

Aus der
Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und Rehabilitation
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson



**Quantitative und qualitative Beurteilung verschiedener
RNA - Extraktionskits an normalen und arthrotischen humanen
Chondrozyten**

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

vorgelegt von
Alexander Bürger

aus
Dessau

Jahr
2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Müller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Vigo Heissmeyer
Prof. Dr. Alexander Faußner
Prof. Dr. Matthias Schieker

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Roland Klar

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1. Einführung.....	6
1.1. Epidemiologie	6
1.2. Ätiologie	8
1.2.1. Risikofaktoren.....	8
1.3. Pathophysiologie des Knorpels	13
1.3.1. Bestandteile des Knorpels	13
1.3.2. Histologischer Aufbau des Gelenkknorpels.....	15
1.3.3. Histopathologie	17
1.4. Behandlung von Knorpeldefekten	20
1.5. Ursachenbekämpfung von Knorpeldefekten.....	21
1.6. Ziel dieser Arbeit	22
2. Material und Methoden.....	23
2.1. Material	23
2.1.1. Chemikalien	23
2.1.2. Kommerzielle Kits	24
2.1.3. Instrumente.....	24
2.2. Zellkultur	25
2.2.1. Humane (normale und arthrotische) Chondrozyten.....	25
2.2.2. Kultivierung der Zellen per Vollmedium – Chondrozytenmedium	25
2.2.3. Aussaat der Chondrozyten aus Passage 0	25
2.2.4. Trypsinierung der Monolayerzellkultur	26
2.2.5. Zellzahlbestimmung mittels der Vitalfärbung Trypanblau	26
2.2.6. Separation der Zellen in Zellkultur-Multischalen.....	27
2.2.7. Finale Zellernte und Vorbereitung zur späteren RNA-Isolation	28
2.3. RNA-Extraktion aus humanen Chondrozyten.....	30

2.3.1. Auftauen der Zelllysate	30
2.3.2. Methode 1 - Trizol-Methode	30
2.3.3. Methode 2 - innuPREP RNA Mini Kit	31
2.3.4. Methode 3 - Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit	33
2.3.5. Methode 4 - RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit	35
2.4. RNA-Quantifizierung (Photometrisch)	37
2.5. RNA Qualitätsanalyse mittels Chip Elektrophorese	38
2.5.1. Prinzip der Lab-on-Chip-Technologie.....	38
2.5.2. Bestimmung der RNA – Integrität	39
2.6. Statistische Analyse	41
3. Ergebnisse	42
3.1. Methode 1 - Trizol-Methode	42
3.2. Methode 2 - innuPREP RNA Mini Kit	43
3.3. Methode 3 - Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit.....	44
3.4. Methode 4 - RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit	45
3.5. Methoden im Vergleich	46
4. Diskussion.....	50
4.1. Zusammenfassung der Hauptergebnisse.....	50
4.2. Diskussion der Methoden.....	54
4.2.1. Methode 1 - Trizol-Methode	54
4.2.2. Methode 2 - innuPREP RNA Mini Kit	57
4.2.3. Methode 3 - Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit	58
4.2.4. Methode 4 - RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit	59
5. Schlussfolgerung.....	61
6. Literaturverzeichnis	62
7. Abbildungsverzeichnis	66
8. Tabellenverzeichnis	67

9. Anhang	68
9.1. Ergebnisse Bioanalyser - Trizol-Methode (OA)	68
9.2. Ergebnisse Bioanalyser - Trizol-Methode (non OA)	71
9.3. Ergebnisse Bioanalyser – Kit Analytik Jena (OA)	74
9.4. Ergebnisse Bioanalyser – Kit Analytik Jena (non OA)	77
9.5. Ergebnisse Bioanalyser – Kit Bio-Rad (OA)	80
9.6. Ergebnisse Bioanalyser – Kit Bio-Rad (non OA)	83
9.7. Ergebnisse Bioanalyser – Kit Qiagen (OA).....	86
9.8. Ergebnisse Bioanalyser – Kit Qiagen (non OA).....	89
10. Danksagung.....	92
11. Eidesstattliche Versicherung	93

1. Einführung

Klinische Definition der Arthrose

Die Arthrose (syn. Arthrosis deformans, Osteoarthrose, im englischen Sprachraum Osteoarthritis) ist die häufigste degenerative, nicht entzündliche Gelenkerkrankung, die jedes Gelenk betreffen kann. Im langsamen progredienten Verlauf beginnt diese Erkrankung mit einfachen Knorpelläsionen und kann bis zum vollständigen Knorpelverlust führen. Angrenzendes Gelenkgewebe, wie Knochen, Muskeln, Bänder und die Kapseln werden in diesem Prozess meist auch geschädigt [Hackenbroch 1978, Herold 2017, Kirchner 2014, Mobasheri 2017, Rabenberg 2013, Riede 2009].

1.1. Epidemiologie

Arthrose ist prinzipiell eine altersunabhängige Erkrankung, allerdings sind zumeist, mit bis zu 60%, Personen im höherem Alter (> 60 Jahre) mit spontan beginnendem Krankheitsverlauf betroffen [Fuchs 2017, Neogi 2013, Riede 2009].

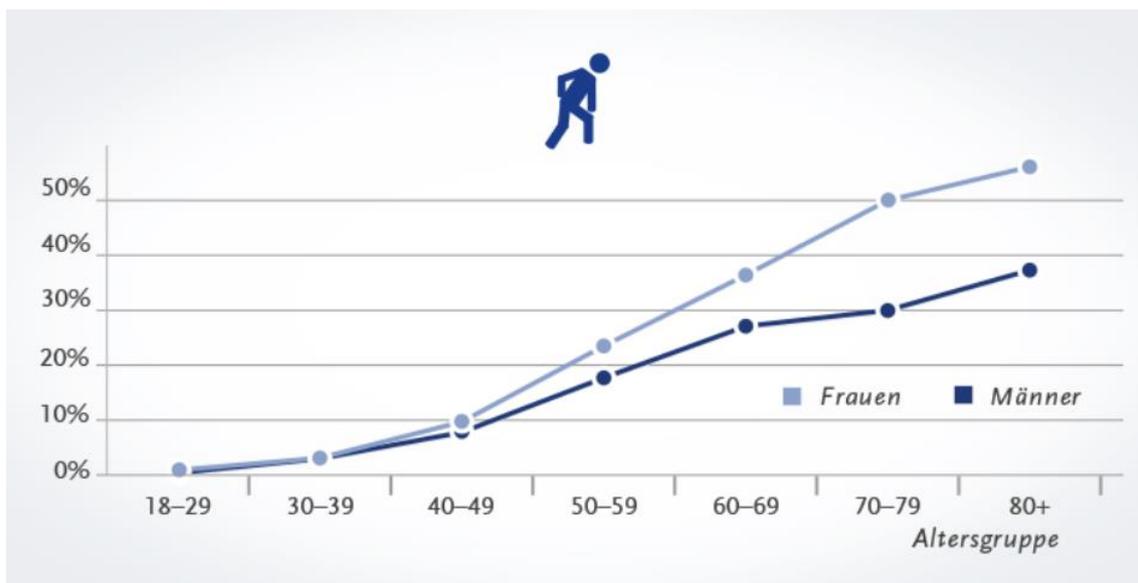


Abbildung 1: Prävalenz von Arthrose in unterschiedlichen Altersgruppen, Quelle: Robert Koch-Institut [2017]

Die Prävalenz in Deutschland, laut der Studie von Gesundheit in Deutschland aktuell 2014/2015- European Health Interview Survey (EHIS), beträgt bereits in der Altersgruppe 18 – 29 Jahre bei den Männern 0,4% und bei Frauen 0,9%. Die

ungleiche Prävalenz, die bereits in jungen Jahren vorkommt, wird mit zunehmenden Alter deutlich signifikanter (**Abbildung 1**). In der ältesten Altersgruppe, ab 65 Jahre, waren 31,1% der Männer und 48,1% der Frauen betroffen. Über alle Altersgruppen ergab diese 12 monatige Studie, dass die Prävalenz an Arthrose zu leiden ab dem 18. Lebensjahr bei Männer bei 13,9% und bei Frauen, deutlich höher, bei 21,8% liegt [Fuchs 2017, Robert Koch-Institut 2017]. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass in der Altersgruppe von 45 – 64 Jahren, ein erhöhtes Auftreten von Arthrose in bildungsärmeren Gesellschaftsschichten beobachtet wurde [Fuchs 2017]. Die am häufigsten betroffenen Gelenke sind das Schultergelenk, die proximalen und distalen Interphalangealgelenke, das Daumengrundgelenk sowie das Hüftgelenk und das Kniegelenk [Scharf 2011]. Weltweit wird die Arthrose bei Männern am häufigsten in der Hüfte (Coxarthrose) und bei Frauen hingegen im Knie (Gonarthrose) lokalisiert [Neogi 2013, Riede 2009]. Allerdings ist der Befall der Knie oder der Hüften in Deutschland relativ geschlechtsunabhängig nur der Fingerbefall ist bei Frauen deutlich erhöht (**Abbildung 2**) [Fuchs J 2013].

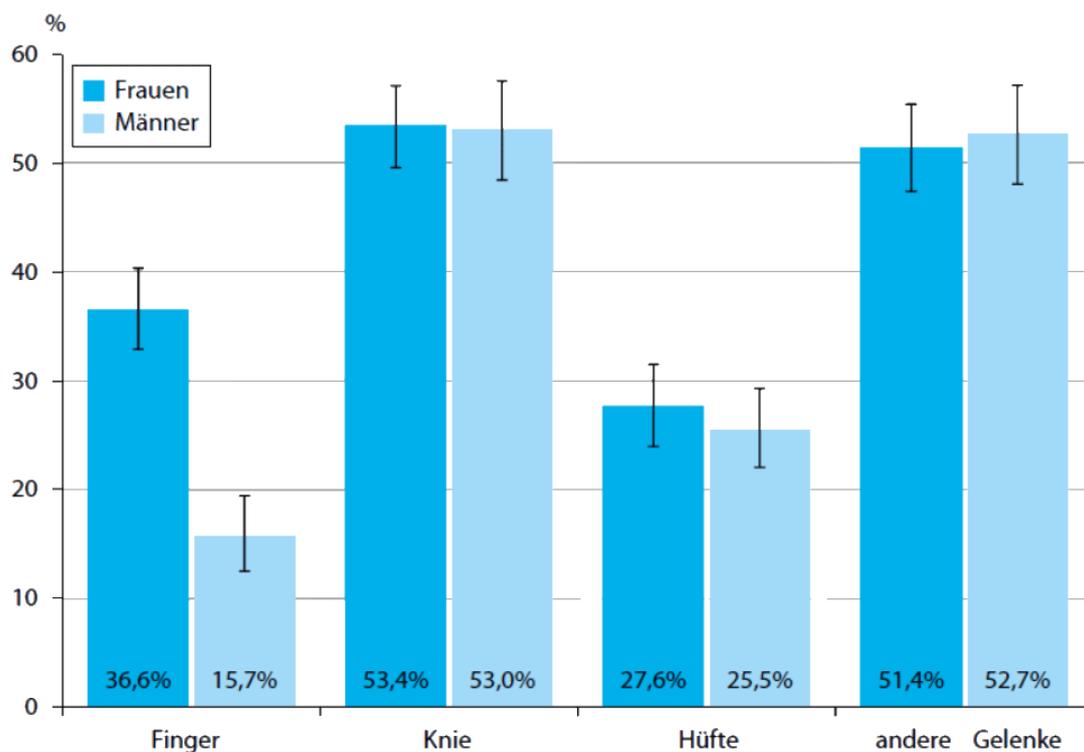


Abbildung 2: Lokalisation der Arthrose, Quelle: adaptiert von Fuchs J [2013]

1.2. Ätiologie

Die bisher genannten arthrotischen Gelenke, wie z.B. Knie oder Hüfte, gehören meist zur primären, spontan auftretenden Form, der keine eindeutige Ursache zugeordnet werden kann. Deutlich seltener kommt es zu der sekundären Arthrose, bei der meist jüngere Patienten betroffen sind. Die Auslöser hierfür können multifaktoriell sein und können in folgende Auslösefaktoren unterteilt werden:

- **Mechanisch:**
Gelenkfehlstellung (z.B. Varus/ Valgus), Fehlbildung (z.B. Hüftdysplasie), Gelenktrauma, Adipositas
- **Metabolisch:**
Rachitis, Hämochromatose, Chondrokalzinose, Ochronose
- **Endokrinologisch:**
Akromegalie, Hyperparathyreoidismus, Hyperurikämie, Diabetes mellitus
- **Hämatogen:**
Hämophilie
- **Aseptische Knochennekrose**

[Herold 2017, Kirchner 2014, Rabenberg 2013, Riede 2009, Scharf 2011].

1.2.1. Risikofaktoren

Durch mechanisch oder biologisch bedingte Gelenkveränderungen kommt es zu einer Dysregulation der anabolen und katabolen Prozesse im Knorpel, welche in einer Arthrose resultieren können. Generell gibt es eine Vielzahl an Risikofaktoren die eine Arthrose begünstigen, siehe auch **Abbildung 3**.

1.2.1.1. Systemische Faktoren

Der auffälligste Risikofaktor ist das Alter, da hier die meisten arthrosespezifischen Befunde radiologisch beobachtet werden können [Michael 2010, Neogi 2013, Rabenberg 2013]. Im fortgeschrittenen Alter sind bis zu 60% der Population betroffen, eine dafür geläufige Erklärung ist, dass langjährige mechanische

Belastungen zu intrinsischen Veränderungen der extrazellulären Matrixproteine von Kollagen und Proteoglykanen und zugleich die Abnahme der Zellregenerationsfähigkeit zum vermehrten Knorpelabrieb führt [Scharf 2011, Sulzbacher 2013].

Ein weiterer Risikofaktor ist das Geschlecht, da wie bereits beschrieben, Frauen deutlich häufiger als Männer betroffen sind [Glyn-Jones 2015]. Eine mögliche Hypothese dafür ist die menopausal bedingte Hormonumstellung, in Bezug auf das Östrogensystem, da ab diesem Zeitpunkt die Prävalenz und Inzidenz deutlich erhöht sind. Dennoch gibt es bisher noch keine eindeutigen wissenschaftlichen Belege über die arthrotische Rolle von Östrogen. Als weitere generelle Risikofaktoren der Arthrose, die noch diskutiert werden, sind Osteoporose und der genaue Einfluss der Vitamine C, D, E und K zu nennen [Michael 2010, Neogi 2013, Rabenberg 2013].

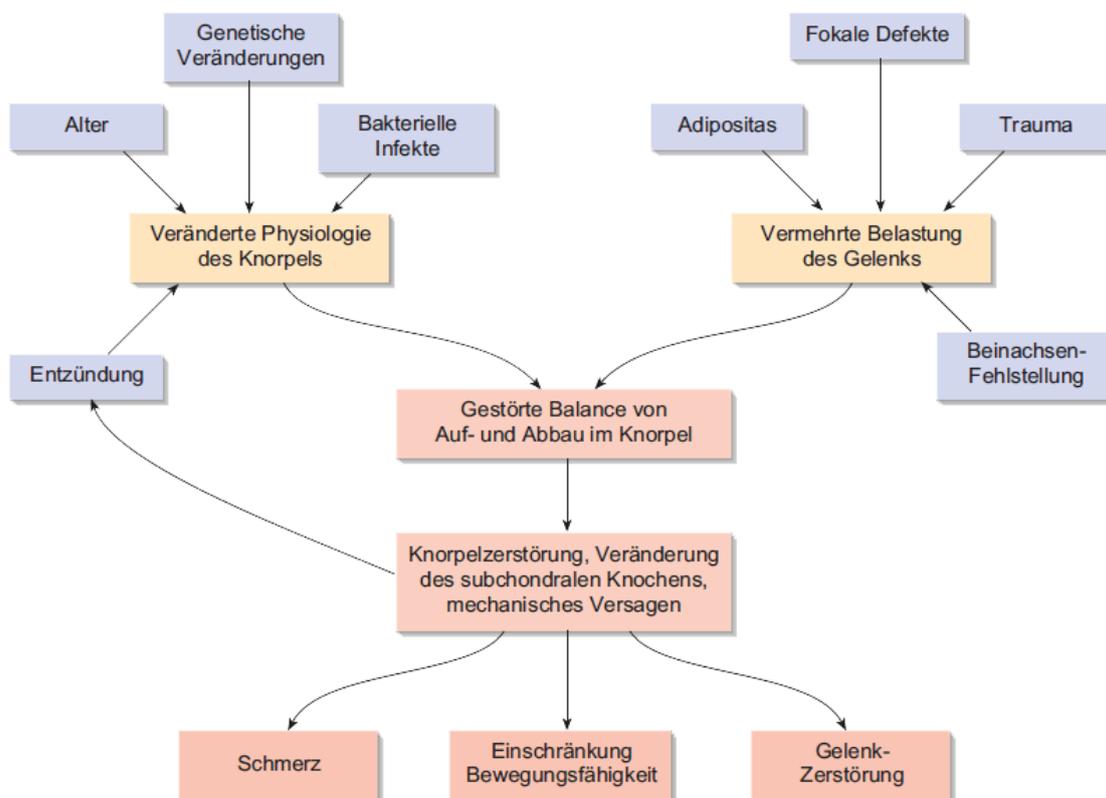


Abbildung 3: Mechanismen der Arthroseentstehung, Quelle: adaptiert von [Scharf 2011]

Eine genetische Prädisposition ist auch, wie für viele andere Erkrankung, ein Risikofaktor, im Falle der Arthrose erhöht sich die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung, für Hände und Hüfte, auf 40 – 60 % [Neogi 2013]. Bisher sind die mit Arthrose assoziierten bekanntesten Loci *GDF5*, Chromosom 7q22 und *MCF2L*, weitere neuere Loci mit Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) liegen auf den Chromosomen 3, 6, 9,12, und 16 (**Tabelle 1**) [Neogi 2013, Pitsillides 2011, Reynard 2013, Sulzbacher 2013, Zeggini 2012].

Chromosom	Gene	Protein
3p21.1	<i>GLT8D1</i>	Glycosyltransferase 8 domain-containing protein 1
3p21.1	<i>GNL3</i>	Guanine nucleotide-binding protein-like 3
6q13-q14.1	<i>FILP1</i>	Filamin-A-interacting protein 1
6q13-q14.1	<i>SENP6</i>	Sentrin-specific protease 6
7q22	<i>PRKAR2B</i>	cAMP-dependent protein kinase type II β regulatory
7q22	<i>HPB1</i>	<i>HMG-box transcription factor 1</i>
7q22	<i>COG5</i>	Conserved oligomeric golgi complex subunit 5
7q22	<i>GPR22</i>	G-protein-coupled receptor 22
7q22	<i>DUS4L</i>	tRNA-dihydrouridine(20a/20b) synthase [NAD(P)+]-like
7q22	<i>BCAP29</i>	B-cell receptor-associated protein 29
9q33.1	<i>ASTN2</i>	Astrotactin-2
12q11.22	<i>KLHDC5</i>	Kelch domain-containing protein 5
12q11.22	<i>PTH1H</i>	Parathyroid hormone-related protein
12q23.3	<i>CHST11</i>	Carbohydrate sulphotransferase 11
13q34	<i>MCF2L</i>	Guanine nucleotide exchange factor DBS
16q12.2	<i>FTO</i>	α -ketoglutarate-dependent dioxygenase FTO
20q11.22	<i>GDF5</i>	Growth/differentiation factor 5

Tabelle 1: Einige mit Arthrose assoziierte Gene und ihre Proteine

1.2.1.2.Mechanische Faktoren

Der Gelenkknorpel hat zwei wichtige mechanische Funktionen. Zu einem ermöglicht er das reibungsarme Gleiten der Gelenkflächen und durch seine viskoelastischen Eigenschaften kommt es zu einer gleichmäßigen Kraftübertragung [Benninghoff 2008]. Wird nur einer dieser Faktoren beeinträchtigt kann dies, je nach Schwere, die Entstehung einer Arthrose begünstigen bzw. bestehende Krankheitsverläufe verschlechtern [Herold 2017, Rabenberg 2013].

Einseitige und lange Belastungen, wie bei häufigen Tätigkeiten in kniender oder hockender Stellung, erhöhen das Risiko an einer Gonarthrose zu erkranken. Berufsgruppen wie Bodenverleger sind daher mit einem bis zu 1,6-fach erhöhten Risiko besonders stark gefährdet [Michael 2010, Neogi 2013]. Generell kann davon ausgegangen werden, dass sobald eine Tätigkeit mit einer rein einseitigen, individuellen Gelenkbelastung, schnellen Richtungswechsel oder zu starkem Druck auf die Gelenkeinheit erfolgt, sei es im Sport oder in der Berufswelt, ist dies mit dem Auftreten einer Arthrose assoziiert [Herold 2017, Michael 2010, Neogi 2013, Rabenberg 2013]. Des Weiteren spielen natürlich auch die anatomischen Voraussetzungen eine entscheidende Rolle für das Auftreten einer Arthrose. Daher führt im muskuloskelettalen System, als Beispiel angeführt, bereits ein Beinlängenunterschied von nur 1 cm zu einer Risikoverdopplung für eine Kniearthrose im kürzeren Bein [Glyn-Jones 2015].

Der mit Wahrscheinlichkeit bedeutendste Risikofaktor, in unserer Gesellschaft, für Arthrose sind Übergewicht und Adipositas. Besonders gewichtstragende Gelenke zeigen vermehrt radiologisch arthrotische Anzeichen und begünstigen zudem den Übergang in eine aktivierte Arthrose [Glyn-Jones 2015, Rabenberg 2013]. Das am häufigsten betroffene Gelenk ist das Knie, welches ein 2,96-fach höheres Erkrankungsrisiko aufzeigt im Vergleich zu einer normalgewichtigen Personen [Glyn-Jones 2015, Mobasher 2017, Neogi 2013]. Interessanter Weise zeigt die Datenlage zwischen Übergewicht und Arthrose einen Zusammenhang für die Hand, aber keinen deutlichen für die Hüfte [Glyn-Jones 2015, Michael 2010, Mobasher 2017, Neogi 2013]. Des Weiteren ergaben Untersuchungen,

dass es einen positiven linearen Zusammenhang zwischen dem Body-Mass-Index (BMI) von beiden Geschlechtern und dem Auftreten der Arthrose gibt, wobei die Frauen in jeder BMI-Kategorie ein höheres Risiko tragen (**Abbildung 4**) [Rabenberg 2013].

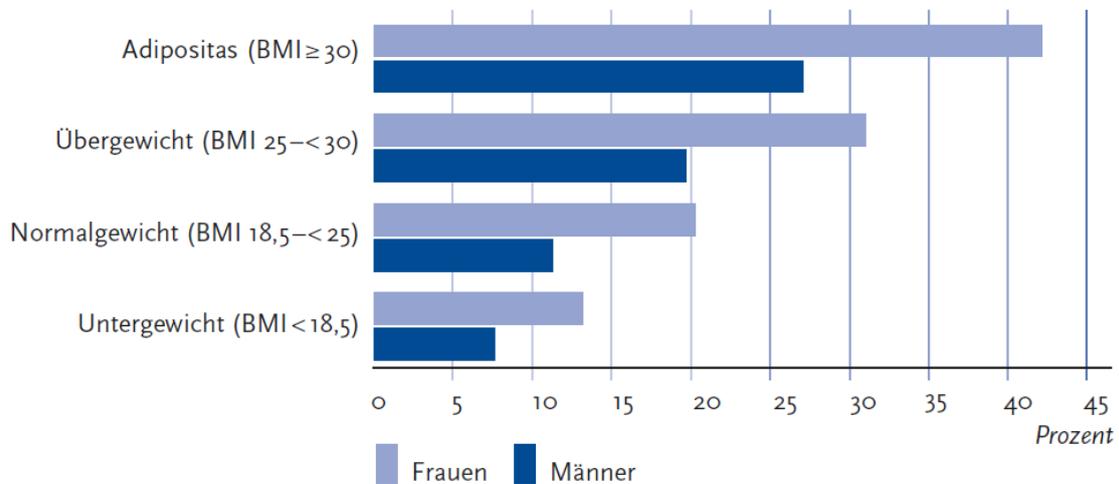


Abbildung 4: Arthrose nach Body-Mass-Index, Quelle: Rabenberg [2013]

1.3. Pathophysiologie des Knorpels

1.3.1. Bestandteile des Knorpels

Das hyaline Knorpelgewebe der Gelenke entwickelt sich aus embryonalen Mesenchymzellen, die sich im zeitlichen Verlauf zu Chondrozyten (Knorpelzellen) differenzieren, die in ihrer selbst synthetisierten Extrazellulärmatrix (EZM) eingebettet liegen. In Bezug auf das gesamte Knorpelvolumen nimmt die EZM das größte Volumen in Anspruch und nur 1 – 10 % des Volumens wird von den Chondrozyten belegt [Scharf 2011, Sulzbacher 2013]. Die EZM verleiht dem Knorpel seine wichtige biomechanische Eigenschaft der Druckelastizität, welche eine gleichmäßige Verteilung der Spannung auf die kraftübertragenden Gelenkflächen gewährleistet [Lüllmann-Rauch 2012].

Diese Eigenschaft hat seinen Ursprung in der Zusammensetzung, die ein sehr geordnetes dreidimensionales Netzwerk aufgrund der intermolekularen Affinitäten zwischen Wasser, Proteoglykanen (PG), Kollagen Typ II und anderen Proteinen bilden.

Aggrecan ist das häufigste PG im Knorpel und besitzt ca. 100 lange Chondroitin-sulfatketten und ca. 30 kürzere Keratansulfatketten, beide gehören zu Gruppe der Glykosaminoglykane (GAG) und sind kovalent gebunden. Diese Mischung aus GAG und PG ist bereits durch seine negative Ladung hydrophil. Durch das Linkprotein Hyaluronan (HA) können bis zu 100 Aggrecanmonomere zu riesigen PG-Aggregaten nicht kovalent verknüpft werden, wodurch eine erhebliche Wasserbindungskapazität erzielt wird und diese ist dafür verantwortlich, dass ein Knorpel aus bis zu 80 % Wasser besteht. Die PG und HA würden sich aufgrund ihrer Ladungen abstoßen, allerdings befinden sich diese Komplexe in einem engen, aus 90 – 95 % Typ II bestehenden, zugfestem Kollagennetzwerk eingespannt. Durch diese Integration werden die PG und HA auf 1/5 ihrer eigentlichen Expansionsfähigkeit begrenzt was in Kombination mit dem Kollagen die Knorpelspannung aufrechterhält und somit für die Widerstandsfähigkeit des

Knorpels verantwortlich ist [Lüllmann-Rauch 2012, Scharf 2011, Sulzbacher 2013].

Bei Belastung eines Gelenkes kommt es zur Kompression der Knorpelmatrix und das ursprünglich gebundene, interstitielle Wasser wird durch das Maschennetzwerk ausgedrückt. Die maximale Knorpelkomprimierung wird erreicht, wenn die Matrix so verengt ist, dass sie sogar für Wasser undurchdringlich wird. Bei Entlastung des Knorpels kommt es zu einer Dekompression und das Wasser kann durch die Anziehungskräfte der PG-GAG-Komplexe zurückströmen und der Knorpel enthält seine Ausgangsform zurück [Lüllmann-Rauch 2012]. Des Weiteren ist das Ein- und Ausströmen des Wassers in die Knorpelmatrix, ein essenzieller Prozess für die Nährstoffversorgung und für den Abtransport von Abbauprodukten. Der Knorpel besitzt in der Regel weder Blut- noch Lymphgefäße, daher erfolgt die Versorgung per Diffusion über die gelösten Nährstoffe in der Gelenkflüssigkeit (Synovia). Die Synovia erhält selber über einen Teil der Gelenkkapsel, genauer über die gefäßdurchsetzte innere Gelenkhaut (Membrana synovialis), die benötigten Nährstoffe [Lüllmann-Rauch 2012, Rabenberg 2013].

Zelluläre Matrix	Chondrozyten
Feste Extrazelluläre Matrix	Kollagenfasern Typ II
	Kleine Mengen Typ V, VI, IX, XI Kollagen
	Hyaluronan
	Proteoglykane (PG)
	- Aggrecan
	- Decorin
	- Fibromodulin
	- Biglykan
	Glykosaminoglykane (GAG)
	- Chondroitinsulfat
- Keratansulfat	
Flüssige Extrazelluläre Matrix	Wasser

Tabelle 2: Bestandteile des Knorpelgewebes, Quelle: adaptiert von Sulzbacher [2013]

Die Zusammensetzung des Knorpelgewebes, siehe **Tabelle 2**, sei es quantitativ oder qualitativ, bedingt somit die optimale Funktionstüchtigkeit des Knorpels. Daher ist eine Balance zwischen anabolen und katabolen Faktoren, welche die Syntheseleistung der Chondrozyten modulieren unabdingbar.

Als matrixaufbauende Faktoren zählen Zytokine wie die Transforming Growth Factor β (TGF- β) Isoformen, der Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) und die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs).

Als matrixabbauende Faktoren gelten die beiden Interleukin-1 (IL-1) Isoformen, IL1- α und IL1- β , aber auch Matrixmetalloproteinasen (MMPs) [Glyn-Jones 2015, Goldring 2016, Lüllmann-Rauch 2012, Scharf 2011, Scharstuhl 2002, Sulzbacher 2013, Wrana 1994, Wu 2016].

Des Weiteren sind Chondrozyten auch von einer Vielzahl von Stimuli unterschiedlicher Qualität abhängig. Eine statische Knorpelbelastung reduziert die Matrixsynthese, während eine zyklische, nicht zu starke Belastung den Chondrozytenmetabolismus eher fördert [Scharf 2011].

1.3.2. Histologischer Aufbau des Gelenkknorpels

Abhängig von der Lokalisation des Gelenkes kann die Dicke des Knorpels, welche nicht von einem Perichondrium überzogen ist, von 1 mm bis zu 7 mm reichen, siehe **Abbildung 5**.

Damit die Kollagenfibrillen die Kräfte optimal übertragen können, besitzt der Knorpel eine besondere Architektur, die in vier Zonen untergliedert wird, siehe **Abbildung 6**. Mit entsprechender Färbung ist es möglich, einen bogenförmigen bzw. arkadenartigen Verlauf der Kollagenfasern zu erkennen. Dieser Verlauf beginnt, oberhalb des subchondralen Knochens, in der mineralisierten Knorpelzone (IV), die sich durch eine mit Hydroxyapatitkristallen versetzte EZM auszeichnet. Die Zone IV verlassend, ziehen die Kollagenfasern radiär, parallel und senkrecht zur Knorpeloberfläche in die Radiärzone (III) ein. Dabei durchdringen sie auch eine Grenzlamelle (eng. tide mark), welche die Zonen IV

und III voneinander trennt (**Abbildung 6 B**). Ankommend in der Übergangszone (II) beginnt der Faserverlauf sich zu ändern und mündet mit seinem Wendepunkt in der Tangentialzone (I) und zieht anschließend wieder runter bis zur Zone IV. Durch diesen Wendepunkt in Zone I liegen die Fasern parallel zur Gelenkoberfläche und werden daher auch als Tangentialfasern bezeichnet [Lüllmann-Rauch 2012, Scharf 2011].

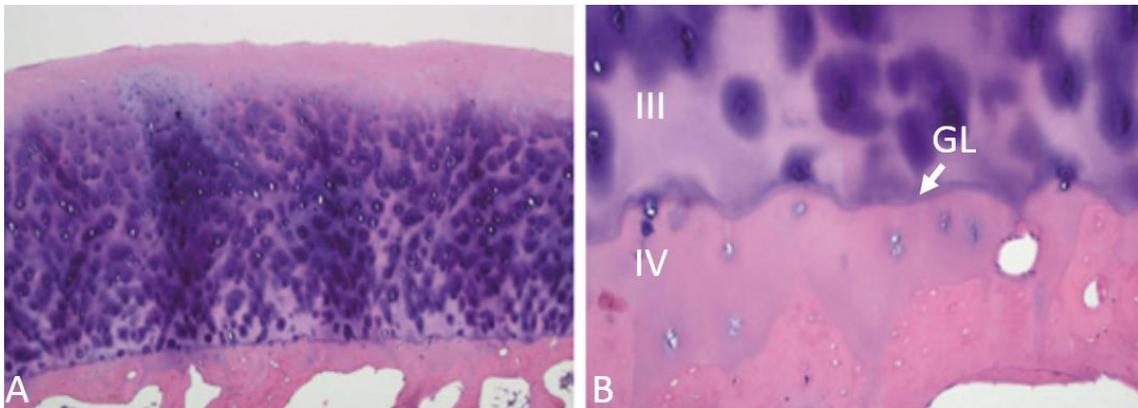


Abbildung 5: Gesunder Hüftknorpel (HE-Färbung), Quelle: adaptiert von Sulzbacher [2013]
 A) Hyaliner Hüftknorpel mit 3 mm dicke (x100); B) Grenzlamelle (GL) zwischen der Radiärzone (III) und mineralisierten Knorpelzone (IV) (x200); Durch Hämatoxylin blau gefärbt die in Gruppen liegenden Chondrozyten, die sog. Chondrone, mit ihrer stark basophilen Matrix dem sog. Territorium; durch Eosin rötlich gefärbt die kollagenreichen acidophilen Regionen

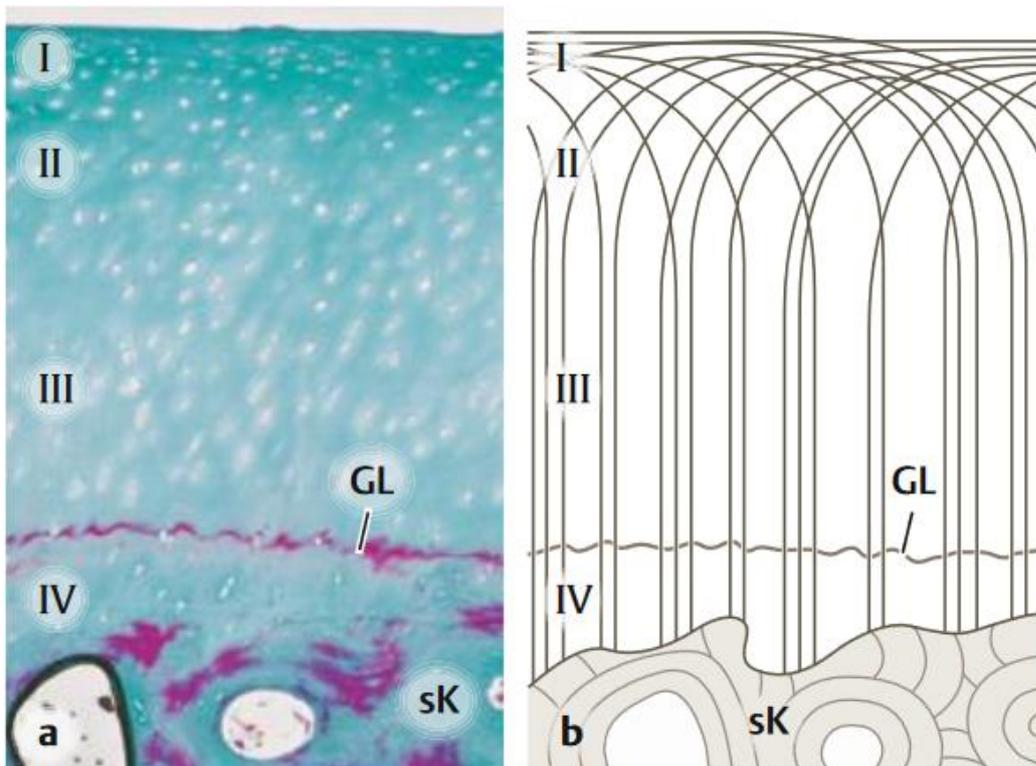


Abbildung 6: Gelenkknorpel (Goldner-Färbung), Quelle: adaptiert von Lüllmann-Rauch [2012]
 I) Tangentialzone, II) Übergangszone, III) Radiärzone, IV) mineralisierte Knorpelzone, GL) Grenzlinie (tide mark), sK) subchondraler Knochen

1.3.3. Histopathologie

Der Arthroseverlauf ist primär charakterisiert durch das makroskopische Aufweichen des Knorpels, der sogenannten Chondromalazie, und dem Verlust des Gelenkknorpels mit einer Dysfunktion der Chondrozyten (**Abbildung 7**). Die Veränderungen der biochemischen Zusammensetzung der EZM wie der vermehrten Expression von Kollagen Typ I und Typ III, anstatt Typ II, dem Verlust der PG sowie einer vermehrten Chondroitin- 4- Sulfat Produktion führen zu einer Abnahme der Druckelastizität. Ist diese essentielle Eigenschaft in ihrer Funktionalität reduziert, folgen unweigerlich eine geringere Belastbarkeit sowie ein erhöhter Abrieb [Kirchner 2014, Sulzbacher 2013].

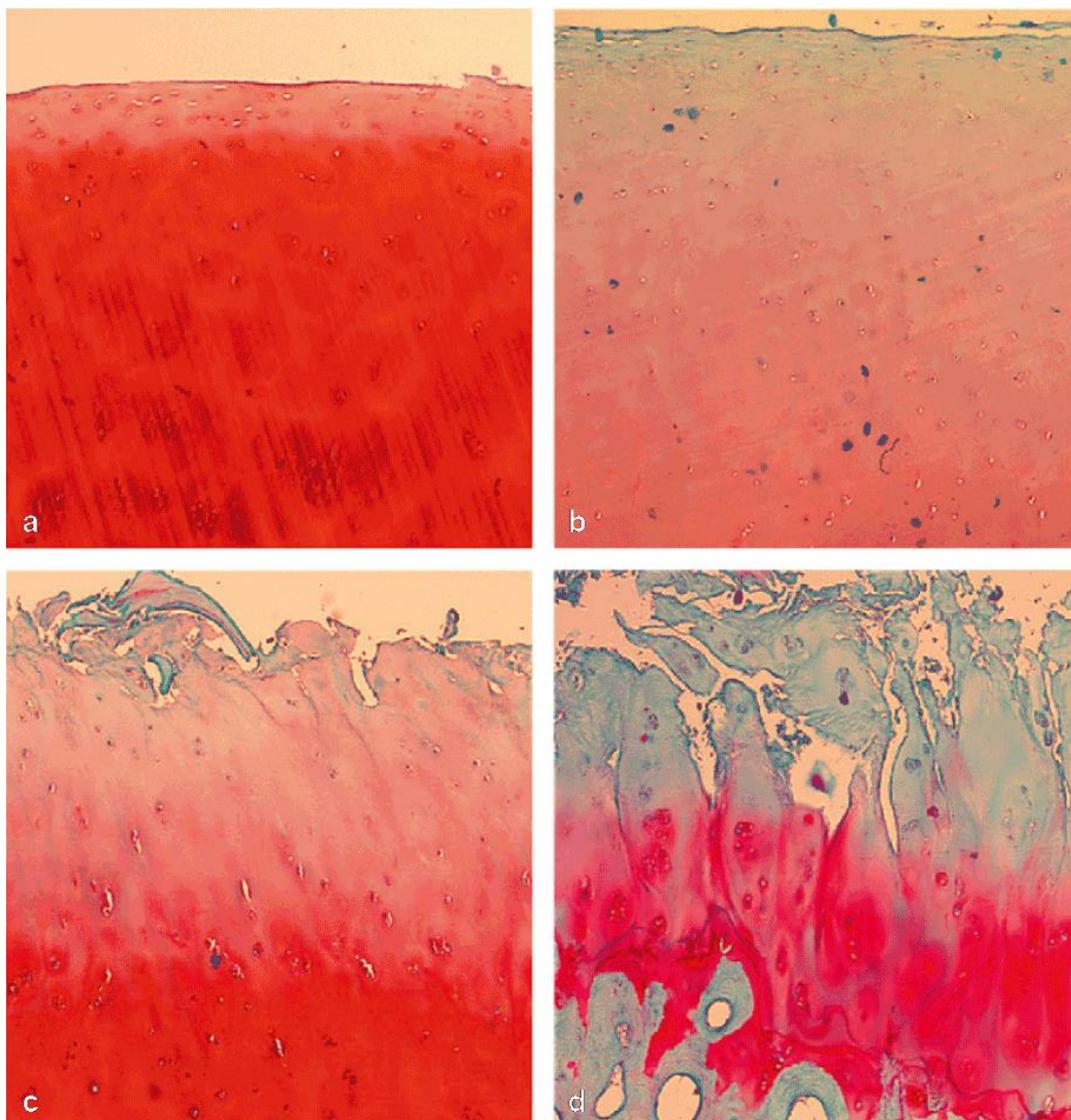


Abbildung 7: Histologische Veränderungen im Gelenkknorpel (Safranin-O-/ Echtgrün-Färbung)
a) gesunder Gelenkknorpel b) Chondromalazie c) oberflächliche Knorpelauffaserung
d) Knorpelfläche tief zerklüftet; Quelle: adaptiert von Scharf [2011]

Histologisch kann man den progredienten Verlust der PG im Gelenkknorpel gut mit einer Safranin-O-/ Echtgrün-Färbung darstellen. Der ursprüngliche Knorpel zeigt ein gleichmäßig anfärbbares Gewebe mit den wenigen Chondrozyten, die entweder einzeln oder in Zweiergruppen, den Chondronen, vorliegen. Der beginnende Verlust der PG, in der Knorpelmatrix, führt zu einem Verlust der Wasserbindungskapazität und zeigt eine deutliche verminderte Safranin-O-Färbung, siehe **Abbildung 7 b** [Aigner 2006, Scharf 2011, Sulzbacher 2013]. In den Frühphasen der Arthrose versuchen die Chondrozyten kompensatorisch dem PG-Verlust durch vermehrte Proliferation in den oberen und mittleren Schichten entgegen zu wirken, sowie durch eine gesteigerte Expression von neuen Matrix-Komponenten. Mit zunehmender Schwere der Arthrose kommt es daher auch zur typischen Bildung von Knorpelnestern, den sog. Clustern, siehe folgende **Abbildung** [Aigner 2006, Scharf 2011, Sulzbacher 2013].

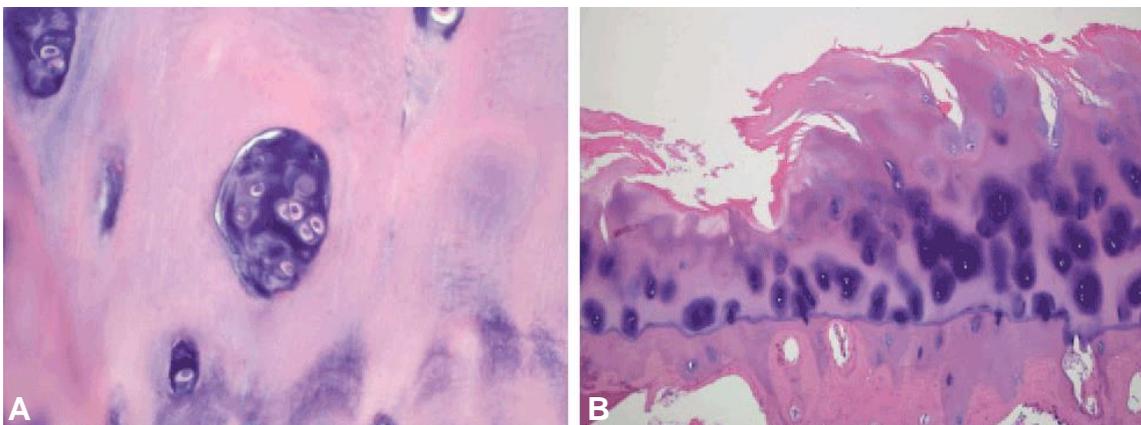


Abbildung 8: Clusterbildung und schwer geschädigter Knorpel (HE-Färbung)
 A) Knorpelnest bei mittelschwerem Knorpelschaden (x400) B) Fortgeschrittene Arthrose mit tiefen Fissuren und Knorpelverlust; Quelle: adaptiert von Sulzbach [2013]

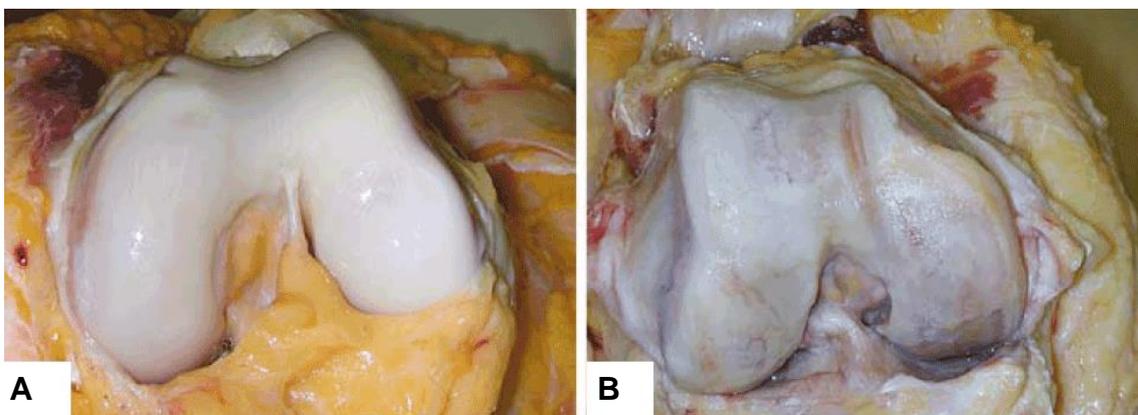


Abbildung 9: Arthrose im Kniegelenk, Quelle: adaptiert von Aigner [2006]
 A) normales Kniegelenk B) Kniegelenk mit deutlich erkennbarer arthrotischer Knorpelschädigung

Problematisch wird es allerdings, wenn die Reparaturmechanismen nicht mehr ausreichen, um den bestehenden Schaden zu beheben. Mittelfristig kommt es zur Apoptose der Chondrozyten und die Zerstörung der EZM nimmt seinen Lauf. Es kommt zu Fissuren in den oberen Knorpelschichten, welche im zeitlichen Verlauf immer tiefer werden (**Abbildung 7 b, c**). Dies mündet schließlich darin, dass sich selbst einzelne kleine arthrotische Knorpelfragmente ablösen, was endgültig betrachtet in die Freilegung des subchondralen Knochens, der sog. Knochenglatze, führen kann (**Abbildung 9 B**) [Aigner 2006, Scharf 2011]. Bereits die ersten frei zirkulierenden Knorpelfragmente im Gelenk versucht der Körper durch matrixdegradierende Enzyme wie Proteasen und Kollagenasen abzubauen. Die Freisetzung dieser knorpelabbauenden Enzyme bei bereits geschwächten Chondrozyten initiiert eine „Teufelskreis“, da auch die noch intakte EZM geschwächt wird und die noch existierenden Chondrozyten noch mehr belastet [Scharf 2011].

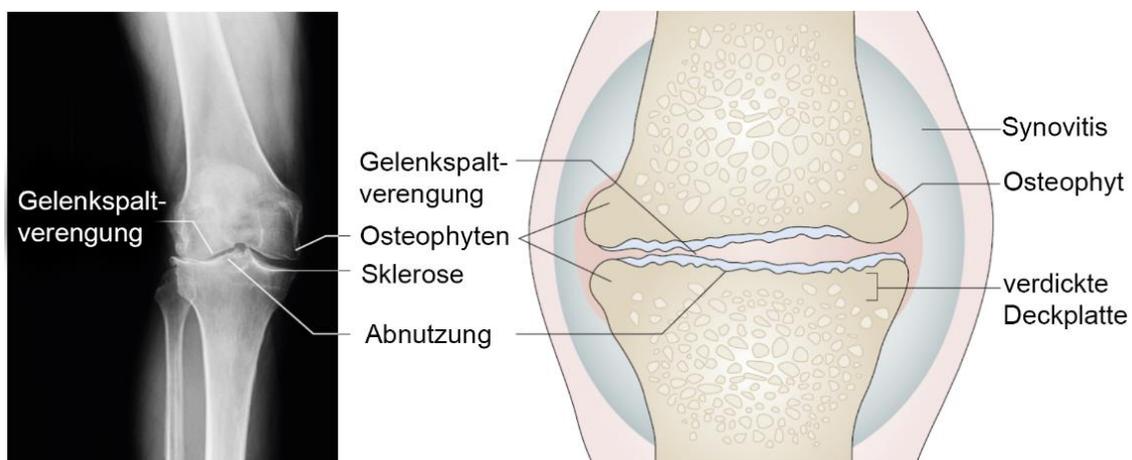


Abbildung 10: Radiologische und schematische Darstellung der Arthrose, Quelle: adaptiert von Goldring [2016]

Der subchondrale Knochen (knöcherne Deckplatte) zeigt im Verlauf der Arthrose auch gewisse Kompensationsmechanismen, bevor es zu den Deformierungen in den Hauptbelastungszonen des Gelenkes kommt [Aigner 2006]. Die Deckplatte mit dem darunter liegendem Trabekelnetzwerk versucht der erhöhten mechanischen Belastung durch vermehrte Knochenbildung (subchondrale Hyperostose) entgegenzuwirken. Allerdings führt das im Verlauf zu einer subchondralen Sklerosierung. Um eine stabile Gelenkführung zu erreichen, kommt es in den Randbereichen der Gelenkfläche beginnend sogar zu

knöchernen Anwüchsen, den sog. Osteophyten (**Abbildung 10**). Progredient im Verlauf können diese sogar selber zu einer Gelenkspaltverschmälerung beitragen. In der fortgeschrittenen Arthrose kommt es durch Mikrofrakturen zu Nekrosen im Subchondralknochen wodurch sich Geröllzysten (subchondrale Zysten) bilden können [Aigner 2006, Goldring 2016, Scharf 2011, Sulzbacher 2013].

1.4. Behandlung von Knorpeldefekten

Krankhafte Veränderungen in den Gelenken führen meist zu Bewegungseinschränkungen und Schmerzen [Rabenberg 2013]. Bei Verdacht eines Knorpeldefektes wird durch eine Magnetresonanztomographie die Größe diagnostiziert und entsprechend eines spezifischen Behandlungsplans therapiert. Schwere und größere Defekte können durch teils größere operative Eingriffe mit einer Endoprothese erfolgreich versorgt werden. Bei kleineren Defekten ist es möglich die Regeneration des Knorpels durch Anregung der Selbstregeneration, oder Knorpel-Knochen Transplantation bis hin zur autologen Chondrozytentransplantation zu unterstützen (**Abbildung 11**) [Jansson 2018].



Abbildung 11: Autologe Chondrozyten Transplantation (ACT) am Knie, Quelle: Jansson [2018]
Bild links zeigt die ursprünglich geschädigte Knorpelregion, gesäubert und vorbereitet für ein Transplantat; Bild rechts zeigt das passgenaue und integrierte Knorpelzelltransplantat

Im Vergleich zu einer Endoprothese setzen die organischen Alternativen alle auf ein erneutes Wachstum von gesunden Chondrozyten an den defekten Knorpelstellen, dabei unterscheidet sich nur der Ursprung dieser Zellen. Die symptomatischen Behandlungsstrategien lindern zwar die Schmerzen der betroffenen Patienten, allerdings helfen sie nicht bei der Ursachenbekämpfung

1.5. Ursachenbekämpfung von Knorpeldefekten

Bisher gibt es zwar effektive Methoden zur Behandlung von Knorpeldefekten, aber diese dienen der Symptombehandlung und helfen nicht bei der Lösung der Ursache. Um letzteres zu gewährleisten ist es notwendig, die molekularen Prozesse der Chondrogenese genau zu erforschen. Eine Möglichkeit hierfür sind Experimente mit Chondrozyten, und deren Genexpressionsmusteranalyse, bei Verwendung unterschiedlichster modulatorischer Faktoren. Wären diese Genexpressionsmuster und die dazugehörigen molekularen Mechanismen bekannt, könnte dies der Menschheit helfen, die Ursachen für „primäre“ Arthrose zu erkennen bzw. zu bekämpfen. Des Weiteren wäre auch eine verbesserte klinische Anwendung der regenerativen Medizin denkbar, wodurch die Notwendigkeit von Endoprothesen reduziert werden könnte.

Um die Ursachenbekämpfung voran zu bringen ist es wichtig, auch geeignete Bedingungen für molekularbiologische Untersuchungen zu schaffen, wie es z.B. für eine Genexpressionsanalyse nötig wäre. Für eine solche Untersuchung und weiteren Verfahren, wie auch für das Next Generation Sequencing (NGS), ist es extrem wichtig, dass die RNA nicht nur in ausreichender Menge vorliegt, sondern auch eine optimale Qualität besitzt. Auf dem wissenschaftlichen Markt gibt es eine Vielzahl an Methoden und kommerziell erwerbbar Kits, welche für die RNA-Extraktion genutzt werden können. Allerdings gibt es bisher keine Studie darüber, ob eines dieser Verfahren einen entscheidenden Vorteil oder Nachteil für die RNA-Isolierung von humanen gesunden und erkrankten Chondrozyten bringt.

1.6. Ziel dieser Arbeit

Das primäre Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, ob die Trizol-Methode (nach Chomczynski 1987) in Bezug auf RNA Qualität und Quantität noch konkurrenzfähig zu den drei verschiedenen Kits der etablierten Hersteller Qiagen, Bio-Rad und Analytik Jena ist und welche Methode die besten Ergebnisse für die RNA-Isolation von Chondrozyten ermöglicht.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Chemikalie	Firma
Amphotericin B solution (250 µg/ml)	Sigma-Aldrich
Ascorbic acid	Sigma-Aldrich
Chloroform	Sigma-Aldrich
DMEM/HAM's F-12	Biochrom (Merck)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Biochrom (Merck)
Ethanol	Merck
Fetales Kälberserum 10% (Fetal)	PAA Laboratories
MEM amino acids (50x)	Gibco (Thermo Fisher Scientific)
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml / 10.000 µg/ml	Biochrom (Merck)
QIAzol®Lysis Reagent	Qiagen
Trypanblau	Gibco (Thermo Fisher Scientific)
Trypsin / EDTA Solution (10x)	Biochrom (Merck)
UltraPure™ Wasser (DNase/RNase frei, destilliert)	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

2.1.2. Kommerzielle Kits

Kit	Firma
Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit	Bio-Rad
innuPREP RNA Mini Kit	Analytik Jena
RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies
RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit	Qiagen

2.1.3. Instrumente

Instrument	Hersteller
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies
Brutschrank	Binder
Eismaschine	Ziegra, Brucheismaschine
Gefrierschrank (-20°C)	Bosch Liebherr
Gefrierschrank (-80°C)	Heraeus, HFU 586 Basic
Kühlschrank (4°C)	Liebherr
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank (Klasse II)	BDK
Mikroskop	Zeiss, Axio Vert.A1
NanoDrop Lite	Thermo Fisher Scientific
Waage	Sartorius, Feinwaage 1702
Wasserbad	Julabo, TW20
Zählkammer nach Neubauer improved	Hecht-Assistent
Zentrifugen	Eppendorf, Centrifuge 5417 Heraeus, Multifuge 1 L-R Heraeus R

2.2.Zellkultur

2.2.1. Humane (normale und arthrotische) Chondrozyten

Für die Kultivierung von Knorpelzellen wurden in dieser Arbeit normale Chondrozyten (Lonza, Basel, Schweiz) und arthrotische Chondrozyten als Ausgangsmaterial genutzt. Bei den arthrotischen Zellen handelt es sich um bereits isolierte Chondrozyten. Diese wurden während der Versorgung eines anonymisierten Spenders mit einer Knieendoprothese gewonnen. Die Zellen dienten in vorherigen Experimenten als Ausgangsmaterial z.B. für qPCR oder als Kontrollmaterial.

2.2.2. Kultivierung der Zellen per Vollmedium – Chondrozytenmedium

Für die Chondrozyten wurde ein spezielles Nährmedium zusammengestellt, was aus Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM)/HAM's F-12 mit stabilem Glutamin (1:1; Biochrom, Berlin, Deutschland) und anteilig aus 1% MEM amino acids (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA), 25 µg/ml L-Ascorbic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA), 50 IU/ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom), 0,01% Amphotericin B solution (250 µg/ml) (Sigma-Aldrich) und 10% fetalem Kälberserum (FCS) (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) bestand.

2.2.3. Aussaat der Chondrozyten aus Passage 0

Die im flüssigen Stickstoff eingelagerten Chondrozytenproben, mit je 2×10^6 Zellen, wurden in der Hand angetaut und in 4°C vorgekühltes Vollmedium (20ml) überführt. Gekühltes Medium hatte den Zweck, langsam die Zellen im Nährstoffreichen Medium auftauen zu lassen und zugleich das Gefriermedium, welches mit dem zelltoxischen, DMSO versetzt war zu verdünnen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Proben bei 1500 U/min für 5 Minuten (Multifuge 1 L-R, Heraeus). Den DMSO haltigen Überstand entfernte man vollständig und resuspendierte anschließend das Zellpellet in frischem, gekühltem Vollmedium (20 ml). Die Zellsuspension wurde in eine Nunc™ zellkulturbehandelte TripleFlasks™ (500 cm² Kulturfläche, Thermo Fisher Scientific) überführt und das Gesamtvolumen auf 80 ml Vollmedium erhöht. Anschließend erfolgte die

Inkubation in einem Brutschrank (Binder, Tuttlingen, Deutschland) bei 37°C mit 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit.

Mediumwechsel und Wachstumskontrolle des Chondrozytenmonolayers erfolgte per Mikroskop alle 2 Tage. Der Mediumwechsel erfolgte, indem das verbrauchte Medium aus den TripleFlasksTM abgegossen und neues auf 37°C vorgewärmtes Medium (80 ml) hinzugefügt wurde.

2.2.4. Trypsinierung der Monolayerzellkultur

Bei einer 90-100% Konfluenz wurden die adhäsiven Chondrozyten für die Ablösung durch Trypsin, eine aus dem Schwein gewonnene Protease, für die darauffolgende Separation vorbereitet. Zum Vorwärmen auf 37°C der hier erwähnten Substanzen nutzte man ein Wasserbad (TW20, Julabo, Seelbach, Deutschland). Zuerst erfolgte die vollständige Entfernung des Kulturmediums mit Hilfe einer Pipette. Der anschließende zweimalige Waschschrift mit vorgewärmten Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) ohne Ca²⁺/Mg²⁺ (Biochrom) sollte die Entfernung möglicher enzyminhibierende Inhaltsstoffe aus dem vorherigen Medium gewährleisten. Im nächsten Schritt wurden 7 ml der vorgewärmten Trypsin/ EDTA Lösung (0,05%/ 0,02% Biochrom) zur Zelldissoziation hinzugefügt und für 5 min im Brutschrank (Binder) bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Mit der Zugabe von 7 ml erwärmten Vollmedium neutralisierte man die proteatische Wirkung wieder. Die anschließende Zentrifugation der Proben erfolgte bei 1500 U/min für 5 Minuten und der Trypsin haltige Überstand wurde verworfen. Das gewonnene Zellpellet wurde für die nachfolgende Zellzahlbestimmung in 10 ml angewärmten Vollmedium resuspendiert.

2.2.5. Zellzahlbestimmung mittels der Vitalfärbung Trypanblau

Das Prinzip dieses Zellzahlbestimmungsverfahrens beruht darauf, dass nicht membranpermeable Farbstoffe, zu denen auch Trypanblau gehört, von lebenden nicht und von toten Zellen aufgenommen werden. In Kombination mit der Zählkammer nach Neubauer (**Abbildung 12-A**), welches eine definierte

Netzeinteilung von 3 x 3 Quadraten mit je einer Fläche von 1mm² und eine Tiefe von 0,1mm besitzt, erlaubt eine genaue Bestimmung der Zellzahl.

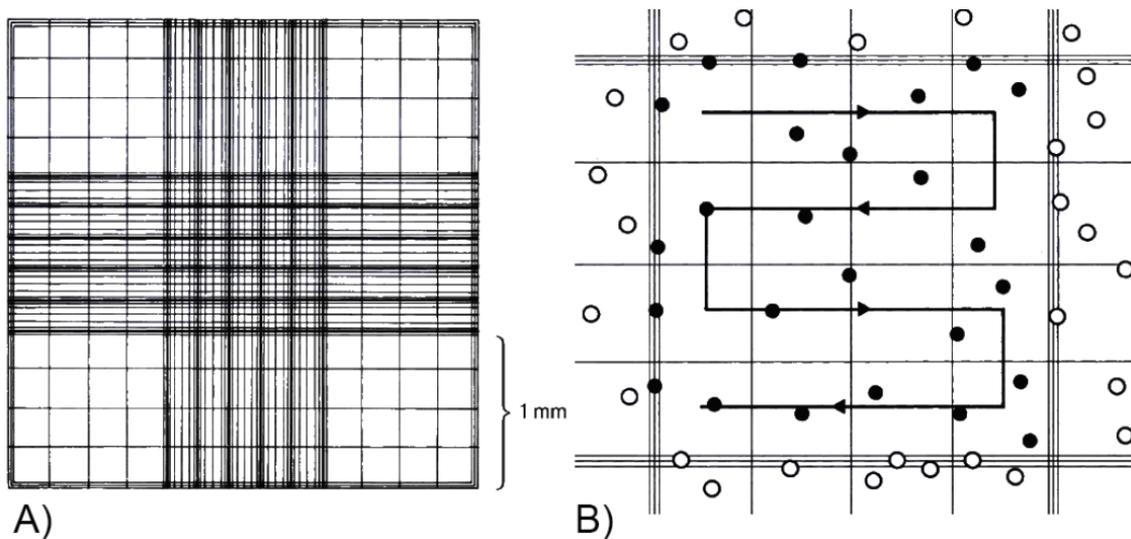


Abbildung 12: Neubauer-Zählkammer und Zähltechnik, Quelle: adaptiert von Gstraunthaler [2013].

A) zeigt die Netzeinteilung und B) zeigt schematisch die Auszählmethode.

Für die Vitalfärbung wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl 0,4% Trypanblaulösung (Thermo Fisher Scientific) gemischt und durch Ansetzen der Pipette an die Zählkammerkante überführt. Die Kapillarkräfte zwischen Deckglas und Kammer saugten dabei fast selbstständig die Suspension auf, dennoch achtete man darauf, dass nur eine exakt befüllte Kammer verwendbare Zellzahlen liefert.

Unter einem Lichtmikroskop wurden die 4 Eckquadranten ausgezählt (**Abbildung 12-B**), dabei zählte man nur die vitalen, also nur die nicht blau gefärbten Zellen. Um die Gesamtzellzahl in einem Milliliter abschätzen zu können, bildete man den Mittelwert aus den ausgezählten Quadranten, multipliziert diesen mit 10⁴ und dem Verdünnungsfaktor 2 [Gstraunthaler 2013].

2.2.6. Separation der Zellen in Zellkultur-Multischalen

Da im späterem Verlauf die RNA der Chondrozytenzelllinien durch vier unterschiedliche Methoden gewonnen werden sollte, wurde je Zelllinie und Methode eine 6 Well Nunc™ Zellkultur-Multischale (Thermo Fisher Scientific) genutzt. Nach erfolgreich bestimmter Zellzahl (non-OA Linie 195 Zellen; OA Linie

92 Zellen) füllte man jedes Well mit 2 ml vorgewärmten Vollmedium (siehe 2.2.2) und ungefähr 200.000 Zellen. Alle zwei Tage erfolgte der Wechsel des Kulturmediums, indem man das verbrauchte Medium vollständig abpipettierte und durch 2 ml frisches, vorgewärmtes Medium ersetzte. Des Weiteren erfolgte zuvor immer eine mikroskopische Untersuchung bzgl. Zellkonfluenz und Kontaminierung durch z.B. Bakterien oder Pilze. Eine 90 - 100% Konfluenz wurde nach einer Woche erzielt und die Zellernte für die RNA-Isolation vorbereitet.

2.2.7. Finale Zellernte und Vorbereitung zur späteren RNA-Isolation

Da die RNA-Extraktion nicht am gleichen Tag erfolgte wie die Zellernte, wurden vorab entsprechende Vorbereitungen für jede Methode getroffen, um das Zelllysate tiefgekühlt zwischenzulagern.

Da die Chondrozyten sich adhäsiv als Monolayer in den Wells fixiert haben, entfernte man das Medium vollständig und vorsichtig. Nach zweimaligem Waschschrift mit Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Biochrom) folgte die Lysierung der Zellen separat je nach Methode. Die Arbeiten erfolgten gemäß der Sicherheitsbestimmungen an einem Arbeitsplatz mit Abzug.

2.2.7.1.Methode 1 - Trizol-Methode/ "Single-step method"

Für diese Methode, bekannt auch als Phenol-Chloroform-Extraktion, gab man 1 ml der QIAzol®Lysis Reagent (Qiagen, Hilden, Deutschland) in jedes dafür vorgesehene Well. Mit gleicher Pipettenspitze, pro Well, wurde die Lyselösung mehrfach durch wiederholtes auf- und abpipettieren aufgetragen bis der Monolayer gut resuspendiert war. Nach kurzer Einwirkzeit bei Raumtemperatur wurde die Qiazol-Zellsuspension in ein beschriftetes 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock Tube überführt (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und sofort bei -80°C gelagert.

2.2.7.2.Methode 2 - innuPREP RNA Mini Kit

Für diese Methode wurden 400 µl der mitgelieferten Lysis Solution RL in jedes dafür vorgesehene Well gegeben. Anschließend trug man mit gleicher

Pipettenspitze, pro Well, die Lyselösung mehrfach durch wiederholtes auf- und abpipettieren auf, bis der Monolayer gut resuspendiert war. Nach kurzer Einwirkzeit von drei Minuten bei Raumtemperatur wurde das Zellysat in ein RNA freies, beschriftetes 1,5 ml Eppendorf Safe–Lock Tube überführt (Eppendorf) und sofort bei -20°C gelagert und nicht, wie bei allen anderen hier beschriebenen Methoden, bei -80°C.

2.2.7.3.Methode 3 - Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit

Für diese Methode wurde 1 ml der mitgelieferten PureZOL Lösung in jedes dafür vorgesehene Well gegeben. Mit gleicher Pipettenspitze, pro Well, wurde die Lyselösung mehrfach, durch wiederholtes auf- und abpipettieren, aufgetragen bis der Monolayer gut resuspendiert war. Nach kurzer Einwirkzeit bei Raumtemperatur wurde die PureZOL-Zellsuspension in ein beschriftetes 1,5 ml Eppendorf Safe–Lock Tube überführt (Eppendorf) und sofort bei -80°C gelagert.

2.2.7.4.Methode 4 - RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit

Für diese Methode wurde vorab nach Herstellerangaben pro verwendetem 1 ml mitgelieferter RLT Buffer Lösung 10 µl β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) hinzugefügt. Von dieser Lösung gab man 350 µl in jedes dafür vorgesehene Well. Mit gleicher Pipettenspitze, pro Well, wurde die Lyselösung mehrfach, durch wiederholtes auf- und abpipettieren, aufgetragen bis der Monolayer gut resuspendiert war. Nach kurzer Einwirkzeit bei Raumtemperatur wurde das Zellysat in ein RNA freies, beschriftetes 1,5 ml Eppendorf Safe–Lock Tube (PCR-clean, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt und sofort bei -80°C gelagert.

2.3. RNA-Extraktion aus humanen Chondrozyten

RNA ist sehr anfällig für die Degradierung durch die ubiquitär vorkommenden RNasen. Um ein möglichst RNase freies Arbeiten zu gewährleisten, wurden sämtliche Arbeitsschritte mit sterilen Komponenten durchgeführt.

2.3.1. Auftauen der Zelllysate

Da alle Proben, wie unter 2.2.7 beschrieben, eingefroren gelagert waren, mussten sie zur Fortsetzung der RNA-Extraktion aufgetaut werden. Um dabei auch eine vollständige Lösung der in der Zellsuspension befindlichen Salze zu gewährleisten, wurden die Proben bei 37°C für 5 min im Thermomixer comfort (Eppendorf) erwärmt. Nach einer kurzen Abzentrifugation erfolgte die Probenlagerung für die anschließenden Schritte auf Eis, soweit nicht explizit anders erwähnt.

2.3.2. Methode 1 - Trizol-Methode

Zu jedem Zelllysate wurde 200 µl Chloroform (Sigma-Aldrich) hinzugefügt, für 15 s händisch geschüttelt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase folgte die Zentrifugation der Proben für mindestens 20 min bei 15.000 x *g* und 4°C

Durch die Zentrifugation entsteht eine dreischichtige Auftrennung der Proben. Die oberste farblose Schicht, eine wässrig wirkende Lösung, beinhaltet die RNA, welche vorsichtig in ein neues, bereits beschriftetes, RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt wurde. Die weißliche, dünne Interphase und tieferliegende rötliche Schicht, die organische Phase, wurden dabei intakt gelassen und nicht überführt.

Zur RNA-Fällung wurde dem so überführten Volumen 500 µl Isopropanol (Sigma-Aldrich) hinzugefügt, anschließend gevortext und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase erfolgte die Zentrifugation der Proben für mindestens 60 min bei 15.000 x *g* und 4°C, wodurch sich an den Reaktionsgefäßböden kleine gelartige Pellets bildeten.

Der Überstand wurde sehr vorsichtig verworfen, um die Integrität der Pellets nicht zu gefährden. Der folgende Waschschrift der RNA-Pellets erfolgte durch Zugabe von jeweils 1 ml 75% Ethanol und anschließender Zentrifugation für 20°min bei 15.000 x g und 4°C mit anschließender Verwerfung des Ethanolüberstandes.

Die Herstellung des 75% Ethanols erfolgte durch die korrekte Mischung von absoluten Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) und UltraPure™ DNase/RNase freiem destilliertem Wasser (Thermo Fisher Scientific). Der Waschschrift erfolgte zweimal. Da das Ethanol nicht vollständig per Pipette entfernt werden kann, ließ man das Restethanol bei Raumtemperatur und geöffnetem Reaktionsgefäßdeckel verdampfen.

Die RNA wurde von der Gefäßwand mit 80 µl UltraPure™ DNase/RNase freiem destilliertem Wasser (Thermo Fisher Scientific) gelöst und danach im Thermomixer comfort (Eppendorf) für 20 min bei 37°C erhitzt. Dieser Schritt dient vorrangig dazu, dass sich das gebildete RNA-Pellet optimal auflösen kann. Des Weiteren dient es auch zur Entfernung von wasserlöslichen Substanzen wie z.B. Phenol, welche an der RNA gebunden vorliegen könnten. Gebundene Phenolrestspuren sind kontraproduktiv für spätere Analyseverfahren bei denen es wichtig ist, dass Enzyme mit der RNA interagieren.

Abschließend erfolgte eine kurze Zentrifugation der Proben, welche bis zur RNA - Konzentrationsbestimmung wieder auf Eis lagerten.

2.3.3. Methode 2 - innuPREP RNA Mini Kit

Entsprechend der Herstellerangaben (Analytik Jena) wurden vorab die Konzentrate der Waschlösungen, HS mit 3 ml und LS mit 8 ml absolutem Ethanol (Merck) versetzt. Alle Arbeitsschritte für diese Methode erfolgten bei Raumtemperatur. Bei den hier genannten Reaktionsgefäßen handelt es sich um die vom Hersteller gelieferten "Receiver Tubes". Alle hier verwendeten Komponenten, bis auf das Ethanol, sind im Kit bereits enthalten und wurden entsprechend verwendet. Die Herstellung des hier verwendeten 70%igen Ethanols erfolgte durch die korrekte Mischung von absolutem Ethanol (Merck)

und UltraPure™ DNase/RNase freiem destilliertem Wasser (Thermo Fisher Scientific).

Zum entfernen der gDNA wurde das aufgetaute Zelllysate in ein Reaktionsgefäß, versehen mit Säule D ("Spin Filter D"), überführt. Nach 2 min Zentrifugation bei 11.000 x *g* wurde nur die Säule D verworfen.

Dem gewonnenen Filtrat, welches die RNA beinhaltet, wurden 400 µl 70% Ethanol hinzugefügt und gut mit Pipette gemischt. Diese Suspension wurde in ein neues Reaktionsgefäß, versehen mit Säule R ("Spin Filter R"), transferiert und für 2 min bei 11.000 x *g* zentrifugiert. In diesem Schritt wurde die RNA in der Säule R gebunden, daher wurde das gewonnene Filtrat verworfen.

Im gleichen Reaktionsgefäß erfolgte der erste Waschschrift mit der Waschlösung HS. Von ihr wurden 500 µl in die Säule R gegeben und anschließend bei 11.000 x *g* für 1 min zentrifugiert. Das gewonnene Filtrat wurde samt Reaktionsgefäß verworfen.

Im zweiten Waschschrift mit der Waschlösung LS wurden 700 µl in die Säule R gegeben, selbige in einem neuem Reaktionsgefäß liegend, und anschließend bei 11.000 x *g* für 1 min zentrifugiert. Das gewonnene Filtrat wurde samt Reaktionsgefäß verworfen.

Um die restlichen Spuren des Ethanol zu entfernen wurde, in einem neuen Reaktionsgefäß liegend, die Säule R nochmals für 3 min bei 11.000 x *g* zentrifugiert. Das gewonnene Filtrat wurde samt Reaktionsgefäß verworfen.

Die RNA, auf Säule R gebunden, wurde in den vorab beschrifteten "Elution Tubes" gelöst. In die Säule R, liegend im 1,5 ml Elution Tube, wurde dazu vorsichtig 80 µl des RNase freien Wassers auf die Säulenmembran pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 min erfolgte die Zentrifugation mit 15.000 x *g* für 1 min.

Die Proben wurden anschließend bis zur RNA - Konzentrationsbestimmung wieder auf Eis gelagert.

2.3.4. Methode 3 - Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit

Die hier verwendeten Komponenten sind, bis auf ein paar Ausnahmen, separat erwähnt, im Kit (Bio-Rad) bereits enthalten und wurden entsprechend verwendet. Das Konzentrat der Waschlösung "Low stringency wash solution" wurde entsprechend der Anleitung mit 80 ml absoluten Ethanol (Merck) versetzt. Des Weiteren wurde absoluter Ethanol (Merck) genutzt, um 70% Ethanol durch die korrekte Mischung mit UltraPure™ DNase/RNase freiem destilliertem Wasser (Thermo Fisher Scientific) zu erzeugen.

Zu jedem Zellysat fügte man 200 µl Chloroform (Sigma-Aldrich) hinzu und schüttelte dieses 15 s händisch. Während der Inkubationsphase von 5 min bei Raumtemperatur wurden die Proben zusätzlich gelegentlich geschüttelt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Proben für mindestens 15 min bei 15.000 x g und 4°C.

Durch die Zentrifugation entsteht eine dreischichtige Auftrennung der Proben. Die oberste farblose Schicht, eine wässrige wirkende Lösung, beinhaltet die RNA, diese überführte man vorsichtig in ein 2,0 ml Eppendorf Safe-Lock Tube (PCR-clean, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die weißliche, dünne Interphase und tieferliegende rötliche Schicht, die organische Phase, wurden dabei intakt gelassen und nicht überführt.

Nach der Transferierung der wässrigen Phase wurden 600 µl 70%iges Ethanol hinzugefügt und per Pipette gut vermischt.

Die RNA-Ethanol-Lösung transferierte man anschließend in eine RNA bindende Säule, in einem 2.0 ml liegendes Waschgefäß. Der vollständige Transfer erfolgte in mehreren Schritten beginnend mit 700 µl und anschließend erfolgte die Zentrifugation bei Raumtemperatur für 1 min bei 15.000 x g. Das Filtrat wurde nach jedem Schritt verworfen.

Danach füllte man die RNA bindenden Säulen mit jeweils 700 µl „Low stringency“ Waschlösung und zentrifugierte diese bei Raumtemperatur für 30 s bei 15.000 x g. Das gewonnene Filtrat wurde verworfen.

Für den enzymatischen Verdau mit DNase I, anwendungsfertig aliquotiert und bei -20°C gelagert, wurden 80 µl des Enzyms vorsichtig auf die Säulenmembran pipettiert. Durch den Verdau mit DNase I wird gewährleistet, dass eine bestehende Kontaminierung mit genomischer DNA minimiert wird.

Nach einer Inkubationsphase von 15 min bei Raumtemperatur erfolgten zwei weitere Waschschrte.

Der erste Waschschrte erfolgte mit der „High stringency“ und der zweite mit der Low stringency“ Waschlösung. Die Säulen wurden bei jedem Schrrte mit jeweils 700 µl der entsprechenden Waschlösung gefüllt und bei Raumtemperatur für 30 s bei 15.000 x g zentrifugiert. Das gewonnene Filtrat wurde bei beiden Schritten jeweils verworfen.

Die RNA-Säule wurde in ein, vorab beschriftetes, 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Zur RNA-Eluierung wurden vorsichtig 40 µl des RNase freien Wassers auf die Säulenmembran pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 min erfolgte, bei Raumtemperatur, die Zentrifugation mit 15.000 x g für 2 min. Dieser Schrrte wurde einmal wiederholt um ein Gesamtvolumen von 80 µl zu erhalten.

Die Proben wurden anschließend bis zur RNA - Konzentrationsbestimmung wieder auf Eis gelagert.

2.3.5. Methode 4 - RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit

Entsprechend der Herstellerangaben (Qiagen) wurde vorab das Konzentrat des RPE Puffers mit dem vierfachen Volumen an absolutem Ethanol (Merck) versetzt. Alle hier verwendeten Komponenten, bis auf das Ethanol, sind im Kit bereits enthalten und wurden entsprechend verwendet.

Zur Degradierung der Proteine und zur Inaktivierung von Ribonukleasen im Zellysat wurde das Enzym Proteinase K verwendet. Für diesen Schritt wurden zuerst 590 μ l RNase freies Wasser und anschließend auch noch 10 μ l der Proteinase K hinzugefügt und gut vermischt. Dieses Gemisch wurde dann für 10 min bei 55°C im Thermomixer comfort (Eppendorf) erhitzt.

Nach dieser Inkubationsphase wurde die Proben für mindestens 3 min bei 10.000 x g und 20-25°C zentrifugiert, wodurch sich an den Reaktionsgefäßböden kleine gelartige Pellets bildeten.

Der klare, wässrig wirkende Überstand, ca. 900 μ l, wurde sehr vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock Tube (PCR-clean, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt ohne die Integrität des Pellet dabei zu verletzen, da dieser ungewünschtes Zellmaterial beinhaltet wie z.B. degradiertes Protein, welches die Effizienz der gesamten RNA - Isolierung minimieren könnte. Der Überstand wurde anschließend mit 450 μ l absolutem Ethanol gut gemischt und das Gefäß mit dem Pellet verworfen.

Die gewonnene RNA-Ethanol-Lösung wurde als nächstes auf die RNA-bindende Säule "RNeasy Mini spin column" übertragen, welche dafür in einem 2.0 ml RNase freiem Mikroreaktionsgefäße (sog. Eppi) lag. Zuerst wurden 700 μ l der Probe auf die Säule transferiert und bei 20-25°C, für 15 s mit 15.000 x g zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Dieser Schritt der RNA-Transferierung erfolgte wiederholt bis das gesamte Probenmaterial filtriert wurde.

Als nächstes wurde die Säule mit 350 μ l RW1 Puffer gewaschen und bei 20-25°C, für 15 s mit 15.000 x g zentrifugiert, das entstandene Filtrat verworfen.

Um eine bestehende Kontaminierung mit genomischer DNA zu minimieren wurde die Probe enzymatisch mit DNase I verdaut. Dafür setzte man eine DNase I-Stocklösung, für jede Probe, mit 10 µl und 70 µl RDD Puffer an. Dieses DNase I-Gemisch von 80 µl wurde vorsichtig auf die Säulenmembran pipettiert und für 15 min im Thermomixer comfort (Eppendorf) auf 25°C erwärmt.

Nach dieser Inkubationsphase wurde die Säule mit 350 µl RW1 Puffer gewaschen und bei 20-25°C, für 15 s mit 15.000 x g zentrifugiert. Das entstandene Filtrat wurde verworfen und es folgten zwei Waschschrirte.

Beide Waschschrirte erfolgten, indem 500 µl des RPE Puffers auf die Säule aufgetragen, bei 20-25°C für 15 s mit 15.000 x g zentrifugiert und das entstandene Filtrat verworfen wurden. Eine anschließende dritte Zentrifugation, mit gleichen Parametern wie zuvor, wurde durchgeführt, um zu gewährleisten, dass keine Rückstände des RPE Puffers in der Säule sind.

Die RNA-Säule wurde in ein, vorab gut beschriftetes RNase freie, 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Zur RNA-Eluierung wurden vorsichtig 40 µl des RNase freien Wassers auf die Säulenmembran pipettiert und bei 20-25°C für 1 min mit 15.000 x g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt um ein Gesamtvolumen von 80 µl zu erhalten.

Die Proben wurden anschließend bis zur RNA - Konzentrationsbestimmung wieder auf Eis gelagert.

2.4. RNA-Quantifizierung (Photometrisch)

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde das NanoDrop Lite UV- Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) verwendet.

Das Gerät ermöglicht die Bestimmung der Konzentrationen über die Messung der optischen Dichte. Das Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren, wie von RNA oder DNA, erfolgt bei einer Wellenlänge von 260 nm und von Proteinen bei 280 nm. Das Verhältnis der Absorption (A) 260/280 liefert bereits erste Indizien auch über die Qualität der Probe. Generell werden Proben mit einem Verhältnis von ~ 1,8 eher als reine DNA betrachtet und für RNA beträgt dieses Verhältnis eher ~ 2,0.

Über die Gerätesteuerung wurde die Konfiguration für RNA-Messung aufgerufen. Zur Kalibrierung des Gerätes wurden entweder 2 µl UltraPure™ DNase/RNase freiem destilliertem Wasser (Thermo Fisher Scientific) oder die vom Kit zur Verfügung gestellte Elutionslösung verwendet. Für jede Methode wurde das Gerät separat kalibriert.

Von jeder Probe wurden anschließend ~2 µl zur Analyse verwendet. Abschließend wurden 2 µl vom Kalibrierungswasser nochmals zur Verifizierung der bisherigen Ergebnisse überprüft.

2.5. RNA Qualitätsanalyse mittels Chip Elektrophorese

Um die Integrität der RNA genau beurteilen zu können, wurden alle RNA-Proben an das Genzentrum der LMU, Arbeitsgruppe Blum, übergeben. Dort fand die Analyse der Proben mittels des Agilent 2100 Bioanalyser und dem dazugehörigen RNA 6000 Nano Kit (Agilent, Technologies Santa Clara, CA USA) nach Herstellerangaben statt.

2.5.1. Prinzip der Lab-on-Chip-Technologie

Das Prinzip dieser Lab-On-Chip Systeme, wie des Agilent 2100 Bioanalyser Systems ist, dass RNA-Fragmente größenabhängig per Elektrophorese durch ein Chip internes polymergefülltes System aus Mikrokanälen aufgetrennt werden. Das fast gleiche Prinzip der RNA- Auftrennung wird auch bei der Gelelektrophorese genutzt, welches als das eigentliche Standardverfahren zum Nachweis von DNA oder RNA-Fragmenten zählt. Allerdings unterscheiden sich beide Systeme grundlegend im Visualisierungsverfahren. Bei der Standard- Gelelektrophorese setzt man auf Interkalationsfarbstoffe wie dem krebserregenden Ethidiumbromid (EtBr) welches unter UV- Licht ($\lambda=360\text{nm}$)

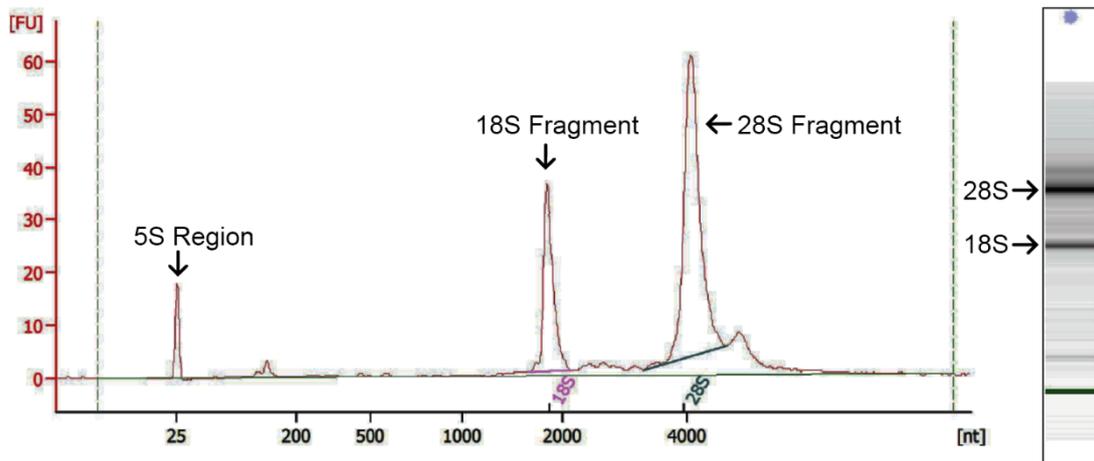


Abbildung 13: Elektropherogramm und virtuelles Gel

Im linken Diagramm abgebildet ein Elektropherogramm mit einem berechneten RIN von 10,0. Die 5S Region beinhaltet kleine rRNA Fragmente wie 5S rRNA sowie tRNA. Rechts abgebildet, dass zum Elektropherogramm korrespondierende virtuelle Gel mit den 28S und 18S Fragmenten gekennzeichnet.

sichtbar gemacht werden kann und interpretiert werden muss. Für einzelne Nukleinsäurestränge, wie ssDNA oder RNA, ist diese Methode mit EtBr allerdings nicht sehr sensitiv und benötigt, um äquivalent zur dsDNA Färbung zu sein, bis zur zehnfachen Menge an Nukleinsäuren.

Das Chip-System hat in seinem Polymergeflecht einen RNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff der, durch einen Laser induziert, angeregt und mittels eines computergestützten Videosystems ausgelesen wird. Die Software des Agilent 2100 Bioanalyzer ermöglicht somit eine optimale und objektive Berechnung der Fragmentgröße sowie der Konzentration. Die graphische Darstellung kann in zwei Formen erfolgen, entweder als virtuelles Gelbild oder als ein Elektropherogram bei dem die Fluoreszenzintensität gegen die Fragmentgröße pro Migrationszeit dargestellt wird, siehe dazu **Abbildung 13** [Schroeder 2006, Technologies 2005, Thermofisher 2017].

2.5.2. Bestimmung der RNA – Integrität

Ein großer Vorteil des Chip-Systems ist die relativ einfache Bestimmung der RNA- Integrität. Zum einen benutzt dieses Verfahren, wie auch das der Gelelektrophorese, das Verhältnis der eukaryotischen rRNA-Fragmente 28S- rRNA:18S- rRNA zueinander. Ist dieses Verhältnis größer 2,0 wird die RNA- Qualität zumeist als optimal betrachtet. Um allerdings eine noch genauere Aussage über die Qualität zu erhalten, liefert ein Softwarealgorithmus ein deutlich präziseres und aussagekräftigeres Ergebnis. Der Algorithmus bewertet die vorliegende Probe mit einer sogenannten "RNA Integrity Number" (RIN) die zwischen 1 und 10 liegt. Beträgt der RIN 10,0 liegt die RNA in sehr hoher Qualität vor und ist weder degradiert noch fragmentiert, während RNA mit einer RIN von 1,0 das Gegenteil bedeutet [Becker 2009, Imbeaud 2005, Schroeder 2006]. Zur Veranschaulichung werden Beispiele für die unterschiedlichen RIN-Werte in der nächsten **Abbildung (14)** illustriert.

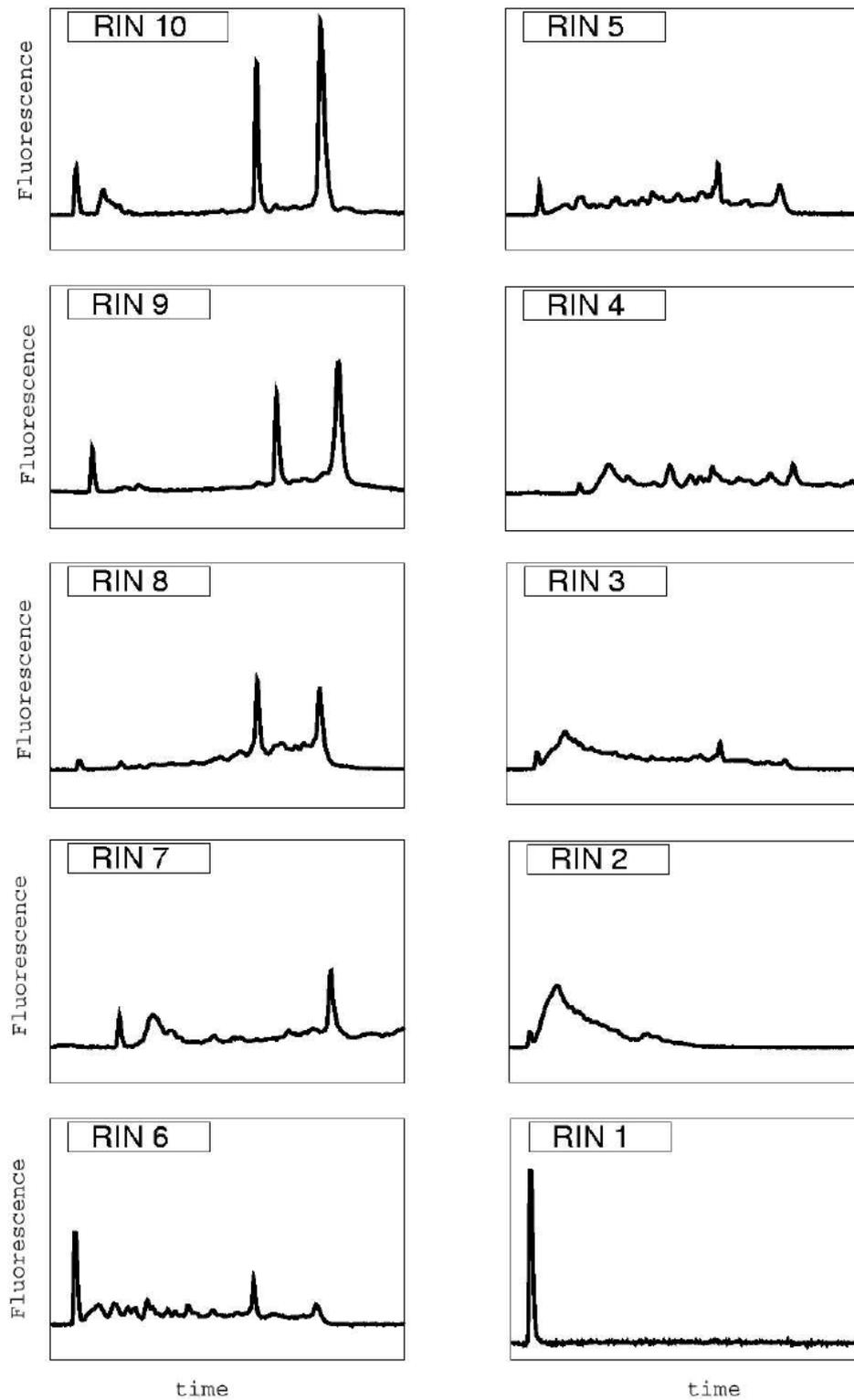


Abbildung 14: Darstellung der RIN von 10 bis 1, Quelle: Schroeder [2006]
 Völlig intakte RNA hat einen RIN von 10 und völlig degradierte einen RIN von 1. Die graduelle Degradierung der rRNA erfolgt in Richtung kleiner Fragmentgrößen.

2.6. Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mit der Software PASW Statistics 18 (Version 18, SPSS, Chicago, IL USA). Für die deskriptive Statistik wurden die Daten entsprechend ihrem Mittelwert und der dazugehörigen Standardabweichung angegeben. Um Unterschiede zwischen den gemessenen Methoden genauer bewerten zu können, wurde ein multipler Vergleichstest (Post-Hoc-Test) im Rahmen einer Varianzanalyse nach Tukey-HSD (honest significant difference) durchgeführt. Die Tests wurden für Signifikanzniveaus von 5% ($p < 0,05$) und von 1% ($p < 0,01$) durchgeführt. Des Weiteren wurde Excel von Microsoft für die graphische Visualisierung genutzt.

3. Ergebnisse

3.1. Methode 1 - Trizol-Methode

Die RNA-Konzentrationsbestimmung (**Abbildung 15**) ergab im Mittel, gemessen mit dem NanoDrop, für die OA-Proben 122,88 ng/µl und die non-OA-Proben 87,48 ng/µl. Statistisch zeigt dieses System, dass sich die OA-Proben mit einer ca. 40% höheren RNA-Konzentration signifikant zu den non-OA-Proben unterscheiden ($p < 0,01$). Die mit dem Agilent 2100 Bioanalytiker analysierten Proben zeigten generell eine höhere Konzentration (OA: 130,50 ng/µl; non-OA: 104,50 ng/µl), dennoch sind diese Konzentrationsunterschiede von ca. 20% nicht signifikant ($p=5,33\%$) (Individualdaten siehe Anhang 9.1 und 9.2).

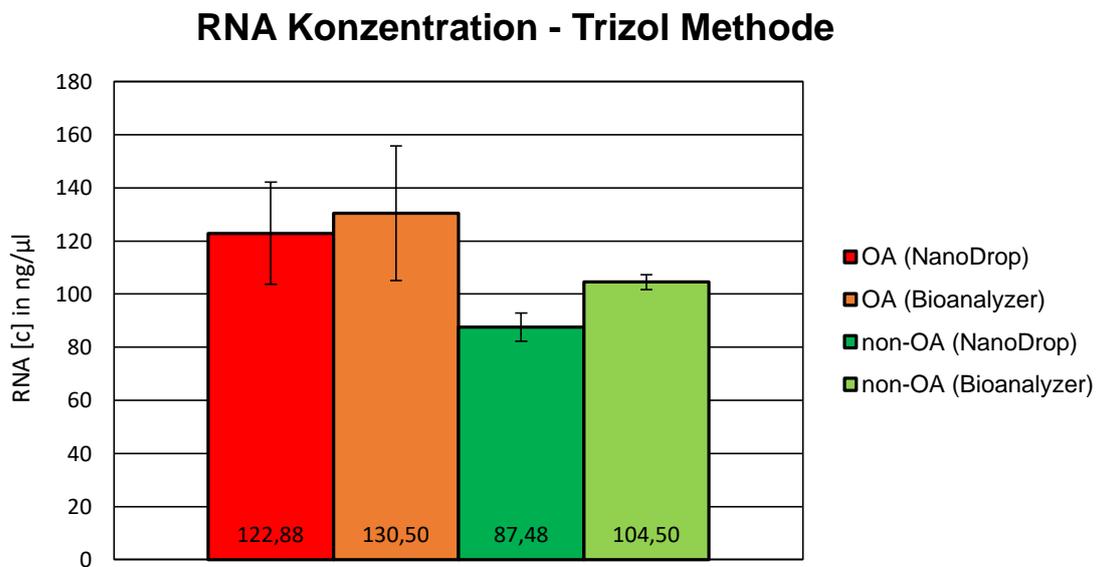


Abbildung 15: Ergebnis der RNA-Konzentrationsbestimmung der Methode 1

Die spektrophotometrisch ermittelten Ratio A260/A280 Werte zeigten im Mittel für die OA-Proben einen Wert von 1,88 und für die non-OA-Proben einen Wert von 1,84.

Die Analyse rRNA 28s/18s Ratio, per Elektropherogramm, zeigten im Mittel für die OA-Proben einen Wert von 1,86 und für die non-OA-Proben einen Wert von 1,87.

Die ermittelte RNA Integrität, zeigte im Mittel für die OA-Proben einen Wert von 9,97 und für die non-OA-Proben einen Wert von 9,68.

3.2. Methode 2 - innuPREP RNA Mini Kit

Die RNA-Konzentrationsbestimmung (**Abbildung 16**) ergab im Mittel, gemessen mit dem NanoDrop, für die OA-Proben 132,12 ng/µl und die non-OA-Proben 77,20 ng/µl. Statistisch zeigte dieses System, dass sich die OA-Proben mit einer ca. 71% höheren RNA-Konzentration signifikant zu den non-OA-Proben unterschieden ($p < 0,01$). Die mit dem Agilent 2100 Bioanalytiker analysierten Proben zeigten generell eine niedrigere Konzentration (OA: 87,50 ng/µl; non-OA: 44,00 ng/µl), hier sind die Konzentrationsunterschiede mit fast 99% mehr RNA in den OA-Proben signifikant ($p < 0,01$) (Individualdaten siehe Anhang 9.3 und 9.4).

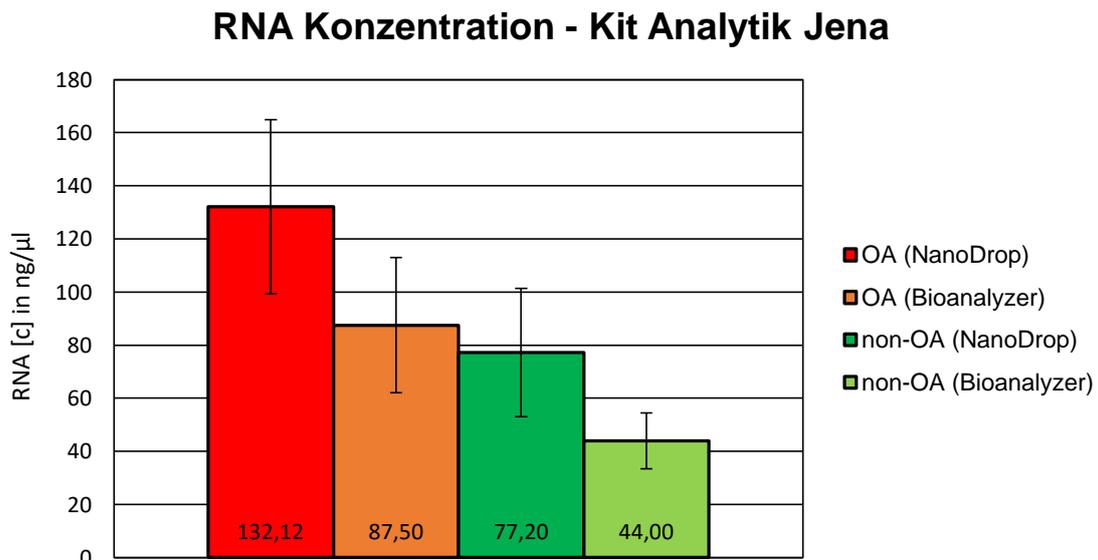


Abbildung 16: Ergebnis der RNA-Konzentrationsbestimmung von Methode 2

Die spektrophotometrisch ermittelten Ratio A260/A280 Werte zeigten im Mittel für die OA-Proben einen Wert von 2,07 und für die non-OA-Proben einen Wert von 2,04.

Die Analyse rRNA 28s/18s Ratio, per Elektropherogramm, zeigten im Mittel für die OA-Proben einen Wert von 2,40 und für die non-OA-Proben einen Wert von 2,48.

Die ermittelte RNA Integrität, zeigte im Mittel für die OA-Proben einen Wert von 9,93 und für die non-OA-Proben einen Wert von 9,83.

3.3. Methode 3 - Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit

Die RNA-Konzentrationsbestimmung (**Abbildung 17**) ergab im Mittel, gemessen mit dem NanoDrop, für die OA-Proben 121,25 ng/µl und die non-OA-Proben 76,98 ng/µl. Statistisch zeigte dieses System, dass sich die OA-Proben mit einer ca. 58% höheren RNA-Konzentration signifikant zu den non-OA-Proben unterschieden ($p < 0,01$). Die mit dem Agilent 2100 Bioanalyser analysierten Proben zeigen generell eine niedrigere Konzentration (OA: 108,67 ng/µl; non-OA: 67,33 ng/µl), auch hier sind die Konzentrationsunterschiede mit fast 61% mehr RNA in den OA-Proben signifikant ($p < 0,01$) (Individualdaten siehe Anhang 9.5 und 9.6).

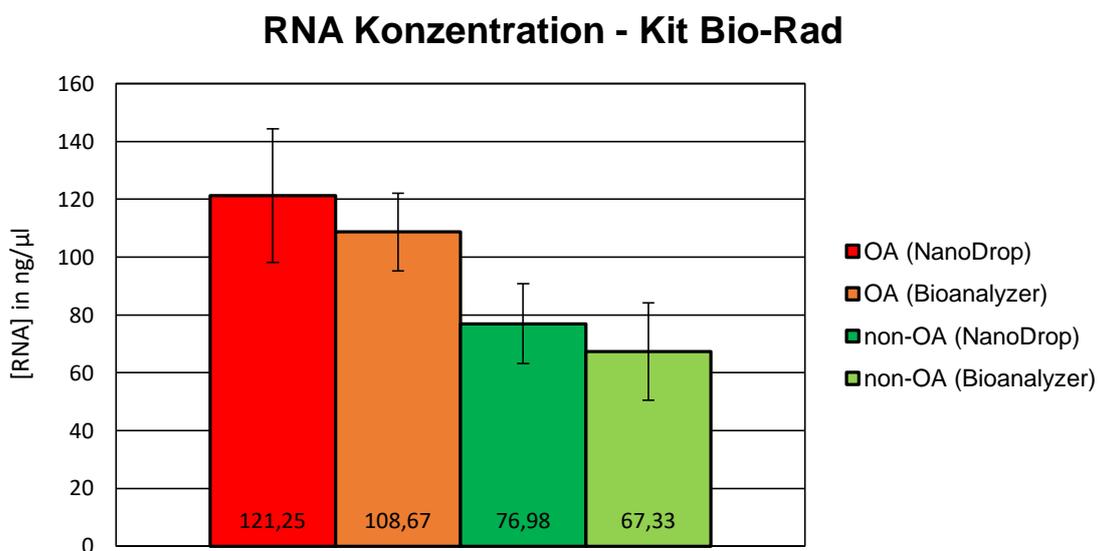


Abbildung 17: Ergebnis der RNA-Konzentrationsbestimmung von Methode 3

Die spektrophotometrisch ermittelten Ratio A260/A280 Werte zeigten im Mittel für die OA-Proben einen Wert von 2,01 und für die non-OA-Proben einen Wert von 2,08.

Die Analyse rRNA 28s/18s Ratio, per Elektropherogramm, zeigten im Mittel für die OA-Proben einen 2,08 und für die non-OA-Proben einen Wert von 2,30.

Die ermittelte RNA Integrität, zeigte im Mittel für die OA-Proben einen Wert von 9,30 und für die non-OA-Proben einen Wert von 9,26.

3.4. Methode 4 - RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit

Die RNA-Konzentrationsbestimmung (**Abbildung 18**) ergab im Mittel, gemessen mit dem NanoDrop, für die OA-Proben 148,62 ng/ μ l und die non-OA-Proben 96,28 ng/ μ l. Statistisch zeigte dieses System, dass sich die OA-Proben mit einer ca. 54% höheren RNA-Konzentration nicht signifikant zu den non-OA-Proben unterscheiden ($p=3,06\%$). Die mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer analysierten Proben zeigten nur eine etwas verminderte Konzentration für die OA-Proben, die anderen Werte sind relativ ähnlich (OA: 136,83 ng/ μ l; non-OA: 98,50 ng/ μ l). Die Konzentrationsunterschiede in diesem System mit fast 39% mehr RNA in den OA-Proben waren signifikant ($p < 0,01$) (Individualdaten siehe Anhang 9.7 und 9.8)

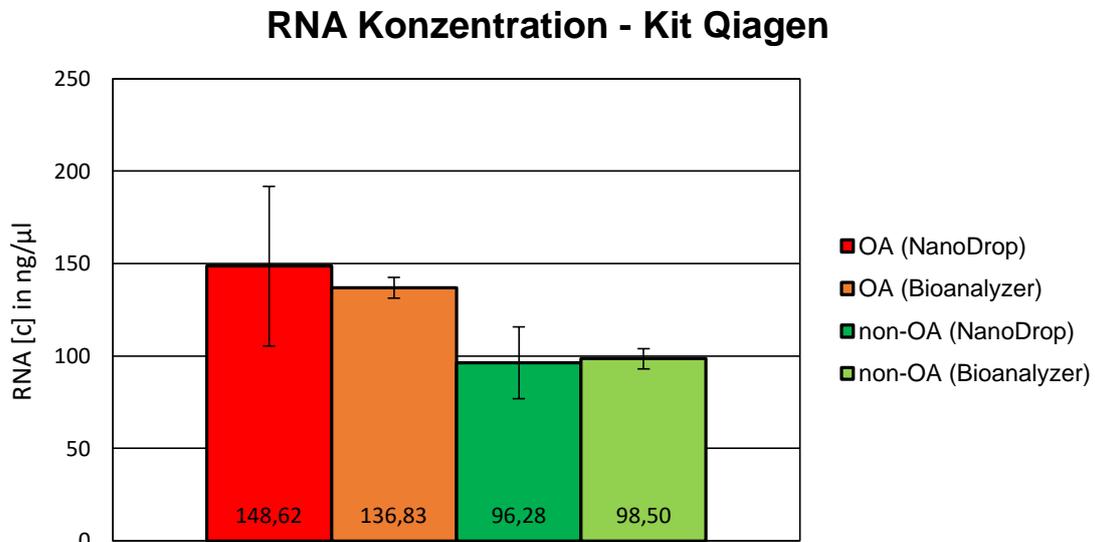


Abbildung 18: Ergebnis der RNA-Konzentrationsbestimmung von Methode 4

Die spektrophotometrisch ermittelten Ratio A260/A280 Werte zeigten im Mittel für die OA-Proben einen Wert von 1,98 und für die non-OA-Proben einen Wert von 1,99.

Die Analyse rRNA 28s/18s Ratio, per Elektrophenogramm, zeigten im Mittel für die OA-Proben einen 2,62 und für die non-OA-Proben einen Wert von 2,65.

Die ermittelte RNA Integrität, zeigte im Mittel für die OA-Proben einen Wert von 9,35 und für die non-OA-Proben einen Wert von 9,16.

3.5. Methoden im Vergleich

3.5.1.1. RNA-Quantität

Die RNA-Quantifizierung erfolgte zweimalig, zu einem direkt nach der RNA-Isolation per NanoDrop und später nochmals im Genzentrum der LMU per Agilent 2100 Bioanalyzer.

Unabhängig von den verwendeten Geräten wird in **Abbildung 19** gezeigt, dass die RNA-Konzentration in den OA-Proben im Vergleich zu den non-OA-Proben deutlich zwischen 24 % und fast 100 % erhöht waren. Um genauere statistische Aussagen bzgl. der quantitativen Ausbeute der jeweiligen Methode zu treffen, wurden die Kits untereinander in den Kategorien OA- und non-OA-Proben verglichen.

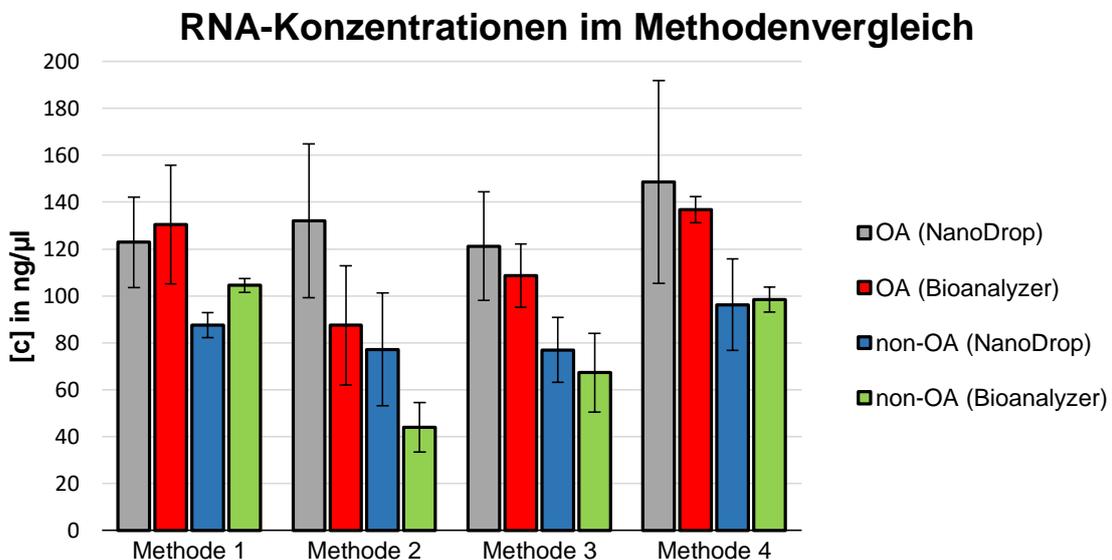


Abbildung 19: Ergebnis der RNA-Konzentrationen im Methodenvergleich
Methode 1 = Trizol - Methode; Methode 2 = Kit Analytik Jena; Methode 3 = Kit Bio-Rad, Methode 4 = Kit Qiagen

Die mit Hilfe des NanoDrop ermittelten Konzentrationen zeigten keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,01$) zwischen den einzelnen Methoden weder für die OA noch für die non-OA-Proben. Im Vergleich dazu zeigte die Auswertung der Bioanalyzer-Daten zum Teil signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) zwischen den einzelnen Methoden. Die OA-Proben zeigten bei der RNA-Isolation keine signifikanten Unterschiede zur Trizol-Methode (Methode 1). Allerdings zeigte

Methode 2 mit einen p-Wert von 1,49 % keinen signifikanten Unterschied, aber dennoch einen tendenziellen Unterschied aufgrund der geringeren RNA-Ausbeute (87,5 ng/µl). Im Gegensatz dazu steht Methode 4, mit der die höchsten Konzentrationen generiert werden konnten mit 136-148 ng/µl. Dadurch hob sich Methode 4 signifikant ($p < 0,01$) von den Methoden 2 und 3 ab. Bei non-OA-Proben gab es zumeist signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) zur Trizol-Methode, außer zur Methode 4 (98,50 ng/µl), da hier die größte RNA-Ausbeute mit 104,50 ng/µl generiert werden konnte. Die Methoden 2 und 3 lieferten mit 44,00 ng/µl und 67,33 ng/µl im Vergleich zu den Methoden 1 und 4 signifikant ($p < 0,01$) geringere RNA-Mengen.

Um eine Wertung über die einzelnen Methoden zu generieren, erfolgte die Platzierung der Methode mit der höchsten Konzentration bei Platz 1 und entsprechend absteigender Konzentration erfolgten die weiteren Platzierungen. Dementsprechend kann aus der folgenden **Tabelle 3** entnommen werden, dass mit Hilfe von Methode 4 (RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit von Qiagen) die meiste RNA gewonnen wurde und die Trizol-Methode den zweiten Platz belegte.

	Platz 1	Platz 2	Platz 3	Platz 4
Methode	4	1	3	2
[c] in ng/µl	120,1	111,3	93,6	85,2
Punkte	4	3	2	1

Tabelle 3: Platzierung der Methoden nach Quantität

3.5.1.2. Qualitätsbestimmung mittels rRNA 28s/18s Fragmentverhältnis

Statistisch wurde das rRNA 28s/18s Fragmentverhältnis untersucht innerhalb der Kategorien der OA- und non-OA-Proben, siehe **Abbildung 20**. In beiden Kategorien zeigte die Trizol-Methode die niedrigsten Werte in der Kategorie OA mit einem Wert von 1,86 und für non-OA einen Wert von 1,87. Signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) gibt es unabhängig von der Kategorie zu allen anderen Methoden, nur in der Kategorie OA der Methode 3 gab es keine Signifikanz ($p=0,18$). Des Weiteren zeigte Methode 4 für beide Kategorien die höchsten Werte für die OA-Proben mit 2,62 und für die non-OA-Proben mit 2,65. Bei einem

p-Wert von 5 % unterschieden sich von Methode 4, unabhängig der Kategorie, die Methoden 2 und Methode 3. Allerdings änderte sich dies, wenn der p-Wert auf 1 % gesenkt wird. In diesem Fall zeigte in der Kategorie OA nur Methode 2 signifikant geringere Werte. In der Kategorie non-OA zeigte nur Methode 3 signifikant geringere Werte als Methode 4.

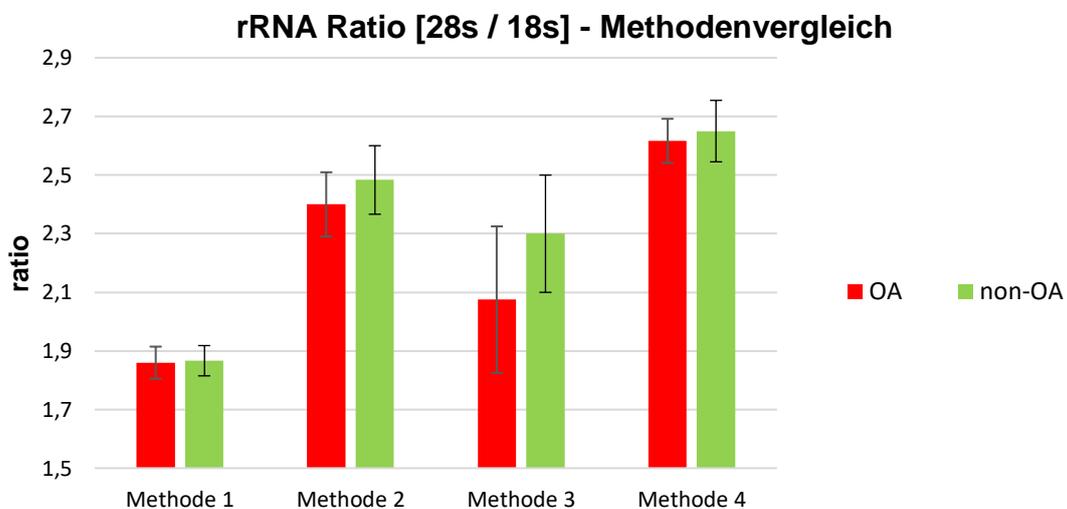


Abbildung 20: rRNA 28s/18s-Fragmentverhältnis im Methodenvergleich
 Methode 1 = Trizol - Methode; Methode 2 = Kit Analytik Jena; Methode 3 = Kit Bio-Rad,
 Methode 4 = Kit Qiagen

Um eine Wertung über die einzelnen Methoden zu generieren, erfolgte die Platzierung der Methode mit dem höchsten rRNA 28s/18s-Fragmentverhältnis auf Platz 1 und entsprechend absteigenden Verhältnis erfolgten die weiteren Platzierungen. Dementsprechend kann aus der folgenden **Tabelle 4** entnommen werden, dass Methode 4 (RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit von Qiagen) das höchste Fragmentverhältnis aufwies und Platz 1 belegt. Die Trizol-Methode hingegen belegte den letzten Platz.

	Platz 1	Platz 2	Platz 3	Platz 4
Methode	4	2	3	1
ratio 28s/18s	2,63	2,44	2,19	1,86
Punkte	4	3	2	1

Tabelle 4: Platzierung der Methoden nach rRNA 28s/18s Verhältnis

3.5.1.3. RNA-Qualität mittels RNA Integrity Number

Statistisch wurde die RNA Integrity Number innerhalb der Kategorien der OA- und non-OA-Proben untersucht, siehe **Abbildung 21**. Die Trizol-Methode zeigte für die OA-Proben mit einem RIN-Wert von 9,97 signifikant ($p < 0,01$) höhere Werte im Vergleich zur Methode 3 und Methode 4. In der Kategorie der non-OA-Proben zeigte nur Methode 4 signifikant ($p < 0,01$) schlechtere Werte als Methode 1. Im Vergleich der Methoden 2 bis 4 ist auffällig, dass Methode 2 zumeist signifikant ($p < 0,01$) höhere Werte, unabhängig der Kategorie, aufweist. Einzige nicht signifikante Ausnahme ($p=0,029$) ist Methode 3 aus der non-OA Kategorie.

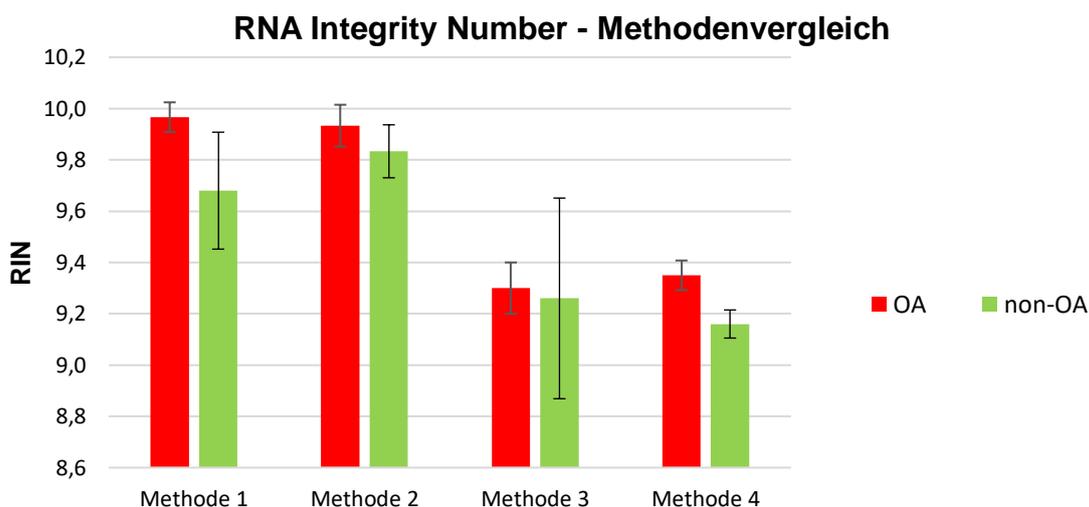


Abbildung 21: RNA Integrity Number im Methodenvergleich
 Methode 1 = Trizol - Methode; Methode 2 = Kit Analytik Jena; Methode 3 = Kit Bio-Rad,
 Methode 4 = Kit Qiagen

Um eine Wertung über die einzelnen Methoden zu generieren, erfolgte die Platzierung der Methode mit dem höchsten RIN-Wert auf Platz 1 und entsprechend absteigenden Werten erfolgten die weiteren Platzierungen. Dementsprechend kann aus der folgenden **Tabelle 5** entnommen werden, dass Methode 2 (innuPREP RNA Mini Kit von Analytik Jena) den höchsten RIN-Wert aufwies und somit Platz 1 belegte. Die Trizol-Methode hingegen belegte Platz 2.

	Platz 1	Platz 2	Platz 3	Platz 4
Method	2	1	3	4
RIN	9,88	9,82	9,28	9,26
Punkte	4	3	2	1

Tabelle 5: Platzierung der Methoden nach RIN

4. Diskussion

Bisher ist es ein gängiges Problem, Chondrozyten – RNA aus frischem Knorpelgewebe zu beziehen. Um die Chondrozyten aus ihrer Matrixstruktur zu lösen und zu homogenisieren, muss viel Arbeit in diesen Prozess gesteckt werden, was meist zu Lasten der RNA Integrität geht [Le Bleu 2017, Ruettinger 2010]. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass man mit dem herkömmlichen Verfahren nur maximale RIN-Werte von 7 erreichte. Ein deutlich RNA schonendes Verfahren für die Chondrozytenisolation ist der enzymatische Verdau mit Proteasen und Kollagenasen [Le Bleu 2017, Redeker 2017]. Da man die Zellen als Monolayer kultivierte, bestand die Gefahr, dass sie ihren charakteristischen Phänotyp verlieren, wenn die Passagenanzahl zu hoch würde. Um eine ausreichende Menge an Ausgangsmaterial zu haben, wurden die verwendeten Zelllinien bis zur zweiten Passage überführt. Allerdings sollten hier die Effekte auf das Genexpressionsmuster nur marginal verändert sein [Ma 2013]. Letzteres ist eine wichtige Voraussetzung für die grundlegende molekulare Erforschung von Chondrozyten und deren pathologische Veränderungen. Eine ausreichende Menge an geeignetem Ausgangszellmaterial ist allerdings noch kein Garant dafür, dass auch RNA mit optimaler Quantität und Qualität für die jeweilige Untersuchungsmethode und Fragestellung gewonnen werden kann.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Trizol-Methode zur RNA-Extraktion mit den 3 Kits von unterschiedlichen, aber sehr gut etablierten, Herstellern zu vergleichen um eine Hilfestellung für die molekulare Chondrozytenerforschung anzubieten.

4.1. Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Alle 4 Methoden lieferten für weitere Untersuchungen nutzbare Chondrozyten RNA bezüglich Quantität und Qualität. Dennoch ist es wichtig vorab zu wissen, welcher RNA-Typ nach der Isolation untersucht werden soll. Durch die Säulen-aufreinigung, welche jedes verwendete Kit nutzt, werden RNA-Fragmente mit weniger als 200 Nukleotiden entfernt, was somit z.B. auch tRNAs betreffen würde. In Bezug auf die totale RNA, kann es laut Herstellerangaben, daher eine

Diskrepanz bis zu 20 % geben. Wäre es also gewünscht, kleinere Fragmente (< 200 Nukleotide) zu analysieren, wäre die Trizol-Methode den getesteten Kits wahrscheinlich überlegen, wie es auch in der Studie von Sultan et al. [2014] gezeigt wurde. In Korrelation mit den gewonnenen Konzentrationen, gemessen mit dem NanoDrop Lite, scheint es aber keine solch große Diskrepanz zu geben, zumindest nicht beim arthrotischen Zellen, da es hier keine großen Konzentrationsunterschiede gab.

Anders sieht es dafür bei den non-OA-Proben aus, da hier 2 Kits, eine bis zu 12 % geringere Konzentration zeigten. Da allerdings bei dem Kit von Qiagen eine 10 % höhere Konzentration als bei der Trizol-Methode vorlag, kann eine erhöhte Anzahl kleinerer RNA-Fragmente vermutlich ausgeschlossen werden. Ein Kriterium könnte eine unterschiedliche Säulenbeschaffenheit sein, wodurch evtl. diese mit abweichenden Filtereigenschaften die Konzentrationsunterschiede erklären könnte. Im Vergleich der RNA-Konzentration OA-Proben zu den non-OA Proben war auffällig, dass die OA-Proben unabhängig von der verwendeten Methode eine höhere Konzentration aufwiesen. Vermutlich ist dieser erhöhte RNA-Gehalt auf den durch Arthrose induzierten Reparaturmechanismus zurückzuführen, wodurch die Syntheseraten von Kollagen und Proteoglykanen gesteigert werden [Kirchner 2014, Scharf 2011, Sulzbacher 2013].

Nach Betrachtung der Quantität muss auch die Qualität berücksichtigt werden, dazu wurden das rRNA Verhältnis 28s/18s und die RIN-Werte bestimmt. Die Trizol-Methode zeigte das schlechteste rRNA 28s/18s Verhältnis, aber von den RIN-Werten zeigte es das zweitbeste Ergebnis.

Im Nachfolgenden, siehe **Tabelle 6**, zeigt die erstellte Übersicht die Platzierung der einzelnen Methoden in den Kategorien Konzentration, rRNA 28s/18s Verhältnis und den RIN-Werten. Die Platzierung erfolgte nach den gemessenen Ergebnissen, daher steht 4 für das beste Ergebnis in der Kategorie und 1 für das schlechteste.

	Methode 1	Methode 2	Methode 3	Methode 4
Kategorie	Erworbene Punkte			
RNA [c]	3	1	2	4
ratio 28s/18s	1	3	2	4
RIN	3	4	2	1
Summe	7	8	6	9
	Platz 3	Platz 2	Platz 4	Platz 1

Tabelle 6: Zusammenfassung der Platzierungen der einzelnen Methoden
Methode 1 = Trizol - Methode; Methode 2 = Kit Analytik Jena; Methode 3 = Kit Bio-Rad,
Methode 4 = Kit Qiagen

Die Platzierung der Methoden ist natürlich abhängig von der Gewichtung der bewerteten Kategorien. Bei der gewählten Gewichtung belegt die Trizol-Methode nur den dritten Platz. Zu erwähnen ist jedoch die Kategorie Kostenfaktor. Dieser ist separat in **Tabelle 7** aufgeführt, da er weder einen Einfluss auf die Qualität noch auf die Quantität der RNA hat, aber dennoch ein essentielles Kriterium für viele Wissenschaftler darstellt.

	Methode 1	Methode 2	Methode 3	Methode 4
Kosten pro Kit (50x Reaktionen)	~ €91,--	€193,--	€498,--	€379,--
Kosten für 1x Reaktion	~ €1,80	€3,86	€9,96	€7,58
	Platz 1	Platz 2	Platz 4	Platz 3

Tabelle 7: Kostenübersicht der einzelnen Methoden
Methode 1 = Trizol - Methode; Methode 2 = Kit Analytik Jena; Methode 3 = Kit Bio-Rad,
Methode 4 = Kit Qiagen

Das wahrscheinlich größte Risiko bei der Trizol-Methode besteht darin, dass ungeübtes Personal die Proben nicht nur einfach kontaminieren kann, es können zusätzlich Quantität und Qualität der Proben auch extrem fluktuieren. Als Beispiel dafür sei die Phasentrennung mit anschließender Überführung der wässrigen, RNA beinhaltenden Phase genannt, welche nur durch geübtes Personal in gleicher Güte reproduzierbar ist. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass in Studien, wie von Asai [2015], die Trizol-Methode im Bezug zur anderen kommerziellen Kits im Rahmen der RNA-Qualität schlechter abschnitt. Die Ergebnisse von Asai zeigten innerhalb der Trizol-Proben extreme Konzentrationsunterschiede, aber die verwendeten Kits zeigten gleichbleibende

Resultate. Dies lässt die Vermutung nahe, dass entweder der Trizol-Anwender nicht ausreichend geübt war oder Asais Trizol-Protokoll nicht genug optimiert wurde (für mehr Details siehe 4.2.1). Die Kits im Vergleich zur Trizol-Methode sind relativ unabhängig von der Erfahrung des Anwenders. Einsteigern fällt die Anwendung der Kits deutlich leichter und somit können, trotz mangelnder Erfahrung, sehr gute Erfolge bei der RNA-Isolierung verzeichnet werden.

Liegt der Schwerpunkt für die Analysen auf der Chondrozyten RNA-Qualität, ist das Kit von Analytika Jena an erster Stelle zu erwähnen, allerdings mit dem Kompromiss der geringsten Konzentration. Als Gesamtsieger, mit kleinen Einbußen bei den RIN-Werten, ist das Kit von Qiagen zu nennen.

4.2. Diskussion der Methoden

4.2.1. Methode 1 - Trizol-Methode

Die Trizol-Methode basiert auf der „Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction“, welche von Chomczynski und Sacchi [1987] entwickelt wurde. Die Namensgebung für die Trizol-Methode ermöglicht, vereinfacht dargestellt, nur die gleichzeitige Auftrennung von RNA, DNA und Proteinen in unterschiedliche Phasen [Rio 2010]. Entsprechend dem Protokoll der Single-Step-Methode [Chomczynski 1987, 2006] gibt es eine genaue Anleitung für den Ansatz der Denaturierungs-lösung. Allerdings fiel die Entscheidung eine sog. „ready-to-use“ Lösung zu benutzen, um die Anzahl an möglichen Fehlerquellen zu reduzieren. Abgesehen von den evtl. höheren Kosten bieten solch fertige Reagenzien, von etablierten Herstellern, viele Vorteile wie gleichbleibende Qualität, reduzierten Umgang mit gefährlichen Substanzen sowie verminderte Exposition zu diesen.

Auf dem Markt gibt es mehrere Hersteller von sogenannten „ready-to-use“ Lösungen bestehend aus Phenol, Guanidinthiocyanat und andere Substanzen, die zur Gewinnung der total-RNA, per Trizol-Methode, geeignet sind. Die vermutlich geläufigsten Produkte sind von Thermo Fischer Scientific unter dem Namen TRIzol[®] Reagenz und von Qiagen das QIAzol[®]Lysis Reagenz. Letzteres wurde, wie unter Kapitel 2.3.2 beschrieben, verwendet. Eine Aussage, ob eine andere „ready-to-use“ Lösung bessere oder schlechtere Ergebnisse für die Chondrozyten-RNA liefern würde, ist so nicht möglich. Da aber die Inhaltsstoffe sich generell auf das Protocol von Chomczynski und Sacchi beziehen, dürfte es vermutlich keine deutlich größeren Unterschiede geben. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass für Genexpression- oder MicroRNA-analysen beide Lösungen wie in der Studien von Vanhauwaert et al. [2016] oder von Pritchard et al.[2012] gleichwertig verwendet werden. Allerdings zeigte Oh et al. [2015] in deren Studie mit dem Titel „Comparison of Total RNA Isolation Methods for Analysis of Immune-Related microRNAs in Market Milks“ die besten Ergebnisse bzgl. RNA-Ausbeute und Homogenisierung per QIAzol[®]Lysis Reagenz. Da allerdings zu einem die RNA in Chondrozyten durch Lyse gewonnen werden

muss und in der Milch die RNA-Fragmente bereits frei vorliegen ist es fraglich, ob sich die Ergebnisse von Oh et al. [2015] auf die Isolierung von Chondrozyten-RNA übertragen lassen. Daher wurde eher eine Gleichwertigkeit beider Lösungen angenommen.

Das Protokoll zur Trizol-Methode nach Chomczynski und Sacchi [1987] befolgte man hiesigen Labor für Biomechanik und Experimentelle Orthopädie nicht exakt, da wie auch von Chomczynski in 2006 beschrieben, hohe Anteile von Polysaccharide und Proteoglykane bestimmte Protokollanpassungen erfordern. Das genutzte Protokoll, unter 2.2.7.1 beschrieben, wurde über mehrere Jahre am hiesigen Labor für die Isolierung von Chondrozyten RNA angepasst und optimiert. Die erzielten Ergebnisse im Vergleich zu den kommerziellen Kits suggerieren, dass die getroffenen Anpassungen sehr erfolgreich gewählt waren. Ein Beleg dafür sind die erzielten, kontinuierlich hohen RNA-Konzentrationswerte, wodurch die Trizol-Methode in dieser Kategorie den zweiten Platz belegte und somit eindeutig konkurrenzfähig zu den kommerziell erwerblichen Kits war. Sollten allerdings andere abgewandelte Protokolle nach Chomczynski für die Chondrozyten RNA-Isolierung genutzt werden, kann es durchaus sein, dass die Ergebnisse deutlich schlechter bzw. variabler ausfallen können.

Als Beispiel für ein evtl. nicht optimiertes Protokoll, welches nicht auf Chondrozyten bezogen ist, könnte man die Studie von Asai et al. [2015] mit dem Titel „High-quality RNA extraction from copepods for Next Generation Sequencing: A comparative study“ anführen. In dieser Studie vergleichen die Autoren auch die Trizol-Methode gegenüber ähnlichen Kits, wie die in dieser Arbeit verwendeten von BioRad (Aurum Total RNA Mini Kit) und Qiagen (RNeasy Micro Kit). Auffällig war in dieser Studie, dass die Kits ähnliche Werte für beide getesteten Geschlechter der Ruderfußkrebse aufwiesen, aber die Trizol-Methode extreme Unterschiede zeigte. Vielleicht hätte diese Diskrepanz in der Studie von Asai et al. durch Protokolloptimierung vermieden werden können und es wären vergleichbare Konzentrationsunterschiede wie bei den Kits beobachtet worden. Die in dieser Arbeit beschriebene Trizol-Methode zeigte gleichwertige

Konzentrationsverhältnisse im Vergleich zu den verwendeten Kits zwischen den OA- und non-OA-Proben, wodurch eine optimale Qualität des hiesigen Chondrozyten-Trizol-Protokolls als gewährleistet betrachtet werden kann.

Der qualitätsbestimmende Faktor für die Trizol-Methode ist eine optimale Durchführung des Methodenprotokolls. Im Gegensatz zu einigen Kits, gibt es bei dieser Methode weder einen enzymatischen Verdau der DNA noch eine Säulenaufreinigung. Diese in den Kits mitgelieferten protektiven Elemente sind bei der Standard Trizol-Methode nicht vorhanden, weshalb sich bereits kleine Unachtsamkeiten gravierend negativ auf die Qualität der RNA auswirken können. Die Hauptfehlerquellen wie DNA Kontaminierung und RNA Degradierung sind zumeist auf die versuchsdurchführende Person zurückzuführen. Eine DNA Kontaminierung kann leicht bei der Überführung der wässrigen Phase auftreten, indem auch nur geringe Mengen der anderen Phasen mit überführt werden. Um diese Fehlerquelle zu minimieren, könnte man natürlich weniger der RNA beinhaltenden Phase überführen, allerdings geht dies zu Lasten der Konzentration. Problematischer als eine DNA Kontaminierung ist die RNA-Degradierung, da sie alle weiteren, auf RNA basierenden Untersuchungsmethoden kompromittiert bzw. direkt unanwendbar macht. Daher ist es unabdingbar unabhängig von der Methode immer auf RNase freie Materialien zurückzugreifen und äußerst sauber zu arbeiten. Bei der Trizol-Methode ist die durchführende Person vollständig für die verwendeten Materialien zuständig. Daher muss der Versuchsdurchführende auch die Gefahr der RNase Kontaminierung durch Fremdeinflüsse, wie Mitbenutzung der gleichen Reaktionsgefäße und des Arbeitsplatzes durch Kollegen berücksichtigen. Die kommerziellen Kits haben den Vorteil, dass die meist sorgfältigen RNase frei abgepackten Materialien den fast vollständigen Versuchsbedarf abdecken, was die Gefahr der RNA Degradierung durch Fremdkontaminierung mindert.

Die gewonnen RNA-Proben werden meist genutzt, um genaue Aussagen über die Genexpression zu treffen. Das Next Generation Sequencing (NGS) ist dafür ein sehr geeignetes Hilfsmittel um die RNA-Sequenzen schnell zu entschlüsseln. Allerdings haben die durchführenden Genomzentren sehr hohe Anforderungen

an das Probenmaterial. Am Genomzentrum der Universität von Kalifornien, Davis [Richard 2018] gibt es sehr genaue Anforderungen wie z.B. dass ein DNase Verdau durchgeführt werden soll und die RIN Werte über 8 liegen müssen damit die Proben analysiert werden können. Die bedeutendste Forderung lautet, dass für die RNA-Isolierung kein Protokoll benutzt werden soll, welches Trizol oder Phenol beinhaltende Komponenten verwendet. Natürlich wird erwähnt, dass auch Trizol-Protokolle benutzt werden können, allerdings müsste zuvor auch eine Säulenaufreinigung stattfinden, um etwaige Phenolspuren zu entfernen. Dies ist auch sinnvoll, da Phenole irreversible Bindungen mit dem Phosphat-Backbone von RNA und DNA eingehen können und somit die molekularen Anwendungen wie z.B. Restriktionsverdau, PCR und auch das Sequenzieren negativ beeinflusst werden könnten [Healey 2014]. Möchte man die Gefahr der Phenol-Kontaminierung ausschließen, so wäre die Trizol-Standardmethode ohne eine zusätzliche Säulenaufreinigung obsolet.

Die Trizol-Methode nach Chomczynski und Sacchi, aus dem Jahr 1987, ist auch nach mehr als 30 Jahren eines der Standardverfahren für die RNA-Isolierung. Bei optimaler Durchführung und für das Gewebe perfekt angepasstem Protokoll ist es möglich, relativ kostengünstige Ergebnisse mit hervorragender Quantität und Qualität zu erzielen. Aber um dies zu gewährleisten, muss das Personal äußerst geübt, sorgfältig und gewissenhaft arbeiten. Daher sollte diese Methode nur von erfahrenen Wissenschaftlern durchgeführt werden und nicht wie in den meisten Studien von ungeübten Studenten.

4.2.2. Methode 2 - innuPREP RNA Mini Kit

Das Kit von Analytik Jena benutzt wie auch die Trizol-Methode Guanidiniumthiocyanat. Allerdings werden keine weiteren giftigen Substanzen wie Phenol, Chloroform oder β -Mercaptoethanol genutzt, was die Risiken für den Versuchsdurchführenden deutlich minimiert. Auffällig bei dem System ist, dass kein enzymatischer Verdau mit DNase genutzt wird. Stattdessen kommt eine Säulenaufreinigung mit einer speziellen Filtermembran (Spinfilter D) zum Einsatz, welche die vorhandene DNA vollständig entfernen soll. Diese elegante Lösung umgeht somit den enzymatischen Verdau, welcher bei den anderen Kits

genutzt wurde, und zugleich das fehleranfällige Abpipettieren der RNA-Phase bei der Trizol-Methode. Wie auch bei den anderen kommerziellen Kits kommt auch hier eine Säulenaufreinigung mit einer speziellen Filtermembran zum Einsatz welche die RNA bindet.

Das innuPREP RNA Mini Kit ist das anwenderfreundlichste Kit, da es aufgrund der zweifachen Säulenaufreinigung ohne zusätzlichen DNA-Verdau auskommt. Der Anwender benötigt für dieses Kit kaum Erfahrung, da die größten Fehlerquellen, wie z.B. das korrekte Abpipettieren der RNA-Phase, bei der Trizol-Methode vollständig entfallen.

4.2.3. Methode 3 - Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit

Das Kit von Bio-Rad basiert eindeutig auf dem entwickelten Trizol-Protokoll von Chomczynski. Das verwendete PureZol beinhaltet auch die Komponenten Phenol sowie Thiocyanat und ist somit artverwandt mit dem in den anderen Methoden verwendeten QIAzol. Bis auf β -Mercaptoethanol kommen die gleichen gesundheitsschädlichen Komponenten zum Einsatz wie bei der Trizol-Methode. Auch der fehleranfällige Schritt des Abpipettieren der RNA beinhaltenden Phase wird verwendet, welche anschließend per DNase Verdau aufbereitet wird. Im Gegensatz zur Trizol-Methode benutzt dieses Kit, wie auch die anderen hier verwendeten Kits, eine Säulenaufreinigung mit einer RNA bindenden Filtermembran.

Das Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit ist von der Handhabung besser als die Trizol-Methode, allerdings schlechter als die beiden anderen getesteten Kits. Begründet wird dies, wie bereits oben erwähnt, durch den fehleranfälligen Abpipettierungsschritt. Um einer DNA-Kontaminierungen und Phenolverunreinigung vorzubeugen, wie es bei der Trizol-Standardmethode vorkommen kann, werden in diesem Kit kompensatorische Maßnahmen durch Verdau und Säulenaufreinigung getroffen. Ein Problem, das bei dieser Methode nicht beseitigt wird, ist der mögliche RNA-Verlust, wenn der Kitanwender evtl. sicherstellen möchte, nur die RNA-Phase zu überführen und daher weniger nutzbares Material nützt.

4.2.4. Methode 4 - RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit

Das Kit von Qiagen bedient sich wie auch die Trizol-Methode dem Guanidiniumthiocyanat und dem β -Mercaptoethanol, aber weder Chloroform noch Phenol werden verwendet. Auffällig ist die gesonderte Verwendung der sehr potenten Serinproteinase K. Bereits Hilz et al. [1975] zeigten, dass die Proteinase K zwei wertvolle Eigenschaften besitzt welche sie bei der RNA – Isolierung nützlich macht. Zum einen werden Proteine verdaut welche die Proben kontaminieren. Zum anderen minimiert sie die RNA–Degradierung durch die Ribonukleasen, welche selber durch Degradierung inhibiert werden. Durch anschließende Abzentrifugation erhält man einen RNA beinhaltenden Überstand und am Gefäßboden ein kleines evtl. überhaupt nicht sichtbares Pellet aus Protein und anderen Zellbestandteilen. Hier besteht, wie auch bei der Trizol-Methode, die Gefahr, dass das Personal zu einer möglichen Fehlerquelle wird, da aus Sicherheitsgründen, um die Pelletintegrität nicht zu gefährden, weniger vom Überstand genommen wird oder evtl. Pelletbestandteile mitüberführt werden. Konsequenz wäre zum einen weniger RNA, zum anderen eine geringere Reinheit. Allerdings folgt anschließend ein zusätzlicher DNase Verdau und eine Säulenaufreinigung mit einer RNA bindenden Filtermembran, wie bei allen hier verwendeten Kits, wodurch auch kleine Verunreinigungen kompensatorisch behoben werden können.

Das RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit ist von der Handhabung her das zweitbeste Kit, da mögliche Fehlerquellen relativ gut gelöst werden. Die Problematik, dass Fehler beim abpipettieren entstehen können, ist vorhanden, aber geringer als bei der Trizol-Methode. Dies könnte daran liegen, dass das Pellet im Gefäß eine spezifische Position nach der Zentrifugation hat und mit dieser Kenntnis die Abnahme des Überstandes erleichtert wird. Sollten dennoch kleine Teile des Pellet übertragen werden, so greifen hier auch die kompensatorischen Maßnahmen wie der DNA-Verdau und die Säulenaufreinigung, die etwaigen DNA-Kontaminierungen entgegenwirken. Ein Problem, was bei dieser Methode nicht beseitigt wird, ist der mögliche RNA-Verlust, wenn der Kitanwender evtl. sicherstellen möchte, das Pellet nicht zu beschädigen und daher weniger RNA-

Überstand überträgt als möglich. Da allerdings der Hersteller in seiner Anleitung beschreibt, dass kleinere Pelletfragmente keinen Einfluss auf das Endergebnis haben, wird angenommen, dass meist auch von nicht geübten Kitanwendern mehr RNA gewonnen werden kann als im Vergleich zu den Trizol basierten Methoden.

5. Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass, wenn man kontinuierlich gute Ergebnisse haben möchte, es sich lohnt in ein geeignetes Kit zu investieren. Die Trizol-Methode kann ebenfalls gute bis sehr gute Ergebnisse liefern, ist aber deutlich störungsanfälliger als die kommerziellen Kits und sollte nur von gut ausgebildetem Personal genutzt werden. Sollen weitere Analysen der RNA durchgeführt werden, wie z.B. das NGS, können die per Kit gewonnenen Proben meist direkt verwendet werden. Im Gegensatz werden bei der Standard Trizol-Methode meist weitere Aufbereitungsschritte erforderlich, um z.B. geringe Phenol Restspuren zu beseitigen, wodurch sich die Kosten für diese Methode deutlich erhöhen können.

Unabhängig von der verwendeten Methode gibt es einen Risikofaktor, welcher für eine optimale RNA-Isolation maßgeblich entscheidend ist. Dies ist der Faktor Mensch. Durch Übung und Erfahrung des durchführenden Personals kann dieser Risikofaktor deutlich geschmälert aber niemals ausgeschlossen werden, da etliche den Mensch negativ beeinflussende Variablen existieren. Einzige Möglichkeit eine Methode vollständig valide zu standardisieren und somit auch korrekt mit anderen Methoden vergleichen zu können, wäre nur mit dem Einsatz von Maschinen und dem Ausschluss von menschlichen Personal denkbar.

6. Literaturverzeichnis

1. Aigner, T., Söder, S. "Histopathological examination of joint degeneration: typing, grading and staging of osteoarthritis" Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 2006
2. Asai, S., Ianora, A., Lauritano, C. et al. High-quality RNA extraction from copepods for Next Generation Sequencing: A comparative study. *Marine genomics* 24 Pt 1 (2015) 115-118
3. Becker, C., RIEDMAIER, I., PFAFFL, M.W. et al. RNA-Qualitätskontrolle in der Genexpressionsanalytik. *BIOspektrum* 15 (2009) 512-515
4. Benninghoff, A., Drenckhahn, D. "Taschenbuch Anatomie" Elsevier, Urban & Fischer, München [u.a.], 2008
5. Chomczynski, P., Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162 (1987) 156-159
6. Chomczynski, P., Sacchi, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature protocols* 1 (2006) 581-585
7. Fuchs, J., Kuhnert, R., Scheidt-Nave, C. 12-Monats-Prävalenz von Arthrose in Deutschland. *Journal of Health Monitoring* 2(3): 55–60 (2017)
8. Fuchs J, R.M., Scheidt-Nave C (2013) Prävalenz ausgewählter muskuloskelettaler Erkrankungen - Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* 56(5):678-686
Url:<<http://edoc.rki.de/oa/articles/reTBzeyFBYxM/PDF/24ZsqC2a9dzqQ.pdf>> (Zugriff:28.12.2017)
9. Glyn-Jones, S., Palmer, A.J., Agricola, R. et al. Osteoarthritis. *Lancet* (London, England) 386 (2015) 376-387
10. Goldring, S.R., Goldring, M.B. Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage-bone crosstalk. *Nature reviews. Rheumatology* 12 (2016) 632-644
11. Gstraunthaler, G., Lindl, T. "Zell- und Gewebekultur" Springer, Berlin [u.a.], 2013
12. Hackenbroch, M. [Prearthrosis and prearthrotic deformity]. *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete* 116 (1978) 418-422
13. Healey, A., Furtado, A., Cooper, T. et al. Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant methods* 10 (2014) 21

14. Herold, G. "Innere Medizin" –G. Herold, Köln, 2017
15. Hilz, H., Wiegers, U., Adamietz, P. Stimulation of proteinase K action by denaturing agents: application to the isolation of nucleic acids and the degradation of 'masked' proteins. *European journal of biochemistry* 56 (1975) 103-108
16. Imbeaud, S., Graudens, E., Boulanger, V. et al. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic acids research* 33 (2005) e56
17. Jansson, V. (2018) Knorpeldefekte (Chondromalazie). Orthopädische Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
 Url:<http://www.klinikum.uni-muenchen.de/Orthopaedische-Klinik-und-Poliklinik/de/Orthopaedisches-Behandlungsspektrum/knie_band/knorpel/index.html> (Zugriff: 18.03.2018)
18. Kirchner, T., Grundmann, E. "Kurzlehrbuch Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie" Elsevier, Urban & Fischer, München, 2014
19. Le Bleu, H.K., Kamal, F.A., Kelly, M. et al. Extraction of high-quality RNA from human articular cartilage. *Anal Biochem* 518 (2017) 134-138
20. Lüllmann-Rauch, R. "Taschenlehrbuch Histologie" Thieme, Stuttgart [u.a.], 2012
21. Ma, B., Leijten, J.C., Wu, L. et al. Gene expression profiling of dedifferentiated human articular chondrocytes in monolayer culture. *Osteoarthritis Cartilage* 21 (2013) 599-603
22. Michael, J.W., Schluter-Brust, K.U., Eysel, P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Deutsches Arzteblatt international* 107 (2010) 152-162
23. Mobasheri, A., Rayman, M.P., Gualillo, O. et al. The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 13 (2017) 302
24. Neogi, T., Zhang, Y. Epidemiology of osteoarthritis. *Rheumatic diseases clinics of North America* 39 (2013) 1-19
25. Oh, S., Park, M.R., Son, S.J. et al. Comparison of Total RNA Isolation Methods for Analysis of Immune-Related microRNAs in Market Milks. *Korean journal for food science of animal resources* 35 (2015) 459-465
26. Pitsillides, A.A., Beier, F. Cartilage biology in osteoarthritis—lessons from developmental biology. *Nature Reviews Rheumatology* 7 (2011) 654

27. Pritchard, C.C., Cheng, H.H., Tewari, M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nature reviews. Genetics* 13 (2012) 358-369
28. Rabenberg, M., Robert Koch-Institut, B. Arthrose. Gesundheitsberichterstattung des Bundes; Heft 54 (2013) 40
29. Redeker, J.I., Schmitt, B., Grigull, N.P. et al. Effect of electromagnetic fields on human osteoarthritic and non-osteoarthritic chondrocytes. *BMC Complement Altern Med* 17 (2017) 402
30. Reynard, L.N., Loughlin, J. Insights from human genetic studies into the pathways involved in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 9 (2013) 573
31. Richard, M. (2018) NGS Library Construction - Guidelines for Submission of Library-Worthy RNA. DNA Technologies Core, Genome and Biomedical Sciences Facility (GBSF), University of California-Davis Url: <<http://dnatech.genomecenter.ucdavis.edu/illumina-sequencing-all-about-libraries>> (Zugriff: 10.03.2018)
32. Riede, U.-N., Werner, M., Freudenberg, N. "Basiswissen Allgemeine und Spezielle Pathologie" Springer, Heidelberg, 2009
33. Rio, D.C., Ares, M., Jr., Hannon, G.J. et al. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harbor protocols* 2010 (2010) pdb.prot5439
34. Robert Koch-Institut, B. (2017) Oktober 2017: Arthrose. Robert Koch-Institut 2017, Studie GEDA 2014/2015-EHIS, Erhebung 2014–2015 Url:<https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Zahl_des_Monats/Archiv2017/2017_10_Zahl_des_Monats.html> (Zugriff 28.12.2017)
35. Ruettinger, A., Neumann, S., Wiederanders, B. et al. Comparison of different methods for preparation and characterization of total RNA from cartilage samples to uncover osteoarthritis in vivo. *BMC research notes* 3 (2010) 7
36. Scharf, H.-P., Anagnostakos, K. "Orthopädie und Unfallchirurgie" Elsevier, Urban & Fischer, München, 2011
37. Scharstuhl, A., Glansbeek, H.L., van Beuningen, H.M. et al. Inhibition of endogenous TGF-beta during experimental osteoarthritis prevents osteophyte formation and impairs cartilage repair. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 169 (2002) 507-514
38. Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S. et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7 (2006) 3
39. Sultan, M., Amstislavskiy, V., Risch, T. et al. Influence of RNA extraction methods and library selection schemes on RNA-seq data. *BMC genomics* 15 (2014) 675

40. Sulzbacher, I. Osteoarthritis: histology and pathogenesis. Wiener medizinische Wochenschrift (1946) 163 (2013) 212-219
41. Technologies, A. (2005) Agilent 2100 Bioanalyzer 2100 Expert User's Guide. Agilent Technologies Url: <[https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2946-90004_Vespucci_UG_eBook_\(NoSecPack\).pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2946-90004_Vespucci_UG_eBook_(NoSecPack).pdf)> (Zugriff:08.12.2017)
42. Thermofisher (2017) Ethidium Bromide (EtBr) Dye for DNA and RNA Detection. Thermo Fisher Scientific Url: <<https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-gel-electrophoresis/dna-stains/etbr.html>> (Zugriff: 08.12.2017)
43. Vanhauwaert, S., Lefever, S., Coucke, P. et al. RT-qPCR gene expression analysis in zebrafish: Preanalytical precautions and use of expressed repetitive elements for normalization. Methods in cell biology 135 (2016) 329-342
44. Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R. et al. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. Nature 370 (1994) 341-347
45. Wu, M., Chen, G., Li, Y.-P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. Bone Research 4 (2016) 16009
46. Zeggini, E., Panoutsopoulou, K., Southam, L. et al. Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): a genome-wide association study. Lancet (London, England) 380 (2012) 815-823

7. Abbildungsverzeichnis

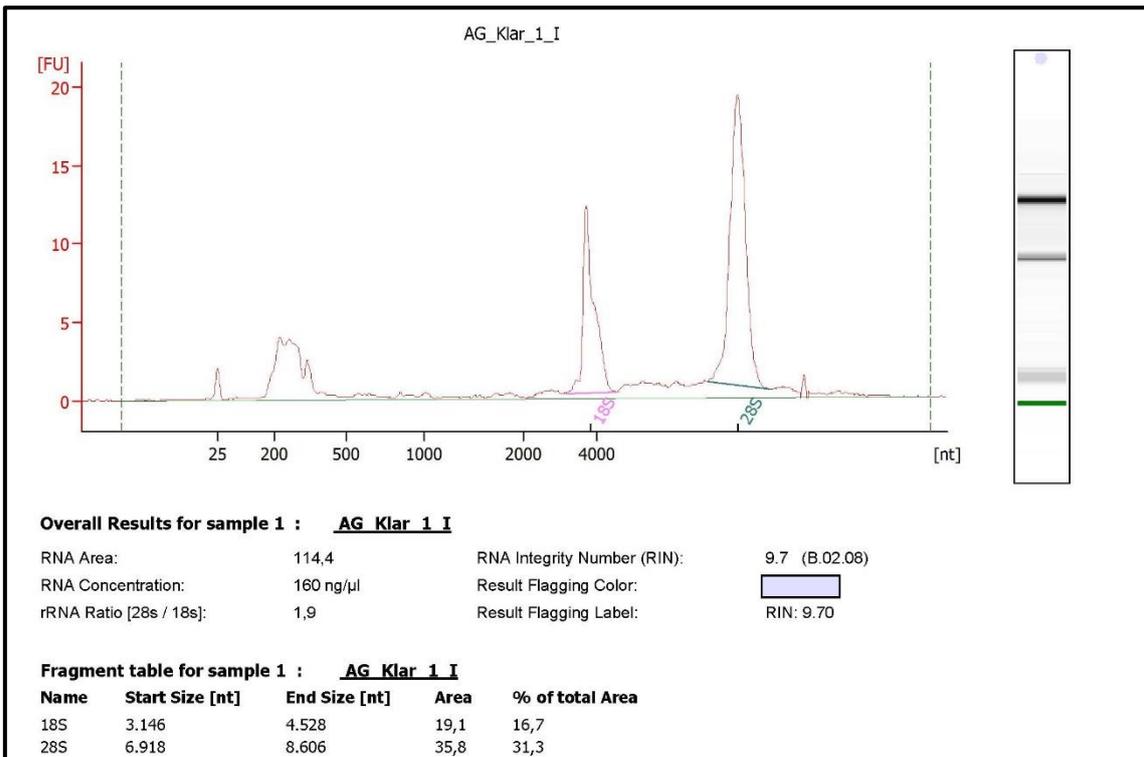
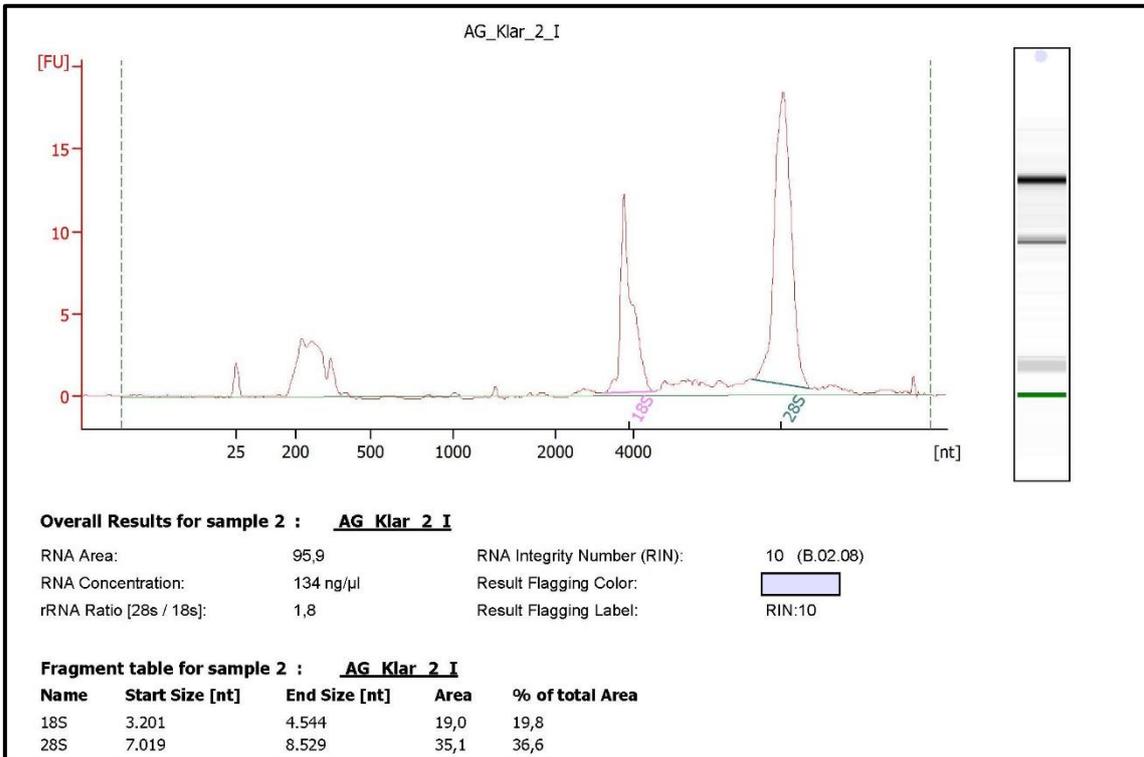
Abbildung 1: Prävalenz von Arthrose in unterschiedlichen Altersgruppen	6
Abbildung 2: Lokalisation der Arthrose	7
Abbildung 3: Mechanismen der Arthroseentstehung,	9
Abbildung 4: Arthrose nach Body-Mass-Index	12
Abbildung 5: Gesunder Hüftknorpel (HE-Färbung)	16
Abbildung 6: Gelenkknorpel (Goldner-Färbung)	16
Abbildung 7: Histologische Veränderungen im Gelenkknorpel (Safranin-O-/ Echtgrün-Färbung)	17
Abbildung 8: Clusterbildung und schwer geschädigter Knorpel (HE-Färbung)	18
Abbildung 9: Arthrose im Kniegelenk	18
Abbildung 10: Radiologische und schematische Darstellung der Arthrose	19
Abbildung 11: Autologe Chondrozyten Transplantation (ACT) am Knie	20
Abbildung 12: Neubauer-Zählkammer und Zähltechnik	27
Abbildung 13: Elektropherogramm und virtuelles Gel	38
Abbildung 14: Darstellung der RIN von 10 bis 1	40
Abbildung 15: Ergebnis der RNA-Konzentrationsbestimmung der Methode 1 .	42
Abbildung 16: Ergebnis der RNA-Konzentrationsbestimmung von Methode 2	43
Abbildung 17: Ergebnis der RNA-Konzentrationsbestimmung von Methode 3	44
Abbildung 18: Ergebnis der RNA-Konzentrationsbestimmung von Methode 4	45
Abbildung 19: Ergebnis der RNA-Konzentrationen im Methodenvergleich	46
Abbildung 20: rRNA 28s/18s-Fragmentverhältnis im Methodenvergleich	48
Abbildung 21: RNA Integrity Number im Methodenvergleich	49

8. Tabellenverzeichnis

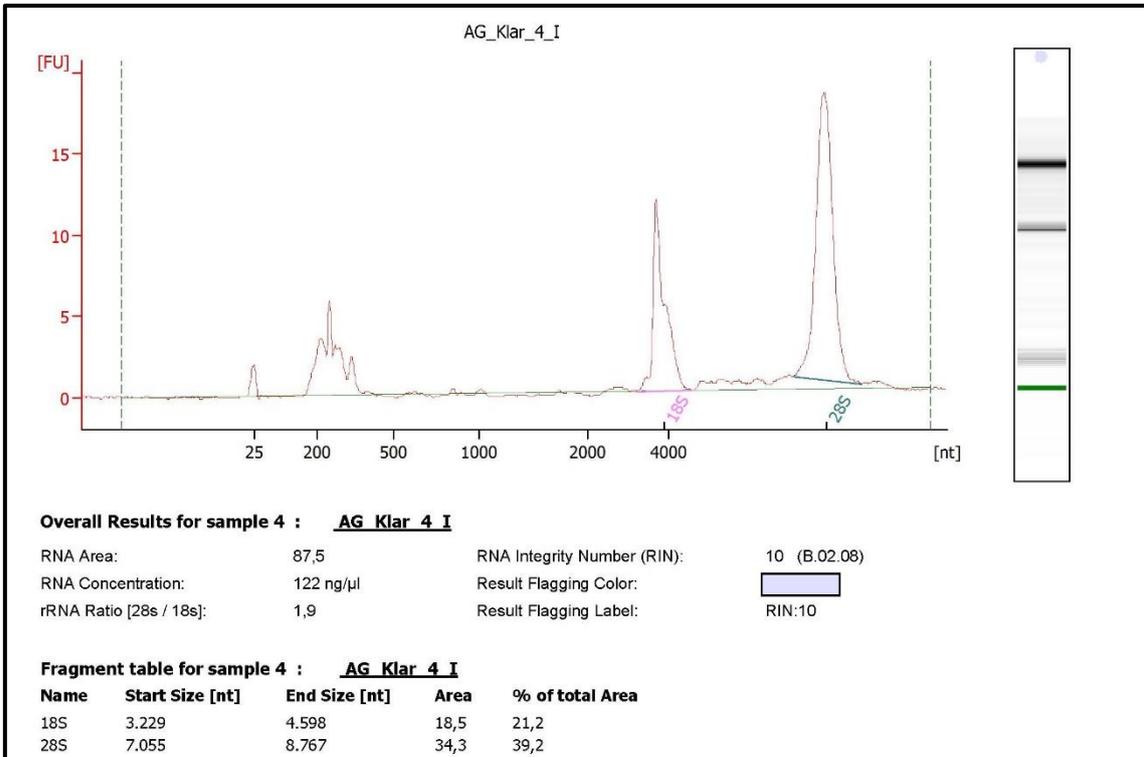
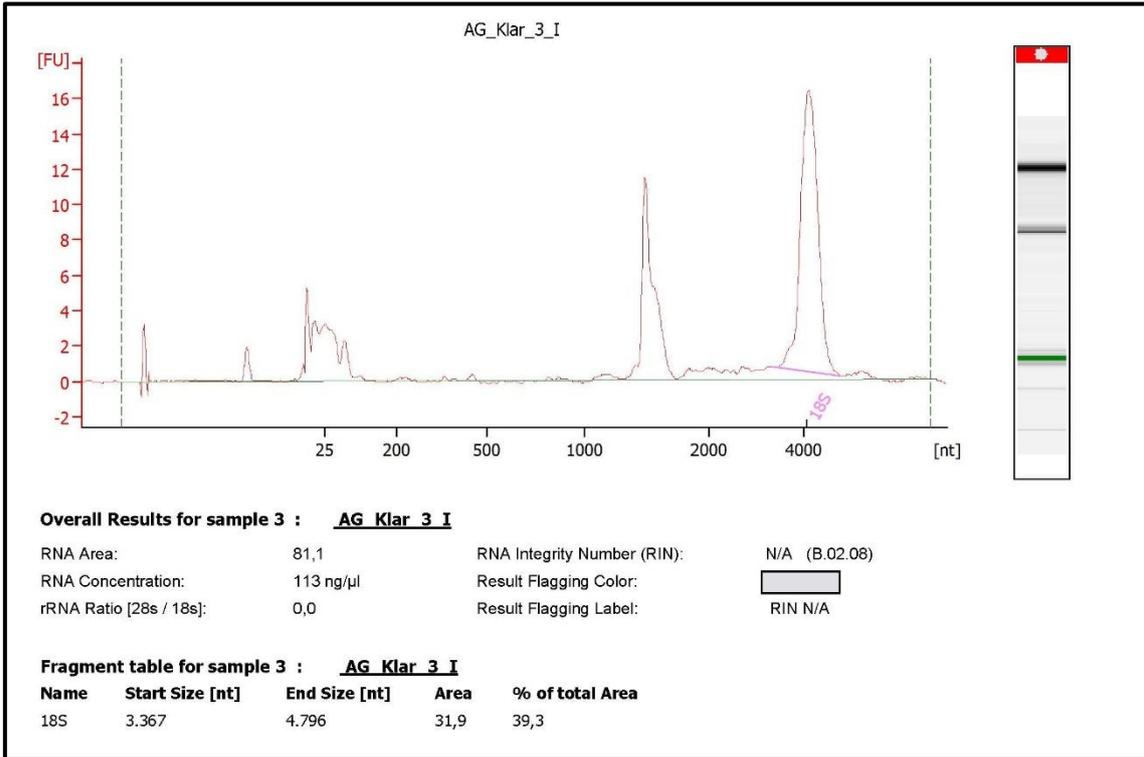
Tabelle 1: Einige mit Arthrose assoziierte Gene und ihre Proteine	10
Tabelle 2: Bestandteile des Knorpelgewebes.....	14
Tabelle 3: Platzierung der Methoden nach Quantität.....	47
Tabelle 4: Platzierung der Methoden nach rRNA 28s/18s Verhältnis	48
Tabelle 5: Platzierung der Methoden nach RIN	49
Tabelle 6: Zusammenfassung der Platzierungen der einzelnen Methoden.....	52
Tabelle 7: Kostenübersicht der einzelnen Methoden	52

9. Anhang

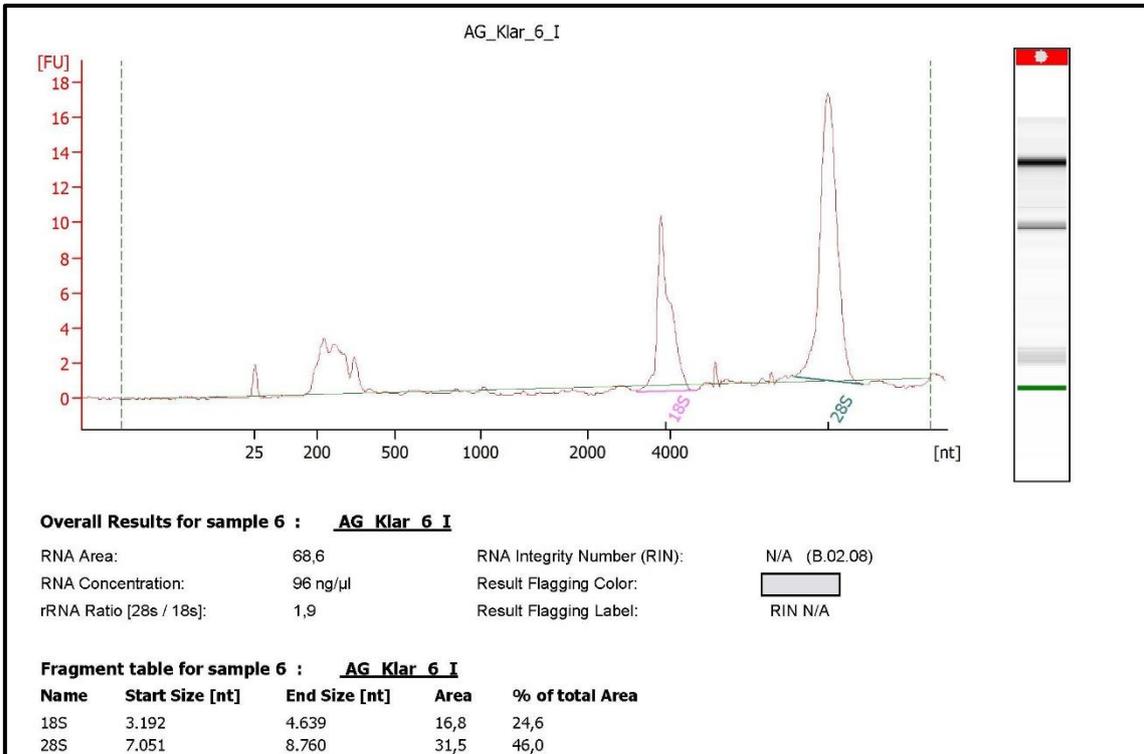
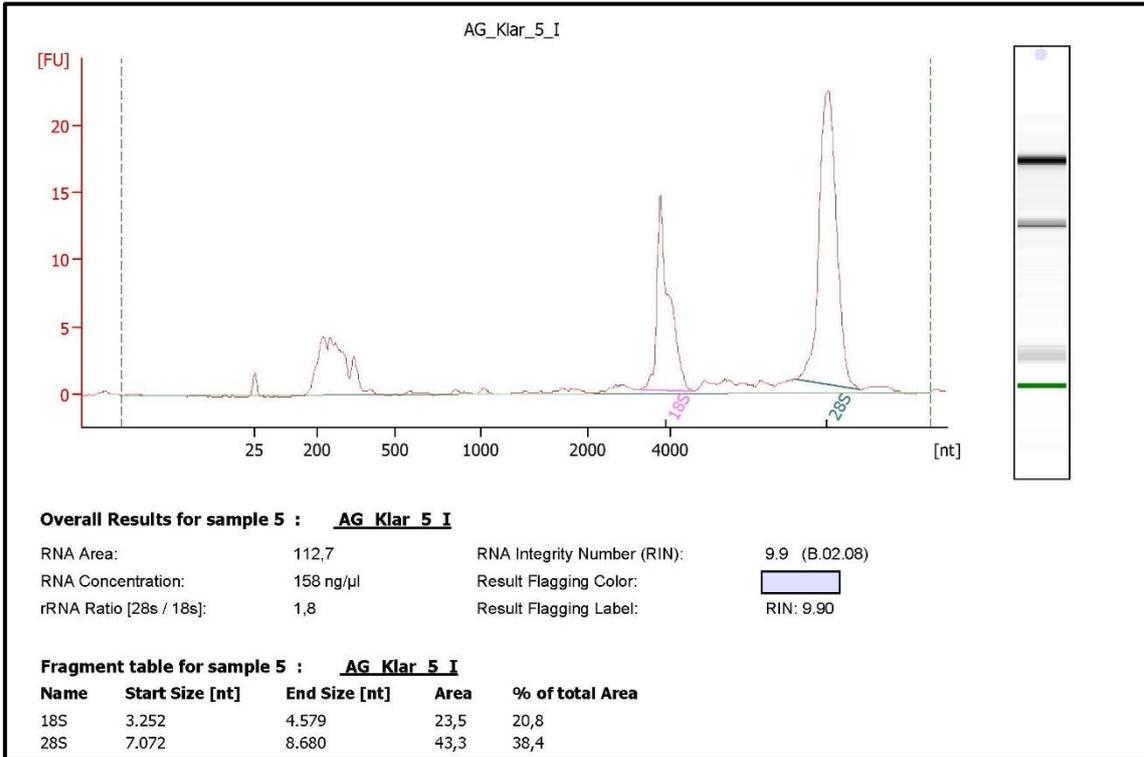
9.1. Ergebnisse Bioanalyser - Trizol-Methode (OA)



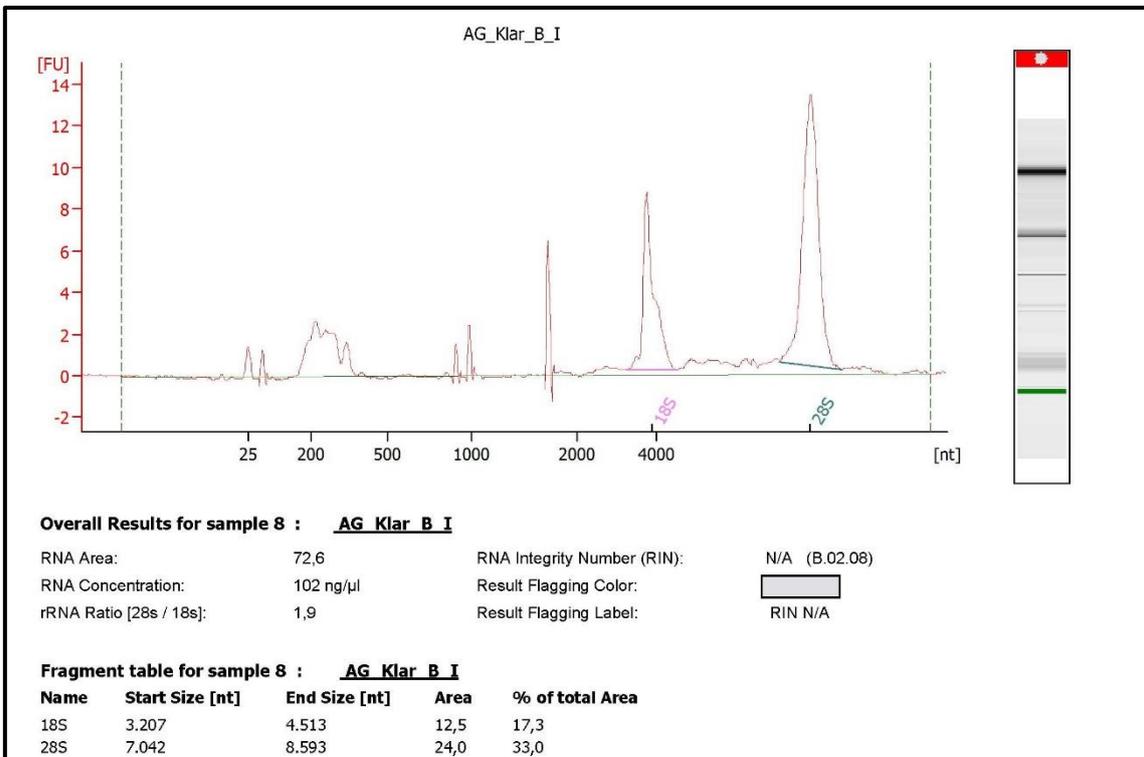
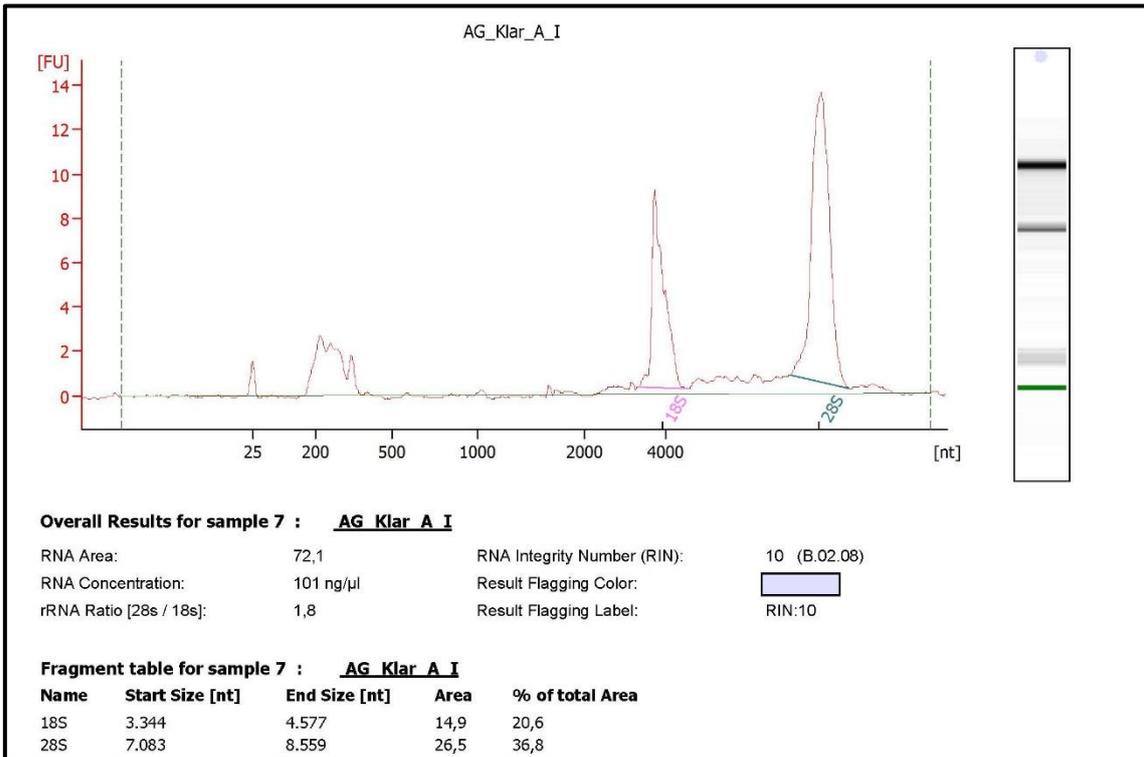
9.1. Ergebnisse Bioanalyser - Trizol-Methode (OA) (Fortsetzung)



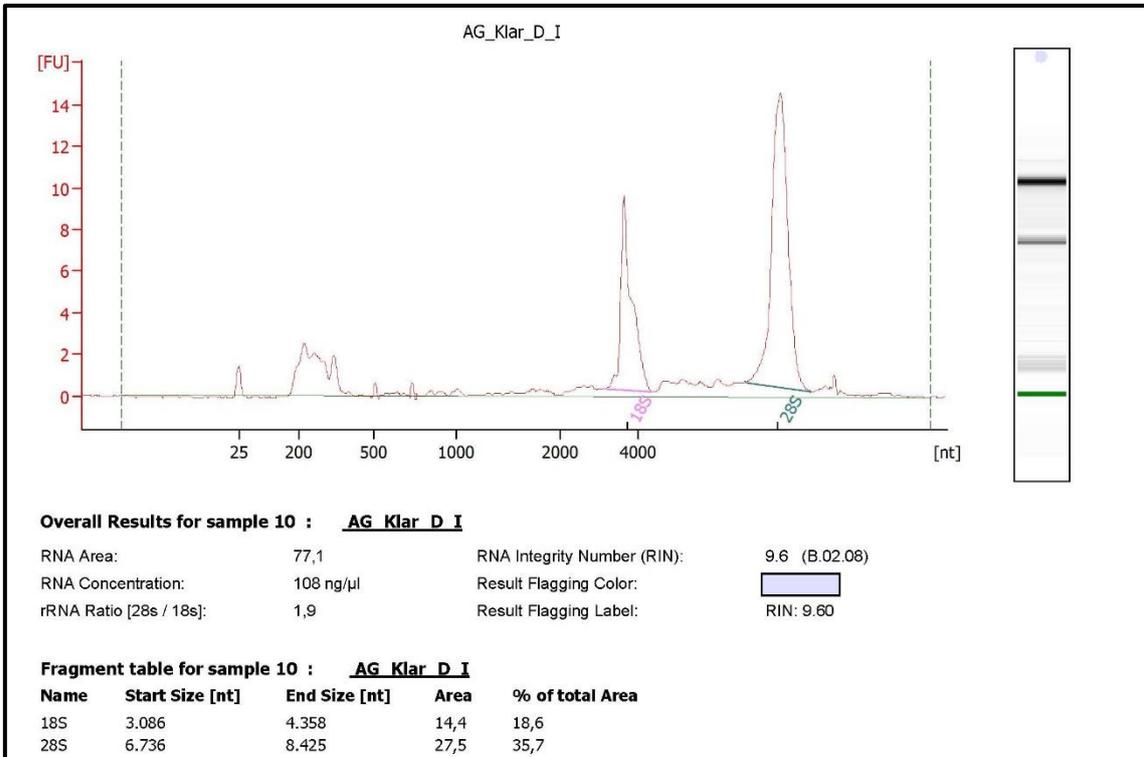
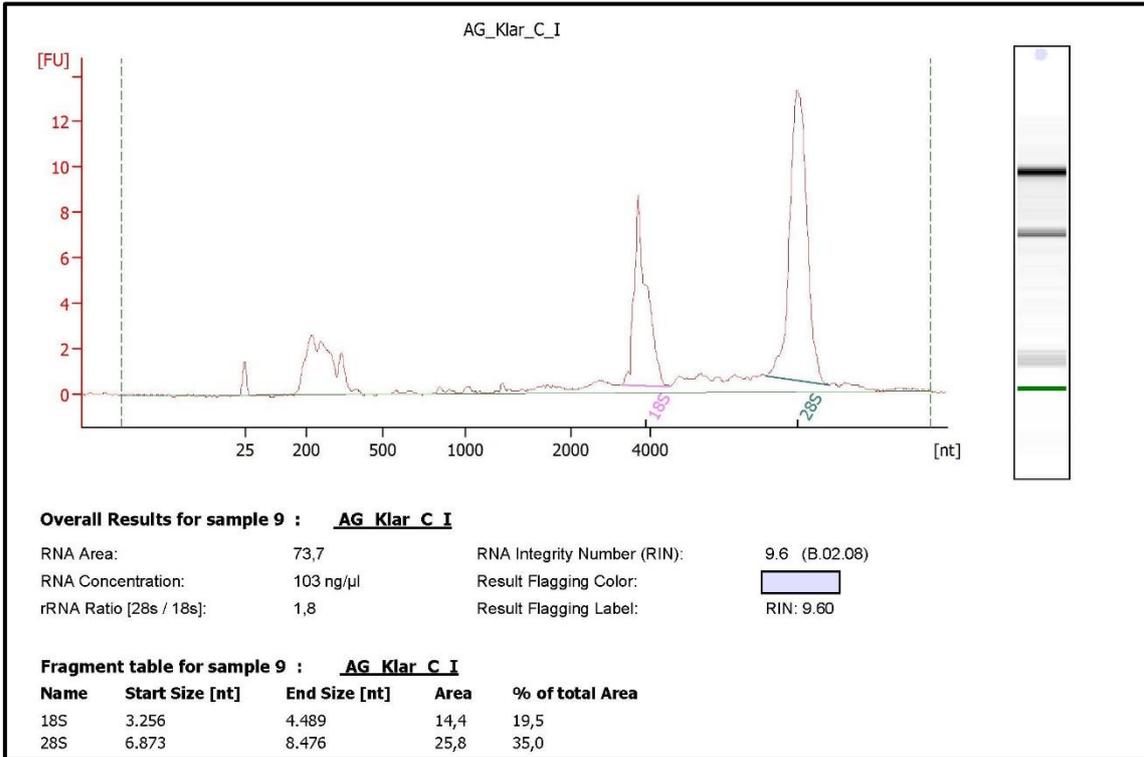
9.1. Ergebnisse Bioanalyser - Trizol-Methode (OA) (Fortsetzung)



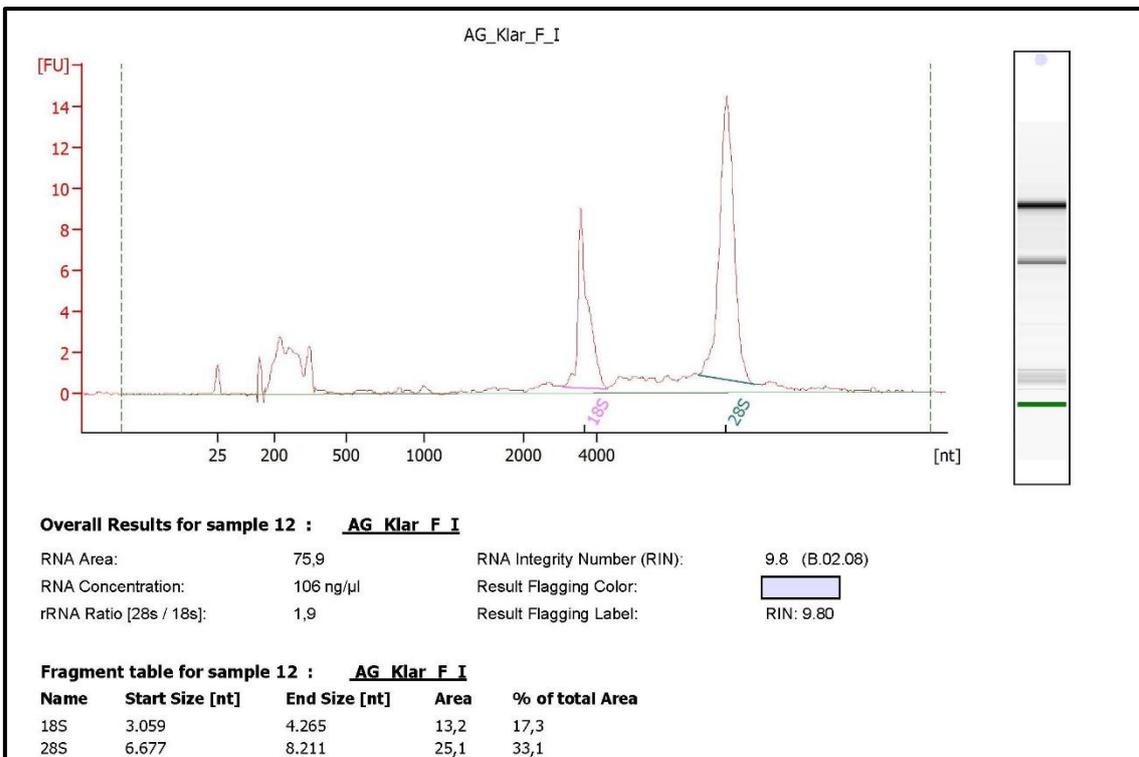
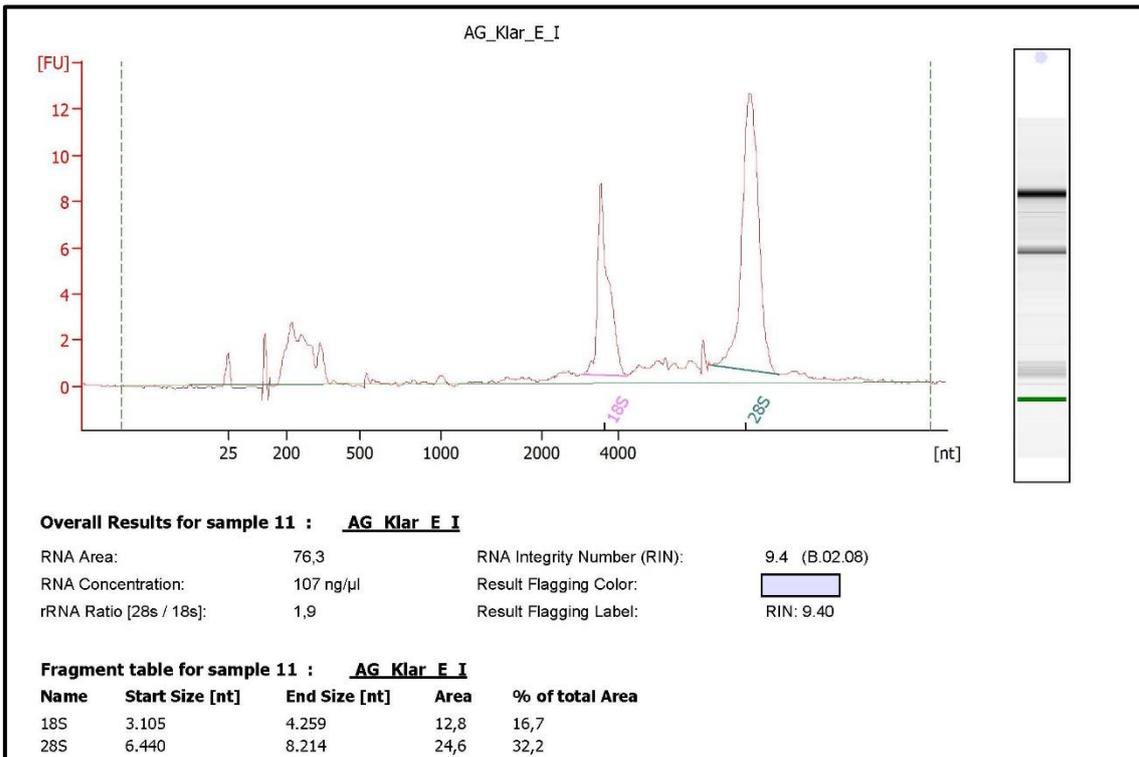
9.2. Ergebnisse Bioanalyser - Trizol-Methode (non OA)



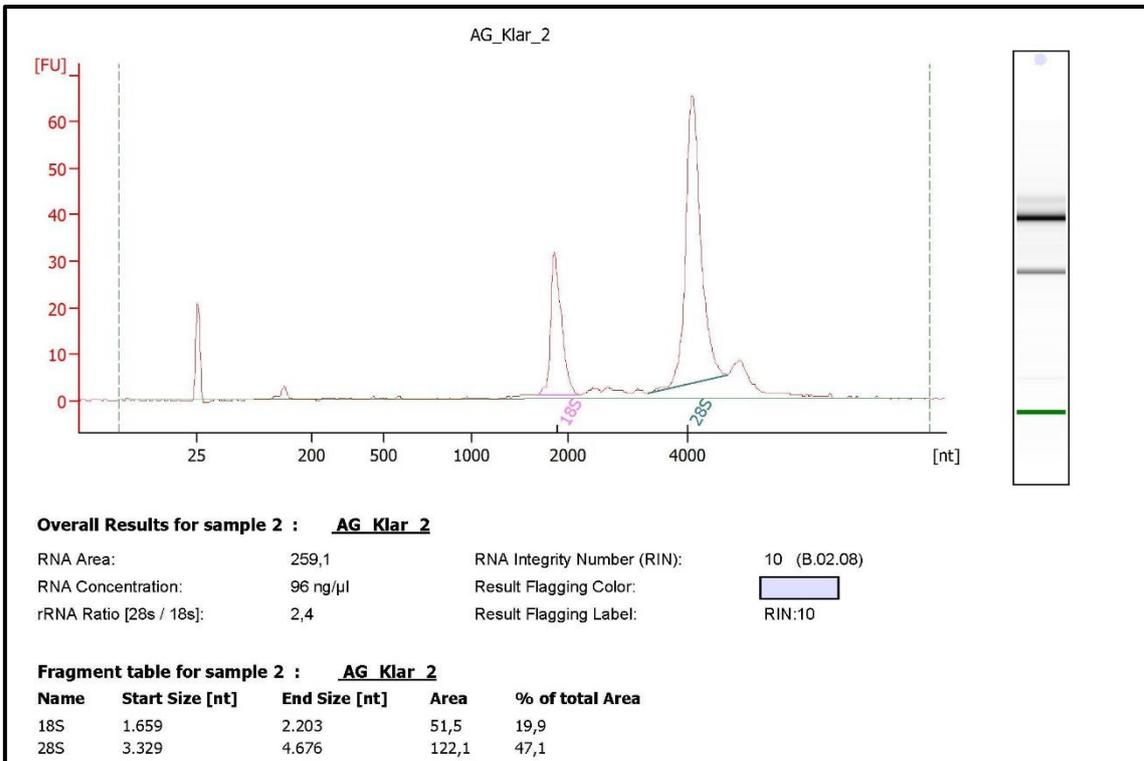
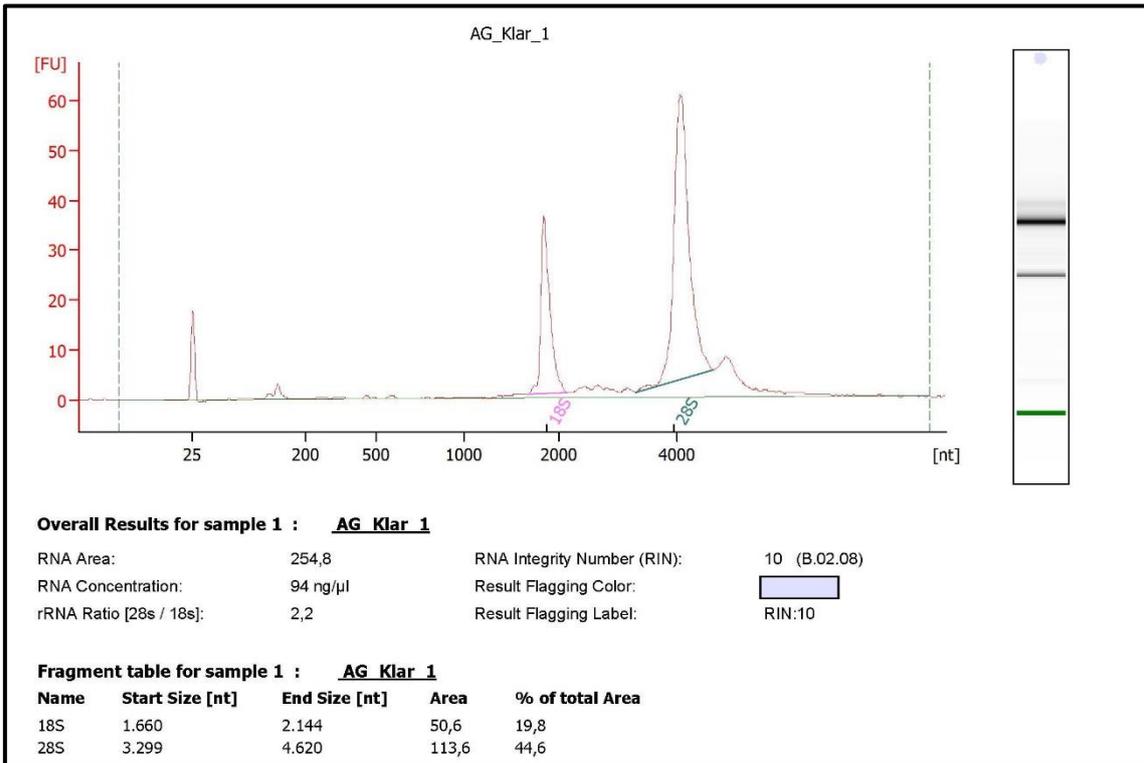
9.2. Ergebnisse Bioanalyser - Trizol-Methode (non OA) (Fortsetzung)



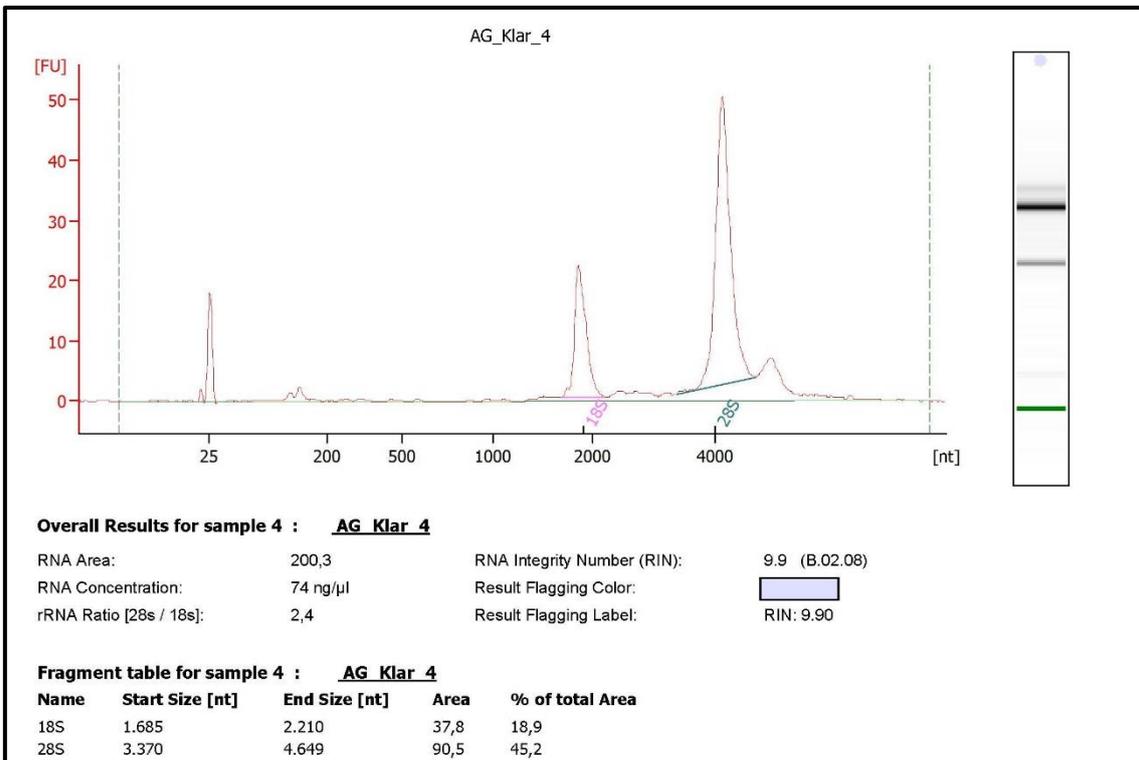
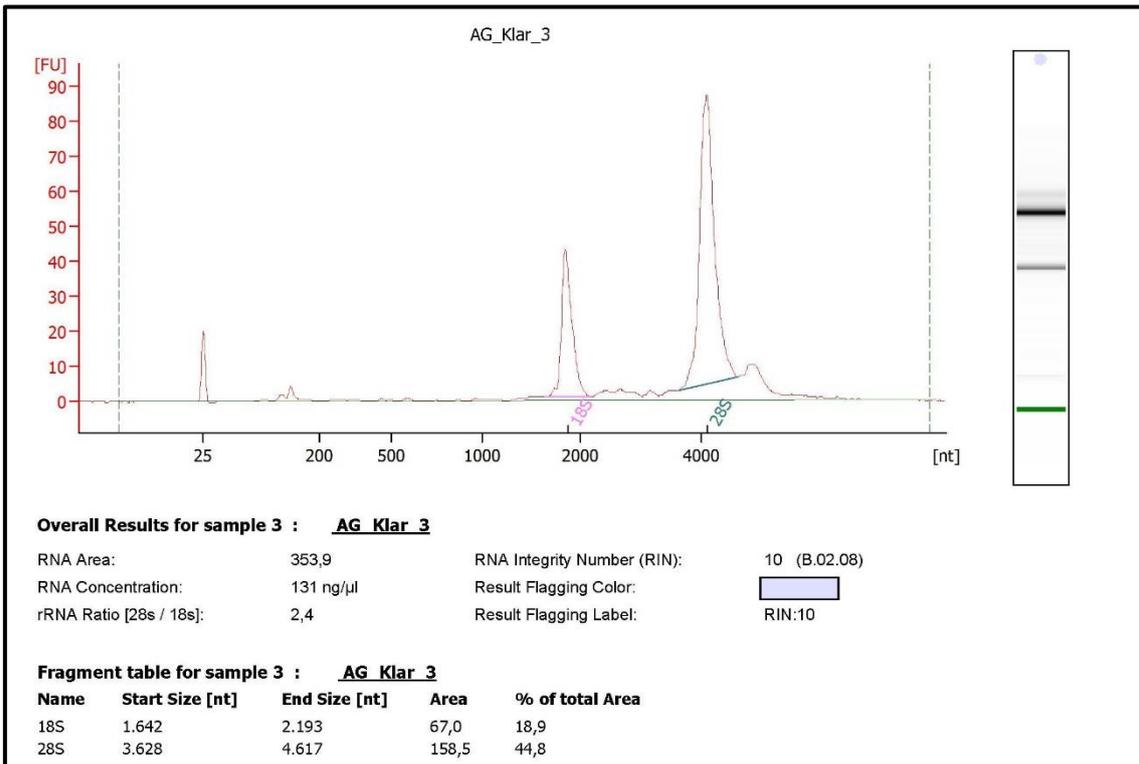
9.2. Ergebnisse Bioanalyser - Trizol-Methode (non OA) (Fortsetzung)



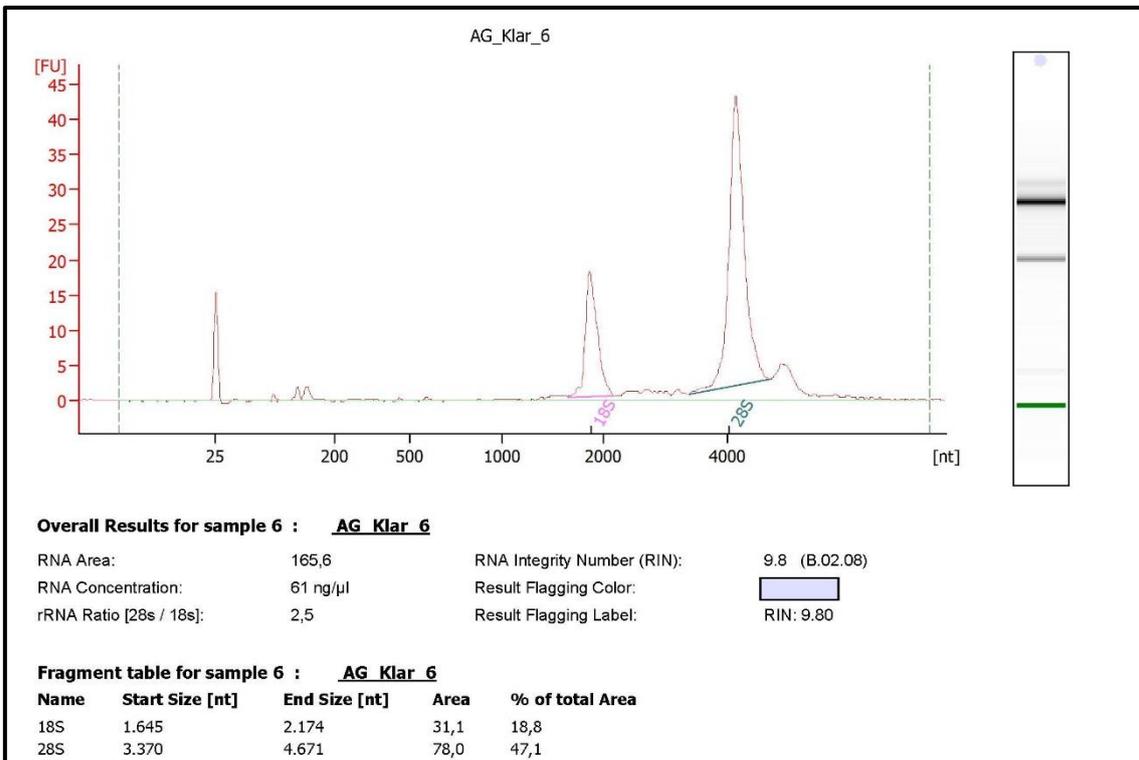
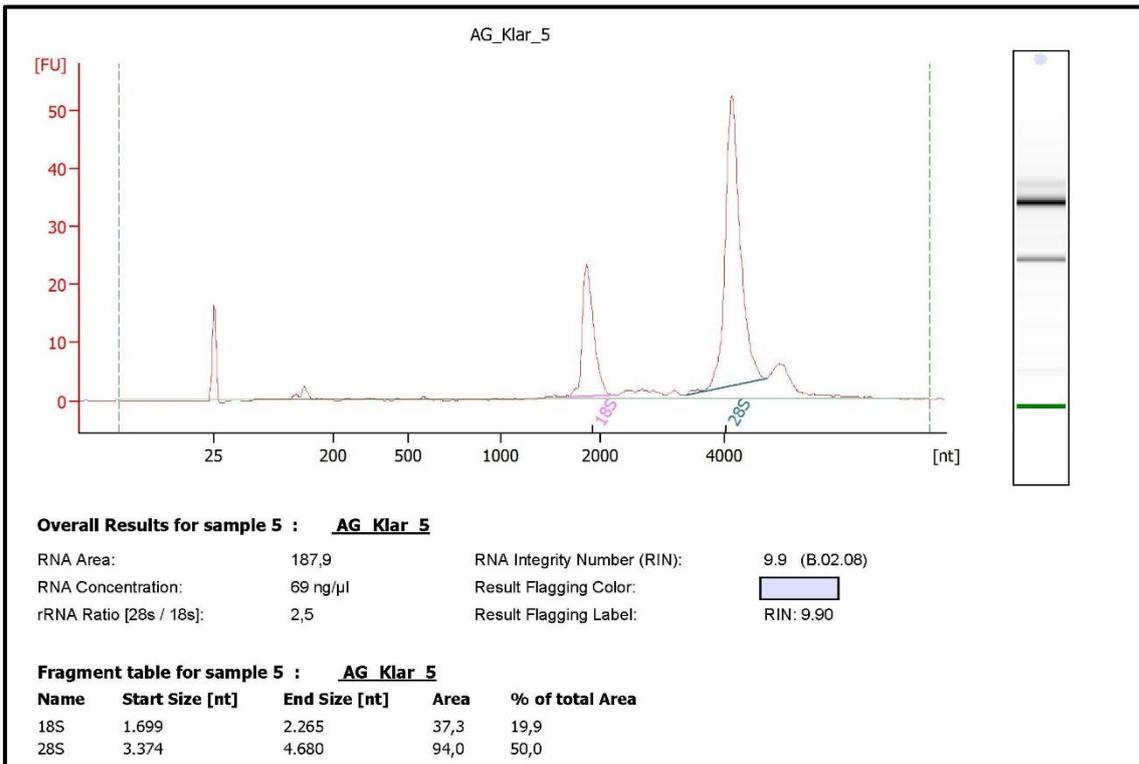
9.3. Ergebnisse Bioanalyzer – Kit Analytik Jena (OA)



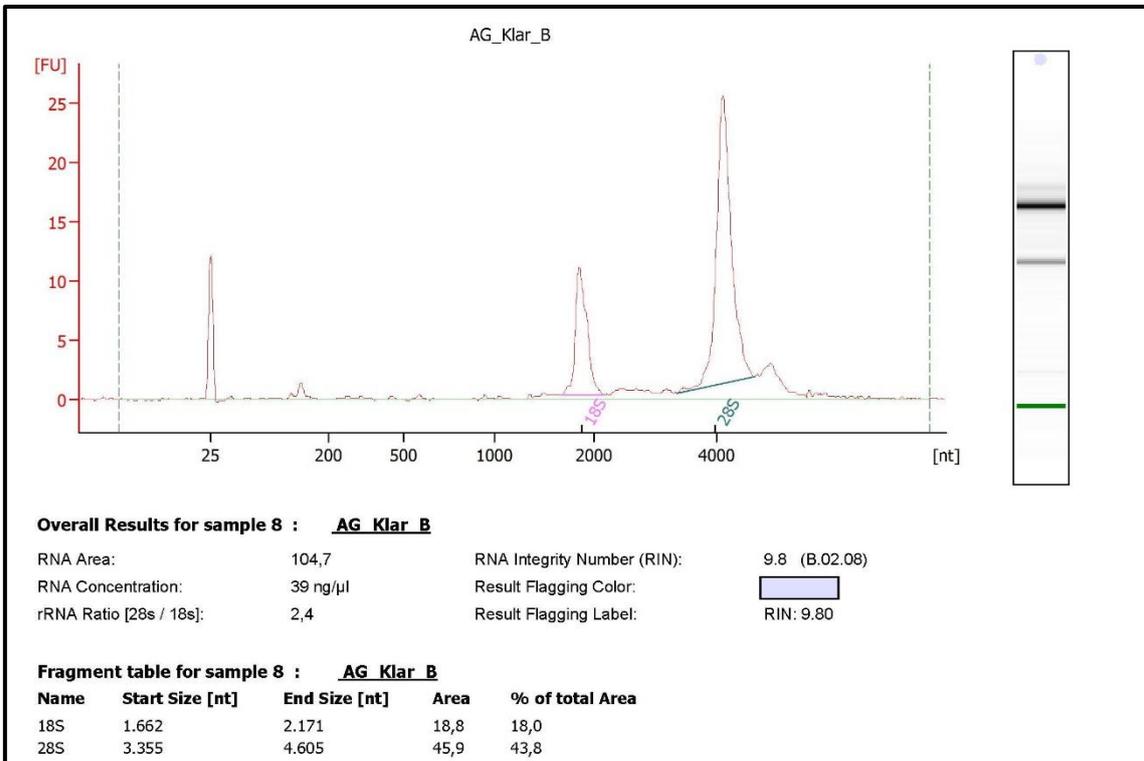
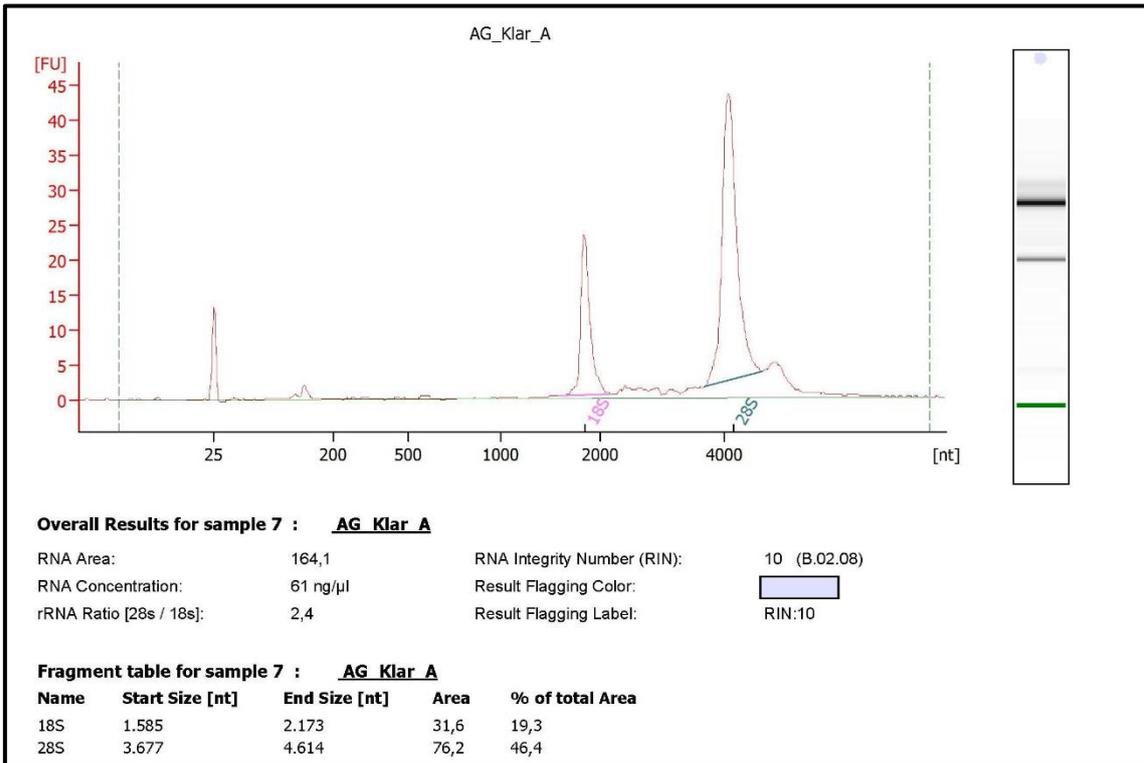
9.3. Ergebnisse Bioanalyser – Kit Analytik Jena (OA) (Fortsetzung)



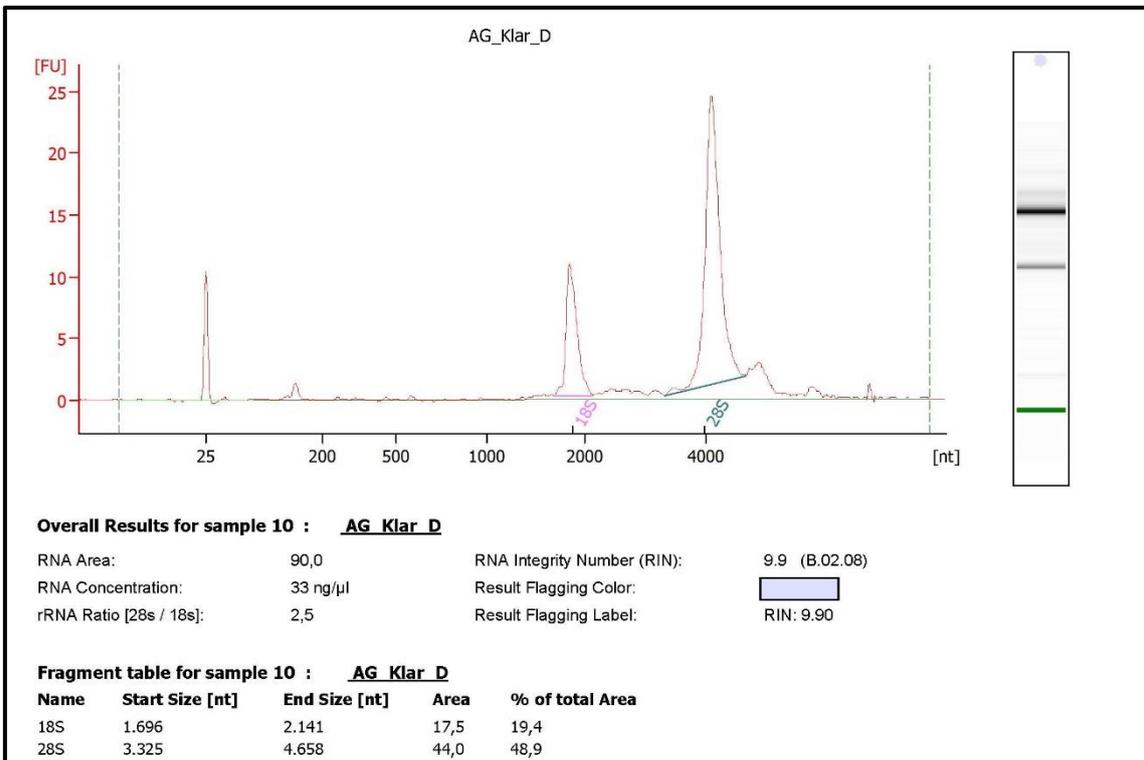
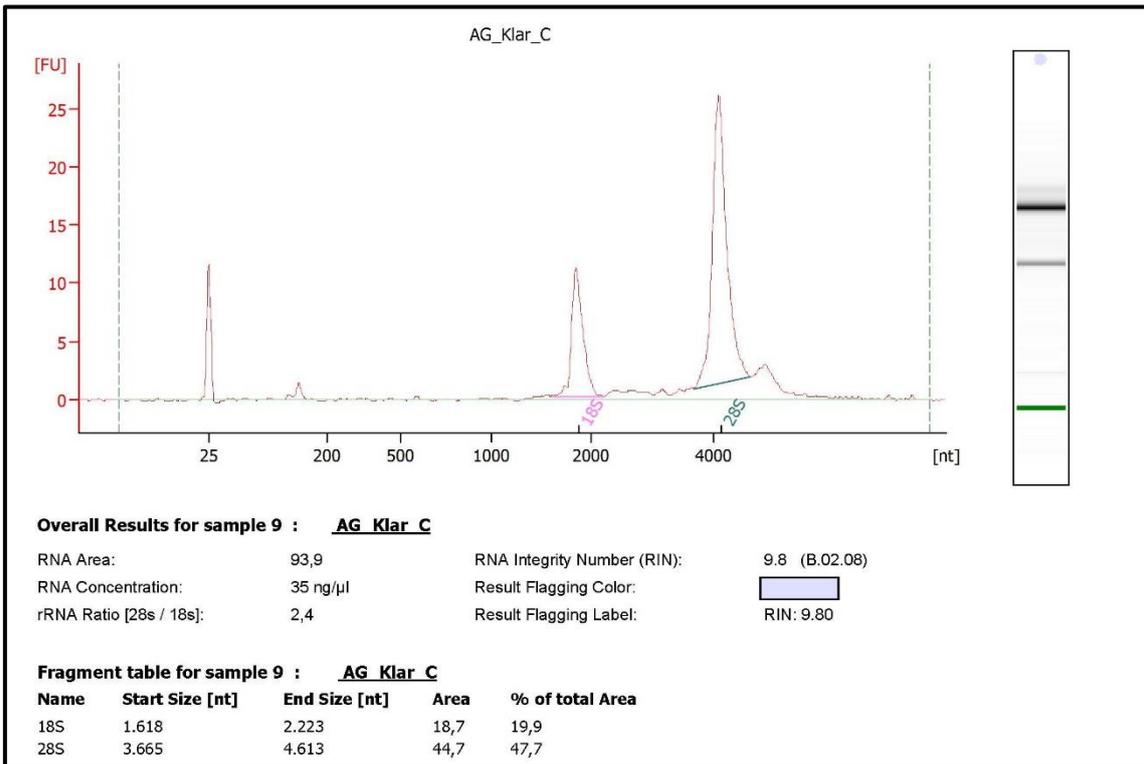
9.3. Ergebnisse Bioanalyser – Kit Analytik Jena (OA) (Fortsetzung)



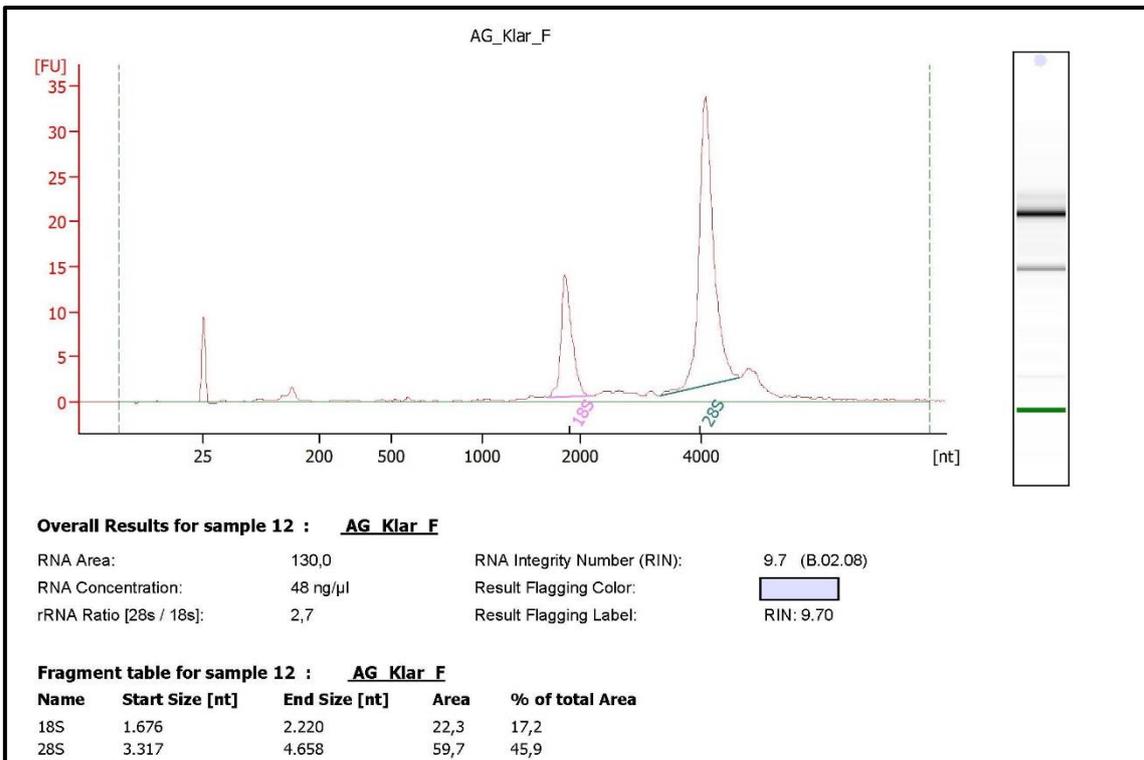
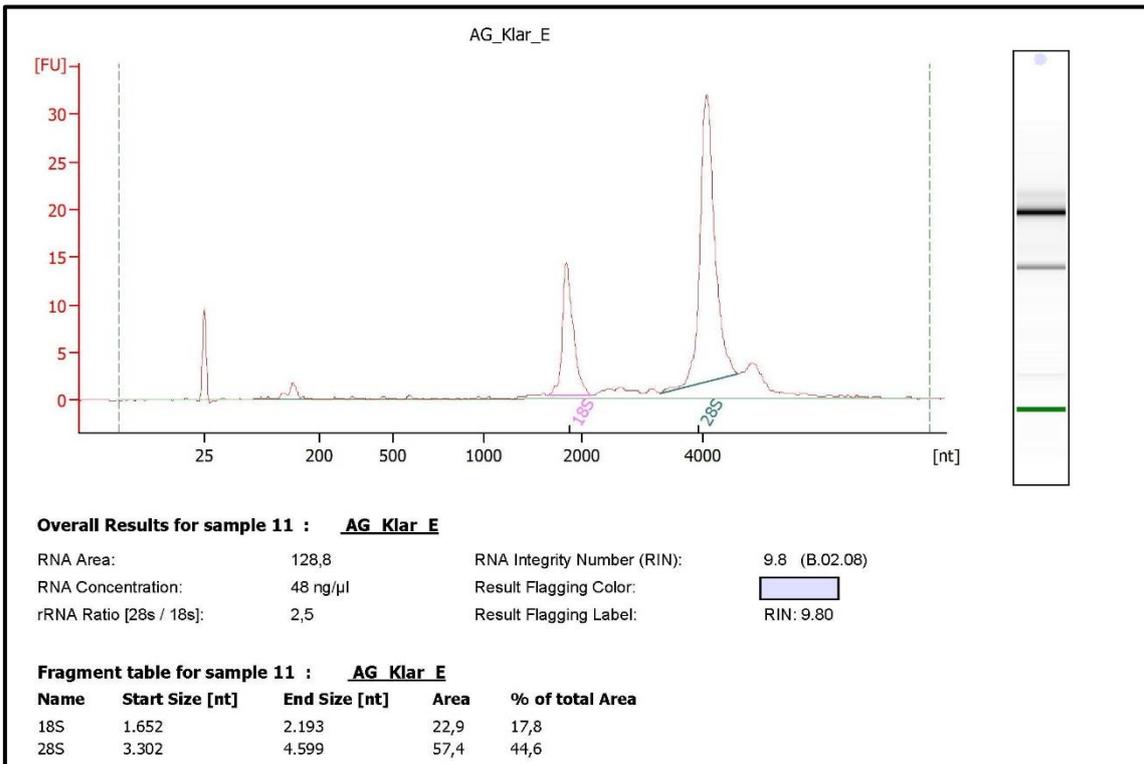
9.4. Ergebnisse Bioanalyzer – Kit Analytik Jena (non OA)



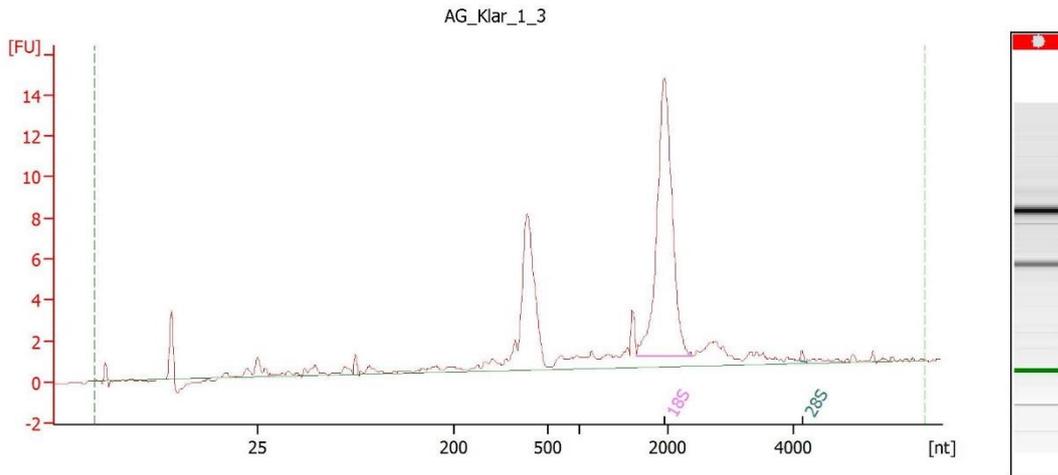
9.4. Ergebnisse Bioanalyser – Kit Analytik Jena (non OA) (Fortsetzung)



9.4. Ergebnisse Bioanalyser – Kit Analytik Jena (non OA) (Fortsetzung)



9.5. Ergebnisse Bioanalyzer – Kit Bio-Rad (OA)

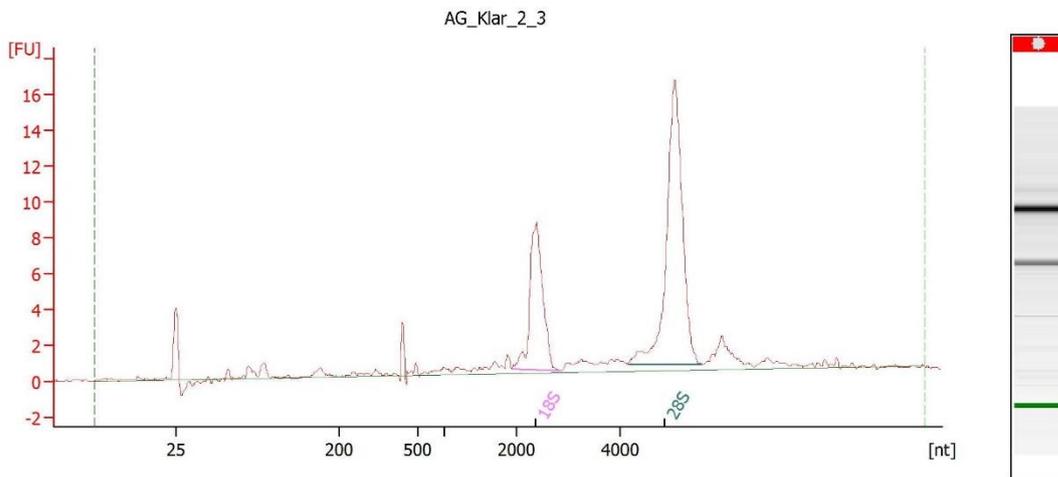


Overall Results for sample 1 : AG Klar 1 3

RNA Area:	70,2	RNA Integrity Number (RIN):	N/A (B.02.08)
RNA Concentration:	108 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0,0	Result Flagging Label:	RIN N/A

Fragment table for sample 1 : AG Klar 1 3

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1.642	2.397	26,4	37,6
28S	4.116	4.223	0,2	0,3



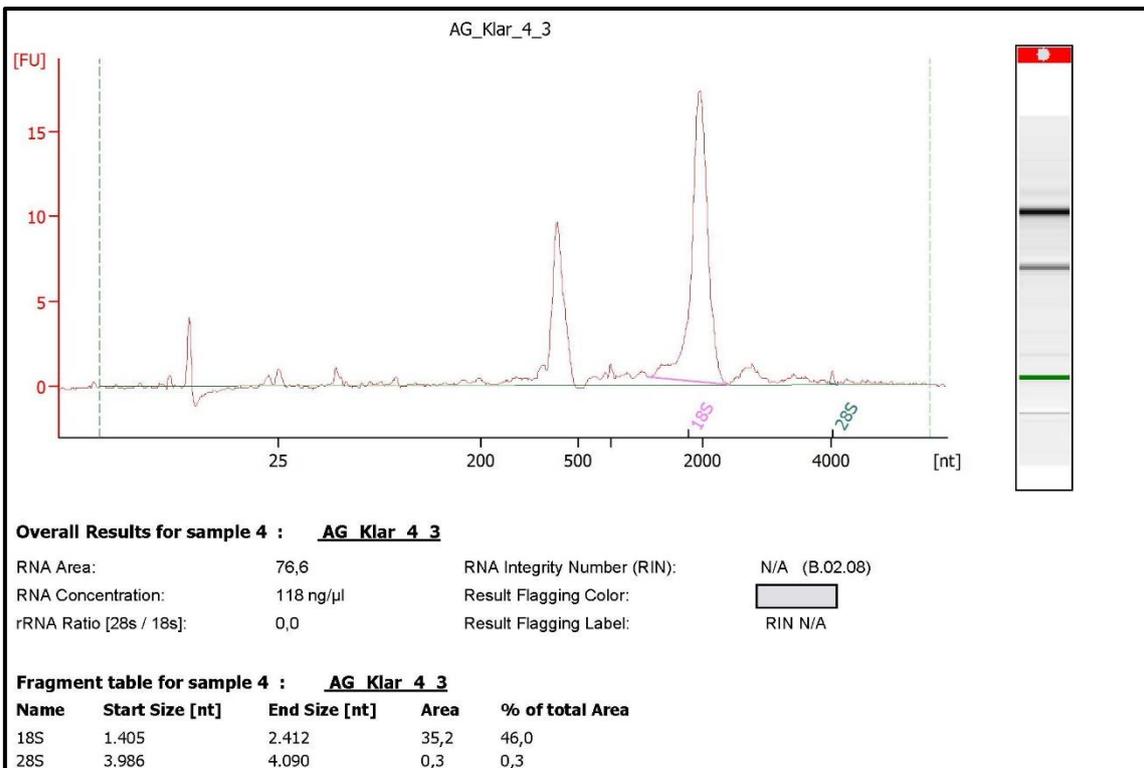
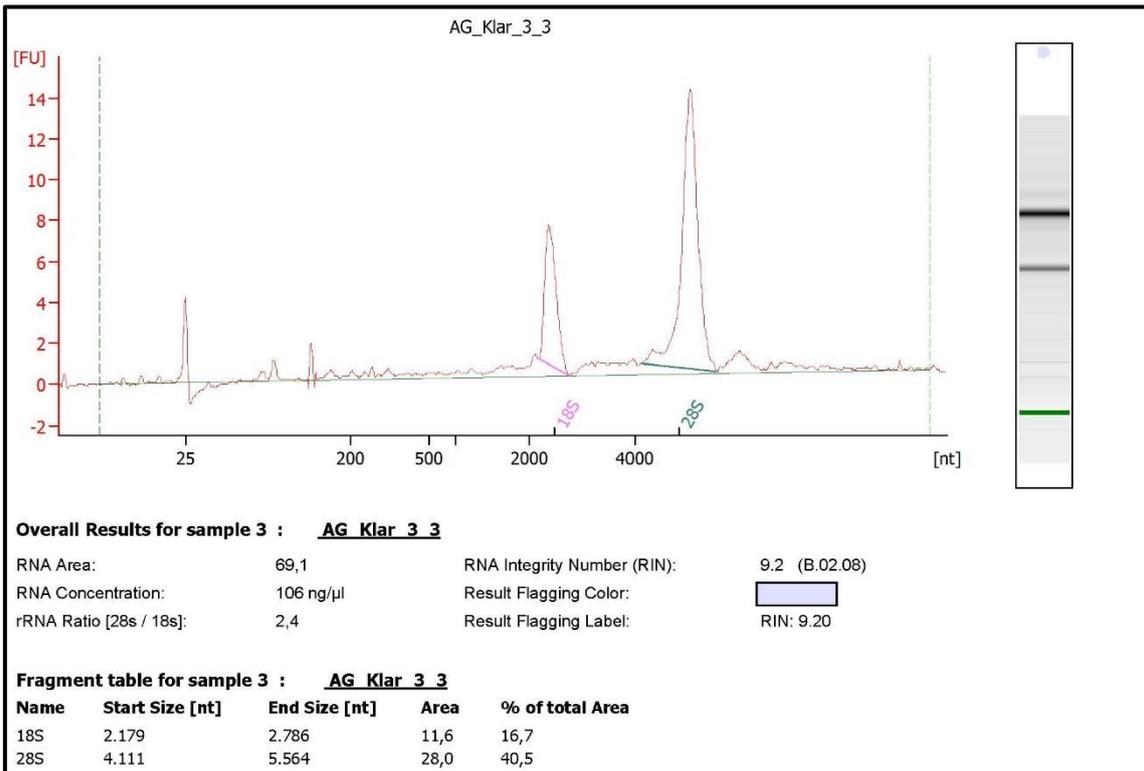
Overall Results for sample 2 : AG Klar 2 3

RNA Area:	74,4	RNA Integrity Number (RIN):	N/A (B.02.08)
RNA Concentration:	114 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	2,0	Result Flagging Label:	RIN N/A

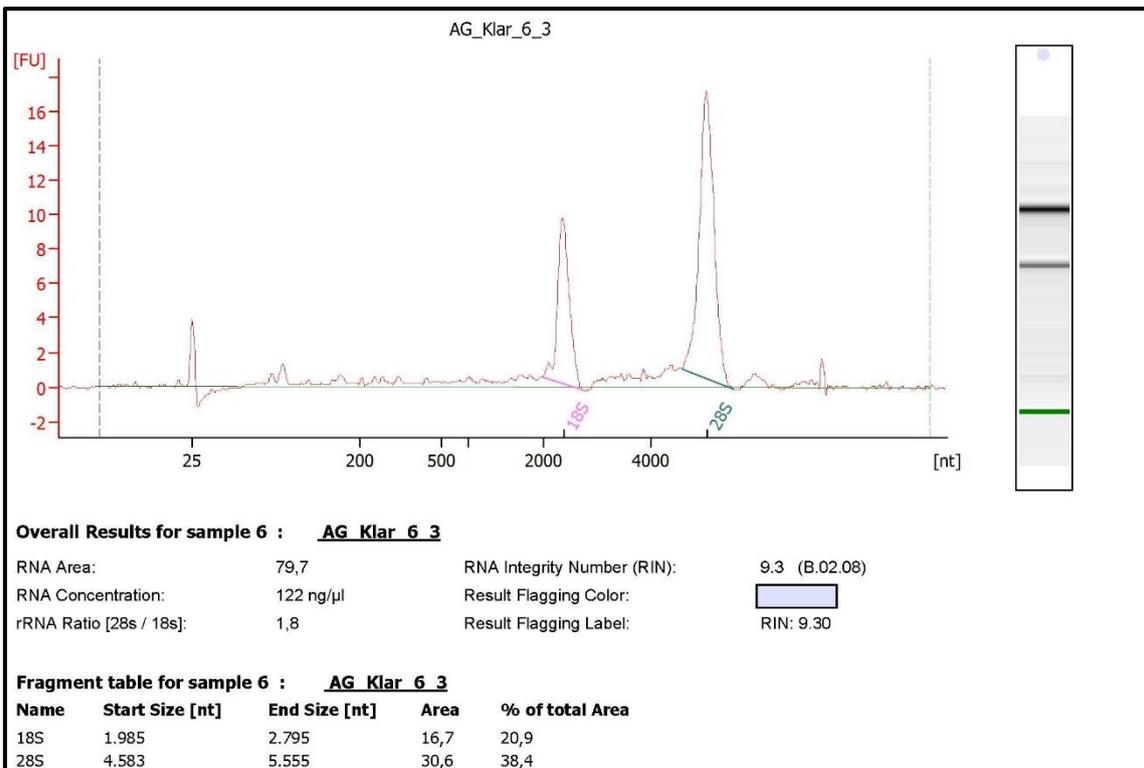
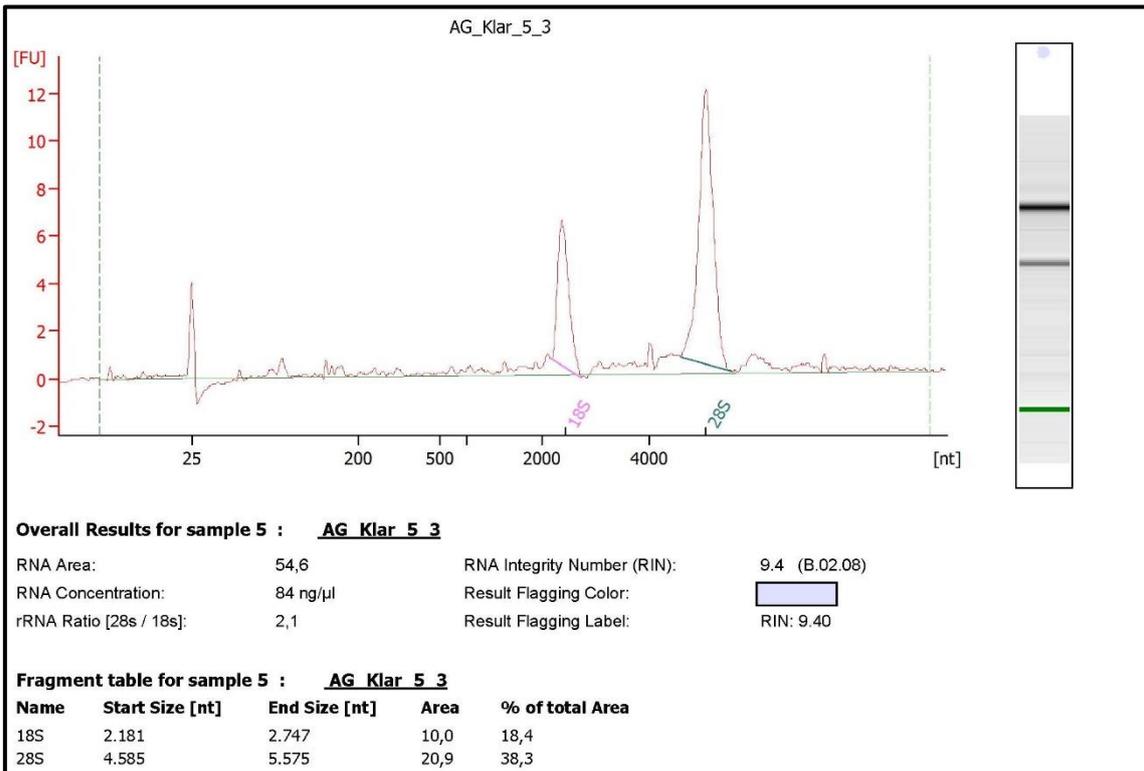
Fragment table for sample 2 : AG Klar 2 3

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1.935	2.845	16,0	21,6
28S	4.136	5.571	31,6	42,5

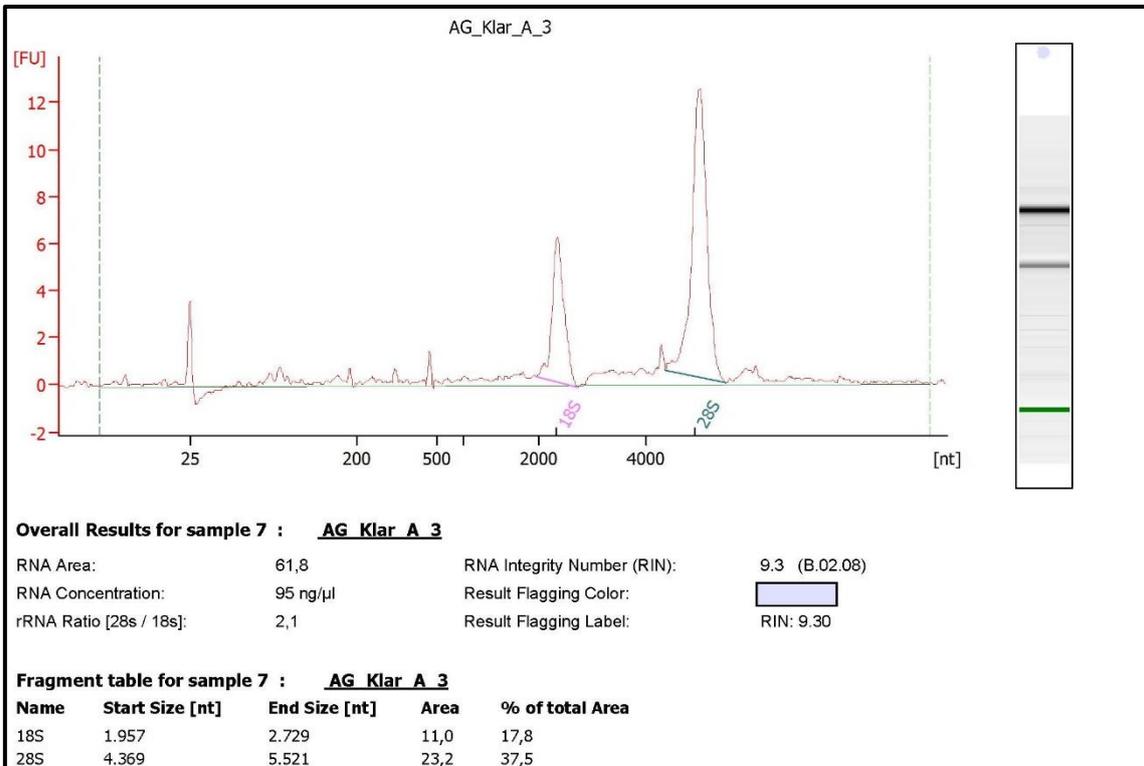
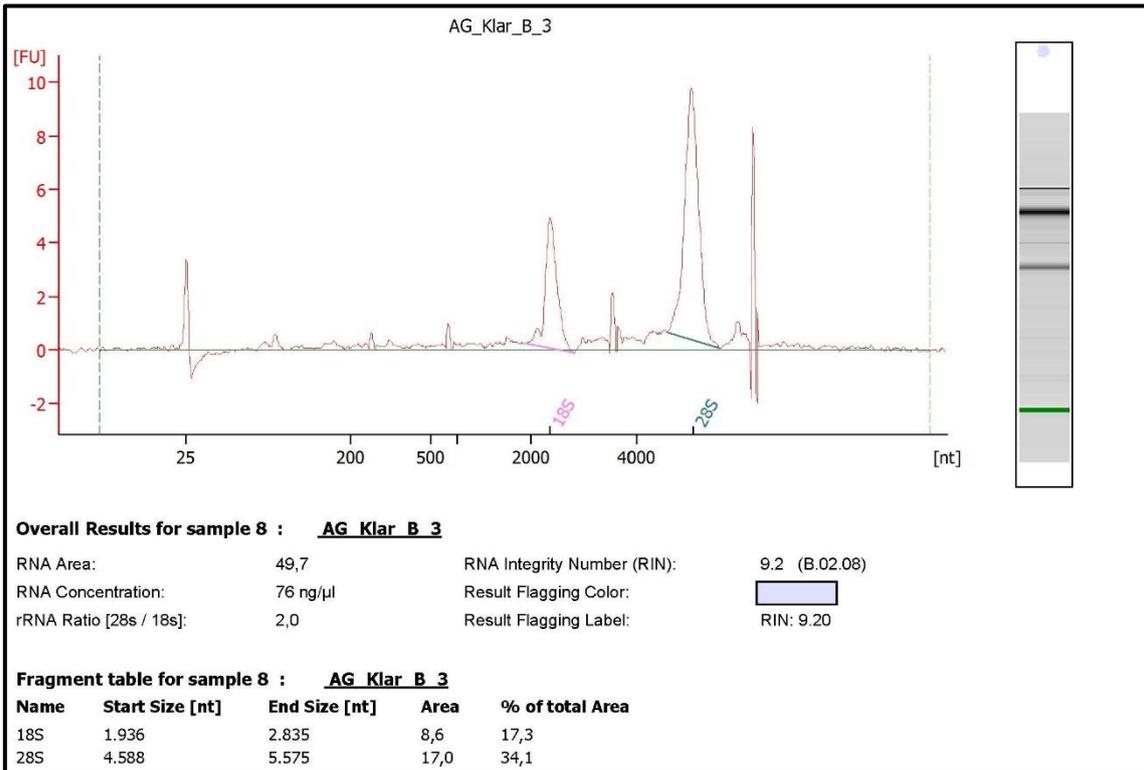
9.5. Ergebnisse Bioanalyser – Kit Bio-Rad (OA) (Fortsetzung)



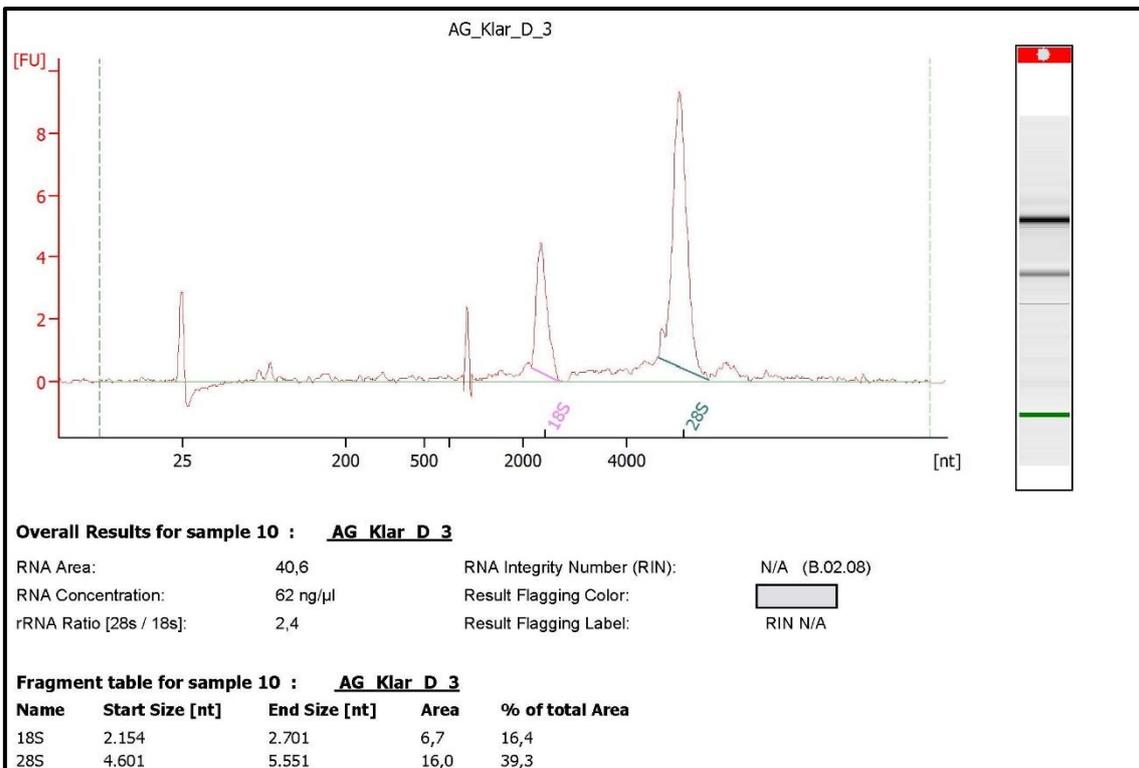
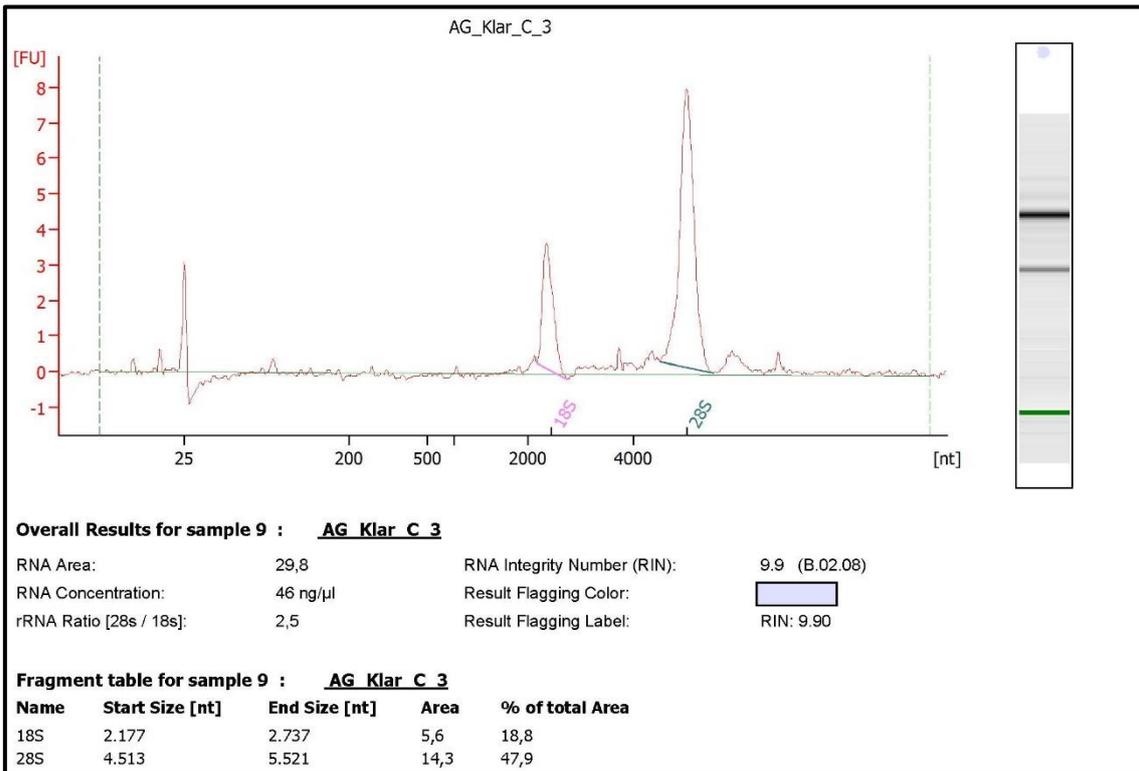
9.5. Ergebnisse Bioanalyser – Kit Bio-Rad (OA) (Fortsetzung)



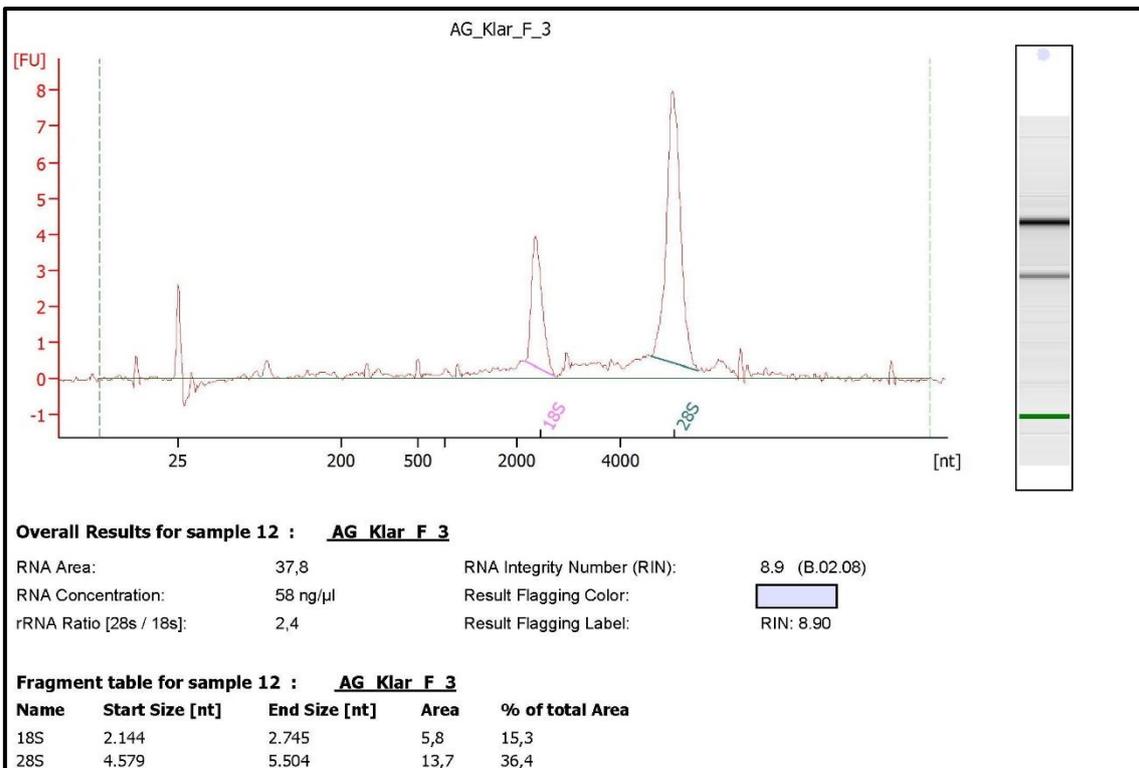
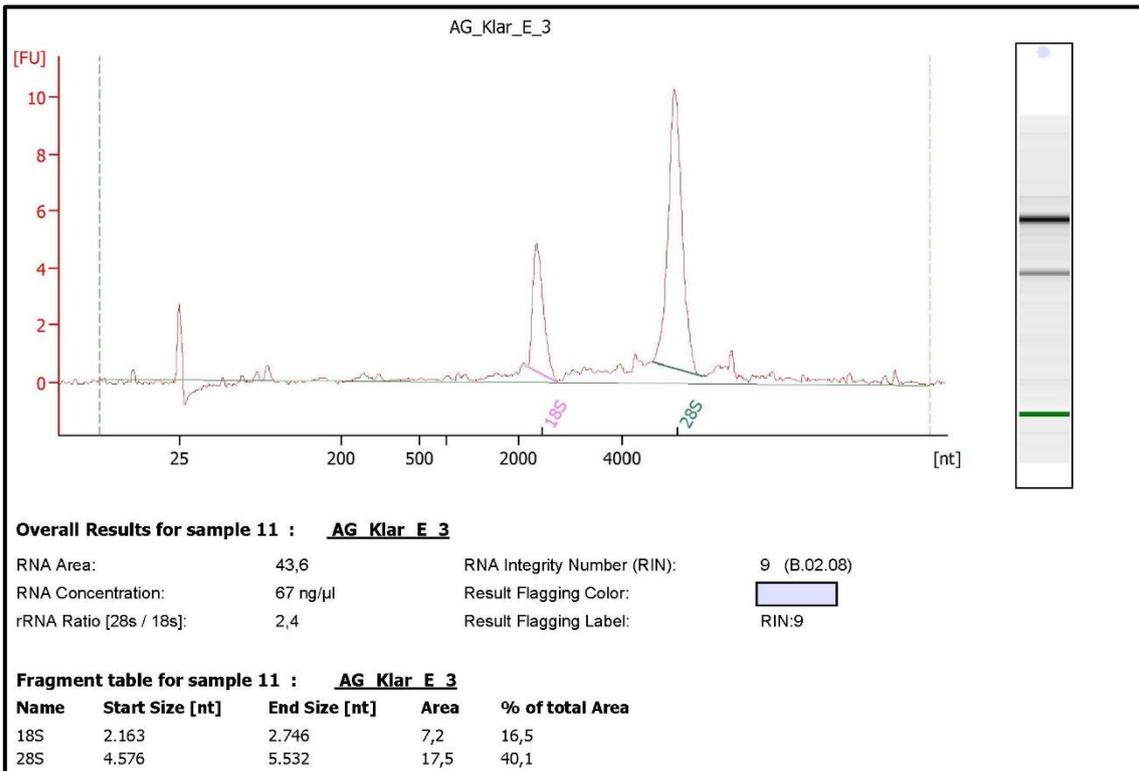
9.6. Ergebnisse Bioanalyzer – Kit Bio-Rad (non OA)



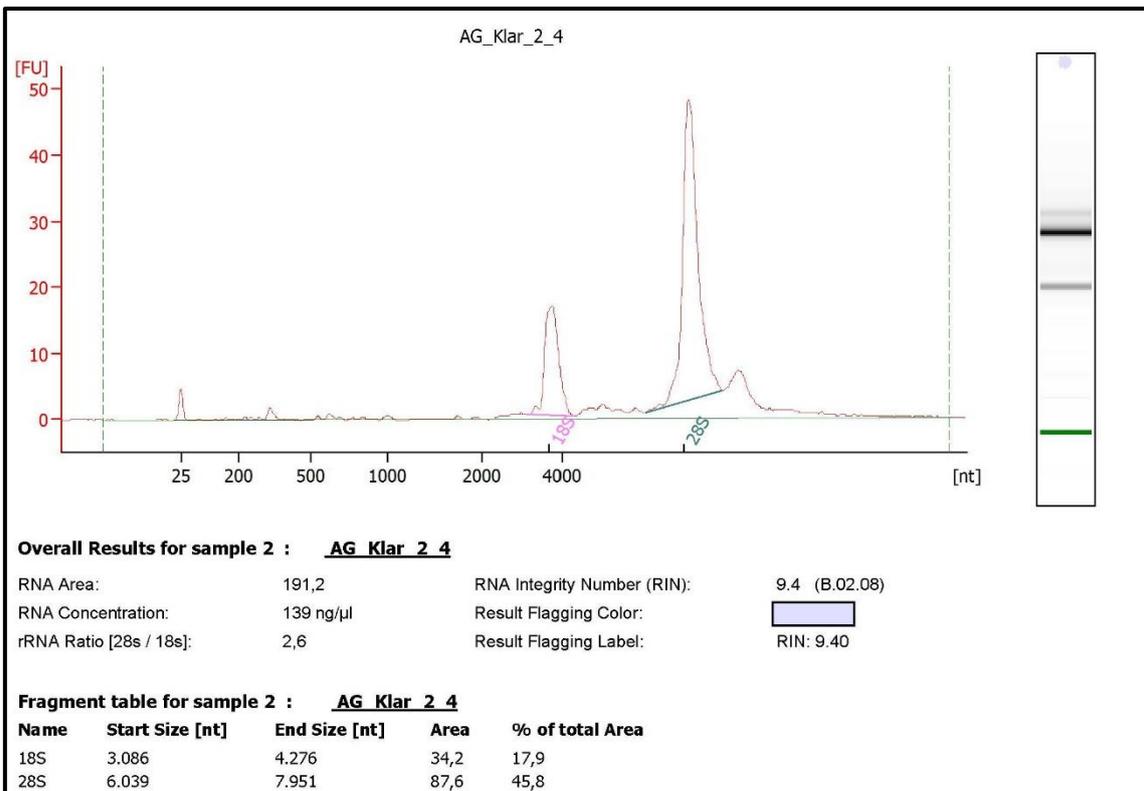
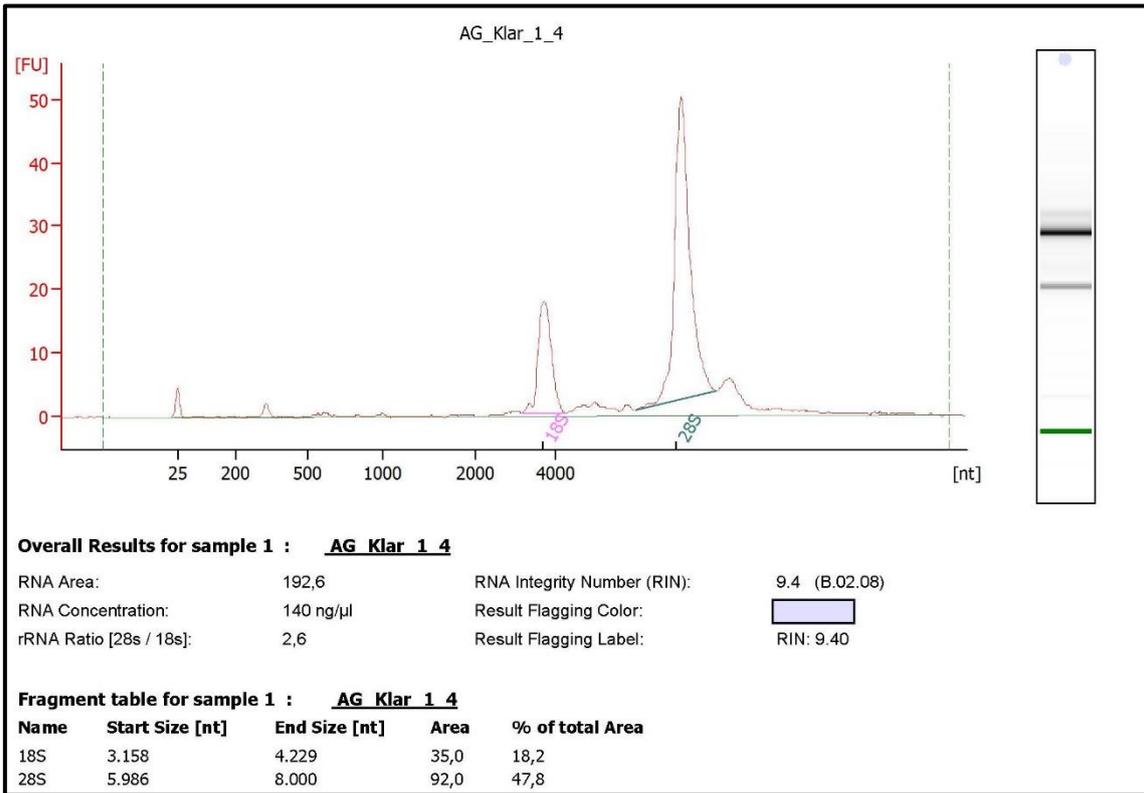
9.6. Ergebnisse Bioanalyser – Kit Bio-Rad (non OA) (Fortsetzung)



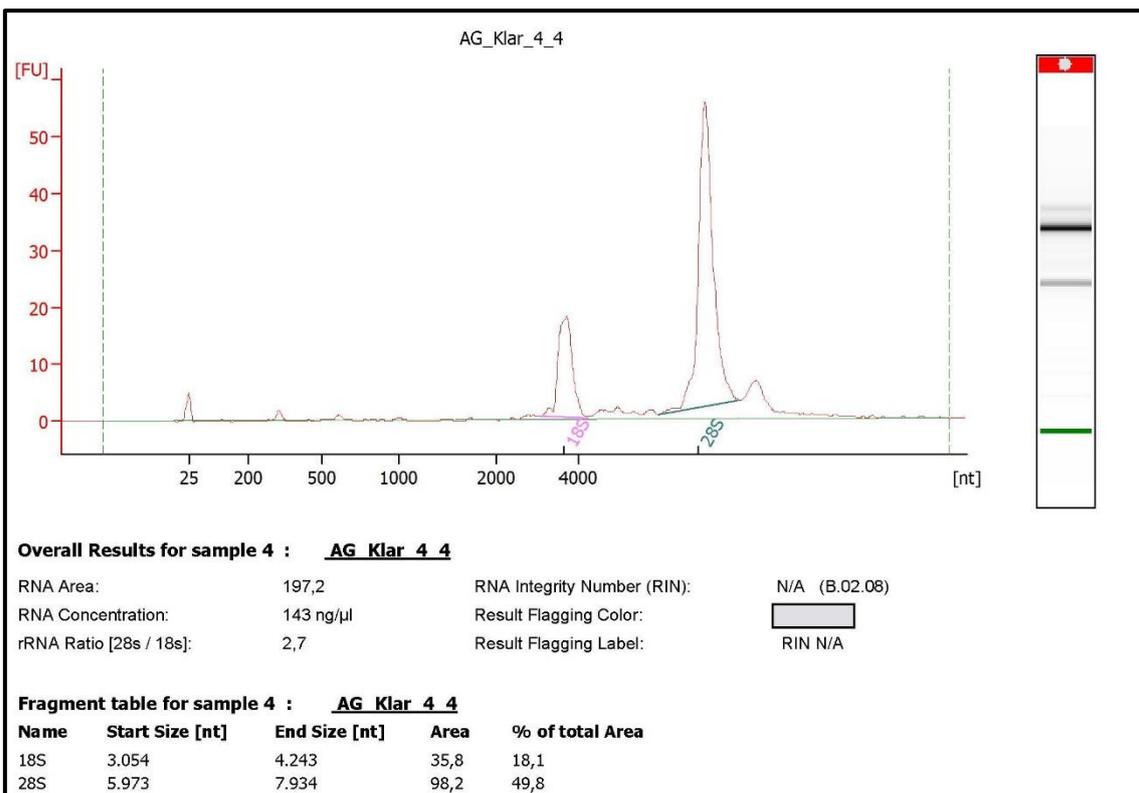
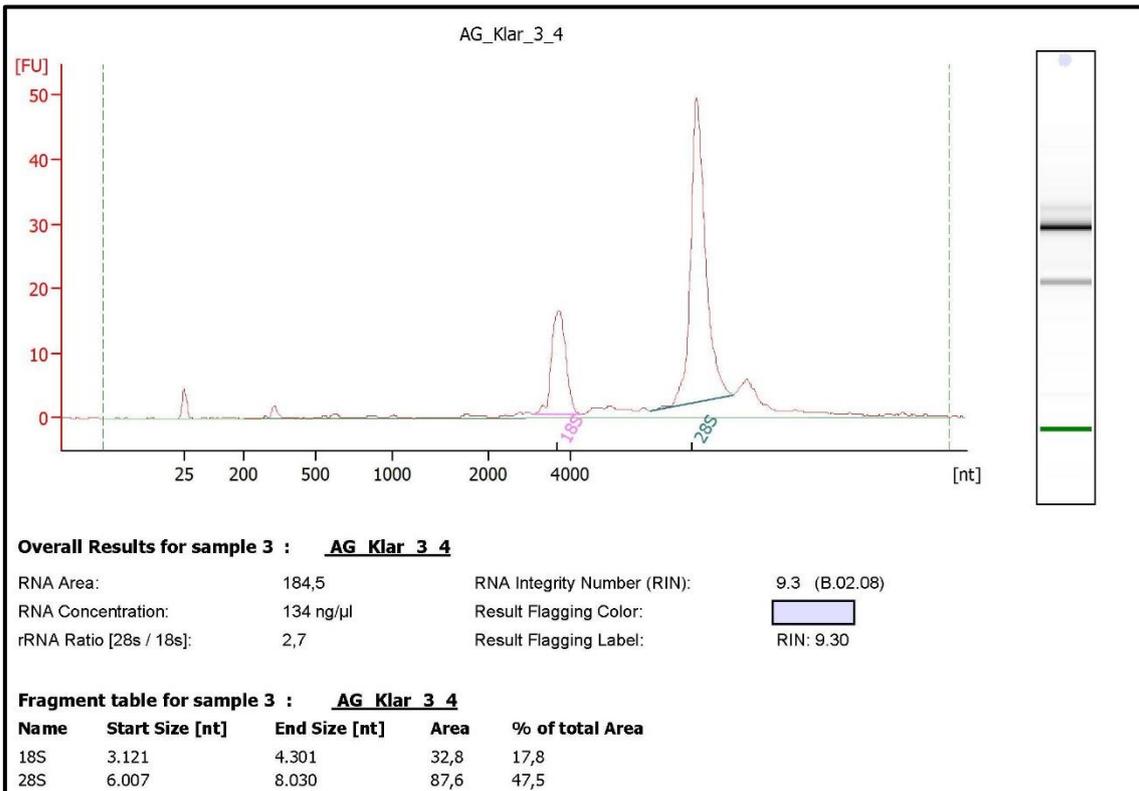
9.6. Ergebnisse Bioanalyser – Kit Bio-Rad (non OA) (Fortsetzung)



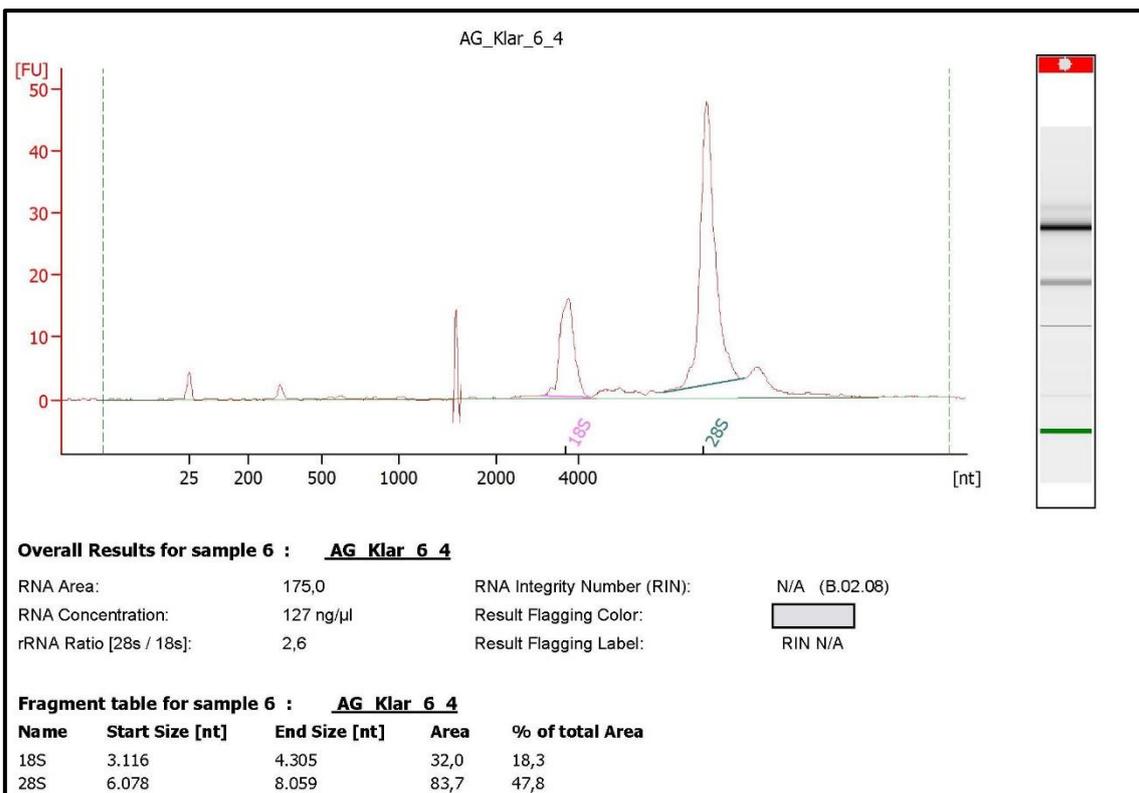
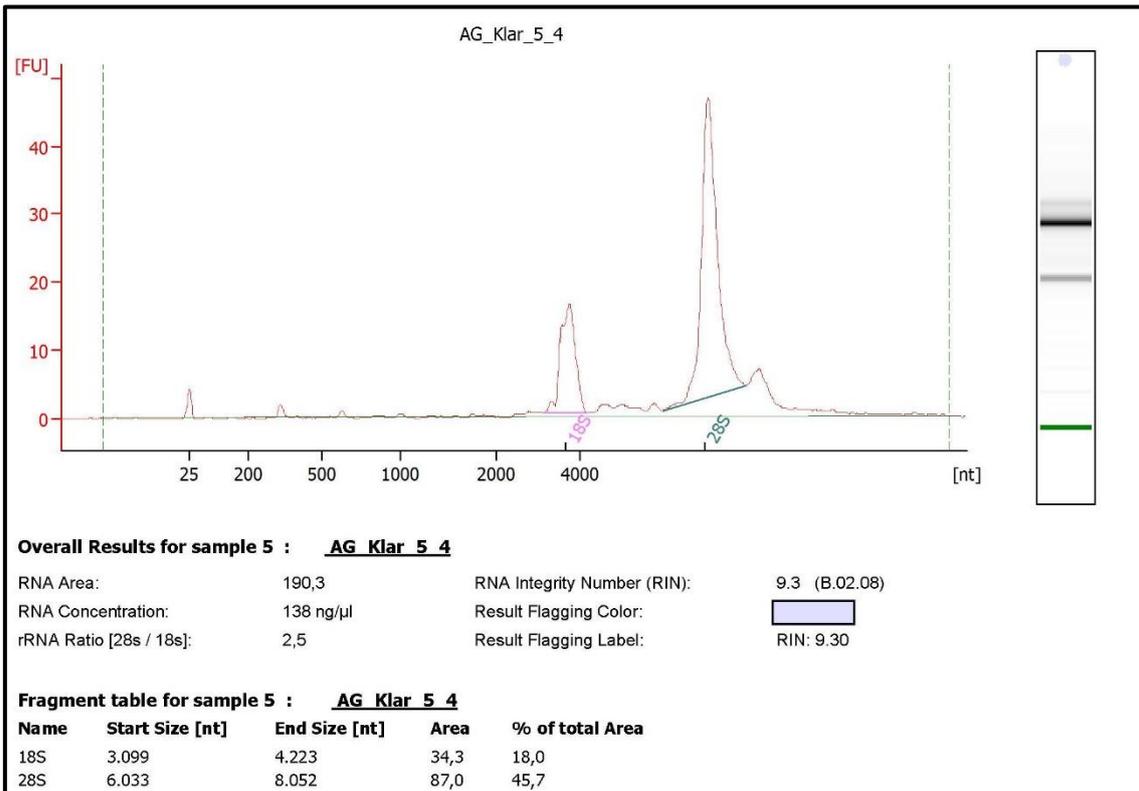
9.7. Ergebnisse Bioanalyser – Kit Qiagen (OA)



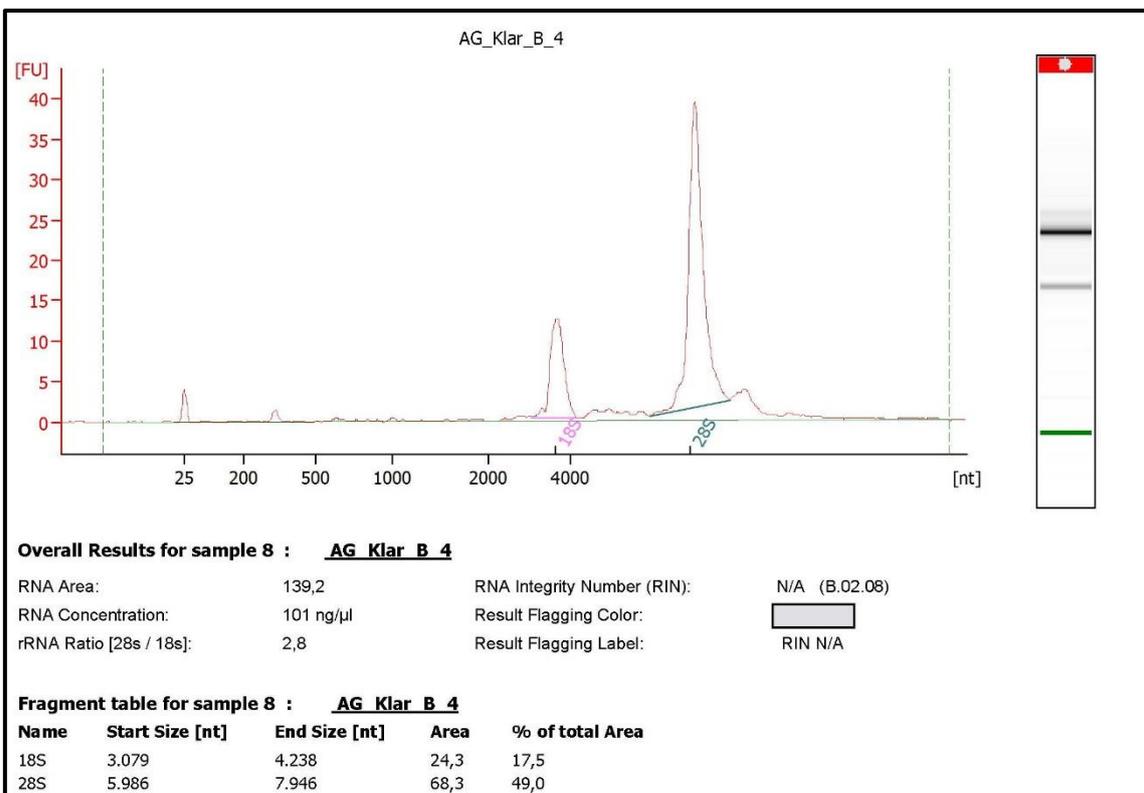
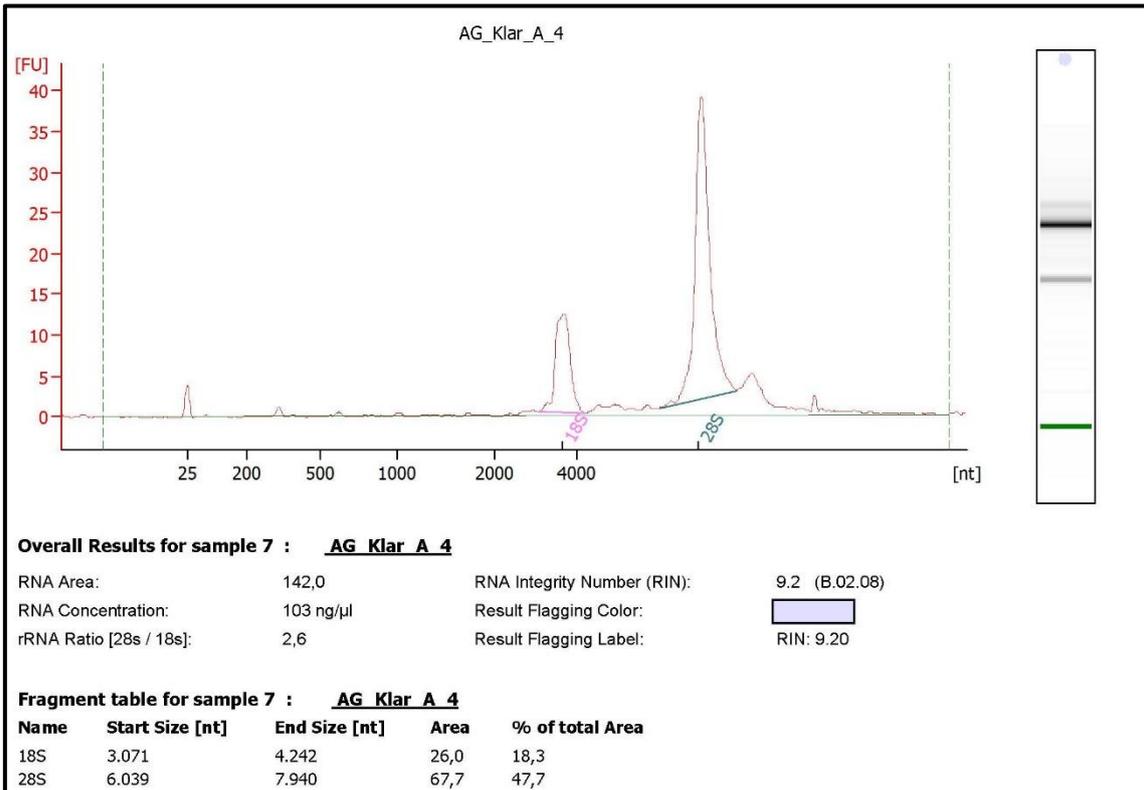
9.7. Ergebnisse Bioanalyser – Kit Qiagen (OA) (Fortsetzung)



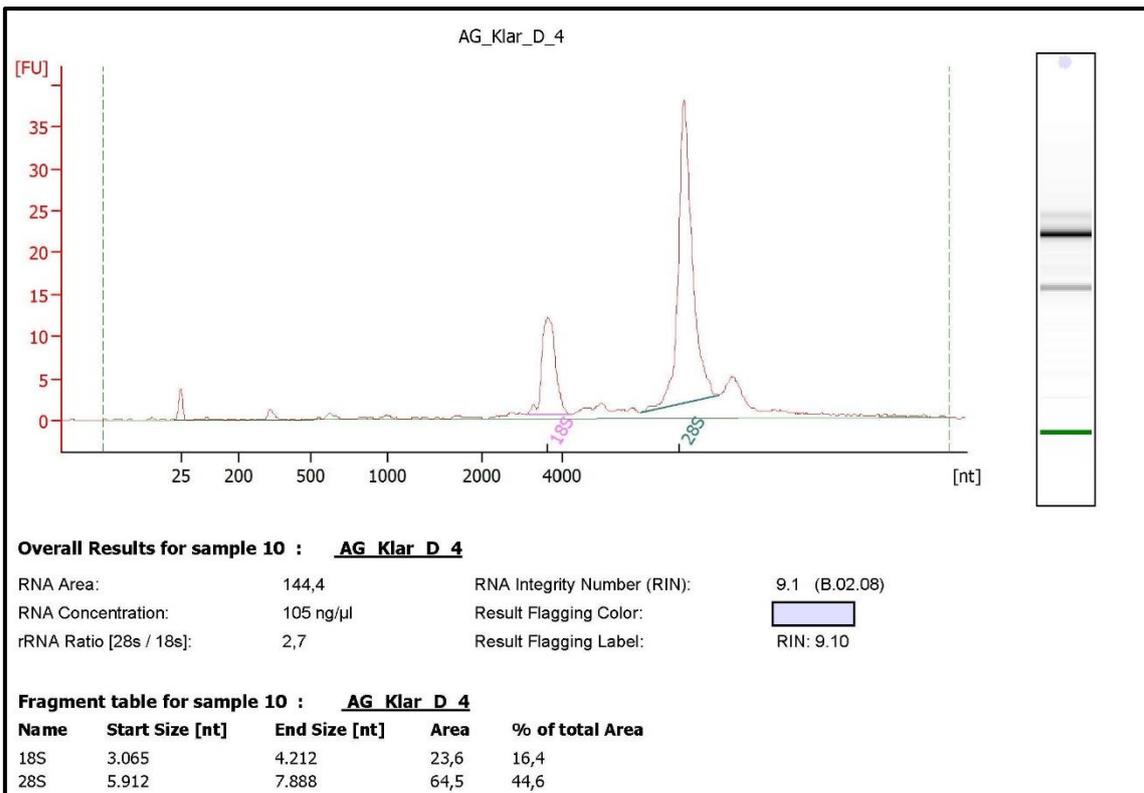
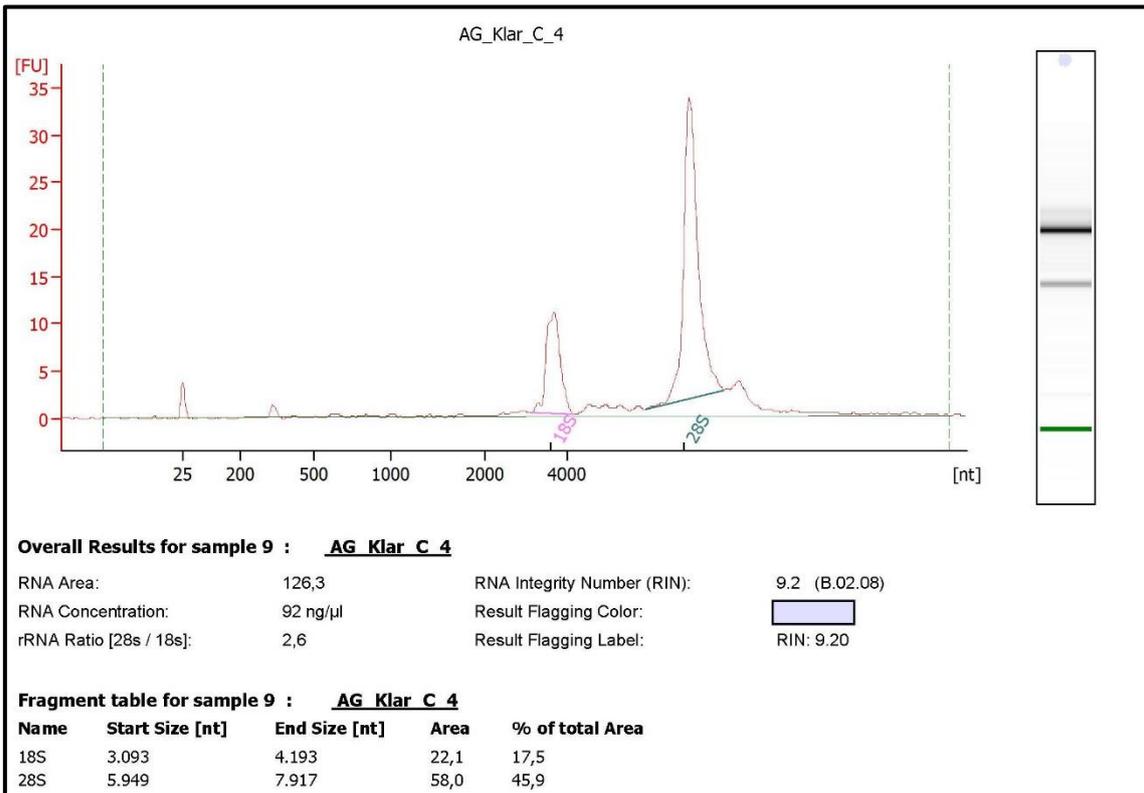
9.7. Ergebnisse Bioanalyser – Kit Qiagen (OA) (Fortsetzung)



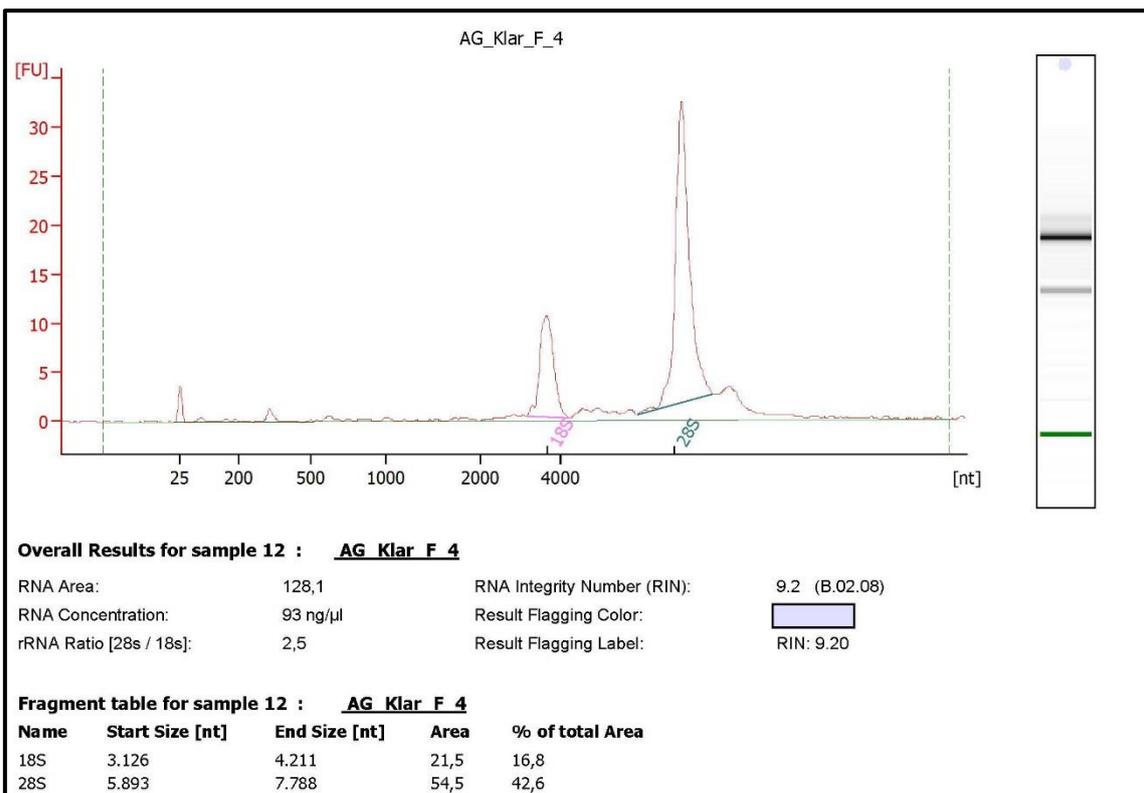
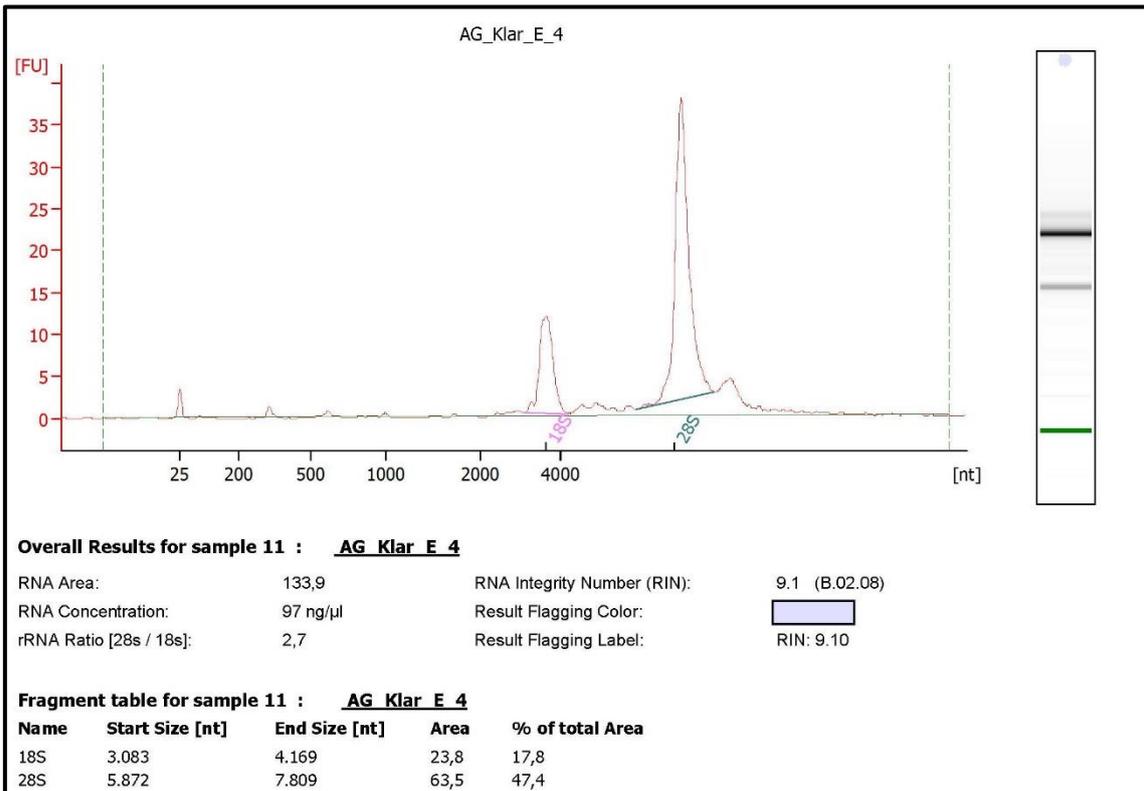
9.8. Ergebnisse Bioanalyser – Kit Qiagen (non OA)



9.8. Ergebnisse Bioanalyser – Kit Qiagen (non OA) (Fortsetzung)



9.8. Ergebnisse Bioanalyser – Kit Qiagen (non OA) (Fortsetzung)



10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Peter Müller einen ganz besonderen Dank entgegen bringen, für Möglichkeit meine Doktorarbeit im Team des Labors für Biomechanik und Experimentelle Orthopädie zu absolvieren.

Mein außerordentlicher Dank gilt Herrn Dr. Roland Klar, der mir als Betreuer dieser Arbeit jederzeit zur Seite stand wenn ich Hilfe benötigte. Besonders sei hier die kritische Auseinandersetzung bei der Durchsicht meiner Arbeit genannt.

Des Weiteren möchte ich mich bei Julia Redeke und Bärbel Schmitt bedanken für die praktische Einarbeitung in die unterschiedlichen Labortätigkeiten.

Ein ganz besonderer herzlicher Dank gebührt meinen Eltern und meiner Schwester, die mich bei all meinen Umwegen im Leben unterstützt haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein größter Dank gilt allerdings meiner Frau Rebecca, für unsere zwei gemeinsamen Kinder, die jahrelange Geduld, Fürsorge, Motivation, Liebe und Kraft die sie mir schenkte; ohne sie hätte ich diese Arbeit nicht verfassen können.

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema selbständig 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.

Gröbenzell, 14.11.2021

Ort, Datum

Alexander Bürger

Alexander Bürger (Doktorand)