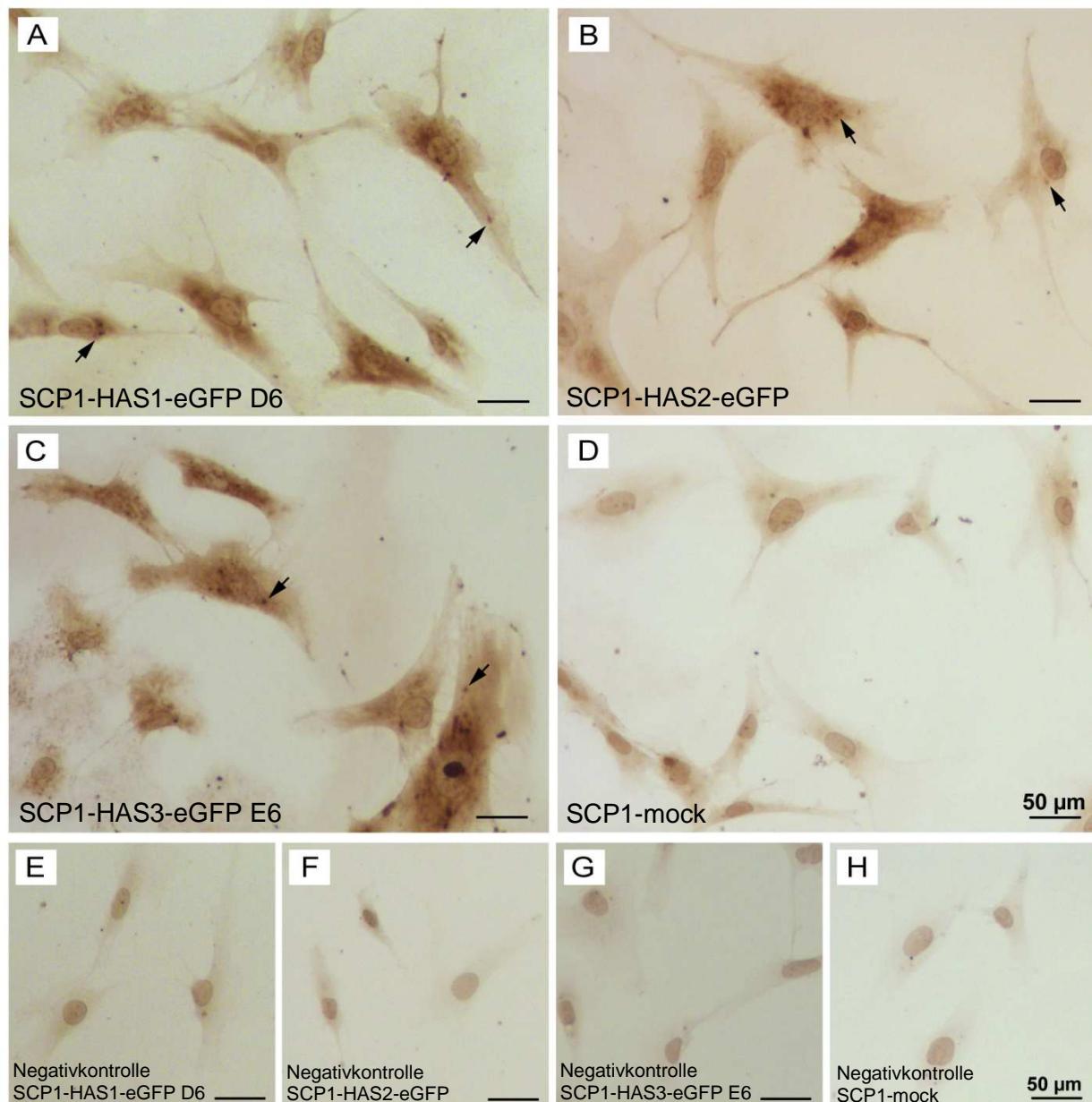


Abb. 14: Hyaluronan-Färbung mit bHABC. Verglichen wurde die HA-Verteilung in den Zelllinien SCP1-HAS1-eGFP D6 (**A**), SCP1-HAS2-eGFP (**B**), SCP1-HAS3-eGFP E6 (**C**) mit der Kontrollzelllinie SCP1-mock (**D**) nach 48h Kultivierung. Die Zellen mit überexprimierten HAS-eGFP (**A-C**) zeigen eine intensivere HA-Färbung als die Kontrolle (**D**). Die Pfeile zeigen akkumuliertes HA. Für die Negativkontrolle wurde das HA mit Hyaluronidase verdaut (SCP1-HAS1-3 (**E-G**), SCP1-mock (**H**)).

3.4 Untersuchung der Lokalisation der HAS-eGFP

Die Untersuchung der HAS-eGFP-Lokalisation erfolgte mittels Immunfluoreszenz. Durch den eigenfluoreszierenden eGFP-Tag an ihrem C-terminalen Ende sollten die HAS direkt im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Bei teils schwacher Eigenfluoreszenz wurde das Signal durch spezifische Immunfluoreszenzantikörper verstärkt. Um die Lokalisation der HAS-eGFP als integrales Membranprotein in der Zelloberfläche zu bestätigen, wurde eine Membranfärbung mit spezifischem Antikörper gegen den Oberflächenmarker CD44 durchgeführt. Außerdem erfolgte eine Färbung des Aktinzytoskeletts, um eine Interaktion zwischen den HAS-eGFP und dem Zytoskelett untersuchen zu können. Nach Fixierung mit 4% Formaldehyd wurden die Zelllinien SCP1-HAS1-eGFP D6, SCP1-HAS2-eGFP, SCP1-HAS3-eGFP E6 und SCP1-mock mit den folgenden Antikörpern behandelt: als Primärantikörper wurde der monoklonale Antikörper Anti-CD44 und als Sekundärantikörper der Alexa Fluor 546 konjugierte anti-Maus Antikörper verwendet. Um das Signal der HAS2-eGFP zu verstärken, wurde auf der Zelllinie SCP1-HAS2-eGFP als zusätzlicher Primärantikörper Anti-HAS2 und als Sekundärantikörper der Alexa Fluor 488 konjugierte anti-Kaninchen Antikörper verwendet. Für die Aktin-Färbung wurden dieselben Zelllinien mit 3,7% Formaldehyd fixiert und mit Phalloidin nach Protokoll (s. 2.2.7.2) gefärbt. Um eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers auszuschließen, wurde als Negativkontrolle bei jeder Färbung und auf jeder Zelllinie eine Behandlung nur mit Sekundärantikörper durchgeführt. Die Einstellung am Mikroskop erfolgte so, dass in diesen Proben kein Fluoreszenzsignal detektiert wurde. Außerdem diente die mock-Zelllinie als Vergleich, da diese keinen eGFP-Tag exprimiert, also auch kein grünes Signal detektiert werden sollte. Um die Fluoreszenzsignale stärker darstellen zu können, wurden die Bilder mit der Software Adobe Photoshop bearbeitet. Dabei wurden Helligkeit und Kontrast auf bis zu 60 des Wertebereichs erhöht. Bei den Bildern, die im direkten Vergleich stehen, erfolgte eine identische Helligkeits- und Kontrastanpassung.

3.4.1 Lokalisation der HAS-eGFP in der Zellmembran

In allen Zelllinien, die ein HAS-eGFP-Gen tragen, ist ein deutliches grünes Fluoreszenzsignal zu sehen, während bei der mock-Zelllinie mit denselben Einstellungen keine grüne Eigenfluoreszenz erkennbar ist. Auch bei der Anwendung des spezifischen Antikörpers gegen HAS2 ist in der mock-Zelllinie nur eine sehr geringe Färbung im Vergleich zu der Zelllinie SCP1-HAS2-eGFP zu sehen. Dies bestätigt die Überexpression der HAS-eGFP auf Proteinebene. Die Intensität des grünen Fluoreszenzsignals ist in der direkten Umgebung des Zellkerns am stärksten, aber auch am Zellrand und in den Zellausläufern ist ein Signal zu erkennen. Nur in den kleinen Filopodien, die in der CD44-Färbung zu sehen sind, ist kein grünes Signal detektierbar. In der Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle sind an ausgewählten Stellen, an denen in der Oberflächenfärbung mit CD44 eindeutig die Membran gefärbt ist, dieselben Strukturen zu sehen. Folglich scheinen die drei Isoformen der transgenen HAS-eGFP in die Zellmembran integriert zu sein (s. Abb. 15-17).

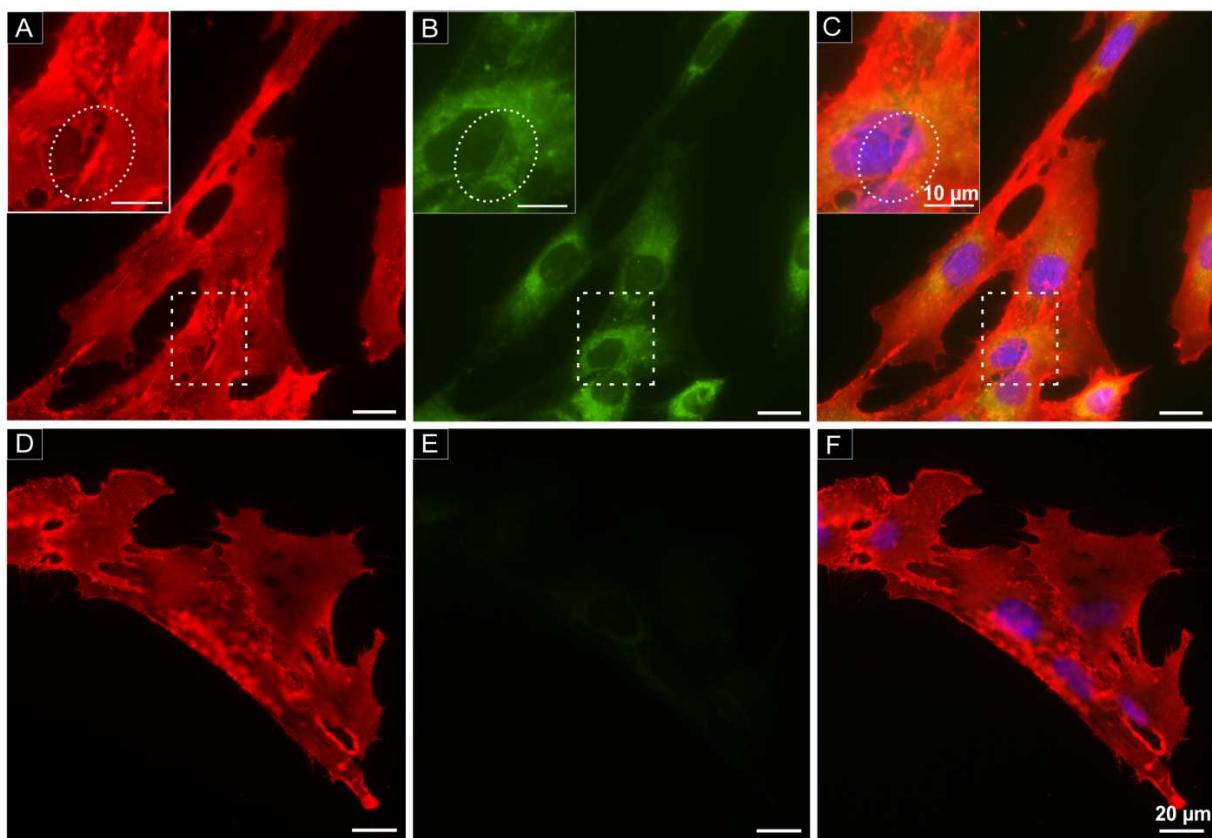


Abb. 15: Untersuchung der Lokalisation der HAS1-eGFP in der Zellmembran mittels Immunfluoreszenz. Dargestellt sind die Zelllinien SCP1-HAS1-eGFP D6 (**A-C**) und SCP1-mock als Negativkontrolle (**D-F**). Das rote Signal repräsentiert die CD44-Färbung der Zellmembran (**A,D**), das grüne Signal die eGFP-getaggte HAS1 (**B,E**). **C** und **F** zeigen das überlagerte Bild beider Fluoreszenzkanäle. Das grüne Signal der SCP1-HAS1-eGFP D6 Zelllinie (**B**) zeigt die gleiche Membranstruktur der Zelle, wie sie durch die Membranfärbung mit CD44 dargestellt ist (**A**). Die Kreise in der Vergrößerung zeigen Stellen an, an denen Membranstrukturen besonders gut erkennbar sind. Die Zelllinie SCP1-mock (**E**) zeigt verglichen mit den transduzierten Zellen (**B**) keine grüne Eigenfluoreszenz.

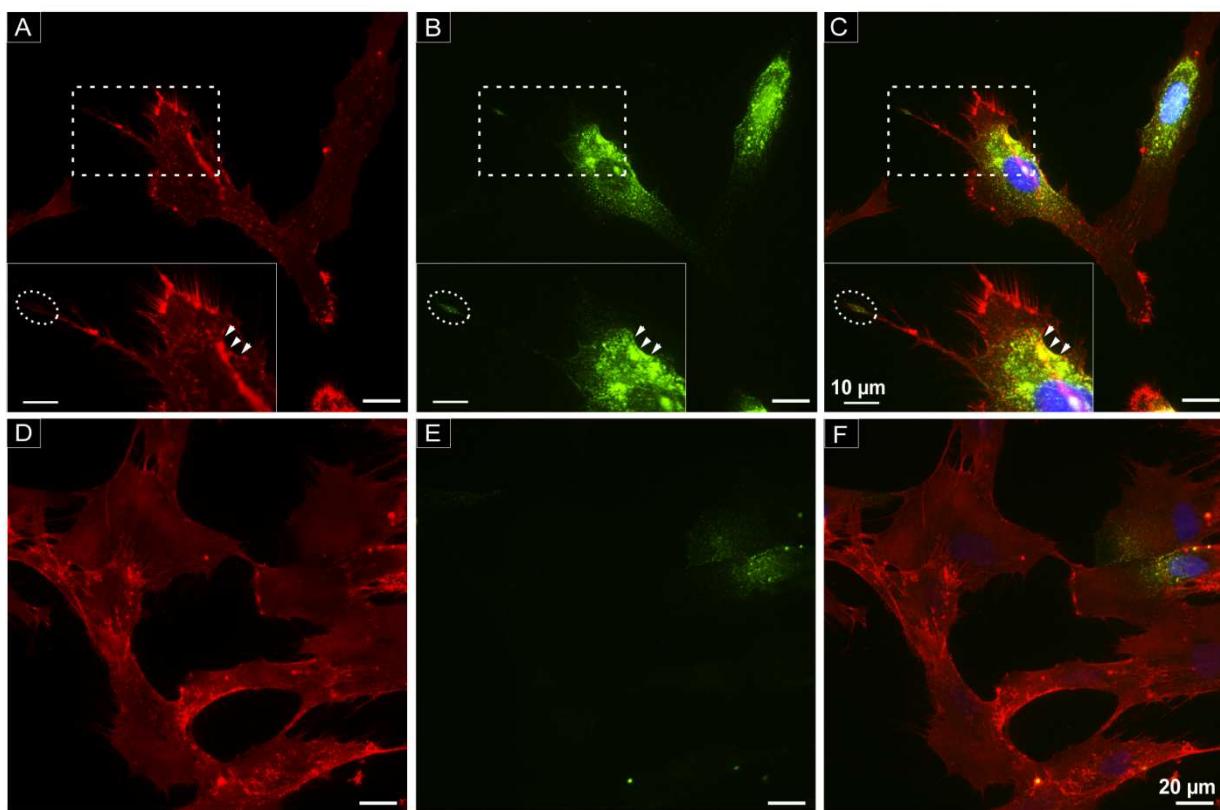


Abb. 16: Untersuchung der Lokalisation der HAS2-eGFP in der Zellmembran mittels Immunfluoreszenz. Dargestellt sind die Zelllinien SCP1-HAS2-eGFP (A-C) und SCP1-mock als Negativkontrolle (D-F). Das rote Signal repräsentiert die CD44-Färbung der Zellmembran (A, D), das grüne Signal die HAS2-eGFP, die mit spezifischen Antikörpern angefärbt wurde (B,E). C und F zeigen das überlagerte Bild beider Fluoreszenzkanäle. Das grüne Signal von HAS2-eGFP (B) ist an einigen Stellen überlagert von der Membranfärbung mit CD44 (A). Die Pfeilspitzen in der Vergrößerung zeigen Stellen an, an denen eine Kolokalisation der beiden Fluoreszenzsignale besonders gut erkennbar ist. Auch bei den SCP1-mock-Zellen (E) ist ein Signal sichtbar, allerdings deutlich weniger als in den transduzierten Zellen (B).

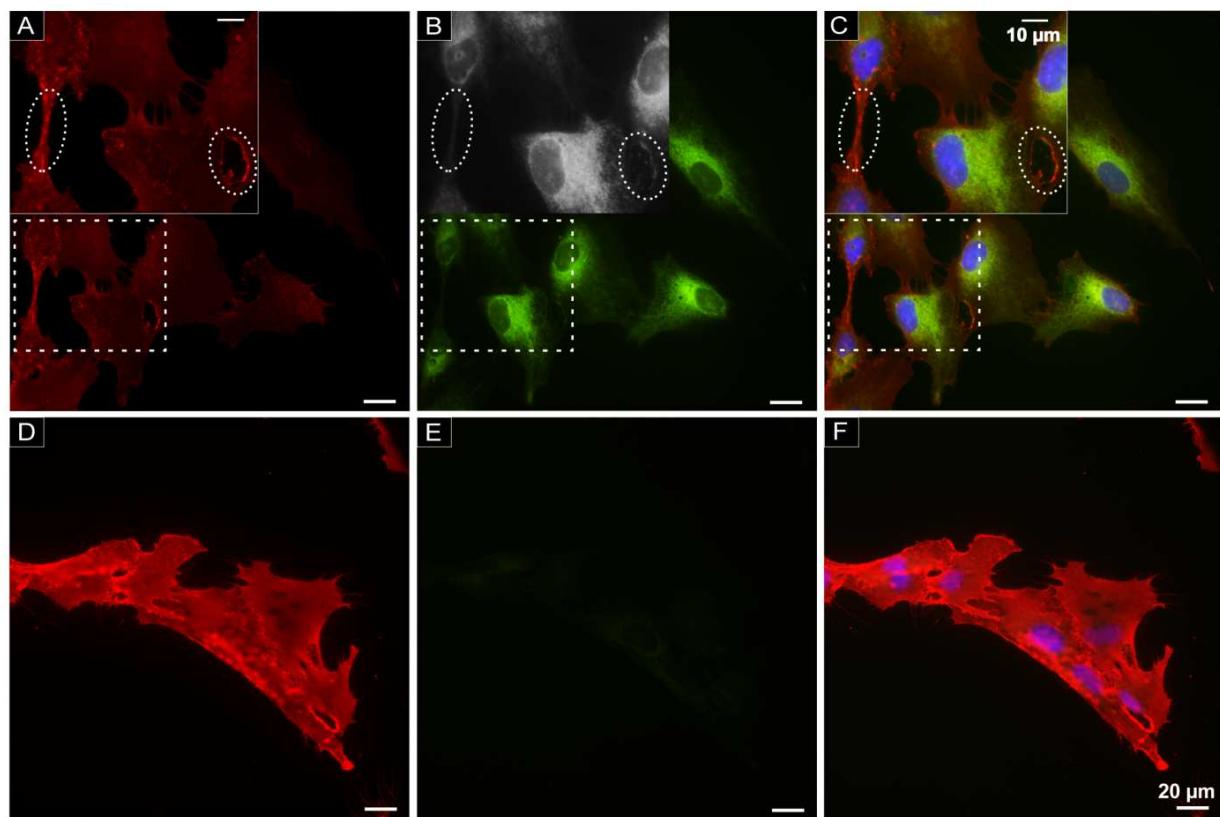


Abb. 17: Untersuchung der Lokalisation der HAS3-eGFP in der Zellmembran mittels Immunfluoreszenz. Dargestellt sind die Zelllinien SCP1-HAS3-eGFP E6 (**A-C**) und SCP1-mock als Negativkontrolle (**D-F**). Das rote Signal repräsentiert die CD44-Färbung der Zellmembran (**A, D**), das grüne Signal die eGFP-getaggte HAS3 (**B,E**). **C** und **F** zeigen das überlagerte Bild beider Fluoreszenzkanäle. Das grüne Signal der SCP1-HAS3-eGFP E6 Zelllinie (**B**) zeigt die gleiche Oberflächenform der Zelle, wie sie durch die Membranfärbung mit CD44 dargestellt ist (**A**). In der Vergrößerung sind Stellen markiert, an denen Membranstrukturen besonders gut erkennbar sind. Die Zelllinie SCP1-mock (**E**) zeigt verglichen mit den transduzierten Zellen (**B**) keine grüne Eigenfluoreszenz.

3.4.2 Kolokalisation der HAS-eGFP mit dem Aktinzytoskelett

Für die Myosin-Chitinsynthasen (Weiss et al. 2006) und Cellulosesynthasen (Gutierrez et al. 2009) ist bekannt, dass sie mit dem Aktinzytoskelett in Verbindung stehen. Da die HAS eng mit der Chitinsynthase und der Cellulosesynthase verwandt ist (Watanabe und Yamaguchi 1996), ist es vorstellbar, dass diese Interaktion auch bei der HAS vorkommt. In der Aktinfärbung mit Phalloidin sind kurze Aktinfilamente und Stressfasern zu sehen. Bei allen Isoformen der HAS sind an einigen Stellen diese filamentären Strukturen auch im grünen Fluoreszenzsignal zu sehen. Die Überlagerung der Fluoreszenzsignale (vgl. Pfeilspitzen) lässt auf eine Kolokalisation der Strukturen schließen und damit eine Interaktion von Aktin und HAS-eGFP vermuten (s. Abb. 18-20).

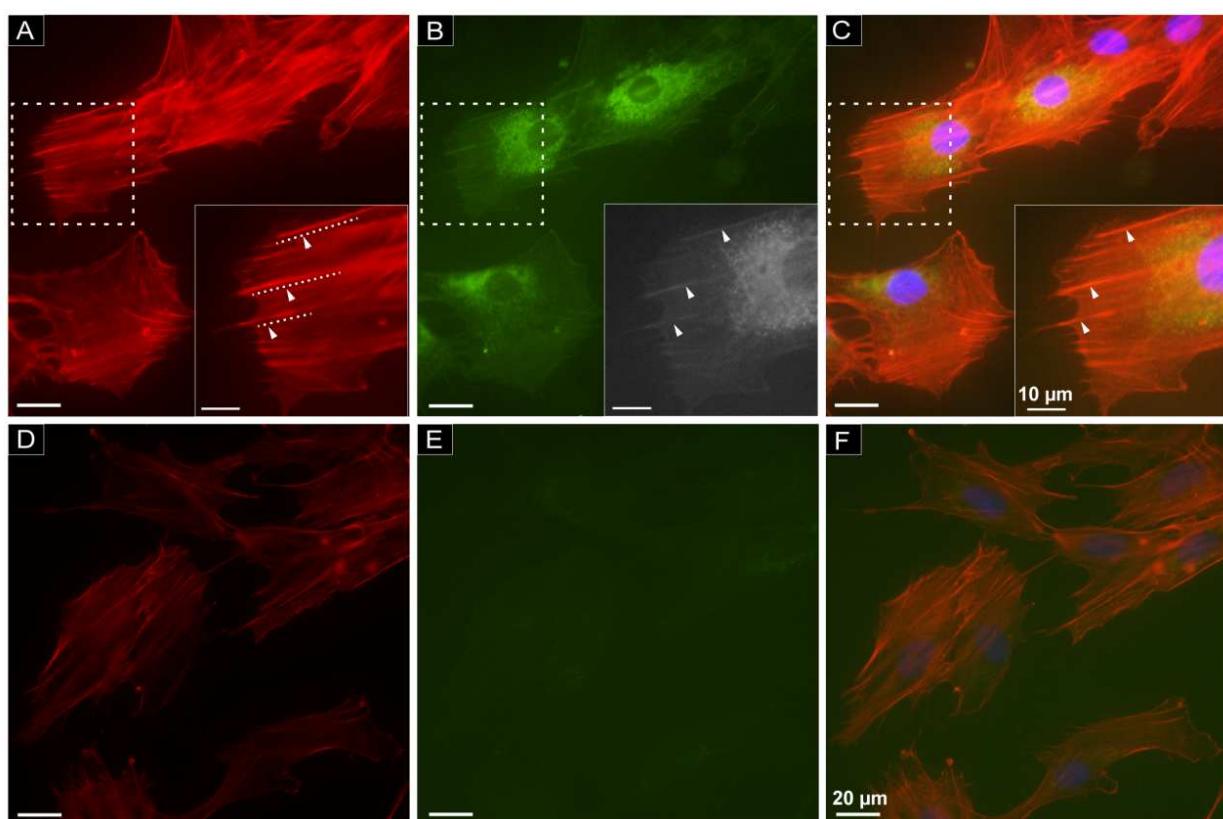


Abb. 18: Untersuchung der Kolokalisation der HAS1-eGFP und des Aktinzytoskeletts mittels Fluoreszenzmikroskopie. Dargestellt sind die Zelllinien SCP1-HAS1-eGFP D6 (**A-C**) und SCP1-mock als Negativkontrolle (**D-F**). Im Rotlichtkanal sind die mit Alexa Fluor 546 konjugiertem Phalloidin gefärbten Aktinfilamente gezeigt (**A, D**). Das grüne Signal repräsentiert die eGFP-getaggte HAS1 (**B, E**). **C** und **F** zeigen das überlagerte Bild beider Fluoreszenzkanäle. In den Zellen SCP1-HAS1-eGFP D6 zeigen sich im grünen Fluoreszenzfilter (**B**) ebenso die Strukturen, die im roten Filter Aktinfilamente darstellen (**A**) (s. gestrichelte Linien und Pfeilspitzen in der Vergrößerung). An diesen Stellen liegt vermutlich eine Kolokalisation von Aktin und der HAS1 vor. Die Zelllinie SCP1-mock (**E**) zeigt verglichen mit den transduzierten Zellen (**B**) keine grüne Eigenfluoreszenz.

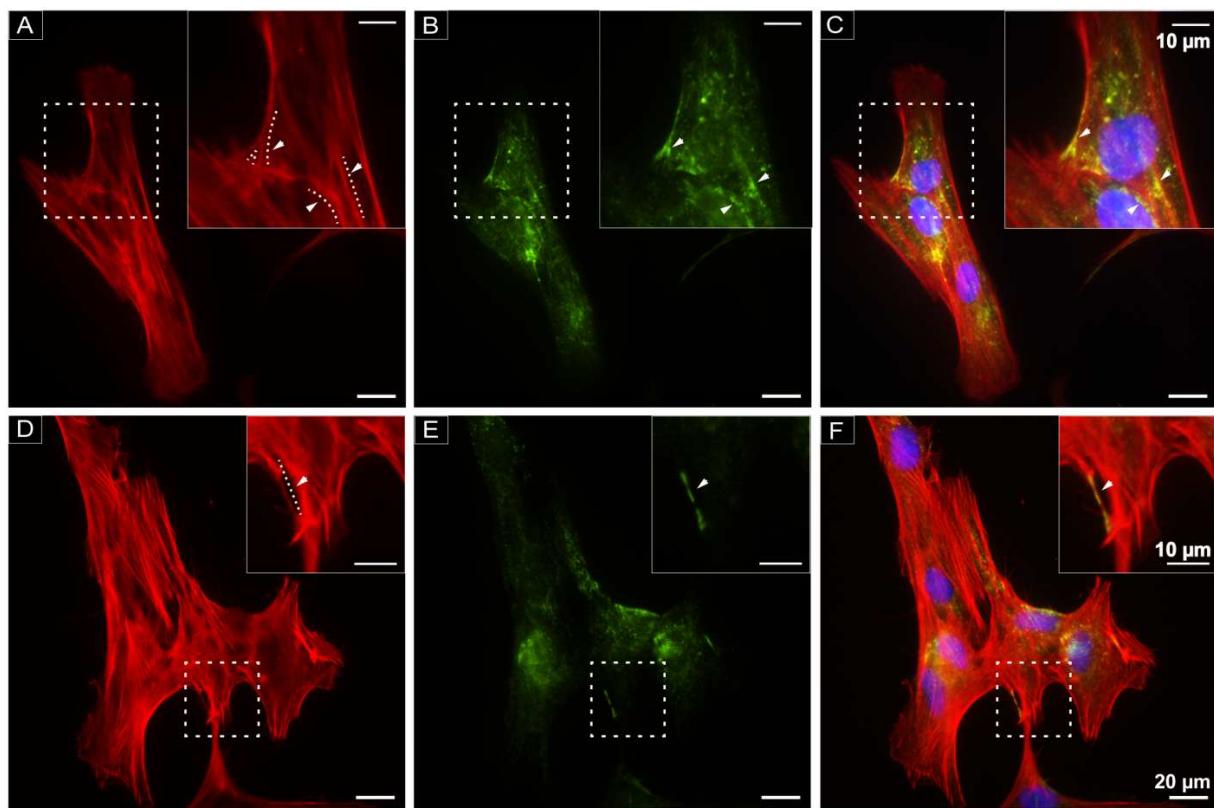


Abb. 19: Untersuchung der Kolokalisation der HAS2-eGFP und des Aktinzytoskeletts mittels Fluoreszenzmikroskopie. Dargestellt sind die Zelllinien SCP1-HAS2-eGFP (**A-C**) und SCP1-mock als Negativkontrolle (**D-F**). Im Rotlichtkanal sind die Aktinfilamente, gefärbt durch Alexa Fluor 546 Phalloidin, sichtbar (**A, D**). Das grüne Signal repräsentiert die HAS2, die bei unzureichender Eigenfluoreszenz des eGFP-Tags mit spezifischen Antikörpern angefärbt wurde (**B, E**). **C** und **F** zeigen das überlagerte Bild beider Fluoreszenzkanäle. In den Zellen SCP1-HAS2-eGFP zeigen sich im grünen Fluoreszenzfilter (**B**) ebenso die Strukturen, die im roten Filter Aktinfilamente darstellen (**A**) (s. gestrichelte Linien und Pfeilspitzen in der Vergrößerung). An diesen Stellen liegt anscheinend eine Kolokalisation von Aktin und der HAS2-eGFP vor. Da ein Antikörper gegen HAS2 eingesetzt wurde, zeigt sich in der Zelllinie SCP1-mock (**E**) ebenfalls ein grünes Signal. Auch hier zeigen sich Überlagerungen von HAS2 und Aktinfilamenten.

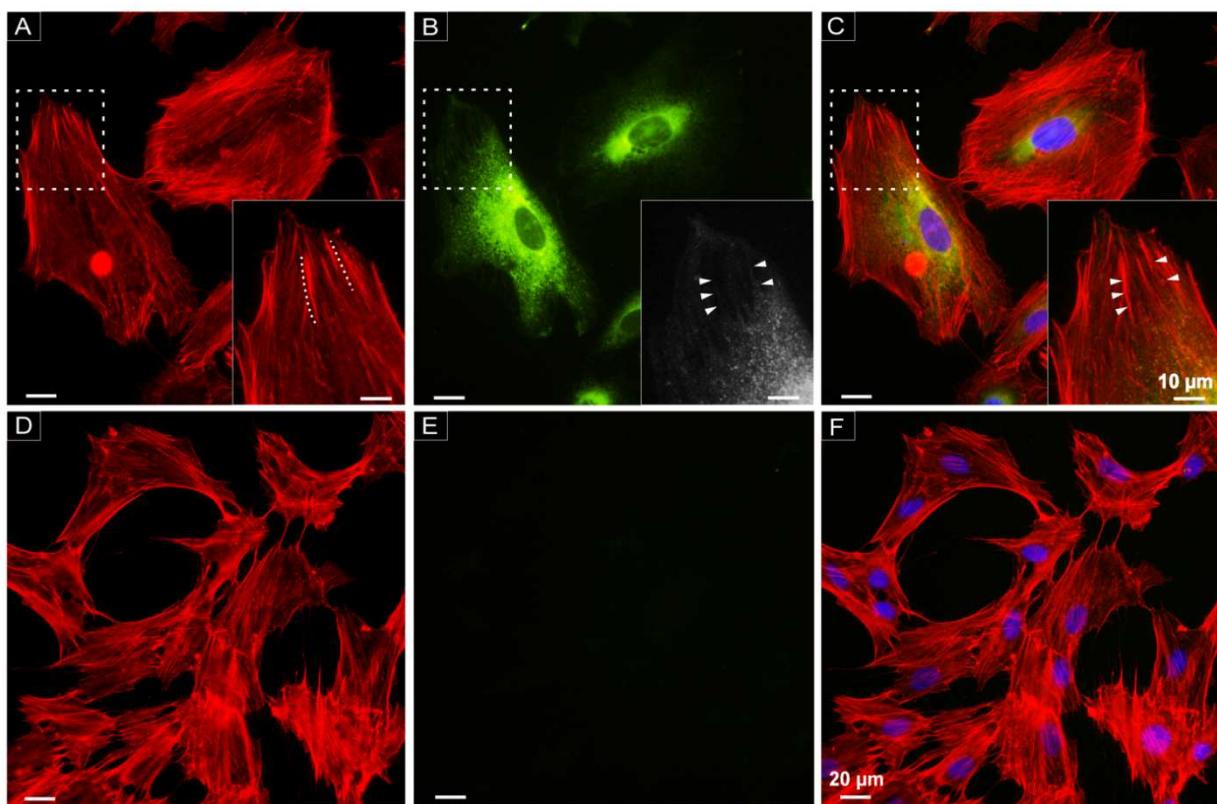


Abb. 20: Untersuchung der Kolokalisation der HAS3-eGFP und des Aktinzytoskeletts mittels Fluoreszenzmikroskopie. Dargestellt sind die Zelllinien SCP1-HAS3-eGFP E6 (**A-C**) und SCP1-mock als Negativkontrolle (**D-F**). Im Rotlichtkanal zeigen sich die Aktinfilamente, gefärbt durch Alexa Fluor 546 Phalloidin (**A, D**). Das grüne Signal repräsentiert die eGFP-getaggte HAS3 (**B, E**). **C** und **F** zeigen das überlagerte Bild beider Fluoreszenzkanäle. In den Zellen SCP1-HAS3-eGFP E6 zeigen sich im grünen Fluoreszenzfilter (**B**) ebenso die Strukturen, die im roten Licht Aktinfilamente darstellen (**A**) (s. gestrichelte Linien und Pfeilspitzen in der Vergrößerung). An diesen Stellen liegt vermutlich eine Kolokalisation von Aktin und der HAS3 vor. Die Zelllinie SCP1-mock (**E**) zeigt keine grüne Eigenfluoreszenz.

3.5 Untersuchung der mit Lifeact-mRFPPruby transduzierten SCP1

Mit Lifeact transduzierte Zellen bieten die Möglichkeit, das Aktinzytoskelett und seine Dynamik in lebenden Zellen zu untersuchen (Riedl et al. 2008). Lifeact ist ein 17 Aminosäuren umfassendes Peptid, welches filamentöses Aktin (F-Aktin) in eukaryotischen Zellen spezifisch bindet. Über die Fusion von Lifeact mit dem mRFPPruby, einem rot fluoreszierenden Protein, kann das F-Aktin in lebenden oder fixierten Zellen direkt im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Ein großer Vorteil von Lifeact ist, dass es die F-Aktin-Dynamik oder sonstige zelluläre Prozesse nicht beeinflusst (Jang et al. 2012, Riedl et al. 2008). Soweit uns aus der Literatur bekannt ist, generierten wir in dieser Arbeit zum ersten Mal Lifeact-mRFPPruby überexprimierende hMSCs mit Hilfe des lentiviralen Gentransfersystems. Es wurden lebende hMSC-Zellen, die Lifeact-mRFPPruby stabil exprimieren, direkt im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Dafür wurden ca. 100 Zellen in 30 µl Medium suspendiert, in speziellen Kammern (Ibidi µ-Slide VI^{0.4}) auf den Steg aufgetragen und 1-2 h bis zur Adhärenz weiter im Zellinkubator inkubiert. Außerdem wurden fixierte Zellen untersucht. Diese wurden auf einem Objektträger ausgesät, über Nacht inkubiert und dann mit 4% Formaldehyd fixiert. Die Aufnahmen erfolgten mit dem Mikroskop Axio Observer.Z1 und dem Objektiv Plan-Neofluoar 40x/1.30 Oil. Es wurde der rote Cy3-Filter bei einer Belichtungszeit von 50-80 ms eingesetzt. Die Bilder zeigen die Anordnung der Aktinfilamente in der gesamten Zelle. Dabei sind die Stressfasern im Zellkörper und die Aktinfilamente im Zellcortex gefärbt. Die kürzeren Aktinfilamente, die in den lebenden Zellen zu sehen sind, wurden in den fixierten Zellen nicht beobachtet (s. Abb. 21). Nachfolgend wurden hMSCs dann mit Lifeact-mRFPPruby und jeweils einer Isoform der HAS-eGFP doppeltransduziert.

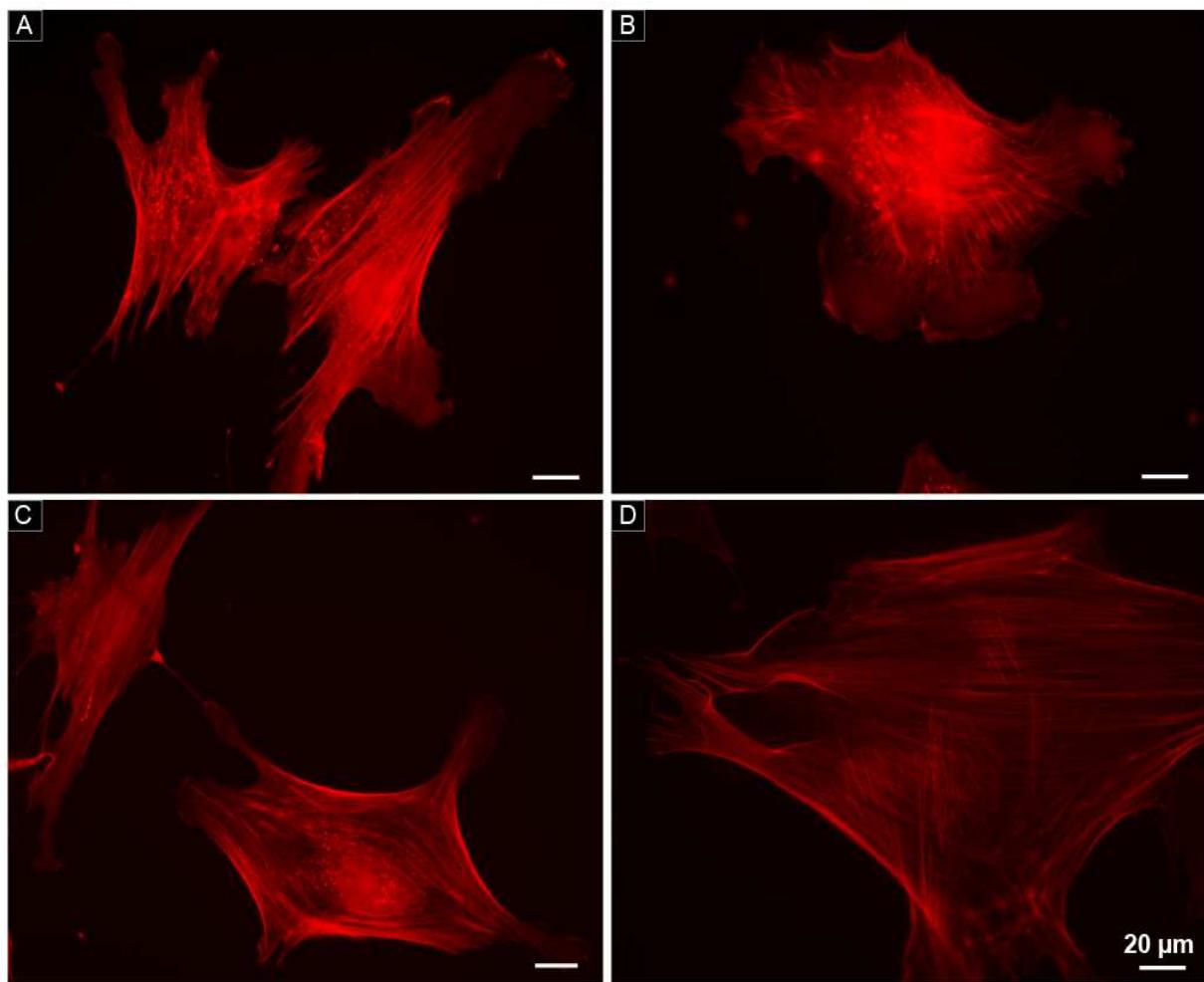


Abb. 21: Fluoreszenzmikroskopie der hMSC-Lifeact-mRFPuby-Zellen. Das rote Signal repräsentiert das Aktinzytoskelett, es sind Stressfasern im Zellkörper und Aktinfilamente im Zellcortex gefärbt. Dargestellt sind lebende Zellen (A-C), aufgenommen in speziellen Kammern (Ibidi μ -Slide), und fixierte Zellen (D).

3.6 Untersuchung der doppeltransduzierten hMSCs

Um die Interaktion zwischen den HAS-eGFP und dem Aktinzytoskelett in lebenden Zellen über ein Zeitintervall hinweg untersuchen zu können, wurden doppeltransduzierte hMSCs hergestellt. Diese hMSCs wurden zeitgleich mit pLenti6.3-Lifeact-mRFPuby und jeweils mit pLenti4.3-HAS1-eGFP, pLenti4.3-HAS2-eGFP oder pLenti4.3-HAS3-eGFP transduziert. Es wurden die Vektoren pLenti6.3-V5(DEST) (Bla) und pLenti4.3-V5(DEST) (Zeo) eingesetzt, damit die Selektion von positiven Transformanden mit Blasticidin und Zeocin durchgeführt werden konnte. In den so hergestellten Zellen konnten sowohl das durch Lifeact-mRFPuby eigenfluoreszierende Aktinzytoskelett als auch die in die Zellmembran integrierten eigenfluoreszierenden HAS-eGFP direkt mittels Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden. Es erfolgten Timelapse-Aufnahmen, in denen über einen Zeitraum von 2-5 min hinweg alle 5 sec ein Bild aufgenommen wurde. Die Aufnahmen erfolgten mit dem Mikroskop Axio Observer.Z1, AxioCam MRm und dem Objektiv Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil. Eingesetzt wurden der rote Cy3- und der grüne GFP-Filter bei einer Belichtungszeit von 30-60 msec bzw. von 270 msec. In Abb. 22 und Abb. 23 werden Zellen gezeigt, die Lifeact-mRFPuby und HAS1-eGFP bzw. HAS3-eGFP überexprimieren. Die grün fluoreszierenden HAS-eGFP stellen sich als globuläre Strukturen dar. Die Timelapse-Aufnahme der HAS3-eGFP überexprimierenden Zelle zeigt, dass die globulären Strukturen entlang der Aktinfilamente angeordnet sind und dass sie sich bewegen, ohne die Ausrichtung an den Aktinfilamenten zu verlieren (s. Abb. 22). Bei den hMSC-Lifeact-mRFPuby-HAS1-eGFP zeigen sich die HAS1-eGFP ebenfalls als globuläre Strukturen (s. Abb. 23), welche an bestimmten Stellen eine Ausrichtung an den Aktinfilamenten aufweisen. In der Timelapse-Aufnahme (hier nicht gezeigt) ist ebenfalls eine Bewegung der globulären Strukturen zu erkennen.

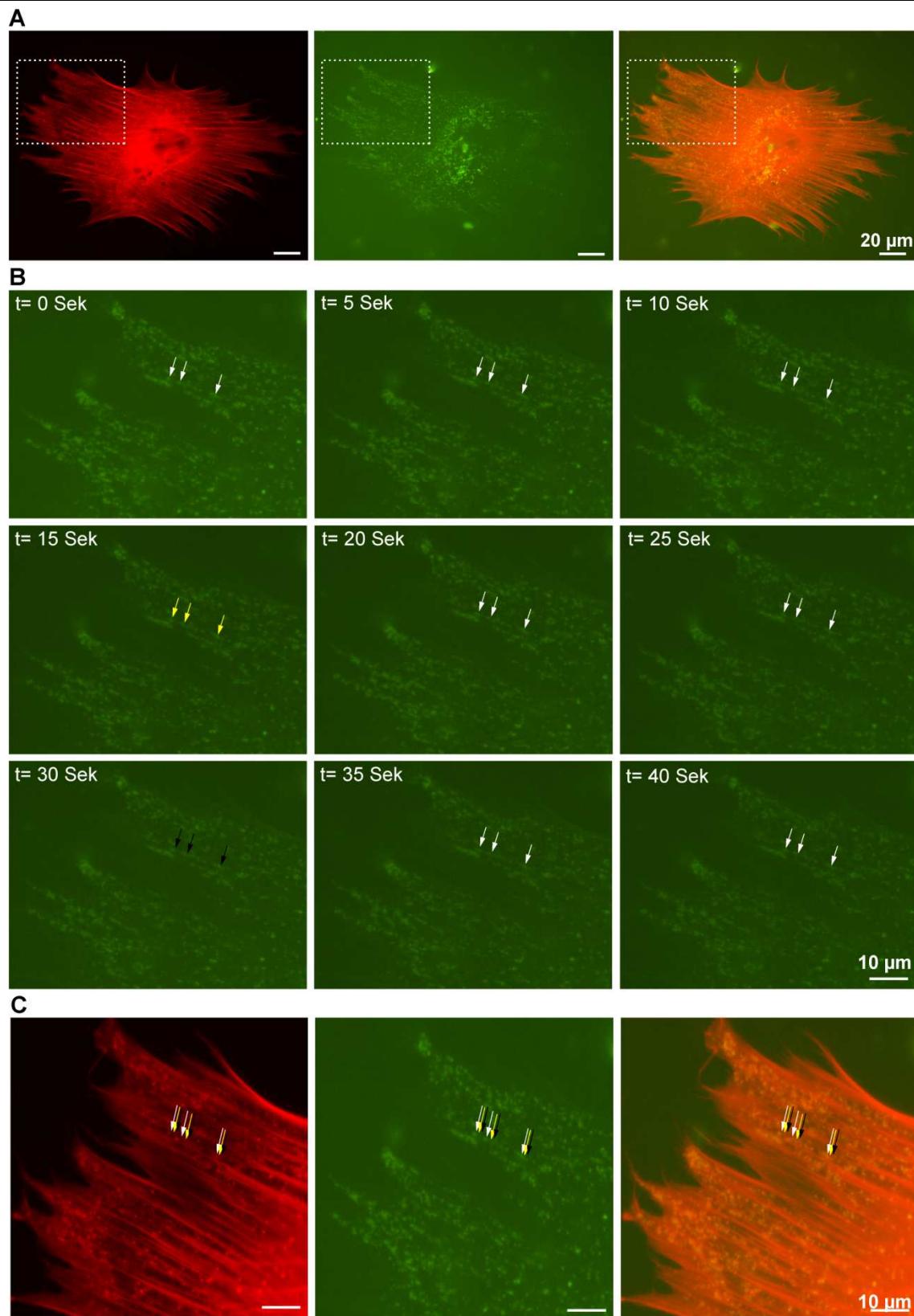


Abb. 22: Fluoreszenzmikroskopische Timelapse-Aufnahme der Lifeact-mRFPuby- (rot) und HAS3-eGFP- (grün) überexprimierenden hMSC-Zellen. **A** zeigt eine ganze Zelle im Cy3- und GFP-Filter sowie das Mischbild zu Beginn der Timelapse-Aufnahme. Die HAS3-eGFP stellen sich als globuläre Strukturen dar, welche entlang der Aktinfasern angeordnet sind. In **B** wird ein Ausschnitt dieser Zelle über 40 sec gezeigt. Die Timelapse-Aufnahme zeigt, dass sich die globulären Strukturen entlang der Aktinfilamente bewegen. Die Pfeile markieren in jedem Bild dieselbe Struktur. In **C** ist exemplarisch für drei Punkte die Bewegungsrichtung angezeigt. Werden die in B angezeigten Pfeile zu den Zeitpunkten $t=0,15$ und 30 sec überlagert, zeigt sich eine Bewegung nach rechts entlang des Aktinfilaments.

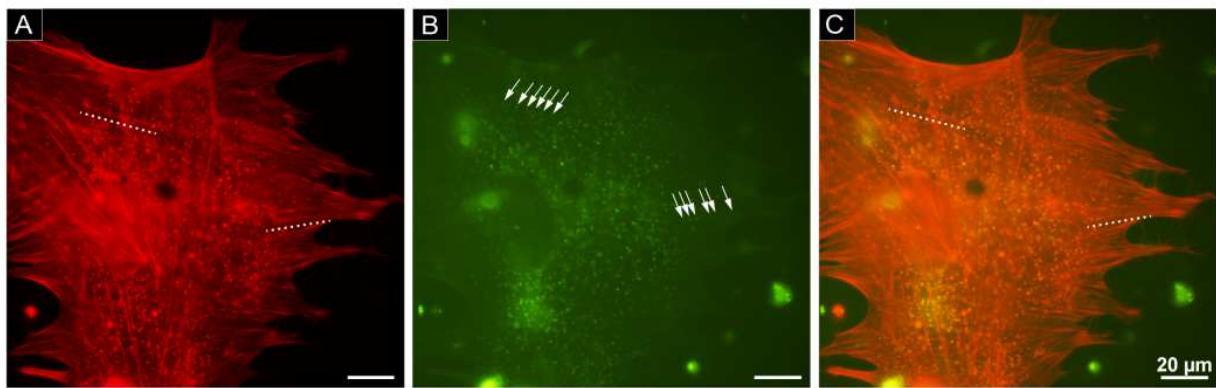


Abb. 23: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer hMSC-Lifeact-mRFPuby-HAS1-eGFP-Zelle. **A** zeigt die Aktinstrukturen, dargestellt durch Lifeact-mRFPuby im Cy3-Filter. **B** zeigt HAS1-eGFP im GFP-Filter. **C** zeigt das Mischbild beider Filter. Die HAS1-eGFP stellen sich als globuläre Strukturen dar. An bestimmten Stellen ist eine Ausrichtung entlang der Aktinfilamente zu erkennen (vgl. Pfeile und Linien).

4. Diskussion

4.1 Herstellung der Zelllinien

Das Ziel dieser Arbeit war es, Zellen herzustellen, die als Modellsystem für Untersuchungen bezüglich der Regulation der HAS-Aktivität in hMSCs und ihrer Auswirkung auf das Zellverhalten dienen können. Als möglicher Regulationsmechanismus wurde die Interaktion der HAS mit dem Aktinzytoskelett untersucht. Hierfür wurden hMSC-Zellen generiert, die jeweils eine der drei bekannten Isoformen der Hyaluronansynthase HAS1, HAS2 oder HAS3 (Weigel et al. 1997) überexprimieren. Es sollte jede Isoform kloniert werden, da diese individuelle Unterschiede aufweisen. Die drei Isoformen gelten als gleichartig in ihrer molekularen Struktur. Die sequenzielle Übereinstimmung der zentralen zytoplasmatischen Domäne, die das aktive Zentrum bildet, beträgt 75-87%. Dennoch zeigen sie deutliche Unterschiede in ihrer enzymatischen Aktivität und Stabilität, ihrer Elongationsrate und der Kettenlänge des synthetisierten Hyaluronans. Die HAS3 synthetisiert mit einer molekularen Masse von etwa 1×10^5 - 1×10^6 Da das kürzeste HA. HAS1 und HAS2 können HA mit bis zu 2×10^6 Da synthetisieren (Itano et al. 1999). Wahrscheinlich beruhen die Unterschiede in der Synthese auf individuellen Regulierungsmechanismen. Denkbar ist die Beeinflussung der HAS durch das intrazelluläre Milieu, akzessorische Proteine der HAS (Itano et al. 1999) oder Interaktionen mit zytoplasmatischen Proteinen (Brinck und Heldin 1999).

Um die transgenen Proteine direkt im Fluoreszenzmikroskop untersuchen zu können, wurden die HAS mit eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) fusioniert. GFP hat gegenüber anderen Protein-Tags den Vorteil, dass es über Monate stabil bleibt und direkt mittels Fluoreszenzmikroskopie in lebenden und fixierten Zellen sichtbar gemacht werden kann (Lippincott-Schwartz und Patterson 2003). Durch eine Codon-Optimierung für höhere Expression und Mutationen im Chromophor bietet eGFP eine 35-fach hellere Fluoreszenz als das Wildtyp-GFP (Zhang et al. 1996). Der eGFP-Tag wurde C-terminal fusioniert, da angenommen wurde, dass er in dieser Lokalisation die Proteinstruktur und -funktionalität weniger beeinträchtigt. In einer Studie wurde bereits beschrieben, dass ein C-terminaler GFP-Tag dem N-terminalen überlegen ist (Palmer und Freeman 2004). Proteine mit C-terminalem GFP-Tag wurden eher in ihrer ursprünglichen Lokalisation vorgefunden, als solche mit N-terminalem GFP-

Tag. Daraus wurde geschlossen, dass auch die funktionellen Charakteristika des nativen Proteins eher erhalten bleiben. Außerdem wurde mit C-terminal getaggenen Genen eine höhere Transduktionseffizienz erreicht als bei N-terminalem GFP. Die HAS ist ein Transmembranprotein mit einer großen zentralen Domäne und sieben transmembranen Domänen. Die zentrale Domäne, sowie C- und N-Terminus liegen intrazellulär vor (Weigel et al. 1997, Watanabe und Yamaguchi 1996). Somit liegt das C-terminal fusionierte eGFP ebenfalls intrazellulär vor.

Für den Gentransfer wurde das lentivirale Transduktionssystem benutzt, da dieses gegenüber anderen, z.B. jenem mit onkoretroviralen Vektoren, mehrere Vorteile bietet. Es zeichnet sich durch eine bessere Transduktionseffizienz, eine langanhaltende Genexpression und ein höheres Maß an Transgenexpression aus, ohne dabei Funktionen der hMSCs, z.B. ihre Differenzierungsfähigkeit, zu beeinträchtigen (Van Damme et al. 2006). Die Transduktion nur mit dem HAS-eGFP-Gen erfolgte mit SCP1-Zellen (hTERT-immortalisierte hMSCs). Durch die Transduktion des hTERT-Gens (human telomerase reverse transcriptase) erlangen die hMSCs eine längere Lebenszeit, ohne dabei in Seneszenz zu gehen, ihren Stammzellcharakter zu verlieren oder maligne zu transformieren (Böcker et al. 2008b). Da vermutet wurde, dass zwei weitere Transduktionen die bereits transduzierten SCP1-Zellen zu stark belasten und somit in ihrer Funktion einschränken könnten, wurden hMSC-Zellen für die Doppeltransduktion mit den Genen HAS-eGFP und Lifeact-mRFPuby eingesetzt.

4.2 Expressionsstudien

Es konnten die stabilen Zelllinien SCP1-HAS1-eGFP D6, SCP1-HAS2-eGFP und SCP1-HAS3-eGFP E6 hergestellt werden. Mittels FACS-Analyse, RT-PCR, Western Blot und Fluoreszenzmikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass alle Zelllinien ihr jeweiliges HAS-eGFP-Gen auf RNA-Ebene sowie auf Proteinebene überexprimieren. Da bei der Transduktion der SCP1-Zellen mit den Genen HAS1-, HAS2- und HAS3-eGFP keine ausreichend hohe Transduktionseffizienz erreicht wurde, sollten Klone ausgesucht werden, die das Gen besonders gut exprimieren. Hierfür wurden die SCP1-HAS1-eGFP und SCP1-HAS3-eGFP erst vereinzelt (s. 2.2.4.4) und dann anhand des eGFP-Tags mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse beurteilt. Für die Zellklone SCP1-HAS1-eGFP D6 und SCP1-HAS3-eGFP E6 konnten hohe Expressionsraten festgestellt werden (s. 3.2). Folglich

wurden diese gepickten Zelllinien für weitere Untersuchungen verwendet. Nur die Zelllinie SCP1-HAS2-eGFP zeigte weder in der Fluoreszenzmikroskopie noch in der FACS-Analyse ein Signal und konnte somit nicht fluoreszenzmikroskopisch vereinzelt werden. Es sind ungefähr 10^5 Kopien von GFP pro Zelle notwendig, um das Zweifache der Hintergrundfluoreszenz zu erreichen (Tsien 1998). Die Expressionsrate von HAS2-eGFP ist trotz des konstitutiv exprimierenden CMV-Promotors eventuell niedriger, so dass das Protein nicht direkt über die Fluoreszenz detektierbar ist. Eine andere Erklärung besteht darin, dass das eGFP nicht korrekt gefaltet ist und somit nicht fluoresziert. Der N-Terminus der drei HAS-Isoformen ist sowohl in seiner Länge als auch in seiner Aminosäuresequenz verschieden. So ist eine unterschiedliche Faltung des N-Terminus denkbar, die dadurch die Faltung des angeschlossenen eGFP-Proteins beeinflusst. Möglicherweise hätte zwischen dem HAS2-Gen und dem eGFP-Tag zusätzlich eine Linker-Sequenz kloniert werden müssen. Bei HAS1-eGFP und HAS3-eGFP scheint eine solche Linker-Sequenz nicht notwendig zu sein. Die weiteren Untersuchungen erfolgten daher bei den HAS2-eGFP-überexprimierenden Zellen an der ungepickten Zelllinie.

In der Analyse mit den sensitiveren Methoden RT-PCR und Western Blot konnten Banden für HAS2 und eGFP nachgewiesen werden (s. 3.2.2 und 3.2.3). Dies beweist, dass das transgene Fusionsprotein exprimiert wurde, obwohl kein fluoreszierendes eGFP-Signal detektierbar war. Die Zelllinie SCP1-HAS3-eGFP E6 zeigte in der RT-PCR, bei der Verwendung sowohl des in der HAS3-Sequenz als auch des in der eGFP-Sequenz spezifisch bindenden Primerpaars, starke Banden. Ebenfalls in der Fluoreszenzmikroskopie und der FACS-Analyse wies diese Zellreihe starke Signale für eGFP auf. Der Klon E6 zeigte eine etwas stärkere Fluoreszenzintensität als der Klon B7 und wurde deshalb diesem vorgezogen und für die weiteren Studien verwendet. Von der Zelllinie SCP1-HAS1-eGFP wurden ebenfalls drei Klone analysiert. In der RT-PCR wurden bei allen starke Banden für HAS1 und eGFP detektiert. Ausgewählt wurde der Klon D6, da bei ihm der höchste Prozentsatz an Zellen in der FACS-Analyse positiv war.

Für den Nachweis von HAS-eGFP auf Proteinebene mittels Western Blot mussten verschiedene Antikörper gegen die HAS-Isoformen sowie gegen GFP getestet werden. Mit dem Antikörper Anti-HAS1 für HAS1-eGFP und dem Antikörper Anti-GFP Epitope Tag für HAS2-eGFP konnte die Expression von HAS2-eGFP nachgewiesen werden. Bei den SCP1-HAS3-eGFP konnte sowohl mit einem

Antikörper gegen HAS3 als auch gegen GFP die Überexpression von HAS3-eGFP eindeutig gezeigt werden. Die mitgeführte Negativkontrolle in Form von SCP1-mock-Zellen zeigte in der RT-PCR und im Western Blot erwartungsgemäß keine Expression von eGFP. Allerdings ist in der RT-PCR eine Expression von endogenem HAS2 nachzuweisen, die sich aber schwächer darstellt als bei den überexprimierenden SCP1-HAS2-eGFP Zellen. Eine Expression von endogener HAS1 oder HAS3 wurde in den SCP1-mock nicht festgestellt.

In der Literatur wird beschrieben, dass die Expression je nach HAS-Isoform, je nach Zellart und abhängig von äußeren Faktoren wie z.B. Wachstumsfaktoren (Usui et al. 2000) unterschiedlich ausfallen kann. Die Analysen der hMSCs aus der vorliegenden Arbeit ergaben, dass diese endogen nur HAS2 exprimieren. Dagegen ergab eine andere Untersuchung zu den Expressionsmustern der drei HAS-Isoformen in hMSCs aus neun verschiedenen Spendern, dass alle drei Isoformen exprimiert wurden. Dort zeigte HAS2 die höchste Expressionsrate, gefolgt von HAS1 und HAS3. Bei HAS1 zeigten sich die größten Schwankungen unter den Spendern (Qu et al. 2014). Diese Ergebnisse lassen sich aber nicht direkt auf unsere Studie übertragen. Zum einen weisen die von uns verwendeten hMSCs möglicherweise durch das hTERT-Gen andere Expressionsmuster auf. Zum anderen wurde in der Studie von Qu et al., anders als bei uns, dem Zellmedium FGF-2 (fibroblast growth factor 2) zugegeben, welcher sowohl die Expression von HAS1, HAS2 und HAS3 als auch die HA-Produktion stimuliert (Shimabukuro et al. 2005). Zusätzlich können Alter und Geschlecht der Patienten, aus denen die Zellen isoliert wurden, das Expressionsmuster beeinflussen. Informationen hierzu sind bei der Studie von Qu et al. nicht angegeben. Ob die Seneszenz der Zellen bei der Expression der HAS-Isoformen eine Rolle spielt, wurde in einer anderen Studie untersucht. Jung et al. (2011) beobachteten, dass die Expression der drei HAS-Isoformen in hMSCs mit zunehmender Passage und Seneszenz abnimmt. Bei den hier verwendeten SCP1 wird der Eintritt in die Seneszenz durch die Expression von hTERT (human telomerase reverse transcriptase) verhindert (Böcker et al. 2008b). Dies könnte der Grund sein, weshalb in dieser Arbeit in den SCP1-mock die HAS2-Expression trotz längerer Kultivierungszeit aufrechterhalten bleibt. Eine starke Expression von HAS1 wurde aber in aus dem Knochenmark isolierten hMSCs von Patienten mit Multiplem Myelom nachgewiesen, während gesunde hMSCs hauptsächlich HAS2 exprimieren (Calabro et al. 2002). Das Ergebnis unserer mock-Zelllinie ist, dass diese nur HAS2

exprimieren. Dies passt zu den oben aufgeführten Ergebnissen, wonach die Expression von HAS2 am stärksten ist.

4.3 Die Enzymaktivität der HAS-eGFP

Die Funktionalität der transduzierten HAS wurde mittels ihrer Enzymaktivität überprüft. Diese wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden, einem HA-ELISA und einer HA-Färbung mit bHABC, nachgewiesen. Mit dem Hyaluronan-spezifischen ELISA wurde die Konzentration des sezernierten Hyaluronans im Medium gemessen. In anderen Studien wurde gezeigt, dass durch Zugabe von N-Acetylglycosaminen die Syntheseleistung von HAS1, HAS2 und HAS3 in humanen Fibroblasten gesteigert wird (Tu et al. 2009, Breborowicz et al. 1998). Somit wurden hier ebenfalls Substrate zugegeben, um die HAS in ihrer Syntheseleistung zu stimulieren. In einer Vorstudie stellten wir fest, dass die Zugabe von HA-Oligosacchariden als Primer für die HA-Synthese nicht notwendig ist. Dies wird auch in der Literatur bestätigt (Weigel und DeAngelis 2007). Um eine vergleichende Aussage zwischen den Zelllinien treffen zu können, wurden die Zellen gezählt und die Syntheseleistung als Konzentration an Hyaluronan pro 10.000 Zellen berechnet. Wie zu erwarten zeigten die HAS-überexprimierenden Zellen eine statistisch signifikant höhere Syntheseleistung als die SCP1-mock-Zellen (s. Abb. 13). In unseren Untersuchungen produzierten die SCP1-HAS3-eGFP E6-Zellen am meisten Hyaluronan, nämlich das 2,8-fache der Negativkontrolle SCP1-mock. Die SCP1-HAS1-eGFP D6 zeigten, verglichen mit den SCP1-HAS2-eGFP-Zellen, eine ähnliche Syntheseleistung. Zwar fiel diese niedriger aus als bei den SCP1-HAS3-eGFP-Zellen, sie war aber signifikant höher als bei der Negativkontrolle. Berücksichtigt man den Umstand, dass die Negativkontrolle endogene HAS2 exprimierte und die Zelllinie SCP1-HAS2-eGFP nicht vereinzelt wurde, spricht das für eine deutlich höhere HAS-Aktivität in den mit HAS2 transduzierten Zellen. Unser Ergebnis deckt sich zum Teil mit Angaben in der Literatur, welche besagen, dass sich die drei Isoformen der HAS in ihrer HA-Syntheserate unterscheiden. Zellen, die HAS3 überexprimieren, erzielten die höchste Hyaluronansyntheseleistung. HAS2-überexprimierende Zellen lagen in ihrer Syntheseleistung darunter und HAS1-überexprimierende Zellen erzielten jeweils die niedrigste Rate an HA (Liu et al. 2001, Brinck und Heldin 1999, Itano et al. 1999). Im Gegensatz zu unserem Ergebnis beschreiben Brinck und Heldin allerdings andere

Dimensionen. Bei ihren Untersuchungen stellt sich die Syntheseleistung von HAS1 4-fach geringer als die der HAS2 und 10-fach geringer als die der HAS3 dar. In jener Studie wurden jedoch Säugetier-HAS in CHO-Zellen („Chinese Hamster Ovary“, immortalisierte Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters) untersucht. Da es immer zellabhängige Beobachtungen geben kann, lassen sich die Ergebnisse somit nicht direkt vergleichen. Qu et al. (2014) untersuchten die HA-Sekretion von hMSCs unter Stimulation mit FGF-2 aus neun verschiedenen Spendern. Dabei zeigten sich zwischen den Spendern große Unterschiede, nämlich um das bis zu 20-fache. Mit Ausnahme der zwei Zelllinien mit besonders hoher HA-Sekretion liegen die dort gemessenen Werte in derselben Größenordnung wie bei unseren hMSCs in der vorliegenden Studie. Unsere Messungen für die HAS-überexprimierenden Zellen liegen im Bereich von 155-182 ng/10.000 Zellen, die Werte von Qu et al. bei 22,5-400 ng/10.000 Zellen. Die Umgebungsbedingungen haben wohl einen starken Einfluss auf die HA-Produktion und HAS-Expression und führen somit zu unterschiedlichen HA-Konzentrationen. In unserer Studie wurde die Aktivität der HAS nicht mit FGF-2 stimuliert. Außerdem kann auch der Zeitpunkt, zu dem das Medium abgenommen wurde, eine Rolle spielen. Wenn über einen längeren Zeitraum, wie hier über 48 h, inkubiert wird, kann in dieser Zeit neben der Produktion von HA auch wieder ein Abbau von HA stattfinden. Qu et al. bestimmten die HA-Konzentration nach 24h. Als zweite Methode zur Überprüfung der Aktivität der HAS wurde ein Aktivitätsassay etabliert, bei dem mittels biotinyliertem Hyaluronanbindeprotein (bHABC) Hyaluronan von fixierten Zellen angefärbt werden konnte. Es ist bekannt, dass die Hyaluronansynthese intrazellulär stattfindet. Das entstehende Hyaluronan wird durch die Plasmamembran ausgestoßen, kann aber noch mit der HAS verbunden bleiben (Toole 2004). Fest auf der Membran gebundenes Hyaluronan kann demnach noch mit einer aktiven HAS in Verbindung stehen. Eine andere Möglichkeit der Bindung an die Membran besteht durch Hyaluronan-bindende Rezeptoren wie z.B. CD44-Rezeptoren (Tammi et al. 1998). Aber auch dieses an CD44-Rezeptoren gebundene Hyaluronan setzt voraus, dass es zuvor in den Extrazellulärtraum sezerniert wurde. Bei diesem Assay wurden die Zellen vor und nach dem Färben mehrfach mit PBS gewaschen, da kein freies Hyaluronan, sondern nur membrangebundenes Hyaluronan dargestellt werden sollte. Die bHABC-Färbung zeigte sich in den HAS-überexprimierenden Zelllinien deutlich stärker als in SCP1-mock. Die ganze Zelle war angefärbt. Die intensivste Färbung stellte sich im

zentralen Bereich der Zelle dar, doch auch bis in die Zellausläufer war ein Signal erkennbar. An manchen Stellen bilden sich intensiver gefärbte Stellen. Dort scheint eine größere Ansammlung an Hyaluronan vorzuliegen, welches vermutlich an HA-Rezeptoren wie CD44 oder RHAMM oder direkt an die HAS gebunden ist. Die Negativkontrolle wurde mitgeführt, um zu überprüfen, dass es sich um eine spezifische Färbung von Hyaluronan handelt. Bei den Negativkontrollen wurde vor der Färbung extrazelluläres Hyaluronan mit Hyaluronidase verdaut. Hier wurde kein Signal detektiert. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei den gefärbten Strukturen in den nicht mit Hyaluronidase behandelten Zellen um Hyaluronan handelt. Bei der Negativkontrolle waren die Zellkonturen nur sehr schwach sichtbar. Da die Permeabilisierung der Zellmembran erst nach dem Verdau mit Hyaluronidase erfolgte, zeigt dies also, dass mit dem bHABC kaum intrazelluläres Hyaluronan angefärbt wurde. Deshalb scheint es sich bei der intensiven Färbung der Positivkontrollen hauptsächlich um extrazellulär gebundenes Hyaluronan zu handeln. Somit scheinen aktive HAS in der Membran vorhanden zu sein. Die Färbung des Zellkerns könnte auf eine unspezifische Bindung des bHABC hinweisen oder es könnte Hyaluronan im Zellkern enthalten sein, um dieses Ergebnis zu liefern. Eine Hyaluronan-Färbung des Zellkerns wurde bereits in anderen Studien beschrieben. Intrazelluläres Hyaluronan ist möglicherweise Bestandteil der Zellkern-Matrix und steht mit dem Chromatin in Zusammenhang (Evanko und Wight 1999). Vergleicht man nun die Ergebnisse der HAS-Enzymaktivität der jeweiligen Zelllinie aus diesen beiden Methoden, zeichnet sich die gleiche Tendenz ab. Von den HAS-überexprimierenden Zelllinien zeigt die HAS3-überexprimierende Zelllinie bei beiden Methoden die stärkste Enzymaktivität. Im ELISA wird eindeutig die höchste HA-Konzentration bei der HAS3-Zelllinie gemessen, aber auch in der HA-Färbung zeigen sich bei dieser besonders intensiv angefärbte Zellen. Die HAS1- und HAS2-überexprimierenden Zellen zeigen ähnliche HA-Konzentrationen im HA-ELISA und erscheinen im Aktivitätsassay mit bHABC gleich intensiv gefärbt. Bei der Auswertung beider Methoden gilt es zu bedenken, dass die Zelllinie SCP1-HAS2-eGFP nicht gepickt wurde und dass somit nicht unbedingt alle Zellen der HAS2-eGFP-Linie positiv sind. Das heißt, dass sie eventuell trotz hoher Enzymaktivität der HAS2-eGFP-überexprimierenden Zellen insgesamt vergleichsweise weniger HA produzieren als die gepickten Zelllinien, von denen fast 100% der Zellen HAS1-eGFP bzw. HAS3-eGFP überexprimieren. Der Vergleich der HAS1- und HAS3-

überexprimierenden Zellen in der FACS-Analyse ergibt für die drei Klone der Zelllinie SCP1-HAS3-eGFP eine etwa 10-fach stärkere Fluoreszenzintensität als für die Klone der SCP1-HAS1-eGFP-Zellen.

4.4 Lokalisation der HAS-eGFP in der Plasmamembran

Durch die in dieser Studie durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte die Lokalisation der transgenen HAS-eGFP in der Plasmamembran nachgewiesen werden. Bereits in frühen Studien wurde erkannt, dass Hyaluronan auf der Innenseite der Plasmamembran synthetisiert und dann in die extrazelluläre Matrix ausgestoßen wird (Prehm 1984). Weigel et al. (1997) bestätigten mit weiteren Untersuchungen, dass die Hyaluronansynthase ein integrales Membranprotein ist. Es wurde herausgefunden, dass die HAS nur aktiv sind, wenn sie in die Plasmamembran eingebaut sind (Rilla et al. 2005, Müllegger et al. 2003). Mit GFP-markierten HAS2 und HAS3 konnte gezeigt werden, dass auch intrazellulär HAS vorkommen, welche den Transportweg über das endoplasmatische Retikulum, den Golgi-Apparat und endozytotische Vesikel nehmen. Dieser latente HAS-Pool kann schnell aktiviert werden, indem die Aufnahme in die Zellmembran induziert wird (Rilla et al. 2005). In den hier dargestellten Fluoreszenzbildern zeigen sich die HAS-eGFP in der gesamten Zelle, jedoch mit einer verstärkten Gruppierung um den Zellkern herum. Rilla et al. (2005) haben dieselbe Beobachtung beschrieben und anhand einer spezifischen Färbung des Golgi-Apparates die Kolokalisation desselben mit diesem perinukleären HAS-eGFP festgestellt. Die in unserer Studie beobachteten perinukleären HAS-eGFP stellen also wohl den intrazellulären HAS-Pool dar. Bei dieser Färbung wird durch die HAS2-Antikörper hauptsächlich die membrangebundene HAS2 gezeigt. Der Oberflächenmarker CD44 ist einer der Hauptrezeptoren von HA auf hMSCs. An diesen Rezeptor gebundenes HA kann eine perizelluläre Matrix ausbilden (Knudson et al. 1996) und auch diverse physiologische Abläufe wie z.B. Zelladhäsion und Zellmigration induzieren (Chen und Abatangelo 1999). Durch die Membranfärbung über spezifische CD44-Antikörper konnte in unseren Zelllinien die Lokalisation der HAS in der Membran nachgewiesen werden. An bestimmten Stellen, an denen eine Kolokalisation von CD44 und HAS-eGFP beobachtet wurde, sind eindeutig Membranstrukturen zu erkennen (s. Abb. 15-17). Das HAS-eGFP Signal ist in den Ausläufern der Zelle weniger intensiv, weil die HAS-

eGFP hier über die Zellmembran verteilt vorliegen und nicht in Vesikel dicht gepackt sind wie die intrazelluläre HAS (Rilla et al. 2005). In der CD44-Färbung sind feine Filopodien und kleine Ausstülpungen zu sehen, die jedoch kein Signal für HAS-eGFP zeigen. Anscheinend befinden sich in diesen Bereichen nur vereinzelte HAS-eGFP, die kein ausreichend starkes Signal generieren können. Die Oberflächenmarker CD44 sind an Zellausläufern ebenso zahlreich vorhanden wie auf der zentralen Zellmembran. Das rote Signal ist somit auch am Rand gut detektierbar. Die Verteilung der HAS-eGFP in der Zellmembran ist nicht homogen sondern globulär strukturiert. Dies wurde ebenfalls in anderen Studien beschrieben (Rilla et al. 2005, Müllegger et al. 2003) und als Protrusion in der Zellmembran mit Ansammlungen von HAS gewertet. Warum HAS gerade in Zellprotrusionen gehäuft vorliegt, ist noch nicht ausreichend geklärt.

4.5 Interaktion der HAS-eGFP mit dem Aktinzytoskelett

In dieser Studie sollte mit verschiedenen Methoden untersucht werden, ob in den hier hergestellten HAS-überexprimierenden hMSCs eine Interaktion der HAS mit dem Aktinzytoskelett besteht. Es wurde bereits eine direkte Interaktion des Aktinzytoskeletts mit den Chitinsynthasen über eine Myosindomäne (Weiss et al. 2006) und eine vermutlich indirekte Interaktion der Mikrotubuli mit den Cellulosesynthasen (Gutierrez et al. 2009) beschrieben. Die bei den Myosin-Chitinsynthasen in Muscheln beschriebene Interaktion lässt auf eine regulatorische Funktion des Aktinzytoskeletts schließen. Diese steuert vermutlich die Chitinablagerung, welche für die Mineralisation der Muschelschale entscheidend ist. Möglicherweise werden über die Myosindomäne der Transport, die Lokalisation in der Membran und die Aktivität der Myosin-Chitinsynthasen reguliert. Außerdem könnten infolge der Chitinablagerung im Extrazellulärraum entstehende Kräfte über die Myosin-Chitinsynthase und das Aktinzytoskelett Mechanosignaltransduktionen induzieren und die Expression von Genen, die für die Biomineralisation entscheidend sind, regulieren. Gutierrez et al. beschreiben ebenfalls, dass der Einbau der Cellulosesynthasen in die Membran und die dortige Organisation über eine Interaktion mit den Mikrotubuli des Zellskeletts reguliert wird. Über die genaue Regulation der HAS ist noch wenig bekannt. Da die HAS eng mit den Chitin- und Cellulosesynthasen verwandt ist - sie gehört ebenfalls zu der GT2-Enzymfamilie der

Glycosyltransferasen (DeAngelis et al. 1993, Watanabe und Yamaguchi 1996) - ist auch für sie eine derartige Interaktion vorstellbar. Falls die Integration der HAS in die Zellmembran über eine Interaktion mit den Aktinfilamenten läuft, stellt dies einen Regulationsmechanismus für die Aktivität der HAS dar. Es wurde nämlich gezeigt, dass die HAS nur in ihrer Lokalisation in der Zellmembran aktiv ist (Rilla et al. 2005). Sie stellen die Hypothese auf, dass die Aktivierung der HAS den Transport in die Membran induziert und die laufende Synthese die HAS in dieser Lokalisation hält. Der Transport zur Zellmembran könnte über das Aktinzytoskelett reguliert werden. Kultti et al. (2006) haben beobachtet, dass eine Überexpression von GFP-getaggtem HAS3 und HAS2 aus Maus in verschiedenen Zelltypen die Ausbildung von Mikrovillus-ähnlichen Ausstülpungen induziert. Sie konnten zeigen, dass aktive HAS, Aktin und perizelluläres HA für die Ausbildung und Stabilisierung der Ausstülpungen essenziell sind, während die HA-Rezeptoren CD44 und RHAMM nicht erforderlich sind. Auch aus obiger Studie ergibt sich die Frage, inwiefern Aktin und die HAS miteinander agieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die HAS-überexprimierenden hMSCs zum einen im fixierten Zustand mittels Immunfluoreszenz bzw. direkter Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Hierbei zeigte sich an einigen Stellen eine Kolokalisation von Aktinfasern und HAS-eGFP (grün) überexprimieren und in denen das Aktinzytoskelett (rot) mit einer Phalloidin-Färbung dargestellt wird, zeigt das grüne Signal an manchen Stellen die gleiche Struktur wie im roten Signal. Je nach Fokusebene erscheinen die Strukturen der HAS unterschiedlich. An der Zellmembran bilden die HAS vorwiegend globuläre Strukturen aus, die linear angeordnet sind. In der Ebene, in der die Zellen an den Objektträger adhärieren, sind die HAS durchgehend linear an den Aktinfilamenten lokalisiert.

In der Literatur wird beschrieben, dass es durch die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen zu Artefakten in der Proteindarstellung kommen kann, da diese Methoden Veränderungen in der zellulären Ultrastruktur verursachen können. Die Lokalisation von Transmembranproteinen, wie es auch die HAS sind, bleibt allerdings im Gegensatz zu gelösten Proteinen besser erhalten. Die besten Ergebnisse für den Erhalt der Proteinlokalisierung und für die Zugänglichkeit von Antikörpern wurden mit Formaldehyd in höherer Konzentration (4%) und Triton X-100 erzielt (Schnell et al. 2012). Mit diesen Reagenzien wurden die Zellen in den vorliegenden Versuchen behandelt. Somit ist bei den hier gezeigten Ergebnissen trotz Fixierung und

Permeabilisierung eher mit geringfügigen Artefakten zu rechnen und durchaus eine Aussage bezüglich der Lokalisation der HAS-eGFP möglich. Schnell et al. schlagen vor, die Proteine z.B. mit Hilfe des eGFP auch in lebenden Zellen zu untersuchen, um Artefakte durch die Fixierung zu erkennen bzw. zu umgehen. Um also der Vermutung einer Aktin-HAS-Interaktion weiter nachzugehen und um eventuelle Fixierungsartefakte zu vermeiden, werden Zellen benötigt, bei denen das Aktinzytoskelett in lebenden Zellen dargestellt werden kann. Ermöglicht wird dies durch die bereits in verschiedenen Zelltypen etablierte Methode mit dem Protein Lifeact-mRFPuby (Riedl et al. 2008). Dieses bindet spezifisch an F-Aktin, ohne dabei die Aktindynamik oder zelluläre Prozesse zu beeinflussen. In dieser Arbeit wurden zuerst hMSCs hergestellt, die nur das Lifeact-mRFPuby-Gen stabil exprimieren. Da hier in Bezug auf Lifeact erstmals das lentivirale Gentransfersystem und erstmals hMSCs eingesetzt wurden, sollte zuerst deren Funktionalität sichergestellt werden. Die Färbung des Aktinzytoskeletts mit Lifeact in hMSCs zeigt, wie auch die Färbung mit Phalloidin, die typischen Stressfasern und lockere Netzwerke aus kurzen Aktinfilamenten. Die Lifeact-Darstellungen von Riedl (2011) in MEF-Zellen (immortalisierte murine embryonale Fibroblasten) und MDCK-Zellen (Madin-Darby Canine Kidney Zellen) zeigen mit unseren Bildern vergleichbare Strukturen der Aktinfilamente. Hierbei sind die Stressfasern im Zellkörper und die Aktinfilamente im Zellcortex gefärbt. In der Zellkultivierung zeigten die hMSC-Lifeact-mRFPuby-Zellen ein gesundes Wachstum und normale Zellmorphologie.

Im Anschluss an die erfolgreiche Herstellung dieser Zellen erfolgte die Doppeltransduktion von hMSCs mit Lifeact-mRFPuby und HAS-eGFP. Mit diesem Modellsystem sollte ermöglicht werden, eine Kolokalisation durch eine mögliche Interaktion von Aktin und HAS direkt mittels Fluoreszenzmikroskopie in lebenden Zellen untersuchen zu können.

Vergleicht man das grüne Signal der HAS3-eGFP in den Aufnahmen der lebenden und fixierten Zellen, zeigt es sich in den lebenden als globuläre Struktur und in den fixierten Zellen eher homogen verteilt (s. Abb. 22 und Abb. 20). Dieser Unterschied ist möglicherweise auf die Fixierung zurückzuführen. In beiden Darstellungen zeigt sich HAS-eGFP aber ubiquitär in der Zelle verteilt. In den lebenden Zellen scheint die perinukleäre Gruppierung der HAS weniger stark ausgeprägt. Diese Zellen waren noch in der Phase der Adhäsion, als die Bilder aufgenommen wurden. Die fixierten Zellen hatten im Gegensatz dazu 48h Kultivierungszeit. Wahrscheinlich sind die HAS

in dieser Phase aktiv in der Zellmembran, da für die neue Umgebung extrazelluläres Hyaluronan, z.B. für eine initiale Adhäsion an die Glasoberfläche (Cohen et al. 2006), benötigt wird. Margolin (2000) beschreibt, dass GFP bei mehreren Fixierungsprotokollen, unter anderem mit Paraformaldehyd, gut erhalten bleibt, jedoch die Fluoreszenz oft signifikant abgeschwächt wird. Wir erhielten bei unserem Probenmaterial sowohl bei den fixierten als auch den lebenden Zellen zu Beginn ein gut detektierbares eGFP-Signal. Allerdings verblasste dieses bei mehrmaligem Belichten, vor allem in den Timelapse-Aufnahmen, sehr schnell. Somit war es oft schwierig, genaue Bewegungsmuster der HAS-eGFP über einen längeren Zeitraum zu erkennen. In der hier dargestellten Aufnahme einer hMSC-HAS3-eGFP-Lifeact-mRFPruby Zelle reichen aber die ersten 30 sec aus, um eine klare Tendenz der Bewegung zu erkennen. Die globulären HAS3-eGFP bewegen sich in gleicher Richtung entlang der Aktinfilamente. Auch in den hMSC-HAS1-eGFP-Lifeact-mRFPruby Zellen stellen sich die HAS1-eGFP als globuläre Struktur dar. An ausgewählten Stellen ist ebenfalls eine Anordnung der HAS1-eGFP entlang der Aktinfilamente zu erkennen. Die globulären Strukturen bewegen sich, allerdings war ein gerichtetes Bewegungsmuster wie bei der Aufnahme von hMSC-HAS3-eGFP-Lifeact-mRFPruby nicht eindeutig zu erkennen (Timelapse-Aufnahme nicht gezeigt). Bei den globulären Strukturen, die sich eher ungerichtet, also nicht entlang der Aktinfilamente, bewegen, handelt es sich möglicherweise um den inaktiven, intrazellulär vorliegenden HAS-Pool oder um HAS an Filamenten, die nach oben gerichtet sind. Wahrscheinlich hängt das Bewegungsmuster auch mit der derzeitigen Aktion der Zelle zusammen, abhängig davon, ob sich diese gerade flächig ausbreitet oder eher ruhig vorliegt. Auch Unterschiede in der aufgenommenen Ebene können das Bild des Bewegungsmusters beeinflussen. Um klare Aussagen über ein Muster treffen zu können, müssten allerdings noch viele weitere Zellen aufgenommen und verglichen werden. In den mit Lifeact-mRFPruby transduzierten Zellen zeigen sich neben den filamentösen Aktinstrukturen ebenfalls globuläre Strukturen. Diese repräsentieren wohl Aktinfilamente in Mikrovilli, die sich von der Zelle aus nach oben erstrecken. In der hier dargestellten horizontalen Ebene werden diese Filamente nur als Punkte dargestellt. In seitlichen Aufnahmen von HAS3-GFP-überexprimierenden MCF-7-Zellen sind eine Vielzahl solcher Mikrovilli vorhanden, die nachweislich Aktin und HAS3-GFP enthalten (Kultti et al. 2006). In unseren Aufnahmen zeigen sich ebenfalls die globulären HAS-eGFP zum Teil überlagert mit diesen Aktin-Punkten. In

den fixierten hMSC-Lifeact-mRFPuby-Zellen und den fixierten Zellen mit Phalloidinfärbung zeigen sich keine solchen Punkte in der Aktinstruktur. Möglicherweise werden die feinen und fragilen Mikrovilli beim Vorgang der Fixierung zerstört.

Für weitere Untersuchungen muss die Herstellung der doppeltransduzierten Zellen optimiert werden. Zum einen überlebten nicht viele Zellen die Selektion mit Blasticidin und Zeocin, und zum anderen musste bei der weiteren Kultivierung festgestellt werden, dass die Zellen sehr schlecht wuchsen. Sie vermehrten sich kaum und das Medium enthielt viel Zelldebris. Auch ihre Form entsprach nicht der von gesunden hMSCs. Viele der Zellen stellten sich „ausgefranst und verzerrt“ dar. Wahrscheinlich entsprach diese Form Stadien kurz vor der Apoptose. Für die Aufnahmen wurden die wenigen morphologisch gesund aussehenden Zellen verwendet. Vermutlich wäre eine nacheinander folgende Transduktion der zwei Gene schonender für die Zellen. Dass eine Doppeltransduktion möglich ist, wurde schon mehrfach gezeigt. So sind unsere HAS-überexprimierenden SCP1-Zellen ebenfalls mit zwei Genen transduziert worden, allerdings zu getrennten Zeitpunkten. Auch mit anderen Zellen und Genen konnten nach einer Doppeltransduktion stabil exprimierende Zellen gewonnen werden, die gute Zellfunktionen und keine offensichtlichen Defizite in Wachstum und Zellmorphologie aufwiesen (Laufs et al. 1998, Bencsics et al. 1996). Für weitere Untersuchungen sollten neue, doppeltransduzierte Zellen hergestellt werden, bei denen die Transduktion von Lifeact-mRFPuby und den HAS-eGFP nacheinander erfolgt. Die Timelapse-Untersuchungen sollten dann mit den besten Klonen wiederholt werden und erneut die Bewegungsmuster untersucht werden. Interessant wären Timelapse-Aufnahmen unter unterschiedlichen Bedingungen bzw. in verschiedenen Stadien der Zellen. Zur exakteren Darstellung der Lokalisation von HAS-eGFP könnten die mit HAS-eGFP transduzierten Zellen nach Immunfluoreszenzfärbung sowie die doppeltransduzierten Zellen zusätzlich unter dem LSM-Mikroskop untersucht werden. Dadurch würden Überlagerungseffekte ausgeschaltet und man könnte so zwischen den intrazellulären und den membranständigen HAS-eGFP unterscheiden. Erkenntnisse über den Einbau der HAS in die Membran könnten z.B. klären, ob der Transport der HAS zur Plasmamembran über Aktinfilamente abläuft.

4.6 Ausblick

Die durchgeföhrten Untersuchungen der hier generierten Zellen und die oben diskutierten Ergebnisse belegen, dass sich diese Zelllinien durch eine stabile Expression des jeweiligen HAS-eGFP-Gens und die Funktionalität des jeweiligen Proteins auszeichnen. Die HAS-eGFP scheinen in die Membran eingebaut zu sein und indirekt oder direkt mit dem Aktinzytoskelett zu interagieren. In dieser Arbeit konnte demnach erfolgreich ein Modellsystem für weitere Untersuchungen zur Rolle der HAS beim Knochenremodellingprozess etabliert werden.

Dabei gibt es noch Punkte, die es zu optimieren gilt. So sollte nach einer Lösung für die nichtfluoreszierenden SCP1-HAS2-eGFP gesucht werden. Eine Umklonierung durch Einföhrung einer Linker-Sequenz zwischen dem HAS2- und dem eGFP-Gen kann eine mögliche Fehlfaltung des eGFP-Gens verhindern. Eine andere Strategie wäre die Einfögung einer sogenannten IRES-Sequenz (interne ribosomale Eintrittsstelle). Durch diese können das eGFP-Gen und das Zielgen in ein gemeinsames Plasmid kloniert werden, die Proteine werden aber getrennt translatiert. Das eGFP sollte also keine Beeinflussung in seiner Faltung durch das vorangestellte HAS2-Protein erfahren. In solchen Zellen wäre das eGFP zur fluoreszenzmikroskopischen Selektion von positiven Transformanden vorhanden, allerdings könnte die Lokalisation der HAS nicht mehr durch das eGFP-Signal untersucht werden.

In weiteren Studien kann mit dem hier etablierten Modellsystem untersucht werden, ob und wie die HAS-überexprimierenden Zellen sich selbst sowie Osteoblasten und Osteoklasten beeinflussen. In der Literatur ist beschrieben, dass HA das Wachstumsverhalten und die Migration von hMSCs beeinflussen kann (Chen et al. 2007). Inwiefern die Überexpression der HAS die Migrationsfähigkeit im Vergleich zu nichttransduzierten hMSCs beeinflusst, könnte Gegenstand weiterer Forschung sein. Auch die Haftung der Zellen zueinander, an Oberflächen und an die extrazelluläre Matrix hängt mit dem HA zusammen und könnte untersucht werden. Für die Knochenheilung ist die Einwanderung von hMSCs essenziell. Mit unseren Zellen könnte untersucht werden, inwieweit die Überexpression der HAS bzw. das damit vermehrt vorliegende HA in der extrazellulären Matrix das Heranlocken der Stammzellen steuern kann. Bei der Differenzierung der hMSCs in osteogene, chondrogene oder adipogene Zelllinien spielen nicht nur gelöste Substanzen eine

Rolle, sondern vor allem auch die extrazelluläre Matrix (Lutolf et al. 2009). In der Literatur gibt es verschiedene Angaben bezüglich der Korrelation von Hyaluronankonzentration und Zellmotilität. Brinck und Heldin (1999) beschreiben eine verminderte Zellmigration bei erhöhter Hyaluronankonzentration. Andere Arbeitsgruppen fanden später heraus, dass es von der Größe der Hyaluronanketten abhängt, ob die Zellmigration und -proliferation gefördert oder gehemmt wird. Hochmolekulares Hyaluronan (HMW-HA; 500-1400 kDa) zeigte inhibitorische Wirkung, während kleine HA-Fragmente (6mer und 8mer Oligosaccharide) sowie Fragmente mittlerer Größe (LMW-HA; 100-300 kDa) die Zellmigration stimulierten (Tolg et al. 2014, Ghazi et al. 2012, Ariyoshi et al. 2005). Die Erkenntnis, dass HMW-HA die Osteoklastenbildung und -funktion hemmen kann (Ariyoshi et al. 2014, Pivetta et al. 2011, Ariyoshi et al. 2005, Stancíková et al. 2004), bietet einen neuen Ansatz für die Therapie von destruktiven Knochenerkrankungen wie z.B. der Osteoarthritis und Osteoporose. Die meisten Untersuchungen erfolgen an Knochenmark-Stromazellen aus Maus. Um die Effekte auf den Menschen übertragen zu können, müssen diese Studien ebenfalls in humanen Zellen durchgeführt werden. Von den hier hergestellten HAS-überexprimierenden Zellen ist noch nicht bekannt, welches Molekulargewicht das von ihnen produzierte HA hat. Dies sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen werden. Dann könnte mit diesen Zellen auch der Effekt ihres HAs auf umliegende Zellen geprüft werden.

Die Experimente der vorliegenden Arbeit weisen auf eine Interaktion der HAS mit dem Aktinzytoskelett hin. Die HAS könnten über das Zytoskelett reguliert werden und damit einen Einfluss auf die Migrationsfähigkeit der hMSCs haben. Bei der Frakturheilung ist es essenziell, dass die hMSCs in der Lage sind, an die Frakturstelle zu wandern. Für eine erfolgreiche Therapie ist es somit wichtig, ein genaueres Verständnis über die Regulation und Beeinflussbarkeit der Migrationsfähigkeit der hMSCs zu gewinnen. Das hier etablierte Modellsystem bietet die Möglichkeit, die mechanische Interaktion zwischen den HAS und dem Aktinzytoskelett, zu erforschen. Dadurch sollen genauere Erkenntnisse über die Regulierungsmechanismen der HAS und die Eigenschaften der HAS-überexprimierenden Zellen gewonnen werden. Da Hyaluronan eine wesentliche Rolle im gesunden Knochenumsatz sowie in der Frakturheilung spielt, kann das Verständnis über seine Regulation Impulse für zukünftige Therapieansätze liefern.

5. Zusammenfassung

Hintergrund: Hyaluronan (HA) ist ein wichtiger Bestandteil von vielen Geweben und Flüssigkeiten des Körpers. HA beeinflusst die Makro- und Mikroumgebung und kann direkt über Rezeptoren wie CD44 (cluster of differentiation 44) und RHAMM (receptor for HA mediated motility) mit den Zellen wechselwirken. Dadurch hat HA Einfluss auf die Aktivierung, Migration und Proliferation von Zellen sowie auf den Umbau der extrazellulären Matrix. HA kann das Verhalten der Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten beeinflussen und ist somit ein wichtiger Faktor sowohl für die gesunde Knochenhomöostase als auch für die Frakturheilung. Hyaluronansynthetasen (HAS) sind komplexe Membranproteine, die für die Synthese von HA verantwortlich sind. Bei Säugetieren sind drei Isoformen bekannt: HAS1, HAS2 und HAS3. Sie zeigen eine hohe Homologie in ihrer Sequenz und Struktur, unterscheiden sich aber in Stabilität, Syntheserate und Länge des HA. Der genaue Regulierungsmechanismus der HAS ist noch nicht bekannt. Bisher wurde über eine Regulation durch externe Signalmoleküle, Ubiquitinierung oder Phosphorylierung berichtet. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Modellsystem zur Untersuchung der Regulation der Aktivität der HAS aufgebaut. Mit diesem sollte die Interaktion der HAS mit dem Aktinzytoskelett als möglicher Regulationsmechanismus untersucht werden.

Methoden: Zu diesem Zweck wurden drei Zelllinien hergestellt. Zum einen hTERT immortalisierte hMSCs (human mesenchymal stem cells), die sogenannten SCP1, welche jeweils eine der HAS-Isoformen, fusioniert mit einem eGFP-Tag, stabil exprimieren. Des Weiteren SCP1, die Lifeact-mRFPuby exprimieren, welches F-Aktin fluoreszenzmarkiert. Schließlich doppeltransduzierte hMSCs, welche sowohl HAS-eGFP als auch Lifeact-mRFPuby exprimieren. Als Gentransfersystem wurden Lentiviren eingesetzt. Zuerst wurden die Zellen hinsichtlich der stabilen und funktionellen Expression ihres Transgens anhand verschiedener Methoden untersucht. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurde eine Kolokalisation von Aktin und HAS dargestellt. In fluoreszenzmikroskopischen Timelapse-Aufnahmen wurden die Bewegungsmuster der HAS beobachtet.

Ergebnisse: Mittels RT-PCR, Western Blot und Fluoreszenzmikroskopie wurde nachgewiesen, dass die Zelllinien SCP1-HAS1-eGFP D6, SCP1-HAS2-eGFP und SCP1-HAS3-eGFP E6 alle ihr jeweiliges HAS-eGFP-Gen stabil exprimieren. Die Funktionalität der HAS-eGFP wurde mit einem HA-spezifischen ELISA und mit einem

selbst etablierten Aktivitätsassay untersucht, welcher das HA durch den biotinylierten HA-Bindekomplex (bHABC) färbt. Im ELISA zeigten alle Zelllinien eine statistisch signifikant höhere Hyaluronanproduktion als die Negativkontrolle. Die HAS3-überexprimierende Zelllinie erzielte von allen die höchste HA-Konzentration. In der Färbung mit bHABC war deutlich zu erkennen, dass diejenigen Zelllinien, in denen eine der HAS-eGFP-Isoformen überexprimiert wurde, eine stärkere Braunfärbung zeigten als Zellen der Negativkontrolle. Für den Nachweis, dass die HAS-eGFP in der Membran lokalisiert sind, wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen den Oberflächenmarker CD44 durchgeführt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigten an Stellen, die durch die CD44-Färbung eindeutig als Membran zu erkennen sind, ebenfalls ein Signal für die HAS-eGFP. Dies bedeutet, dass die drei Isoformen der HAS-eGFP dort in der Zellmembran integriert vorlagen. Um eine Kolokalisation der HAS-eGFP mit dem Aktinzytoskelett darstellen zu können, erfolgte außerdem eine Färbung des Aktins mit Phalloidin. Bei allen Zelllinien konnte an ausgewählten Stellen eine solche Kolokalisation gesehen werden. Die hMSC-Lifeact-mRFPuby-Zellen wurden lebendig und fixiert im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Sie lieferten eine gute Darstellung des Zytoskeletts mit Stressfasern im Zellkörper und Aktinfilamenten im Zellcortex. Auffallend war, dass in den lebenden Zellen kurze Aktinfilamente zu sehen waren, die sich bei den fixierten Zellen nicht beobachten ließen. Um eine Interaktion zwischen den HAS-eGFP und dem Aktinzytoskelett in lebenden Zellen untersuchen zu können, wurden von den doppeltransduzierten hMSCs Timelapse-Aufnahmen angefertigt. Darin stellten sich die grün fluoreszierenden HAS-eGFP als globuläre Strukturen dar, die entlang der Aktinfilamente angeordnet waren und sich auch entlang dieser bewegten.

Schlussfolgerung: Mit diesen Zellen wurde ein Modellsystem geschaffen, mit welchem eine Regulation der HAS über die Interaktion mit dem Zytoskelett untersucht werden kann. Genaueres Wissen über diesen Mechanismus kann für zukünftige Therapieansätze bei Frakturen und bei Knochenerkrankungen, wie z.B. der Osteoporose, richtungsweisend werden.

Abstract

Background: Hyaluronan (HA) is an important component of several tissues and fluids in the human body. HA affects the macro and micro environment and can interact directly with the cells by means of receptors like CD44 (cluster of differentiation 44) and RHAMM (receptor for HA mediated motility). Thus, HA influences the cell's activation, migration and proliferation and the remodeling of the extracellular matrix. HA may influence the behavior of osteoblasts, osteoclasts and osteocytes and therefore, it is an important factor in healthy bone homoeostasis and fracture healing. Hyaluronan synthases (HAS) are complex membrane proteins which are responsible for the synthesis of HA. Three isoforms are known in mammals: HAS1, HAS2 and HAS3. They show high homology in sequence and structure but differ in their stability, synthesis rate and HA length. The exact regulatory mechanism of HAS is not yet known. So far, regulation by means of external signal molecules, ubiquitination or phosphorylation has been reported. In the present study a model system to investigate the regulation of HAS was established. With this model an interaction between the HAS and the actin cytoskeleton as a possible regulation mechanism should be investigated.

Methods: To that end, three cell lines were developed. Those were hTERT immortalized hMSCs (human mesenchymal stem cells), the so-called SCP1, which each stably express one of the HAS isoforms, fused with an eGFP tag. Furthermore, there were SCP1 which express Lifeact-mRFPuby, a protein that fluorescently labels F-Actin, and finally double-transduced hMSCs which express both HAS-eGFP and Lifeact-mRFPuby. Lentiviruses were used as a gene transfer system. First, the cells were investigated as to their stable and functional expression of the transgene with several methods. The colocalization of actin and HAS was illustrated by using immunofluorescence microscopy. Movement patterns of the HAS were observed by time-lapse recordings under the fluorescence microscope.

Results: It has been demonstrated by using RT-PCR, Western blot and fluorescence microscopy that the three cell lines SCP1-HAS1-eGFP D6, SCP1-HAS2-eGFP and SCP1-HAS3-eGFP E6 all stably express their respective HAS-eGFP gene. The functionality of HAS-eGFP was investigated using a HA-specific ELISA and a self-established activity assay which stains HA by a biotinylated HA-binding complex (bHABC). In the ELISA all cell lines showed a statistically significantly higher

hyaluronan concentration than the negative control. Of all cell lines the ones expressing HAS3 achieved the highest HA concentration. In the staining with bHABC it was clearly visible that those cell lines expressing one of the HAS-eGFP isoforms showed a stronger brown-staining than cells of the negative control. In order to prove that HAS-eGFP was located in the membrane, an immunostaining against the surface marker CD44 was performed. Those images recorded under the fluorescence microscope also showed a signal for HAS-eGFP in areas which were clearly identified as membrane through the CD44 staining. This means that the three HAS-eGFP isoforms are integrated in the cell membrane at this location. In order to visualize a colocalization of the HAS-eGFP with the actin cytoskeleton, an actin staining with phalloidin was performed. In all cell lines such a colocalization could be seen at selected sites. The hMSC-Lifeact-mRFPuby cells were viewed under the fluorescence microscope, some alive and others fixated. They all provided a good illustration of the cytoskeleton with stress fibers in the cell body and actin filaments in the cell cortex. It was striking to notice that short actin filaments were seen in the living cells but not in the fixated ones. For investigating an interaction between HAS-eGFP and the actin cytoskeleton in living cells, time-lapse recordings were made of the double-transduced hMSCs. Here, the green-fluorescent HAS-eGFP presented themselves as globular structures which were positioned along the actin filaments and which were moving along these.

Conclusion: With these cells a model system was created with which a regulation of the HAS through the interaction with the cytoskeleton can be investigated. Deeper knowledge about this mechanism may lead the way for future therapeutic approaches in fracture healing and in bone diseases like osteoporosis.

6. Literaturverzeichnis

- Adams, J. R., Sander, G. und Byers, S. (2006) 'Expression of hyaluronan synthases and hyaluronidases in the MG63 osteoblast cell line', *Matrix Biol*, 25(1), 40-6.
- Albrecht, C., Schlegel, W., Eckl, P., Jagersberger, T., Sadeghi, K., Berger, A., Vecsei, V. und Marlovits, S. (2009) 'Alterations in CD44 isoforms and HAS expression in human articular chondrocytes during the de- and re-differentiation processes', *Int J Mol Med*, 23(2), 253-9.
- Allison, D. D. und Grande-Allen, K. J. (2006) 'Review. Hyaluronan: a powerful tissue engineering tool', *Tissue Eng*, 12(8), 2131-40.
- Ariyoshi, W., Okinaga, T., Knudson, C. B., Knudson, W. und Nishihara, T. (2014) 'High molecular weight hyaluronic acid regulates osteoclast formation by inhibiting receptor activator of NF- κ B ligand through Rho kinase', *Osteoarthritis Cartilage*, 22(1), 111-20.
- Ariyoshi, W., Takahashi, T., Kanno, T., Ichimiya, H., Takano, H., Koseki, T. und Nishihara, T. (2005) 'Mechanisms involved in enhancement of osteoclast formation and function by low molecular weight hyaluronic acid', *J Biol Chem*, 280(19), 18967-72.
- Aslan, H., Zilberman, Y., Kandel, L., Liebergall, M., Oskouian, R. J., Gazit, D. und Gazit, Z. (2006) 'Osteogenic differentiation of noncultured immunoisolated bone marrow-derived CD105+ cells', *Stem Cells*, 24(7), 1728-37.
- Awad, H. A., Butler, D. L., Boivin, G. P., Smith, F. N., Malaviya, P., Huibregtse, B. und Caplan, A. I. (1999) 'Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon', *Tissue Eng*, 5(3), 267-77.
- Baier Leach, J., Bivens, K. A., Patrick, C. W., Jr. und Schmidt, C. E. (2003) 'Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: natural, biodegradable tissue engineering scaffolds', *Biotechnol Bioeng*, 82(5), 578-89.
- Baldini, A., Zaffe, D. und Nicolini, G. (2010) 'Bone-defects healing by high-molecular hyaluronic acid: preliminary results', *Ann Stomatol (Roma)*, 1(1), 2-7.
- Ballini, A., Cantore, S., Capodiferro, S. und Grassi, F. R. (2009) 'Esterified hyaluronic acid and autologous bone in the surgical correction of the infra-bone defects', *Int J Med Sci*, 6(2), 65-71.
- Bastow, E. R., Byers, S., Golub, S. B., Clarkin, C. E., Pitsillides, A. A. und Fosang, A. J. (2008) 'Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone', *Cell Mol Life Sci*, 65(3), 395-413.
- Beard, B. C., Dickerson, D., Beebe, K., Gooch, C., Fletcher, J., Okbinoglu, T., Miller, D. G., Jacobs, M. A., Kaul, R., Kiem, H. P. und Trobridge, G. D. (2007a)

- 'Comparison of HIV-derived lentiviral and MLV-based gammaretroviral vector integration sites in primate repopulating cells', *Mol Ther*, 15(7), 1356-65.
- Beard, B. C., Keyser, K. A., Trobridge, G. D., Peterson, L. J., Miller, D. G., Jacobs, M., Kaul, R. und Kiem, H. P. (2007b) 'Unique integration profiles in a canine model of long-term repopulating cells transduced with gammaretrovirus, lentivirus, or foamy virus', *Hum Gene Ther*, 18(5), 423-34.
- Bencsics, C., Wachtel, S. R., Milstien, S., Hatakeyama, K., Becker, J. B. und Kang, U. J. (1996) 'Double transduction with GTP cyclohydrolase I and tyrosine hydroxylase is necessary for spontaneous synthesis of L-DOPA by primary fibroblasts', *J Neurosci*, 16(14), 4449-56.
- Benisch, P., Schilling, T., Klein-Hitpass, L., Frey, S. P., Seefried, L., Raaijmakers, N., Krug, M., Regensburger, M., Zeck, S., Schinke, T., Amling, M., Ebert, R. und Jakob, F. (2012) 'The transcriptional profile of mesenchymal stem cell populations in primary osteoporosis is distinct and shows overexpression of osteogenic inhibitors', *PLoS One*, 7(9), e45142.
- Bernardo, M. E., Emons, J. A., Karperien, M., Nauta, A. J., Willemze, R., Roelofs, H., Romeo, S., Marchini, A., Rappold, G. A., Vukicevic, S., Locatelli, F. und Fibbe, W. E. (2007) 'Human mesenchymal stem cells derived from bone marrow display a better chondrogenic differentiation compared with other sources', *Connect Tissue Res*, 48(3), 132-40.
- Bobis, S., Jarocha, D. und Majka, M. (2006) 'Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications', *Folia Histochem Cytobiol*, 44(4), 215-30.
- Böcker, W., Denk, H., Heitz, P. U. und Moch, H. (Hrsg.) (2008a) : *Pathologie*. (4. Auflage) München: *Urban & Fischer bei Elsevier*.
- Böcker, W., Yin, Z., Drosse, I., Haasters, F., Rossmann, O., Wierer, M., Popov, C., Locher, M., Mutschler, W., Docheva, D. und Schieker, M. (2008b) 'Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer', *J Cell Mol Med*, 12(4), 1347-59.
- Boskey, A. L. und Dick, B. L. (1991) 'Hyaluronan interactions with hydroxyapatite do not alter in vitro hydroxyapatite crystal proliferation and growth', *Matrix*, 11(6), 442-6.
- Bourguignon, L. Y., Zhu, H., Shao, L. und Chen, Y. W. (2001) 'CD44 interaction with c-Src kinase promotes cortactin-mediated cytoskeleton function and hyaluronic acid-dependent ovarian tumor cell migration', *J Biol Chem*, 276(10), 7327-36.
- Breborowicz, A., Kuzlan-Pawlaczyk, M., Wieczorowska-Tobis, K., Wisniewska, J., Tam, P., French, I. und Wu, G. (1998) 'The effect of N-acetylglucosamine as a substrate for in vitro synthesis of glycosaminoglycans by human peritoneal mesothelial cells and fibroblasts', *Adv Perit Dial*, 14, 31-5.

- Brinck, J. und Heldin, P. (1999) 'Expression of recombinant hyaluronan synthase (HAS) isoforms in CHO cells reduces cell migration and cell surface CD44', *Exp Cell Res*, 252(2), 342-51.
- Bruder, S. P., Kurth, A. A., Shea, M., Hayes, W. C., Jaiswal, N. und Kadiyala, S. (1998) 'Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells', *J Orthop Res*, 16(2), 155-62.
- Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C. R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., Scully, S., Tan, H. L., Xu, W., Lacey, D. L., Boyle, W. J. und Simonet, W. S. (1998) 'osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification', *Genes Dev*, 12(9), 1260-8.
- Calabro, A., Oken, M. M., Hascall, V. C. und Masellis, A. M. (2002) 'Characterization of hyaluronan synthase expression and hyaluronan synthesis in bone marrow mesenchymal progenitor cells: predominant expression of HAS1 mRNA and up-regulated hyaluronan synthesis in bone marrow cells derived from multiple myeloma patients', *Blood*, 100(7), 2578-85.
- Caplan, A. I. (1991) 'Mesenchymal stem cells', *J Orthop Res*, 9(5), 641-50.
- Caplan, A. I. (2005) 'Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics', *Tissue Eng*, 11(7-8), 1198-211.
- Caplan, A. I. und Bruder, S. P. (2001) 'Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century', *Trends Mol Med*, 7(6), 259-64.
- Chang, E. J., Kim, H. J., Ha, J., Kim, H. J., Ryu, J., Park, K. H., Kim, U. H., Lee, Z. H., Kim, H. M., Fisher, D. E. und Kim, H. H. (2007) 'Hyaluronan inhibits osteoclast differentiation via Toll-like receptor 4', *J Cell Sci*, 120(Pt 1), 166-76.
- Chen, P. Y., Huang, L. L. und Hsieh, H. J. (2007) 'Hyaluronan preserves the proliferation and differentiation potentials of long-term cultured murine adipose-derived stromal cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 360(1), 1-6.
- Chen, W. Y. und Abatangelo, G. (1999) 'Functions of hyaluronan in wound repair', *Wound Repair Regen*, 7(2), 79-89.
- Cohen, J. (1996) 'New role for HIV: a vehicle for moving genes into cells', *Science*, 272(5259), 195.
- Cohen, M., Kam, Z., Addadi, L. und Geiger, B. (2006) 'Dynamic study of the transition from hyaluronan- to integrin-mediated adhesion in chondrocytes', *EMBO J*, 25(2), 302-11.
- Conget, P. A. und Minguell, J. J. (1999) 'Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells', *J Cell Physiol*, 181(1), 67-73.
- Davis, B. M., Humeau, L., Slepushkin, V., Binder, G., Korshalla, L., Ni, Y., Ogunjimi, E. O., Chang, L. F., Lu, X. und Dropulic, B. (2004) 'ABC transporter inhibitors

- that are substrates enhance lentiviral vector transduction into primitive hematopoietic progenitor cells', *Blood*, 104(2), 364-73.
- DeAngelis, P. L., Papaconstantinou, J. und Weigel, P. H. (1993) 'Molecular cloning, identification, and sequence of the hyaluronan synthase gene from group A Streptococcus pyogenes', *J Biol Chem*, 268(26), 19181-4.
- DeAngelis, P. L. und Weigel, P. H. (1994) 'Immunochemical confirmation of the primary structure of streptococcal hyaluronan synthase and synthesis of high molecular weight product by the recombinant enzyme', *Biochemistry*, 33(31), 9033-9.
- Delorme, B., Chateauvieux, S. und Charbord, P. (2006) 'The concept of mesenchymal stem cells', *Regen Med*, 1(4), 497-509.
- Deng, W., Han, Q., Liao, L., Li, C., Ge, W., Zhao, Z., You, S., Deng, H., Murad, F. und Zhao, R. C. (2005) 'Engrafted bone marrow-derived flk-(1+) mesenchymal stem cells regenerate skin tissue', *Tissue Eng*, 11(1-2), 110-9.
- Docheva, D., Popov, C., Mutschler, W. und Schieker, M. (2007) 'Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system', *J Cell Mol Med*, 11(1), 21-38.
- Dougall, W. C., Glaccum, M., Charrier, K., Rohrbach, K., Brasel, K., De Smedt, T., Daro, E., Smith, J., Tometsko, M. E., Maliszewski, C. R., Armstrong, A., Shen, V., Bain, S., Cosman, D., Anderson, D., Morrissey, P. J., Peschon, J. J. und Schuh, J. (1999) 'RANK is essential for osteoclast and lymph node development', *Genes Dev*, 13(18), 2412-24.
- Evanko, S. P., Angello, J. C. und Wight, T. N. (1999) 'Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19(4), 1004-13.
- Evanko, S. P. und Wight, T. N. (1999) 'Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells', *J Histochem Cytochem*, 47(10), 1331-42.
- Evans, C. H. (2012) 'Gene delivery to bone', *Adv Drug Deliv Rev*, 64(12), 1331-40.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G. und Mavilio, F. (1998) 'Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors', *Science*, 279(5356), 1528-30.
- Fraser, J. R., Laurent, T. C. und Laurent, U. B. (1997) 'Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover', *J Intern Med*, 242(1), 27-33.
- Friedenstein, A. J., Piatetzky, S., Il und Petrakova, K. V. (1966) 'Osteogenesis in transplants of bone marrow cells', *J Embryol Exp Morphol*, 16(3), 381-90.
- Fujii, Y., Fujii, K., Nakano, K. und Tanaka, Y. (2003) 'Crosslinking of CD44 on human osteoblastic cells upregulates ICAM-1 and VCAM-1', *FEBS Lett*, 539(1-3), 45-50.

- Gafni, Y., Turgeman, G., Liebergal, M., Pelled, G., Gazit, Z. und Gazit, D. (2004) 'Stem cells as vehicles for orthopedic gene therapy', *Gene Ther*, 11(4), 417-26.
- Gamradt, S. C. und Lieberman, J. R. (2004) 'Genetic modification of stem cells to enhance bone repair', *Ann Biomed Eng*, 32(1), 136-47.
- Gao, X., Kim, K. S. und Liu, D. (2007) 'Nonviral gene delivery: what we know and what is next', *AAPS J*, 9(1), E92-104.
- Gazit, D., Turgeman, G., Kelley, P., Wang, E., Jalenak, M., Zilberman, Y. und Moutsatsos, I. (1999) 'Engineered pluripotent mesenchymal cells integrate and differentiate in regenerating bone: a novel cell-mediated gene therapy', *J Gene Med*, 1(2), 121-33.
- Ghazi, K., Deng-Pichon, U., Warnet, J. M. und Rat, P. (2012) 'Hyaluronan fragments improve wound healing on in vitro cutaneous model through P2X7 purinoreceptor basal activation: role of molecular weight', *PLoS One*, 7(11), e48351.
- Goentzel, B. J., Weigel, P. H. und Steinberg, R. A. (2006) 'Recombinant human hyaluronan synthase 3 is phosphorylated in mammalian cells', *Biochem J*, 396(2), 347-54.
- Gutierrez, R., Lindeboom, J. J., Paredes, A. R., Emons, A. M. und Ehrhardt, D. W. (2009) 'Arabidopsis cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane and interact with cellulose synthase trafficking compartments', *Nat Cell Biol*, 11(7), 797-806.
- Hagenaars, C. E., van der Kraan, A. A., Kawilarang-de Haas, E. W., Visser, J. W. und Nijweide, P. J. (1989) 'Osteoclast formation from cloned pluripotent hemopoietic stem cells', *Bone Miner*, 6(2), 179-89.
- Harada, S. und Rodan, G. A. (2003) 'Control of osteoblast function and regulation of bone mass', *Nature*, 423(6937), 349-55.
- Heyde, M., Partridge, K. A., Oreffo, R. O., Howdle, S. M., Shakesheff, K. M. und Garnett, M. C. (2007) 'Gene therapy used for tissue engineering applications', *J Pharm Pharmacol*, 59(3), 329-50.
- Hiscock, D. R., Caterson, B. und Flannery, C. R. (2000) 'Expression of hyaluronan synthases in articular cartilage', *Osteoarthritis Cartilage*, 8(2), 120-6.
- Huang, L., Cheng, Y. Y., Koo, P. L., Lee, K. M., Qin, L., Cheng, J. C. und Kumta, S. M. (2003) 'The effect of hyaluronan on osteoblast proliferation and differentiation in rat calvarial-derived cell cultures', *J Biomed Mater Res A*, 66(4), 880-4.

- Ishida, O., Tanaka, Y., Morimoto, I., Takigawa, M. und Eto, S. (1997) 'Chondrocytes are regulated by cellular adhesion through CD44 and hyaluronic acid pathway', *J Bone Miner Res*, 12(10), 1657-63.
- Itano, N., Atsumi, F., Sawai, T., Yamada, Y., Miyaishi, O., Senga, T., Hamaguchi, M. und Kimata, K. (2002) 'Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(6), 3609-14.
- Itano, N., Sawai, T., Yoshida, M., Lenas, P., Yamada, Y., Imagawa, M., Shinomura, T., Hamaguchi, M., Yoshida, Y., Ohnuki, Y., Miyauchi, S., Spicer, A. P., McDonald, J. A. und Kimata, K. (1999) 'Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties', *J Biol Chem*, 274(35), 25085-92.
- Itoh, S., Matubara, M., Kawauchi, T., Nakamura, H., Yukitake, S., Ichinose, S. und Shinomiya, K. (2001) 'Enhancement of bone ingrowth in a titanium fiber mesh implant by rhBMP-2 and hyaluronic acid', *J Mater Sci Mater Med*, 12(7), 575-81.
- Jang, Y., Soekmadji, C., Mitchell, J. M., Thomas, W. G. und Thorn, P. (2012) 'Real-time measurement of F-actin remodelling during exocytosis using Lifeact-EGFP transgenic animals', *PLoS One*, 7(7), e39815.
- Jiang, D., Liang, J., Fan, J., Yu, S., Chen, S., Luo, Y., Prestwich, G. D., Mascarenhas, M. M., Garg, H. G., Quinn, D. A., Homer, R. J., Goldstein, D. R., Bucala, R., Lee, P. J., Medzhitov, R. und Noble, P. W. (2005) 'Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan', *Nat Med*, 11(11), 1173-9.
- Jung, E. M., Kwon, O., Kwon, K. S., Cho, Y. S., Rhee, S. K., Min, J. K. und Oh, D. B. (2011) 'Evidences for correlation between the reduced VCAM-1 expression and hyaluronan synthesis during cellular senescence of human mesenchymal stem cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 404(1), 463-9.
- Kadivar, M., Khatami, S., Mortazavi, Y., Shokrgozar, M. A., Taghikhani, M. und Soleimani, M. (2006) 'In vitro cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 340(2), 639-47.
- Kang, X. Q., Zang, W. J., Bao, L. J., Li, D. L., Song, T. S., Xu, X. L. und Yu, X. J. (2005) 'Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes', *World J Gastroenterol*, 11(47), 7461-5.
- Karousou, E., Kamiryo, M., Skandalis, S. S., Ruusala, A., Asteriou, T., Passi, A., Yamashita, H., Hellman, U., Heldin, C. H. und Heldin, P. (2010) 'The activity of hyaluronan synthase 2 is regulated by dimerization and ubiquitination', *J Biol Chem*, 285(31), 23647-54.

- Karvinen, S., Pasonen-Seppanen, S., Hyttinen, J. M., Pienimaki, J. P., Torronen, K., Jokela, T. A., Tammi, M. I. und Tammi, R. (2003) 'Keratinocyte growth factor stimulates migration and hyaluronan synthesis in the epidermis by activation of keratinocyte hyaluronan synthases 2 and 3', *J Biol Chem*, 278(49), 49495-504.
- Kim, E. Y., Hong, Y. B., Lai, Z., Cho, Y. H., Brady, R. O. und Jung, S. C. (2005) 'Long-term expression of the human glucocerebrosidase gene in vivo after transplantation of bone-marrow-derived cells transformed with a lentivirus vector', *J Gene Med*, 7(7), 878-87.
- Knudson, W., Aguiar, D. J., Hua, Q. und Knudson, C. B. (1996) 'CD44-anchored hyaluronan-rich pericellular matrices: an ultrastructural and biochemical analysis', *Exp Cell Res*, 228(2), 216-28.
- Kofron, M. D. und Laurencin, C. T. (2006) 'Bone tissue engineering by gene delivery', *Adv Drug Deliv Rev*, 58(4), 555-76.
- Kon, E., Muraglia, A., Corsi, A., Bianco, P., Marcacci, M., Martin, I., Boyde, A., Ruspantini, I., Chistolini, P., Rocca, M., Giardino, R., Cancedda, R. und Quarto, R. (2000) 'Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones', *J Biomed Mater Res*, 49(3), 328-37.
- Kopen, G. C., Prockop, D. J. und Phinney, D. G. (1999) 'Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(19), 10711-6.
- Kultti, A., Rilla, K., Tiihonen, R., Spicer, A. P., Tammi, R. H. und Tammi, M. I. (2006) 'Hyaluronan synthesis induces microvillus-like cell surface protrusions', *J Biol Chem*, 281(23), 15821-8.
- Laufs, S., Blau, N. und Thony, B. (1998) 'Retrovirus-mediated double transduction of the GTPCH and PTPS genes allows 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase-deficient human fibroblasts to synthesize and release tetrahydrobiopterin', *J Neurochem*, 71(1), 33-40.
- Lerner, U. H. (2006) 'Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis', *J Dent Res*, 85(7), 584-95.
- Li, Y., Toole, B. P., Dealy, C. N. und Kosher, R. A. (2007) 'Hyaluronan in limb morphogenesis', *Dev Biol*, 305(2), 411-20.
- Lippincott-Schwartz, J. und Patterson, G. H. (2003) 'Development and use of fluorescent protein markers in living cells', *Science*, 300(5616), 87-91.
- Liu, N., Gao, F., Han, Z., Xu, X., Underhill, C. B. und Zhang, L. (2001) 'Hyaluronan synthase 3 overexpression promotes the growth of TSU prostate cancer cells', *Cancer Res*, 61(13), 5207-14.

- Lutolf, M. P., Gilbert, P. M. und Blau, H. M. (2009) 'Designing materials to direct stem-cell fate', *Nature*, 462(7272), 433-41.
- Margolin, W. (2000) 'Green fluorescent protein as a reporter for macromolecular localization in bacterial cells', *Methods*, 20(1), 62-72.
- Mathieu, L. M., Mueller, T. L., Bourban, P. E., Pioletti, D. P., Muller, R. und Manson, J. A. (2006) 'Architecture and properties of anisotropic polymer composite scaffolds for bone tissue engineering', *Biomaterials*, 27(6), 905-16.
- McKee, C. M., Penno, M. B., Cowman, M., Burdick, M. D., Strieter, R. M., Bao, C. und Noble, P. W. (1996) 'Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44', *J Clin Invest*, 98(10), 2403-13.
- Meinel, L., Hofmann, S., Betz, O., Fajardo, R., Merkle, H. P., Langer, R., Evans, C. H., Vunjak-Novakovic, G. und Kaplan, D. L. (2006) 'Osteogenesis by human mesenchymal stem cells cultured on silk biomaterials: comparison of adenovirus mediated gene transfer and protein delivery of BMP-2', *Biomaterials*, 27(28), 4993-5002.
- Moffatt, P., Lee, E. R., St-Jacques, B., Matsumoto, K., Yamaguchi, Y. und Roughley, P. J. (2011) 'Hyaluronan production by means of Has2 gene expression in chondrocytes is essential for long bone development', *Dev Dyn*, 240(2), 404-12.
- Müllegger, J., Rustom, A., Kreil, G., Gerdes, H. H. und Lepperdinger, G. (2003) 'Piggy-back' transport of *Xenopus* hyaluronan synthase (XHAS1) via the secretory pathway to the plasma membrane', *Biol Chem*, 384(1), 175-82.
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R. und de Crombrugghe, B. (2002) 'The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation', *Cell*, 108(1), 17-29.
- Niedzwiedzki, T., Dabrowski, Z., Miszta, H. und Pawlikowski, M. (1993) 'Bone healing after bone marrow stromal cell transplantation to the bone defect', *Biomaterials*, 14(2), 115-21.
- Nishida, Y., Knudson, W., Knudson, C. B. und Ishiguro, N. (2005) 'Antisense inhibition of hyaluronan synthase-2 in human osteosarcoma cells inhibits hyaluronan retention and tumorigenicity', *Exp Cell Res*, 307(1), 194-203.
- Oligino, T. J., Yao, Q., Ghivizzani, S. C. und Robbins, P. (2000) 'Vector systems for gene transfer to joints', *Clin Orthop Relat Res*, (379 Suppl), S17-30.
- Ong, S. Y., Dai, H. und Leong, K. W. (2006) 'Hepatic differentiation potential of commercially available human mesenchymal stem cells', *Tissue Eng*, 12(12), 3477-85.

- Oohira, A., und Nogami, H. (1989) 'Elevated accumulation of hyaluronate in the tubular bones of osteogenesis imperfecta', *Bone*, 10(6), 409-13.
- Otto, F., Thornell, A. P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K. C., Rosewell, I. R., Stamp, G. W., Beddington, R. S., Mundlos, S., Olsen, B. R., Selby, P. B. und Owen, M. J. (1997) 'Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development', *Cell*, 89(5), 765-71.
- Palmer, E. und Freeman, T. (2004) 'Investigation into the use of C- and N-terminal GFP fusion proteins for subcellular localization studies using reverse transfection microarrays', *Comp Funct Genomics*, 5(4), 342-53.
- Palmqvist, P., Persson, E., Conaway, H. H. und Lerner, U. H. (2002) 'IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF- κ B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF- κ B in mouse calvariae', *J Immunol*, 169(6), 3353-62.
- Panetta, N. J., Gupta, D. M., Quarto, N. und Longaker, M. T. (2009) 'Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering', *Panminerva Med*, 51(1), 25-41.
- Phillips, J. E., Gersbach, C. A. und Garcia, A. J. (2007) 'Virus-based gene therapy strategies for bone regeneration', *Biomaterials*, 28(2), 211-29.
- Pienimäki, J. P., Rilla, K., Fulop, C., Sironen, R. K., Karvinen, S., Pasonen, S., Lammi, M. J., Tammi, R., Hascall, V. C. und Tammi, M. I. (2001) 'Epidermal growth factor activates hyaluronan synthase 2 in epidermal keratinocytes and increases pericellular and intracellular hyaluronan', *J Biol Chem*, 276(23), 20428-35.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. und Marshak, D. R. (1999) 'Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells', *Science*, 284(5411), 143-7.
- Pivetta, E., Scapolan, M., Wassermann, B., Steffan, A., Colombatti, A. und Spessotto, P. (2011) 'Blood-derived human osteoclast resorption activity is impaired by Hyaluronan-CD44 engagement via a p38-dependent mechanism', *J Cell Physiol*, 226(3), 769-79.
- Ponte, A. L., Marais, E., Gallay, N., Langonne, A., Delorme, B., Herault, O., Charbord, P. und Domenech, J. (2007) 'The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities', *Stem Cells*, 25(7), 1737-45.
- Prehm, P. (1984) 'Hyaluronate is synthesized at plasma membranes', *Biochem J*, 220(2), 597-600.
- Prince, C. W. (2004) 'Roles of hyaluronan in bone resorption', *BMC Musculoskelet Disord*, 5, 12.

- Prockop, D. J. (1997) 'Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues', *Science*, 276(5309), 71-4.
- Qu, C., Rilla, K., Tammi, R., Tammi, M., Kroger, H. und Lammi, M. J. (2014) 'Extensive CD44-dependent hyaluronan coats on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells produced by hyaluronan synthases HAS1, HAS2 and HAS3', *Int J Biochem Cell Biol*, 48, 45-54.
- Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutepov, S. M., Mukhachev, V., Lavroukov, A., Kon, E. und Marcacci, M. (2001) 'Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells', *N Engl J Med*, 344(5), 385-6.
- Raines, A. L., Sunwoo, M., Gertzman, A. A., Thacker, K., Guldberg, R. E., Schwartz, Z. und Boyan, B. D. (2011) 'Hyaluronic acid stimulates neovascularization during the regeneration of bone marrow after ablation', *J Biomed Mater Res A*, 96(3), 575-83.
- Recklies, A. D., White, C., Melching, L. und Roughley, P. J. (2001) 'Differential regulation and expression of hyaluronan synthases in human articular chondrocytes, synovial cells and osteosarcoma cells', *Biochem J*, 354(Pt 1), 17-24.
- Richmond, T. A. und Somerville, C. R. (2000) 'The cellulose synthase superfamily', *Plant Physiol*, 124(2), 495-8.
- Riedl, J. (2011) Development and Characterization of Lifeact - a versatile marker for the visualization of F-actin. [Dissertation] Ludwig-Maximilians-Universität München: Fakultät für Biologie.
- Riedl, J., Crevenna, A. H., Kessenbrock, K., Yu, J. H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T. A., Werb, Z., Sixt, M. und Wedlich-Soldner, R. (2008) 'Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin', *Nat Methods*, 5(7), 605-7.
- Rilla, K., Siiskonen, H., Spicer, A. P., Hyttinen, J. M., Tammi, M. I. und Tammi, R. H. (2005) 'Plasma membrane residence of hyaluronan synthase is coupled to its enzymatic activity', *J Biol Chem*, 280(36), 31890-7.
- Roe, T., Reynolds, T. C., Yu, G. und Brown, P. O. (1993) 'Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis', *EMBO J*, 12(5), 2099-108.
- Rogers, J. J., Young, H. E., Adkison, L. R., Lucas, P. A. und Black, A. C., Jr. (1995) 'Differentiation factors induce expression of muscle, fat, cartilage, and bone in a clone of mouse pluripotent mesenchymal stem cells', *Am Surg*, 61(3), 231-6.
- Salbach, J., Rachner, T. D., Rauner, M., Hempel, U., Anderegg, U., Franz, S., Simon, J. C. und Hofbauer, L. C. (2012) 'Regenerative potential of glycosaminoglycans for skin and bone', *J Mol Med (Berl)*, 90(6), 625-35.

- Savani, R. C., Cao, G., Pooler, P. M., Zaman, A., Zhou, Z. und DeLisser, H. M. (2001) 'Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis', *J Biol Chem*, 276(39), 36770-8.
- Sayo, T., Sugiyama, Y., Takahashi, Y., Ozawa, N., Sakai, S., Ishikawa, O., Tamura, M. und Inoue, S. (2002) 'Hyaluronan synthase 3 regulates hyaluronan synthesis in cultured human keratinocytes', *J Invest Dermatol*, 118(1), 43-8.
- Schnell, U., Dijk, F., Sjollema, K. A. und Giepmans, B. N. (2012) 'Immunolabeling artifacts and the need for live-cell imaging', *Nat Methods*, 9(2), 152-8.
- Schulz, T., Schumacher, U. und Prehm, P. (2007) 'Hyaluronan export by the ABC transporter MRP5 and its modulation by intracellular cGMP', *J Biol Chem*, 282(29), 20999-1004.
- Shapiro, F. (2008) 'Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts', *Eur Cell Mater*, 15, 53-76.
- Shimabukuro, Y., Ueda, M., Ichikawa, T., Terashi, Y., Yamada, S., Kusumoto, Y., Takedachi, M., Terakura, M., Kohya, A., Hashikawa, T. und Murakami, S. (2005) 'Fibroblast growth factor-2 stimulates hyaluronan production by human dental pulp cells', *J Endod*, 31(11), 805-8.
- Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Luthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H. L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T. M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R. und Boyle, W. J. (1997) 'Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density', *Cell*, 89(2), 309-19.
- Sims, N. A. und Gooi, J. H. (2008) 'Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption', *Semin Cell Dev Biol*, 19(5), 444-51.
- Singer, N. G. und Caplan, A. I. (2011) 'Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation', *Annu Rev Pathol*, 6, 457-78.
- Spessotto, P., Rossi, F. M., Degan, M., Di Francia, R., Perris, R., Colombatti, A. und Gattei, V. (2002) 'Hyaluronan-CD44 interaction hampers migration of osteoclast-like cells by down-regulating MMP-9', *J Cell Biol*, 158(6), 1133-44.
- Stancíková, M., Svik, K., Istok, R., Rovensky, J. und Velebny, V. (2004) 'The effects of hyaluronan on bone resorption and bone mineral density in a rat model of estrogen deficiency-induced osteopenia', *Int J Tissue React*, 26(1-2), 9-16.
- Sterling, H., Saginario, C. und Vignery, A. (1998) 'CD44 occupancy prevents macrophage multinucleation', *J Cell Biol*, 143(3), 837-47.

- Stern, R. (2003) 'Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet?', *Glycobiology*, 13(12), 105R-115R.
- Suzuki, M., Asplund, T., Yamashita, H., Heldin, C. H. und Heldin, P. (1995) 'Stimulation of hyaluronan biosynthesis by platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor-beta 1 involves activation of protein kinase C', *Biochem J*, 307 (Pt 3), 817-21.
- Takada, Y., Sakiyama, H., Kuriwa, K., Masuda, R., Inoue, N., Nakagawa, K., Itano, N., Saito, T., Yamada, T. und Kimata, K. (1999) 'Metabolic activities of partially degenerated hypertrophic chondrocytes: gene expression of hyaluronan synthases', *Cell Tissue Res*, 298(2), 317-25.
- Tammi, R., MacCallum, D., Hascall, V. C., Pienimaki, J. P., Hyttinen, M. und Tammi, M. (1998) 'Hyaluronan bound to CD44 on keratinocytes is displaced by hyaluronan decasaccharides and not hexasaccharides', *J Biol Chem*, 273(44), 28878-88.
- Temple, S. (2001) 'The development of neural stem cells', *Nature*, 414(6859), 112-7.
- Thomas, N. K. und Brown, T. J. (2010) 'ABC transporters do not contribute to extracellular translocation of hyaluronan in human breast cancer in vitro', *Exp Cell Res*, 316(7), 1241-53.
- Tlapak-Simmons, V. L., Baron, C. A., Gotschall, R., Haque, D., Canfield, W. M. und Weigel, P. H. (2005) 'Hyaluronan biosynthesis by class I streptococcal hyaluronan synthases occurs at the reducing end', *J Biol Chem*, 280(13), 13012-8.
- Tolg, C., Telmer, P. und Turley, E. (2014) 'Specific sizes of hyaluronan oligosaccharides stimulate fibroblast migration and excisional wound repair', *PLoS One*, 9(2), e88479.
- Toole, B. P. (2001) 'Hyaluronan in morphogenesis', *Semin Cell Dev Biol*, 12(2), 79-87.
- Toole, B. P. (2004) 'Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue', *Nat Rev Cancer*, 4(7), 528-39.
- Toole, B. P. und Hascall, V. C. (2002) 'Hyaluronan and tumor growth', *Am J Pathol*, 161(3), 745-7.
- Tsien, R. Y. (1998) 'The green fluorescent protein', *Annu Rev Biochem*, 67, 509-44.
- Tu, C. X., Zhang, R. X., Zhang, X. J. und Huang, T. (2009) 'Exogenous N-acetylglucosamine increases hyaluronan production in cultured human dermal fibroblasts', *Arch Dermatol Res*, 301(7), 549-51.
- Unterman, S. A., Gibson, M., Lee, J. H., Crist, J., Chansakul, T., Yang, E. C. und Elisseeff, J. H. (2012) 'Hyaluronic acid-binding scaffold for articular cartilage repair', *Tissue Eng Part A*, 18(23-24), 2497-506.

- Usui, T., Amano, S., Oshika, T., Suzuki, K., Miyata, K., Araie, M., Heldin, P. und Yamashita, H. (2000) 'Expression regulation of hyaluronan synthase in corneal endothelial cells', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(11), 3261-7.
- Van Damme, A., Thorrez, L., Ma, L., Vandenberghe, H., Eyckmans, J., Dell'Accio, F., De Bari, C., Luyten, F., Lillicrap, D., Collen, D., VandenDriessche, T. und Chuah, M. K. (2006) 'Efficient lentiviral transduction and improved engraftment of human bone marrow mesenchymal cells', *Stem Cells*, 24(4), 896-907.
- Wakitani, S., Goto, T., Pineda, S. J., Young, R. G., Mansour, J. M., Caplan, A. I. und Goldberg, V. M. (1994) 'Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage', *J Bone Joint Surg Am*, 76(4), 579-92.
- Watanabe, K. und Yamaguchi, Y. (1996) 'Molecular identification of a putative human hyaluronan synthase', *J Biol Chem*, 271(38), 22945-8.
- Weigel, P. H. und DeAngelis, P. L. (2007) 'Hyaluronan synthases: a decade-plus of novel glycosyltransferases', *J Biol Chem*, 282(51), 36777-81.
- Weigel, P. H., Hascall, V. C. und Tammi, M. (1997) 'Hyaluronan synthases', *J Biol Chem*, 272(22), 13997-4000.
- Weiss, I. M., Schönitzer, V., Eichner, N. und Sumper, M. (2006) 'The chitin synthase involved in marine bivalve mollusk shell formation contains a myosin domain', *FEBS Lett*, 580(7), 1846-52.
- Wiktor-Jedrzejczak, W., Bartocci, A., Ferrante, A. W., Jr., Ahmed-Ansari, A., Sell, K. W., Pollard, J. W. und Stanley, E. R. (1990) 'Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrosis (op/op) mouse', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(12), 4828-32.
- Wilson, J. M. (2004) 'Adeno-associated virus and lentivirus pseudotypes for lung-directed gene therapy', *Proc Am Thorac Soc*, 1(4), 309-14.
- Xia, Z., Ye, H., Locklin, R. M., Ferguson, D. J., Cui, Z. und Triffitt, J. T. (2005) 'Efficient characterisation of human cell-bioceramic interactions in vitro and in vivo by using enhanced GFP-labelled mesenchymal stem cells', *Biomaterials*, 26(29), 5790-800.
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N. und Suda, T. (1998) 'Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(7), 3597-602.
- Yoshida, H., Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., Shultz, L. D. und Nishikawa, S. (1990) 'The murine mutation

osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene', *Nature*, 345(6274), 442-4.

Young, R. G., Butler, D. L., Weber, W., Caplan, A. I., Gordon, S. L. und Fink, D. J. (1998) 'Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair', *J Orthop Res*, 16(4), 406-13.

Zhang, G., Gurtu, V. und Kain, S. R. (1996) 'An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 227(3), 707-11.

Zhang, X. Y., La Russa, V. F., Bao, L., Kolls, J., Schwarzenberger, P. und Reiser, J. (2002) 'Lentiviral vectors for sustained transgene expression in human bone marrow-derived stromal cells', *Mol Ther*, 5(5 Pt 1), 555-65.

Zimmerman, E., Geiger, B. und Addadi, L. (2002) 'Initial stages of cell-matrix adhesion can be mediated and modulated by cell-surface hyaluronan', *Biophys J*, 82(4), 1848-57.

Zou, L., Zou, X., Chen, L., Li, H., Mygind, T., Kassem, M. und Bunger, C. (2008) 'Effect of hyaluronan on osteogenic differentiation of porcine bone marrow stromal cells in vitro', *J Orthop Res*, 26(5), 713-20.

7. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| 293FT-Zellen | humane embryonale Nierenzellen (genetisch modifiziert) |
| bHABC | biotinyliertes Hyaluronanbindeprotein (engl.: biotinylated hyaluronan binding complex) |
| Bla | Blasticidin |
| BMP-2 | bone morphogenic protein 2, Knochenwachstumsfaktor |
| bp | Basenpaar, DNA-Einheit |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| CD44 | cluster of differentiation 44, Oberflächenrezeptor |
| cDNA | komplementäre DNA (engl.: complementary DNA) |
| CIP-Enzym | calf intestine phosphatase-Enzym |
| CMV-Promotor | Cytomegalie-Virus-Promotor |
| Da | Dalton, Einheit der molekularen Masse |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol, Fluoreszenzfarbstoff für DNA |
| D-MEM | Dulbecco´s Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | Desoxynukleotid-Triphosphat |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| eGFP | verbessertes grün fluoreszierendes Protein (engl.: enhanced green fluorescent protein) |
| ELISA | enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (engl.: enzyme linked immunosorbent assay) |
| FACS | fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (engl.: fluorescent activated cell sorting) |
| FBS | Fetales Rinderserum (engl.: fetal bovine serum) |
| FGF-2 | Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (engl.: fibroblast growth factor) |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein |
| GT2-Familie | Glycosyltransferase 2-Familie |
| HA | Hyaluronan |

| | |
|----------------|---|
| HAS | Hyaluronansynthase |
| HIV-1 | Humanes Immundefizienz-Virus Typ 1 |
| hMSC(s) | humane mesenchymale Stammzelle(n) (engl.: human mesenchymal stem cell(s)) |
| hTERT | humane Telomerase-Reverse Transkriptase |
| ICAM-1 | Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (engl.: intracellular adhesion molecule 1) |
| IGF | Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (engl.: insulin like growth factor) |
| IL-1 β | Interleukin 1 β |
| Kb(p) | Kilobasen(paare) = 1000 bp, DNA- <i>Einheit</i> |
| kDa | Kilodalton, Einheit der molekularen Masse |
| KGF | Keratinozyten-Wachstumsfaktor (engl.: keratinocyte growth factor) |
| lacZ-Gen | β -Galaktosidase-Gen |
| LB-Medium | Bakterien-Nährmedium, (engl.: lysogeny broth) |
| LTR-Sequenzen | Gensequenz von Retroviren (engl.: long terminal repeats) |
| M-CSF | Monozytenkolonien-stimulierender Faktor (engl.: macrophage colony stimulating factor) |
| mRFP | Monomeres rot fluoreszierendes Protein (engl.: monomer red fluorescent protein) |
| mRNA | Boten-RNA (engl.: messenger RNA) |
| N ₂ | Stickstoff |
| OD | Optische Dichte |
| OPG | Osteoprotegerin |
| PBS | Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction) |
| RANKL | engl.: receptor activator of nuclear factor κ B ligand |
| RHAMM | engl.: receptor for hyaluronan mediated motility |
| rhBMP-2 | rekombinantes humanes BMP-2 (bone morphogenic protein) |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute) |
| RSV-Promotor | Rous-Sarkom-Virus-Promotor |

| | |
|-------------|---|
| RT-PCR | Reverse Transkriptase-PCR |
| SCP1-Zellen | Immortalisierte hMSCs (engl.: single cell picked clone 1) |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamidgelektrophorese |
| SOC-Medium | Bakterienkultur-Medium (engl.: super optimal broth medium) |
| ssRNA | Einzelstrang-RNA (engl.: single-stranded RNA) |
| TGF-β | Transformierender Wachstumsfaktor β (engl.: transforming growth factor) |
| U | Units (Enzymeinheit) |
| Zeo | Zeocin |
| α- MEM | alpha minimum essential medium |

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke insbesondere meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Böcker für die Vergabe dieses interessanten Themas. Mit seinen wertvollen Ratschlägen und seiner fachlichen Unterstützung hat er die Entstehung und Entwicklung dieser Arbeit ermöglicht.

Ganz besonders herzlich bedanke ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Veronika Schönitzer, die mich stets hervorragend betreut hat. Sie hat mich fachlich und menschlich während der gesamten Arbeiten an diesem Projekt tatkräftig unterstützt. Ihre Anregungen, Tipps und Diskussionsbereitschaft waren mir eine entscheidende Hilfe.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Matthias Schieker, Leiter des ExperiMed Labors, bedanke ich mich für das Zur-Verfügung-Stellen der technischen Ausstattung sowie für die freundliche Bereitschaft, mich mit Rat und Anregungen zu unterstützen. Herrn PD Dr. Attila Aszodi danke ich für das großzügige Überlassen des Plasmids pBK-CMV-Lifeact-mRFPruby. Außerdem möchte ich dem gesamten ExperiMed-Team meinen Dank aussprechen. Die besondere Hilfsbereitschaft hat mir den Einstieg in die wissenschaftliche Arbeit sehr erleichtert und die kollegiale und offene Art hat immer eine positive Arbeitsatmosphäre geschaffen.

Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Koszinowski und Herrn Priv. Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Haas (Max-von-Pettenkofer-Institut, Abteilung Virologie) danke ich für die Bereitstellung des S2-Arbeitsplatzes für die virologischen Arbeiten und ich danke Frau Dr. rer. nat. Veronika Schönitzer sehr für deren Durchführung.

Abschließend möchte ich ganz besonders meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung danken.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung der putativen Interaktion der Hyaluronansynthase mit dem Aktinzytoskelett in humanen mesenchymalen Stammzellen“ selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Eva Hofbauer

München, den 11.06.2015