

**Identifikation differentiell exprimierter  
Gene in der Chondrozytenreifung:  
Einfluss von Kollagen VIII auf die späte  
Differenzierung von Chondrozyten des  
embryonalen Hühnersternums**

**Birgit Wurbs**

**2010**



Die Kunst ist, einmal mehr aufzustehen als man umgeworfen wird.

Sir Winston Churchill (1874 - 1965)

# **Biologie**

## **Dissertationsthema**

### **Identifikation differentiell exprimierter Gene in der Chondrozytenreifung:**

Einfluss von Kollagen VIII auf die späte Differenzierung von  
Chondrozyten des embryonalen Hühnersternums

### **Inaugural Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades**

**der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie**

**der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät**

**der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

**vorgelegt von**

**Birgit Wurbs (geb. Günther)**

**aus Datteln**

**2010**

Dekan:	Professor Dr. N. Sachser
Erster Gutachter:	Prof. Dr. B. Moerschbacher
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. P. Bruckner
Tag der mündlichen Prüfung:	20.04.2010.....
Tag der Promotion:	23.04.2010.....

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>1</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1</b>	<b>Der Knorpel.....</b>	<b>4</b>
1.1.1	Klassifizierung des Knorpels.....	4
1.1.2	ECM des Knorpels.....	5
1.1.2.1	Komponenten der ECM.....	6
1.1.2.1.1	Kollagene.....	6
1.1.2.1.1.1	Fibrilläre Kollagene.....	7
1.1.2.1.1.2	Nichtfibrilläre Kollagene.....	9
1.1.2.1.2	Nicht-kollagene Matrixproteine.....	13
1.1.2.1.2.1	Glykosaminoglykane (GAGs).....	13
1.1.2.1.2.2	Proteoglykane.....	14
1.1.2.1.2.3	Glykoproteine.....	15
<b>1.2</b>	<b>Die Wachstumsfuge.....</b>	<b>16</b>
1.2.1	Enchondrale Ossifikation.....	16
<b>1.3</b>	<b>Embryonales Hühnersternum.....</b>	<b>19</b>
1.3.1	Kultivierung von Zellen aus dem embryonalen Hühnersternum.....	20
1.3.1.1	Unterschiede in der Kultivierung von kaudalen und kranialen Zellen.....	21
<b>1.4</b>	<b>Regulation der Chondrozytendifferenzierung.....</b>	<b>21</b>
1.4.1	Rolle der Proteasen bei der Regulation.....	22
1.4.2	Parakrine und autokrine Regulation.....	24
1.4.3	Transkriptionsfaktoren in der Chondrozytendifferenzierung.....	33.
1.4.4	Kollagene in der Regulation der Chondrozytendifferenzierung.....	34
<b>1.5</b>	<b>Ziel dieser Arbeit.....</b>	<b>34</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>36</b>
<b>2.1</b>	<b>Liste der verwendeten Chemikalien.....</b>	<b>36</b>
<b>2.2</b>	<b>Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>39</b>
2.2.1	Sternapräparation aus Hühnerembryonen.....	39
2.2.2	Brustkorbpräparation aus neugeborenen Mäusen.....	39
2.2.3	Chondrozytenisolierung.....	40
2.2.4	Agarose-Suspensionskulturen.....	40
2.2.5	Monolayerkultur.....	41

---

2.2.6	Transfektion von Chondrozyten.....	41
2.2.7	Immunfluoreszenz.....	41
2.2.8	Markierung mit <sup>14</sup> C- Prolin.....	42
<b>2.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>42</b>
2.3.1	Verwendeter Bakterienstamm.....	42
2.3.2	Nährmedien und Nährmedienzusätze.....	42
2.3.3	Bakterienkultivierung und Stammhaltung.....	43
2.3.4	Vektoren.....	43
2.3.5	Oligonukleotide (Primer).....	44
2.3.6	Herstellung einer subtraktiven cDNA Bank.....	47
2.3.6.1	cDNA-Synthese.....	47
2.3.6.2	Restriktionsverdau mit <i>Rsa</i> I.....	47
2.3.6.3	Adapterligation.....	48
2.3.6.4	Subtraktive Hybridisierung.....	48
2.3.6.5	PCR-Amplifikation.....	48
2.3.6.6	PCR-Analyse der Subtraktionseffizienz.....	48
2.3.6.7	Differentielles Screening der subtrahieren cDNA.....	49
2.3.6.8	T/A-Klonierung.....	49
2.3.6.9	Bakterienkolonie-PCR zur Erstellung eines cDNA-Arrays.....	49
2.3.6.10	cDNA-Dot Blots.....	50
2.3.6.11	Radioaktive Markierung von subtrahierter und unsubtrahierter cDNA.....	50
2.3.6.12	Hybridisierung der Dot Blots.....	50
2.3.6.13	Sequenzierung.....	51
2.3.6.14	Sequenzanalysen im Internet.....	51
2.3.7	Gene array.....	51
2.3.8	Isolierung von RNA aus Hühnerchondrozyten mit Trizol® .....	51
2.3.9	Isolierung von mRNA.....	52
2.3.10	Reinigung von RNA.....	52
2.3.11	DNase I-Verdau.....	52
2.3.12	Isolierung von DNA.....	52
2.3.13	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäuren.....	53
2.3.14	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	53
2.3.14.1	Gelelektrophorese von DNA (Sambrook et al., 1989).....	53
2.3.14.2	Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese.....	53

2.3.15	Northern Blot.....	54
2.3.16	Hybridisierungstechniken.....	54
2.3.16.1	Radioaktive Markierung einer ssDNA-Sonde.....	54
2.3.16.2	DIG Markierung einer ssDNA-Sonde.....	55
2.3.16.2.1	Konzentrationsbestimmung der DIG gelabelten DNA durch Dot Blots.....	55
2.3.16.3	Hybridisierung und Detektion von Northern Blots.....	56
2.3.16.3.1	Hybridisierung von Northern Blots mit einer radioaktiv markierten Sonde.....	56
2.3.16.3.2	Hybridisierung von Northern Blots mit einer DIG markierten Sonde.....	56
2.3.17	cDNA-Synthese.....	57
2.3.17.1	Reverse Transkription.....	57
2.3.17.2	Reverse Transkription mit dem Qiagen <sup>®</sup> One Step RT-PCR Kit.....	57
2.3.18	Amplifikation von Nukleinsäuren.....	58
2.3.18.1	Taq-Polymerasen.....	58
2.3.18.2	Pfu-Polymerasen.....	58
2.3.19	Klonierung.....	59
2.3.19.1	Klonierung der ORF-cDNA von $\alpha 1$ (VIII) aus Huhn.....	59
2.3.19.2	Klonierung der ORF-cDNA von $\alpha 1$ (VIII) aus Maus.....	59
2.3.19.3	Plasmidisolierung mit dem Qiaprep-Spin-Miniprep-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland).....	60
2.3.19.4	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	60
2.3.19.5	A-Tailing.....	60
2.3.19.6	Restriktionsverdau von DNA.....	61
2.3.19.7	Dephosphorylierung.....	61
2.3.19.8	Ligation von DNA-Fragmenten.....	61
<b>2.4.</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>61</b>
2.4.1	Bestimmung der alkalischen Phosphatase.....	61
2.4.2	Fällung von Proteinen aus Zellmedium.....	62
2.4.3	Bestimmung der Proteinkonzentrationen (BCA- Test).....	62
2.4.4	Isolierung von Kollagenen aus Zellkulturmedium.....	62
2.4.5	Isolierung von Kollagenen aus Zellen und der umgebenden Matrix.....	63
2.4.6	Isolierung von Kollagenen aus Agarose.....	63
2.4.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	64
2.4.8	Färbung mit Coomassie Brilliantblau R-250.....	64
2.4.9	Sequenzierung von Proteinbanden.....	65

2.4.10	Fluorographie.....	65
2.4.11	Western-Blot und Immundetektion.....	65
<b>2.5</b>	<b>Histologische Analyse.....</b>	<b>66</b>
2.5.1	Herstellung von Paraffinblöcken und -schnitten.....	66
2.5.2	Herstellung von Kryostatblöcken und -schnitten.....	67
2.5.3	Färbung von Gewebeschnitten.....	67
2.5.3.1	Alzian-Blau/Sirius-Rot-Färbung.....	68
2.5.3.2	Immunhistochemische Färbung.....	68
2.5.3.2.1	Immun-histochemische bzw. Fluoreszenz-Färbung.....	68
2.5.3.2.2	Färbung mit dem DakoCytomation ARK <sup>TM</sup> .....	69
2.5.3.3	Verwendete Mikroskope.....	70
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>71</b>
<b>3.1</b>	<b>Anfertigung einer subtraktiven cDNA-Bank.....</b>	<b>71</b>
3.1.1	RNA-Isolierung.....	73
3.1.2	Adapterligation.....	74
3.1.3	Analyse der PCR-Produkte.....	76
3.1.4	Analyse der subtraktiven Bibliothek durch differentielles Screening.....	76
3.1.5	Ergebnisse der Sequenzierungen.....	80
<b>3.2</b>	<b>Gene Array.....</b>	<b>81</b>
<b>3.3</b>	<b>Analyse einiger differentiell exprimierter Gene.....</b>	<b>86</b>
3.3.1	Vergleich der Expression ausgewählter Gene in kaudalen und kranialen Chondrozyten durch Northern Blots.....	86
3.3.1.1	Herstellung der Sonden zur Hybridisierung von Northern Blots.....	86
3.3.1.2	Hybridisierung der Northern Blots.....	87
3.3.2	Untersuchung der Expression von ADAM TS-like1 und Kollagen VIII während der späten Chondrozytendifferenzierung.....	90
3.3.2.1	Expression in kranialen Zellen.....	90
3.3.2.2	Expression in kaudalen Zellen.....	91
3.3.3	Silencing der $\alpha$ 1-mRNA von Kollagen VIII in kaudalen Hühnerchondrozyten.....	93
3.3.3.1	Effekt der Runterregulierung der $\alpha$ 1(VIII)-mRNA auf die späte Chondrozytendifferenzierung.....	94
3.3.3.1.1	Alkalische Phosphatase Bestimmung.....	95
3.3.3.1.2	Expression von Kollagen X.....	96

3.3.3.1.3	Expression von Kollagen II.....	98
3.3.4	Silencing der $\alpha 2$ (VIII)-mRNA in kaudalen Hühnerchondrozyten.....	98
3.3.5	Die Kollagen VIII Knockout-Maus ( <i>Col8a1<sup>-/-</sup>/Col8a2<sup>-/-</sup></i> ).....	99
3.3.5.1	Alzian Blau und Sirius Rot-Färbung.....	99
3.3.5.2	Immunhistochemische und Immunfluoreszenz-Färbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen Kollagen X.....	101
3.3.5.3	Immunhistochemische Färbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen Kollagen II.....	106
3.3.6	Überexpression der $\alpha 1$ -Kette von Kollagen VIII in Chondrozyten aus dem Sternum des Huhns.....	107
3.3.7	Überexpression der $\alpha 1$ -Kette von Kollagen VIII mit Hilfe des Kollagen II- Promotors in transgenen Mäusen.....	109
3.3.8	Immunfärbung mit Kollagen VIII-AK.....	111
3.3.9	Western Blot-Analyse mit Kollagen VIII-AK.....	113
3.3.10	Immunfärbung mit ADAMTS-like1.....	113
3.3.11	Untersuchung der Carboanhydrase, die in kranialen Chondrozyten hochreguliert ist.....	114
<b>3.4</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse.....</b>	<b>115</b>
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>117</b>
<b>4.1</b>	<b>Methoden für die Identifikation differentiell exprimierter Gene.....</b>	<b>117</b>
4.1.1	Suppressive subtraktive Hybridisierung und Gene Array im Vergleich.....	117
<b>4.2</b>	<b>Analyse einiger differentiell exprimierter Transkripte.....</b>	<b>119</b>
<b>4.3</b>	<b>Untersuchungen zu den <math>\alpha 1</math>- und <math>\alpha 2</math>-Ketten von Kollagen VIII.....</b>	<b>120</b>
4.3.1	Expression während der Differenzierung <i>in vitro</i> .....	120
4.3.2	Silencing von Kollagen VIII <i>in vitro</i> .....	121
4.3.3	Die Kollagen VIII Knockout-Maus ( <i>Col8a1<sup>-/-</sup>/Col8a2<sup>-/-</sup></i> ).....	122
4.3.4	Überexpression der $\alpha 1$ -Kette von Kollagen VIII <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	123
4.3.5	Kollagen VIII Proteinexpression.....	124
4.3.5.1	Immunfärbung.....	124
4.3.5.2	Western-Blot.....	123
<b>4.4</b>	<b>Rolle von Kollagen VIII während der Differenzierung.....</b>	<b>125</b>
4.4.1	Homo- oder Heterotrimer?.....	125
4.4.2	Kollagen VIII in Wechselwirkung mit anderen Molekülen.....	126
4.4.2.1	Matrixmoleküle.....	126

---

4.4.2.2	Zellrezeptoren Integrine und DDRs.....	128
4.4.2.3	Lösliche Faktoren.....	130
4.4.2.4	MMPs.....	131
<b>4.5</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>132</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>134</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>136</b>
<b>6.1</b>	<b>Nukleotidsequenzen von Kollagen VIII.....</b>	<b>136</b>
6.1.1	Kollagen $\alpha 1$ (VIII)-mRNA-Sequenz 1 von <i>Gallus gallus</i> .....	136
6.1.2	Kollagen $\alpha 1$ (VIII)-mRNA-Sequenz 2 von <i>Gallus gallus</i> .....	137
6.1.3	Kollagen $\alpha 2$ (VIII) mRNA-Sequenz von <i>Gallus gallus</i> .....	138
6.1.4	Kollagen $\alpha 1$ (VIII) mRNA-Sequenz von <i>Mus musculus</i> .....	139
<b>6.2</b>	<b>Vektorkarten.....</b>	<b>140</b>
6.2.1	Zwischenklonierungsvektor pCR <sup>®</sup> II-TOPO (Invitrogen, USA).....	140
6.2.2	Zwischenklonierungsvektor pBluescript II KS (Stratagene, La Jolla, USA)..	141
6.2.3	Expressionsvektor zur Kontrolle, pmaxGFP (Lonza, Köln).....	142
6.2.4	Expressionsvektor pCMV-Tag-4A (Stratagene, La Jolla, USA).....	143
6.2.5	Bausatz Kollagen VIII in Plasmid.....	144
<b>6.3</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>145</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>176</b>
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>177</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ascorbinsäure
ADAM TS	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
ALP	alkalische Phosphatase
$\alpha 1$ (VIII)	Kollagen $\alpha 1$ (VIII), mRNA bzw. Protein
$\alpha 2$ (VIII)	Kollagen $\alpha 2$ (VIII), mRNA bzw. Protein
$\alpha 1$ (X)	Kollagen $\alpha 1$ (X), mRNA bzw. Protein
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfid
ATDC5	Zelllinie, gewonnen aus einem murinen, embryonalen Karzinom
B	$\beta$ -Aminopropionitril
BLAST	basic local alignment and search tool
BMP	bone morphogenic protein
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
C	Cystein
CBF $\beta$	core-bonding factor $\beta$
cDNA	komplementäre DNA
Col	Kollagen
<i>Col8a1</i>	Gen, das die $\alpha 1$ -Kette von Kollagen VIII kodiert
<i>Col8a2</i>	Gen, das die $\alpha 2$ -Kette von Kollagen VIII kodiert
COMP	cartilage oligomeric protein
cpm	counts per minute
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	entionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco`s modifiziertes Eagle Medium
DMEM/F12	DMEM/Ham`s F-12 mit L-Glutamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
dp	double strand
DTT	Dithiothreitol
E64	Proteinase Inhibierer E64
E.coli	Escherichia coli
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-N, N, N`, N`-tetraessigsäure
ERK	extracellular signal regulated kinases
EST/Est	expressed sequece tag
FACIT	fibrillenassoziierte Kollagene mit unterbrochenen Tripelhelices
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FKS	fötales Kälberserum
GAG	Glykosaminoglykan
GAPDH/G3PDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GDF	growth and differentiation factor
gg	<i>Gallus gallus</i>
Gly	Glycin
h	Stunde/Stunden

hs	<i>Homo sapiens</i>
HT-Agarose	Hochtemperatur-Agarose
IGF-I	Insulin-like growth factor I
Ihh	Indian hedgehog
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
LB	Luria Bertani
MAP	mitogen-activated protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	Map Kinase Kinase
mm	<i>Mus musculus</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOPS	3(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MT-MMP	membrane-type Matrixmetalloproteinase
NC	nicht kollagene Domäne
NT-Agarose	Niedrigtemperatur-Agarose
OD	Optische Dichte
P	Pyruvat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PG	Proteoglykan
Ptc	patched
PTH	parathyroid hormone
PTHR	parathyroid hormone receptor
PTHrP	parathyroid hormone-related peptide
RA	retinoic acid
RAR	retinoic acid receptor
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat-Sequenz
Rho	Rho-GTPase
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
Rock	Rho-Kinase
Rsa I	Rhodopseudomonas sphaeroides
RT	Raumtemperatur bzw. Reverse Transkriptase
Runx	run-related
SDS	sodiumdodecylsulfate
SMCD	Schmid`s metaphysäre Chondrodysplasie
Smo	smoothened
SOX	Sry-related HMG box
ss	single strand
T <sub>3</sub>	Trijodthyronin
T <sub>4</sub>	Thyroxin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	tris buffered saline
TBST	tris buffered saline und Tween-20

---

TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TR	Thyroid-Kernrezeptoren
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
VEGF	vascular endothelial growth factor
WT	Wildtyp
WW	Wechselwirkung
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactosid

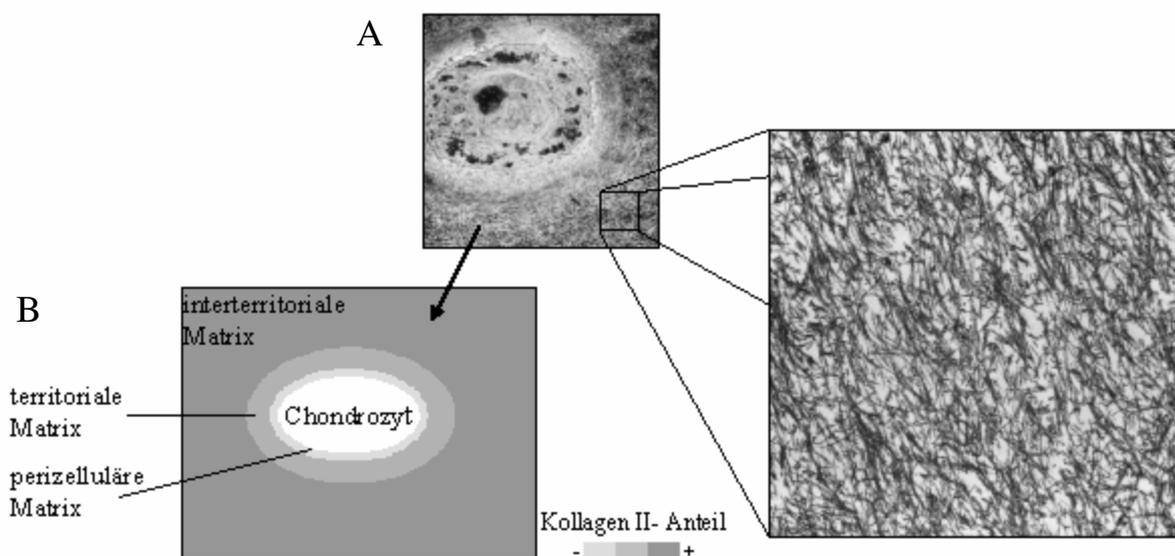
# 1. Einleitung

## 1.1 Der Knorpel

Der Knorpel gehört zu den wichtigsten Binde- und Stützgeweben des Körpers. Er leistet, z.B. als Gelenkknorpel (artikulärer Knorpel), Dehn- und Kompressionskräften biomechanischen Widerstand. Als nicht permanenter Knorpel dient er während der indirekten Knochenbildung (enchondralen Ossifikation) als Vorstufe des Knochens.

Wie auch andere Bindegewebstypen (Knochen, Sehnen, Cornea, Glaskörper des Auges) leitet er sich vom Mesoderm ab. Der Knorpel besteht aus nur einem Zelltyp, der Knorpelzelle (Chondrozyt), und aus der sie umgebenden extrazellulären Matrix (ECM), die von der Zelle selber synthetisiert wird. Die Abbildung 1.1 zeigt diese strukturelle Baueinheit des Knorpels, den Chondron, in einer elektronenmikroskopischen Aufnahme (A) und schematisch (B). Die extrazelluläre Matrix ändert sich in ihrer Zusammensetzung mit zunehmendem Abstand zum Chondrozyten. Sie macht im Knorpel den wesentlich größeren Bestandteil aus.

Da in Knorpelgewebe keine Vaskularisierung stattfindet, werden die Zellen durch Diffusion mit Nährstoffen versorgt.



**Abbildung 1.1: Der Chondrozyt (Knorpelzelle) und die umgebende extrazelluläre Matrix.** A: Aufnahme mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop eines Chondrozyten und seines Umfeldes. In der Vergrößerung ist das Netzwerk aus Kollagenfibrillen, das den Chondrozyten umgibt, zu erkennen (Eyre, 2002). B: Schematische Darstellung eines Chondrozyten und seiner umgebenden Matrix. Der Kollagen II-Anteil in der extrazellulären Matrix nimmt mit dem Abstand vom Chondrozyten zu. Der Chondrozyt mit den umgebenden Schichten wird als Chondron bezeichnet (Verändert nach Horton, 1993).

### 1.1.1 Klassifizierung des Knorpels

Es werden drei Knorpeltypen unterschieden, die sich in ihrer Morphologie und der Zusammensetzung der ECM stark unterscheiden (Horton, 1993, Temenoff und Mikos, 2000):

## Elastischer Knorpel

Der elastische Knorpel formt das Ohr und die Nase. Charakteristisch ist die Anwesenheit von elastischer Faser (Elastin) in großen Mengen, was diesem Knorpel Verformbarkeit und Biugsamkeit verleiht.

## Faserknorpel

Der Faserknorpel besitzt eine hohe Festigkeit, da er aus eng ineinander verflochtenen Kollagenfasern besteht. Er befindet sich am Übergang zwischen hyalinem Knorpel und dichtem Bindegewebe und kommt in Zwischenwirbelscheiben, in der Schambeinfuge und in Teilen des Kiefergelenkes vor.

## Hyaliner Knorpel

Der hyaline Knorpel besteht aus Kollagenfibrillen, aus Proteoglykan-Aggregaten und dem Chondrozyten. Er kommt während der embryonalen Entwicklung in den Anlagen einiger Skeletteile vor, die in der indirekten Knochenbildung (enchondralen Ossifikation) durch Knochen ersetzt werden. Als permanenter Knorpel liegt er an Gelenkoberflächen, Rippen, der Nase, dem Kehlkopf, der Trachea und den Bronchien vor. An den Gelenken sorgt der artikulare Knorpel für eine reibungsarme Bewegung der artikulierenden Skelettelemente. In der vorliegenden Arbeit wird nur der hyaline Knorpel behandelt.

### 1.1.2 ECM des Knorpels

Der hyaline Knorpel besteht zu etwa 80% aus Wasser und zu etwa 20% aus zum Teil sehr komplex aufgebauten Aggregaten, die ein hohes Molekulargewicht besitzen. Bei der Betrachtung durch ein Elektronenmikroskop lassen sich quergestreifte Fibrillen erkennen. Sie bestehen hauptsächlich aus den Kollagenen II, XI und IX, welche innerhalb der Fibrillen kovalent quervernetzt sind und somit für eine starke mechanische Zugfestigkeit des Gewebes sorgen.

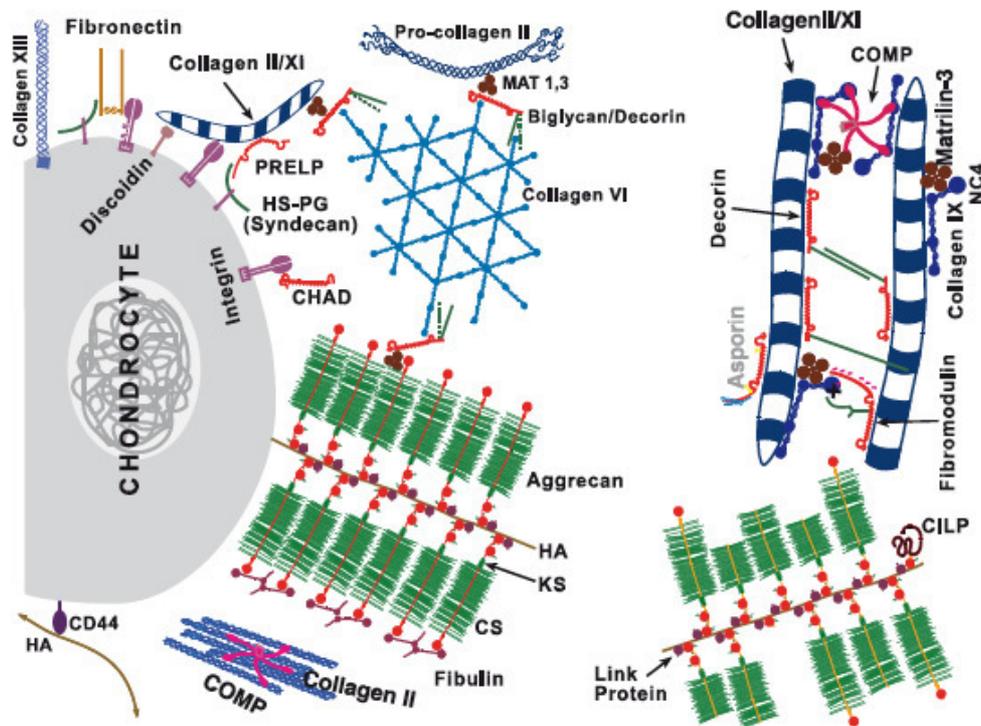
Umgeben werden die Fibrillen von Hyaluronan und Proteoglykanen. Die Proteoglykane besitzen sulfatierte Glykosaminoglykanketten, so dass aufgrund der großen Menge an negativen Ladungen sehr viel Wasser gebunden werden kann. Auf diese Weise entsteht ein innerer Schwellendruck und das führt zur hohen Druckbelastbarkeit des Knorpels.

Die ECM, die direkt an die Membran des Chondrozyten angrenzt, besteht aus dichtem Proteoglykan und wird als perizelluläre Matrix bezeichnet. Die daran anliegende territoriale Matrix besteht aus Fibrillen, dünnen Filamenten und Chondroitinsulfat. Die Fibrillen der interterritorialen Matrix sind dicker als die der territorialen Matrix und die interterritoriale Matrix ist reich an Keratansulfat (Poole et al., 1984). Der Anteil an Kollagen II nimmt mit dem Abstand zum Chondrozyten zu. Schematisch zu sehen ist das in der Abbildung 1.1 B.

Neben den Hauptkomponenten enthält die ECM des hyalinen Knorpels noch zahlreiche weitere Proteine wie z.B. kleinere Proteoglykane und Glykoproteine. So spielen z.B. Thrombospondine und Fibronectin eine Rolle bei der Zell-Matrix-Interaktion. Sehr wichtige Enzyme in der ECM sind die Matrixmetalloproteasen (MMPs), da sie durch Spaltung Matrixkomponenten aktivieren oder deaktivieren können.

### 1.1.2.1 Komponenten der ECM

Zur besseren Übersicht über die verschiedenen ECM-Komponenten und zur Veranschaulichung der Komplexität der ECM wird zunächst eine Abbildung gezeigt (1.2), die einige Komponenten in der Interaktion mit anderen ECM-Komponenten darstellt.



**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Zusammenspiels verschiedener Matrixkomponenten.** COMP=cartilage oligomeric matrix protein, CS=Chondroitinsulfat, HA=Hyaluronsäure, HS-PG=Heparansulfat-Proteoglykan, KS=Keratansulfat, MAT=Matrilin, CHAD=Chondroadherin, PRELP=proline arginine-rich end leucine-rich repeat protein (Heinegård, 2009).

Mutationen in einzelnen ECM-Komponenten können verschieden starke Auswirkungen auf den Organismus haben. So können etwa Veränderungen in Kollagen X oder II durch eine gestörte enchondrale Ossifikation zu Kleinwuchs führen, oder zu degenerativen Krankheiten des Knorpels, wie Osteoarthrose, etwa durch das Fehlen von Kollagen IX oder Mutationen in Kollagen II.

In den folgenden Abschnitten werden zunächst die Kollagene und dann die nicht-Kollagenen-Matrixkomponenten, zu denen auch COMP (Thrombospondin-5) und Matriline zählen, vorgestellt.

#### 1.1.2.1.1 Kollagene

Kollagene sind der Menge nach die bedeutendsten Proteine des Organismus. Sie geben die Struktur von Haut, Sehnen, Bändern und bilden die organische Grundsubstanz von Hartgewebe und Basalmembran. Momentan sind 27 verschiedene Kollagene bekannt, die von

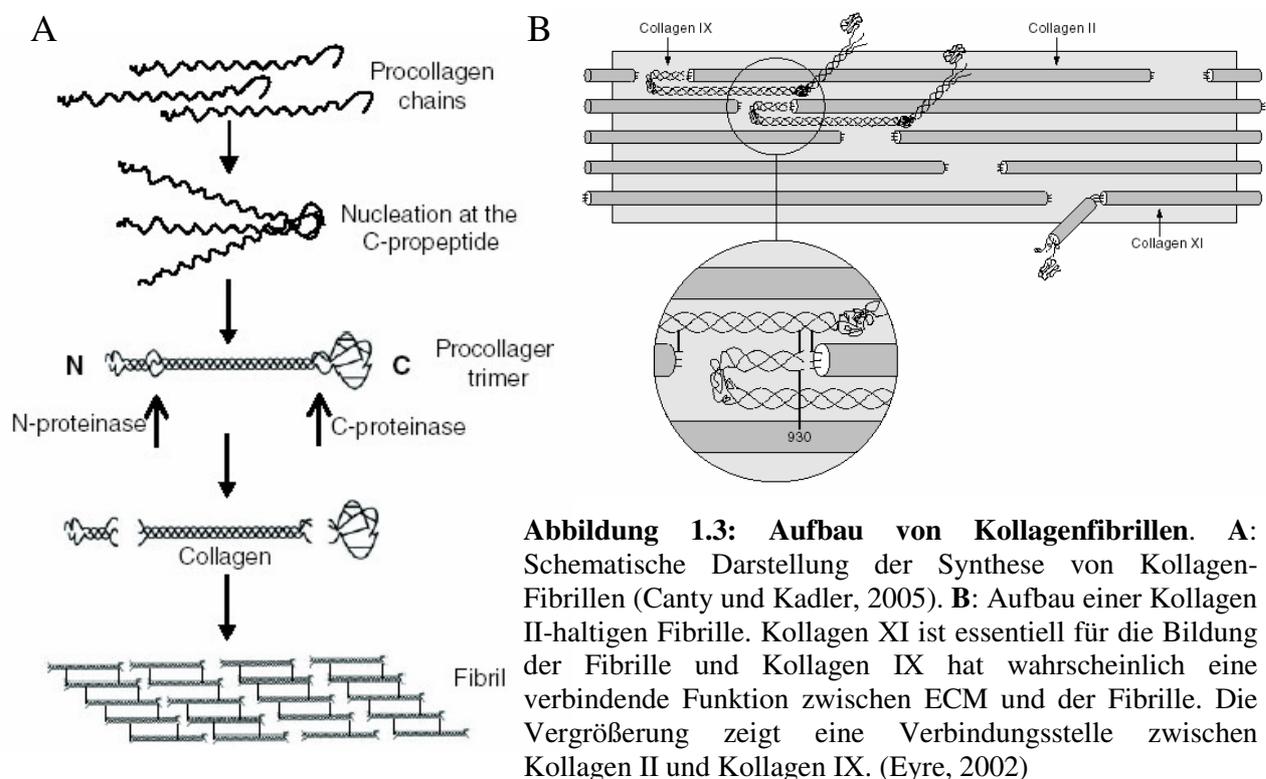
41 Genen kodiert werden. Viele von ihnen sind im Knorpel vertreten, von denen einige der wichtigsten noch vorgestellt werden.

Im artikulären Knorpel haben Kollagene einen Anteil von etwa 66% am Trockengewicht. Kollagene formen verschiedene Quartärstrukturen, nach denen sie sich auch in Gruppen einteilen lassen: Es gibt die fibrillären Kollagene, fibrillenassoziierte Kollagene mit unterbrochenen Tripelhelices, Transmembrankollagene, filamentbildende Kollagen und netzwerkbildende Kollagene.

Allen gemeinsam ist eine rechtsgängige Tripelhelix, bestehend aus drei Polypeptidketten (linksgängige  $\alpha$ -Ketten). Die Tripelhelix der verschiedenen Kollagentypen kann drei identische (z.B. bei Kollagen X), zwei oder sogar drei (z.B. bei Kollagen IX) verschiedene  $\alpha$ -Ketten enthalten. Die Ketten bestehen aus Wiederholungen von X-Y-Gly-Aminosäuren-Triplets. X und Y können beliebige Aminosäuren sein, X ist aber oft Prolin und Y 4-trans-Hydroxyprolin.

### 1.1.2.1.1 Fibrilläre Kollagene

Die fibrillären Kollagene sind die Hauptkollagene von Bindegewebe, Knochen, Knorpel, Sehnen und Bändern. Ihre wichtigsten Vertreter sind Kollagene I, II, III, V und XI und ihre Aufgabe ist es, Fasern zu formen, die Druck und Zugbelastung standhalten können. In verschiedenen Geweben variieren die Fibrillenzusammensetzungen, um den unterschiedlichen Anforderungen nachkommen zu können: In Sehnen liegt vor allem Kollagen I vor, und die Fibrillen sind parallel angeordnet, damit sie die Zugbelastung in eine Richtung aushalten können.



In der Haut dagegen, wo Kollagen I und III besonders häufig sind, liegen die Fibrillen weniger geordnet vor, damit eine Dehnung in alle Richtung möglich ist.

Im Knorpel bilden die dünnen Fibrillen ein dreidimensionales Netzwerk aus, das auf Druckbelastung eingestellt ist. Der Durchmesser der Kollagenfibrillen nimmt mit zunehmendem Abstand zum Chondrozyten zu. Der Anteil von Kollagen II an den Fibrillen

beträgt bei großem Abstand zur Zelle bis zu 90% Kollagen II (Eyre und Wu, 1987), und die Fibrillen werden dicker und sind stärker gebündelt.

Fibrillen sind heterotypisch, das heißt, dass sie nicht nur aus einem Typ Kollagen bestehen, sondern aus verschiedenen (Eikenberry et al., 1992). Neben den Kollagenen II (etwa 80%), Kollagen IX und XI (jeweils 10%) (Vaughan et al., 1988), treten im hyalinen Knorpel in den Fibrillen auch die Kollagene I, III, XII, XIV, XVI und XXVII auf. Die Kollagene IX, XII, XIV, XVI und XXII sind so genannte FACITs (fibril-associated collagens with interrupted triple helices) und können nicht selbständig Fibrillen bilden, werden jedoch in diese integriert. Die Fibrillenbildung erfolgt im Extrazellulärraum. Zuvor werden die Tripelhelices im Lumen des endoplasmatischen Retikulums mit der Hilfe von Chaperonen, beginnend am C-Terminus, generiert. Modifizierungen wie z.B. die Hydroxylierung von Prolylresten durch die Prolyl-4-Hydroxylase stabilisieren die Tripelhelices thermisch. Nach der Sekretion in den Extrazellulärraum oder während der letzten Phasen der Sekretion werden die Propeptide durch Prokollagenproteinasen abgespalten. Danach bestehen die fibrillären Kollagenmoleküle aus der langen tripelhelikalen Domäne, die an beiden Enden von den Telopeptiden flankiert wird. Jetzt sind die Moleküle zur Fibrillenbildung kompetent. Durch wechselwirkende Aminosäuren ordnen sich die Moleküle in den Fibrillen D-periodisch (D=67 nm) versetzt an. Dies resultiert in einer im Elektronenmikroskop sichtbaren D-periodischen Abfolge von Lücken- und Überlappungsregionen. Aus der unterschiedlichen Aufnahme in diese Regionen von Kontrastmitteln ergeben sich helle und dunkle Abschnitte (Petruska und Hodge, 1964, Eikenberry und Bruckner, 1999). Die Abbildung 1.3 A zeigt vereinfacht die Fibrillenbildung von Kollagenen. Nach erfolgter Fibrillogenese werden die Fibrillen durch kovalente Quervernetzungen stabilisiert. Für diese Quervernetzung sind die Telopeptide notwendig.

## Kollagen II

Kollagen II ist ein Produkt von *Col2a1* und bildet eine homotrimere Tripelhelix  $[\alpha 1(\text{II})]_3$ . Es kommt in allen Knorpeltypen vor und wird während der enchondralen Ossifikation nur in frühen Phasen der Chondrozytenspätendifferenzierung gebildet (Sandberg und Vuorio, 1987, Ng et al., 1993). Allerdings ist seine Expression nicht nur auf Knorpel beschränkt. Während der embryonalen Entwicklung der Maus wurde es z.B. auch im Herz, Gehirn und Auge nachgewiesen (Cheah et al., 1991, Ng et al., 1993). *Col2a1* Transkripte gibt es in zwei Splice-Varianten. Die lange Form mit Exon 2 (IIA) wird vor allem in nicht knorpeligen Zellen exprimiert, während die kurze Form (IIB), ohne Exon 2, typisch für reife Chondrozyten ist (Metsäranta et al., 1992, Ng et al., 1993).

Kollagen II ist ohne andere Kollagene nicht in der Lage, Fibrillen zu bilden, die lang genug für die verschiedenen Gewebe sind. Deshalb kommt Kollagen II niemals als einziges Protein vor, sondern zusammen mit den Kollagenen IX und XI, seltener mit XI und XVI. Die Abbildung 1.3 B zeigt schematisch eine Fibrille, die aus den Kollagenen II, IX und XI besteht.

Wenn Kollagen IIA durch Mutationen verändert ist, kann dies zu unterschiedlich starken Chondrodysplasien führen, die mitunter Knochendeformation und Kleinwuchs verursachen (Williams und Jimenez, 1995). Bei 2% der Patienten, die eine familiäre, frühe Osteoarthritis haben, sind auch Mutationen im Kollagen II-Gen für die Krankheit verantwortlich (Ritvaniemi et al., 1995).

## Kollagen XI

Kollagen XI hat wie die Kollagene I, III, V, XXIV und XXVII eine rutenartige Struktur und eine große tripelhelicale Domäne. Es liegt als Heterotrimer [ $\alpha 1(XI)$   $\alpha 2(XI)$   $\alpha 3(XI)$ ] vor (Eyre et al., 1987).

Die  $\alpha 3(XI)$ -Kette ist in ihrer Primärsequenz identisch mit  $\alpha 1(II)$  B, das eine der langen Spleißvarianten von Kollagen II-mRNA ist (Eyre und Wu, 1987). Im adulten Knorpel findet man die Ketten  $\alpha 1(V)$  und  $\alpha 1(XI)$  im Verhältnis 1:1 (Eyre und Wu, 1987). Die  $\alpha 1(V)$ -Kette verbindet sich mit  $\alpha 1(XI)$  und  $\alpha 2(XI)$ -Ketten.

In der ECM ist Kollagen XI in dünnen Fibrillen mit bis zu 10% vertreten, während es bei dicken Fibrillen nur noch etwa 3% ausmacht (Vaughan et al., 1988, Eyre und Wu, 1987).

Es wird angenommen, dass Kollagen XI den Kern der Fibrillen bildet (Bateman et al., 1996) und dass sich Kollagen II und IX anlagern.

Das Stickler-Syndrom ist eine besondere Form der Chondrodysplasie (Vikkula et al., 1995) und führt zu unnormaler Skelett- und Augenentwicklung, verursacht durch Punktmutationen in den Genen *Coll1a1* und *Colla2*. Eine Deletion in *Coll1a1* der Maus führt zu einem frame shift des Leserasters und als Folge davon zu einer autosomal rezessiven Chondrodysplasie. Die cho/cho-Maus stirbt bei der Geburt, da die Translation der Volllänge  $\alpha 1(XI)$ -Kette nicht stattfinden kann. Verursacht wird der Tod wahrscheinlich durch eine Unterentwicklung der Lunge oder durch einen Kollaps der Luftröhre (Li et al., 1995).

Vermutlich spielt Kollagen XI eine Rolle bei der Regulierung des Durchmessers der Kollagen II/XI-Fibrillen (Blaschke et al., 2000). Außerdem wird vermutet, dass es mit Proteoglykanen interagiert und zu deren Bindung an die Fibrillen beiträgt (Li et al., 1995). Dafür spricht, dass Proteoglykane leicht aus dem Knorpelgewebe von cho/cho-Mäusen extrahiert werden können (Stephens und Seegmiller, 1976). Auffällig in der cho/cho-Maus sind die dicken Kollagenfibrillen und die abnormale Entwicklung von Rippen, Schnauze, Extremitäten, Mandibeln und Trachea (Helminen et al., 2002).

### 1.1.2.1.1.2 Nichtfibrilläre Kollagene

#### **FACIT-Kollagene** (fibrillenassoziierte Kollagene mit unterbrochenen Tripelhelices)

Zu den FACIT-Kollagenen gehören Kollagen IX, XII, XIV, XVI und XIX bis XXIII. Sie bilden keine Fibrillen, können aber mit ihnen interagieren, wie z.B. Kollagen IX, das als monomeres Protein an die Oberfläche von Kollagen II-haltigen Fibrillen bindet. Das N-terminale Ende des Kollagen IX-Moleküls weist von der Fibrille weg. Kollagen IX hat häufig eine Dermatan-sulfat-Seitenkette, was zu den hydrophilen Eigenschaften der Kollagen II/IX-haltigen Fibrillen führt. Die nicht-kollagenen Domänen von Kollagen IX können als gelenkartige Verbindungen zwischen den kollagenen Domänen mit anderen Matrixmolekülen wechselwirken.

## Kollagen IX

Das Kollagen IX-Molekül besteht aus einer  $\alpha 1(IX)$ , einer  $\alpha 2(IX)$  und einer  $\alpha 3(IX)$ -Kette, welche eine unterbrochene Tripelhelix bilden. Es besitzt drei kollagene (COL) und vier nicht kollagene (NC) Domänen

Im Knorpel ist an die  $\alpha 2(IX)$ -Kette oft ein kurzes Glykosaminoglykan gebunden (Irwin und Mayne, 1986, McCormick et al., 1987). Kollagen IX interagiert mit Fibrillen, die hauptsächlich aus Kollagen II bestehen (Vaughan et al., 1988, van der Rest, M. und Mayne, R., 1988). Verantwortlich für die direkte Interaktion mit der Fibrille sind wahrscheinlich die

COL1- und COL2-Domänen, während die COL3-Domäne in die perifibrilläre Matrix ragt. Am Amino-Ende der  $\alpha 1(\text{IX})$ -Kette liegt eine globuläre Domäne (NC4) (Vasios et al., 1988), die mit 243 Aminosäuren im Knorpel sehr viel größer ist, als die anderen nicht kollagenen Domänen NC1-3, die nur zwischen 12-30 Aminosäuren lang sind.

Für die Anhaftung von Kollagen IX an Kollagen II-haltige Fibrillen, verbindet sich die COL2-Domäne von Kollagen IX über Lysyl- und Hydroxyllysylreste mit den N- und C-Telopeptiden von Kollagen II. Die NC1-Domäne knüpft sich an die Tripelhelix von Kollagen II (Eyre et al., 2004). Die COL1-Domäne von Kollagen IX wird antiparallel zu den Kollagen II-Molekülen in die Lückenregionen der Fibrillen eingelagert. Ein Umknicken des Kollagen IX-Moleküls um 180 Grad in der NC2-Domäne führt dazu, dass die COL2-Domäne nunmehr parallel zu den Kollagen II-Molekülen an der Fibrillenoberfläche angeordnet ist. Ein weiterer Knick in der NC2-Domäne erlaubt, dass die COL3- und NC4-Domänen aus der Fibrillenoberfläche herausragen (im Elektronenmikroskop nach Rotationsbedampfung darstellbar (Vaughan et al., 1988)) und deshalb zur bevorzugten Kandidatregionen für Wechselwirkungen mit Zellen und der extrafibrillären Matrix werden (Wu et al., 1992). Es wurde des weiteren spekuliert, dass COL3-Domänen auch in andere Fibrillen eingelagert werden können und Kollagen IX so als Quervernetzer für die Stabilisierung der Fibrillen und des gesamten Netzwerkes sorgt (Müller-Glauser et al., 1986; Eyre et al., 2004).

Kollagen IX ist auf der Oberfläche von Fibrillen dünnerer und mittlerer Dicke zu finden und verknüpft diese wahrscheinlich mit der umliegenden ECM. So bindet es z.B. *in vitro* an verschiedene Integrine, sehr wichtige Zellrezeptoren, und könnte auf diese Weise eine Verbindung zwischen den Chondrozyten und der ECM schaffen (Käpylä et al., 2004). Sehr wahrscheinlich ist auch eine direkte Interaktion von Kollagen IX mit Matrilin-3, und eine indirekte mit Matrilin-3 über COMP (Budde et al., 2005).

Eine Maus, der die  $\alpha 1(\text{IX})$ -Kette fehlt (Fässler et al., 1994), kann kein funktionelles Kollagen IX-Protein mehr bilden (Hagg et al., 1997). Die neugeborene Maus zeigt einen Phänotyp in der Wachstumsfuge (Dreier et al., 2008). Die verschiedenen Zonen der Wachstumsfuge (proliferierende, prähypertrophe und später auch die hypertrophe Zone) haben im Gegensatz zum Wildtyp zellfreie Regionen. Diese Abnormalitäten nehmen mit dem Alter der Tiere ab. Allerdings entwickelt sich früh Osteoarthritis, was sich unter anderem durch Verlust von Gelenkknorpel und Degeneration der Gelenkoberflächen bemerkbar macht (Fässler et al., 1994). Außerdem wurde festgestellt, dass die Mäuse einen Hörverlust haben, da Kollagen IX eine Komponente des Corti-Organ im Innenohr ist (Asamura et al., 2005, Suzuki et al., 2005).

Im Menschen führen Mutationen im Kollagen IX-Gen häufig zu autosomal dominanter Multipler Epiphysärer Dysplasie (MED) (Briggs et al., 1994, Czarny-Ratayczak et al., 2001), einer recht milden Chondrodysplasie, die zu verzögerter und unregelmäßiger Ossifikation einiger Epiphysen (Endstück langer Röhrenknochen, mit 2. Ossifikationszentrum, siehe Abbildung 1.6) führt.

## Filamentbildende Kollagene

### Kollagen VI

Kollagen VI ist eine weit verbreitete Komponente des Bindegewebes (Wu et al., 1987). Es bildet aus drei Polypeptidketten,  $\alpha 1(\text{VI})$ ,  $\alpha 2(\text{VI})$  und  $\alpha 3(\text{VI})$ , ein Heterotrimer (Chu et al., 1987). Die tripelhelikale Domäne ist zweimal unterbrochen und etwa 335 AS lang. Sie wird von zwei globulären Domänen am aminoterminalen und am carboxyterminalen Ende eingerahmt. In dem Helixbereich befinden sich Arginin-Glycin-Aspartat (RGD)-Sequenzen,

die wahrscheinlich von Integrinen erkannt werden können, z.B. von  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin (Ruoslathi und Pierschbacher, 1987).

Kollagen VI bildet Suprastrukturen aus, indem sich 2 monomere Moleküle antiparallel zu Dimeren zusammenlegen, die weiter zu Tetrameren aggregieren. Diese polymerisieren dann über die globuläre Domäne.

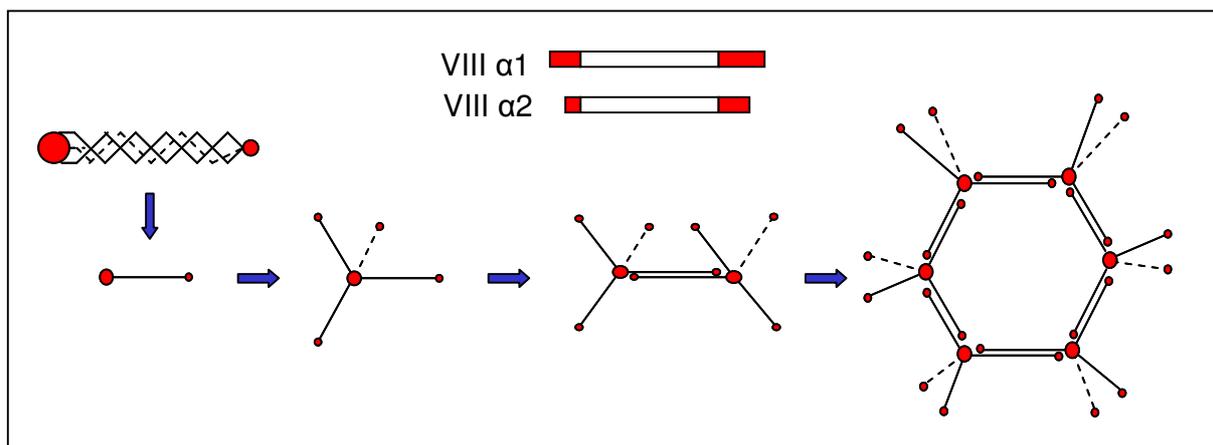
Kollagen VI kann mit vielen verschiedenen Proteinen interagieren, z.B. mit den Kollagenen I, II, IV, XIV, Perlekan, Decorin, Fibronectin und Integrinen (Birk und Bruckner, 2005). Es kann die Zellmigration, Differenzierung, Apoptose und Proliferation beeinflussen.

Zusätzlich zu den drei bereits bekannten  $\alpha 1$ - $\alpha 3$ (VI)-Ketten wurden kürzlich drei weitere Ketten,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  und  $\alpha 6$  entdeckt (Gara et al., 2008, Fitzgerald et al., 2008). Die drei Ketten ähneln im Aufbau der  $\alpha 3$ -Kette und es wird vermutet, dass sie diese ersetzen können. Vermutlich sind sie durch Verdopplung des Vorläufers der  $\alpha 3$ -Kette entstanden. Eine Voraussetzung für die Sekretion von  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  und  $\alpha 6$  ist die Synthese der  $\alpha 1$ -Kette (Gara et al., 2008).

## Netzwerkbildende Kollagene

### Kollagen VIII

Kollagen VIII gehört zu den kurzkettigen, nicht Fibrillen formenden Kollagenen. Es wurde in Endothelzellen entdeckt und deshalb zunächst Endothelzell-Kollagen genannt (Sage et al., 1979, Benya, 1980). Es gibt zwei verschiedene Polypeptide  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$ , die jeweils aus einer tripelhelikalen Domäne und zwei nicht kollagenen Domänen,  $NC_1$  (C-terminal) und  $NC_2$  (N-terminal), die die tripelhelikale Domäne einrahmen, bestehen. Die Polypeptide können Homo- oder Heterotrimere formen (Greenhill et al., 2000, Illidge et al., 1998, Illidge et al., 2001) und bilden hexagonale Netzwerkstrukturen (Sawada et al., 1990, Birk und Bruckner, 2005). Die Abbildung 1.4 zeigt schematisch ein solches Polypeptid und die Entstehung eines Netzwerks.



**Abbildung 1.4: Kollagen VIII Netzwerkbildung.** Kollagen VIII formt Hetero- oder Homotrimere aus den  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$ -Ketten, von denen sich jeweils 4 durch Interaktionen ihrer C-terminalen Enden zu Tetraedern zusammenschließen und dann wiederum hexagonale Netzwerke knüpfen (verändert nach Birk und Bruckner, 2005).

Kollagen  $\alpha 1$ (VIII) und  $\alpha 2$ (VIII) sind strukturell sowohl untereinander sehr ähnlich, als auch zu der Kollagen  $\alpha 1$ (X)-Kette (Shuttleworth et al., 1997).

Die Netzwerke von Kollagen VIII sind in verschiedenen subepithelialen und subendothelialen extrazellulären Matrices zu finden (Sage et al., 1982, Kittelberger et al., 1990, Muragaki et al.,

1992). Sie kommen zum Beispiel in der Descemet-Membran im Auge (Kapoor et al., 1986) und in Blutgefäßen (Sinha et al., 2001) vor. In einer *Col8a1<sup>-/-</sup>/Col8a2<sup>-/-</sup>*-Maus wurde eine veränderte Segmentierung des vorderen Auges mit einer hervortretenden Augenkammer nachgewiesen. Außerdem ist das Hornhautstroma dünner und die Descemet-Membran ist nur etwa halb so dick wie in der Wildtyp-Maus (Hopfer et al., 2005). Im Vergleich zum Wildtyp fehlt die schmale hintere Zone und eine Bänderung, welche in der Wildtyp-Maus deutlich im Transmissions-Elektronen-Mikroskop zu erkennen ist.

Beim Menschen werden die Augenkrankheiten FECD (*Fuchs`endothelial dystrophy*) und PPCD (*Posterior polymorphous corneal dystrophy*) mit verschiedenen Mutationen in der Kollagen VIII  $\alpha$ 2-Kette in Verbindung gebracht (Biswas et al., 2001, Gottsch et al., 2005a/b). Im Unterschied zu der *Col8a1<sup>-/-</sup>/Col8a2<sup>-/-</sup>*-Maus ist die Descemet-Membran im menschlichen Auge bei diesen Krankheiten auffällig verdickt.

Kollagen VIII stimuliert die Migration von glatten Muskelzellen und die Invasion durch das Binden an Integrin-Rezeptoren und durch die Hochregulierung der Expression von Matrix-Metalloproteasen 2 und 9 (Hou et al., 2000). Es wird angenommen, dass Kollagen VIII vielleicht eine provisorische Matrix bilden kann, bis Kollagen I sich absetzt (Gerth et al., 2007 Pilcher et al., 1998).

Außerdem wird für Kollagen VIII über verschiedene mögliche Funktionen spekuliert. Ihm wird eine Rolle bei der Proliferation und Migration von Zellen zugeschrieben (Gerth et al., 2007).

Bei Untersuchungen an Zebrafischen wurde eine Mutante mit auffälligen Veränderungen am Notochord entdeckt (Gansner und Gitlin, 2008). Die Mutante besitzt außerdem einen kürzeren Dottersack. Im Vergleich zum Wildtyp kann man per Elektronenmikroskopie Zonen am ER entdecken, wo sich Proteine stauen, die nicht sekretiert werden können und die so Aggregate bilden. Die Störung in der Bildung des Notochords wird wahrscheinlich durch eine unzureichende Anlagerung von Kollagen VIII aus  $\alpha$ 1-Ketten verursacht.

Hopfer et al. (2009) und Gerth et al. (2007) haben eine Verbindung zwischen diabetischer Nephropathie und der Expression von Kollagen VIII gefunden. Das Fehlen von Kollagen VIII in *Col8a1<sup>-/-</sup>/Col8a2<sup>-/-</sup>*-Mäusen führt zu einem besseren Schutz der Niere in diabetischer Nephropathie. In Knockout-Mäusen mit durch Streptozotocin ausgelöster Diabetes sind die Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp im Glomerulus der Niere nicht so stark ausgeprägt und es wird weniger Albumin ausgeschieden. Vermutlich spielt Kollagen VIII eine Rolle in der Regulierung der Proliferation mesangialer Zellen während der diabetischen Nephropathie.

## **Kollagen X**

Kollagen X gehört wie Kollagen VIII zu den kurzkettigen, nicht Fibrillen bildenden, aber Netzwerk formenden Kollagenen. Es wird von hypertrophen Chondrozyten in der Wachstumsfuge während der enchondralen Ossifikation (Apte und Olsen., 1993, Schmid und Linsenmayer, 1983, Kielty et al., 1985), bei der Reparatur von Frakturen (Grant et al., 1987) und als Folge von Arthrose im artikulären Knorpel (von der Mark et al., 1992) gebildet. Da es ausschließlich von hypertrophen Zellen exprimiert wird, ist es ein Marker für die Spätdifferenzierung der Zellen. Drei  $\alpha$ 1-Polypeptidketten von Kollagen X formen ein Homotrimer-Molekül. Eine Kette besteht aus einem kollagenen Teil, gerahmt von zwei nicht helikalen Domänen, NC<sub>1</sub> und NC<sub>2</sub> (Thomas et al., 1991, Reichenberger et al., 1992). Eine Kette hat ein Molekulargewicht von 59 kDa (Schmid und Linsenmayer, 1987). Über die Funktion von Kollagen X gibt es verschiedene Spekulationen: Es wird angenommen, dass Kollagen X eine Rolle im Prozess der enchondralen Ossifikation spielt (Kwan et al., 1989). Außerdem wird angenommen, dass Kollagen X durch seine Anwesenheit einen Gewebekollaps verhindert, wenn die Matrix abgebaut wird (Kirsch und von der Mark, 1990, Olsen, 1995).

Im Menschen verursacht eine Mutation in der NC1-Domäne (heterozygot) von Kollagen X SMCD (Schmid metaphyseal chondrodysplasia) (Chan et al., 1998). Die Krankheit zeigt einen recht milden Phänotyp mit kleiner Statur, Coxa vara (auswärtsgebogene Hüfte), Genu varum (O-Beine) und mit einer weiten irregulären Wachstumsfuge. Das Krankheitsbild wird durch die Haploinsuffizienz von Kollagen X und nicht etwa durch Expression einer mutierten Kollagen X-Kette ausgelöst (Lachman et al., 1988, Wallis et al., 1996). Die Kollagen-Trimer-Bildung und die Sekretierung wird beeinflusst.

Chan et al. (2001) untersuchten *in vitro* zwei weitere Mutationen in der  $\alpha 1(X)$ -Kette, die nicht im NC1-Bereich liegen und ebenfalls zu SMCD führen, mit Hilfe von zellfreier Translation in der Anwesenheit von Mikrosomen. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Spaltung des Signalpeptids von der mutierten pre  $\alpha 1(X)$ -Kette inhibiert ist. So bleiben die Ketten an die Membran der Mikrosomen gebunden. Weitere Translations- und Transfektions-Studien in Zellen zeigten, dass die Ketten Trimere, aber keine Tripelhelix bilden können. Vermutlich kann das Protein aus diesen Gründen nicht sekretiert werden und das führt dann wahrscheinlich zum Abbau des Proteins.

Eine Erklärung für SMCD durch eine verzögerte terminale Differenzierung könnte ER-Stress sein, der durch die nicht korrekte Proteinfaltung oder fehlende Sekretion des Proteins ausgelöst werden kann (Tsang et al., 2007). Untersuchungen an Kollagen X, das eine Deletion aufweist, konnten zeigen, dass durch die mutierten  $\alpha 1(X)$ -Ketten in hypertrophen Chondrozyten (hypertrophe Zone, siehe 1.5) ER-Stress ausgelöst wird. Die Zellen werden zwar nicht apoptotisch, jedoch wird die terminale Differenzierung unterbrochen und die enchondrale Ossifikation verzögert. Sie beginnen erneut, Faktoren typisch für ein vorausgehendes Differenzierungsstadium, zu exprimieren, so dass weniger Kollagen X synthetisiert wird und somit auch der ER-Stress abnimmt.

Bei Mäusen tritt bei einer homozygoten Null-Mutation für Kollagen X ein milder Phänotyp für SMCD auf, bei heterozygoten Mäusen ein normaler Phänotyp (Kwan et al., 1997). Wird eine Kollagenkette, mit einer Deletion in der  $\alpha 1(X)$ -Helix, aus Huhn in der Maus exprimiert, führt das zu einer spondylometaphysären Dysplasie mit einem schwereren Phänotyp als bei der SMCD. Die Auswirkungen fallen unterschiedlich aus: Einige transgene Mäuse hatten z.B. eine kleine Statur, Ausbeulungen am Rücken und ein instabiles Becken. 15-20% starben sogar im Alter von etwa 20 Tagen, da sich ca. 16 Tage nach der Geburt ein Buckel bildete, eine Lähmung der Hinterbeine einsetzte und Probleme mit der Atmung auftraten (Jacenko et al., 1993, Jacenko et al., 2002).

Campbell et al. (2004) haben die Hypothese, dass der Fehler in Kollagen X in einem Kollaps der Gitternetzstruktur, der Auflösung der Aufteilung der Wachstumsfuge und Markverbindungen und in Inbalance des Cytokin-Metabolismus resultiert.

### **1.1.2.1.2 Nicht-kollagene Matrixproteine**

In dem folgenden Abschnitt werden einige wichtige, nicht-kollagene Matrixbestandteile näher vorgestellt. Die Tabelle 1.1 zeigt außer den vorgestellten Proteinen ergänzend noch weitere nicht-kollagene Matrixproteine.

#### **1.1.2.1.2.1 Glykosaminoglykane (GAGs)**

Die Glykosaminoglykane bestehen aus zwei sich wiederholenden Disaccharideinheiten, einer Uronsäure und einem Aminozucker. Sie besitzen keinen Proteinkern und sind deshalb nicht mit Proteoglykanen zu verwechseln. Es gibt die Hyaluronsäure, das Chondroitinsulfat, das Dermatansulfat, das Keratansulfat und das Heparansulfat (Buckwalter und Mankin, 1998,

Wirth und Rudert, 1996). Sie werden nach ihrer Zusammensetzung aus den verschiedenen Uronsäuren und Aminosuktern unterschieden. Die Hyaluronsäure wird nicht an ein Protein gebunden, während die übrigen vier GAGs immer an einen Proteinkern gebunden vorkommen und auf diese Weise die Proteoglykane bilden. Sie enthält im Gegensatz zu den anderen GAGs keine Sulfatgruppe an ihren Aminosuktern.

Im Knorpel dienen die GAG-Ketten, verbunden mit dem Aggrecan, durch ihre negativ geladenen Sulfatgruppen der Erzeugung eines osmotischen Drucks.

#### 1.1.2.1.2.2 Proteoglykane

Die Proteoglykane sind die zweithäufigsten Proteine in der ECM. Mit dem Proteinkern des Moleküls können eine oder mehrere GAG-Ketten verbunden sein. In Proteoglykanen der Plasmamembran finden sich Heparansulfatketten, während die anderen GAG-Ketten in Proteoglykanen der ECM vorkommen.

#### Aggrecan

Aggrecan hat einen etwa 250 kDa großen Proteinkern, der drei globuläre Domänen besitzt (G1-3) (Doege et al., 1991). Die G1- und G2-Regionen werden durch eine kurze, interglobuläre Domäne unterbrochen. Die G2- und G3-Domänen werden durch eine lange Region unterbrochen, an die sich GAGs anlagern können (Roughley, 2006). Es können etwa 30 Keratansulfat- und bis zu 100 Chondroitinsulfat-Seitenketten an das Proteingerüst binden. Durch die Seitenketten entsteht eine sehr hohe Konzentration an negativen Ladungen, die  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen anzieht, wodurch dann ein osmotisch bedingter Wasser-Influx stattfindet.

Aggrecan bildet im Knorpel sehr große Aggregate mit Hyaluronsäure. Die Bindung der Aggrecane wird durch das Link-Protein stabilisiert (Mörgelin et al., 1988), dessen Struktur ähnlich wie die G1-Domäne des Aggrecans ist.

Es sind Mutationen in dem Aggrecan-Gen im Menschen, in der Maus und im Huhn bekannt, die zu einer Chondrodysplasie führen.

In der Abbildung 1.2 ist eine schematische Darstellung von Aggrecanen im Verbund mit Hyaluronsäure und im Zusammenspiel mit anderen Matrixkomponenten zu sehen.

#### Decorin

Decorin gehört zur Familie der kleinen, leucinreichen Proteoglykane. Es hat eine Molmasse von 40 kDa und enthält nur eine GAG-Kette (Chondroitin- oder Dermatansulfat) am N-terminalen Ende. Decorin besitzt eine Reihe verschiedener biologischer Funktionen. Bereits 1984 entdeckten Vogel et al., dass es die Fibrillogenese der Kollagene I und II inhibieren kann. Außerdem kann es die Aktivität von Wachstumsfaktoren und von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen verändern (Yamaguchi et al., 1990, Iozzo et al., 1999, Santra et al., 2002). Es spielt eine Rolle im Wachstum von Tumoren, in der Angiogenese und in der Erneuerung von Gewebe (Santra et al., 1997, Schönherr et al., 1999, Huttenlocher et al., 1996).

Diese vielen verschiedenen Funktionen werden dem Proteinteil des Proteoglykans zugeschrieben, dessen leucinreiche Region mit insgesamt 12 Leucinen von Cysteinen flankiert werden. So können die Leucine etwa mit Kollagenen und mit TGF- $\beta$  interagieren (Weber et al., 1996, Keene et al., 2000, Reed und Iozzo, 2003, Yamaguchi et al., 1990). In Ovarienzellen vom Hamster konnte gezeigt werden, dass über die Expression von Decorin TGF- $\beta$  inaktiviert und somit die Proliferation der Zellen inhibiert wird (Yamaguchi, et al., 1990). Auch an Kollagen gebundenes Decorin kann noch mit TGF- $\beta$  interagieren (Schönherr et al., 1998). Decorin verlinkt verschiedene Kollagene untereinander, indem es ein Kollagen

mit seinem Proteinteil und das andere mit seinem Glykosaminoglykanteil bindet (Heinegard et al., 2002). In der ECM des Knorpels kommt Decorin also eine Bedeutung in der Quervernetzung der Kollagene und in der Regulierung der späten Chondrozyten-differenzierung zu, bei welcher Decorin über die Inaktivierung von TGF- $\beta$  als positiver Regulator agieren könnte.

Es wird angenommen, dass Decorin eine hufeisenförmige Struktur hat (Weber et al., 1996), indem die  $\beta$ -Faltblätter nach innen und die  $\alpha$ -Helices nach außen gerichtet sind. Die innere Seite des „Hufeisens“ wäre sehr gut geeignet für die Wechselwirkungen mit anderen Proteinen oder Wachstumsfaktoren. Eine andere Studie versucht zu beweisen, dass Decorin als Dimer vorliegt (Scott, Grossmann, et al., 2003). Grundlegend für diese These sind Licht- und Röntgenstrahlen-Streuungs-Experimente. Goldoni et al. (2004) haben mittels Cross-linking Experimenten versucht, eine Bestätigung hierfür zu finden, kamen aber zu der Annahme zurück, dass Decorin als Monomer vorliegt.

Die Decorin Knockout-Maus ist lebensfähig, hat aber eine fragile Haut (Danielson et al., 1997). Ultrastrukturelle Analysen zeigen, dass die Kollagenmorphologie in der Haut und in den Sehnen verändert ist. Die Fibrillen sind grob und unregelmäßiger im Vergleich zu der Wildtypmaus. Im Elektronenmikroskop sind in der Knockout-Maus sowohl größere als auch kleinere Fibrillendurchmesser zu sehen. Die Autoren schließen aus ihren Ergebnissen, dass ohne Decorin eine unkontrollierte laterale Fusion der Fibrillen stattfindet und daraus die reduzierte Zerreißfestigkeit der Haut und Sehnen entsteht.

Eine andere Gruppe (Rühland et al., 2007) untersuchte die Fibrillenbildung unter Anwesenheit von Decorin mit einer GAG-Kette und ohne GAG-Kette und konnte zeigen, dass die Zugabe von Decorin zu Fibroblasten, die kein Decorin exprimieren, den Durchmesser der Fibrillen vergrößert. Durch Zugabe von Decorin ohne GAG-Kette wird der Durchmesser der Fibrillen allerdings noch stärker vergrößert. Sie schlossen daraus, dass die GAG-Kette des Decorin in der frühen Fibrillogenese eine Auswirkung auf die Dicke der Fibrillen hat. Unveröffentlichte Ergebnisse von Hansen et al. zeigen, dass Decorin für das Alignment und die Fusion von Knorpelfibrillen sorgt.

### 1.1.2.1.2.3 Glykoproteine

Glykoproteine bestehen im Gegensatz zu Proteoglykanen zu einem sehr großen Prozentsatz aus einem Proteinteil und kurzen Kohlenhydratseitenketten. Sie stellen Kontakte zwischen den verschiedenen Komponenten der ECM her und vermitteln zwischen der ECM und den Chondrozyten. Ein Beispiel für ein Glykoprotein ist COMP. Es besteht aus einer coiled-coil-Domäne, die 5 identische Untereinheiten am N-terminalen Ende zusammenhält. Es kann Matrilin 1, 3 und 4 (Mann et al., 2004) und die Kollagene I, II und IX (Holden et al., 2001, Thur et al., 2001) binden. Es konnte gezeigt werden, dass COMP an Kollagen IX (in Fibrillen mit Kollagen II) bindet und als Linker zwischen Matrilin und Kollagen IX agieren kann (Budde et al., 2005).

In der Tabelle 1.1 sind die wichtigsten nicht-kollagenen Matrixkomponenten des Knorpels aufgeführt.

**Tabelle 1.1:** Übersicht über einige wichtige nicht-kollagene Matrixkomponenten des Knorpels

Protein	Klassifizierung	Vorkommen
Aggrecan	Proteoglykan	Knorpel, Blutgefäß, Hirn
Biglykan	Proteoglykan (DS/CS)	Knorpel, Haut, Knochen, Sehnen, Aorta
Decorin	Proteoglykan (DS/CS)	Knorpel, Haut, Knochen, Sehnen, Aorta
Fibromodulin	Proteoglykan (KS)	Knorpel, Niere, Plazenta, Pankreas, Skelettmuskel
COMP	strukturgebendes Glykoprotein	im Knorpel, Sehnen
Fibronectin	strukturgebendes Protein	Knorpel, weitverbreitet
Matrilin-1	strukturgebendes Protein	im Knorpel, Sehnen, Knochen
Tenascin	strukturgebendes Protein	Knorpel
Thrombospondin 1 und 3	strukturgebendes Protein	1: Knorpel, weit verbreitet; 3: Knorpel, Hirn, Lunge
Perlekan	Proteoglykan	Basalmembran, Knorpel
Matrix Gla-Protein	regulatorisches Protein	Knochen, Knorpel, Eingeweide
Fibrillin	strukturgebendes Protein	Knorpel, weitverbreitet,
Elastin	strukturgebendes Protein	Lunge, Blutgefäße

CS=Chondroitinsulfat, DS=Dermatansulfat, KS=Keratansulfat, COMP=cartilage oligomeric protein

## 1.2 Die Wachstumsfuge

Es gibt zwei verschiedene Möglichkeiten der Knochenbildung (Osteogenese): Beide beginnen mit der Kondensation mesenchymaler Vorläuferzellen. Bei der direkten oder desmalen Knochenbildung differenzieren die mesenchymalen Zellen direkt zu Osteoblasten. Diese werden in eine verkalkte Substanz, die aus Kollagen I, Proteoglykanen, Mucinen und nicht-kollagenen Proteinen besteht, eingebettet. Die desmale Knochenbildung findet zum Beispiel bei Schädelknochen statt.

Die zweite Möglichkeit der Knochenbildung ist die indirekte oder enchondrale Ossifikation. Es wird eine knorpelige Anlage geformt, die später durch Knochen und Knochenmark ersetzt wird (Chung, 2004). Zum Beispiel entstehen die Knochentrabekel von Röhrenknochen auf diese Weise.

### 1.2.1 Enchondrale Ossifikation

Nach der Kondensation der mesenchymalen Zellen zu einer knorpeligen Anlage, differenzieren die äußeren Zellen zu Osteoblasten und bilden das Perichondrium, während die inneren Zellen zu Chondrozyten differenzieren. Die Chondrozyten exprimieren bestimmte Knorpelmatrixkomponenten wie z.B. Kollagen II und Aggrecan. In der Mitte der knorpeligen Anlage bildet sich das erste Verknöcherungszentrum (Ossifikationszentrum), in welchem die Zellen zunächst proliferieren, dann hypertrophieren und schließlich durch Apoptose sterben. Die Differenzierung des Chondrozyten aus der Ruhephase bis zum Sterben des hypertrophen

Chondrozyten durch Apoptose wird als terminale oder späte Chondrozytendifferenzierung bezeichnet.

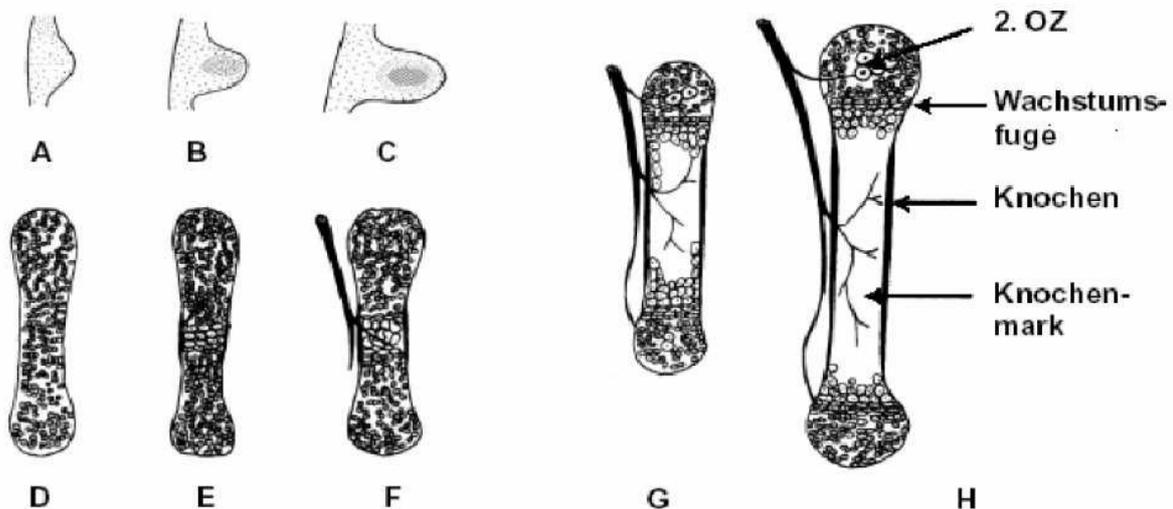
Nun wandern Blutgefäße und Chondroklasten ein, die die Reste der Knorpelzellen abbauen. Osteoblasten-Vorläuferzellen gelangen in die Markhöhle. Das knöcherne Zentrum weitet sich längs zu beiden Seiten aus.

Typisch für die hypertrophen Zellen ist die Expression von Kollagen X statt Kollagen II, das von den proliferierenden Zellen exprimiert wird.

An den beiden Enden der Röhrenknochen entstehen sekundäre Ossifikationszentren in den Epiphysen, die sich zentrifugal ausbreiten. Die Gelenkflächen bleiben knorpelig. Für das Längenwachstum ist die Wachstumsfuge verantwortlich, die zwischen den beiden Ossifikationszentren liegt. Hier durchlaufen die Chondrozyten ebenfalls die verschiedenen Stadien von den ruhenden Chondrozyten bis zur Apoptose.

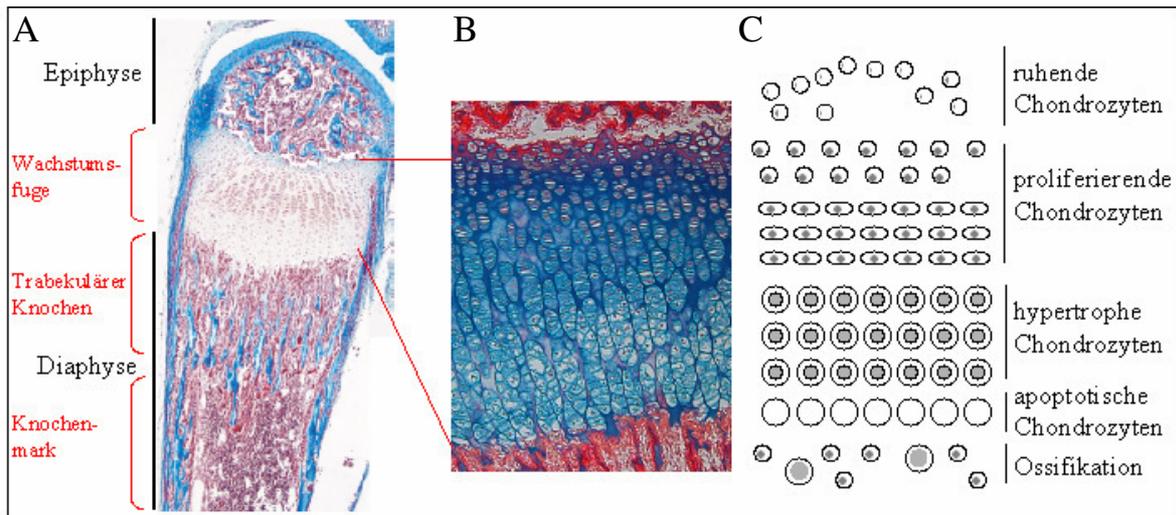
Das Längenwachstum der Knochen endet schließlich beim Erreichen der Geschlechtsreife, wenn eine hohe Konzentration an Sexualhormonen sämtliche Chondrozyten der Wachstumsfuge zur Hypertrophierung anregt und der restliche Knorpel durch Knochen ersetzt wird.

In der Abbildung 1.5 ist die enchondrale Ossifikation schematisch dargestellt.



**Abbildung 1.5: Die enchondrale Ossifikation.** A-C: Kondensierung der mesenchymalen Zellen, D: Formen der Knochenanlagen durch Knorpel, E: Chondrozyten in der Mitte werden hypertroph, F: Blutgefäße wachsen in das Innere des späteren Knochens, G: Die Knochenmarkhöhle, das zweite Ossifikationszentrum und die epiphysäre Wachstumsfuge bilden sich, H: Das sekundäre Ossifikationszentrum bildet sich im epiphysären Knorpel (Cancedda et al., 1995)

In der Wachstumsfuge sind die verschiedenen Differenzierungsstadien, die Chondrozyten auf ihrem Weg bis zur Ossifikation durchlaufen, gut zu erkennen und zu unterscheiden. Die Stadien sind horizontal angeordnet, (Hunziker, 1994), wie in der Abbildung 1.6 C schematisch dargestellt. In Abbildung 1.6 A ist die Tibia einer 14 Tage alten Maus mit Epiphyse, Diaphyse und der Wachstumsfuge zu sehen. Das 2. Ossifikationszentrum in der Epiphyse ist 14 Tage nach der Geburt fast vollständig verknöchert. Die Abbildung 1.6 B zeigt die Vergrößerung einer Wachstumsfuge der Tibia einer 15,5 Tage alten Maus. Die Ruhechondrozyten liegen benachbart zu der Epiphyse. Daran schließt sich die proliferative Zone an, gefolgt von den prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten. Die hypertrophen Zellen werden schließlich apoptotisch und Teil der Knochen.



**Abbildung 1.6: Die Wachstumsfuge des Knochens.** A: Metatarsale Sektion einer 14 Tage alten Maus, gefärbt mit Masson-Trichrom (Ortega et al., 2004). B: Ausschnitt aus der Wachstumsfuge einer Tibia einer 15,5 Tage alten Maus (100 fache Vergrößerung im Lichtmikroskop). C: Schematische Darstellung der verschiedenen Stadien die die Zellen der Wachstumsfuge durchlaufen.

Es gibt für die Chondrozyten der verschiedenen Zonen unterschiedliche Charakteristika:

### Ruhezone

Die Chondrozyten der Ruhezone sind klein und rund. Sie liegen weit von einander getrennt und sind von einer Matrix umgeben, die für den hyalinen Knorpel typisch ist (Hunziker, 1994, Brochhausen et al., 2009). Die Zellen sind metabolisch kaum aktiv und proliferieren fast überhaupt nicht.

Ihre Aufgabe ist relativ unbekannt. Es wurden stammzellenähnliche Zellen in der Ruhezone gefunden (Abad et al., 2002), aus denen sich proliferierende Zellen entwickeln können. Abad et al. (2002) haben die proliferative und die hypertrophe Zone einer Wachstumszone entfernt, woraufhin sich diese Zonen aus der Ruhezone neu bildeten.

### Proliferative Zone

Typisch für proliferierende Chondrozyten der Wachstumsfuge ist die Säulenbildung. Die Säulen sind parallel zu der longitudinalen Achse des Knochens angeordnet. Ihre Höhe hängt von der Mitoserate der Zellen ab. Die Mitospindeln ordnen sich senkrecht zur Längsachse des Knochens an (Stevenson et al., 1990) und die Chondrozyten drängen nach der Teilung vorerst horizontal auseinander und stapeln sich dann übereinander (Hunziker, 1994).

Einen großen Anteil in der ECM der proliferierenden Chondrozyten hat Kollagen II.

Die Chondrozyten synthetisieren während der terminalen Differenzierung für die verschiedenen Zonen typische Faktoren. Nach Cancedda et al. (1995) lässt sich die Differenzierung in 3 Stadien teilen.

Die Chondrozyten der proliferierenden Zone bilden das Stadium I. Typische Genprodukte sind die Kollagene II, IX und XI, Aggrecan und Link Protein. Dieses Stadium lässt sich noch in Ia und Ib unterteilen. Das frühere Stadium Ia ist gekennzeichnet durch eine hohe Expression von Kollagen VI (Quarto et al., 1993) und das spätere Stadium Ib durch eine Aktivierung von Matrilin 1 und die Hochregulierung spezifischer Matrixproteine (Muratoglu et al., 1995).

## **Hypertrophe Zone**

Nach der Einteilung von Cancedda et al. (1995) gehören die hypertrophen Chondrozyten dem Stadium II der Differenzierung an.

Optisch unterscheiden sich Chondrozyten dieser Zone von Chondrozyten der proliferierenden Zone darin, dass ihr Volumen um bis zu 10 mal größer ist. Sie entstehen durch eine terminale Differenzierung der prähypertrophen Chondrozyten, die eine Zone zwischen den proliferierenden und den hypertrophen Zellen bilden.

Die Zellen haben einen sehr hohen Kalziumspiegel, den sie für die Abgabe von Matrixvesikeln benötigen (Wang und Kirsch, 2002, Wang et al., 2003). Die Vesikel nehmen mit Hilfe von Annexinen viel Kalzium auf (Kirsch et al., 2000) und durch die Vesikel werden Phosphatasen, Matrixmetalloproteinasen (MMPs), Kalziumphosphat und Hydroxylapatit aus der Zelle geschleust. Die MMPs 3 und 13 werden von den Chondrozyten exprimiert und bauen die ECM, welche die Zellen umgibt, ab. MMP-13 z.B. spaltet Kollagen II (Goldring et al., 2006, Colnot et al., 2004, Ortega et al., 2004).

Die ECM der hypertrophen Zone unterscheidet sich stark von der ECM der restlichen Wachstumsfuge (Ruhe- und Proliferative Zone). Kollagen X und die alkalische Phosphatase sind typische Produkte der Zellen der hypertrophen Zone (Alvarez, et al., 2000). Kollagen II, IX und XI werden in dieser Zone kaum noch synthetisiert.

## **Invasive Zone**

In der invasiven Zone durchlaufen die Chondrozyten das Stadium 3 der Differenzierung:

Die mineralisierte Matrix wird vaskularisiert. Es dringen Blutgefäße und Osteoblasten ein, stimuliert durch VEGF (vascular endothelial growth factor), das von den hypertrophen Chondrozyten exprimiert wird (Gerber et al., 1999).

Einwandernde Chondroklasten bzw. Osteoklasten degradieren die restliche Matrix (Lewinson und Silbermann, 1992, Vu et al., 1998). Endothelzellen, die von den einwachsenden Blutgefäßen stammen, exprimieren MMP 3, 10 und 13 (Bord et al., 1998, Tuckerman et al., 2000).

Etwa 20% der Septa des hypertrophen Knorpels bleiben bestehen und dienen als Gerüst für die Anlagerung von Knochenmatrix, die von den Osteoblasten sekretiert wird (Salle et al., 2002). Schließlich werden die hypertrophen Chondrozyten apoptotisch (Gibson, 1998, Salvesen und Dixit, 1997).

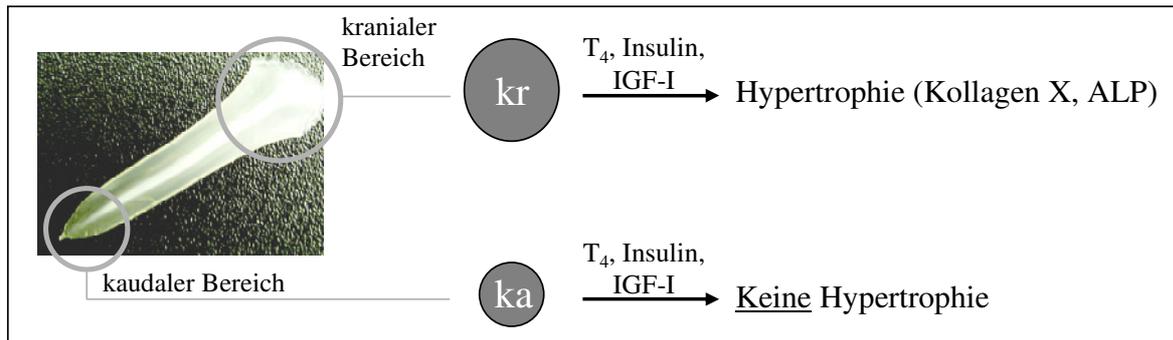
## **1.3 Embryonales Hühnersternum**

Die Entwicklung des embryonalen Sternums des Huhns ist mit der Bildung des primären Ossifikationszentrums vergleichbar. Aus diesem Grund eignet sich das Sternum gut, um die verschiedenen Zellstadien der späten Differenzierung während der enchondralen Ossifikation zu untersuchen.

Die Chondrozyten im Sternum des Huhns entwickeln sich innerhalb der späten Differenzierung unterschiedlich schnell. Am 17. Tag der Entwicklung des Hühnerembryos im Ei ist das Sternum noch immer knorpelig und enthält Zellen in verschiedenen Stadien der Differenzierung, wohingegen die Zellen bis zum 16. Tag des Embryos im Ei homomorph und klein sind und dicht zusammen liegen.

Ab dem 16. Tag zeigen sich im kranialen Bereich des Sternums (siehe Abbildung 1.7) die ersten hypertrophen Zellen. So besteht dieser Teil ab dem 17. Tag aus unterschiedlich differenzierten Zellen. Links und rechts von der Mittelachse des Sternums befinden sich

hypertrophe Zellen, während im peripheren Bereich auch noch kleine, proliferierende Zellen auftreten (D'Angelo und Pacifi, 1997).



**Abbildung 1.7: Embryonales Hühnersternum.** Die Chondrozyten werden aus dem kranialen und kaudalen Teil des Sternums gewonnen und unterscheiden sich dadurch, dass sie sich in unterschiedlichen Stadien der späten Chondrozytendifferenzierung befinden (Foto: T. Steens).

Die Zellen aus dem kranialen Bereich des Sternums beginnen mit der Synthese von Kollagen X. Am Tag 20, das ist einen Tag, bevor das Huhn schlüpft, bestehen 50-80% des Kollagens in diesem Bereich aus Kollagen X (Gibson und Flint, 1985, Reginato et al., 1986). Bereits am 18. Tag beginnt die Verknöcherung und die Vaskularisierung des kranialen Teils; im Gegensatz dazu bleibt der kaudale Teil des Sternums noch bis zu zwei Monate nach dem Schlüpfen des Huhnes knorpelig (Iwamoto, et al., 1993). Die kaudalen Chondrozyten synthetisieren die Kollagene II, IX und XI und befinden sich teilweise im Ruhestadium oder im proliferativen Stadium.

### 1.3.1 Kultivierung von Zellen aus dem embryonalen Hühnersternum

Chondrozyten aus dem kaudalen und kranialen Teil des embryonalen Hühnersternums können auch in Kultur gehalten werden, so dass man die späte Differenzierung *in vitro* simulieren kann. Hierzu wurde eine drei-dimensionale Agarosesuspensionskultur entwickelt (Benya und Shaffer, 1982, Bruckner et al., 1989). Die Dedifferenzierung, welche Monolayerkulturen bei den Chondrozyten verursacht, wird verhindert. Bei der Dedifferenzierung nimmt der Chondrozyt wieder den Phänotyp seiner Vorläuferzelle an, und exprimiert Kollagen I statt Kollagen II und Aggrecan (Mayne et al., 1976, Bruckner et al., 1989). In der drei-dimensionalen Agarosesuspensionskultur wird der differenzierte Chondrozyt stabilisiert und produziert die ECM. Für die Proliferation allerdings benötigt er FKS (Fötale Kälber Serum). Eine andere Möglichkeit der Stabilisierung des Chondrozyten-Phänotyps ist die Kultivierung in Kollagen-Gelen unter Zugabe von Serum (Gibson et al., 1984).

So kann man die Chondrozyten entweder in ihrem gegenwärtigen Zustand erhalten oder die Hypertrophie, also die weitere Differenzierung, induzieren. Um die Differenzierung zu verhindern, muß ein serumfreies Medium verwendet werden, da durch serumhaltiges Medium, das sehr viele verschiedene Faktoren besitzt, die Differenzierung eingeleitet werden kann (Bruckner et al., 1989, Tschan et al., 1990).

Chondrozyten sind empfindlich gegenüber Sauerstoff-Radikalen. Im Knorpel herrscht normalerweise ein geringer Sauerstoffgehalt, der während der Kultivierung in Suspensionskulturen in dieser Form nicht erreicht werden kann. Tschan et al. (1990) konnten zeigen, dass Chondrozyten *in vitro* durch Sauerstoff-Radikale sterben, was aber durch Zugabe von Cystein oder Pyruvat verhindert werden kann.

Außerdem bewiesen sie *in vitro*, dass Chondrozyten in Kulturen von geringer Dichte durch FKS zur Differenzierung angeregt werden können.

### 1.3.1.1 Unterschiede in der Kultivierung von kaudalen und kranialen Zellen

Die Hypertrophie von kranialen Zellen kann durch Zugabe von Insulin like growth factor I (IGF-I), Insulin oder Thyroidhormon erreicht werden (siehe Abbildung 1.7). So kann man während einer 14-tägigen Kultivierung beobachten, wie die Synthese der Hypertrophiemarker Kollagen X und der alkalischen Phosphatase in kranialen Zellen nach Stimulierung ansteigt. Zu Beginn der Kultivierung bilden die kranialen Zellen ein relativ heterogenes Gemisch (frühhypertrophe und proliferierende Zellen), doch durch die Stimulierung werden sie schnell hypertroph und sezernieren die Hypertrophie-Marker, z.B. Kollagen X und die alkalische Phosphatase.

In kaudalen Zellen reichen die gleichen Bedingungen nicht aus, um die Zellen zur Differenzierung anzuregen (siehe Abbildung 1.7) (Böhme et al., 1995). Allerdings zeigten Experimente, in denen Chondrozyten mit Endothelzellen kokultiviert wurden, und Thyroxin in das serumfreie Medium gegeben wurde, dass kaudale Chondrozyten unter diesen Bedingungen hypertroph werden können (Bittner et al., 1998). Der gleiche Effekt tritt ein, wenn die kaudalen Zellen nur mit Thyroxin und dem konditionierten Medium der Endothelzellen kultiviert werden.

Wie sich zeigte, sind Endothelzell-Proteasen für die Freischaltung der terminalen Differenzierung kaudaler Chondrozyten verantwortlich (Babarina et al., 2001).

*In vitro* kann Chymotrypsin die Funktion der Endothelzell-Proteasen ersetzen. Zusammen mit Thyroxin führt es dazu, dass kaudale Chondrozyten in Kultur hypertroph werden.

Werden kaudale und kraniale Chondrozyten in Kokultur gehalten, ohne dass Endothelzell-Protease zugegeben werden, unterdrücken die kaudalen Zellen ihre eigene Hypertrophie und die Hypertrophie der kranialen Zellen (Böhme et al., 1995), indem sie negative Regulatoren der Differenzierung sekretieren.

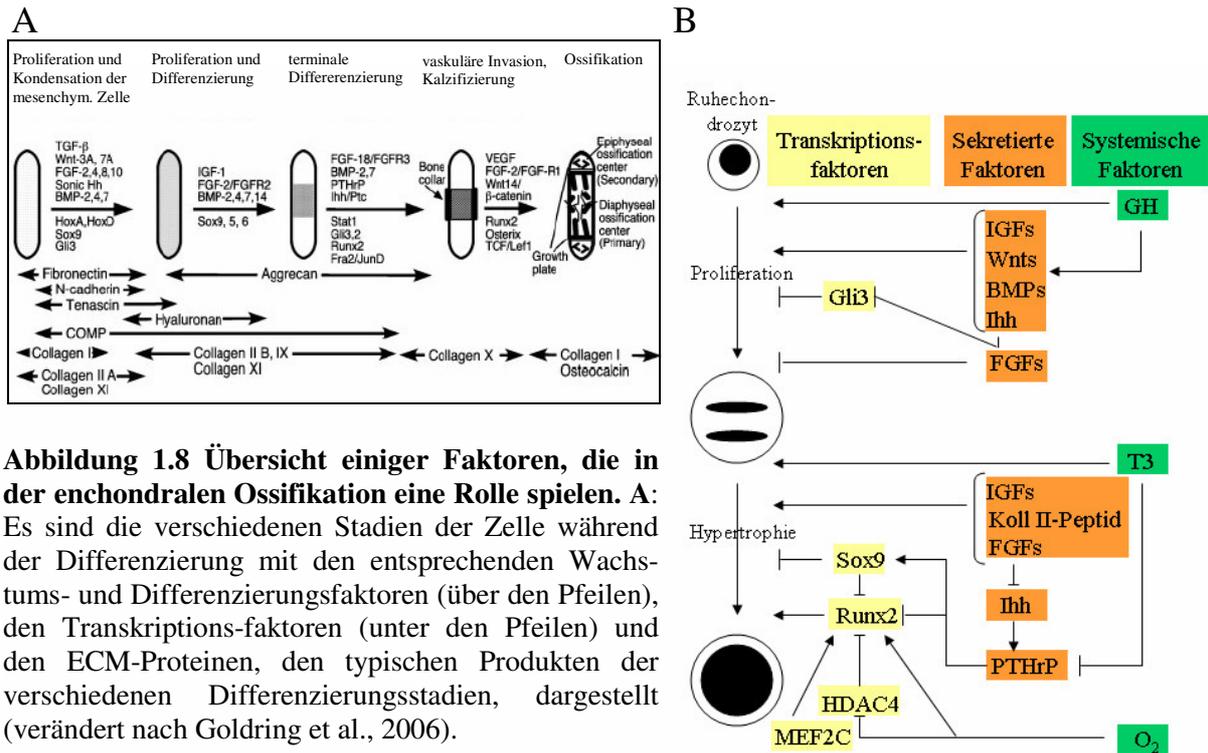
## 1.4 Regulation der Chondrozytendifferenzierung

Der Prozess der Chondrozytendifferenzierung wird auf verschiedenen Wegen reguliert. Die ECM spielt eine wesentliche Rolle. Ihre Funktion liegt nicht nur in ihrer Struktur, sondern auch in der Bereitstellung von verschiedenen Faktoren und der Interaktion mit der Zelle.

Im weiteren Verlauf der Einleitung werden autokrine und parakrine Faktoren vorgestellt, einige Transkriptionsfaktoren und die Proteasen.

In der Abbildung 1.8 werden einige Faktoren gezeigt, die die enchondrale Ossifikation beeinflussen. Sie soll verdeutlichen, dass in der Differenzierung viele verschiedene Faktoren eine Rolle spielen und dass die Anwesenheit eines Faktors den nächsten beeinflusst.

Die Abbildung 1.8 A zeigt die verschiedenen Stadien, die die Zelle während der enchondralen Ossifikation durchläuft und dazu nötige Faktoren. Unterhalb der Abbildung sind die Synthese-Produkte der entsprechenden Stadien dargestellt. In der Abbildung 1.8 B wird die Wirkung einiger Transkriptions-, sekretierter und systemischer Faktoren und ihre Interaktion untereinander dargestellt.



**Abbildung 1.8** Übersicht einiger Faktoren, die in der enchondralen Ossifikation eine Rolle spielen. **A:** Es sind die verschiedenen Stadien der Zelle während der Differenzierung mit den entsprechenden Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (über den Pfeilen), den Transkriptions-faktoren (unter den Pfeilen) und den ECM-Proteinen, den typischen Produkten der verschiedenen Differenzierungsstadien, dargestellt (verändert nach Goldring et al., 2006).

**B:** Schematisches Diagramm über die Rolle verschiedener systemischer Faktoren, sekretierter Faktoren und Transkriptionsfaktoren und über ihre Interaktionen (verändert nach Macky et al., 2008).

### 1.4.1 Rolle der Proteasen bei der Regulation

Die Hypertrophierung der Chondrozyten und die Mineralisierung geht mit einem Abbau der extrazellulären Matrix einher. Verschiedene Proteasen bauen Matrixkomponenten ab und aktivieren oder deaktivieren durch Spaltung Faktoren, die in der terminalen Differenzierung eine Rolle spielen. Zu den aktiven Proteasen gehören z.B. die Matrix-Metallo-Proteasen (MMPs) und Cystein-Proteasen.

Im Weiteren werden die MMPs, Cathepsin und die ADAMTS-Proteine vorgestellt:

#### MMP

Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) spielen eine große Rolle beim Abbau der ECM. Sie spalten ECM-Proteine und Zelloberflächenproteine und sie aktivieren und deaktivieren Wachstumsfaktoren (Egelblad und Werb, 2002). Die MMPs sind eine Familie aus mehr als 20 Zink-abhängigen Proteasen. Sie sind entweder verankert in der Membran oder sie werden sezerniert. Die meisten MMPs werden als inaktive Vorstufen synthetisiert und müssen nachträglich aktiviert werden (Stetler-Stevenson, 1989, Strongin et al., 1993). Sie werden durch proteolytische Abspaltung der aminoterminalen Domäne aktiviert. MMPs werden je nach Substrat in Kollagenase (Substrat: tripelhelikales Kollagen), Gelatinasen (Substrat: degradiertes Kollagen und Gelatine), Stromelysine (Substrat: Proteoglykane), Membran-gebundene MMPs und in die übrigen MMPs aufgeteilt. Die Inhibitoren der MMPs heißen TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinases).

MMP 2 (Gelatinase A), MMP9 (Gelatinase B), MMP13 (Kollagenase 3) und MMP14 (MT1-MMP) sind sehr wichtig für die enchondrale Ossifikation (Vu et al., 1998, Pendas et al., 1997, Holmbeck et al., 1999).

MMP9-Null-Mäuse haben Knochen, die etwa 10% kürzer sind als beim Wildtyp. Außerdem verzögert sich die Apoptose der hypertrophen Chondrozyten (Vu et al., 1998). Im Mikroskop lassen sich in der Wachstumsfuge von der Tibia, dem Femur und dem Mittelfuß Abnormalitäten erkennen: Bei der Geburt der MMP9-Null-Maus ist die hypertrophe Zone etwa doppelt so lang wie in der Wildtyp-Maus, nach drei Wochen ist sie sechs bis acht mal so lang. Doch die Form der Chondrozyten ist normal und die Kalzifizierung verläuft ebenfalls wie bei der Wildtyp-Maus. Acht Wochen nach der Geburt ist der Unterschied in der Wachstumsfuge verschwunden, da die Ossifikation in der Knockout-Maus anstatt enchondral, diesmal über das Perichondrium abläuft.

Wird MMP13 inhibiert, kommt es zu einer Einstellung des Kollagen II-Abbaus und einer Blockade der Kollagen X-Synthese (Wu et al., 2002).

Untersuchungen zu MMP9 und -13 Doppel Knock-out-Mäusen hat ergeben, dass MMP9 und MMP13 bei der Knochenentwicklung auf einander abgestimmt aktiv sind. Die Knochenmarkhöhle formiert sich nur verzögert, hypertropher Knorpel sammelt sich, die Knochenbildung ist blockiert und das sekundäre Ossifikationszentrum bildet sich zögerlich (Ortega et al., 2003, 2004).

## Cathepsin

Cathepsine gehören zu der Gruppe der Cysteinproteasen. Die meisten Cathepsine sind Endopeptidasen. Sie werden als Preproenzyme synthetisiert und die Prepeptide werden im Endoplasmatischen Retikulum entfernt. Das aktive Cathepsin entsteht nach proteolytischer Abspaltung des Propeptids durch verschiedene Proteasen in saurer Umgebung von Endosomen oder Lysosomen (Lutgens et al., 2007). Die meisten Cathepsine sind in saurer Umgebung sehr aktiv, z.B. die Cathepsine B, F, H, K, L und V. Cathepsin S dagegen ist besonders aktiv bei neutralem pH-Wert (Turk et al., 2000).

Cathepsine sind am Abbau der ECM beteiligt. Sie werden in Osteoklasten exprimiert, aber auch in Chondrozyten und in synovialen Fibroblasten von Patienten, die an rheumatoider Arthritis erkrankt sind (Ruettger et al., 2008, Konttinen et al., 2002, Hummel et al., 1998).

Ruettger et al. (2008) waren in der Lage zu zeigen, dass ein N-terminales Fragment von Kollagen II über die Protein Kinase C und die p38 MAP Kinase, abhängig von  $Ca^{2+}$  die Expression und Synthese der Cathepsine B, K und L induziert. Kollagen II kann an Annexin V binden (Lucic et al., 2003), das an der Einfuhr von Kalzium in die Zelle beteiligt ist (Wang und Kirsch, 2002).

## ADAMTS

ADAMTS-Proteine (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, soluble) sind extrazelluläre Multidomänen-Enzyme, die als Prokollagen N-Proteinase Kollagene prozessieren (ADAMTS-2, -3 und -14), Aggrecan (ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9 und -15), Versikan (ADAMTS-1, -4 und -9) und Brevikan (ADAMTS-4) schneiden, die Angiogenese inhibieren und eine Rolle in der Selbstregulierung der Blutgerinnung spielen. (Porter et al., 2005). Sie sind eine Subfamilie der Metalloendopeptidasen und nah verwandt mit den ADAM-Proteinasen, die als integrale Membranproteine für das Abspalten von extrazellulären Domänen von Membranproteinen (ectodomain shedding) oder die Aktivierung von verschiedenen Zelloberflächen-Proteinen verantwortlich sind (Seals und Courtneidge, 2003).

Einige ADAMTS-Proteine, z.B. ADAMTS-1, -4 und -5 können an die ECM binden (Porter et al., 2005, Kuno und Matsushima, 1998).

Zu den sehr wichtigen Aggrekanasen gehören die ADAMTS-1, -4 und -5. Das Ausschalten von ADAMTS-4 und -5 in Mäusen zeigte allerdings keine Auswirkungen auf das Wachstum oder den Knorpel (Little et al., 2005, Stanton et al., 2005). Die ADAMTS-1-Nullmaus weist aber ein vermindertes Wachstum, Veränderungen im Fettgewebe und eine verminderte Fruchtbarkeit aufgrund histologischer Veränderungen im Uterus und den Ovarien auf (Shindo et al., 2000, Yokoyama et al., 2002).

Es wird angenommen, dass die ADAMTS-Proteine in der späten Chondrozytendifferenzierung eine Rolle spielen: Die Expression von ADAMTS-5 z.B. wird durch Triiodthyronin, einen Faktor, der die terminale Differenzierung positiv reguliert, hochreguliert. ADAMTS-5 spielt außerdem eine wichtige Rolle beim Abbau der Matrix im Knorpel während der Osteoarthritis. Für eine Maus, der die katalytische Domäne von ADAMTS-5 fehlt, konnte ein geringerer Abbau von Knorpelgewebe während der Osteoarthritis im Tiermodell im Vergleich zu der Wildtyp-Maus nachgewiesen werden (Glasson et al., 2005). Echtermeyer et al. (2009) konnten kürzlich mittels einer Syndekan-4 defizienten Maus zeigen, dass Syndekan-4 die Aktivierung von ADAMTS-5 kontrolliert. Syndekane sind transmembrane Heparansulfat-Proteoglykane, die mit verschiedenen Faktoren, z.B. FGF, VEGF und TGF- $\beta$  interagieren können. Die Kontrolle von ADAMTS-5 geschieht, indem Syndekan-4 direkt mit ADAMTS-5 wechselwirkt sowie über die Regulierung einer Protein Kinase, der MAPK (mitogen-activated protein kinase), welche wiederum Aktivierung von MMP-3 induziert.

Zu den ADAMTS gehören auch die ADAMTS-like-Proteine, von denen bis jetzt drei bekannt sind (Hirohata et al., 2002) und denen die katalytische Metalloprotease-Domäne und die Disintegrin-like-Domäne fehlt. Die Ankerdomäne jedoch ist vorhanden. Sie wird von ADAMTS benötigt, um das Substrat zu binden und schneiden zu können (Kuno et al., 1999, Colige et al., 1999).

Bis dato gibt es nur Spekulationen, welche Funktionen ADAMTS-like haben könnte. Man nimmt an, dass ADAMTS-like ADAMTS reguliert, etwa durch Konkurrenz um das Substrat, so dass dieses vor dem Verdau geschützt wird. Eine andere Möglichkeit wäre auch, dass ADAMTS-like die Aktivität von ADAMTS erhöht.

#### 1.4.2 Parakrine und autokrine Regulation

Einige Faktoren, die während der späten Chondrozytendifferenzierung eine Rolle spielen, sind noch nicht identifiziert. Es gibt sowohl parakrine Hormone oder Wachstumsfaktoren, welche Einfluss auf die umliegenden Chondrozyten nehmen, als auch autokrine Faktoren, die von den Zellen selber produziert werden und auf dieselbe Zelle wirken, die den Faktor produziert hat.

Ein Beispiel für die parakrine Regulation sind die kaudalen Chondrozyten, die in Kokultur mit kranialen Chondrozyten nicht nur ihre eigene Hypertrophierung, sondern auch die der kranialen Chondrozyten unterdrücken. Das geschieht über die Sekretion von Faktoren, welche die Differenzierung negativ regulieren.

Kultiviert man artikuläre Chondrozyten zusammen mit Zellen der Wachstumsfuge oder kranialen Zellen, wird ebenfalls die Hypertrophie in der Wachstumsfuge bzw. der kranialen Zellen gehemmt (Jikko et al., 1999, D'Angelo und Pacifici, 1997).

Außerdem inhibieren epiphysäre Chondrozyten die Differenzierung von Chondrozyten aus der Wachstumsfuge (Haaijman et al., 1999, Pateder et al., 2000). Die Hypertrophierung von proliferativen Chondrozyten wird dadurch gehemmt, dass Ruhechondrozyten direkt neben ihnen, um 90° gedreht, angesiedelt werden (Abad et al., 2002). Das alles sind deutliche Indizien für parakrine Regulationsmechanismen. Im weiteren Verlauf der Einleitung werden

Faktoren vorgestellt, die für eine parakrine oder autokrine Regulierung der Chondrozytendifferenzierung in Frage kommen:

### **FGFs und FGFRs (Fibroblast Growth Factor Rezeptoren)**

Die FGF-Familie besteht aus 23 verschiedenen Polypeptiden, die verschiedene Aufgaben in unterschiedlichen biologischen Prozessen haben. Sie besitzen eine große Affinität zu Heparin (Powers et al., 2000) und haben eine sehr homologe Kernregion von 140 Aminosäuren.

Die FGF-Rezeptoren gehören zu einer Familie von 4 Tyrosin-Kinase-Rezeptoren. Sie binden Fibroblastenwachstumsfaktoren mit unterschiedlicher Affinität (Kronenberg, 2003, Ornitz und Marie, 2002, Vajo et al., 2000).

Die FGF-Rezeptoren durchspannen die Membran. Sie besitzen eine extrazelluläre, Liganden bindende Region, bestehend aus 3 Immunglobulin-Domänen, eine Transmembran- und eine intrazelluläre Tyrosin Kinase-Domäne. Das Binden von FGF an den Rezeptor führt zur Homodimerisierung des Rezeptors, welcher wiederum die Autophosphorylierung und Stimulierung der Tyrosin-Kinase-Aktivität induziert.

FGFR3 wird in den proliferierenden Chondrozyten exprimiert. Kommt es zu Mutationen in dem Rezeptor, kann dies zu Störungen in der Signalkaskade führen, was wiederum verschiedene Skelett-Dysplasien verursacht, wie z.B. Achondroplasie (ACH) und Hypochondroplasie (HCH). Beiden Krankheiten ist ein kleinwüchsiger Phänotyp gemein, der bei ACH stärker ausgeprägt ist und dadurch zustande kommt, dass die Wachstumsfuge der Epiphyse zu früh verknöchert und das Längenwachstum eingeschränkt wird.

Die Mutationen sind immer autosomal dominant und werden durch „gain of function“ Mutationen, die einen dauerhaft aktiven FGF-Rezeptor 3 zur Folge haben, verursacht.

Je aktiver der FGF-Rezeptor ist, desto schwerwiegender ist der Phänotyp. Aktiviert wird FGFR-3 durch FGF-18 (Liu et al., 2007), das im Perichondrium exprimiert wird.

FGFR-3 kontrolliert die Chondrozytendifferenzierung negativ (Ornitz und Marie, 2002, Vajo et al., 2000). Es wurde bestätigt, dass das Binden von FGF an FGFR-3 die Proliferation durch die Herunterregulierung von Ihh (Indian hedgehog), einem Protein, das die Proliferation stimuliert und die Hypertrophie inhibiert, negativ beeinflusst (Ornitz und Marie, 2002, Brochhausen et al., 2009) Aber es ist weitgehend unklar, was für eine Wirkung die Expression von FGFR-3 auf die Hypertrophie besitzt. Stat-1, ein Transkriptionsfaktor, spielt ebenfalls eine Rolle in der Vermittlung des FGF-Signales und bei der Inhibierung der Proliferation (Sahni et al., 1999, Sahni et al., 2001).

MAPK (Mitogen activating protein kinase) ist ein Effektor von FGFR-3. Wenn der Aktivator von MAPK, MEK, durchweg aktiv ist, entsteht ein Phänotyp für Achondroplasia, der dem des dauerhaft aktiven FGF-Rezeptor 3 sehr ähnlich ist (Murakami et al., 2004).

### **PTHrP (Parathyroid hormone-related peptide)**

PTHrP wird in verschiedenen Geweben, sowohl bei Erwachsenen als auch während der Entwicklung exprimiert, z.B. im Herz, Knorpel, Niere, Haar-Follikel, Plazenta, Brust, Lunge und von vielen Epithelzellen (Schipani und Provot, 2003). Es ist ein wichtiger autokriner, bzw. parakriner Faktor. Mäuse, in denen PTHrP überexprimiert oder ausgeschaltet wird, zeigen dramatische Veränderungen bei der Entwicklung (Schipani und Provot, 2003).

Bindet PTHrP an den PTH/PTHrP-Rezeptor, wird die Protein-Kinase A aktiviert. Diese phosphoryliert den Transkriptionsfaktor Sox9, der für den Einfluss von PTHrP auf die Wachstumsfuge sorgt (Huang et al., 2001).

In der Wachstumsfuge wird PTHrP mRNA von perichondrialen Zellen und proliferierenden Chondrozyten der periartikulären Region exprimiert, während der Rezeptor in geringen Mengen von säulenartigen, proliferierenden Chondrozyten und in größeren Mengen von prähypertrophen Zellen exprimiert wird (Lanske et al., 1996, Vortkamp et al., 1996). Mutationen in dem Rezeptor führen zu Chondrodysplasien: Chondrodysplasie vom Typ Blomstrand (BLC) (Schipani und Provot, 2003, Oostra et al., 2000) und die metaphysäre Chondrodysplasie vom Typ Jansen (JMC) (Schipani und Provot, 2003, Calvi und Schipani, 2000). Die Krankheit BLC ist charakterisiert durch ein Sterben des Embryos, zu frühe Mineralisierung der Knochen und kurze Gliedmaßen. Die enchondrale Ossifikation ist sehr stark beschleunigt und die Säulenbildung der proliferierenden Zellen findet nicht statt.

JMC, die durch eine konstitutive Expression des PTH/PTHrP-Rezeptors verursacht wird, zeichnet sich durch Kleinwuchs mit kurzen Gliedmaßen und Besonderheiten in der Wachstumsfuge, in Form von verzögert eintretender und lang andauernder Hypertrophie und verzögerter vaskulärer Invasion, aus (Calvi und Schipani, 2000, Schipani et al., 1997).

In Hühnerchondrozyten, die den Transkriptionsfaktor Runx2 überexprimieren, konnte gezeigt werden, dass PTHrP die Aktivität der alkalischen Phosphatase und die Kalzifizierung der Matrix blockiert. Eventuell geschieht die Inhibierung der Runx2-Expression durch die Induktion weiterer Transkriptionsfaktoren, gesteuert durch PTHrP (Iwamoto et al., 2003).

Um die Chondrozytendifferenzierung zu regulieren agieren PTHrP und Indian Hedgehog (Ihh) gemeinsam, in Form eines negativen Feedback Loops: Prähypertrophe Chondrozyten produzieren Ihh und aktivieren so die Expression von PTHrP in den Zellen des periartikulären Perichondriums. Das gebildete PTHrP bindet an die PTH/PTHrP-Rezeptoren der proliferierenden und hypertrophen Zellen und verhindert so ein Fortschreiten der Hypertrophie (Chung et al., 1998, Vortkamp et al., 1996, Lanske et al., 1996, Wallis, 1996). Die Chondrozyten werden im proliferierenden Stadium gehalten und die Expression von Ihh wird gebremst. Die Abbildung 1.9 zeigt eine schematische Darstellung des negativen Feedback loops.

Veränderungen in der PTHrP-Expression führen im Tiermodell zu sehr auffälligen Phänotypen: In Mäusen, die kein PTHrP oder nur defektes PTHrP produzieren, differenzieren Chondrozyten zu früh und es wird zu viel Knochen gebildet (Amizuka et al., 1994, Lanske et al., 1996).

Wird die Expression von PTHrP verstärkt, führt dies zu einer Verzögerung der Differenzierung und fehlender Knochenbildung. Die Mäuse werden mit einem knorpeligen Skelett geboren (Weir et al., 1996).

### **Ihh (Indian hedgehog)**

Ihh gehört zu der Familie der Hedgehog-Proteine, die für die embryonale Musterbildung und für die Gliedknospenentwicklung mit verantwortlich sind (Hammerschmidt et al., 1997). Es wird besonders stark in der prähypertrophen Zone exprimiert (Kronenberg, 2003) und gilt als notwendig und hinreichend für die Expression von PTHrP (Vortkamp et al., 1996, St.-Jacques et al., 1999). Ihh inhibiert die hypertrophe Chondrozytendifferenzierung, indem es die Produktion von PTHrP fördert. Auf diesen negativen „Feedback-Loop“ wurde in dem Abschnitt über PTHrP bereits näher eingegangen.

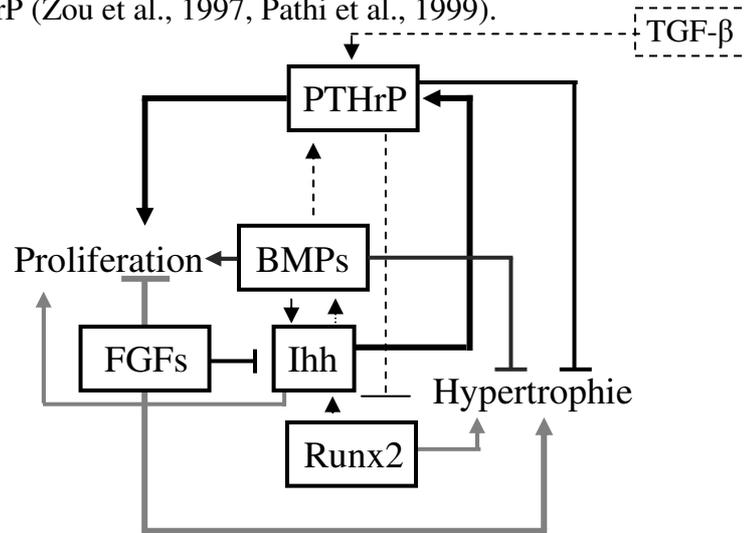
Hedgehog-Proteine binden an Ptc-(patched) Rezeptoren und als Folge wird das Membranprotein Smo (smoothened) freigesetzt, das intrazellulär aktiv ist. In der Abwesenheit von Ihh blockiert Ptc das Membranprotein Smo.

In der Ihh-Knockout-Maus ist die Chondrozytendifferenzierung reduziert, die Hypertrophie jedoch verstärkt. Die Osteoblastenentwicklung fehlt (St.-Jacques, McMahon, 1999). Wird Ihh

überexprimiert, tritt die Hypertrophie nur verzögert ein (Vortkamp, et al., 1996, Lanske et al., 1996).

Ihh reguliert die Hypertrophie *in vivo* also negativ, die Proliferation aber positiv. Die Induzierung der Proliferation durch Ihh ist unabhängig von PTHrP, die inhibitorische Wirkung von Ihh auf die Hypertrophie ist allerdings abhängig von PTHrP (Karp et al., 2000, Kobayashi et al., 2002).

Außerdem reguliert Ihh die Synthese von BMP-2 und -4. Wenn Ihh in Organkulturen überexprimiert wird, führt dies zu einer stärkeren Expression von BMP-2 und -4 im Perichondrium. Vielleicht sind die BMPs als Signalmoleküle verantwortlich für die Initiierung von PTHrP (Zou et al., 1997, Pathi et al., 1999).



**Abbildung 1.9: Negativer Feedback-Loop in der Ihh/PTHrP-Interaktion** (nach Provot und Schipani, 2005).

## Vitamin D-Metabolite

Vitamin D gehört zu den Steroidhormonen. Sie regeln unter anderem die extrazelluläre Kalziumkonzentration. Vitamin D<sub>3</sub> entsteht bei UV-Bestrahlung in der Haut aus Provitamin D<sub>3</sub>, welches in der Leber synthetisiert wird. Ein Mangel an Vitamin D kann Rachitis verursachen. Patienten mit Rachitis haben weiche Schädelknochen am Hinterkopf, Auftreibungen an den Rippen und Handgelenken und sie neigen zu Infekten der oberen Luftwege. Langfristig kann die Krankheit zu verbogenen Beinen, krummer Wirbelsäule und gestörtem Zahnaufbau führen. Auf mikroskopischer Ebene läßt sich eine Vergrößerung der hypertrophen Zone der Wachstumsfuge erkennen (Norman und Hurwitz, 1993, Yagishita et al., 2001).

1,25- und 24,25 Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>(-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) sind die aktiven Formen von Vitamin D. In der Wachstumsfuge regulieren sie die Proliferation, die Differenzierung und die Synthese von Matrix durch Chondrozyten.

Vitamin D reguliert die Differenzierung der Chondrozyten aus der Wachstumsfuge über die klassischen nuklearen Vitamin D-Rezeptoren und über Membran-assoziierte Rezeptoren (Boyan et al., 2003).

In Ruhechondrozyten ist Vitamin 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> aktiv (Sylvia et al., 1993). Es bindet an die Membran und induziert die Aktivität der Mitogen-activated Protein Kinase und reduziert die Prostaglandin Produktion (Schwartz et al., 2002).

Ein spezieller 1,25 Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>(-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)-Rezeptor, der 1,25 D<sub>3</sub> MARRS-Rezeptor (1,25 dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> membrane associated rapid response steroid receptor),

vermittelt die Inhibierung der späten Chondrozyten-Differenzierung. Er ist an der Oberfläche der Plasmamembran verankert und bindet 1,25 Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>(-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>).

Versuche in Kulturen von Chondrozyten aus dem kranialen Teil der Sterna von embryonalen Hühnern haben gezeigt, dass IGF-I die Inhibierung aufhebt und die Chondrozyten hypertroph werden. Mit E-64, einem Inhibitor für Cystein-Proteasen, kann dieser Effekt wieder aufgehoben werden. Es wird davon ausgegangen, dass der Rezeptor durch die Proteasen nach Stimulierung mit IGF-I gespalten wird, Vitamin D nicht mehr binden kann, und somit die Inhibierung der späten Chondrozytendifferenzierung nichtig ist. E-64 blockiert die Proteasen und somit die Spaltung des Rezeptors (Dreier et al., 2008a).

## Retinoinsäure

Die isomeren Formen der Retinoinsäure (retinoic acid, RA) kommen in embryonalen Chondrozyten und im Perichondrium vor und die Retinoid-Rezeptoren werden im Knorpel exprimiert (Koyama et al., 1999). Sie ist ein aktives Derivat von Vitamin A und essentiell für die Skelettentwicklung. Allerdings verursacht zu viel RA starke Abnormalitäten im Skelett (Wolbach und Hegsted, 1952). Die Retinoinsäuren-Rezeptoren und die Retinoid-X-Rezeptoren stammen aus zwei unterschiedlichen Transkriptionsfaktor-Familien und vermitteln die Signale der Retinoinsäure. Wenn der Ligand bindet, bilden die Rezeptoren Heterodimere und binden an die Promotoren der Zielgene der RAs (Mangelsdorf, 1994).

Obwohl man im Promotor von Kollagen X keine Bindungsstelle für die Heterodimere gefunden hat, konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Synthese von Kollagen X, die Aktivität der alkalischen Phosphatase und die Mineralisierung (Pacifici et al., 1991, Iwamoto et al., 1994) durch RA verstärkt wird. Vermutlich wird das Signal hier durch BMP-7 (Grimsrud et al. 1998) weitergegeben, da RA die Synthese von BMP-7 bewirkt. Fehlt BMP, wird weniger Kollagen X gebildet. Im Promotor von Kollagen X wurde eine Bindungsstelle für BMP gefunden, die die Signalisierung durch RA vermitteln kann (Adams et al., 2003, Li et al., 2003b).

RA induziert auch die Expression von Runx2, Smad1 und Smad 5, die alle drei Bindungsstellen auf dem Kollagen X Promotor besitzen und deren Bindungsstellen für die Stimulierung durch RA bzw. BMP-2 notwendig sind (Li et al., 2003b, Drissi et al., 2003).

Die Retinoinsäure verursacht nur dann eine weitere Differenzierung, wenn die Zellen bereits sehr weit differenziert sind, sich also im prähypertrophen Stadium befinden (Iwamoto et al., 1993, Dietz et al., 1999). Versuche in Monolayerkulturen mit Kaninchen- und Hühnerchondrozyten über einen längeren Zeitpunkt haben gezeigt, dass RA die Differenzierung inhibiert und die Dedifferenzierung induziert (Pacifici et al., 1980, Horton et al., 1987). In Rinderchondrozyten kann die Dedifferenzierung mit BMP-7 verhindert werden (Nishihara et al., 2003).

Wang und Kirsch (2002) konnten zeigen, dass Retinoinsäure die Kalziumkonzentration im Zytoplasma erhöht. Außerdem wird angenommen, dass die Behandlung mit Retinoinsäure zu einer Erhöhung der Expression von Annexin II, V und VI und zu einer Annexin-Kanal-Bildung in den Chondrozyten der Wachstumsfuge führt (Wang et al., 2005). Wahrscheinlich wird der Einfluss von Kalzium durch Annexin vermittelt (Wang und Kirsch, 2002, Wang et al., 2003). In embryonalen Hühnerchondrozyten der Wachstumsfuge resultiert die Überexpression von Annexin V in einer Steigerung der zytoplasmatischen Kalzium-Konzentration, ähnlich wie bei der Überexpression von RA. Es folgt außerdem verstärkte Expression von Annexin II und VI, Osteocalcin, Runx2, ATPase und die Mineralisierung wird stimuliert (Wang et al., 2005).

Williams et al. (2009) konnten zeigen, dass Mäuse ohne die RA-Rezeptoren  $\alpha$  und  $\gamma$  oder  $\beta$  und  $\gamma$  eine Verringerung im Wachstum und eine sehr geringe Aggrecan-Expression besitzen.

RAR  $\gamma$  ist der in den proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge am meisten exprimierte RA-Rezeptor. Eine RAR  $\beta/\gamma$  knockout-Maus hat eine geringe Expression des Transkriptionsfaktors Sox9.

### **Insulin und Insulin-like Growth Factors (IGFs)**

Insulin ist ein Hauptregulator des Glukosestoffwechsels. Das Hormon wird als Proinsulin von den  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln im Pankreas gebildet. Es besteht aus einer A- und einer B-Peptidkette, die über zwei Disulfidbrücken zusammengehalten werden.

IGFs sind Wachstumshormon abhängige Wachstumsfaktoren, die parakrin das Knorpelwachstum und die Differenzierung beeinflussen. Wegen ihrer strukturellen Ähnlichkeit und ihrer analogen Wirkung zu Insulin haben sie ihren Namen erhalten.

IGF-I wird vor allem in der Leber synthetisiert, während IGF-II in Teilen des embryonalen Gewebes stark präsent ist und vermutlich eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Wachstums vor der Geburt spielt.

Als Faktor, der das Wachstum von Gliedmaßen unterstützt, wurde IGF-I mittels eines Laser-Amputations-Experiments (Geduspan et al., 1992, Geduspan und Solursh, 1993) identifiziert. Chondrozyten synthetisieren sowohl IGF-I als auch IGF-II (Burch et al., 1986, Nilsson et al., 1986).

Es ist noch nicht genau geklärt, welche Zellen der Wachstumsfuge IGF exprimieren. So wurde z.B. in fötalen Chondrozyten aus Rindern mRNA von IGF-I und IGF-II in proliferierenden Zellen nachgewiesen (Olney und Mougey, 1999). In Mäusen allerdings wurde IGF-I mRNA in proliferierenden und hypertrophen Zellen gefunden (Reinecke et al., 2000, Smink et al., 2002).

IGF-I interagiert mit den IGF-Bindungsproteinen (IGFBP), deren Expression in fötalen Chondrozyten durch IGF-I und IGF-II, Insulin und TGF- $\beta$  beeinflusst wird.

Die Zellrezeptoren, an die IGF-I und Insulin binden, bestehen aus zwei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten. Die Liganden binden an der  $\alpha$ -Untereinheit und die Tyrosinkinase der  $\beta$ -Untereinheit katalysiert daraufhin die Autophosphorylierung von Tyrosinresten.

Torres et al. (2003) konnten zeigen, dass Insulin eine antiapoptotische Wirkung besitzt. In Kulturen hoher Dichte mit Chondrozyten aus Gliedknospen des Huhns führte die Stimulierung mit Insulin zu einer verstärkten Proliferation der Zellen und zu einer reduzierten Hypertrophie und Apoptose. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich auch mit Ruhechondrozyten der Ratte. Unter serumfreien Bedingungen konnten weder IGF-I noch Insulin eine Hypertrophierung der Zellen erreichen. Nur in sehr hohen Konzentrationen führte Insulin zu einer Synthese von Kollagen X und alkalischer Phosphatase (Ballock und Reddi, 1994).

Es wird angenommen, dass Insulin ein primärer Faktor für den Beginn und den Ablauf der Chondrogenese ist, und dass es direkt an der Reifung der Chondrozyten beteiligt ist und hier nicht über den IGF-Rezeptor wirkt (Quarto et al., 1992).

IGF stimuliert das Wachstum und die Differenzierung während der frühen Organogenese im Hühnerembryo *in vivo* (Girbau et al., 1987). In der Wachstumsfuge wird die IGF-I-Produktion über das Wachstumshormon (Growth hormone) angeregt (Nilsson et al., 1986). IGF-I bindet an den IGF-Rezeptor und stimuliert die Proliferation der Chondrozyten (Isgaard, 1992). Untersuchungen zur Expression von IGF-I auf mRNA-Ebene in hypertrophen Chondrozyten zeigten, dass sich die Expression von IGF-I verringert, allerdings bleibt die Expression des Wachstumshormons und des IGF-Rezeptors unverändert im Vergleich zu den anderen Zonen der Wachstumsfuge (Olney und Mougey, 1999).

Eine Deletion im IGF-I-Gen beim Menschen verursacht Zwergwuchs. Die IGF-I-Knockout-Maus zeigt ebenfalls Zwergwuchs (Liu et al., 1993, Woods et al. 1996). Das Fehlen von IGF-I

bei der Maus führt zu kleineren Zellen in der hypertrophen Zone, so dass die Zellzahl gleich ist, jedoch die hypertrophe Zone schmaler ist.

In Kulturen von Hühnerchondrozyten aus dem kranialen Teil des Sternums ist es möglich, die Hypertrophie der Zellen mit Insulin oder IGF-I zu stimulieren. Die Zellen synthetisieren dann Marker wie Kollagen X und die alkalische Phosphatase (Böhme et al., 1995, Szüts et al., 1998). Werden Chondrozyten des gesamten Sternums kultiviert und mit Insulin oder IGF-I stimuliert, so proliferieren diese zwar, werden aber nicht hypertroph (Böhme et al., 1992).

## Thyroidhormone

Thyroidhormone sind wichtige Regulatoren der enchondralen Ossifikation. Sie sind Faktoren beim postnatalen somatischen Wachstum und der Skelettentwicklung und regulieren Teile des Knochen- und Mineralhaushaltes (Allain und McGregor, 1993, Compston, 1993). Im Menschen sind die beiden wichtigsten Thyroidhormone Trijodthyronin ( $T_3$ ) und Thyroxin ( $T_4$ ). Zweiteres wird zu  $T_3$  dejodiert, während  $T_3$  Signale direkt durch 3 Thyroid-Kernrezeptoren vermitteln kann (Gauthier et al., 1999). Die drei Thyroid-Kernrezeptoren,  $TR\alpha_1$ ,  $TR\alpha_2$  und  $TR\beta_1$  werden in ruhenden und proliferativen Chondrozyten nachgewiesen. Sie sind Transkriptionsfaktoren, die abhängig von Liganden sind, und können durch Interaktionen die Expression bestimmter Gene auslösen.

Die am häufigste auftretenden Ursachen für ein verändertes Wachstum und ein deformiertes Skelett sind Störungen der Funktion von Thyroiden.

Wird der Rezeptor  $T_3R\alpha$  ausgeschaltet ( $T_3R\alpha$ -Knock-out-Maus), bleiben die Chondrozyten in der Wachstumsfuge unorganisiert und es kommt zur Hemmung des Wachstums, da keine enchondrale Ossifikation stattfindet (Fraichard et al., 1997).

Der Rezeptor  $T_3R\beta$  ist nicht so bedeutend für die Knochenbildung: Bei der  $T_3R\beta$ -Knockout-Maus konnte kein Fehler in der Skelettentwicklung festgestellt werden (Forrest et al., 1996a/b). Allerdings besitzen  $T_3R\beta$ -Knockout-Mäuse ein Defizit der Hörfunktion, sie sind sehr oft taub (Forrest, 1996b).

Es wurden *in vitro* Experimente mit  $T_3$  und  $T_4$  in Chondrozyten verschiedener Spezies durchgeführt: Humane Chondrozyten und Rattenchondrozyten der Epiphyse können mit  $T_3$  zur Synthese der alkalischen Phosphatase angeregt werden. Hier weisen die Chondrozyten von Ratten eine geringere Proliferation der Zellen auf (Carrascosa et al., 1992, Ohlsson et al., 1992a/b).

Kraniale Chondrozyten aus dem Sternum des Huhns, isoliert nach 17 tägiger Bebrütung des Eis, lassen sich in Agarosekultur durch  $T_4$  zur Synthese von Kollagen X und der alkalischen Phosphatase stimulieren. Die Zellen werden hypertroph, ohne vorher zu proliferieren (Böhme et al., 1992).

$T_4$  reguliert den Transkriptionsfaktor Sox9 negativ, welcher die Differenzierung der Zellen aus dem proliferativen zum hypertrophen Stadium inhibiert (Okubo und Reddi, 2003).

Es konnte in Chondrozyten aus Wachstumsfugen sowohl des Schweins als auch des Kaninchens eine Induktion der Expression von Aggrekanase-2 durch die Zugabe von  $T_3$  nachgewiesen werden (Makihira et al., 2003).

$T_3$  ist sowohl in der Lage, den Abbau von Proteoglykanen zu induzieren als auch, ihre Synthese zu steigern (Audhya et al., 1976, Grade et al., 1994).

Dies sind deutliche Hinweise auf eine positiv regulatorische Funktion von Thyroidhormonen während der terminalen Chondrozytdifferenzierung.

Produziert die Schilddrüse zu wenig  $T_3$  bzw.  $T_4$ , führt das im Menschen zu Kretinismus (Hypothyreose), einer Krankheit, bei der es zu neurologischen Schäden und Wachstumsstörungen kommen kann. Die Ursache für die fehlende Produktion von Thyroxin ist sehr häufig ein Mangel an Jod.

Für die Kashin-Beck-Krankheit, die sich in Gelenk-Deformationen und geringer Beweglichkeit zeigt (Sokoloff, 1989, Allander, 1994), wird ein Mangel an Selen mitverantwortlich gemacht, da sie auf Selenarme Regionen wie etwa China und Nordkorea beschränkt ist (Wu und Xu, 1987, Yang et al., 1988). Selen wird u.a. für die Aktivität der Deiodinase benötigt, die die Reaktion von Thyroxin in Trijodthyronin katalysiert (Zagrodzki et al., 2000).

Eine Studie zur Kashin-Beck-Krankheit hat gezeigt, dass sie sich nicht durch Selenzugabe bekämpfen läßt (Moreno-Reyes et al., 2003).

## Wnts

Die Wnt-Familie, eine Gruppe von Cystein-reichen Glykoproteinen, sind an einigen Entwicklungsprozessen, einschließlich der Chondrogenese beteiligt (Wodarz und Nusse, 1998). Wnts binden an so genannte Frizzled-Rezeptoren, was zur Stabilisierung von cytosolischem  $\beta$ -Catenin führt, das wiederum Komplexe mit Transkriptionsfaktoren der LEF-1/TCF-Familie bildet und als Komplex in den Kern der Zelle gelangt. Dort kann dann die Transkription der Zielgene reguliert werden (Behrens et al., 1996).

Wnt-3a etwa unterdrückt die Chondrogenese von mesenchymalen Zellen, indem es die Zell-Zell-Adhäsion stabilisiert (Sox-9-Expression wird unterdrückt) und induziert die Dedifferenzierung von artikulären Chondrozyten durch die transkriptionale Aktivierung von  $\beta$ -Catenin-T-Zell-Faktor/lymphoid enhancer-factor-Komplex (Hwang et al., 2004).

In den Knorpelanlagen des Huhns kommen auch noch Wnt-4, -5a, -5b und -14 vor. Es wurde eine Studie für eine Überexpression *in vivo* angefertigt: Wnt-4 wird in den Gelenken exprimiert und führt zu einer beschleunigten Hypertrophie der Chondrozyten, während Wnt-5a im Perichondrium exprimiert wird und die Hypertrophie verlangsamt.

Außerdem unterstützt Wnt-5 in der Chondrogenese die Proliferation der mesenchymalen Stammzellen (Church et al., 2002).

Wnt-14 und Wnt-2 hemmen gemeinsam die Chondrogenese (Hoang et al., 1998, Kawakami et al., 1999, Hartmann und Tabin, 2000, 2001).

Osterix, ein Osteoblasten-spezifischer Transkriptionsfaktor, inhibiert Wnt (Zhang et al., 2008). In der Osterix-Null-Maus wird der Antagonist Dkk1 von Wnt nicht exprimiert und die Expression der Zielgene von Wnt, cMyc und Cyclin D, ist erhöht.

Eine Krankheit, die mit Fehlern im Wnt-Signalweg in Verbindung gebracht wird, ist die rheumatoide Arthritis (Sen et al., 2001).

## TGF- $\beta$ -Familie

Die TGF- $\beta$ -Superfamilie (transforming growth factor  $\beta$ ) läßt sich in die TGF- $\beta$ /Aktinin-Faktoren und die BMP/Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (growth and differentiation factor, GDF, siehe nächste Abschnitt) teilen. Sie sind sich strukturell alle ähnlich und es handelt sich bei allen um Wachstumsfaktoren.

Zunächst sind die TGF- $\beta$ s inaktive Komplexe, bestehend aus dem reifen TGF- $\beta$  und einem durch Disulfidbrücken verbundenen TGF- $\beta$  Bindungsprotein (Kanzaki et al., 1990), die später, vermittelt durch Proteasen, aktiviert werden.

Es müssen Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren vom Typ I und II für die Signalwirkung vorliegen (Franzen et al., 1993). TGF- $\beta$  bindet und der Rezeptor Typ II phosphoryliert den Rezeptor vom Typ I, der wiederum Smad 2 und 3 phosphoryliert, welche schließlich in den Zellkern gelangen und dort die Transkription der Zielgene regulieren können (Nakao et al., 1997, Whitman, 1998).

In der Wachstumsfuge werden TGF- $\beta$ 1 bis 3 synthetisiert. Mäuse, die durch genetische Veränderung einen im Zytoplasma kürzeren TGF- $\beta$  Rezeptor vom Typ II besitzen, haben eine verbreitete Wachstumsfuge, deren Aufbau nicht so organisiert ist wie im Wildtyp. Außerdem zeigt sich im Gelenkknorpel eine frühe Form der Osteoarthritis (Serra et al., 1997). Weiter wurde beschrieben (Yang et al., 2001), dass artikuläre Chondrozyten durch einen Smad3 vermittelten TGF- $\beta$ -Signalweg im Ruhezustand gehalten werden.

Nicht differenzierte Mesenchymzellen werden *in vitro* durch TGF- $\beta$  zur Chondrogenese angeregt (Denker et al., 1995). Die späte Differenzierung von Chondrozyten wird allerdings durch TGF- $\beta$  inhibiert (Tschan et al., 1993). So wurde in serumfreien Suspensionskulturen von Chondrozyten aus embryonalen Hühnersterna gezeigt, wie TGF- $\beta$  die Hypertrophie inhibiert und die Dedifferenzierung der Zellen verursacht. In kranialen Chondrozyten kann die Hypertrophie in Zusammenarbeit mit FGF-2 unterdrückt werden (Böhme et al., 1995, Szüts et al., 1998). Bei kaudalen Chondrozyten läßt sich die Hypertrophierung durch TGF- $\beta$  hemmen, wenn die Zellen in konditioniertem Endothelzellmedium kultiviert und nur mit Thyroxin stimuliert werden (Babarina et al., 2001).

Interessanterweise synthetisieren hypertrophe Zellen die größte Menge an aktivem TGF- $\beta$  (D'Angelo und Pacifici, 1997), vermutlich wird die Spätdifferenzierung innerhalb eines physiologischen Rahmens begrenzt (D'Angelo et al., 2001).

TGF- $\beta$  induziert die Expression von PTHrP, einem negativen Faktor der Chondrozyten-differenzierung, auf den bereits näher eingegangen wurde (Pateder et al., 2000). In Mäusen, die kein PTHrP synthetisieren können, kann durch TGF- $\beta$  nicht die Hypertrophie, sondern nur die Proliferation der Chondrozyten und die Mineralisation der Matrix unterdrückt werden. Vermutlich gibt es also einen von PTHrP unabhängigen Weg des TGF- $\beta$  (Serra et al., 1999).

### **BMPs (Bone morphogenetic protein)**

Die BMPs, die auch GDFs (Growth and differentiation factors) genannt werden, bilden, mit Ausnahme von BMP-1, eine Unterfamilie von sekretierten Signalmolekülen in der Superfamilie der TGF- $\beta$ s (Massague, 1998, Massague und Wotton, 2000, Massague und Chen, 2000).

Sie sind als Auslöser der Knorpel- und Knochen-Bildung während der Entwicklung sehr wichtig. Ihre Funktion wird durch das Binden an ihre Zellrezeptoren, die eine Serin-Threonin-Kinase-Aktivität besitzen, ausgelöst. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt zur Aktivierung des SMADs-Protein, welches wiederum das Signal von der Membran zum Kern weiterleitet.

BMPs spielen eine wichtige Rolle während der mesenchymalen Kondensierung.

In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass BMPs einen direkten Einfluss auf die Spätdifferenzierung der Chondrozyten haben:

In serumfreien und serumhaltigen Medium führt die Zugabe von BMP-2, -4 und -7 bei kranialen Chondrozyten zu Hypertrophie (Leboy et al., 1997, Volk et al., 1998), während BMP-7 diese und die Mineralisierung des Knorpels in Organkultur unterdrückte (Haaijman et al., 1997).

Das Expressionsmuster der BMPs ist verschieden: Die meisten BMPs (BMP-2, -3, -4, -5 und -7) werden vom Perichondrium exprimiert, manche von den hypertrophen Chondrozyten (BMP-2 und -6) und BMP-7 auch von den proliferierenden Chondrozyten (Brochhausen et al., 2009). Sie haben auch Teil an dem Ihh-PTHrP-Signalweg, indem sie die Expression von Ihh induzieren und somit die Proliferation der Chondrozyten anregen (Grimsrud et al., 1999). Es gilt als wahrscheinlich, dass BMPs die Proliferation positiv und die terminale Differenzierung negativ beeinflussen (Minina et al., 2002, Minina et al., 2001).

### 1.4.3 Transkriptionsfaktoren in der Chondrozytendifferenzierung

#### **SOX-Protein**

Die Sox-Familie sind Transkriptionsfaktoren, die eine sehr mobile Gruppe, die HMG Box-DNA-Bindungsdomäne besitzen (Crombrugge et al., 2001, Lefebvre, 2002). Sox9 ist ein kritischer Faktor bei der Entwicklung von mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten und es erhöht die Expression von den Kollagen II, IX und XI und Aggrecan.

Es wird in der Wachstumsfuge beim Längenwachstum von Knochen in proliferierenden Zellen synthetisiert und fördert die Proliferierung, während es die Hypertrophie hemmt (Akiyama et al., 2002 und 2004, Bi et al., 2001).

Eine heterozygote Missense-Mutation führt im Menschen zu einer abnormalen Entwicklung des Skeletts und verursacht eine Verformung der meisten Knochen (Giordano et al., 2001). Viele Neugeborene sterben am Versagen der Atmung, aufgrund schlecht gebildeter Tracheen und Rippen.

In Mäusen, denen Sox9 bereits in den undifferenzierten mesenchymalen Zellen der Gliedknospe fehlt, kommt es zum völligen Fehlen von Knorpel und Knochen. Es gibt keine Expression von Sox5 und Sox6 und Runx2. Allerdings gibt es eine Ausdehnung apoptotischer Regionen. Wird Sox9 erst nach der Kondensation mesenchymaler Zellen ausgeschaltet, führt dies zu einer Chondrodysplasie, ähnlich wie die der Sox5/6 Doppelknockout-Maus (Smits, et al., 2001, Akiyama, et al., 2002).

Daraus kann man schließen, dass die Expression von Sox5 und 6 von der Sox9-Expression abhängt. Beide Faktoren spielen auch eine Rolle in der späten Differenzierung der Chondrozyten der Wachstumsfuge. Sox5<sup>+/-</sup>Sox6<sup>-/-</sup> und Sox5<sup>-/-</sup>Sox6<sup>+/-</sup>-Tiere zeigen, dass die beiden Faktoren für die Proliferation von Chondrozyten notwendig sind und die säulenartige Anordnung der Zellen innerhalb der Wachstumsfuge unterstützen, weil sie die prähypertrophe Differenzierung verzögern (Smits et al., 2004).

#### **Runx2 und Runx3**

Runx2 ist ein Transkriptions-Faktor, der die Differenzierung positiv reguliert. Er gehört zu der Runt Transkriptions-Faktor-Familie und ist ein sehr wichtiges Molekül für die Differenzierung von Osteoblasten (Mundlos et al., 1997, Ducy et al., 1997). Die Runx2-Knockout-Maus hat keine Knochen (Komori et al., 1997, Otto et al., 1997) und *in vitro* wurde gezeigt, dass Runx2 Osteoblasten spezifische Gen-Expression unterstützen kann (Ducy et al., 1997).

Im Menschen führt die Inaktivierung von Runx2 zu kleidokranialer Dysplasie (Mundlos et al., 1997), einer autosomal dominant vererbten Skeletterkrankung, bei der sich proportionierter Zwergwuchs, ein vergrößerter Stirnschädel, fallende Schultern und ein Defekt im Schlüsselbein phänotypisch zeigen. Es kann auch zu neurologischen Irritationen kommen.

Runx2 wird auch in Chondrozyten exprimiert und initiiert die Hypertrophie. Mäuse, in denen der Faktor fehlt, haben eine verzögerte späte Chondrozytenreifung (Inada et al., 1999, Kim et al., 1999). Runx2 induziert sowohl *in vivo* (Ueta et al., 2001, Takeda et al., 2001, Stricker et al., 2002) als auch *in vitro* (Enomoto et al., 2000) die Expression von Kollagen X und anderer Hypertrophiemarker, wenn es ektopisch in unreifen Chondrozyten exprimiert wird.

Runx3 kooperiert mit Runx2 bei der Induzierung der Hypertrophie der Chondrozyten (Yoshida et al., 2004). Wahrscheinlich aktiviert Runx2 den Promotor von Ihh und somit auch die PTHrP-Expression, um eine größere Menge an reifenden und proliferierenden Chondrozyten zu erhalten.

Runx spielt auch bei der Vaskularisierung eine große Rolle: Die Invasion von Blutgefäßen in den Knorpel geht mit einer Hochregulierung von VEGF (vascular endothelial growth factor) in hypertrophen Zonen einher. Mäuse, denen Runx2 fehlt, zeigen keine Hochregulierung von VEGF und keine Vaskularisierung im Skelett (Zelzer et al., 2001). Bei einer Hochregulierung von Runx2, erhöht sich auch die Expression von VEGF-mRNA und die Protein-Produktion.

#### **1.4.4 Kollagene in der Regulation der Chondrozytendifferenzierung**

Wie bereits erwähnt, sind Kollagene aufgrund ihrer Eigenschaften strukturgebend für Haut, Sehnen, Bänder und die organisch Grundsubstanz von Hartgewebe und Basalmembranen. In erster Linie geben Kollagene Halt und Stützkraft.

Im Zusammenhang mit der Chondrozytendifferenzierung stellt sich die Frage, ob sie auch eine regulierende Funktion haben könnten.

Versuche mit Chondrozyten, die serumfrei in Kollagen I-haltiger Agarose kultiviert wurden, haben gezeigt, dass die Zellen ihren differenzierten Phänotyp verloren haben (Farjanel et al., 2001). Außerdem hat Kollagen I in fibrillärer Form mehr Einfluss auf die Chondrozyten als in nicht fibrillärer Form. Wurden die Zellen in Serum kultiviert, wurde die dedifferenzierende Wirkung von Kollagen I ausgesetzt.

Kollagen II ist das Kollagen im Knorpel, das den größten Anteil ausmacht. Als Fibrillen bildendes Kollagen sorgt es für die Festigkeit des Knorpels gegen Zug- und Scherkräfte. Dort bildet es mit den Kollagenen IX und XI Fibrillen und hat einen Anteil von 80% und mehr (Vaughan et al., 1988). Bis jetzt ist nicht bekannt, ob eines dieser drei Kollagene auch an der Regulierung der Differenzierung beteiligt ist. Kollagen XI hat wahrscheinlich eine Rolle in der Regulierung des Durchmessers von Kollagen II-haltigen Fibrillen. Die großen, zellfreien Zonen in den Wachstumszonen der Kollagen IX-defizienten Maus deuten auf eine Funktion des Proteins für die normale Skelettentwicklung hin (Dreier et al., 2008b).

Kollagen X ist ein anderes Kollagen, das im Knorpel vorkommt. Es ist ausschließlich in hypertrophen Zellen zu finden. Es gehört zu den kurzkettigen, nicht Fibrillen bildenden Kollagenen. Seine Funktion ist noch nicht bekannt.

Es wird auch vermutet, dass Kollagen IV neben seiner strukturgebenden Funktion in der Basalmembran auch eine regulatorische Funktion besitzt. Da es auch in der perizellulären Matrix des Chondrozyten vorkommt (Kvist et al., 2008), darf nicht ausgeschlossen werden, dass es einen Einfluss auf die terminale Differenzierung hat.

Auch die Funktion von Kollagen VIII im Knorpel ist noch unbekannt. Seine möglichen Aufgaben in anderen Zelltypen allerdings, z.B. Migration von glatten Muskelzellen, das Binden an Integrin und die Hochregulierung der MMP2 und 9-Expression (Hou et al., 2000) sind ein interessanter Hinweis auf eine große Bandbreite der möglichen Funktionen von Kollagen VIII.

### **1.5 Ziel dieser Arbeit**

Die Bildung und Differenzierung von Knorpelzellen ist ein stringent regulierter Vorgang, dessen nähere Aufklärung für das Verständnis von Prozessen wie Osteoarthritis oder anderen Chondrodysplasien hilfreich ist.

Als Modell zur Untersuchung der terminalen Differenzierung von Chondrozyten während der enchondralen Ossifikation eignen sich besonders Zellen aus dem Sternum von Hühnerembryonen.

Die kaudalen und kranialen Chondrozyten des Sternums befinden sich am 17. Tag *in ovo* in unterschiedlichen Stadien der Differenzierung bzw. sie besitzen eine unterschiedliche

Ansprechbarkeit für Differenzierungssignale. Vereinfacht dargestellt sind die Chondrozyten des kaudalen Teils vorwiegend ruhende und proliferierende Zellen, während die im kranialen Teil bereits damit beginnen zu hypertrophieren. In Kultur lässt sich die Hypertrophierung dieser Zellen mit verschiedenen Faktoren auslösen. Allerdings können die kaudalen Zellen ihre eigene Differenzierung sowie die der kranialen Zellen blockieren.

In dieser Arbeit sollen die Faktoren, die zur Inhibierung der Differenzierung von den kaudalen Zellen sezerniert werden, untersucht werden. Dazu sollen verschiedene Ansätze verfolgt werden, die aufeinander aufbauen:

Zuerst sollen mittels einer suppressiven, subtraktiven Hybridisierung und eines Gene Arrays differentiell exprimierte Gene in kaudalen und kranialen Zellen identifiziert werden.

Über semiquantitative PCR, Northern Blotting und Sequenzanalysen sollen diese Ergebnisse verifiziert und vertieft werden.

Eine Auswahl differentiell exprimierter Gene soll schließlich im Chondrozytenmodell funktional untersucht werden, einen besonderen Schwerpunkt sollen dabei der Einsatz von siRNAs und die proteinbiochemische Untersuchung über Western Blots und Antikörper darstellen.

Auch die Untersuchung bereits erzeugter transgener Huhn- und oder Mausmodelle soll bei den Versuchen hinzugezogen werden.

Am Ende der Arbeit soll ein tieferes Verständnis zur Funktion der differentiell exprimierten Gene und ihrer Funktion in der Chondrozytendifferenzierung bestehen.

Eventuell können auch Grundlagen für die weiterführende Untersuchung in Huhn- und Mausmodellen gelegt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Liste der verwendeten Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acetazolamid	Sigma-Aldrich, USA
Acetylamid	Roth, Karlsruhe
Agar	Difco Laboratories, USA
Agarose Seakem®LE	BMA, USA
Agarose-HT	FMC Bioproducts, Rockland
Agarose-NT	FMC Bioproducts, Rockland
Albumin bovine Fraction	Serva, Heidelberg
β-Aminopropionitril	Sigma-Aldrich, USA
Ampicillin	Biomol, Hamburg
Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Chymotrypsin	Serva, Heidelberg
Coomassie Blue G250	Serva, Heidelberg
Cystein	Sigma-Aldrich, USA
Desoxynukleotidtriphosphate	Sigma-Aldrich, USA
Diethylpyrocarbonat	Sigma-Aldrich, USA
Diethanolamin	Roth, Karlsruhe
N,N Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Diphenyloxazol (in DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol	Roth, Karlsruhe
DMEM	Gibco, Invitrogen, USA

---

DMSO	Roth, Karlsruhe
EDTA (Titriplex)	Merck, Darmstadt
EGTA	Merck, Darmstadt
Entellan	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, USA
Fluoromount-G	Southern Biotech, USA
Express Hyb Hybridization solution	Clontech Laboratories, USA
Formaldehyd 37 %	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum	Gibco, Invitrogen, USA
Glukose	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Ham`s F-12	PAA Laboratories, Österreich
HCl	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Difco Laboratories, USA
Hepes	Gibco, Invitrogen, USA
IGF-I	Sigma-Aldrich, USA
IPTG	ICN Biomedicals
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Biomol, Hamburg
KCl	Roth, Darmstadt
Kollagenase B (bakterielle)	Roche, Schweiz

---

2 Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
Magermilchpulver	Fluka Analytika, Schweiz
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
MOPS (3-(N-Morpholino)propane-sulfonic acid	Biomol, Hamburg
NaAcetat	Merck, Darmstadt
Na <sub>3</sub> Citrat x H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
NaCl	MP Biomedicals, USA
NaOH	Roth, Karlsruhe
Natrium-Pyruvat	Fluka, China
p-Nitrophenylphosphat	Sigma-Aldrich, USA
NP40 (Nonidet P-40)	Sigma-Aldrich, USA
PBS (Dulbecco`s)	PAA Laboratories, Österreich
Pepsin	Serva, Heidelberg
PFA (Paraformaldehyd)	Serva, Heidelberg
Roti <sup>®</sup> Histol	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30	Roth, Karlsruhe
SDS	Sigma-Aldrich, USA
TEMED	Sigma-Aldrich, USA
Thyroxin	Sigma-Aldrich, USA
Trichloressigsäure	Serva, Heidelberg
Tris-Ultra Pure	ICN Biomedicals Inc, USA
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypton	Difco Laboratories, USA
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt

Xylencyranblau	Roth, Karlsruhe
Ziegenserum	Dako, Dänemark
Zitronensäure	Roth, Karlsruhe

## 2.2 Zellbiologische Methoden

Um differentiell exprimierte Gene kaudaler und kranialer Chondrozyten aus embryonalen Hühnersterna zu identifizieren, wurde RNA als Ausgangsmaterial, gewonnen aus kaudalen bzw. kranialen Chondrozyten, genutzt. Es folgte eine suppressive, subtraktive Hybridisierung und die Erstellung von jeweils drei Gene Arrays für kaudale bzw. kraniale Chondrozyten. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die identifizierten Gene und deren Genprodukte molekularbiologisch, proteinbiochemisch und histologisch untersucht. Zunächst werden die zellbiologischen Methoden dargestellt:

### 2.2.1 Sternapräparation aus Hühnerembryonen

Die befruchteten Hühnereier wurden für 17 Tage bebrütet, dann mit 75%igem Ethanol Oberflächen desinfiziert und schließlich wurden die Embryonen entnommen. Die Sterna wurden freipräpariert und dreimal unter sterilen Bedingungen in Krebs-Ringer-Puffer mit 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin gewaschen, um Blut- und Gewebereste zu entfernen. Der kaudale und der kraniale Teil des Sternums wurde mit einem sterilen Skalpell vom Mittelteil abgetrennt.

#### Krebs-Ringer-Puffer:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	15,7 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,6 mM
KCl	5,4 mM
NaCl	111,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,3 mM
NaHCO <sub>3</sub>	4 mM
Glukose	13 mM
in reinst. Wasser, pH 7,4	

### 2.2.2 Brustkorbpräparation aus neugeborenen Mäusen

Für die Kultivierung von Chondrozyten aus Wildtyp-(BL6) und *Col8a1<sup>-/-</sup>/Col8a2<sup>-/-</sup>*-Mäusen wurden neugeborenen Mäuse getötet und die Brustkörbe entnommen, sorgfältig von anliegendem Gewebe befreit und gewaschen, wie unter 2.1.1 dargestellt. Die Rippen wurden mit einem sterilen Skalpell vom Rückgrat getrennt.

Die Mäuse wurden uns freundlicherweise von Dr. Ulrike Hopfer (Basel) zur Verfügung gestellt.

### 2.2.3 Chondrozytenisolierung

Zur Gewinnung der Chondrozyten wurden die Knorpelstücke (kaudale und kraniale beim Huhn, bzw. der gesamte Brustkorb bei der Maus) über Nacht mit 1-1,5 mg/ml bakterieller Kollagenase in DMEM mit 1mM Cystein, 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin bei 37 °C verdaut.

Am nächsten Morgen (ca. 19-20 Stunden später) wurden die Chondrozyten im Medium resuspendiert und durch Swinnex-Filter mit drei Schichten Nylongewebe (Porengröße 100 µm) filtriert. Die Zellen wurden dreimal in Krebs-Ringer-Puffer mit 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin gewaschen und durch Zentrifugation (600 x g, 7 min, RT) sedimentiert. Nun wurden die Zellen in DMEM resuspendiert und die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Kammer bestimmt.

#### DMEM(Gibco, Invitrogen):

Dulbecco`s modifiziertes Eagle Medium (4,5 g/l Glukose)

pH 7,4

### 2.2.4 Agarose-Suspensionskulturen (modifiziert nach Benya und Shaffer, 1982)

Damit die Chondrozyten in Kultur optimale Bedingungen haben, wurden sie in Agarose eingebettet ( $2,1 \times 10^6$  Zellen/ml). Dafür wurde ein Volumen 2-fach DMEM, 1 Volumen 2%ige Niedrigtemperatur-Agarose (NT-Agarose) und BCP (5µl/ml) gemischt. Dies wurde auf 2 Volumen DMEM, in dem die Zellen resuspendiert worden waren, gegeben und der Ansatz auf 35 mm Kulturschalen pipettiert, die mit 1%iger Hochtemperatur-Agarose (HT-Agarose) beschichtet waren. Für 15 min standen die Schalen auf einem Wärmetisch (37°C), damit die Zellen absinken konnten, und wurden im Anschluss für 10 min in einen Kühlschrank (4°C) gestellt, so dass sich die Agarose verfestigte.

Schließlich wurden die Schalen in einen Brutschrank gestellt (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) und nach 1-3 Stunden wurde zu jeder Schale 1 ml Medium mit BCP (5µl/ml) gegeben.

Transfizierte Zellen wurden nach der Transfektion vor dem Einbetten zunächst zur Regeneration für 1 Stunde in 20 %igem FKS in DMEM/F12 gehalten.

Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium gewechselt, dem ABCP-Stammlösung (5 µl/ml) beigemischt wurde.

Je nach Versuch wurden die Zellen zur Hypertrophierung stimuliert, kaudale Zellen mit Thyroxin (1-5 µl/ml) und Chymotrypsin (10 µl/ml), kraniale Zellen mit IGF-I (10 µl/ml) (Böhme et al., 1992, Bittner et al., 1998).

In einem Versuch zur Inhibierung der Carboanhydrase durch Acetazolamid wurde regelmäßig zusätzlich zu Thyroxin bzw. IGF-I noch Acetazolamid in einer Konzentration von 5-500 µM zu den kranialen Zellen gegeben.

#### Zusätze: (A) BCP-Stammlösung

Ascorbinsäure (A)	5 mg/ml
β-Aminopropionitril (B)	10 mg/ml
Cystein (C)	35,1 mg/ml
Pyruvat (P)	22 mg/ml
in H <sub>2</sub> O und sterilfiltrieren	

Thyroxin (1 mg/ml)	pro ml Medium wurde 1 µl zugegeben
IGF-I (10 µg/ml)	pro ml Medium wurden 10 µl zugegeben
Chymotrypsin (1 mg/ml)	pro ml Medium wurden 10 µl zugegeben

### 2.2.5 Monolayerkultur

Für die Isolierung von RNA wurden die Zellen in Monolayerkultur gehalten. Sie wurden in einer Dichte von  $1,3-3,5 \times 10^6$  Zellen/Schale (35 mm) auf einem Volumen Niedrigtemperatur-Agarose gemischt mit einem Volumen 2-fach-DMEM ausgesät. Die Kultivierung erfolgte in DMEM.

Um den Einfluss eines in kaudalen und kranialen Chondrozyten differentiell exprimierten Gens auf die späte Differenzierung zu untersuchen, wurden Chondrozyten transfiziert (siehe 2.2.6). Vor der Transfektion der Zellen wurden sie für zwei-drei Tage in Vorkultur gehalten, um sich von der Isolierung regenerieren zu können. Hier wurden  $7,5 \times 10^6$  Zellen/ Schale (100 mm) ausgesät. Kaudale Zellen wurden in 10% FKS-haltigem Medium (DMEM/Häm F12) und kraniale Zellen in FKS-freiem Medium gehalten. Zum Ablösen der Chondrozyten von den Schalen wurden sie nach der Vorkultur  $1\frac{1}{2}$  bis 3 Stunden mit bakterieller Kollagenase (1 mg/ml) und ggf. Pronase (1 mg/ml) verdaut und mit sterilem PBS gewaschen.

### 2.2.6 Transfektion von Chondrozyten

Für die Transfektion der primären Hühnerchondrozyten wurde das Human Chondrocyte Nucleofector Kit<sup>TM</sup> im Zusammenspiel mit dem Nucleofector<sup>TM</sup> von Lonza (Köln) verwendet. Hier wurde die siRNA bzw. das Plasmid mittels Elektroporation direkt in den Zellkern der Chondrozyten eingeschleust. Die Vorgehensweise erfolgte wie vom Hersteller empfohlen. Von dem Plasmid wurden 2 µg/ Transfektion und von der siRNA (20µM) 10 µl/Transfektion pro 1-1,3 Millionen Zellen eingesetzt.

Für die Transfektion wurden die Chondrozyten nach der Vorkultur in 100 µl Human Chondrocyte Nucleofector-Lösung aufgenommen, die siRNA bzw. das Plasmid dazugegeben und in die Küvette pipettiert. Elektroporiert wurde mit dem Programm X-05, das sich nach dem Testen einiger Programme als besonders geeignet für die Vitalität und erfolgreichen Transfektion der Hühnerchondrozyten erwiesen hatte.

Nach der Elektroporation mit der siRNA wurden gleich 500 µl vorgewärmtes DMEM/F12-Medium mit 20 FKS auf den Ansatz pipettiert. Für etwa 1 Stunde wurden die Zellen bei 37°C und 5 % Kohlendioxid zur Regeneration gehalten. Dann wurde das Medium durch DMEM ersetzt und die Zellen wurden eingebettet bzw. in Monolayerkultur genommen.

### 2.2.7 Immunfluoreszenz

Die transfizierten Chondrozyten wurden für 72 Stunden in 35 mm Kulturschalen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie für 5 min in 3 % PFA in PBS fixiert und dann wieder dreimal für 5 min mit PBS gewaschen.

Mit 0,5% Triton X-100 (v/v) in PBS wurden die Zellen für 5 min permeabilisiert und anschließend erneut mit PBS gewaschen. Blockiert wurde mit 1%igem Ziegen Serum in PBS für 15 min.

Der Primärantikörper wurde 1:100 in der Blockierungslösung (1%iges Ziegen Serum in PBS) eingesetzt und für 45 min bei 37°C inkubiert. Es wurde dreimal je 15 min mit PBS gewaschen, bevor der Sekundärantikörper (1:500 in 1 %igem Ziegen Serum in PBS) ebenfalls für 45 min bei 37°C inkubiert wurde. Hier wurden die Schalen mit Alufolie abgedeckt, um sie vor Licht zu schützen.

Vor dem Eindeckeln mit Fluoromount G mit einem Deckgläschen wurde erneut dreimal für 15 min mit PBS gewaschen.

Die Schalen wurden bis zur Betrachtung mit einem konfokalen Lasermikroskop (Zeiss Axio Imager 200) in Alufolie bei 4 °C aufbewahrt.

PBS	Phosphate Buffered Saline (Dulbecco), w/o Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>
3% PFA	3 % Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4; auf etwa 60 °C erhitzen, pH-Einstellung mit 1M NaOH
Primärantikörper	Anti-FLAG Polyclonal AK (Rabbit, Sigma-Aldrich, USA)
Sekundärantikörper	Alexa Flour ® 488 goat anti mouse IgG (Molecular Probes,USA)

### 2.2.8 Markierung mit <sup>14</sup>C-Prolin

Für die Bestimmung der Kollagene und der Kollagen-Menge im Medium bzw. in den Zellen, wurde dem Medium an Tag 11-14 in Kultur <sup>14</sup>C-Prolin zugefügt und die Zellen wurden für einen weiteren Tag bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, so dass das markierte Prolin in die neusynthetisierten Proteine eingebaut werden konnte. Die isolierten, aufgereinigten Kollagene wurden dann durch ein SDS-Gel (siehe 2.4.7) aufgetrennt und die Menge an Kollagen II und Kollagen X fluorographisch (siehe 2.4.11) bestimmt.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

Bei der SSH, die unter 2.3.6 vorgestellt wird, und für die Generierung eines Plasmids zur Transfektion von Hühnerchondrozyten und eines Konstrukts für die Herstellung einer transgenen Maus, die  $\alpha 1(\text{VIII})$  unter Regulation eines Kollagen II-Promotors exprimiert, waren verschiedene Klonierungen notwendig. In den folgenden Abschnitten wird auf die Bedingungen der Bakterienkultivierung und die verwendeten und konstruierten Vektoren eingegangen:

### 2.3.1 Verwendeter Bakterienstamm

Stamm	Referenz	Genotyp
<i>E. coli</i> TOP10 F <sup>-</sup>	Invitrogen <a href="http://products.invitrogen.com">http://products.invitrogen.com</a>	F <sup>-</sup> { <i>lacI</i> <sup>q</sup> , Tn10 (Tet <sup>R</sup> )} <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrrhsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi 80$ <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> ) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1</i> <i>nupG</i>

### 2.3.2 Nährmedien und Nährmedienzusätze

Die Nährmedien und ihre Zusätze wurden nach Sambrook et al. (2001) hergestellt. Nach dem Autoklavieren (121 °C, 1,2 bar; 20 min) der Medien wurde ihnen zur Selektion der Bakterien, die ein Plasmid mit Resistenzgen enthielten, noch Ampicillin (100  $\mu\text{g/ml}$ ) oder Kanamycin (25  $\mu\text{g/ml}$ ) zugesetzt, nachdem das Medium auf 50-60°C abgekühlt war.

Zur blau/weiß-Selektion wurden den Platten 40  $\mu\text{l}$  X-Gal und 40  $\mu\text{l}$  IPTG zugefügt.

LB (Luria-Bertani) Medium

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l

LB Agar

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
Agar	15 g/l

SOC Medium

Trypton-Pepton (Difco)	2 % (w/v)
Hefeextrakt (Difco)	0,5 % (w/v)
NaCl	0,05 % (w/v)

pH-Wert auf 6,8-7,0 einstellen und autklavieren, anschließend zusetzen:

1M KCl	0,25 % (v/v)
1M MgCl* 6 H <sub>2</sub> O	1 % (v/v)
50 % Glukose-Lösung	0,73 % (v/v)

Ampicillinlösung

100 mg/ml in dH<sub>2</sub>O, sterilfiltriert

Kanamycinlösung

25 mg/ml in dH<sub>2</sub>O, sterilfiltriert

IPTG-Lösung

100 mM IPTG in dH<sub>2</sub>O

X-Gal-Lösung

40 mg/ml X-Gal in DMF

### 2.3.3 Bakterienkultivierung und Stammhaltung

Für die Präparation der Plasmide aus den Bakterien wurden Kolonien gepickt und in 3 ml LB-Medium, versetzt mit Antibiotika, für etwa 8-12 Stunden bei 37°C geschüttelt (180 rpm). Zur Aufbewahrung der Klone wurden 828 µl einer Übernachtskultur mit 172 µl 87%igem Glycerin gemischt und bei -70 bis -80°C eingefroren.

Transformationsansätze und Vereinzlungsausstriche von Bakterien wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert und für 12-16 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Platten können auch, mit Parafilm (Pechiney, Plastic Packaging, Menasha) verschlossen werden, um Austrocknung zu vermeiden, und für bis zu drei Wochen bei 4°C gelagert werden.

### 2.3.4 Vektoren

In der Tabelle 2.1 sind die verwendeten, kommerziell zu erwerbenden Vektoren aufgelistet. Die Vektoren pCR<sup>®</sup>II-TOPO und pBluescript II KS sind für die Transformation von Bakterien geeignet. pmaxGFP und pCMV-Tag-4A eignen sich für die Expression in Zellen, die von Eukaryonten stammen.

**Tabelle 2.1: kommerzielle Vektoren**

Vektor	Beschreibung	Vertrieb
pCR®II-TOPO	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , linearisierter Vektor mit 3'-Thymin-Überhängen, blau-weiß-Selektion	Invitrogen, USA
pBluescript II KS	Amp <sup>r</sup> , blau-weiß-Selektion	Stratagene, USA
pmaxGFP	Mammalian Kontrollvektor, Kan <sup>r</sup> , Reporterprotein GFP	Lonza, Köln
pCMV-Tag-4A	Mammalian Expressionsvektor, Kan <sup>r</sup> , FLAG-Tag-Epitop	Stratagene, USA

Die Tabelle 2.2 zeigt die hergestellten Vektoren. pCMV-Tag-4A-Kollagen VIII  $\alpha 1$  gg ist der Vektor zur Überexpression von  $\alpha 1$ (VIII) in Hühnerchondrozyten und pBluescript II KS Kollagen II  $\alpha 1$  Promotor Koll VIII  $\alpha 1$ , mm ist das Ausgangsplasmid für die Herstellung der transgenen Maus.

**Tabelle 2.2: Konstruierte Vektoren**

Vektor	Beschreibung
pCR®II-TOPO-Kollagen VIII $\alpha 1$ gg	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , Vektor zur Zwischenklonierung von $\alpha 1$ (VIII)-cDNA aus Huhn
PCMV-Tag-4A-Kollagen VIII $\alpha 1$ gg	Kan <sup>r</sup> , Expressionsvektor von $\alpha 1$ (VIII)-cDNA aus Huhn
pBluescript II KS-Kollagen VIII $\alpha 1$ mm*	Amp <sup>r</sup> , Vektor zur Zwischenklonierung von $\alpha 1$ (VIII)-cDNA aus Maus
pCR®II-TOPO-Kollagen VIII $\alpha 1$ mm	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , Vektor zur Zwischenklonierung von $\alpha 1$ (VIII)-cDNA aus Maus
pCR®II-TOPO-Kollagen VIII $\alpha 1$ -Tag mm	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , Vektor zur Zwischenklonierung von $\alpha 1$ (VIII) mit myc-Tag cDNA aus Maus
pBluescript II KS-Kollagen II $\alpha 1$ Promotor mm** „Kollagen-II-Promotor-Plasmid“	Amp <sup>r</sup> , Vektor zur Klonierung mit dem Promotor von $\alpha 1$ (II) aus Maus
pBluescript II KS Kollagen II $\alpha 1$ Promotor Koll VIII $\alpha 1$ , mm	Amp <sup>r</sup> , Vektor zur Zwischenklonierung mit dem Promotor von $\alpha 1$ (II) aus Maus, $\alpha 1$ (VIII)-cDNA aus Maus

\*von Ulrike Hopfer freundlicherweise zur Verfügung gestellt, \*\*von Attila Aszodi freundlicherweise zur Verfügung gestellt; gg=*Gallus gallus*, mm=*Mus musculus*

### 2.3.5 Oligonukleotide (Primer)

Für die nähere Untersuchung der in kaudalen und kranialen Zellen unterschiedlich stark exprimierten Gene, die in der suppressiven, subtraktiven Hybridisierung und im Gene array gefunden wurden, war die Herstellung von Sonden für Northern Blot Hybridisierung per PCR notwendig. Außerdem wurde die Expression mittels semiquantitativer reverser Transkriptions-PCR bestimmt. Als House-Keeping-Gen diente Beta aktin bzw. GAPDH.

Auch die cDNA Volllänge-Klone von  $\alpha 1$ (VIII) wurden per PCR synthetisiert. Die Sequenzen für die Primer wurden mit Hilfe der Datenbank NCBI ausgewählt. Die Sequenzierung einiger PCR-Produkte erfolgte bei Eurofins MWG (Ebersbach), ebenso wie die Synthese der Oligonukleotide.

Im Folgenden werden die verschiedenen, benutzten Primer tabellarisch vorgestellt:

**Tabelle 2.3 „Housekeeping“-Gene**

Name	Sequenz 5`-3`	Tm, Produktlänge
chaktin_for (gg) chaktin_rev	ggatgtgcaaggaaggtt atggctggggtgtgaaggt	59,4°C, 353 bp 59,4 °C
GAPDH_for (gg) GAPDH_rev	tgggtgtcaacctgagaaata ctggctggtttctccagac	58°C, 365 bp 62°C
gapdhIn-for (gg) gapdhIn-rev	ttggctgattgccttcttt tcttttcttcacgcattg	53,2°C, 178 53,2°C
G3PDH5` Primer (hs) G3PDH3`Primer (hs)	accacagtccatgcatcac tccaccacctgttgctga	59,4°C 59,4°C

hs=*Homo sapiens*, gg=*Gallus gallus*

Die Tabelle 2.3 zeigt die Primer, die zum Nachweis der Expression der so genannten Housekeeping-Gene zu Verfügung standen. Das Primerpaar gapdhIn ist so gewählt, dass nur dann ein Produkt per PCR gebildet wurde, wenn noch genomische DNA in der Probe vorhanden war. Es diente zur Kontrolle der RNA Proben nach DNase-Behandlung.

**Tabelle 2.4: Primer zur Generierung von Sonden für Northern Blots und als Primer für die Qiagen® One Step RT-PCR (*Gallus gallus*)**

Name	Sequenz 5`-3`	Tm, Produktlänge
Chest7m_for * Chest7m_rev	tcgactgatgcattgaccat tgtgtccttttgaagctg	55,3°C, 583 bp 55,3°C
kolsonde_for ** kolsonde_rev	aagggagaagcaggacacaa atccctgttcagggttga	57,3°C, 575 bp 57,3°C
estkollVIII_for * estkollVIII_rev	cagcttgcaaaaaggacaca ggcctgcagattctcctaga	55,3°C, 244 bp 59,4°C
kollVIII-200907_for ** kollVIII-200907_rev	agagctcctcactcccttc tcagtggtcgtgttcttg	57,3°C, 197 bp 57,3°C
kollalpha2-2_for kollalpha2-2_rev	gactttgtacaacgggcaca ggaaccagagaaggaggag	57,3°C, 308 bp 61,4°C
ferritinH_for ferritinH-rev	ccaccgatctctctcttc gccttcagctgtcactttcc	59,4°C, 582 bp 59,4°C
ADAMTS-2_for ADAMTS-2_rev	ttcctagcagcaggacgaat ttgagcacaggcttcattg	57,3°C, 435 bp 55,3°C
Koll-X_for Koll-X_rev	acctgcaggatccctgtctat atcaatgacagcactgcctgagg	62,1°C, 161 bp 62,4°C
Koll-II_for Koll-II_rev	acctacagcgtcttgaggga atatccacgccaaactcctg	59,4°C, 155 bp 57,3°C

\*Primer hybridisieren in der Est-Sequenz, \*\*Primer hybridisieren im ORF von  $\alpha 1$ (VIII)

Zum Abgleich der aufgetragenen Menge an RNA bzw. mRNA auf den Blots wurde eine Beta aktin-Sonde (siehe Tabelle 2.3) verwendet.

In der Tabelle 2.5 sind die Primer für die Herstellung des ORF von  $\alpha 1$ (VIII) für die Expression im Huhn und in der Maus aufgelistet. Für die Expression in der Maus wurde zusätzlich zu dem ORF noch ein der ORF mit einem Myc-Tag am 3`-Ende generiert.

**Tabelle 2.5: Primer zur Generierung des ORFs**

Name	Sequenz 5`-3`	Tm, Produktlänge
VIIIORF_for orf-2_rev (gg)	aaagaattcatggccgtgctgcattc aaactcgagcatgggatacaataaatcctg	65,1°C, 2235bp 64,4°C
VIIImausfor VIIImausrev (mm)	ttaaagtggctgtggcca ttaaattacatgggatacaataaatcctgaaaa ggagg	60,6°C, 2247bp 65,4°C
VIIImaustagrev (mm)	ttaaattacagatcctcttctgagatgagttttgttc catgggatacaataaatcctgaaaaggagg	74°C, 2277 bp

gg=*Gallus gallus*, mm=*Mus musculus*

In der Tabelle 2.6 sind die Primer für die Sequenzierungen der synthetisierten ORF-Sequenzen von  $\alpha 1$ (VIII) angegeben.

**Tabelle 2.6: Primer zur Sequenzierung des ORFs**

Name	Sequenz 5`-3`	Tm
Sequenzier-1 (gg)	ggaccaccaggacctcatgg	66°C
Sequenzier-2 (gg)	gccatgcagggccaccaggc	66°C
Ko641 (mm)	cagggttaccagggaacca	64°C
ko1262 (mm)	gaccacagggtccaccaggc	68°C

gg=*Gallus gallus*, mm=*Mus musculus*

Die Primer, die in der Tabelle 2.7 gelistet sind, wurden während der suppressiven, subtraktiven Hybridisierung (2.3.6) verwendet.

**Tabelle 2.7: Primer für den Einsatz im Subtraktions-Kit**

Name	Sequenz 5`-3`	Tm
PCR primer 1	ctaatacgactcactatagggc	58,4°C
Nested PCR primer1	tcgagcggccgcccgggcaggt	73,3°C
Nested PCR primer 2R	agcgtggtcgcggccgaggt	67,6°C

Für das Silencing der  $\alpha 1$ (VIII)- und  $\alpha 2$ (VIII)-mRNA in Chondrozyten wurden von Invitrogen (USA) 25bp-lange Fragmente synthetisiert, die komplementär zu einem Sequenzabschnitt der  $\alpha 1$ (VIII)- oder  $\alpha 2$ (VIII)-mRNA-Sequenz waren. Das Programm von Invitrogen (<https://rnaideigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>) arbeitet mit einem dem Nutzer nicht weiter bekannten Algorithmus, um die siRNA-Abschnitte auszuwählen, die zu einem Silencing der entsprechenden Sequenz führen sollen.

**Tabelle 2.8: Sequenzen für die siRNA (*Gallus gallus*)**

Name $\alpha 1$ (VIII) bzw. $\alpha 2$ (VIII)	Sequenz 5`-3`
XM_416597_stealth_337 ( $\alpha 1$ )	Acucaggguggugucuacuauggaa
XM_416597_stealth_2144 ( $\alpha 1$ )	Ccgugaaguuugacaagcuccucua
Stealth_1818 ( $\alpha 2$ ) alte sequenz	Caugccugucaaguucgacaggacu
Stealth_1941 ( $\alpha 2$ )	Gaccaacgucuggguggcucuuuau
RNA stealth_1739 ( $\alpha 2$ )	Ccaccuacaccuacgacgaguacaa
RNA stealth_1870 ( $\alpha 2$ )	Acggaauacauccacuccuccuucu

### 2.3.6 Herstellung einer subtraktiven cDNA Bank

Wie in der Einleitung erklärt wird, wurde nach unterschiedlich stark exprimierten Genen in kaudalen und kranialen Chondrozyten gesucht. Die Methode der Wahl war die Herstellung einer subtraktiven cDNA-Bank (PCR-*Select*-Subtraktions-Kit, BD Biosciences) durch eine suppressive subtraktive Hybridisierung (SSH) nach Diatchenko et al., (1996). Ein Schema zur suppressiven, subtraktiven Hybridisierung ist in der Abbildung 3.1 im Ergebnisteil dargestellt. Zunächst wurde kaudale und kraniale mRNA in cDNA umgeschrieben. Die kaudale cDNA wurde als „tester“ bezeichnet und die kraniale cDNA, die als Referenz genommen wurde, als „driver“. Die „tester“ und die „driver“ cDNA wurden hybridisiert und die übrig-bleibende cDNA entsprach Genen, die in kaudalen Zellen, jedoch nicht in kranialen, exprimiert wurden. Parallel wurde die Reaktion auch umgekehrt durchgeführt, die sogenannte reverse Reaktion. Wenn nicht anders angegeben, stammten die Enzyme, Puffer und Primer aus dem PCR-*Select*-cDNA-Subtraktions-Kit. Die Herstellung der subtraktiven cDNA-Bibliothek wurde in folgende Abschnitte gegliedert:

#### 2.3.6.1 cDNA-Synthese

Für die Herstellung von cDNA wurden 2  $\mu$ g mRNA in 2-4  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O eingesetzt. Auf die RNA-Isolierung aus Chondrozyten und die mRNA-Aufreinigung wird in den Abschnitten 2.3.8 und 2.3.9 eingegangen. Da bei der Aufreinigung der mRNA zunächst ein größeres Volumen vorlag, musste die mRNA zunächst in der Speed-Vac (Savant Speed Vac Plus, Minnesota, USA) getrocknet werden.

Die cDNA-Synthesen (first strand, second strand) erfolgte nach Angaben der Hersteller.

Um die erfolgreiche subtraktive Hybridisierung überprüfen zu können, wurde parallel eine Kontroll-Subtraktion mit RNA aus menschlichem Skelettmuskel (aus dem Kit) durchgeführt. Die cDNA-Synthese der Skelettmuskel-Poly A<sup>+</sup>RNA erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

#### 2.3.6.2 Restriktionsverdau mit *Rsa* I

Die Ansätze wurden mit dem Restriktionsenzym *Rsa* I verdaut, da für die Adapterligation und die SSH blunt-ended-cDNA Fragmente notwendig waren. Der Verdau wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die gelungene Restriktion wurde per Gelelektrophorese (2.3.14, 1% Agarose in TAE-Puffer) überprüft. Nach der Restriktion sollten die meisten cDNA-Fragmente kleiner sein als ohne Verdau (0,1-2 kb statt 0,5-10 kb).

### 2.3.6.3 Adapterligation

Um im weiteren Verlauf die überexprimierten cDNAs identifizieren zu können, wurden die kaudalen und kranialen cDNAs mit 2 unterschiedlichen Adaptoren (1, 2R) ligiert. Als Kontrolle wurden die cDNAs zusätzlich mit beiden Adaptoren ligiert.

Die Ligation erfolgte wie vom Hersteller angegeben.

Überprüft wurde sie durch eine PCR, für die ein Primer gewählt wurde, der an dem Adaptor band und einer, der spezifisch für G3PDH war. Die Quantität des Produktes wurde verglichen mit der einer PCR, wo G3PDH forward und reverse Primer verwendet wurden. War sie viermal schwächer, war die Effizienz der Ligation nicht ausreichend, um mit der Hybridisierung fortzufahren.

### 2.3.6.4 Subtraktive Hybridisierung

Die subtraktive Hybridisierung wurde sowohl als „forward“ und auch als „reverse“ Reaktion durchgeführt. In der forward-Reaktion war die kaudale cDNA die „tester“ und die kraniale cDNA die „driver“-Probe, bei der reverse-Reaktion war es umgekehrt. Das war nötig, um später das differentielle Screenen durchzuführen.

Bei der ersten Hybridisierung wurde „tester“ cDNA, ligiert mit Adapter 1 bzw. Adapter 2R, mit *Rsa* I geschnittener „driver“ cDNA vermischt (genaue Angaben, siehe Hersteller).

Die Reaktion dauerte 8 Stunden und wurde bei 68°C durchgeführt.

Bei der zweiten Hybridisierung wurden die Ansätze der ersten Hybridisierung mit Adapter 1 und Adapter 2R vereinigt und noch einmal „driver“ cDNA im Überschuss zugegeben (siehe Angaben des Herstellers), damit „driver“ cDNA Hybride mit nicht differentiell exprimierten Transkripten der „tester“ cDNA bilden konnte. So wurde nur cDNA angereichert, die in der „tester“-Population überexprimiert wurde.

### 2.3.6.5 PCR-Amplifikation

Mit Hilfe von zwei verschiedenen PCRs wurde zunächst die cDNA, an denen jeweils beide Adapter (1, 2R) ligiert waren, exponentiell amplifiziert. Bei 75°C (5 min) wurden die Adapter aufgefüllt, dann schloss sich eine PCR nach Angaben des Herstellers an.

Die zweite PCR war eine nested PCR, mit welcher der Hintergrund reduziert und die differentiell exprimierte cDNA weiter angereichert werden sollte.

Die Nested Primer waren Inhalt des Kits. Die PCR wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Im Anschluss daran wurde das PCR-Produkt auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und wie vom Hersteller angegeben mit der Kontrolle aus dem Kit verglichen.

### 2.3.6.6 PCR-Analyse der Subtraktionseffizienz

Per PCR-Analyse wurde die Effizienz der Subtraktion überprüft, bevor mit der Herstellung einer cDNA-Bibliothek begonnen werden konnte. Es wurden Primer für GAPDH (aus Huhn) synthetisiert (MWG), um die Subtraktion dieses *Housekeeping*-Gens nachzuweisen.

Die cDNAs (subtrahiert, nicht subtrahiert) wurden 1:10 in reinst. H<sub>2</sub>O verdünnt und davon 1 µl für die PCR eingesetzt.

PCR-Ansatz:

forward Primer (10 $\mu$ M)	1,2 $\mu$ l
reverse Primer (10 $\mu$ M)	1,2 $\mu$ l
10-fach PCR-Puffer	3 $\mu$ l
dNTPs (10 mM)	0,6 $\mu$ l
50x Advantage cDNA-Polymerase-Mix	0,6 $\mu$ l
reinst. H <sub>2</sub> O	22,4 $\mu$ l

Es wurde 30 sek. bei 94°C denaturiert, 30 sek. bei 65°C hybridisiert und 2 min bei 68°C amplifiziert. Die Produkte wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen und auf einem 1 %igem Agarosegel untersucht.

**2.3.6.7 Differentielles Screening der subtrahierten cDNA**

Mit Hilfe des differentiellen Screenings (*PCR-Select-Differential-Screening Kits*, BD Bioscience, USA) wurde die Verunreinigung mit falsch positiven Klonen minimiert, da die Bibliothek neben unsubtrahierter cDNA sowohl mit der *forward* als auch mit der *reverse* subtrahierten cDNA hybridisiert wurde. Die richtigen Klone, welche ein differentiell exprimiertes Gen darstellten, durften nur mit der *forward* cDNA hybridisieren, andere, die auch mit der reversen Sonde hybridisierten waren Hintergrund (Diatchenko et al., 1996).

Die nested PCR wurde vor der Erstellung der Bibliothek wiederholt, der Elongationsschritt bei 72°C ausgeführt und eine finale Amplifikation (5 min, 72 °C) für die Synthese von A-Überhängen angehängt, da für die Herstellung einer Bibliothek eine TOPO T/A-Klonierung (siehe 2.3.6.8) notwendig war.

**2.3.6.8 T/A-Klonierung**

Die Klonierung wurde mit dem TOPO T/A-Cloning-Kit (Invitrogen, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden 10 ng der *forward* und *reverse* subtrahierten cDNA zur Erstellung der subtraktiven Bibliotheken verwendet.

**2.3.6.9 Bakterienkolonie-PCR zur Erstellung eines cDNA-Arrays**

Nach der TOPO-Klonierung wurden 96 Klone zufällig von der Platte gepickt und in einer 96 Well Kulturschale in 100  $\mu$ l LB-Medium (mit Ampicillin) für 4-6 h bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Für die Bakterienkolonie-PCR wurde ein Mastermix hergestellt, der die Nested Primer aus dem Kit enthielt (*PCR-Select-Differential-Screening Kits*, BD Bioscience).

Je 1  $\mu$ l der Bakterienkultur wurde zu 19  $\mu$ l des Mastermixes pipettiert und es wurde das entsprechende PCR-Programm ausgeführt (siehe Skript *PCR-Select-Differential-Screening Kits*).

Von den Kulturen wurden zur Weiterverwendung Einzelausstriche angefertigt und sie wurden bei 4°C gelagert.

### 2.3.6.10 cDNA-Dot Blots

Die PCR-Ansätze wurden 1:1 mit NaOH (0,6 N) verdünnt und jeweils 2 µl des Gemisches wurden auf Nylonmembranen (Hybond-XL-Nylonmembran, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) aufgetupft. So wurden vier identische Dotblots hergestellt, die nach Lufttrocknung in 0,5 m Tris/HCl (pH 7,5) für 2 min neutralisiert wurden. Dann wurden sie in dH<sub>2</sub>O kurz gewaschen und mit UV-Bestrahlung bei 120 mJ immobilisiert. Zur Aufbewahrung wurden sie in Folie eingeschweißt und bei -20°C gelagert.

### 2.3.6.11 Radioaktive Markierung von subtrahierter und unsubtrahierter cDNA

Die subtrahierten und unsubtrahierten cDNA-Proben wurden durch enzymatischen Einbau von [<sup>32</sup>P]-dCTP ([α-<sup>32</sup>P] dCTP Isoblu<3000 Ci/ mmol, MP Biomedicals) radioaktiv markiert. Sie wurden verdünnt (75-100 ng/µl) und entsprechend der Empfehlung des Herstellers (*PCR-Select-Differential-Screening Kit*, BD Bioscience) behandelt. Mit Hilfe des PCR-Purification-Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurden nicht eingebaute cCTPs, wie im Qiagen Handbuch dargestellt, entfernt. Die Sonde wurde zweimal mit 50 µl EB-Puffer eluiert und die Aktivität der Proben über die cpm-Werte von jeweils 2 µl der Sonde mit einem β-Counter (siehe 2.3.16.1) bestimmt.

### 2.3.6.12 Hybridisierung der Dot Blots

Die Dot Blots wurden mit sterilem dH<sub>2</sub>O befeuchtet und in Hybridisierungs-Röhren gelegt. Es wurden 50 µl 20x SSC-Puffer und 50 µl Blockierungslösung (*PCR-Select-Differential-Screening Kits*, BD Bioscience) 1:1 gemischt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Dann wurden sie in 5 ml Hybridisierungslösung (*ExpressHyb, Hybridization Solution*, Clontech) aufgenommen und die Membranen wurden 60-80 min bei 72°C in dieser Lösung prähybridisiert.

10<sup>7</sup> cpm/100 ng cDNA-Sonde wurden mit 50 µl 20x SSC und 50 µl Hybridisierungslösung aufgeköcht. Die Filter wurden für 16 h bei 72 °C mit den Sonden inkubiert.

Dann wurden die Blots dreimal 20 min und einmal 45 min mit *Low-Stringency*-Puffer und zweimal 20 min mit *High-Stringency*-Puffer bei 68°C gewaschen. Die gemessene Radioaktivität der Waschlösung sollte nur noch weniger als 1 cpm betragen.

Die Dot Blots wurden in Folie eingeschweißt und die Screens wurden für 1-12 Stunden aufgelegt. Die Signale wurden durch Phosphoimaging (Storm 860, Molecular Dynamics) detektiert.

#### 20 x SSC

NaCl	175,3 g
Na <sub>3</sub> Citrat x H <sub>2</sub> O	88,2 g
pH 7,0	

#### 20 % SDS

200 g/l, zum Lösen auf 65 °C erhitzen

#### Low-Stringency-Puffer

SSC	2 x
SDS	0,5 %

#### High-Stringency-Puffer

SSC	0,2 x
SDS	0,5 %

### 2.3.6.13 Sequenzierung

Die zu sequenzierenden DNA-Abschnitte wurden zu Eurofins MWG (Ebersbach) geschickt. Dort wurden sie nach der Didesoxy-Methode von Sanger et al. (1977) sequenziert.

### 2.3.6.14 Sequenzanalysen im Internet

Die Sequenzen wurden auf der Internetseite <http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> mit dem Programm BLAST (Altschul et al., 1990) mit bekannten Sequenzen aus Huhn bzw. Maus verglichen.

Zur Herstellung von Primern wurde das Programm zum Primerdesign der Internetseite <http://frodo.wi.mit.edu/> benutzt und für Proteinsequenzvergleiche und das Alignen von 2 Sequenzen wurden die Internetseiten <http://genome.cs.mtu.edu/align/align/html> und <http://espript..ibcp.fr//ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi> verwendet.

## 2.3.7 Gene array

Um noch weitere differentiell exprimierter Gene in kaudalen und kranialen Chondrozyten identifizieren zu können, wurden Chicken Gene Arrays (Affymetrix, USA), die mehr als 32000 Transkripte enthalten, hybridisiert. Für die Hybridisierung, musste die aus kaudalen und kranialen Chondrozyten isolierte RNA (Trizol®, siehe 2.3.8), mit DNase verdaut werden (siehe 2.3.11) und anschließend ein weiteres Mal aufgereinigt werden (siehe 2.3.10). Das Umschreiben in doppelsträngige cDNA und wieder in cRNA, die Markierung mit Biotin und die Hybridisierung mit den jeweils drei Genearrays (drei mit kaudalen Sonden, drei mit kranialen Sonden) wurde von der IFG (Integrierte funktionelle Genomik, Münster) durchgeführt. Die Auswertung mit dem Computer (Refiner Group Report, Genedata Expressionist Refiner Pro 3.0.7) zur Filterung der signifikanten Unterschiede in der Expression wurde von Dr. Martin Eisenacher, Diplominformatiker (IFG, Münster), und Frau Dr. Sylvia Merk (Bioinformatik, Münster) ausgeführt. Der größere Teil der hier vorgestellten Ergebnisse stammt aus den Auswertungen von Frau Dr. Sylvia Merk.

## 2.3.8 Isolierung von RNA aus Hühnerchondrozyten mit Trizol® (Invitrogen, USA)

Für die Herstellung der SSH (2.3.6), für die Hybridisierung des Gene Arrays(2.3.7.), für die Generierung von Northern Blots (2.3.15) und für die Analyse der Expression verschiedener Gene während der Differenzierung der Chondrozyten per semiquantitativer reverser Transkriptions PCR (2.3.17) war die Isolierung von RNA aus Chondrozyten notwendig.

Die Chondrozyten wurden entweder direkt nach der Isolierung (siehe 2.2.3) oder nach der Kultivierung in Monolayer (siehe 2.2.5) abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit Hilfe einer Spritze (20 g) und Trizol (1ml/5-10 Millionen Zellen) durch auf und abziehen lysiert.

Die homogenisierten Proben inkubierten 5 min bei Raumtemperatur, dann wurde ein 0,2-faches Volumen an Chloroform dazugegeben und geschüttelt. Nach zwei bis 3 min Inkubation wurde bei 12000 g für 2-8°C für 15 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit Isopropanol (½ Volumen des eingesetzten Trizols) vermischt. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde wiederum für 15 min zentrifugiert (12 000 g, 2-8°C). Das Pellet wurde mit 75%igem Ethanol gewaschen (1 Volumen des eingesetzten Trizols), kurz stehen gelassen und für 5 min zentrifugiert (7500 g, 2-8 °C).



Lysepuffer

NaCl	0,1 M
EDTA	50 mM
Tris, pH=8	50 mM
Proteinase K	0,1 mg/ml
SDS	1,0%

### 2.3.13 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäuren

Um die Konzentration von DNA- oder RNA-Proben zu bestimmen, wurde ein Eppendorf-Photometer zur Ermittlung der optischen Dichte (OD) verwendet. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm. Eine  $OD_{260}$  von 1,0 entspricht einer dsDNA-Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  und einer ssRNA-Konzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$ . Die Optische Dichte bei 280 nm (Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren) ist zur Bestimmung der Reinheit von Nukleinsäuren geeignet. Die Reinheit der Nukleinsäuren ist ausreichend, wenn das Verhältnis von 260 zu 280 nm zwischen 1,5 und 1,8 liegt (Lottspeich und Zorbas, 1998).

### 2.3.14 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

#### 2.3.14.1 Gelelektrophorese von DNA (Sambrook et al., 1989)

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten, zum Beispiel aus Restriktionsansätzen oder nach einer PCR, wurden horizontale Agarosegele verwendet. Diese erlauben, je nach Zusammensetzung, eine Auftrennung von Nukleinsäuren in einem Bereich von 20 bp bis 20 kb. Die DNA-Proben wurden mit 6 x Auftragspuffer (Fermentas, Vilnius, Litauen) gemischt, in die Geltaschen pipettiert und eine Spannung von 80 bis 120 Volt angelegt. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE-Puffer verwendet. Zur Bestimmung der Größe und der Konzentration der aufgetragenen Proben wurde ein Standard mit definierten Größen parallel aufgetragen (Gene Ruler 1kb bzw. 100 bp DNA Ladder, Fermentas, Vitnius, Litauen). Den Gelen wurde Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  zugesetzt, damit die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht werden konnten. (UV-Transilluminator System (2 UV, MWG, Ebersberg, Thermodrucker Sony UP-D860 E, Thermopapier Sony UD 11). Die Wellenlänge des UV-Lichts betrug 302 nm.

50 x TAE-Puffer

Tris-Base	40 mM
Eisessig	40 mM
EDTA	2 mM
pH 7,8	

#### 2.3.14.2 Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese

Die RNA wurde zur Kontrolle der Reinheit und für die Herstellung von Northern Blots gelelektrophoretisch aufgetrennt. 1-2% Agarose wurde in 1 x MOPS-Puffer gelöst. Zum Ansatz wurde Formaldehyd (37 %) mit einer Endkonzentration von 2,2 M dazugegeben. Die RNA wurde mit 2-fachem Volumen Denaturierungspuffer versetzt und für 10 min bei 65°C denaturiert. Dann wurde sie auf Eis abgekühlt und 6-fach Probenpuffer und 1  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid (0,5 mg/ml) zupipettiert.

Der Gellauf erfolgte bei 90 –100 Volt in 1-fachem MOPS-Puffer bei 4 °C.

#### 10 x MOPS

MOPS	0,2 M
Na Ac	0,05 M
EDTA	0,01 M
pH 7 mit NaOH einstellen	

#### Denaturierungspuffer

Formamid, entionisiert	5% (v/v)
Formaldehyd	14,6 mM
MOPS-Puffer in DEPC-H <sub>2</sub> O	1x

#### RNA-Probenpuffer

Formaldehyd	37 % (w/v), 500 µl
Glycerin	87 % (v/v), 400 µl
Bromphenolblau	1 % (w/v), 50 µl
Xylencyanblau in DEPC-H <sub>2</sub> O	1% (w/v), 50 µl

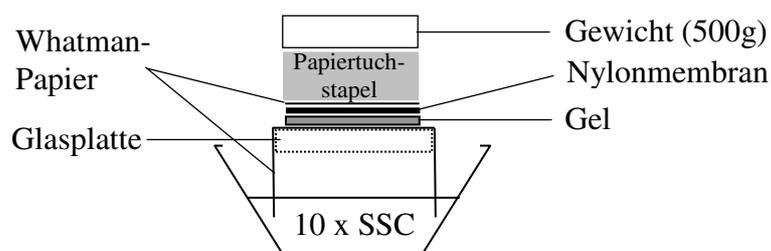
#### denaturierender Laufpuffer

MOPS in DEPC-H <sub>2</sub> O	1 x
Formaldehyd	0,2 M

### 2.3.15 Northern Blot

Zur Herstellung des Northern Blots wurden 10-20 µg RNA oder 1-2 µg mRNA elektrophoretisch aufgetrennt. (siehe 2.3.14.2) Im Anschluss wurden sie auf eine Membran (Hybond-XL-Nylonmembran, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) unter Wirkung von Kapillarkräften mittels eines Transferstapels aus Papier und 10 x SSC-Puffer übertragen (siehe Abbildung 2.2). Die vollständige Übertragung der RNA auf die Membran dauerte etwa 12 Stunden und wurde bei 4°C durchgeführt.

Schließlich wird die Membran kurz getrocknet und die RNA wurde durch Bestrahlung mit UV-Licht (0,120 Joule/cm<sup>2</sup>) an der Membran fixiert (Stratalinker, Stratagene, La Jolla, USA, Einstellung: Autocrosslink).



**Abbildung 2.2: Aufbau für Northern Blotting**

### 2.3.16 Hybridisierungstechniken

#### 2.3.16.1 Radioaktive Markierung einer ssDNA-Sonde

Die cDNA-Sonden wurden mittels PCR hergestellt, nach Elektrophorese aus den Agarose-Gelen ausgeschnitten und aufgereinigt (siehe 2.3.19.4) und unter Verwendung des Prime-a-gene-labeling-Kits (Promega, USA) radioaktiv markiert. Es wurden etwa 30 ng DNA (in 30 µl DEPC-H<sub>2</sub>O) eingesetzt, denaturiert und mit Puffer, unmarkierten dNTPs (dGTP, dTTP, dATP), DNA-Polymerase I (Klenow, Promega, Madison, USA) und markiertem dCTP

versetzt. Es wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und im Anschluss wurde die Probe zur Entfernung der nicht eingebauten [<sup>32</sup>P]-dCTPs mit dem PCR-Purification-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben der Hersteller aufgereinigt.

Die aufgereinigte Sonde wurde mit 2 x 50 µl EB Puffer eluiert. Die Einbaurrate von [<sup>32</sup>P]-dCTP wurde anhand der Radioaktivität von 2 µl der Sonde mit Hilfe eines Szintillationszählers (Beckmann, LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, Fullerton, Ca, USA) bestimmt und für die Hybridisierung des Northern Blots wurden maximal 10 000 cpm eingesetzt. Die Hybridisierung wurde wie unter 2.3.16.3.1 dargestellt durchgeführt.

### **2.3.16.2 DIG Markierung einer ssDNA-Sonde**

Als Alternative zu der radioaktiven Markierung von Sonden gibt es das DIG-System (Roche, Mannheim). Es basiert auf dem Molekül Digoxigenin, das meistens an Uracil gebunden ist, und durch das Klenow-Enzym in die Sonde eingebaut wird. An das Digoxigenin bindet dann ein Antikörper, gebunden an eine alkalische Phosphatase. In einem weiteren Schritt wird das Substrat für die Phosphatase dazugegeben, welches dann abgebaut wird und das Abbauprodukt kann durch einen Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

Es wurde 1 µg cDNA-Templat mit reinst-H<sub>2</sub>O auf 16 µl aufgefüllt, für 10 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Dann wurden 4 µl DIG-High-Prime (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, Roche, Mannheim) dazupipettiert und es wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion für 10 min bei 65°C.

#### **2.3.16.2.1 Konzentrationsbestimmung der DIG gelabelten DNA durch Dot Blots**

Zur Konzentrationsbestimmung der Sonden wurden Verdünnungsreihen mit der markierten cDNA und der Kontroll-DNA erstellt (0,01 pg/µl bis 1 ng/µl). Es wurde jeweils 1 µl der Verdünnungen auf eine Nylon-Membran (Hybond-XL-Nylonmembran, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) pipettiert und UV-fixiert (siehe 2.3.6.10). Die Membran wurde in eine Schüssel mit 20 ml Maleinsäure-Puffer gegeben und 2 min bei RT geschüttelt. Dann wurde sie 30 min in Blockierungspuffer (1:10 verdünnt in Maleinsäure) und 30 min in Antikörper-Lösung (2 µl [75 mU/ml]) in 20 ml Blockierungspuffer) sanft geschüttelt.

Es wurde viermal 10 min in Wasch-Puffer gewaschen und für 2-5 min in Detektions-Puffer inkubiert. (Beide Puffer sind im DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, Roche, Mannheim vorhanden.)

Die Membran wurde auf eine Folie gelegt, mit 4 Tropfen CSPD (Kit) beträufelt, mit einer Folie bedeckt, so dass sich die Lösung verteilt, und für 5 min im Dunkeln inkubiert. Dann wurde ein Röntgenfilm (CL-X Posure<sup>TM</sup> Film, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) aufgelegt.

Für die Hybridisierung wurden 25 ng DIG-markierte DNA-Sonde je ml DIG Easy Hyb eingesetzt.



### 2.3.17 cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA war notwendig für die semiquantitative PCR zur Analyse der Expression verschiedener Gene, für die Herstellung der Sonden zur Hybridisierung der Northern Blots (2.3.16.3) und für die Generierung des Volllänge-ORFs von  $\alpha 1$ (VIII) aus Huhn (2.3.19).

#### 2.3.17.1 Reverse Transkription

Das Umschreiben von polyA-RNA in cDNA wurde auf verschiedene Weise durchgeführt.

Allen reversen Transkriptionen ging ein DNase-Verdau (siehe 2.3.11) voraus.

Zunächst wurde die Strata Script Reverse Transkriptase (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet. Sie ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die durch Entfernung der RNase H-Aktivität von *Moloney Murine Leukemia Virus* Reversen Transcriptase hergestellt wurde. So kann das Enzym eine größere Menge an Volllänge-cDNA-Transkripten synthetisieren.

Für die Reverse Transkription wurden 10  $\mu\text{g}$  totale RNA in 38,5  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  zu 3  $\mu\text{l}$  Oligo(dt)-Primern (100 ng/ $\mu\text{l}$ ) pipettiert und für 5 min bei 70°C inkubiert. Das Gemisch wurde für etwa 20 min bei RT langsam abgekühlt, damit die Primer hybridisieren konnten.

Dann wurden 10  $\mu\text{l}$  10x Puffer (StrataScript), 1,5  $\mu\text{l}$  RNase-Inhibitor (Qiagen), 1  $\mu\text{l}$  dNTPs (mM) und 1  $\mu\text{l}$  Enzym hinzugefügt und für eine Stunde bei 42°C inkubiert. Darauf folgte ein Denaturierungsschritt bei 94°C für 10 min. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert und konnte als Templat für die PCR eingesetzt werden.

Für die Synthese der Volllänge-cDNA von  $\alpha 1$ (VIII) aus Huhn wurde die Super Script<sup>TM</sup> III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) verwendet.

Es wurde zwischen 10 pg und 5  $\mu\text{g}$  RNA in 11  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  eingesetzt, mit 1  $\mu\text{l}$  Oligo(dt) Primern (50 $\mu\text{M}$ ) und 1  $\mu\text{l}$  dNTPs (10 mM) gemischt und für 5 min bei 65°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Dann wurden 4  $\mu\text{l}$  5x first strand buffer (Invitrogen, USA), 1  $\mu\text{l}$  0,1 M DTT, 1  $\mu\text{l}$  RNase-Inhibitor (Qiagen, Hilden, Deutschland) und 1  $\mu\text{l}$  Super Script III zupipettiert und vorsichtig gemischt. Es folgte eine 60 minütige Inkubation bei 50°C und eine 15 minütige Inkubation bei 70°C.

Die cDNA wurde bei -20°C gelagert und konnte als Templat für die PCR eingesetzt werden.

#### 2.3.17.2 Reverse Transkription mit dem Qiagen<sup>®</sup> One Step RT-PCR Kit

Eine weitere Möglichkeit zur cDNA-Synthese bot das Qiagen<sup>®</sup> One Step RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), bei dem das Umschreiben der polyA-RNA und die Vermehrung der cDNA durch PCR gleich hintereinander ablief. Hier diente ein Templat von 100-200 pg RNA als Templat.

Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Diese Methode wurde für den Nachweis des erfolgreichen Silencing der  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA in Hühnerchondrozyten und für die Analyse der Expression verschiedener Gene während der Differenzierung verwendet.

### 2.3.18 Amplifikation von Nukleinsäuren

#### **Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR)**

Die PCR wurde für die Herstellung von Sonden aus cDNA für die Hybridisierung von Northern Blots (2.3.16.3), für die Amplifizierung der Volllänge-cDNA Sequenzen von  $\alpha 1$ (VIII) aus Huhn (2.3.19.1) und Maus (2.3.19.2) und als Kontrolle der DNase-Verdaus angewendet.

#### **2.3.18.1 Taq-Polymerasen**

Mit Hilfe einer PCR werden definierte DNA-Abschnitte beliebig oft amplifiziert.

Die PCR wurde meistens im 25  $\mu$ l- aber auch im 50  $\mu$ l-Ansatz durchgeführt. Es standen zwei PCR Maschinen zu Verfügung (PTC-200 Peltier Thermal Cycler MJ Research, Biorad, USA; TGradient, Biometra, Göttingen, Deutschland).

Für die Standard-PCR wurden die REDTaq-Polymerase (Sigma-Aldrich, USA) bzw. die Moltaq<sup>RED</sup> von Molzym (Bremen) verwendet.

Eine typische PCR-Reaktion setzte sich wie folgt zusammen (25  $\mu$ l Ansatz):

H <sub>2</sub> O	18,375 $\mu$ l
10 x Puffer	2,5 $\mu$ l
dNTPs (10 mM)	0,5 $\mu$ l
Enhancer	0,5 $\mu$ l
forward Primer	1 $\mu$ l
reverse Primer	1 $\mu$ l
Moltaq/ REDTaq	0,125 $\mu$ l
Templat	1 $\mu$ l

Die PCR ist zumeist nach folgendem Prinzip aufgebaut:

1.	94°C	120 sek, initiale Denaturierung
2.	94°C	10-30 sek, Denaturierung
3.	53-60°C	30-60 sek, Primer Anlagerung
4.	68-72°C	Elongation, Zeit definiert durch Amplifikat
5.	68-72 °C	Finale Elongation

Nach dem vierten Schritt folgt der zweite und zumeist werden die Schritte 2-4 zwischen 20- und 32-mal wiederholt.

#### **2.3.18.2 Pfu-Polymerasen**

Für die Herstellung der Volllänge von  $\alpha 1$ (VIII) aus Huhn und aus Maus wurden besondere Polymerasen verwendet, die weniger Fehler einbauen, da sie eine „proof-reading“-Funktion haben.

Für die Generierung der Volllänge von  $\alpha 1$ (VIII) beim Huhn aus cDNA wurde die AccuPrime<sup>TM</sup> Pfx DNA-Polymerase (Invitrogen, USA) verwendet. Von der hergestellten cDNA wurden 2  $\mu$ l eingesetzt und die PCR wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Für die Amplifikation der Volllänge-Sequenzen von  $\alpha 1(\text{VIII})$  mit und ohne Myc-Tag aus Maus wurde die *PfuUltra*<sup>®</sup> II Fusion HS DNA Polymerase (Stratagene, USA) verwendet. Der PCR-Ansatz wurde nach Angaben des Herstellers pipettiert.

Das Enzym arbeitet schneller als gewöhnliche Taq-Polymerasen, aus diesem Grund wurde die Elongationszeit kürzer gewählt:

1.	95°C	120 sek, initiale Denaturierung
2.	95°C	20 sek, Denaturierung
3.	58-60°C	20 sek, Primer Anlagerung
4.	72°C	15 sek/ 1kb, Elongation
5.	72°C	180 sek, finale Elongation

### 2.3.19 Klonierung

Im Verlauf der Arbeit wurde die ORF-cDNA aus Huhn von  $\alpha 1(\text{VIII})$  in den pCMV-Tag-4A-Vektor zu Expression in Hühner-Chondrozyten kloniert und die ORF-cDNA von  $\alpha 1(\text{VIII})$  aus Maus wurde in das pBluescript II KS-Kollagen II  $\alpha 1$ -Plasmid (Kollagen 2 Kasette) kloniert. Kurz soll der Ablauf der Klonierungen vorgestellt werden, bevor die einzelnen Schritte erklärt werden:

#### 2.3.19.1 Klonierung der ORF-cDNA von $\alpha 1(\text{VIII})$ aus Huhn

Der ORF wurde aus cDNA vom Huhn (2.3.17.1) per PCR amplifiziert (2.3.18.2). Mit Hilfe der Primer wurden am 5'-Ende der Sequenz eine *Eco* RI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *Xho* I-Schnittstelle generiert. Nach der PCR folgte eine Agarosegelelektrophorese (2.3.14), die Aufreinigung aus dem Gel (2.3.19.4), ein A-Tailing (2.3.19.5) und eine weitere Aufreinigung. Die cDNA-Sequenz wurde in das Topo-Plasmid kloniert (2.3.6.8), dieses wurde aufgereinigt (2.3.19.3) und zum Sequenzieren (2.3.6.13) eingeschickt.

Der pCMV-Tag-4A-Vektor und das Topo-Plasmid mit dem cDNA-Insert wurden jeweils mit *Eco* RI und *Xho* I für 5 Stunden bei 37°C verdaut (2.3.19.6), aufgereinigt und miteinander ligiert (2.3.19.8). Das fertige Plasmid wurde per Restriktionsverdau und darauf folgender Gelelektrophorese analysiert und konnte zur Transfektion der Hühner-Chondrozyten eingesetzt werden.

#### 2.3.19.2 Klonierung der ORF-cDNA von $\alpha 1(\text{VIII})$ aus Maus

Für die PCR (2.3.18.2) zur Amplifikation der ORF-cDNA wurde das pBluescript II KS mit der cDNA von  $\alpha 1(\text{VIII})$  aus Maus als Insert (freundlicherweise von Dr. U. Hopfer zur Verfügung gestellt) als Templat eingesetzt. Es wurden zwei Konstrukte amplifiziert. Das eine war die ORF-cDNA-Sequenz mit *Dra* I-Schnittstellen am 5' und 3'-Ende. Das zweite Konstrukt wurde mit einem Myc-Tag an seinem 3'-Ende und mit *Dra* I-Schnittstellen synthetisiert.

Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.3.14), aus dem Gel eluiert (2.3.19.4) und es wurde ein A-Tailing durchgeführt (2.3.19.5). Nach dem A-Tailing wurde das Fragment ein weiteres Mal aufgereinigt und in das TOPO-Plasmid kloniert (2.3.6.8). Nach der Vermehrung in *E. coli* wurde das Plasmid zur Sequenzierung eingeschickt (2.3.19.3/2.3.6.13). Für die Klonierung in das Kollagen II-Promotor-Plasmid (Kollagen II Kasette) (freundlicherweise von Herrn Attila Aszodi zur Verfügung gestellt) wurde das

Insert aus dem TOPO-Plasmid mit *Dra* I ausgeschnitten. So entstanden Fragmente der Größe 19 bp, 692 bp, 2000 bp 1175 bp und 2230 bp (ohne Myc-Tag) bzw. 2260bp (mit Myc-Tag). Damit das cDNA-ORF-Fragment gut von dem 2000 bp Fragment unterschieden werden konnte, wurde gleichzeitig auch mit *Bgl* II verdaut, welches das 2000 bp Fragment ein weiteres Mal schnitt. Die Kollagen 2 Kasette wurde mit *Eco* RV verdaut, dephosphoryliert (2.3.19.7) und mit dem cDNA-ORF von  $\alpha 1(\text{VIII})$  ligiert (2.3.19.8).

Nun werden die verschiedenen Schritte der Klonierungen näher vorgestellt. Die TOPO-Klonierung wird unter 2.3.6.8 erklärt.

### **2.3.19.3 Plasmidisolierung mit dem Qiaprep-Spin-Miniprep-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)**

Um Plasmid DNA aus Bakterien zu gewinnen, wurden diese nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979) aufgeschlossen. Für die Plasmid-Aufreinigung wurde das QIAprep-Spin-Miniprep-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die freigesetzte Plasmid-DNA wurde unter einer hohen Salzkonzentration an eine Silikagel-Membran gebunden und mehrfach gewaschen, um die Salze wieder zu entfernen. Nachdem das Ethanol vollständig entfernt war, wurde die Plasmid-DNA mit dH<sub>2</sub>O gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

### **2.3.19.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des QIAquick-Gelextraktion-Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach der Anleitung des Herstellers. Für eine höhere Konzentration der Nukleinsäuren in der Probe wurde nur mit 30  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O eluiert. Das Produkt wurde bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

### **2.3.19.5 A-Tailing**

Für die Klonierung der PCR-Produkte in das TOPO-Plasmid (Invitrogen, USA), zur weiteren Vermehrung und Sequenzierung, benötigten sie Adenosin-Überhänge, die von den Pfu-Enzymen nicht synthetisiert werden. Aus diesem Grunde schloss sich an die Aufreinigung der PCR-Produkte aus dem Gel (siehe 2.3.19.4) noch das A-Tailing an. Dafür wurde eine Taq-Polymerase verwendet, da sie die überstehenden Enden produziert. Hinzu kamen noch dATPs, Enhancer, PCR Puffer und das PCR-Produkt.

Puffer	5 $\mu\text{l}$
Enhancer	1 $\mu\text{l}$
dATP	1 $\mu\text{l}$
Taq-Polymerase	0,5 $\mu\text{l}$
DNA	42,5 $\mu\text{l}$

Der Ansatz wurde für 2 min bei 94°C denaturiert und für 10 min bei 72°C inkubiert.

### 2.3.19.6 Restriktionsverdau von DNA

Für die Überprüfung von Klonierungen und die Restriktion von DNA-Fragmenten aus Plasmiden wurden Restriktionsenzyme verwendet, die DNA an spezifischen, palindromen Sequenzen schneiden. Die Enzyme wurden von NEB (New England Biolabs, Ipswich, USA) erworben und die Puffer nach Angaben des Herstellers verwendet.

Es wurden in 10 µl Restriktionsverdau-Ansatz etwa 0,5-5 µg DNA und 1-2 U Enzym eingesetzt. Je nach Enzym wurde 1-3 Stunden verdaut. Die erhaltenen Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese nach Größe aufgetrennt.

### 2.3.19.7 Dephosphorylierung

Um nach der Spaltung von Vektoren die Religation zu verhindern, wurde das 5' Phosphat mit Calf Intestine Alkaline Phosphatase entfernt. Die Behandlung erfolgte nach Angaben des Herstellers (NEB, USA). Die Denaturierung der Phosphatase erfolgte bei 65°C für 10 min durch 1 µl 20%iges SDS und 10 µl 6-fach Ladepuffer auf einen 50 µl Cip-Ansatz. Es wurde bei Raumtemperatur abgekühlt, auf ein Agarosegel aufgetragen, das Fragment ausgeschnitten und aufgereinigt.

### 2.3.19.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation erfolgte mit der T4 DNA Ligase (NEB, USA) über Nacht bei 16°C. Zu einem 10 µl Ansatz wurde 1 µl Ligase-Puffer (NEB, USA), T4 DNA Ligase und Insert und Vektor im Verhältnis 3:1 pipettiert.

## 2.4. Proteinbiochemische Methoden

Um die späte Differenzierung der Chondrozyten nachzuweisen, wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase (2.4.1) und die Synthese von der  $\alpha$ 1-Kette von Kollagen X biochemisch nachgewiesen, zweier typischer Marker der Hypertrophie von Chondrozyten. Außerdem wurden Western Blots zum immunbiochemischen Nachweis verschiedener Proteine, wie Kollagen VIII und ADAMTS-like, hergestellt.

### 2.4.1 Bestimmung der alkalischen Phosphatase

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase ist ein Indiz für die späte Chondrozyten-differenzierung und wird aus diesem Grund während der Kultivierung beobachtet.

Für die Bestimmung der AP-Aktivität wurde eine modifizierte Methode von Bessey et al. (1946) genutzt. Es wurden jeweils 50 µl des Kulturmediums der Zellen mit 450 µl 0,2% p-Nitrophenylphosphat in 1 M Diethanolamin/ HCl, pH 9,8 bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 500 µl 2 M NaOH/0,2 mM EDTA gestoppt und die Extinktion der Probe bei 405 nm bestimmt.

## 2.4.2 Fällung von Proteinen aus Zellmedium

Für den Nachweis verschiedener Proteine (Kollagen VIII, ADAMTS-like und Kollagen X) im Medium der Chondrozyten, wurden dieses zunächst mit 60%iger Trichloressigsäure (225 µl/ml Medium) und 1%igem Triton (139µl/ml Medium) für mindestens 20 min auf Eis gefällt und dann für 20 min bei 14000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit Ethanol und einmal mit Aceton gewaschen und bei 37°C getrocknet. Es wurde in PBS oder alternativ in Probenpuffer aufgenommen.

### Probenpuffer

SDS	2 % (w/v)
Glycerol	10 %
Tris HCl	60 mM, pH 6,8
Bromphenolblau	0,001 %
Reduktion durch 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol oder 100 mM Dithiothreitol (DTT)	

## 2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentrationen (BCA-Test)

Für den BCA-Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 10 µl Proteinlösung in PBS verwendet. Es gab eine Standardreihe mit bekannter Proteinkonzentration von BSA (0,025 mg/ml bis 0,7 mg/ml). Das BCA-Reagenz wurde aus 50:1 aus BCA-Lösung und Kupfersulfat angesetzt.

Jeweils 200 µl BCA wurden zu den Proteinlösungen und der Standardreihe pipettiert. Die Ansätze wurden für 30 min bei 60°C inkubiert und die Reaktion auf Eis abgestoppt.

Mit einem Photometer wurde dann die Absorption bestimmt und die Konzentration der Proteinlösungen anhand dieser Werte berechnet.

Bei den [<sup>14</sup>C]-Prolin markierten Kollagenen gleicht man die Menge an aufzutragenden Proteinen anhand der Radioaktivität von 2 µl der Probe ab, die mit Hilfe eines Szintillationszählers (siehe 2.3.16.1) und 2 ml Lumasafe<sup>TM</sup> Plus Lumac\*LSC BV (Groningen, Niederlande) bestimmt wurde.

### BCA-Lösung (1l):

Bicinchroninsäure (Na <sub>2</sub> -BCA)	1%, 10g
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	2%, 20g (17,1g, wenn H <sub>2</sub> O frei)
NaOH	0,4%, 4g
(Natriumhydrogencarbonat) NaHCO <sub>3</sub>	0,95%, 9,5g
Na <sub>2</sub> -Tartat	0,16%, 1,6g (1,9 bei Dihydrat)

## 2.4.4 Isolierung von Kollagenen aus Zellkulturmedium

Für den Vergleich der Mengen an Kollagen II und X, Kollagen II wird in den proliferierenden Zellen und Kollagen X in den hypertrophen Zellen synthetisiert, wurden Kollagene aus Zellkulturmedium isoliert.

Das Zellkulturmedium wurde abgenommen (1 ml) und mit 100 µl Pepsinlösung (10 mg/ml in 1M HCL) für 2 Stunden bei RT rotiert. Die Reaktion wurde mit 70 µl 1 M Tris abgestoppt und der pH-Wert wurde mit 1M NaOH auf 7,4 eingestellt.

Die Kollagene wurden dann mit 4,5 M NaCl über Nacht bei 4°C gefällt. Es wurde für 30 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit

300 µl 96%igem Ethanol versetzt und für mindestens 2 Stunden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt. Nach einer weiteren Zentrifugation (30 min, 14000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ ) wurde das Pellet getrocknet und in 70 µl Probenpuffer (siehe 2.4.2) aufgenommen. Diese Präparation von Kollagenen wurde vor allem mit dem Medium der  $^{14}\text{C}$  markierten Proben (2.2.8) durchgeführt.

#### 2.4.5 Isolierung von Kollagen aus Zellen und der umgebenden Matrix

Für die Isolierung von Kollagenen aus Zellen, die in Monolayer kultiviert worden waren, wurden zu etwa 1,5 Millionen Zellen 1,35 ml Essigsäure (0,5 M) 150 µl Pepsin (10 mg/ml in 0,5 M Essigsäure) zugegeben. Der Ansatz wurde für 2 Stunden bei RT rotiert. Es wurde 105 mg NaCl zugegeben (Endkonzentration 1,2 M) und über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  rotiert.

Am nächsten Morgen wurde für 30 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 100 µl Tris (100 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,6) aufgenommen. Dann wurden 300 µl eiskaltes Ethanol zugegeben und kurz gevortext. Die Probe wurde für mindestens 2 Stunden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert und anschließend für 30 min bei 14000 rpm (12 000g) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde in 100 µl  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen und 300 ml eiskaltes Ethanol zupipettiert. Erneut wurde für mindestens 2 Stunden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert und im Anschluss zentrifugiert (30 min, 14000 rpm). Das Pellet wurde getrocknet und in Probenpuffer bzw. in PBS aufgenommen.

Alternativ wurden die Zellen mit TOTEX-Puffer aufgereinigt. Die Zellpellets wurden in 100 µl PBS gewaschen und für 5 min bei 600 g zentrifugiert. Das PBS wurde abgenommen, Totexpuffer mit Protease-Inhibitoren (Complete, Cocktail tablets, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zugegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit einer 20 G-Spritze homogenisiert, für 25 min auf Eis inkubiert und bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 10 min (13000 rpm) zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und es wurde eine TCA-Fällung durchgeführt (2.4.2).

##### TOTEX-Puffer

NaCl	350 mM, 2,04g
HEPES	20 mM, 0,476g
$\text{MgCl}_2$	1 mM, 0,02
EGTA	0,1 mM, 380,4g/mol
EDTA	0,5 mM, 292,2g/mol
Glycerin	20% (v/v), 25,2g
NP40	1%, 10ml der 10%igen Lsg.
in 100 ml $\text{H}_2\text{O}$ , 0,1% Triton, pH 7,9	

#### 2.4.6 Isolierung von Kollagenen aus Agarose

Die Isolierung von Kollagen aus Agarose war umfangreicher als die Isolierung aus Medium, da zunächst die Agarose beseitigt werden musste. Die Kulturschalen wurden einen Tag nach der Markierung mit  $^{14}\text{C}$ -Prolin eingefroren, dann wurde die Agarose in JA 20.1-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Probe wurde für 72 Stunden bei  $4^{\circ}\text{C}$  unter Rühren in 4 ml Pepsinlösung (1 mg/ml Pepsin in 0,2 M NaCl, 0,5 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) inkubiert. Es wurden 500 µl 1 M Tris zugefügt und mit 10 M NaOH auf pH 7 titriert.

Für die Kollagenextraktion wurden 17,5 mg/ml NaCl abgewogen und es wurde über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  unter Rühren inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe für 30 min bei 15000 rpm (Beckmann Coulter, Krefeld, Rotor Ja 20,1, 22550g) und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand

wurde überführt und die Kollagene mit NaCl (200 mg/ml) über Nacht bei 4°C (Rotation) gefällt.

Dann wurde für 45 min bei 18500 rpm (Beckmann Coulter, Krefeld, Rotor Ja 20,1, 34300 g) und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet wurde in 300 µl 0,4 M NaCl in 0,1 M Tris-HCl (pH 7,4) aufgenommen. Es wurden 900 µl 96%iges eiskaltes Ethanol zugefügt und für mindestens 2 Stunden bei -20°C inkubiert. Dann wurde für 30 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert (Beckman, CS-15R) und der Überstand wurde abgenommen. Das Pellet konnte in 70 µl Probenpuffer aufgenommen werden.

#### 2.4.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden mit Acryl-/Bisacrylamid-Gradientengelen (4,5-15%) aufgetrennt. Das Sammelgel hatte eine Konzentration von 4,5% (Laemmli, 1970).

Die Gele, die auf eine Membran geblottet wurden (Western Blot), wurden nicht fixiert und gefärbt, im Gegensatz zu den Gelen, von denen ein Fluorogramm gemacht, oder von denen eine Bande zum Sequenzieren eingeschickt wurde.

##### Sammelgelpuffer (4x)

Tris HCl	0,5 M
SDS	0,4 %
pH 6,8	

##### Trenngelpuffer (4x)

Tris HCl	1,5 M
SDS	0,4 %
pH 8,0	

##### Kammerpuffer

Tris HCl	25 mM
SDS	0,1 %
Glycin	0,2 M

##### SDS-Trenngel

Trenngelpuffer	1x
Acryl/Bisacr.(32:1)	4,5 u.15 (w/v)
TEMED	0,1 % (v/v)
APS	100 µg/ml

##### SDS-Sammelgel

Sammelgelpuffer	1x
Acryl/Bisacr.(32:1)	4,5 % (w/v)
TEMED	0,33 % (v/v)
APS	75 µg/ml

#### 2.4.8 Färbung mit Coomassie Brilliantblau R-250

Für die Färbung mit Coomassie Brilliantblau R-250 wurde das Gel zunächst für 30 min in 50% Methanol (v/v) in 10% (v/v) Essigsäure fixiert und dann für 30 min mit 0,1% (w/v) Coomassie Brilliantblau R-250 in 10% (v/v) Essigsäure und 25% (v/v) Isopropanol gefärbt. Entfärbt wurde es wieder für 30 min mit 50% Methanol (v/v) in 10% (v/v) Essigsäure und anschließend mit 10% (v/v) Methanol in 10% (v/v) Essigsäure, bis das Gel entfärbt war.

Die Nachweisgrenze liegt etwa bei 0,5 µg Protein pro Gelbande.

Die kolloidale Coomassie Färbelösung wurde verwendet, wenn eine Bande zum Sequenzieren geschickt wurde. Es wurde über Nacht gefärbt und am folgenden Tag wurde dreimal 1 Stunde mit bidestilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen.

1 l kolloidale Coomassie Färbelösung:

Coomassie G 250	800 mg (in 10 ml bidest H <sub>2</sub> O lösen)
Ammoniumsulfat	80 g (in 400 ml bidest H <sub>2</sub> O lösen)
Phosphorsäure 85%	16 ml
(die ersten drei Komponenten auf 800 ml auffüllen)	
Methanol	200 ml (direkt vor Gebrauch zugeben)

## 2.4.9 Sequenzierung von Proteinbanden

Die Proteinbanden wurden ausgeschnitten und an das Zentrum für Molekulare Medizin Köln, die Zentrale Bioanalytik (ZBA), geschickt, wo sie sequenziert wurden. Das Ergebnis wurde dann per Mail an unser Institut gesendet. (Informationen gibt es auf der Seite [www.zmmk-bioanalytik@uni-koeln.de](http://www.zmmk-bioanalytik@uni-koeln.de).)

## 2.4.10 Fluorographie

Für die Bestimmung des Verhältnisses zwischen Kollagen II und X wurden die Gele nach der Elektrophorese mit Coomassie gefärbt (siehe 2.4.8), entfärbt und dreimal 20 min in DMSO entwässert. Sie wurden für mindestens 3 Stunden in 20%igem (w/v) Diphenyloxazol in DMSO inkubiert. Dann wurden die Gele gewässert (mind. 45 min) und im Gelrockner (Biorad) getrocknet. Die Röntgenfilme, zur Detektion der Signale, wurden 1-4 Wochen exponiert.

## 2.4.11 Western-Blot und Immundetektion

Nach der Elektrophorese (2.4.7) wurden die Proteine durch Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran (Protran®, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) transferiert (1 mA/cm<sup>2</sup>, also 180 mA und 30 V bei einem großen Gel).

Um zu überprüfen, ob tatsächlich die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde, konnte nun eine Proteinfärbung der Membran vorgenommen werden. Hierzu wurde MemCode™ Reversible Protein Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Nach Entfärbung der Membran wurde diese für 30 min mit Magermilchpulver bei RT blockiert. Dann wurde sie über Nacht mit dem Primäantikörper (1:1000, in TBS-T: Milchpulver 1:1) bei 4°C inkubiert. Dann wurde dreimal für 15 min mit TBS-T gewaschen und schließlich mit dem Sekundäantikörper (POD-konjugiert, 1:25 000 in TBS-T: Milchpulver, 1:1) für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach dreimal 15 min Waschen (TBS-T) wurden die Blots mit ECL-Plus-Reagenz (GE Healthcare, Amersham) bzw. mit Femto-ECL (Super Signal®West Femto Maximum Sensitive Substrat, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) für eine min bzw. fünf min inkubiert. Die Chemilumineszenz wurde auf einem Röntgenfilm festgehalten und mit dem Entwickler Curix 60 der Firma Agfa (Mortsel, Belgien).

Blot-Puffer

Tris HCl	50 mM
Glycin	380 mM
SDS	0,1 (w/v)
Methanol	20 % (v/v)

TBS-T

NaCl	0,15 M
Tris HCl	50 mM, pH 7,4
Tween-20	0,05 % (v/v)

Magermilchpulver

Magermilchpulver	5 % (w/v)
BSA	1 % (w/v) in TBS-T

Primärantikörper

Anti (mouse MAP) Type VIII Kollagen (Gentaur, Belgien)	1:500
Mouse anti-chicken Kollagen Type II monoclonal AB (Chemicon, Millipore, USA)	1:2000
Maus-Anti-chicken Type X Kollagen (Linsemayer, Boston)	1:1000
Anti-Flag® polyclonal (Sigma-Aldrich, USA)	1:1000
Collagen type VIII (Abcam, Großbritannien)	1:500

Sekundärantikörper

Anti Mouse IgG Peroxidase conjugated (Sigma-Aldrich, USA)
Anti goat POD produced in rabbit (Sigma-Aldrich, USA)

## 2.5 Histologische Analyse

Es sollten die Wachstumsfugen der Tibien von der *Col8a1<sup>-/-</sup>/Col8a2<sup>-/-</sup>*-Maus und der Wildtyp-Maus (Bl 6) histologisch miteinander verglichen werden. Dazu wurde eine Alzian-Blau/Sirius-Rot-Färbung und eine immunhistologische Färbung gegen Kollagen X und gegen Kollagen II von Paraffinschnitten durchgeführt. Außerdem sollte die Verteilung des Kollagen VIII-Proteins in der Wachstumsfuge der Wildtyp-Maus nachgewiesen werden. Es wurden Paraffin- und Kryostat-Schnitte verwendet. Auch die ADAMTS-like-Expression sollte auf diese Weise gezeigt werden.

### 2.5.1 Herstellung von Paraffinblöcken und -schnitten

Es wurden Tibien von neugeborenen Mäusen, 15,5 Tage alten und 50 Tage alten Mäusen in Paraffin (Merck, Darmstadt) eingebettet. Vor der Einbettung wurden die Tibien und Femuren fixiert und entkalkt:

Die Mäusebeine wurden, nachdem sie möglichst ganz von Fell, Muskeln und Haut befreit wurden, über Nacht bei 4°C in 4% PFA in PBS (pH 7,4) fixiert.

Um zu Entkalken wurden sie dann gewässert und in einem Entkalker bei 4°C inkubiert. Das Entkalken dauerte mehrere Tage, der Entkalker musste häufig gewechselt werden und durch Einstechen mit einer Nadel wurde getestet, ob die Gewebe vollständig entkalkt waren.

Nach der vollständigen Entkalkung wurden die Proben 24 Stunden bei 4°C gewässert und dann nach folgendem Fließschema behandelt:

Ethanol 50 %	2-6 h, 4 °C
Ethanol 70 %	2-6 h, 4 °C
1. Ethanol 96 %	ü.N., 4 °C
2. Ethanol 96 %	4 h, 4 °C
1. Isopropanol	2-6 h, 4 °C
2. Isopropanol	2-6 h, 4 °C

Falls bis zu diesem Schritt in Eppendorfgefäßen gearbeitet wurde, wurden die Gewebe jetzt eingekapselt. Sie wurden für 24 Stunden bei 60°C in Intermedium (50% Isopropanol/ 50% Paraffin, weich), 12 Stunden in weichem Paraffin und noch mal ü.N. in erneuertem weichen Paraffin inkubiert. Dann wurden sie für 12 Stunden in hartem Paraffin und ü.N. weiter in

hartem Paraffin bei 60°C inkubiert, bevor sie in Paraplast (McCormick, Roth, Karlsruhe) gegossen wurden.

#### Entkalker

EDTA	10 %
Tris/HCl	3 %
in dH <sub>2</sub> O, pH 7,4	

Die Blöckchen wurden mit einem Rotationsmikrotom HM 355 (MICROM Laborgeräte GmbH, Walldorf, Deutschland) bearbeitet und es wurden 5 µm Serienschnitte hergestellt. Die dünnen Schnitte glitten auf einer Wasserrutsche entlang (etwa 20°C) und wurden dann vorsichtig in ein Wasserbad (37°C) für die Glättung der Schnitte zwischengelagert, bevor sie auf einen Objektträger übertragen wurden.

Auf diese Weise konnten Serien von Schnitten hergestellt werden, die außen in der Tibia begannen, dann folgten Schnitte, die weiter innen lagen, und dann kamen wieder die äußeren Teile der anderen Seite der Tibia.

Gelagert wurden die Schnitte und die Blöckchen bei 4°C.

### 2.5.2 Herstellung von Kryostatblöcken und -schnitten

Für die Herstellung von Kryostat-Schnitten wurden zunächst die Tibien von neugeborenen Mäusen in Gewebeeinbettmedium (Neg50 Frozen Section Medium, Richard-Allan Scientific, Waltham, MA) eingebettet und in flüssigen Stickstoff (196°C) schockgefroren. So wurden kleine Blöcke mit wenigen mm Kantenlänge hergestellt, die in dem Kryostaten (Microm Cryo-Star HM 560 MV, Internationale GmbH, Walldorf) bei -20°C gut bearbeitet werden konnten. Die eingebetteten Schnitte wurden bei -80°C gelagert.

Vor dem Schneiden erfolgt keine Fixierung. Die Blöcke wurden auf einen Halter mit Gewebeeinbettmedium für Gefrierschnitte aufgebracht. Bis das Gewebe beim Schneiden erreicht wurde, musste zunächst eine große Menge gefrorenes Einbettmedium entfernt werden. Dann konnten Gewebeschnitte von 3 µm bis 10 µm Dicke angefertigt werden. Die Schnitte wurden vorsichtig auf einen Objektträger aufgezogen und durch die Hand etwas erwärmt, damit sie keine Falten warfen. Mit einem Mikroskop wurde parallel überprüft, an welcher Stelle die Schnitte das Gewebe getroffen hatten.

Die Schnitte wurden bei -80°C bis zur Färbung eingefroren.

Als Positiv-Kontrolle für die immunhistologische Färbung mit dem Kollagen VIII Antikörper (Gentaur, Belgien) wurden von Frau Forsberg gefertigte Kryostat-Schnitte von Nieren aus zwei Monate alten Mäusen verwendet, die auf die gleiche Weise hergestellt worden sind.

### 2.5.3 Färbung von Gewebeschnitten

Die Paraffinschnitte wurden zunächst entparaffiniert. Hierzu wurden sie zunächst für 30 min bei 50°C inkubiert, bevor sie durch eine Reihe, bestehend aus Rotihistol- und Ethanolbädern, gegeben wurden (zweimal Roti®Histol, dreimal Ethanol 96%, einmal 75% und einmal H<sub>2</sub>O, jeweils 10 min). Die Schnitte wurden in PBS (pH 7,4) überführt und mit einem Dako-Pen (Dako, Glostrup, Dänemark) umrandet.

Die Kryostat-Schnitte wurden etwa 50 min bei RT aufgetaut, 10 min bei 4°C in Aceton inkubiert und getrocknet. Dann wurden sie für 10 min in PBS gegeben und mit dem Dako-Pen umrandet.

### 2.5.3.1 Alzian-Blau/Sirius-Rot-Färbung

Um knöcherne Regionen von knorpeligen zu unterscheiden wurden die Paraffinschnitte mit Alzian-Blau und Sirius-Rot gefärbt.

Nach der 10 minütigen Inkubation in PBS wurden die Schnitte 15 mit Weigert`s Hämatoxylin gefärbt. Dann wurden sie mit dest-H<sub>2</sub>O gewaschen und für 10 min mit H<sub>2</sub>O aus dem Hahn beträufelt.

Die Schnitte wurden für drei min in 3%iger Essigsäure (pH 2,5) inkubiert und für 30 min in Alzian-Blau-Lösung gefärbt. Erneut wurden die Schnitte für 10 min mit Leitungswasser beträufelt. Dann wurden die Schnitte für eine Stunde mit Sirius-Rot-Lösung gefärbt und anschließend für 2 min mit 0,01 M HCl gewaschen, um ungebundenen Farbstoff zu entfernen. Die Schnitte wurden durch eine Bäderreihe von steigenden Ethanolkonzentrationen (75 %, dreimal 96%) geführt. Sie wurden zweimal in Roti<sup>®</sup>Histol inkubiert (10 min) und in Entellan eingebettet.

Alzian-Blau-Lösung	1% Alzian-Blau in 3%iger Essigsäure (pH 2,5)
Sirius-Rot-Lösung	0,1% (w/v) in einer an Pikrinsäure (1,2% (w/v)) gesättigten, wässrigen Lösung
Weigert`s Hämatoxylin Lsg.	Lsg A: 1g Hämatoxylin in 100 ml Ethanol lösen Lsg B: 1,16 g EisenIIIchlorid in 99 ml H <sub>2</sub> O und 1 ml 25 %ige Salzsäure Lsg. A und Lsg. B 1:1 mischen

### 2.5.3.2 Immunhistochemische Färbung

#### 2.5.3.2.1 Immun-histochemische bzw. Fluoreszenz-Färbung

Nach dem Entparaffinieren, bzw. der Fixierung der Kroyschnitte, wurden die Schnitte für 60 min mit Hyaluronidase (0,1% in Acetatpuffer, pH 6,0) bei 37°C verdaut. Es wurde dreimal für 5 min in PBS gewaschen.

Im nächsten Schritt wurde die endogene Peroxidase blockiert (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in dest. H<sub>2</sub>O, für 10 min, RT). Dieser Schritt wurde bei den Immunfluoreszenz-Färbungen weggelassen.

Die Schnitte wurden bei 4°C über Nacht blockiert (10% NGS, 5% BSA in PBS), bzw. für 2 Stunden bei 37°C, wenn eine Fluoreszenzfärbung vorgenommen wurde.

Die Schnitte wurden kurz in PBS gewaschen und für eine Stunde bei 37°C mit dem Primäantikörper inkubiert. (Antikörper 1:10, 1:20, 10% Blockierungslösung in PBS).

Es wurde dreimal in PBS gewaschen und der Sekundäantikörper (1:200, 10% Blockierungslösung in PBS) wurde auf die Schnitte pipettiert. Nach einer Stunde Inkubationszeit (37°C, bei Fluoreszenzfärbung RT) wurde erneut mit PBS gewaschen.

Bei der Immunfärbung wurde nun das DAB Substrat (Vektor Laboratories, Kalifornien, USA) nach Angaben des Herstellers gemischt und auf die Schnitte gegeben. Die Farbentwicklung wurde beobachtet und die Reaktion mit dest. H<sub>2</sub>O gestoppt. Die Schnitte wurden für 10 min

mit Leitungswasser gewässert und nach Überführen in die Ethanol und Roti®Histol-Bäder mit Etellan eingedeckelt.

Die Fluoreszenz-Schnitte wurden nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper gewaschen und mit Fluoromount (Southern Biotech, USA) eingedeckelt und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

#### Primäre Antikörper

Anti (mouse MAP) Type VIII Kollagen aus Rabbit (Gentaur, Belgien)  
Collagen type VIII aus Rabbit (Abcam, Großbritannien)  
ADAMTS-like 1 (Punktin), (Acris, Littleton, CO, USA)

#### Sekundärer Antikörper

für Fluoreszenz                      Alexa Fluor® Goat Anti Rabbit (Invitrogen, USA)  
für Immunfärbung                    aus Ziege gegen Rabbit POD (Sigma-Aldrich, USA)  
    aus Ziege gegen Maus POD (Sigma-Aldrich, USA)

#### **2.5.3.2.2 Färbung mit dem DakoCytomation ARK™**

Für die Färbung von der Wachstumsfuge der Maus mit Antikörper, die in Mäusen hergestellt wurden, wurde das DakoCytomation ARK™-Kit verwendet. Hier wird der primäre Antikörper zunächst biotinyliert, so dass Wechselwirkungen auf dem Mausgewebe mit dem zweiten Antikörper vermieden werden können. Nach dem Entparaffinieren, bzw. der Fixierung der Kroyschnitte, wurden die Schnitte für 10 min in Protease XXIV (0,05 % in PBS) verdaut (37°C). Es wurde für dreimal 5 min in PBS gewaschen und dann wurden die Schnitte 90 min mit Hyaluronidase (0,1% in Acetatpuffer, pH 6,0) bei 37°C verdaut. Es wurde erneut dreimal für 5 min in PBS gewaschen.

Im nächsten Schritt wurde die endogene Peroxidase blockiert (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in dest. H<sub>2</sub>O, für 5 min).

Die Schnitte wurden für 5 min gewaschen. An dieser Stelle wurde bei der Färbung mit dem Kollagen II-Antikörper noch ein Pepsinverdau bei 37°C für 10 min eingefügt.

Der primäre Antikörper wurde nach Angaben des Herstellers des Kits (Dako ARK™ Animal research Kit, Peroxidase Mouse) mit dem Biotinylation Reagent und Wasser, und anschließend mit dem Blocking Reagent gemischt und für 15 min bei RT auf den Schnitten inkubiert. Es wurde dreimal für 5 min in PBS gewaschen und der sekundäre Antikörper (Streptavidin-HRP-Gebrauchslösung aus DAKO® ARK) wurde ebenfalls für 15 min bei RT auf die Schnitte gegeben.

Es wurde dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und dann wurde die Substratlösung (DAKO® Liquid Substrate System, 1 Tropfen auf 1 ml) für etwa 10 min auf die Schnitte gegeben. Zwischendurch wurde die Färbung unter einem Mikroskop beobachtet.

Es wurde kurz mit PBS gewaschen, mit Weigert`s Hämatoxylin gefärbt (nur 2-5 sek, dieser Schritt war nicht unbedingt erforderlich) und es wurde 10 min mit Leitungswasser gewässert.

Dann wurden die Schnitte mit dest. H<sub>2</sub>O gespült und entwässert (75 %, 3 x 96 % Ethanol, 2 x Roti®Histol).

Die Schnitte wurden mit Etellan eingedeckelt.

Primäre Antikörper

Mouse-Anti-Human Collagen Type X (Quartett, Berlin)  
Mouse anti-chicken Kollagen Type II monoclonal AB (Chemicon,  
Millipore, USA)

Für die Anfertigung der Immunofluoreszenzschnitte wurde die endogene Peroxidase nicht blockiert und es wurde ein anderer sekundärer Antikörper verwendet. Nach der Inkubation mit dem zweiten AK und dem anschließenden Waschen wurden die Schnitte mit Fluoromount (Southern Biotech, USA) eingedeckelt.

Sekundärer Antikörper

für Fluoreszenz  
für Immunfärbung

Alexa Fluor® Goat Anti Mouse (Invitrogen, USA)  
aus Ziege gegen Maus POD (Sigma-Aldrich, USA)

**2.5.3.3 Verwendete Mikroskope**

Für die Mikroskopie von Zellen und immunhistochemisch oder Fluoreszenz gefärbten Schnitten wurden verschiedene Mikroskope und Programme für die Bildverarbeitung genutzt:

Zeiss Axio Imager 200, Labor Sorokin; Programm: open lab, improvision

Axiovert 100 (Zeiss, Deutschland), Dunkelkammer, 3. Stock, Programm: Axio Vision Version 2.0.5 (Zeiss)

Nikon Eclipse E600 (Nikon, Japan), Programm: PCM 2000 confocal microscope scanning system

Olympus Bx60 (Olympus, Japan), Programm: analysSIS, Soft Imaging System (Olympus, Japan)

### 3. Ergebnisse

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es, Gene zu identifizieren, die in kaudalen und kranialen Chondrozyten des Hühnersternums verschieden stark exprimiert werden. Die Zellen aus dem kaudalen und dem kranialen Teil des Sternums differenzieren unterschiedlich schnell: Erstere sind sogar in der Lage, in Co-Kultur ihre eigene Differenzierung und die der kranialen Zellen zu unterdrücken, wenn diese mit IGF-I oder Insulin induziert worden sind (Böhme et al., 1992).

Erreicht wird die Blockade der Hypertrophie durch lösliche Signalfaktoren der kaudalen Zellen, die, gebunden an Zellrezeptoren der kranialen Zellen, intrazelluläre Signalvermittler in kranialen Zellen in Gang setzen. Es werden Genprodukte gesucht, die in kaudalen Zellen verstärkt exprimiert werden und die Hypertrophie der kranialen Zellen unterdrücken. Aus diesen Grunde wurde eine subtraktive cDNA-Bank nach der Methode der subtraktiven, suppressiven Hybridisierung (siehe 2.3.6) zur Identifikation der in kaudalen Chondrozyten hochregulierten Gene erstellt.

Eine andere Methode, differentiell exprimierte Gene zu identifizieren, ist die Hybridisierung auf einem Gene Array. Die Firma Affymetrix (USA) hat einen Chicken Gene Array mit mehr als 32.000 Transkripten hergestellt. Jeweils drei Gene Arrays wurden mit RNA von kaudalen und kranialen Hühnerchondrozyten hybridisiert (siehe 2.3.7). Die Menge der hybridisierten RNA pro cDNA auf dem Array wurde bestimmt und aus den drei verschiedenen Signalintensitäten der Arrays ein Mittelwert gebildet.

Die gefundenen, unterschiedlich exprimierten Gene wurden tabellarisch erfaßt und einige wurden ausgewählt, um sie weiter zu untersuchen.

Kollagen VIII, ADAMTS-like 1-Protein, Ferritin und die Carboanhydrase gehörten zu den Genen, die molekularbiologisch, immunhistologisch und/oder proteinbiochemisch näher untersucht wurden.

Die Darstellung der Ergebnisse unterteilt sich in verschiedenen Punkte: Sie beginnt mit der Anfertigung einer subtraktiven cDNA-Bank. Dann werden die Ergebnisse der Auswertung des Chicken Gene Arrays vorgestellt.

Es folgt die nähere, funktionelle Analyse einiger in kaudalen und kranialen Chondrozyten als differentiell exprimiert gefundener Gene.

#### 3.1 Anfertigung einer subtraktiven cDNA-Bank

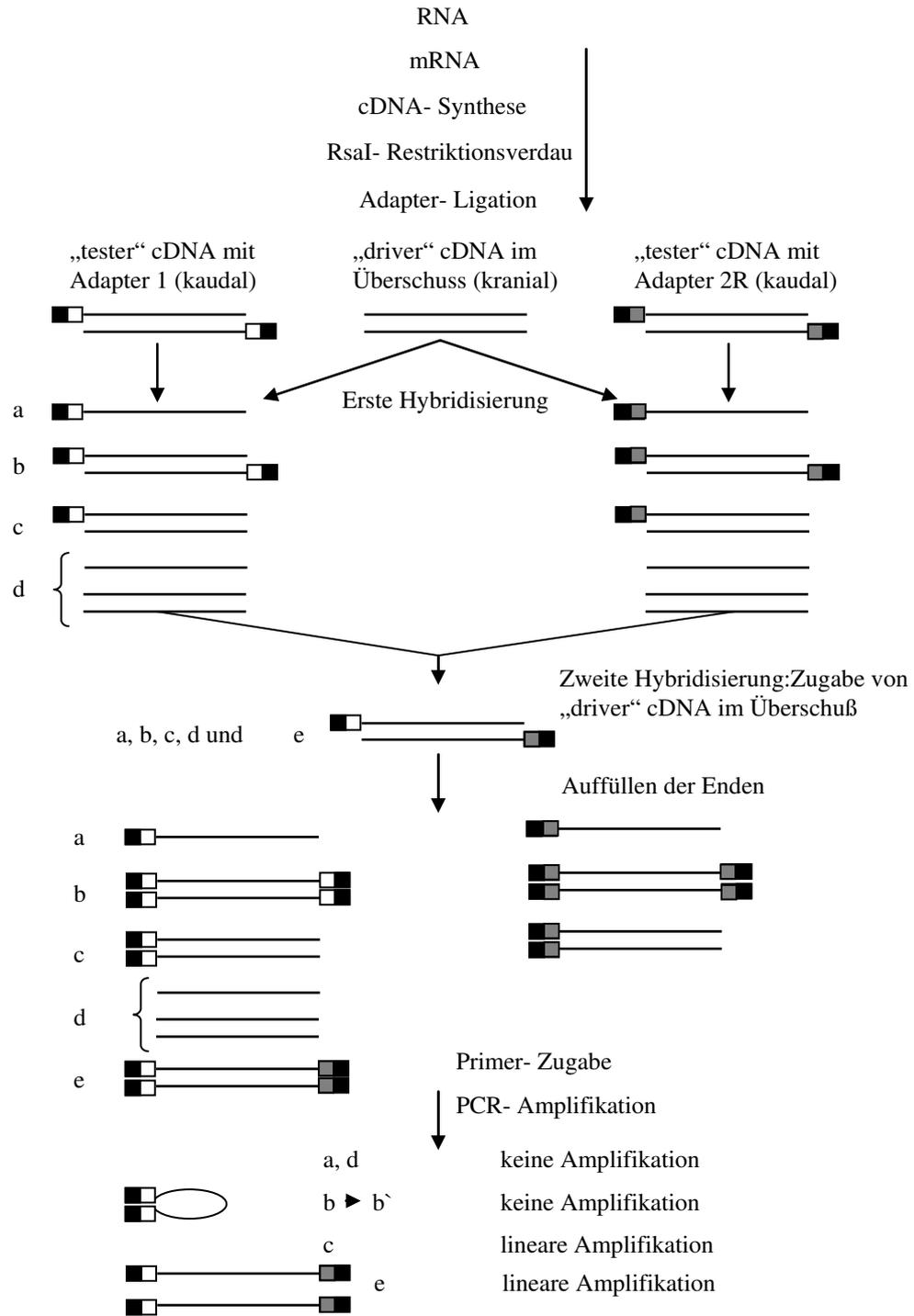
Die suppressive, subtraktive Differenzierung ist eine Methode zur Herstellung von subtraktiven cDNA-Bibliotheken (Diatchenko et al., 1996). Mit ihrer Hilfe können differentiell exprimierte Gene zweier Populationen identifiziert werden. Im Gegensatz zum Differential Display (Liang und Pardee, 1992) und der subtraktiven Hybridisierung können auch schwach differentiell exprimierte Gene entdeckt werden. Dies wird mit einem PCR-Schritt möglich gemacht, der die seltenen Sequenzen anreichert (Diatchenko et al., 1996). Zur Herstellung einer cDNA-Bank durch die SSH werden nur kleine Mengen an RNA für den Start benötigt (Byers et al., 2000). Für die Hybridisierungsschritte ist das Arbeiten mit Radioaktivität überflüssig, nur das Screening zur Identifizierung der isolierten Gene sollte mit radioaktiv markierter cDNA vorgenommen werden (Clontech Bioscience, USA). Es werden durchaus auch Gene als differentiell exprimiert identifiziert, die nicht unterschiedlich exprimiert werden. Diese „falsch Positiven“ können durch Northern Blots, Real-Time-PCR

oder Western Blots erkannt werden (Cao et al., 2004). Mit der SSH können auch Sequenzen von Genen identifiziert werden, die bis dahin völlig unbekannt waren.

In der vorliegenden Arbeit stellen die kaudalen und kranialen Zellen des embryonalen Sternums die zu vergleichenden Populationen dar. Nach der Herstellung der cDNA-Bank wird ein Screening durchgeführt, durch das die verschiedenen stark exprimierten Gene identifiziert werden können.

Die Methode der SSH wird detailliert unter 2.3.6 vorgestellt. Die Abbildung 3.1 zeigt einen schematischen Ablauf der SSH. Hier wird nun noch einmal ganz kurz die Durchführung wiedergegeben: Nach der RNA-Isolierung aus kaudalen und kranialen Zellen, wird die mRNA aufgereinigt, es wird eine Erststrang- und eine Zweitstrang-cDNA-Synthese durchgeführt. Mit dem Restriktionsenzym *Rsa* I wird die cDNA in Fragmente geschnitten und die Adapter 1 bzw. 2R werden an die Fragmente ligiert. Diese sogenannten „tester“-cDNAs werden mit einem Überschuß an „driver“-cDNA hybridisiert. (Es wurde sowohl die forward als auch die reverse Hybridisierung durchgeführt. In einem Ansatz stammte die „tester“-cDNA von den kaudalen Zellen und die „driver“-cDNA von den kranialen Zellen und im zweiten Ansatz ist es umgekehrt.)

In der zweiten Hybridisierung werden die Ansätze mit dem „tester“, der an den Adapter 1 ligiert ist und die Ansätze mit dem „tester“, der an den Adapter 2R ligiert ist, zusammengegeben, zusätzlich zu einem weiteren Überschuß an „driver“-cDNA. Anschließend folgt ein PCR-Schritt, in dem nur die hybridisierten Fragmente, die sowohl einen Adapter 1 als auch Adapter 2R besitzen, amplifiziert werden. In der Vorstellung der Ergebnisse werden die einzelnen Schritte näher erläutert.



**Abbildung 3.1: Schema zur suppressiven, subtraktiven Hybridisierung**

### 3.1.1 RNA-Isolierung

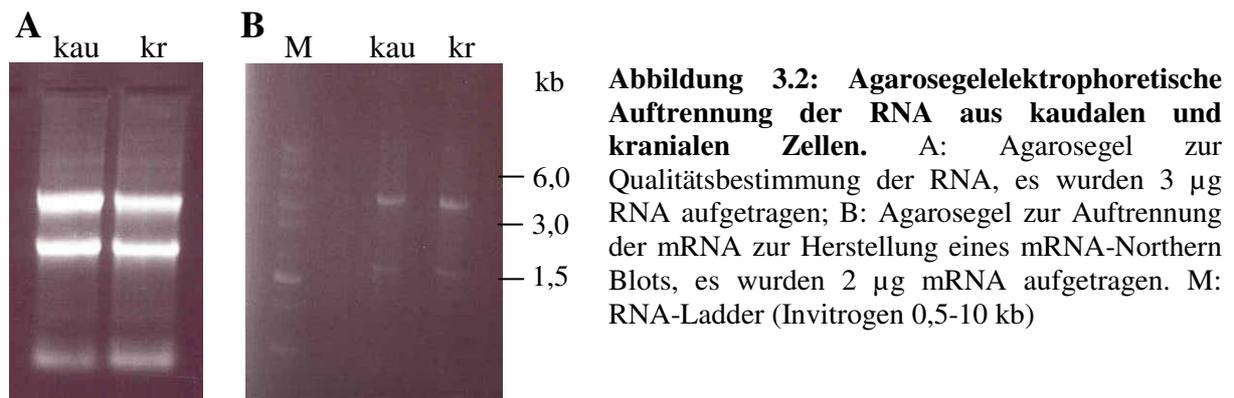
Für die Herstellung einer SSH mußte zunächst RNA aus kaudalen und kranialen Chondrozyten isoliert werden. Dies geschah mit Trizol<sup>®</sup> nach der unter 2.3.8 erläuterten Methode. Für die Isolierung wurde die gleiche Zellzahl an kaudalen und kranialen Zellen verwendet. In Tabelle 3.1 ist die Ausbeute verschiedener Gesamt-RNA-Isolierungen

dargestellt. Trotz Einsatz der gleichen Zellmenge konnte teilweise mehr als doppelt so viel RNA aus kranialen Zellen gewonnen werden, da sie stoffwechselaktiver sind. Aus der Gesamt-RNA konnte im Schnitt 1-2 % mRNA gewonnen werden (siehe 2.3.9).

Versuch	eingesetzte Zellzahl ( $\times 10^6$ )	Ausbeute kaudale RNA ( $\mu\text{g}$ )	Ausbeute kraniale RNA ( $\mu\text{g}$ )
1	112	165,5	599
2	54	117	214,5
3	99	239	329

**Tabelle 3.1: Gesamt-RNA-Ausbeute dargestellt durch die Ergebnisse dreier unabhängiger, repräsentativer RNA-Isolierungen**

Die Reinheit und die Unversehrtheit der isolierten RNA und der aufgereinigten mRNA wurden mittels der Messung der optischen Dichte (siehe 2.3.13) und denaturierender Agarosegelelektrophorese nachgewiesen. Die Abbildung 3.2 zeigt ein Beispiel einer gelelektrophoretischen Auftrennung von RNA (A) und mRNA (B). Hier wurden jeweils 3  $\mu\text{g}$  RNA und 2  $\mu\text{g}$  mRNA auf das Gel aufgetragen.



Für die cDNA- Synthese mittels des PCR-Select-Subtraktions-Kit mußten 0,5-2  $\mu\text{g}$  mRNA eingesetzt werden.

### 3.1.2 Adapterligation

Nach erfolgreicher cDNA- Synthese wurde die cDNA mit *Rsa* I verdaut, so dass im Schnitt etwa 600 bp (Diatchenko *et al.*, 1996) große Fragmente entstanden. An die verdauten cDNA („tester“, forward und reverse) wurden die Adapter 1 bzw. 2R ligiert. Die 5`-Enden der Adapter waren nicht phosphoryliert, so dass sich jeweils nur ein Strang jedes Adapters mit dem 5`-Ende einer cDNA verbinden konnte. Ein Teil der Sequenz der Adapter 1 und 2R sind identisch, damit der Primer 1 in den späteren, für die Vermehrung der differentiell exprimierten Gene notwendigen PCRs, binden konnte.

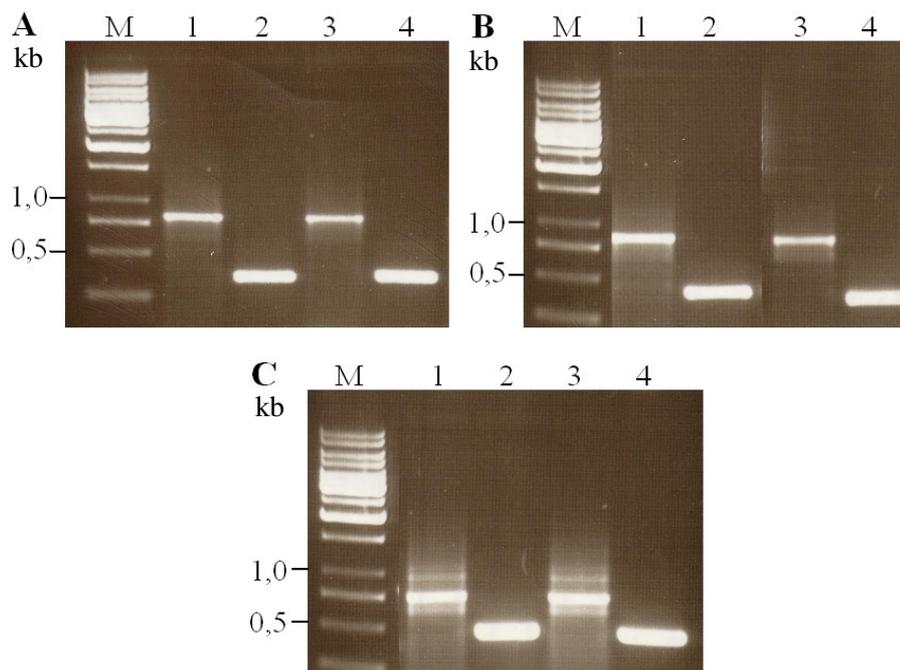
Die „tester“ cDNAs wurden in zwei Hälften geteilt, die eine wurde an Adapter 1 und die andere an Adapter 2R ligiert. Als Negativ-Kontrolle für die Subtraktionsanalyse wurde „tester“-cDNA mit beiden Adaptern ligiert und im weiteren Verlauf nicht voneinander subtrahiert.

Anhand einer PCR wurde überprüft, ob die Ligation erfolgreich verlaufen war. Es wurde eine PCR mit GAPDH Primern (Tabelle 2.3 im Material und Methoden-Teil, die Sequenz durfte keine Schnittstelle für *Rsa I* besitzen) und eine PCR mit dem 3' GAPDH-Primer und Primer 1 aus dem *Select*-Kit, der an ein Sequenzstück der Adapter bindet, durchgeführt. Bei dieser PCR entstand nur ein Produkt, wenn am 5'Ende der cDNAs ein Adapter ligiert worden war. Entsprechend des Templates wurden die GAPDH-Primer spezifisch für das Huhn (Abbildung 3.3 A und B, siehe auch 2.3) bzw. spezifisch für den Menschen (Abbildung 3.3 C, siehe 2.3) gewählt.

Das Produkt der GAPDH3'/Primer 1-PCR sollte nicht weniger als  $\frac{1}{4}$  des Produktes der GAPDH5'/3-PCR betragen, sonst mußte die Ligation als gescheitert betrachtet werden.

Die Abbildung 3.3 zeigt die gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte nach der Ligation. Für die Produkte in A und B wurde für die Banden 1 und 3 je eine Größe von 892 bp erwartet und für die Banden 2 und 4 eine Größe von 365 bp. Für die Produkte in Bande 1 und 3 in C (cDNA aus humaner Skelettmuskulatur) wurde eine Größe von 753 bp erwartet. Die erwarteten Größen stimmten mit den Größen der erhaltenen Banden überein.

Die Banden 2 und 4 dienen jeweils als PCR-Kontrolle und zum Vergleich der Intensitäten der PCR-Produkte, Bande 1 soll mit 2 und 3 soll mit 4 verglichen werden. Die Abbildung 3.3 A zeigt die PCR-Produkte der „tester“-cDNA aus kaudalen Chondrozyten, B zeigt die PCR-Produkte der cDNA aus kranialen Chondrozyten und in Abbildung 3.3 C sieht man die PCR-Produkte der Kontrollreaktion mit cDNA aus humanem Skelettmuskel.



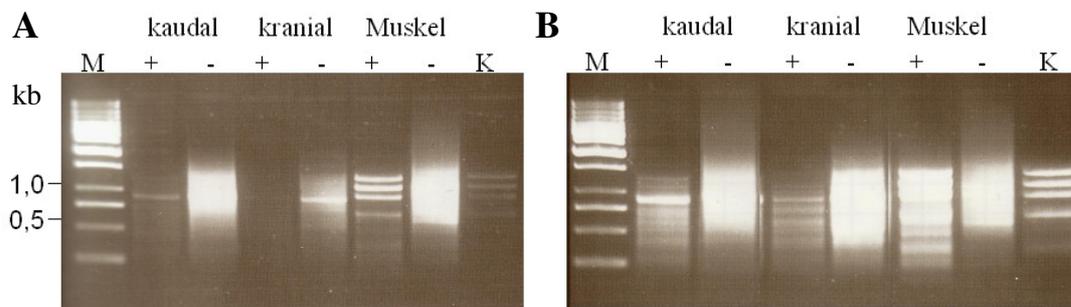
**Abbildung 3.3: Analyse der Ligationseffizienz:** Die Ligation der Adapter wurde per PCR überprüft und die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die cDNA wurde jeweils mit Adapter 1 (Bahn 1 und 2) oder Adapter 2R (Bahn 3 und 4) ligiert. Bei der PCR wurden als Primer der GAPDH 3'Primer und Primer 1 (Bahn 1 und 3) und die GAPDH 3' und 5'Primer (Bahn 2 und 4) eingesetzt. **A:** Als Template diente cDNA kaudaler Zellen. **B:** Hier diente kraniale cDNA als Template. **C:** Als Template diente cDNA aus humaner Skelettmuskulatur, die wie die cDNA aus Hühnerzellen mit Adapter 1 bzw. 2R ligiert worden war. Die GAPDH-Primer wurden homolog zu den Sequenzen des Huhns bzw. des Menschen ausgewählt. M: 1 kb Gene Ruler.

### 3.1.3 Analyse der PCR-Produkte

Nach der Subtraktion der „driver“- von der „tester“-cDNA mittels Hybridisierung mit „driver“-cDNA im Überschuß (siehe Abbildung 3.1), wurden die differentiell exprimierte cDNAs selektiv amplifiziert. Zunächst wurden die fehlenden Stränge der Adapter durch eine Inkubation bei 75°C aufgefüllt, dann wurde eine PCR mit Primer 1 durchgeführt, bei der nur doppelsträngige cDNAs exponentiell vermehrt wurden, die beide Adapter an den 5' und 3' Enden besaßen.

Im Anschluß daran folgte eine nested PCR. Auf diese Weise sollten die differentiell exprimierte cDNAs weiter angereichert und der Hintergrund weiter reduziert werden.

Als Kontrolle für eine erfolgreiche Subtraktion wurde eine „tester“-cDNA aus humanem Skelettmuskel (mit 0,2 % (w/w) *Hae III*- geschnittene  $\Phi$ X174-DNA) mit „driver“-cDNA (nur humane Skelettmuskulatur) hybridisiert. Die stärksten Banden der subtrahierten Probe (Abbildung 3.4 „Muskel“ +) sollten nach Angaben des Herstellers dem Bandenmuster von  $\Phi$ X174-DNA (siehe Abbildung 3.4 „K“) auf dem Agarosegel entsprechen. Das ist besonders nach der ersten PCR (Abbildung 3.4 A) gut zu erkennen. Man kann also den Schluß ziehen, dass die Subtraktion erfolgreich war.



**Abbildung 3.4: Gelelektrophoretische Analyse der Amplifikation:** Per PCR (A) und einer sich anschließenden nested PCR (B) wurden die subtrahierten (+) und nicht subtrahierten (-) cDNAs vermehrt. Als Positivkontrolle (K) wurde erfolgreich subtrahierte  $\Phi$ X174 DNA/*Hae III*-cDNA aus dem Kit eingesetzt. M: Gene Gene Ruler 1 kb.

Die forward und reverse subtrahierte cDNA zeigte sich nach der PCR nicht als distinkte Banden sondern als „Schmier“ in einem Bereich zwischen 0,25 und 1,5 kb. Die nicht subtrahierten Proben waren von höherer Quantität und hochmolekularer als die subtrahierten. Da die parallel durchgeführte Subtraktions-Kontrolle erfolgreich war, wurde auch hier von einer gelungenen Subtraktion ausgegangen.

### 3.1.4 Analyse der subtraktiven Bibliothek durch differentielles Screening

An die Subtraktion schloß sich eine differentielle Analyse der subtraktiven Bibliothek an, da auch unter den vermeintlich differentiell exprimierte cDNAs immer noch Sequenzen vorhanden sein könnten, welche in den kaudalen und kranialen Zellen nicht unterschiedlich stark exprimiert wurden.

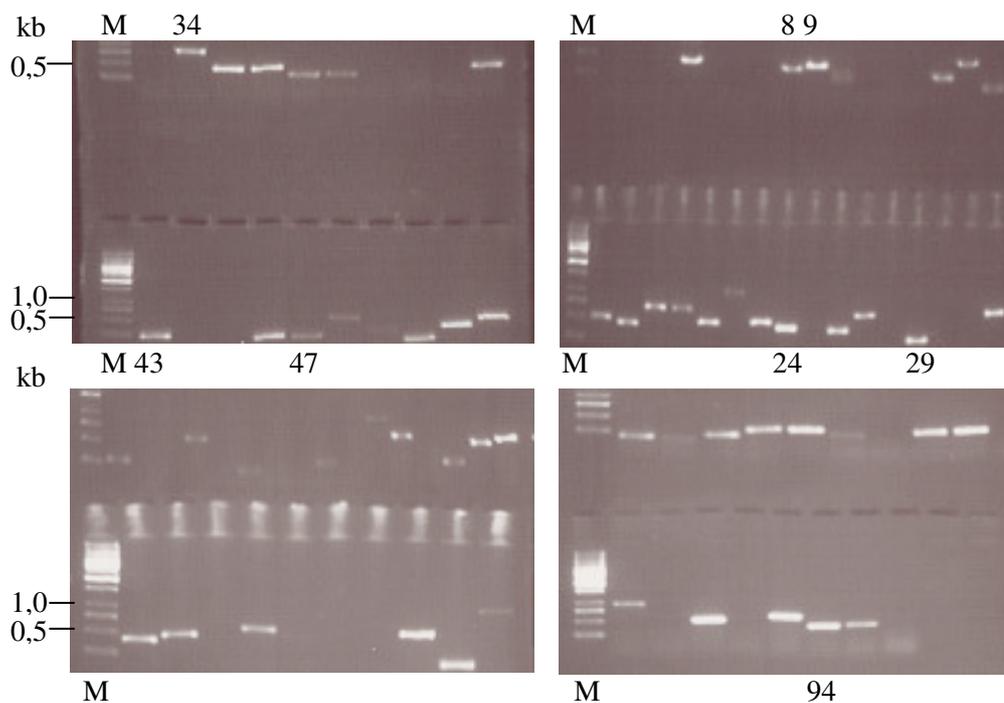
Es wurde sowohl mit der forward subtrahierten cDNA (kaudal = „tester“) als auch mit der reverse subtrahierten cDNA (kranial = „tester“) eine subtraktive Bibliothek hergestellt. Dazu wurden die subtrahierte cDNA in in das T/A-Plasmid des TOPO T/A-Cloning Kits ligiert (siehe 2.3.6.8).

Im weiteren Verlauf sollte bei dem differentiellen Screening der hergestellte Dot Blot mit der forward und mit der reverse subtrahierten cDNA hybridisiert werden, damit die falsch positiven Klone aussortiert werden konnten.

Vor der Klonierung wurde die nested PCR unter leicht veränderten Bedingungen wiederholt. Die Elongation erfolgte bei 72°C und am Ende wurde für 5 min eine zusätzliche Inkubation bei 72°C angefügt.

Vor der Herstellung des Screenings wurden die Klone mittels Bakterienkolonie-PCR auf Inserts getestet. Klone ohne Insert wurden nicht für die Herstellung des Dot Blots verwendet. Die Größe der PCR-Produkte lag zwischen 0,2 kb und 1,5 kb. Die Abbildung 3.5 zeigt Ergebnisse der Bakterienkolonie-PCR mit Templat aus forward subtrahierter cDNA und die Abbildung 3.7 zeigt Ergebnisse der Bakterienkolonie-PCR mit Templat aus reverse subtrahierter cDNA.

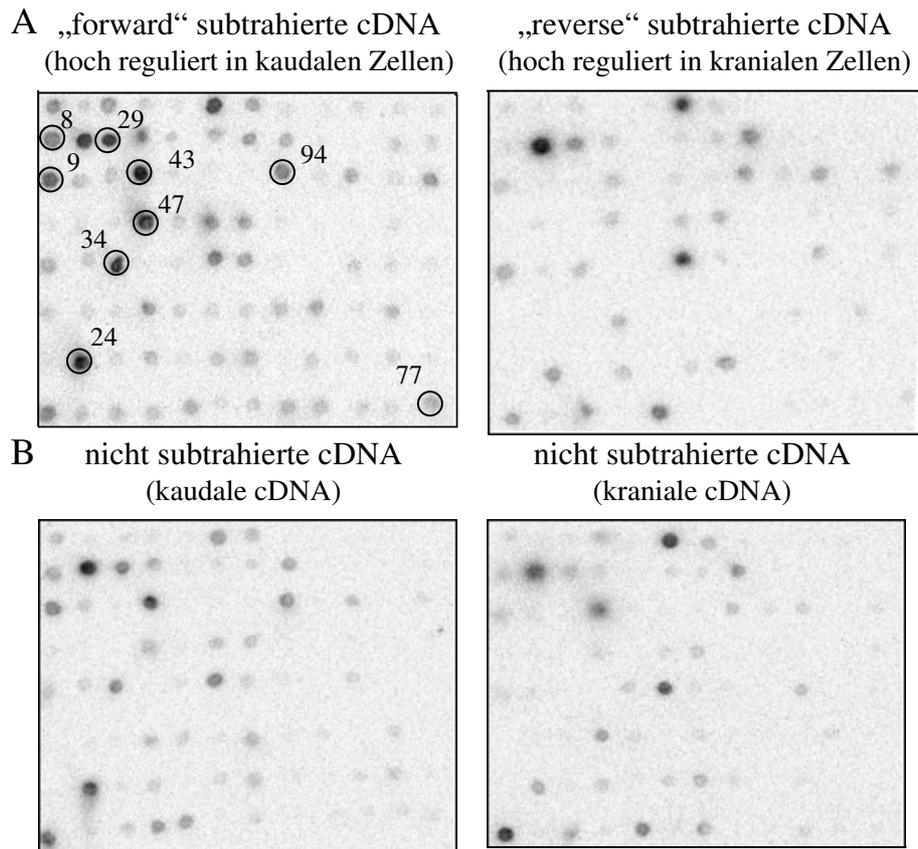
Die Bibliothek wurde durch einen cDNA-Dot Blot hergestellt, indem die Produkte der Kolonie-PCR mit NaOH denaturiert wurde und je 2 µl der Proben auf vier Nylonmembranen (Hybond-XL-Nylonmembran, Amersham Bioscience, Freiburg) aufgetropft wurden. Auf diese Weise wurden 4 identische Dot Blots hergestellt, die mit forward subtrahierter cDNA, reverse subtrahierter cDNA, nicht subtrahierter „tester“-cDNA und nicht subtrahierter driver-cDNA hybridisiert wurden. Diese Sonden wurden mit [<sup>32</sup>P]-dCTP radioaktiv markiert (siehe 2.3.6.11)



**Abbildung 3.5: Gelelektrophorese der Bakterienkolonie-PCR:** Durch Bakterienkolonie-PCR wurden die Klone auf Inserts überprüft. Insgesamt wurden 96 positive Klone zur Anfertigung eines Dot Blots ausgewählt. Für die PCR wurden nested Primer (Tabelle 2.7) verwendet und es wurden 5 µl des Produktes auf einem 1,5%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Ausnahme des Klones 77, der sich auf einem anderen Gel befand, sind die später als differentiell exprimierten gefundenen Klone hier markiert (8, 9, 24, 29, 34, 43, 47 und 94). M:1 kb Gene Gene Ruler

Abbildung 3.6 zeigt die Dot Blots, die aus den Produkten einer Kolonie-PCR mit Templat aus forward subtrahierter cDNA hergestellt worden sind. Der Blot, der mit forward subtrahierter cDNA hybridisiert wurde, zeigte ein ähnliches Hybridisierungsmuster wie der Blot, der mit der nicht subtrahierten „tester“-cDNA hybridisiert wurde.

Die deutlichen Signale standen für cDNA-Sequenzen, die besonders in kaudalen Zellen exprimiert wurden. Der Blot, der mit reverse subtrahierter cDNA hybridisiert wurde, zeigte das gleiche Hybridisierungsmuster, wie der Blot, der mit „driver“-cDNA hybridisiert wurde. cDNA Inserts, welche verstärkt in kaudalen Zellen vorkamen, sollten kein verstärktes Signal in den mit reverse subtrahierter bzw. mit „driver“-cDNA hybridisierten Blots aufweisen. Durch den Blot, der mit „tester“-cDNA hybridisiert wurde, wurden nur cDNA Sequenzen erfaßt, die sehr stark exprimierte Gene in kaudalen Zellen repräsentieren. Erst durch die Hybridisierung mit forward subtrahierter cDNA konnten auch Sequenzen identifiziert werden, die zwar differentiell, jedoch nicht sehr stark, exprimiert wurden.



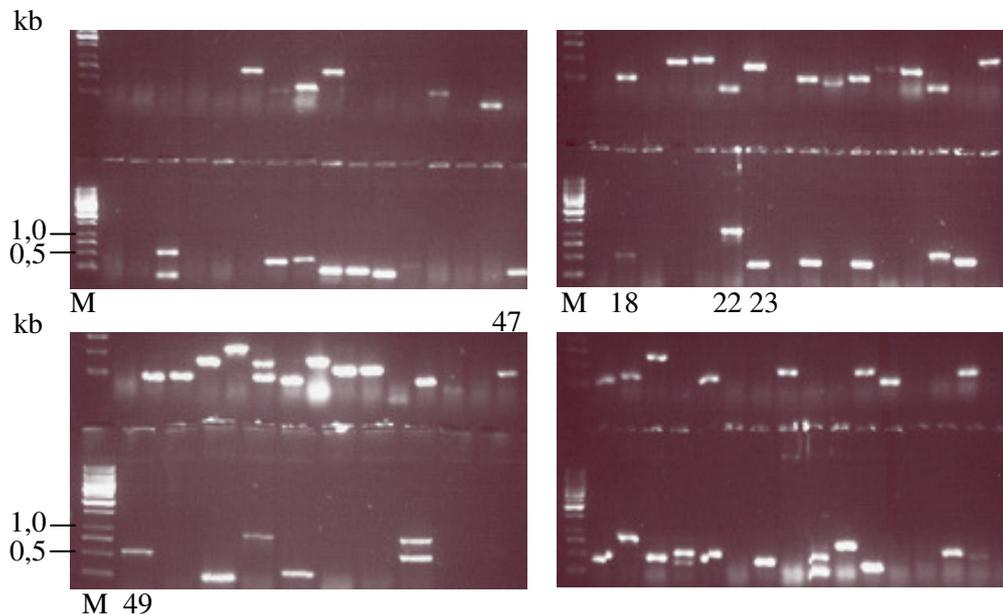
**Abbildung 3.6: Dot Blot der Kolonie- PCR der forward subtrahierten cDNA**

Per Bakterienkolonie-PCR (vergleiche 2.3.6.9) wurden die Inserts der Klone vermehrt, mit NaOH denaturiert und je 2 µl auf eine Nylonmembran getropft. So entstanden 4 identische Nylonmembranen mit 96 verschiedenen PCR- Produkten. Der linke, obere Blot wurde mit [<sup>32</sup>P]-dCTP markierten forward subtrahierter cDNA, der rechte, obere Blot wurde mit reverse subtrahierter cDNA hybridisiert. Der linke, untere Blot wurde mit [<sup>32</sup>P]-dCTP markierter nicht subtrahierter kaudaler, „tester“-cDNA und der rechte, untere Blot mit [<sup>32</sup>P]-dCTP markierter nicht subtrahierter kranialer, „driver“-cDNA hybridisiert.

Die Klone der in der Abbildung 3.6 umkreisten Dots wurden zwecks einer Sequenzierung zu Eurofins-MWG geschickt.

Die Abbildung 3.8 zeigt die Dot Blots, die aus den Produkten einer Kolonie-PCR mit Templat aus reverse subtrahierter cDNA hergestellt worden sind. Ebenso wie in Abbildung 3.5 zeigte der Blot, der mit forward subtrahierter cDNA hybridisiert wurde, ein ähnliches

Hybridisierungsmuster wie der Blot, der mit der nicht subtrahierten „tester“-cDNA hybridisiert wurde.



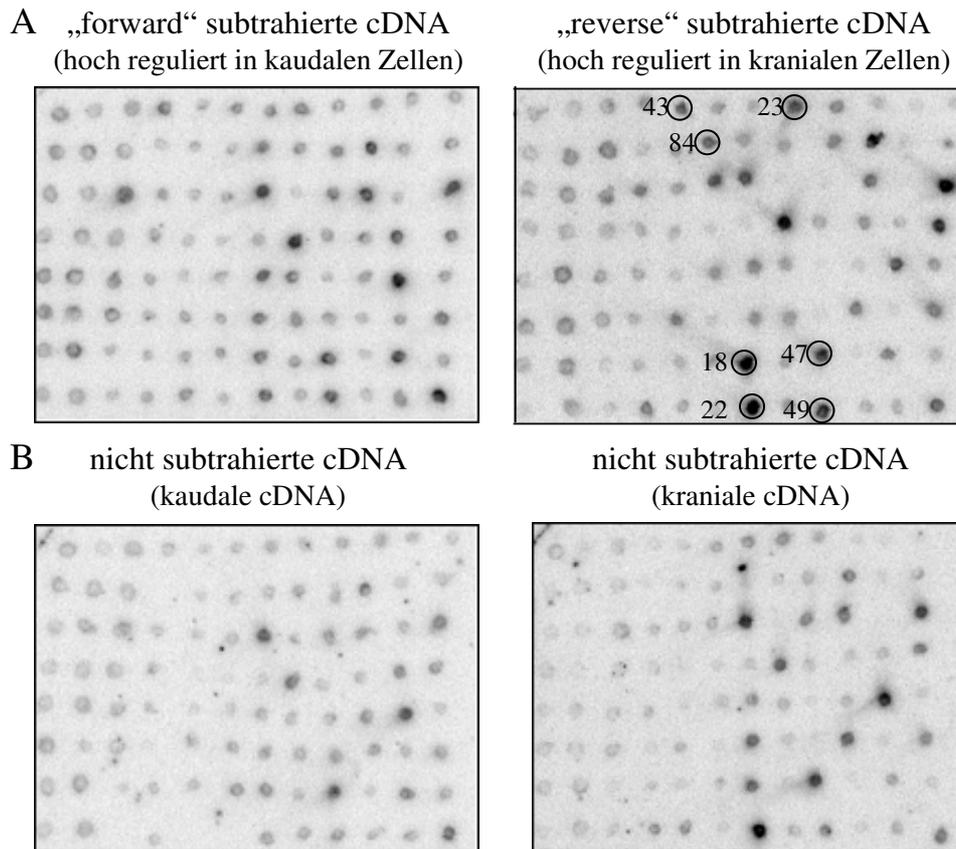
**Abbildung 3.7: Gelelektrophorese der Bakterienkolonie-PCR:** Durch Bakterienkolonie-PCR wurden die Klone auf Inserts überprüft. Insgesamt wurden 96 positive Klone zur Anfertigung eines Dot Blots ausgewählt. Für die PCR wurden nested Primer (Tabelle 2.7) verwendet und es wurden 5 µl des Produktes auf einem 1,5 %igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Ausnahme der Klone 43 und 84, die sich auf einem anderen Gel befanden, sind die später als differentiell exprimierten gefundenen Klone hier markiert (18, 22, 23, 47 und 49). Als Größenstandard wurde der 1kb Gene Gene Ruler verwendet.

Der Blot, der mit reverse subtrahierter cDNA hybridisiert wurde, zeigte das gleiche Hybridisierungsmuster, wie der Blot, der mit „driver“-cDNA hybridisiert wurde. Diese Signale repräsentierten cDNA-Sequenzen, die besonders stark in kranialen Zellen exprimiert wurden.

In diesem Fall sollten cDNA-Inserts, die in kranialen Zellen überexprimiert wurden, kein verstärktes Signal in den mit forward subtrahierter bzw. mit „tester“-cDNA hybridisierten Blots aufweisen.

Durch den Blot, der mit „driver“-cDNA hybridisiert wurde, wurden nur cDNA Sequenzen erfaßt, die sehr stark exprimierte Gene in kranialen Zellen repräsentieren. Erst durch die Hybridisierung mit reverse subtrahierter cDNA konnten auch Sequenzen identifiziert werden, die zwar differentiell, jedoch nicht sehr stark, exprimiert wurden.

Auch bei den Blots mit reverse subtrahierten cDNAs wurden die markierten Dots ausgewählt und die PCR-Produkte wurden sequenziert.



**Abbildung 3.8: Dot Blot der Kolonie-PCR der reverse subtrahierten cDNA**

Per Bakterienkolonie-PCR (vergleiche 2.3.6.9) wurden die Inserts der Klone vermehrt, mit NaOH denaturiert und je 2 µl auf eine Nylonmembran getropft. So entstanden 4 identische Nylonmembranen mit 96 verschiedenen PCR-Produkten. Der linke, obere Blot wurde mit [<sup>32</sup>P]-dCTP markierten forward subtrahierter cDNA, der rechte, obere Blot wurde mit reverse subtrahierter cDNA hybridisiert. Der linke, untere Blot wurde mit [<sup>32</sup>P]-dCTP markierter nicht subtrahierter kaudaler, „tester“-cDNA und der rechte, untere Blot mit [<sup>32</sup>P]-dCTP markierter nicht subtrahierter kranialer, „driver“-cDNA hybridisiert.

### 3.1.5 Ergebnisse der Sequenzierungen

Die ausgewählten Bakterienklone wurden als Übernachtskulturen in LB-Medium mit Ampicillin angezogen und am nächsten Morgen wurde eine Mini-Plasmid-Präp (siehe 2.3.19.3) vorgenommen. Die isolierten Plasmide wurden bei Eurofins MWG sequenziert. Die Sequenzen befinden sich im Anhang dieser Arbeit. Mit Hilfe des Programms BLAST (Altschul et al., 1990) wurden die erhaltenen Sequenzen mit den vorhandenen Sequenzen des Huhns in der Internet-Datenbank (NCBI) verglichen.

Der Abgleich erfolgte Anfang des Jahres 2006.

Es wurden neun Klone der in kaudalen Zellen hochregulierten Gene zum Sequenzieren geschickt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 dargestellt. Sieben Klone der in kranialen Zellen hochregulierten Gene wurden zum Sequenzieren geschickt und diese Ergebnisse sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

**Tabelle 3.2: Ergebnisse der BLAST- Analyse (2006).** Hier sind die Klone dargestellt, die nach der Hybridisierung der Dot Blots in kaudalen Zellen überexprimiert zu sein schienen. Die Spalte „Identität“ zeigt den Grad der Übereinstimmung des sequenzierten Abschnitts mit der gefundenen Sequenz „Homologie zu“.

Klon	Homologie zu	Spezies	Identität
34	cDNA ChEST7m5	<i>Gallus gallus</i>	100 %
8	Ferritin heavy chain Protein	<i>Gallus gallus</i>	100 %
43	Kollagen $\alpha 3$ (VI)	<i>Gallus gallus</i>	100 %
24, 29, 94	Matrix Gla Protein	<i>Gallus gallus</i>	99 %, 100 %, 99 %
77	Cartilage associated protein	<i>Gallus gallus</i>	99 %
47	Osteopontin	<i>Gallus gallus</i>	100 %
9	mitochondriale DNA	<i>Gallus gallus</i>	99 %

**Tabelle 3.3: Ergebnisse der BLAST- Analyse (2006).** Hier sind die Klone dargestellt, die nach der Hybridisierung der Dot Blots in kranialen Zellen überexprimiert zu sein schienen. Die Spalten entsprechen denen der Tabelle 3.2.

Klon	Homologie zu	Spezies	Identität
49	Transkriptionsfaktor crx	<i>Gallus gallus</i>	99 %
84	similar to KIAA protein; Adrenal Gland Protein AD00-5	<i>Gallus gallus</i>	98 %
43	Dermatan Sulfat Proteoglykan 3 oder Proteoglykan Core precursor	<i>Gallus gallus</i>	99 %
22	Matrilin-3- precursor	<i>Gallus gallus</i>	99 %
47	Ubiquitin 52 amino acid fusion protein	<i>Gallus gallus</i>	(98%) sehr kurz
18	ribosomal protein S17	<i>Gallus gallus</i>	99 %
23	similar to ribosomal protein S23	<i>Gallus gallus</i>	100 %

Es wurden sieben verschiedene Gene als in kaudalen Zellen hochreguliert und sieben verschiedene Gene als in kranialen Zellen hochreguliert identifiziert. Das Matrix Gla Protein konnte sogar in drei verschiedenen Klonen gefunden werden. Mit dem Produkt aus der PCR, in der die differentiell exprimierten Gene angereichert wurden, könnten weitere Klonierungen durchgeführt und Dot Blots hergestellt werden. Allerdings wurden mit dem Gene Array (3.2) zunächst genug interessante, differentiell exprimierte Gene identifiziert:

### 3.2 Gene Array

Ein Gene Array ist eine weitere Möglichkeit, die differentielle Expression von Genen aus verschiedenen Zellpopulationen zu analysieren (Carulli et al., 1998). Auf dem Array befinden sich cDNA-Sonden möglicher Kandidatengene, an die die RNA der eigenen Proben hybridisieren kann. Die Quantität der gebundenen RNA wird dann bioinformatisch ausgewertet und mit der Quantität des Signals der zweiten Population verglichen.

Der Vorteil eines Arrays ist, dass sehr viele Gene parallel analysiert werden können. Er ist sehr nützlich, wenn das Expressions-Muster von definierten Genen wie Wachstumsfaktoren, Cytokinen oder Transkriptionsfaktoren untersucht werden soll. Ein großer Nachteil des Gene Array ist, dass nur bekannte Gene als Sonden auf dem Array bereitstehen. Wenn ein neues, unbekanntes Gen eine wesentliche Rolle in der untersuchten Zelle spielt, wird es im Gene Array übersehen (Carulli et al., 1998). Außerdem ist diese Methode sehr teuer (Byers et al., 2000) und nicht sehr sensitiv gegenüber schwach exprimierten Transkripten (Evans et al., 2002).

Als Ausgangsmaterial wird für den Array wie bei der SSH RNA aus den zu vergleichenden Zell- oder Gewebe-Populationen benötigt.

Wie bereits in der Einleitung des Ergebnisteils erwähnt, wurde der Gene Array der Firma Affymetrix, mit mehr als 32.000 Transkripten aus dem Huhn, verwendet. Es wurden jeweils drei Gene Arrays mit RNA aus kaudalen Zellen und drei Gene Arrays mit RNA aus kranialen Zellen hybridisiert. Das Umschreiben der RNA in cDNA und anschließend in rRNA, sowie die Hybridisierung der Gene Array wurde von der IFG, Münster vorgenommen.

Die Analyse der Ergebnisse mit Hilfe spezieller Computerprogramme (Refiner Group Report, Genedata Expressionist Refiner Pro 3.0.7.) wurde von Herrn. Dr. Martin Eisenacher (IFG, Münster) und Frau Dr. Sylvia Merk (Bioinformatik, Münster) durchgeführt. In dieser Arbeit werden die Ergebnisse von Frau Sylvia Merk tabellarisch dargestellt.

Für die Auswertung wurden nur Sequenzen herangezogen, wo jeweils bei allen 3 Gene Arrays eine Hybridisierung stattgefunden hatte, da eine statistische Auswertung ein Minimum von drei Meßwerten verlangt. Auf diese Weise konnten für die Gene, die in kaudalen Zellen hochreguliert wurden, 22 signifikant hochregulierte Sequenzen gefunden werden (siehe Tabelle 3.4), und für die Gene, die in kranialen hochreguliert waren, wurden 28 Sequenzen gefunden (siehe Tabelle 3.5). Aufgeführt sind die Mittelwerte der Expressionsstärke von jeweils drei Arrays, der Unterschied in der Expressionsstärke zwischen kaudalen und kranialen Zellen, die Bezeichnung der Sonde durch Affymetrix und der Name des entsprechenden Gens.

In Abbildung 3.9 ist der Arbeitsverlauf bei der Hybridisierung des Gene Arrays schematisch dargestellt. Zunächst wurde die RNA aus kaudalen und kranialen Zellen isoliert und aufgereinigt (siehe 2.3.8 und 2.3.10). Dann folgte eine Erststrang und eine Zweitstrang cDNA-Synthese und die doppelsträngige cDNA wurde aufgereinigt. In einer in vitro Transkription wurde cRNA hergestellt und mit Biotin, das an Uracil gebunden war, gelabelt. Die cRNA wurde aufgereinigt, fragmentiert und mit den Gene Arrays hybridisiert. Nach dem Waschen und der Färbung durch einen Streptavidin-Phycoerythrin biotinylierten Anti-Streptavidin Antikörper wurde der Array mit dem Computer ausgewertet.

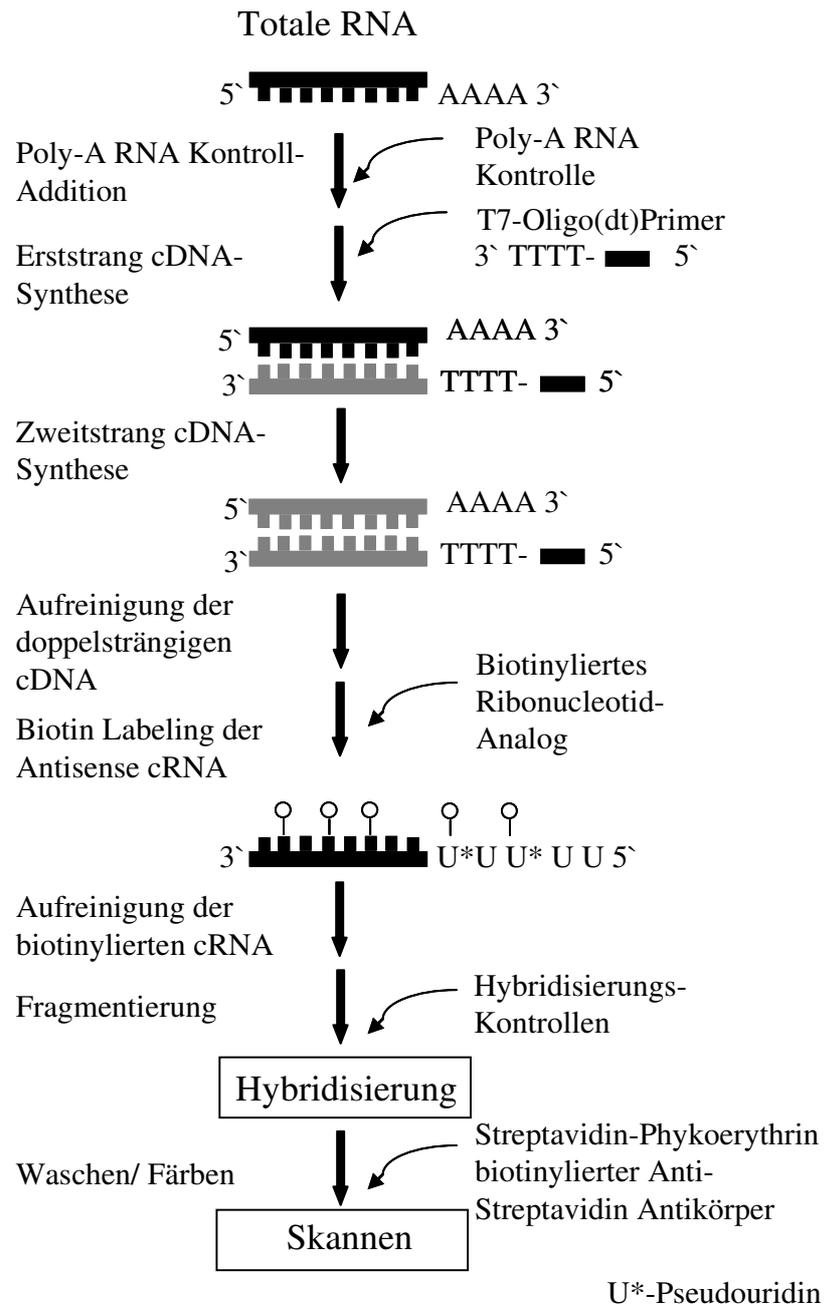


Abbildung 3.9: Schema zur Hybridisierung des Amaxa-Chicken Gene Arrays.

**Tabelle 3.4: Ergebnisse der Gene-Array-Auswertung.** Es werden die Gene, die in kaudalen Zellen verstärkt exprimiert werden, dargestellt. Die Mittelwerte der Expressionslevel der kaudalen und kranialen Zellen wurde aus den Daten der Auswertung von drei verschiedenen Gene-Arrays gebildet. Für diese Tabelle wurden nur die eindeutigen Daten verwendet, für die jeweils alle drei Arrays herangezogen werden konnten. Die Spalte „Name“ bezieht sich auf das Gen, aus dem die Sequenz für die Sonde gewählt wurde, und die Angaben sind der Datenbank NCBI entnommen worden.

Sondenname	MW der Expression in kau	MW der Expression in kr	Unterschied in Expressionsstärke	Name
Gga.4083.1.S1_at	116,355834	39,8887709	2,917	Homeodomain I Protein
GgaAffx.3519.1.S1_at	76,2197271	24,3577014	3,129	Similar to hypothetical protein
Gga.4725.1.S1_at	370,1022081	238,6954219	1,551	Finished cDNA clone ChEST19h15
GgaAffx.10229.2.S1_s_at	492,8563999	293,8627025	1,677	Similar to Single minded
Gga.8371.1.S1_s_at	1101,712118	537,3557929	2,05	Adiponectin receptor 2
Gga.13168.1.S1_at	88,68095371	44,64389822	1,986	Finished cDNA clone ChEST128e8
Gga.7798.1.S1_at	205,2077061	161,9601154	1,267	Protein inhibitor of activated STAT, 2
Gga.14504.1.S1_at	846,9315392	103,8125268	8,158	ADAMTS-like 1
GgaAffx.11923.1.S1_at	1196,015367	387,6500181	3,085	similar to N-acyl-phosphatidylethanolamine hydrolyzing phospholipase D
GgaAffx.9478.1.S1_s_at	69,11777755	29,88883669	2,312	similar to Rho-guanine nucleotide exchange factor
GgaAffx.4087.1.S1_at	48,37794202	36,65873616	1,32	similar to DNaj homolog subfamily B 11 precursor
Gga.15116.1.S1_at	181,9717653	83,88534696	2,169	similar to hypothetical protein FLJ19324
Gga.1980.1.S1_s_at	1446,567998	452,405912	3,198	Thrombospondin-4
Gga.15253.1.S1_at	292,4729013	71,65526152	4,082	cDNA clone 804i22
GgaAffx.11543.1.S1_s_at	401,6740506	176,1465317	2,280	similar to glycogen phosphorylase, brain form
GgaAffx.11375.1.S1_at	1884,202608	1031,553442	1,827	metastasis professor
Gga.3013.1.S1_at	6239,782813	3142,31561	1,986	cDNA clone EST7m5, near to collagen $\alpha$ 1(VIII)
GgaAffx.20632.1.S1_at	361,5444878	172,2182396	2,099	finished cDNA clone ChEST707e22
Gga.17138.1.S1_at	1048,435968	575,4426052	1,822	finished cDNA clone ChEST270f1
Gga.1330.1.S1_s_at	330,4030204	178,2210915	1,854	Laminin gamma 1
GgaAffx.20942.1.S1_s_at	519,6525802	229,4179589	2,265	finished cDNA clone ChEST840d13
Gga.12307.2.S1_a_at	192,53031	56,73712097	3,393	sorbin und SH3 domain containing2

**Tabelle 3.5: Ergebnisse der Gene-Array-Auswertung.** Es werden die Gene, die in kranialen Zellen verstärkt exprimiert werden, dargestellt. Die Mittelwerte der Expressionslevel der kaudalen und kranialen Zellen wurde aus den Daten der Auswertung von drei verschiedenen Gene-Arrays gebildet. Für diese Tabelle wurden nur die eindeutigen Daten verwendet, für die jeweils alle drei Arrays herangezogen werden konnten. Die Spalte „Name“ bezieht sich auf das Gen, aus dem die Sequenz für die Sonde gewählt wurde, und die Angaben sind der Datenbank NCBI entnommen worden.

Sondenname	MW der Expression in kau	MW der Expression in kr	Unterschied in Expressionsstärke	Name
Gga.3994.1.A1_s_at	3783,768648	8509,607054	2,249	Fibronectin 1
Gga.14068.1.S1_at	37,29450783	181,4478224	4,865	DEP domain containing 6
Gga.3986.2.S1_a_at	22,11784468	879,5295758	39,766	carbonicanhydrase II
Gga.16401.1.S1_at	30,00581122	224,0155321	7,466	Interleukin 13 receptor 2
Gga.12309.1.S1_at	72,9220206	154,730881	2,122	apoptosis inducing factor, mitochondrion-associated 2
Gga.2884.1.S1_at	42,97192278	86,02129689	2,002	finished cDNA clone ChEST583n1
Gga.5439.1.S1_at	102,8524958	275,7812977	2,681	finished cDNA clone ChEST855116
Gga.14338.1.S1_at	90,8593904	381,2999114	4,197	fibroblast growth factor receptor 2
GgaAffx.8804.1.S1_at	12,8129221	53,59549965	4,183	similar to KIAA 1135 protein, zinc ion binding
Gga.9293.1.S1_at	1809,162851	5445,698669	3,010	fibronectin 1
Gga.1158.3.S1_a_at	15,61433364	143,1775935	9,17	odd homebox 1 protein
Gga.7890.1.S1_at	11,97784373	156,4837777	13,064	similar to secreted frizzled- related protein 4
Gga.12552.1.S1_at	174,2941802	959,7620304	5,507	transcribed loccus
GgaAffx.6715.1.S1_s_at	11,18005372	52,05849273	4,656	similar to Ptpn21 protein
Gga.4731.3.S1_at	15,84423357	40,50939587	2,557	syndecan binding protein
Gga.13483.1.S1_at	26,08728235	53,0719463	2,035	Semaphorin 7AGPI Membran anchor
Gga.6223.1.S1_at	32,26194211	62,20645614	1,928	ADAM metallopeptidase domain33
Gga.4384.1.S1_at	50,59869227	173,7597628	3,434	baculoviral IAP repeat containing 2
Gga.3587.1.S1_s_at	1135,660424	4586,447557	4,039	Matrilin 3
GgaAffx.20941.1.S1_s_at	14,49615551	39,01572953	2,691	diacylglycerol kinase, delta 130 kDa
GgaAffx.5299.1.S1_s_at	61,52694303	94,57493063	1,537	interleukin-1 receptor associated kinase 2
GgaAffx.11711.1.S1_s_at	23,20062926	194,6435896	8,39	synaptosomal associated protein 91 kDa homolog

Gga.8069.1.S1_at	75,89114115	117,3100483	1,546	similar to N-acetyl glucosaminyltransferase IVb
GgaAffx.20887.1.S1_at	305,2520067	479,3384297	1,57	zyxin
Gga.70.1.S1_at	294,4498213	980,571333	3,33	bagpipe homeobox homolog 1
Gga.2770.2.S1_s_at	79,95967397	146,7646178	1,835	similar to protein C18orf1
Gga.12557.1.S1_at	8,71301008	21,53509255	2,472	similar to TMEF2
Gga.226.1.S1_at	265,4691544	1770,750434	6,670	coagulation factor XIII, A1 Polypeptide

Der Vergleich der Gene, die mittels der SSH als in kaudalen und kranialen Chondrozyten differentiell exprimiert gefunden wurden mit den Genen, die durch den Gene Array als unterschiedlich exprimiert identifiziert wurden, ergab folgendes:

Für die Klone 24, 29, 94, 47 und 9 aus der Tabelle 3.2 wurden in der Auswertung des Gene Arrays keine Vergleichswerte gefunden, entweder weil jeweils nicht alle drei Gene Arrays ausgewertet werden konnten, oder weil keine Sonde für das betreffende Gen vorhanden war. Für die Klone 43 und 77 ergab sich für kaudale und kraniale Chondrozyten eine identische Expression, für den Klon 8 ergab sich eine leicht stärkere (Faktor 1,24) Expression für die kranialen Zellen und für Klon 34 ergab sich eine deutlich stärkere Expression in den kaudalen Zellen (Faktor 2,2) in den Ergebnissen des Gene Arrays.

Bei den Klonen, die für die Gene stehen, die in kranialen Chondrozyten hochreguliert erscheinen (Tabelle 3.3), ergab sich folgendes:

Für die Klone 18 und 47 wurden keine Vergleichswerte in den Ergebnissen des Gene Arrays gefunden. Der Klon 22 ist in den Ergebnissen des Gene Arrays etwa fünffach stärker in kranialen Zellen exprimiert. Die Gene der Klone 49 und 43 wurden im Gene Array zweifach stärker in kranialen Chondrozyten gefunden, Klon 23 etwa 1,35-fach stärker in kranialen und Klon 84 etwa 1,5-fach stärker.

Die Ergebnisse zeigen, dass die reverse Reaktion der SSH mit der kranialen RNA als „tester“ zuverlässiger funktioniert hat.

Die Auswertung wurde anhand einer Tabelle mit allen erfaßten Daten der Gene Arrays vorgenommen, die von Dr. Martin Eisenacher stammte.

### 3.3 Analyse einiger differentiell exprimierter Gene

#### 3.3.1 Vergleich der Expression ausgewählter Gene in kaudalen und kranialen Chondrozyten durch Northern Blots

Um die Ergebnisse zur Expressionsstärke bestimmter Gene, die in der SSH bzw. im Gene Array gefunden wurden, zu bestätigen, wurden Northern Blots mit spezifischen Sonden hybridisiert.

##### 3.3.1.1 Herstellung der Sonden zur Hybridisierung von Northern Blots

Die Kriterien zur Auswahl von Genen, welche in der SSH bzw. im Gene Array gefunden wurden, und die weiter untersucht werden sollten, waren unterschiedlich.

Der Est-Klon Chest 7m5 wurde sowohl in der SSH als auch in dem Gene Array als hochreguliert in kaudalen Zellen detektiert. Da der Klon nach Angaben von BLAST in

unmittelbarer Nähe des *Col8a1* Gens lag, von dem die Funktion noch lange nicht verstanden ist, wurde es als ein Ziel-Gen ausgewählt. Seit dem 16. November 2006 findet man bei Blast die Est-Sequenz zusammengefaßt mit der Sequenz von  $\alpha 1$ (VIII) als 4138 bp lange mRNA. Der ORF von *Col8a1* aus Huhn hat die Größe von 2220 bp.

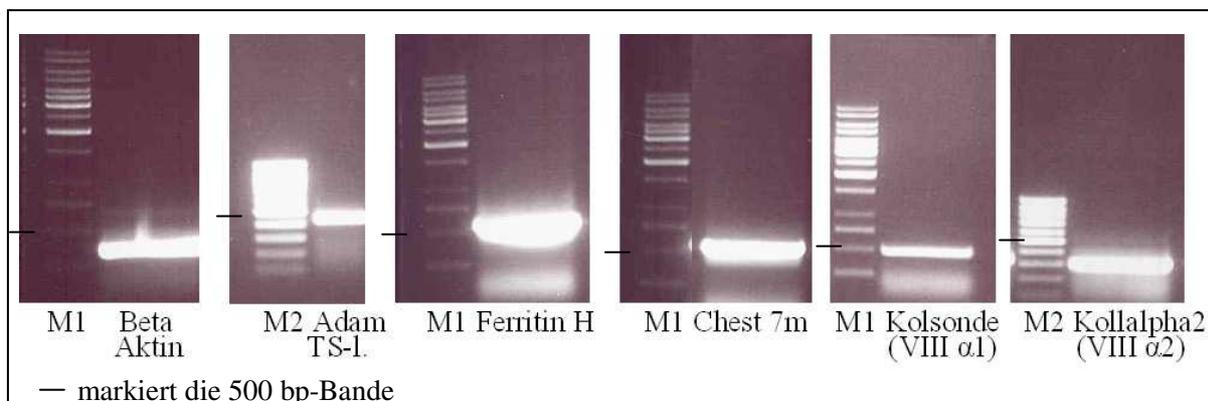
Da zwei verschiedene Ketten von Kollagen VIII existieren ( $\alpha 1$  und  $\alpha 2$ ) und nicht ausgeschlossen werden kann, dass sie Heterotrimere bilden (Greenhill et al., 2000, Illidge et al., 1998), wurde auch eine Sonde für die  $\alpha 2$ -mRNA von Kollagen VIII hergestellt. Zusätzlich zu der Est-Sonde wurde eine  $\alpha 1$ (VIII)-Sonde amplifiziert, deren Sequenz innerhalb des ORF liegt, der die  $\alpha 1$ (VIII)-Kette kodiert („Kolsonde“).

Das ADAMTS-like 1 Protein wurde mittels des Gene Array als mehr als achtmal hochreguliert in kaudalen Zellen gefunden. Da verschiedene ADAMTS-Proteine (A Disintegrin And Metalloproteinase) eine wichtige Rolle in der Regulation der späten Chondrozytenreifung spielen, wurde auch das ADAMTS-like 1 Protein, dessen Funktion bis jetzt unbekannt ist, für eine weitere Untersuchung ausgewählt.

Auch die Expression von Ferritin heavy chain Protein wurde mittels der Hybridisierung eines Northern Blots untersucht.

Zum Abgleich der RNA Menge auf dem Blot zwischen kaudalen und kranialen Zellen wurde eine Hybridisierung mit Beta aktin vorgenommen, das als sogenanntes Housekeeping Gen in beiden Zelltypen gleich exprimiert werden sollte.

Die Sonden wurden per PCR hergestellt, aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt (siehe 2.3.19.4) und mit [<sup>32</sup>P]dCTP markiert (siehe 2.3.16.1). In der Abbildung 3.10 sind die verschiedenen Sonden, amplifiziert per PCR und Agarose-gelelektrophoretisch aufgetrennt, zu sehen.

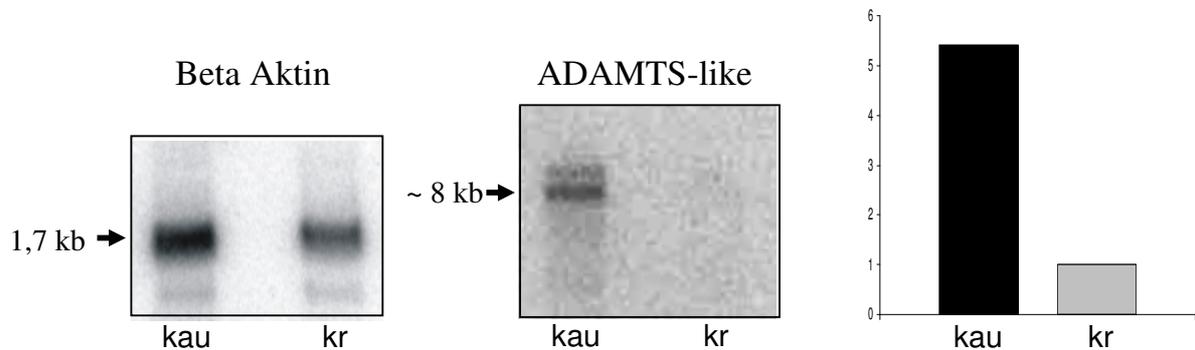


**Abbildung 3.10: Agarosegelelektrophoretische Auftrennung der PCR zur Herstellung von Sonden für die Hybridisierung mit Northern Blots.** Die dargestellten PCR-Produkte wurden aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (siehe 2.3.19.4). A: Beta aktin- Sonde (353 bp\*), B: ADAMTS-like 1-Sonde (435 bp\*), C: Ferritin-Sonde (582 bp\*), D: EST 7m5-Sonde (583bp\*), E:  $\alpha 1$ (VIII)-Sonde (575 bp\*) (Zielsequenz liegt im ORF der  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA), F:  $\alpha 2$ (VIII)-Sonde (308 bp\*), M1: 1 kb Gene Ruler, M2: 100 bp Ladder, \*=erwartete Größe der Sonden

### 3.3.1.2 Hybridisierung der Northern Blots

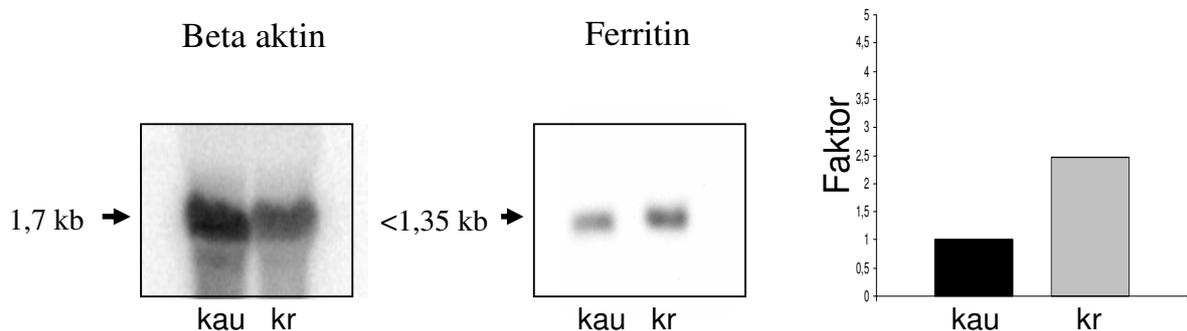
Die Abbildung 3.11 zeigt einen mRNA-Northern Blot, hybridisiert mit Beta aktin und ADAMTS-like 1 zur Analyse der Expression von ADAMTS-like 1 in kaudalen und kranialen Zellen. Mit Hilfe von Image Quant wurde die Expressionsstärke auf Beta aktin abgeglichen, so dass für ADAMTS-like 1 eine Erhöhung der Expression in kaudalen Zellen gegenüber kranialen um 5,4-fach (Gene Array: mehr als acht mal stärker in kaudalen Zellen als in kranialen) nachgewiesen werden konnte. Die beiden Northern Blots mit Gesamt-RNA wurden

nicht in eine Statistik aufgenommen, da das Sondensignal insgesamt zu schwach war, um es mit Image Quant TM auszuwerten. Es war jedoch deutlich zu erkennen, dass ADAMTS-like 1 in kaudalen Zellen stärker exprimiert war, als in kranialen Zellen.



**Abbildung 3.11: Northern Blot-Analyse der Expression von ADAMTS-like 1.** Es wurden je 2 µg mRNA von kaudalen und kranialen Zellen gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran geblottet, denaturiert und mit einer [<sup>32</sup>P]-markierten Sonde hybridisiert. Nach der Hybridisierung mit der Beta aktin-Sonde wurde der Blot gestrippt und mit einer ADAMTS-like 1-Sonde hybridisiert. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung. Die Werte wurden auf Beta aktin genormt. Die Auswertung mit Image Quant TM (Amersham Bioscience, USA) brachte das Ergebnis, dass ADAMTS-like 1 in kaudalen Zellen 5,4 mal stärker exprimiert wurde.

Abbildung 3.12 zeigt einen Northern Blot zur Analyse der Expression von Ferritin in kaudalen und kranialen Zellen. Es wurde zunächst mit einer DIG markierten Beta aktin und nach Strippen mit einer DIG markierten Ferritin Sonde hybridisiert. Der Abgleich mit Image Quant TM erfolgte auf Beta aktin. Das Ergebnis, ein Mittelwert der Signalstärke von zwei Northern Blots (1.Blot: kranial: 1,4-fach mehr als in kaudal; 2.Blot kranial 2,46-fach mehr als in kaudal), zeigte, dass Ferritin etwa 1,95 mal stärker in kranialen Zellen exprimiert wird, was dem Ergebnis aus der SSH widerspricht. Das zeigt, dass die Überprüfung der Expression, der in der SSH in kaudalen Zellen als hochreguliert gefundene Gene, mittels Northern Blot Hybridisierung durchaus sinnvoll war.

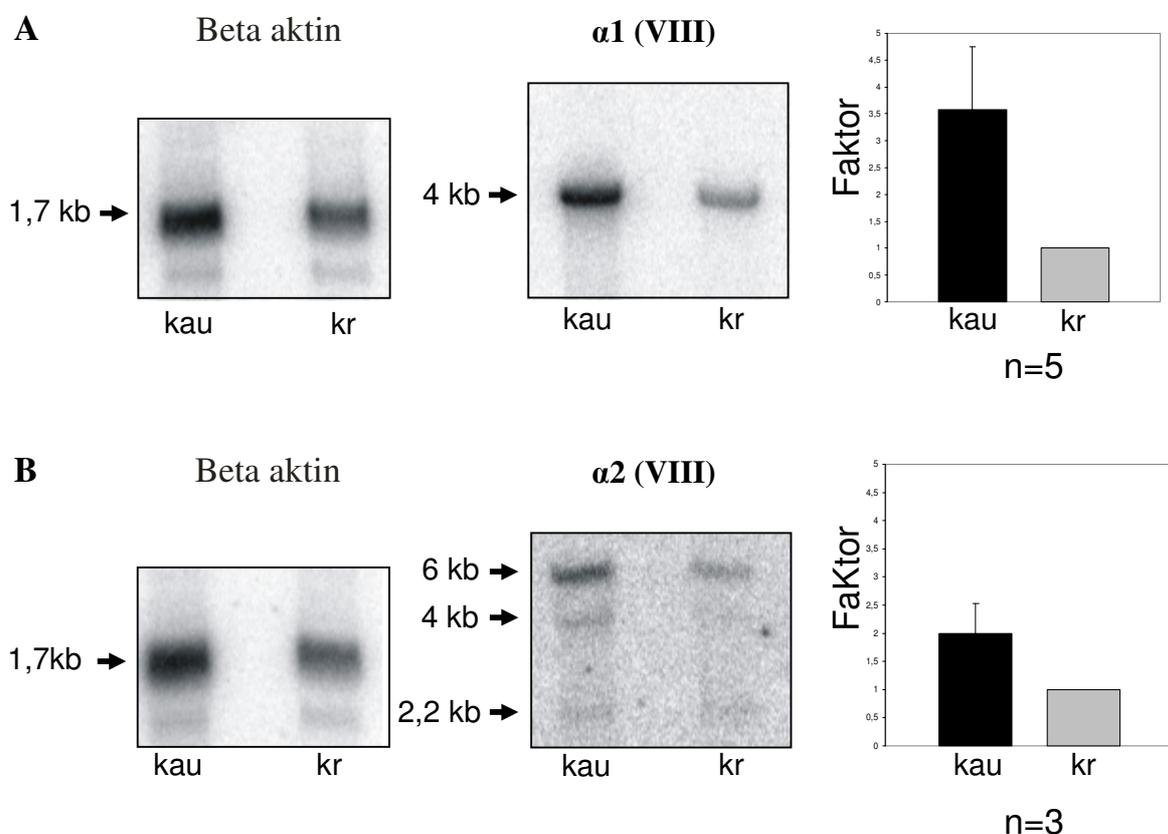


**Abbildung 3.12: Northern Blot-Analyse der Expression von Ferritin.** Es wurden je 20 µg RNA von kaudalen und kranialen Zellen gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran geblottet, denaturiert und mit einer DIG-markierten Sonde hybridisiert. Nach der Hybridisierung mit der Beta aktin-Sonde wurde der Blot gestrippt und mit einer Ferritin-Sonde hybridisiert. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung. Die Werte wurden auf Beta aktin genormt. Die Auswertung der Expressionsstärke mit Hilfe von Image Quant TM (Amersham Bioscience, USA) und die Berechnung eines Mittelwertes aus 2 verschiedenen Blots, brachte das Ergebnis, dass Ferritin in kranialen Zellen 1,95 mal stärker exprimiert wird als in kaudalen Zellen.

Abbildung 3.13 zeigt Northern Blots zur Analyse der Expression von Kollagen VIII in kaudalen und kranialen Zellen. Abgebildet sind mRNA Blots, die zunächst mit Beta aktin und nach dem Strippen mit für die  $\alpha 1$ - bzw.  $\alpha 2$ -Sequenzen von Kollagen VIII spezifischen Sonden hybridisiert worden sind. Für die densitometrische Auswertung wurden auch die Ergebnisse der RNA-Blots herangezogen, so dass für  $\alpha 1$ (VIII)  $n = 5$  Blots und für  $\alpha 2$ (VIII)  $n = 3$  Blots zur Verfügung standen. Der Mittelwert für die Expression in kranialen Zellen wurde auf 1 gesetzt.

Im Mittel war die  $\alpha 1$ -mRNA von Kollagen VIII in kaudalen Zellen etwa 3,5 mal stärker exprimiert als in kranialen Zellen (Ergebnis Gene Array: Zwei mal stärker in kaudalen als in kranialen) und die  $\alpha 2$ -mRNA von Kollagen VIII zwei mal stärker in kaudalen als in kranialen Zellen.

Nach den Ergebnissen der Hybridisierung der Northern Blots wurden Kollagen VIII und ADAMTS-like 1 für weitere Analysen ausgewählt.

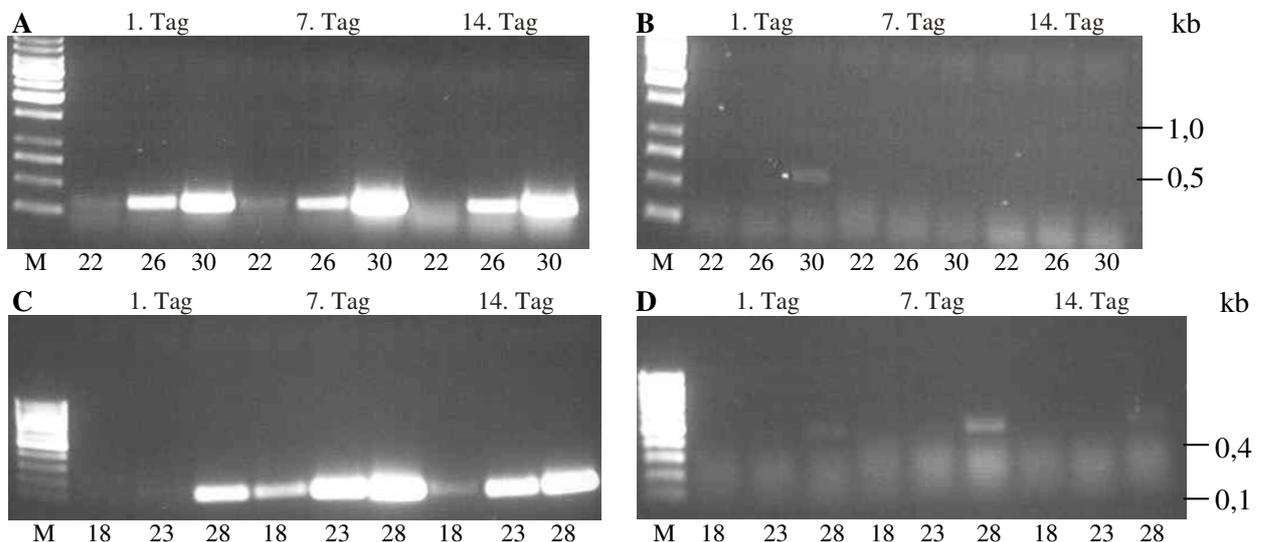


**Abbildung 3.13: Northern Blot-Analyse der Expression von Kollagen VIII.** Es wurden je 2  $\mu\text{g}$  mRNA von kaudalen und kranialen Zellen gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran gebettet, denaturiert und mit einer [ $^{32}\text{P}$ ]-markierten Sonde hybridisiert. Nach der Hybridisierung mit der Beta aktin- Sonde wurde die Blots gestrippt und mit einer  $\alpha 1$ (VIII) (A) bzw.  $\alpha 2$  (VIII) (B) Sonde hybridisiert. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung von 5 (A) bzw. 3 (B) verschiedenen RNA-Blots. Die Werte wurden auf Beta aktin genormt und die Expression der kranialen Zellen auf 1 festgelegt. Die Auswertung der Expressionsstärke mit Hilfe von Image Quant TM (Amersham Bioscience, USA) brachte das Ergebnis, dass die  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA in kaudalen Zellen 3,5 (Mittelwert) mal stärker exprimiert wird als in kranialen Zellen und die  $\alpha 2$ (VIII)-mRNA zwei mal (Mittelwert). Die Größe der Banden wurde mit Hilfe eines Größenstandards (Invitrogen RNA-Ladder) bestimmt.

### 3.3.2 Untersuchung der Expression von ADAMTS-like 1 und Kollagen VIII während der späten Chondrozytendifferenzierung

#### 3.3.2.1 Expression in kranialen Zellen

Zur Überprüfung der Expression von ADAMTS-like 1 und Kollagen VIII während der Differenzierung von Chondrozyten, wurden kraniale Chondrozyten für 14 Tage auf Agarose kultiviert und mit IGF I (siehe 2.2.4) stimuliert. Am 1., 7. und 14. Tag wurden Zellen geerntet, RNA isoliert und eine semiquantitative One Step-PCR (siehe 2.3.17.2) durchgeführt. Beta aktin wurde zum Abgleich der eingesetzten RNA-Menge verwendet. Die Abbildung 3.14 A zeigt den Beta aktin-Expressions-Abgleich (erwartete Bandengröße war 353 bp), B die Expression von  $\alpha 1$ (VIII) (erwartete Bandengröße war 583 bp), C die Kollagen X-Expression (erwartete Bandengröße war 161 bp) und D die ADAMTS-like 1-Expression (erwartete Bandengröße war 435 bp). Unter den Gelbildern ist die PCR-Zyklenzahl aufgeführt. Die Expression von Kollagen X ist ein Marker der Hypertrophie und gibt einen Hinweis auf den Stand der späten Differenzierung der Chondrozyten.



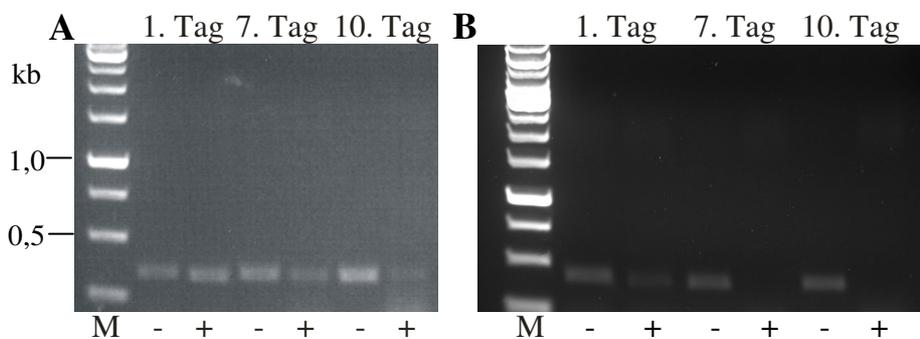
**Abbildung 3.14: Gelelektrophoretische Auftrennung von Produkten einer One Step-semiquantitative-PCR zur Überprüfung der Expression verschiedener Gene in kranialen Zellen während 14 tägiger Chondrozytendifferenzierung.** A: Beta aktin Expression, an Tag 1, 7 und 14. Beta aktin wurde zum Abgleich der Menge der eingesetzten RNA genommen. B zeigt die Expression von  $\alpha 1$ (VIII), C Kollagen X und D zeigt ADAMTS-like 1. M: 1 kb Gene Ruler (A, B) bzw. 100 bp Ladder (C, D)

Es ist gut zu erkennen, dass die Expression der  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA bereits am ersten Tag der Kultivierung in kranialen Zellen sehr gering ist und am 7. Tag bereits gar nicht mehr vorhanden zu sein scheint, während die Expression von Kollagen X am 1. Tag zwar vorhanden, aber noch nicht stark ausgeprägt ist, jedoch bereits am 7. Tag sehr stark ist. Die Expression von ADAMTS-like 1 ist insgesamt schwach und hat ihren Höhepunkt im mittleren Zeitpunkt der Kultivierung am Tag 7.

### 3.3.2.2 Expression in kaudalen Zellen

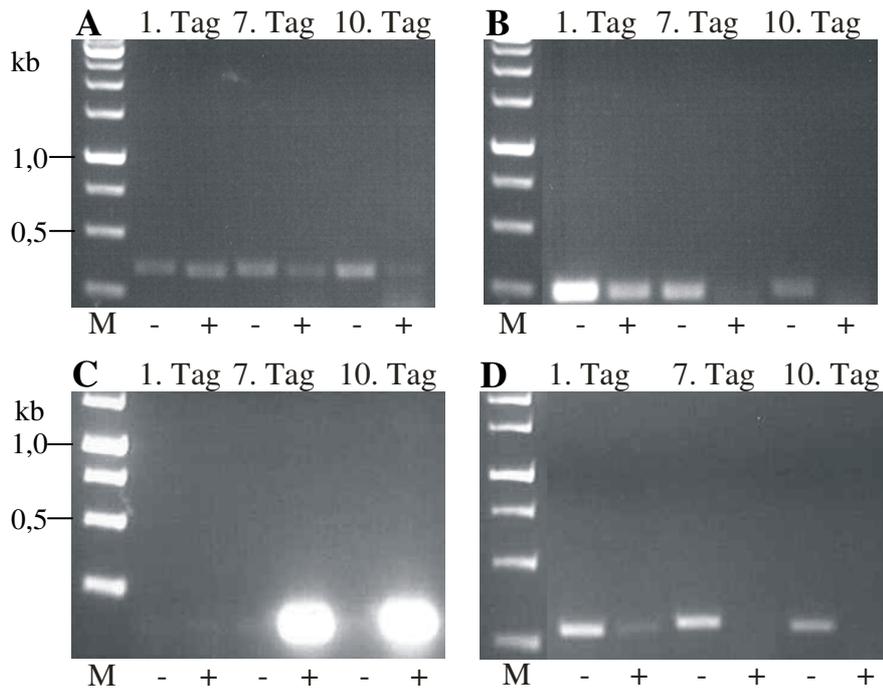
Die Abbildungen 3.15, 3.16 und 3.17 zeigen die Expression von  $\alpha 1(\text{VIII})$  und  $\alpha 2(\text{VIII})$ , von Kollagen X und von ADAMTS-like 1 in kaudalen Zellen während der späten Chondrozytendifferenzierung (mit und ohne Stimulierung). Wie die kranialen Zellen wurden die kaudalen Chondrozyten auf Agarose in Kultur gehalten, an Tag 1, 7 und 10 (Abbildungen 3.15 und 3.16) bzw. 1, 7 und 14 (Abb. 3.17) geerntet und die RNA wurde isoliert. Die Zellen wurden mit Thyroxin und Chymotrypsin (vergleiche 2.2.4) stimuliert (+), die Kontrollen wurden nicht stimuliert (-).

Es wurde eine semiquantitative One Step-PCR gemacht, die Produkte gelelektrophoretisch getrennt und die Menge der RNA anhand einer Beta aktin-PCR abgeglichen (Abb. 3.15 A, 3.16 A und 3.17 A). Für Beta aktin wurde eine Produktgröße von 353 bp erwartet. Abbildung 3.15 B zeigt die Expression von ADAMTS-like 1. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Expression von ADAMTS-like 1 während der Differenzierung abnimmt. In den nicht stimulierten Zellen verändert sich die Expression nicht. Für ADAMTS-like 1 wurde eine Produktgröße von 435 bp erwartet.



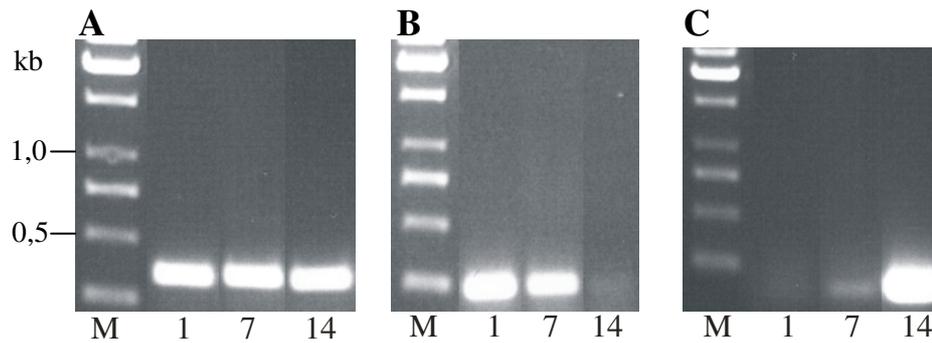
**Abbildung 3.15: Gelelektrophoretische Auftrennung von Produkten einer semiquantitativen One Step-PCR zur Überprüfung der Expression verschiedener Gene in kaudalen Zellen während 10 tägiger Chondrozytendifferenzierung.** Ein Teil der Zellen wurde mit Thyroxin und Chymotrypsin stimuliert (+), der andere Teil nicht. An Tag 1, 7 und 10 wurden Zellen geerntet und RNA isoliert. **A:** Beta aktin Expression, an Tag 1, 7 und 10. Beta aktin wurde zum Abgleich der Menge der eingesetzten RNA genommen. **B** zeigt die Expression von ADAMTS-like 1. M: 1kb Gene Ruler

Die Abbildung 3.16 B zeigt die Expression von  $\alpha 1(\text{VIII})$ , C die Expression von  $\alpha 1(\text{X})$  und D von  $\alpha 2(\text{VIII})$ . Für die PCR, die in der Abbildung B gezeigt wird, wurde ein Produkt der Größe von 244 bp erwartet, für C ein Produkt der Größe 161 bp und für D ein Produkt der Größe 308 bp. Es ist gut zu erkennen, dass die Expression der  $\alpha 1(\text{VIII})$ -mRNA bei nicht stimulierten Chondrozyten am 1. Tag am höchsten war. Am 7. und 10. Tag ist bei den stimulierten Zellen keine Expression der  $\alpha 1$ -mRNA von Kollagen VIII mehr nachweisbar. Die Kollagen X Expression verhält sich genau entgegengesetzt. In den nicht stimulierten Zellen war sie nicht nachweisbar, während sie bei den stimulierten Zellen bereits am 7. Tag sehr stark war. Die Expression der  $\alpha 2(\text{VIII})$ -mRNA verhielt sich entsprechend der Expression der  $\alpha 1(\text{VIII})$ -mRNA.



**Abbildung 3.16: Gelelektrophoretische Auftrennung von Produkten einer semiquantitativen One Step-PCR zur Überprüfung der Expression verschiedener Gene in kaudalen Zellen während 10 tägiger Chondrozytendifferenzierung.** Ein Teil der Zellen wurde mit Thyroxin und Chymotrypsin stimuliert (+), der andere Teil nicht. An Tag 1, 7 und 10 wurden Zellen geerntet und RNA isoliert. **A:** Beta aktin Expression, an Tag 1, 7 und 10. Beta aktin wurde zum Abgleich der Menge der eingesetzten RNA genommen. **B** zeigt die Expression von  $\alpha 1(\text{VIII})$ , **C** Kollagen X und **D** zeigt die Expression von  $\alpha 2(\text{VIII})$ . M: 1kb Gene Ruler

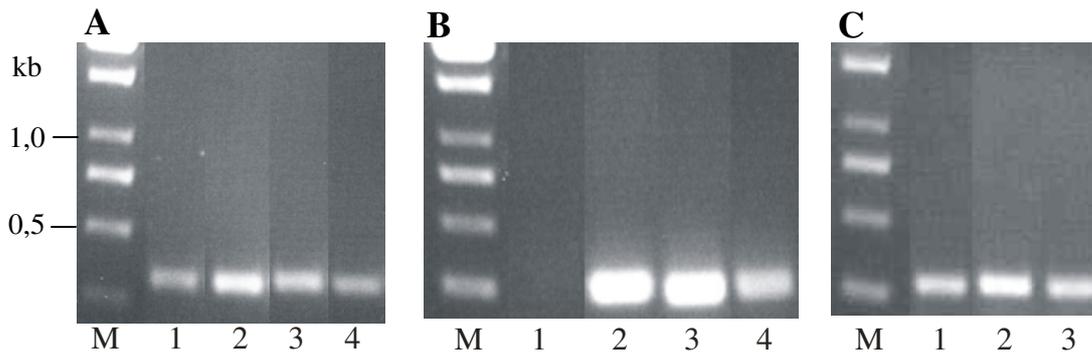
Die Abbildung 3.17 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung einer semiquantitativen One Step-PCR. In diesem Fall wurden die stimulierten Zellen am 1., 7. und 14. Tag geerntet und es wurde die RNA isoliert. Die Abbildung 3 A zeigt den Beta aktin-Abgleich, B die Expression der  $\alpha 1(\text{VIII})$ -mRNA und C die Expression der  $\alpha 1(\text{X})$ -mRNA. Die erwarteten Produktgrößen entsprechen denen der Abbildung 3.16. Bei diesem Versuch war die Expression der  $\alpha 1(\text{VIII})$ -mRNA am 7. Tag noch deutlich nachweisbar, während die Expression der  $\alpha 1$ -mRNA von Kollagen X am 7. Tag kaum festzustellen war. Die Zellen begannen also später zu hypertrophieren als in dem Versuch, dessen Ergebnisse in der Abbildung 3.16 dargestellt ist. Daran kann man eine Varianz im Verhalten der Chondrozyten erkennen, die man von Woche zu Woche aus den Hühnersterna präpariert. Dennoch sind die Versuche aussagekräftig, da ja die Chondrozyten aus einer Charge verglichen werden.



**Abbildung 3.17: Gelelektrophoretische Auftrennung von Produkten einer semiquantitativen One Step-PCR zur Analyse der Expression der  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA und von Kollagen X während einer 14 tägiger Kultivierung kaudaler Zellen.** Die Zellen wurden mit Thyroxin und Chymotrypsin stimuliert, an Tag 1, 7 und 14 wurden Zellen geerntet und RNA isoliert. **A:** Beta aktin-Expression Abgleich, **B**  $\alpha 1$ (VIII) und **C** Kollagen X. M: 1kb Gene Ruler

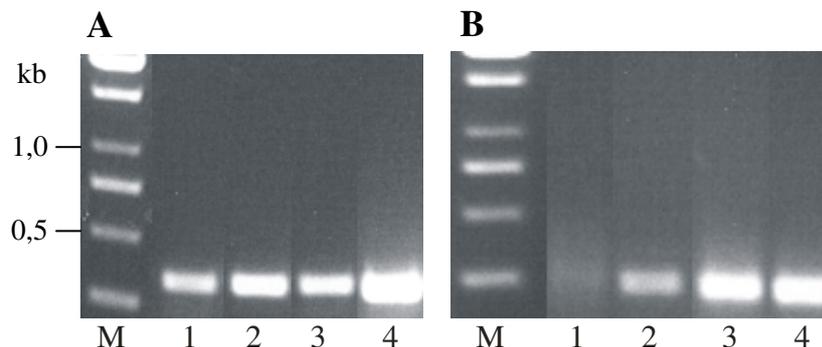
### 3.3.3 Silencing der $\alpha 1$ -mRNA von Kollagen VIII in kaudalen Hühnerchondrozyten

Um eine mögliche regulatorische Funktion von Kollagen VIII in der Chondrozytenreifung nachweisen zu können, wurde die  $\alpha 1$ -mRNA von Kollagen VIII in kaudalen Hühnerchondrozyten durch Elektroporation gesilenced (siehe 2.2.6). Mit Hilfe des Programms von Invitrogen (<https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>), das mit einem von Invitrogen nicht veröffentlichtem Algorithmus arbeitet, wurden zwei Ziele innerhalb der ORF-Sequenz der  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA ausgewählt, die sich für das Silencing besonders eignen und die Zellen wurden mit zwei siRNAs transfiziert (siehe Tabelle 2.8). Als Kontrolle wurde eine scrambled siRNA in der gleichen Konzentration in die Zellen gebracht und als weitere Kontrolle erhielten die Zellen nur das Transfektionsmedium und den Stromstoß. Eine weitere Zahl an Zellen wurde gar nicht mit dem Medium in Berührung gebracht. In den Abbildungen 3.18 und 3.19 ist die gelelektrophoretische Auftrennung der semiquantitativen One Step-PCR nach dem Silencing-Experiment zu sehen. Abbildung 3.18 A zeigt den Beta aktin-Expressions-Abgleich (Produktgröße: 353 bp) und B die Expression der  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA (Produktgröße: 244 bp) drei Tage nach dem Silencing. Das Silencing war erfolgreich (1), während in den Kontrollen (2-4) eine starke Expression der  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA nachweisbar war. Während in den Kontrollen bereits nach 25 Zyklen ein PCR-Produkt zu erkennen war, war in der herunterregulierten Probe erst nach 33 Zyklen ein Produkt zu erkennen (hier nicht abgebildet). Die Expression der  $\alpha 2$ (VIII)-mRNA (Produktgröße: 308 bp) wurde durch das Silencing nicht verändert (Abbildung 3.18 C).



**Abbildung 3.18 Gelelektrophoretische Auftrennung von Produkten einer semiquantitativen One Step-PCR drei Tage nach dem Silencing der  $\alpha 1(\text{VIII})$ -mRNA in kaudalen Chondryzten.** 1 ist die Probe, in welcher die  $\alpha 1(\text{VIII})$ -mRNA herunterreguliert wurde, 2 die scrambled Probe, 3 wurde mit einem elektrischen Impuls behandelt und 4 wurde nicht behandelt. **A:** Beta aktin-Expression Abgleich **B:** Expression von  $\alpha 1(\text{VIII})$  **C:** Expression von  $\alpha 2(\text{VIII})$ . M: 1kb Gene Ruler

Abbildung 3.19 A zeigt den Beta aktin-Expressions-Abgleich fünf Tage nach dem Silencing Experiment. B zeigt die Expression der  $\alpha 1(\text{VIII})$ -mRNA. Die erwarteten Produktgrößen der One Step-PCR entsprechen den erwarteten Größen in der Abbildung 3.18. Das Silencing war auch 5 Tage nach der Transfektion noch nachzuweisen (1), allerdings war der Effekt nicht mehr so ausgeprägt, wie nach 3 Tagen.



**Abbildung 3.19: Gelelektrophoretische Auftrennung von Produkten einer semiquantitativen One Step-PCR fünf Tage nach dem Silencing der  $\alpha 1(\text{VIII})$ -mRNA in kaudalen Chondryzten.** 1 ist die Probe, in welcher die  $\alpha 1(\text{VIII})$ -mRNA herunterreguliert wurde, 2 die scrambled Probe, 3 wurde mit einem elektrischen Impuls behandelt und 4 wurde nicht behandelt. **A:** Beta aktin-Expressions-Abgleich **B:** Expression von  $\alpha 1(\text{VIII})$ . M: 1kb Standard

Es konnte nach 29 Zyklen ein PCR-Produkt für  $\alpha 1(\text{VIII})$  in der herunterregulierten Probe nachgewiesen werden, während in den Kontrollen nach 25 Zyklen ein Produkt auftrat (hier nicht dargestellt).

### 3.3.3.1 Effekt der Runterregulierung der $\alpha 1(\text{VIII})$ -mRNA auf die späte Chondrozytendifferenzierung

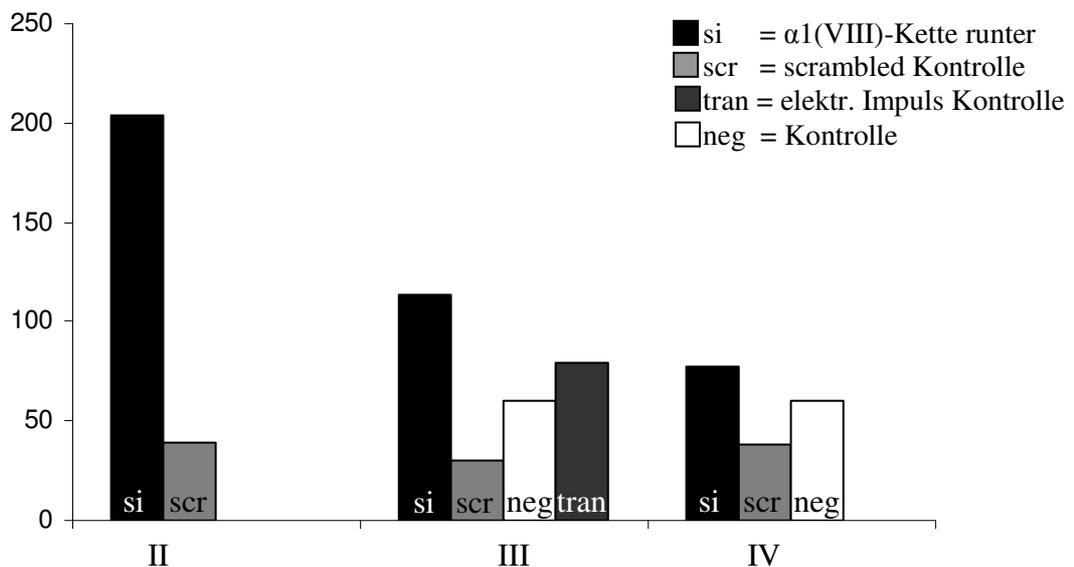
Die Marker für die späte Chondrozytendifferenzierung sind die zunehmende Aktivität der Alkalischen Phosphatase und die steigende Kollagen X-Expression. Die Kollagen II-Expression nimmt während der Differenzierung in dem hypertrophen Zellzustand ab.

### 3.3.3.1.1 Alkalische Phosphatase Bestimmung

Für die Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität der kaudalen Chondrozyten wurde, wie unter 2.4.1 erklärt, verfahren. Das Diagramm in Abbildung 3.20 zeigt die Absorption der verschiedenen stimulierten Proben bei 405 nm. Es ist zu erkennen, dass die Absorption der Probe, in welcher die  $\alpha 1(\text{VIII})$ -mRNA herunterreguliert worden war (si), höher als bei den Kontrollen war (scr, tran und neg). Bei der Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase ist im Gegensatz zu der Kollagen X-Auswertung zu berücksichtigen, dass die Zellzahl eine Rolle spielt. Während bei der Kollagen X-Auswertung die Proteinmenge anhand der Counts aufeinander abgestimmt werden konnte, wurde hier einfach nur die gleiche Menge Medium abgenommen, unabhängig davon, wieviele Zellen während der Kultivierung eventuell gestorben waren und keine alkalische Phosphatase mehr synthetisieren konnten. Die Aussage über die Aktivität der alkalischen Phosphatase kann darum als ein Hinweis auf hypertrophierende Zellen sein, sollte allerdings zusammen mit dem Verhältnis von Kollagen X zu II betrachtet werden. Die hohe Aktivität der alkalischen Phosphatase in der Probe, in welcher die  $\alpha 1(\text{VIII})$ -mRNA herunterreguliert wurde, im Vergleich zu den Kontrollen in den vorgestellten drei unabhängigen Versuchen (Abbildung 3.20), gibt allerdings schon einen deutlichen Hinweis auf eine beschleunigte, spätere Differenzierung der Chondrozyten.

Der Wert der Kontrolle „neg“ im Versuch II wurde aus dem Diagramm gestrichen, da hier in der Kontrolle nach der Transfektion mehr als doppelt so viele Zellen überlebt haben, wie in den transfizierten Zellen und den anderen Kontrollen.

#### Absorption bei 405 nm

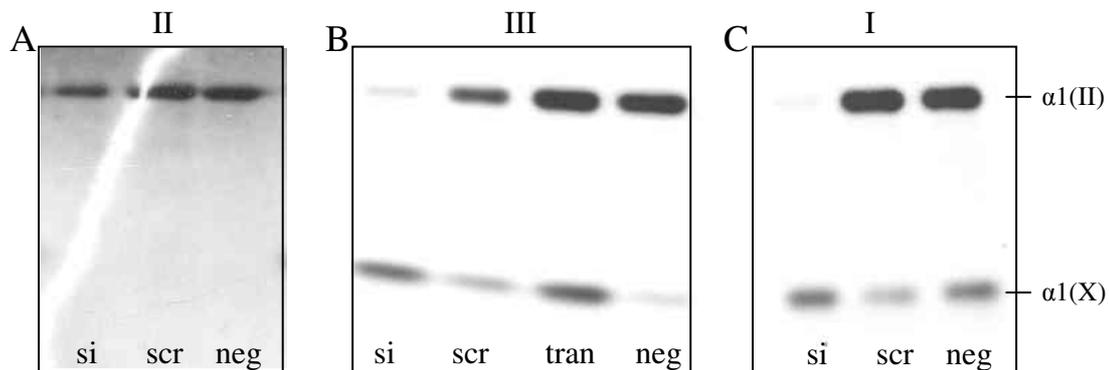


**Abbildung 3.20: Alkalische Phosphatase- Aktivitätsbestimmung am 11. Tag der Kultivierung. II, III und IV stellen drei unabhängige Versuche dar.** Es wurden 50  $\mu\text{l}$  des Mediums für den Test verwendet. si:  $\alpha 1(\text{VIII})$ -mRNA wurde herunterreguliert; scr: Transfizierung mit einer scrambled RNA; tran: Zellen wurden mit einem elektrischen Impuls behandelt; neg: Zellen wurden nicht transfiziert. Im Versuch II wurde der Wert für „neg“ vernachlässigt, da die Zellzahl deutlich höher als in den anderen Proben war.

### 3.3.3.1.2 Expression von Kollagen X

Zum Nachweis der späten Chondrozytendifferenzierung wurde das Verhältnis von Kollagen II, dessen Expression während der Differenzierung abnimmt, zu Kollagen X, dessen Expression während der Differenzierung zunimmt, bestimmt. Unstimulierte kaudale Chondrozyten sollten nicht differenzieren und in Kultur Kollagen II, jedoch kein Kollagen X exprimieren. Kaudale Chondrozyten, stimuliert mit Chymotrypsin und Thyroxin (siehe 2.2.4), sollten nach einigen Tagen in Kultur Kollagen X synthetisieren.

Am 11. Tag der Kultivierung wurde zu dem Medium der Chondrozyten [<sup>14</sup>C] markiertes Prolin zugegeben und am nächsten Tag wurde das Medium geerntet. Pepsin-resistente Kollagene wurden aufgereinigt, die Radioaktivität überprüft und es wurden gleich viele Counts auf einem SDS-Gel aufgetragen (siehe 2.4.5). Dann wurde das Gel gefärbt, getrocknet und es wurde ein Röntgenfilm für 1-2 Wochen aufgelegt. Die Abbildung 3.21 zeigt die Röntgenfilme von 3 unterschiedlichen Versuchen. Abbildung 3.21 A zeigt sowohl für die Probe, in denen die  $\alpha 1(\text{VIII})$ -mRNA herunterreguliert wurde, als auch für die Kontrollen nur eine Bande der  $\alpha 1$ -Kette von Kollagen II, da das hier untersuchte Medium von Zellen stammte, die nicht stimuliert worden waren. Abbildung 3.21 B und C zeigen zwei Ausschnitte von Röntgenfilmen, auf denen die Kollagen II- und X-Synthese nach Stimulierung der Zellen zu sehen ist. Es ist deutlich zu erkennen, dass in den beiden Proben, in denen die  $\alpha 1(\text{VIII})$ -mRNA herunterreguliert wurde (si), wesentlich mehr Kollagen X im Verhältnis zu Kollagen II vorhanden war, als in den Kontrollen (scr, tran und neg). Das ist ein deutliches Zeichen für eine beschleunigte Differenzierung.



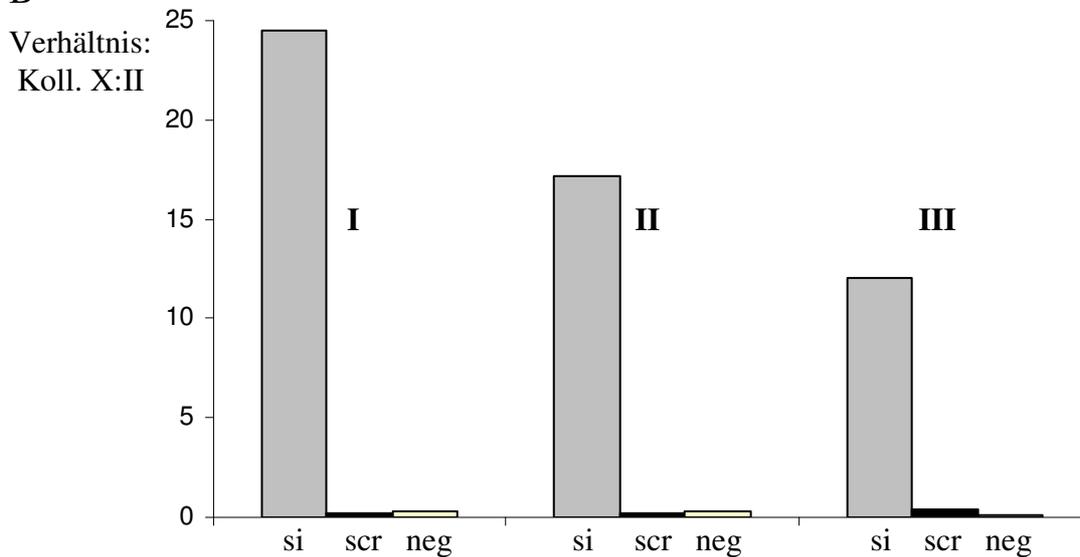
**Abbildung 3.21: Fluorogramm einer SDS-PAGE zur Bestimmung der Kollagen II und X Expression transfizierter Chondrozyten und ihrer Kontrollen mit (B, C) und ohne (A) Stimulation durch Thyroxin und Chymotrypsin.** Die Zellen wurden nach 11 tägiger Kultivierung in Agarose mit [<sup>14</sup>C]-Prolin markiert und prolinresistente Kollagene wurden isoliert. si:  $\alpha 1(\text{VIII})$  wurde herunterreguliert; scr: Transfizierung mit einer scrambled RNA; tran: Zellen wurden mit einem elektrischen Impuls behandelt; neg: Zellen wurden nicht transfiziert.

Die Verhältnisse von Kollagen X zu II wurden für die verschiedenen Experimente mit Hilfe von Image Quant TM (Amersham Bioscience, USA) bestimmt. Für die Experimente I-IV sind diese Ergebnisse der verschiedenen Proben in der Abbildung 3.22 A tabellarisch aufgeführt. Die Unterschiede im Verhältnis von Kollagen X zu II für den Versuch I-III sind auch in einem Diagramm in der Abbildung 3.22 B dargestellt.

A

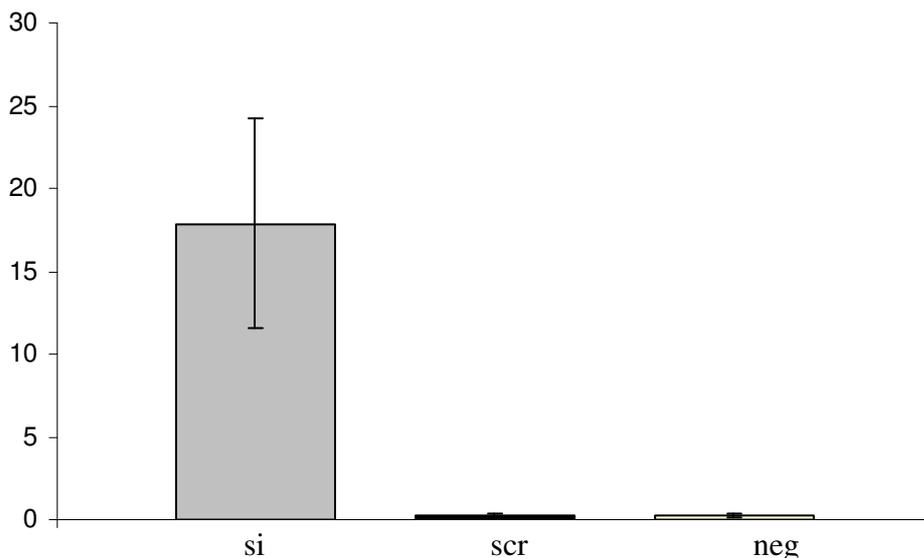
Experiment	si	scr	tran	neg
I	24,5	0,2	/	0,48
II	17,16	0,16	/	0,32
III	12	0,36	0,64	0,06
IV	1,33	0,148	/	0,041

B



**Abbildung 3.22 A und B: Verhältnis der Quantität von Kollagen X zu II zur Bestimmung des Status der späten Chondrozytendifferenzierung in transfizierten Chondrozyten und den Kontrollen.** A: Tabellarische Übersicht zu dem Kollagen X:II Verhältnis. B: Diagrammdarstellung des Kollagen X zu II Verhältnisses der Versuche I-III. si:  $\alpha 1(\text{VIII})$  wurde herunterreguliert; scr: Transfizierung mit einer scrambled RNA; (tran: Zellen wurden mit einem elektrischen Impuls behandelt); neg: Zellen wurden nicht transfiziert.

C



**Abbildung 3.22 C: Verhältnis der Quantität von Kollagen X zu II zur Bestimmung des Status der späten Chondrozytendifferenzierung in transfizierten Chondrozyten und den Kontrollen.** Mittelwerte der Versuche I-III dargestellt als Diagramm. si:  $\alpha 1(\text{VIII})$  wurde herunterreguliert; scr: Transfizierung mit einer scrambled RNA; neg: Zellen wurden nicht transfiziert.

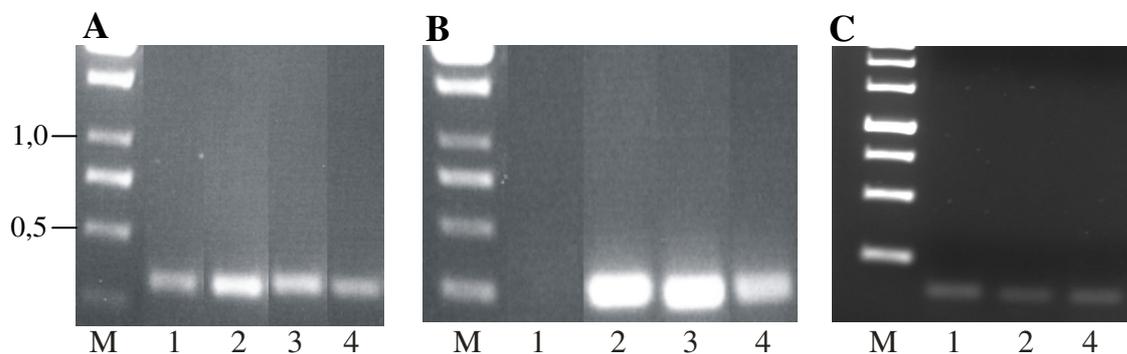
Der Unterschied von der herunterregulierten Probe zu den Kontrollen ist sehr deutlich zu erkennen. Während das Verhältnis von Kollagen X zu II in der Probe über 10 liegt (mit Ausnahme von Versuch IV), liegt es für die Kontrollen immer unter 1. Die Abbildung 3.22 C zeigt die Mittelwerte der Kollagen X zu II-Verhältnisse der Versuche I-III, dargestellt in einem Diagramm. Der Unterschied in den Verhältnissen ist signifikant, wie an der Standardabweichung zu erkennen ist.

Für den T-Test ergibt sich beim Vergleich der Werte von si und scr ein p-Wert von 0,00825 und beim Vergleich der Werte si und neg ein p-Wert von 0,00822. Der p-Wert beim Vergleich von scr und neg liegt bei 0,8532. Hier ist der Unterschied also nicht signifikant.

### 3.3.3.1.3 Expression von Kollagen II

Um sicher zu stellen, dass das große Verhältnis von Kollagen X zu II in der  $\alpha 1(\text{VIII})$ -mRNA herunterregulierten Probe im Vergleich zu den Kontrollen nicht durch eine unbeabsichtigte, zusätzliche Herunterregulierung von Kollagen II durch das Silencing von Kollagen VIII verursacht wurde, wurde die Kollagen II-Expression drei Tage nach der Transfektion der Zellen mittels semiquantitativer One Step-PCR untersucht. Abbildung 3.23 zeigt die agarosegelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. Wie zu erkennen ist, wurde Kollagen II nicht mit herunterreguliert (1). Das Abnehmen der Kollagen II-Expression ist also eine Folge der Beschleunigung der Differenzierung und nicht eine Runterregulierung der Kollagen II mRNA durch die si RNA gegen  $\alpha 1(\text{VIII})$ .

Die erwarteten Produktgrößen waren für die Beta aktin-PCR 353 bp, für  $\alpha 1(\text{VIII})$ -PCR 244 bp und für die Kollagen II-PCR 155 bp.



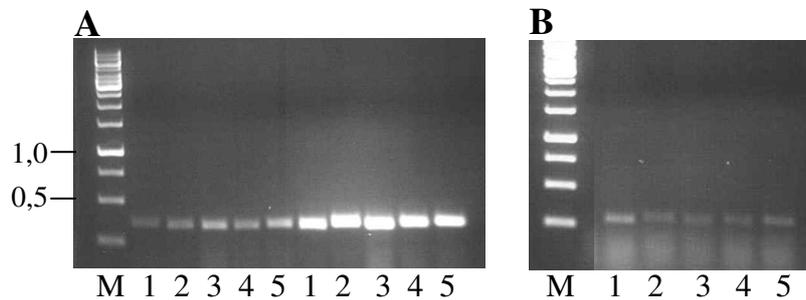
**Abbildung 3.23: Gelelektrophoretische Auftrennung von Produkten einer semiquantitativen One Step-PCR 3 Tage nach dem Silencing der  $\alpha 1(\text{VIII})$ -mRNA in kaudalen Chondrozyten.** 1 ist die Probe, in welcher die  $\alpha 1(\text{VIII})$ -mRNA herunterreguliert wurde, 2 die scrambled Probe, 3 wurde mit einem elektrischen Impuls behandelt und 4 wurde nicht behandelt. **A:** Beta aktin-Abgleich, **B:** Expression von  $\alpha 1(\text{VIII})$  **C:** Kollagen II Expression. M: 1kb Gene Gene Ruler

### 3.3.4 Silencing der $\alpha 2(\text{VIII})$ -mRNA in kaudalen Hühnerchondrozyten

Um festzustellen, inwieweit auch die Expression der  $\alpha 2$ -Kette von Kollagen VIII eine Rolle in der Chondrozytendifferenzierung spielt, wurde auch für die  $\alpha 2(\text{VIII})$ -mRNA ein Silencing-Experiment vorgenommen. Es wurden jeweils zwei verschiedene siRNAs gegen  $\alpha 2(\text{VIII})$  ausgesucht und bei Invitrogen (USA) bestellt (siehe 3.3.3). Die Zellen wurden wie unter 2.2.6 beschrieben je mit einer siRNA-Sequenz alleine und den beiden siRNA-Sequenzen zusammen transfiziert.

Die Abbildung 3.24 zeigt das Fotos eines Agarosegels nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Produkte einer semiquantitativen One Step-PCR. In der Abbildung A sind

die Produkte des Beta aktin Abgleichs als Mengenabgleich für die eingesetzte RNA zu erkennen. B zeigt die Produkte der  $\alpha 2(\text{VIII})$ -One Step-PCR (erwartete Größe: 308 bp). Es ist kein Silencingeffekt zu erkennen.



**Abbildung 3.24: Gelelektrophoretische Auftrennung von Produkten einer semiquantitative One Step-PCR drei Tage nach dem Silencing der  $\alpha 2(\text{VIII})$ -mRNA in kaudalen Chondrozyten.** In den Proben 1-3 wurden die Zellen mit siRNA gegen  $\alpha 2(\text{VIII})$  transfiziert, 4 ist die scrambled Probe und 5 wurde nicht behandelt. **A:** Beta aktin Abgleich, 25 (links) und 28 (rechts) Zyklen **B:** Expression von  $\alpha 2(\text{VIII})$ , 28 Zyklen. M: 1kb Gene Ruler

Insgesamt wurden zweimal 2 verschiedene siRNA-Sequenzen synthetisiert (siehe Tabelle 2.8), allerdings blieb die Runterregulierung der  $\alpha 2(\text{VIII})$ -mRNA erfolglos.

### 3.3.5 Die Kollagen VIII knockout-Maus ( $Col8a1^{-/-}/Col8a2^{-/-}$ )

(freundlicherweise von Dr. Ulrike Hopfer (Basel) zur Verfügung gestellt)

Ulrike Hopfer war so freundlich, unserem Institut präparierte Hinterbeine von fünf neugeborenen Knockout- und dazu fünf passenden Wildtyp-Mäusen (Bl 6), fünf 15,5 Tage alten Knockout- und den dazu passenden Wildtyp-Mäusen und zwei 50 Tage alten Knockout- und Wildtyp-Mäusen zur Verfügung zu stellen, so dass wir Paraffinschnitte durch die Tibienköpfe anfertigen und nach Veränderungen in der Wachstumsfuge suchen konnten. Ergebnisse aus anderen Untersuchungen zu der  $Col8a1^{-/-}/Col8a2^{-/-}$ - (Knockout-)Maus wurden veröffentlicht (Hopfer et al., 2005) und es wurde eine Veränderung der Descemet-Membran im Auge der Maus festgestellt (siehe 1.1.2.1.1.2).

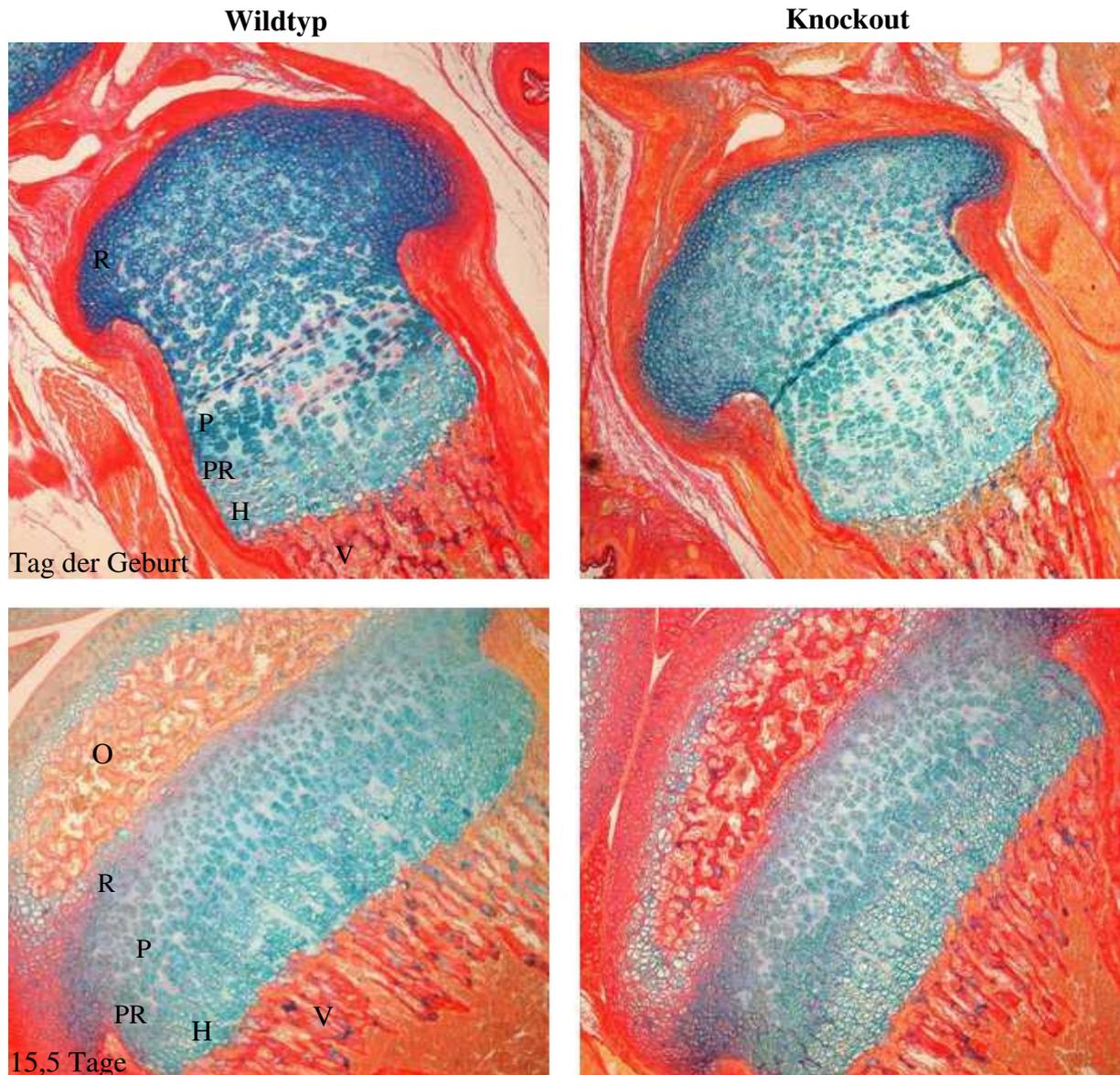
Das Skelett wurde von Hopfer et al. lediglich oberflächlich untersucht, so dass eine genaue Untersuchung der Wachstumszone durchaus vielversprechend schien.

Die erhaltenen Mäusebeine wurden in Paraffin eingebettet (siehe 2.5.1) und mit einem Mikrotom 5  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte gefertigt.

#### 3.3.5.1 Alzian Blau und Sirius Rot-Färbung

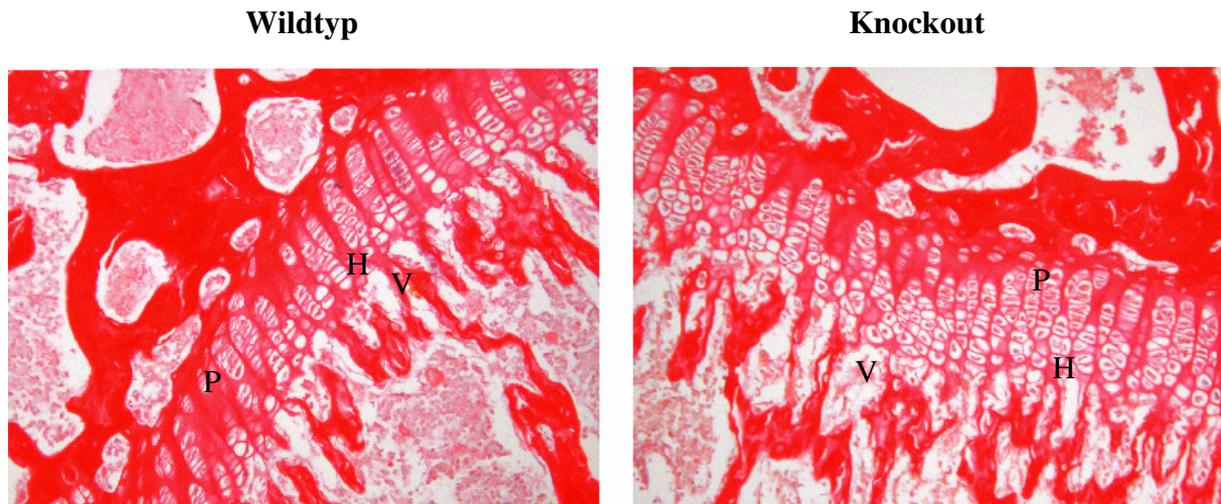
Die Wachstumsfugen der Tibien wurden zunächst mit Alzian-Blau und Sirius-Rot gefärbt.

In Abbildung 3.25 sind die Tibien von neugeborenen Wildtyp- und Knockout-Mäusen und von 15,5 Tage alten Mäusen abgebildet. Das Knorpelgewebe der Wachstumsfuge wurde blau, die Knochen, die Muskeln und anderes Bindegewebe wurden rot gefärbt.



**Abbildung 3.25: Alzian-Blau und Sirius-Rot-Färbung von Tibien von neugeborenen und 15,5 Tage alten Wildtyp- und Knockout-Mäusen.** O: 2. Ossifikationszentrum, R: Ruhezone, P: Proliferative Zone, PR: Prähypertrophe Zone, H: Hypertrophe Zone, V: Vaskuläre Invasionszone; Vergrößerung: 40-fach

Die Abbildung 3.26 zeigt die Wachstumsfuge einer 50 Tage alten Maus. Die Färbung erfolgte ebenfalls mit Sirius-Rot. Es ist eine deutliche Rot-Färbung auch schon in der Wachstumsfuge zu erkennen.

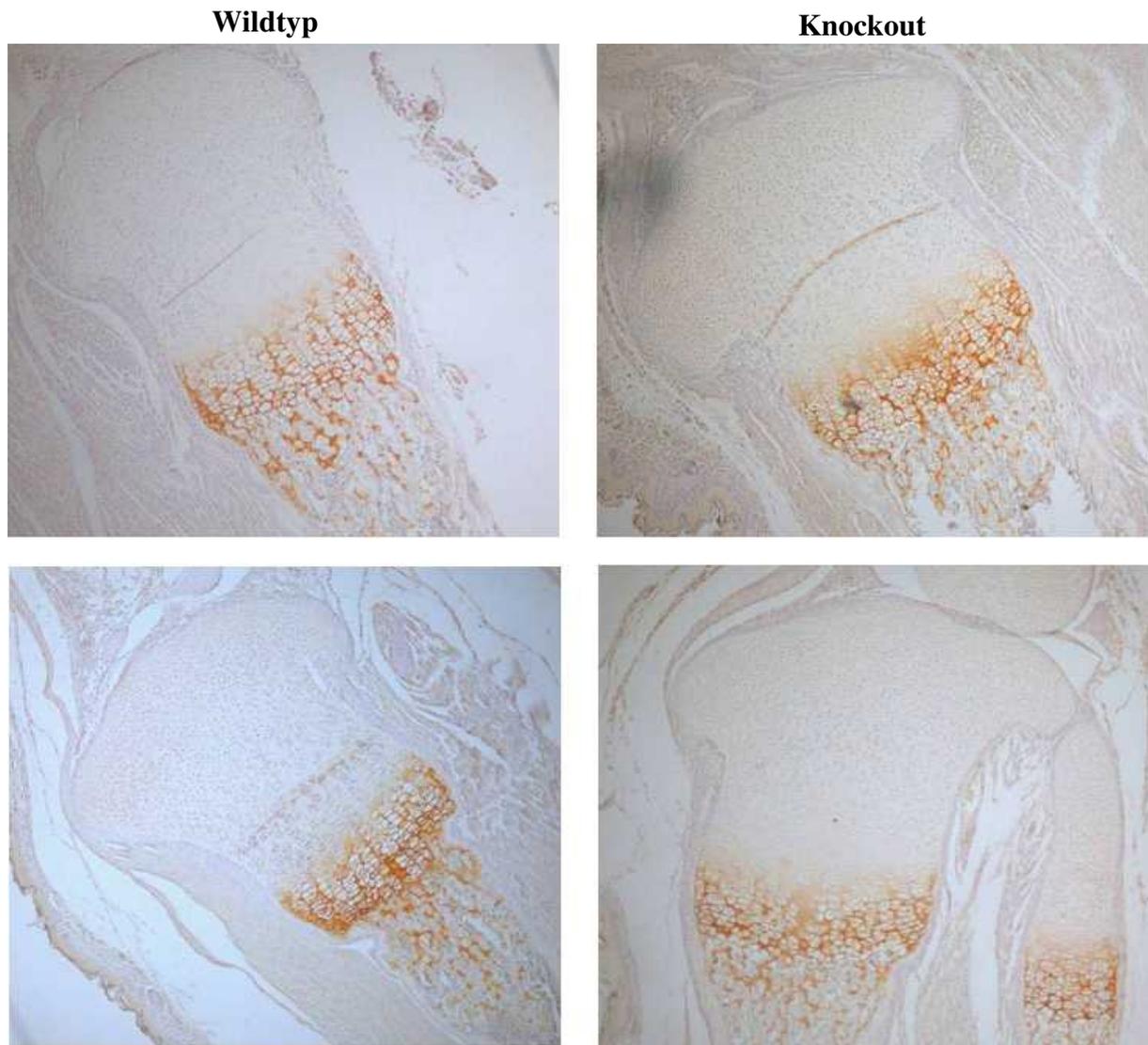


**Abbildung 3.26: Sirius-Rot-Färbung von Tibien von 50 Tage alten Wildtyp- und Knockout-Mäusen.** P: Proliferative Zone, H: Hypertrophe Zone, V: Vaskuläre Invasionszone; Vergrößerung: 40-fach

### 3.3.5.2 Immunhistochemische und Immunfluoreszenz-Färbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen Kollagen X

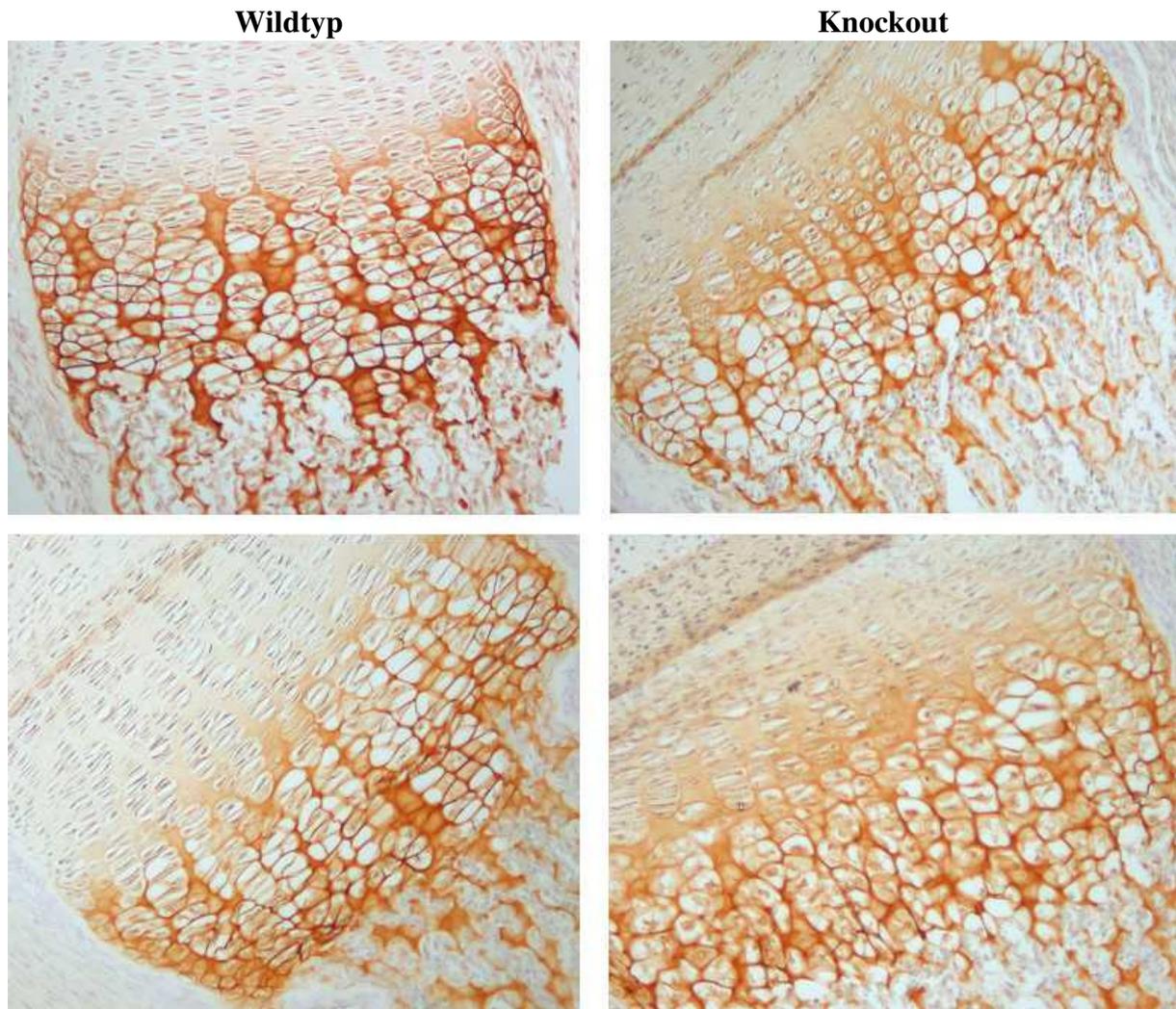
Da anhand der Alzian-Blau und Sirius-Rot-Färbung zunächst kein Unterschied in der Wachstumsfuge zwischen *Col8a1*<sup>-/-</sup>/*Col8a2*<sup>-/-</sup>-Mäusen und den Wildtyp-Mäusen gefunden werden konnte, wurde eine Immunhistochemische Färbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen Kollagen X auf den Tibienschnitten durchgeführt. Die Hypothese verfolgte, dass Kollagen X aufgrund seiner Struktur-Ähnlichkeit zu Kollagen VIII vielleicht das Fehlen von Kollagen VIII kompensieren könnte.

Die Hybridisierung mit dem Antikörper und die anschließende Behandlung mit dem Dako-Kit (siehe 2.5.3.2.2) ergab in den hypertrophen Zonen der Wachstumsfuge eine starke Braunfärbung. Dies traf sowohl für die Tibien der neugeborenen Mäuse (Abbildung 3.27 und 3.28) zu als auch für die Tibien der 15,5 Tage alten Mäuse (Abbildung 3.30). Der erste Eindruck war, dass die Zellsäulen im Wildtyp regelmäßiger aufgebaut waren, und dass die Kollagen X-Färbung in der Knockout-Maus in die prähypertrophe Zone fließt.



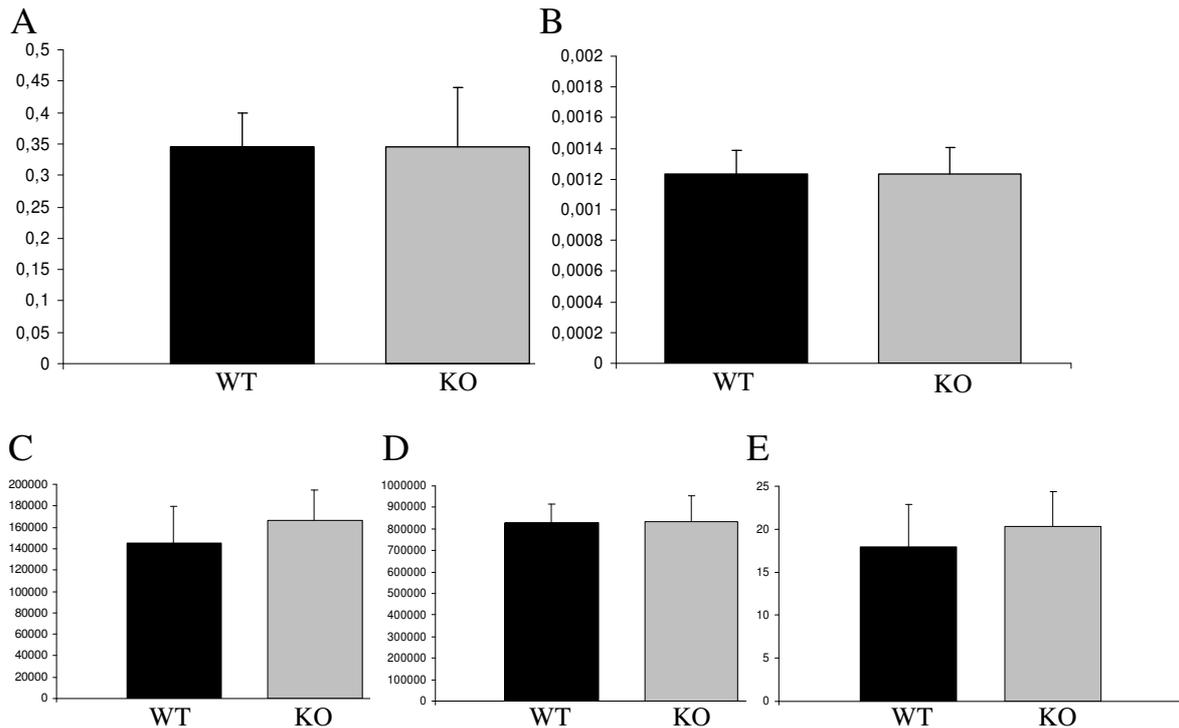
**Abbildung 3.27: Immunhistologische Färbung gegen Kollagen X auf Tibien von neugeborenen Wildtyp- und Knockout-Mäusen.** Die hypertrophe Zone der Wachstumszone zeigt eine deutliche Braunfärbung. Vergrößerung: 40-fach

Das Verwischen der Färbung in die prähypertrophe Zone ist auch besonders in der Abbildung 3.28 in der 100-fachen Vergrößerung zu sehen.



**Abbildung 3.28: Immunhistologische Färbung gegen Kollagen X auf Tibien von neugeborenen Wildtyp- und Knockout- Mäusen.** Vergrößerung: 100-fach

Um den möglichen Unterschied feststellen zu können, wurde mit Hilfe des Programms Image J (frei erhältlich im WWW unter <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) die Zellzahl in der hypertrophen Zone bestimmt. Die hypertrophe Zone wurde eingekreist, ihre Pixelzahl festgelegt und die Zellzahl/Pixel ausgezählt. Außerdem wurde bei den neugeborenen Mäusen die Länge der hypertrophen Zone im Verhältnis zur Breite ausgemessen. Zusätzlich wurde die Größe der Gesamtfläche der Wachstumsfuge in Pixel bestimmt und dann der Anteil der hypertrophen an der Gesamtfläche in Prozent berechnet (Abbildung 3.29). Wie in der Abbildung 3.29 gut zu erkennen ist, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Wachstumsfugen der Tibien der Wildtyp-Mäuse und der Knockout-Mäuse festgestellt werden. Für die Wildtypmaus wurden 5 Mäuse,  $n = 8$  Schnitte (rechtes und linkes Hinterbein, wenn verwendbarer Schnitt vorhanden war) ausgewertet und für die Knockout-Maus 4 Mäuse,  $n = 6$  Schnitte (rechtes und linkes Hinterbein, wenn verwendbarer Schnitt vorhanden war).



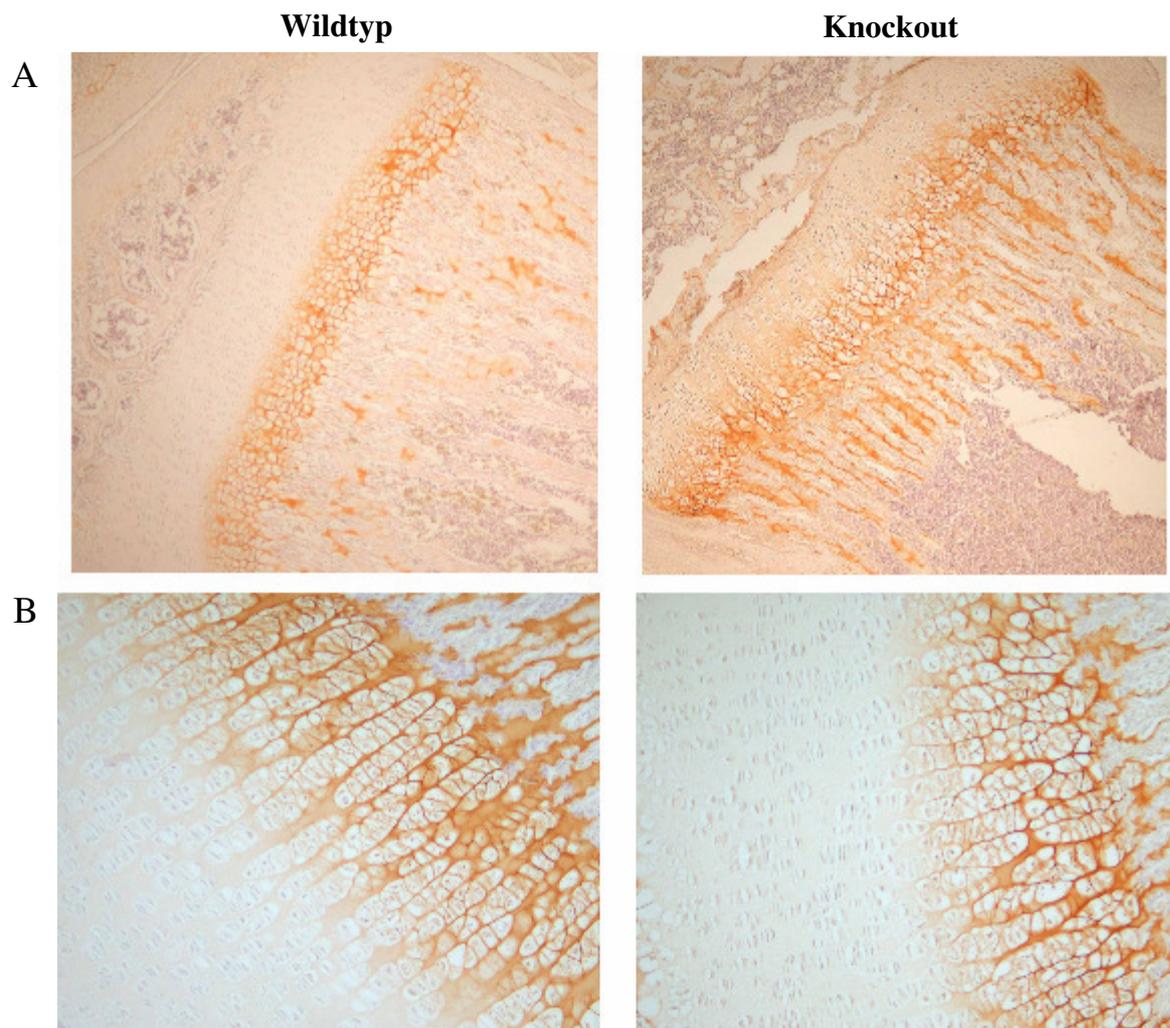
**Abbildung 3.29: Ergebnisse der Auswertung von Größe und Zellzahl der hypertrophen Zone der neugeborenen Wildtyp- und Knockout-Mäuse-Tibien.** A: Länge im Verhältnis zur Breite der hypertrophen Zone, B: Zellzahl pro Pixel in der hypertrophen Zone, C: Größe der hypertrophen Zone (Einheit Pixel), D: Größe der gesamten Wachstumsfuge (Einheit Pixel), E: Anteil der hypertrophen Zone an der Wachstumsfuge (%), WT: Wildtyp, KO: *Col8a1<sup>-/-</sup>/Col8a2<sup>-/-</sup>*

Auch für die Wachstumsfuge der Tibien der 15,5 Tage alten Mäuse (Abbildung 3.30) wurde die Zellzahl/ Pixel in der hypertrophen Zone bestimmt (Abbildung 3.31).

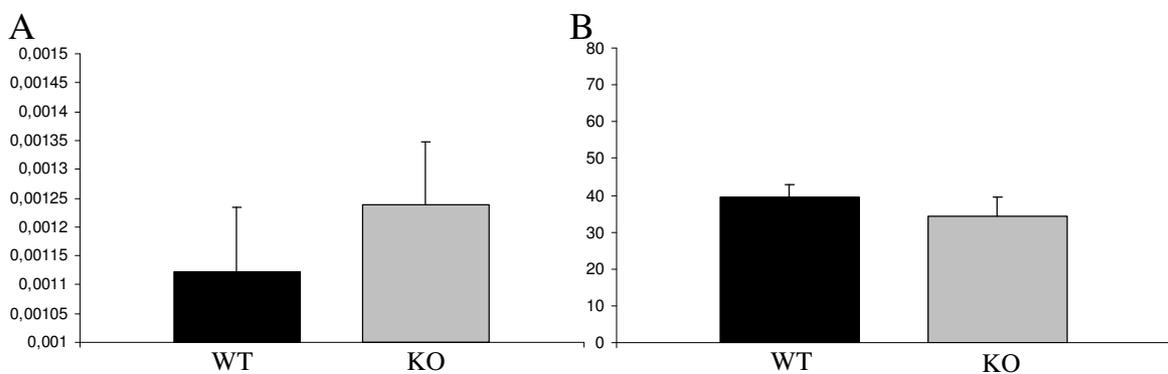
Der erste Eindruck, dass die Zellform in der Knockout-Maus unregelmäßiger waren und dass die Säulenbildung der Zellen weniger ausgeprägt war, konnte auf diese Weise nicht bestätigt werden. In die Auswertung wurden 4 Wildtyp-Mäuse, n = 6 Schnitte und 5 Knockout-Mäuse, n = 8 Schnitte, mit aufgenommen. Auch in der Wachstumsfuge der Tibien der 15,5 Tage alten Mäusen konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Zellen in der hypertrophen Zone oder in dem Anteil der hypertrophen Zone an der gesamten Wachstumsfuge zwischen Wildtyp und Knockout festgestellt werden.

Der Eindruck der unregelmäßigeren Säulenbildung der Zellen und des weniger regelmäßigen Übergangs zwischen der hypertrophen Zone und der prähypertrophen/proliferierenden Zone in den Wachstumsfugen der Knockout-Tiere bleibt aber dennoch bestehen und sollte nicht außer acht gelassen werden.

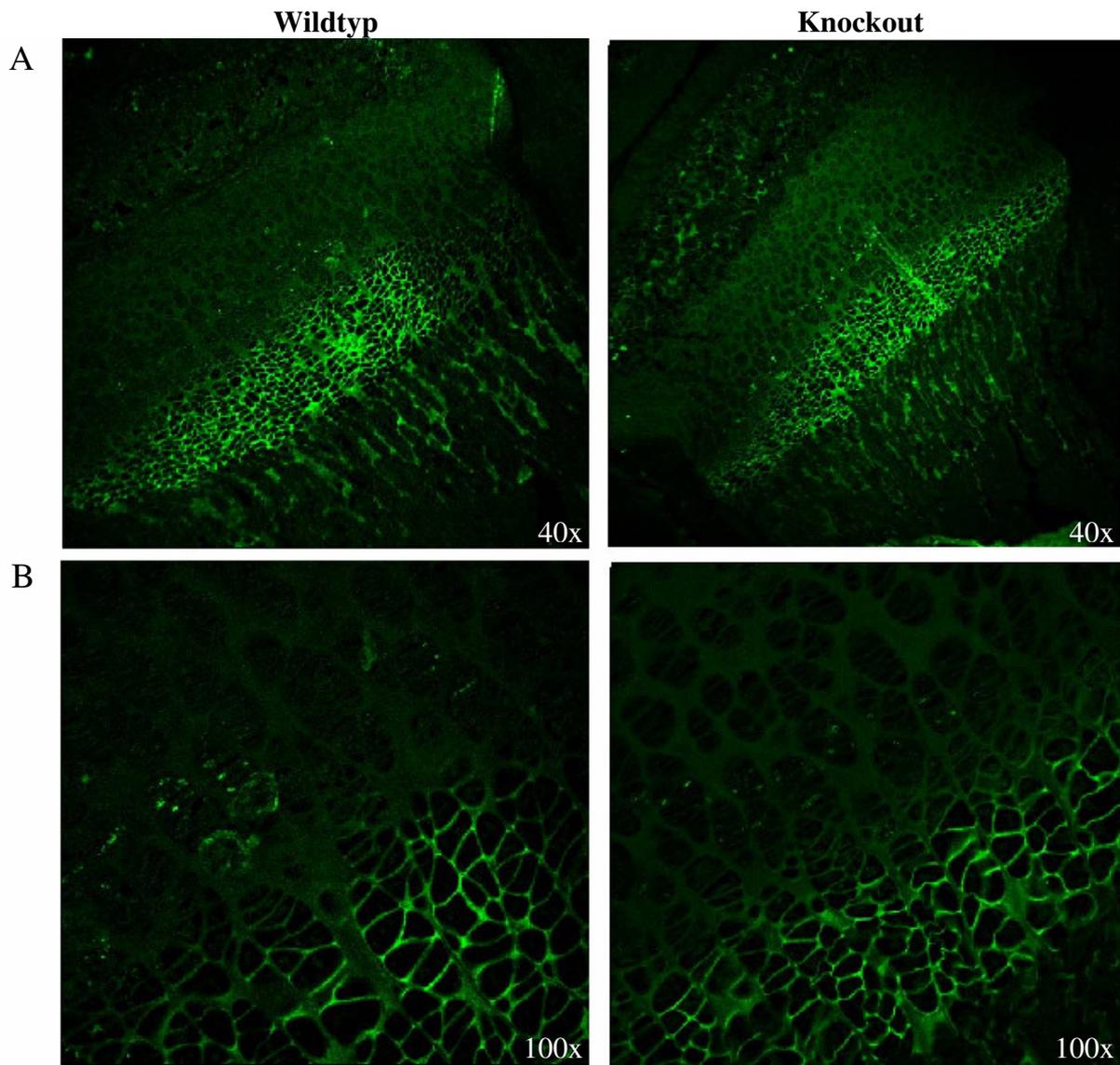
Als Alternative zu den immunhistochemischen Färbungen der Tibien wurden auch Immunfluoreszenzfärbungen vorgenommen (siehe Abbildung 3.32), sie erwiesen jedoch nicht als geeigneter für die Auswertungen.



**Abbildung 3.30: Immunhistologische Färbung gegen Kollagen X auf Tibien von 15,5 Tage alten Wildtyp- und Knockout-Mäusen.** Die hypertrophe Zone der Wachstumszone zeigt eine deutliche Braunfärbung. Vergrößerung: A: 40-fach, B: 100-fach



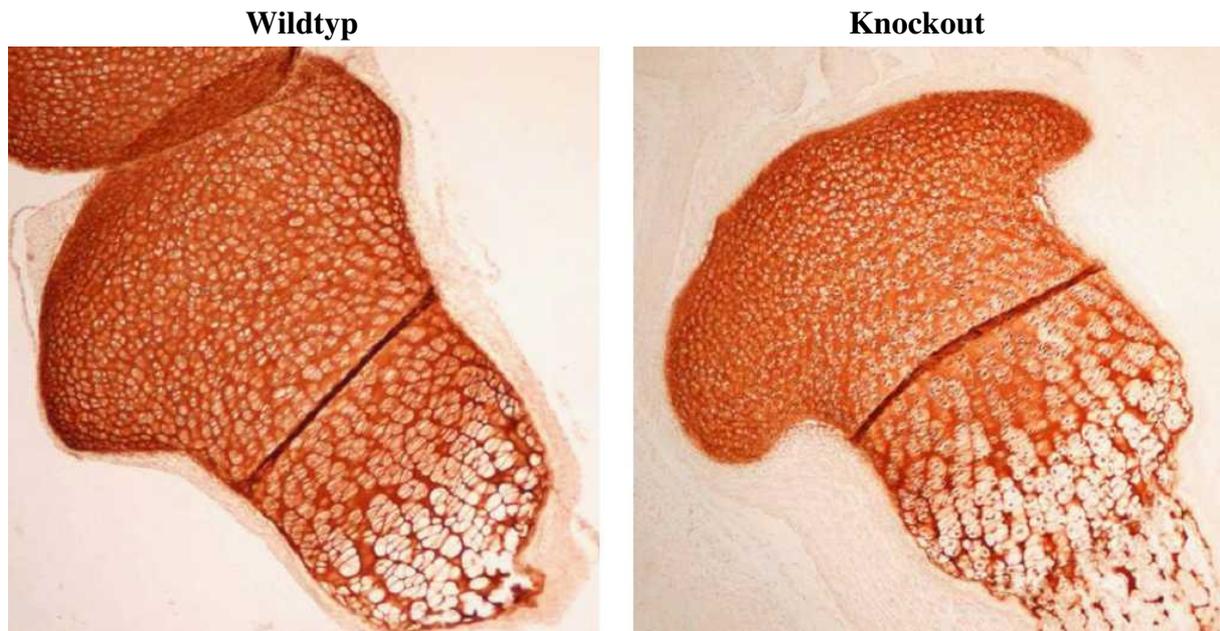
**Abbildung 3.31: Ergebnisse der Auswertung von Größe und Zellzahl der hypertrophen Zone der 15,5 Tage alten Wildtyp- und Knockout-Mäuse-Tibien.** A: Zellzahl pro Pixel in der hypertrophen Zone, B: Anteil der hypertrophen Zone an der Wachstumsfuge (%), WT: Wildtyp, KO: *Col8a1*<sup>-/-</sup>/*Col8a2*<sup>-/-</sup>



**Abbildung 3.32: Immunfluoreszenzfärbung gegen Kollagen X auf Tibien von 15,5 Tagen alten Wildtyp- und Knockout-Mäusen.** Vergrößerung: A: 40-fach, B: 100-fach

### 3.3.5.3 Immunhistochemische Färbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen Kollagen II

Zusätzlich zu den Kollagen X-Färbungen und den Alzian-Blau/Sirius-Rot-Färbungen wurde die Wachstumsfuge der Tibien aus Wildtyp und Knockout-Maus mit einem monoklonalen Antikörper gegen Kollagen II inkubiert. Wie in der Abbildung 3.33 gut zu erkennen ist, ergab sich hier gleichermaßen eine Färbung der gesamten Wachstumsfuge für Wildtyp und Knockout, was zumindest für den Wildtyp auch erwartet war (Blumbach et al., 2008).



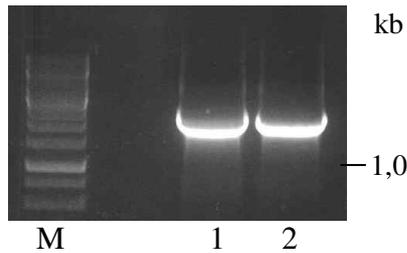
**Abbildung 3.33: Immunhistochemische Färbung gegen Kollagen II auf Tibien von neugeborenen Mäusen.** Vergrößerung: 40-fach

### 3.3.6 Überexpression der $\alpha 1$ -Kette von Kollagen VIII in kranialen Chondrozyten aus dem Sternum des Huhns

Die Anwesenheit der  $\alpha 1$ -Kette von Kollagen VIII verlangsamt nach den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen *in vitro* die Differenzierung und die Unterdrückung der Expression der  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA führt zu einer beschleunigten Differenzierung in kaudalen Hühnerchondrozyten. Allerdings scheint die völlige Abwesenheit der  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Ketten von Kollagen VIII auf die Organisation der Wachstumsfuge *in vivo* in Tibien der Maus keinen Einfluß zu haben. Aus diesen Gründen sollte nun die Überexpression der  $\alpha 1$ -Kette von Kollagen VIII in kranialen Hühnerchondrozyten untersucht werden.

Dazu wurde zunächst eine cDNA-Synthese (siehe 2.3.17.1) und dann eine PCR zur Amplifizierung des vollständigen ORFs von  $\alpha 1$ (VIII), allerdings ohne das Stoppsignal, aber mit *Eco* RI-Schnittstelle (N-terminal) und *Xho* I-Schnittstelle (C-terminal) durchgeführt (siehe 2.3.18.2). Das PCR-Produkt wurde in ein TOPO-Plasmid ligiert und, nach der Sequenzierung durch Eurofins MWG, in das pCMV-Tag4A-Plasmid umkloniert. Die Abbildung 3.34 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung des PCR-Produkts vor der Aufreinigung aus dem Gel. Im Plasmid C-terminal zu der Multiple Cloning Site befindet sich ein Flag-Tag, das, an die  $\alpha 1$ (VIII)-Protein-Kette gekoppelt, für den schnellen Nachweis mit einem Anti-Flag-Antikörper genutzt werden konnte. Das Plasmid wurde in *E. coli* Top F10` transformiert und durch Kanamycin wurden die Klone selektiert. Es wurde eine Plasmidpräparation vorgenommen, das Plasmid testverdaut und zur erneuten Sequenzierung eingeschickt (Eurofins-MWG). Der vollständige ORF von *Col8a1* war vorhanden und das Plasmid konnte für die Transfektion der Chondrozyten verwendet werden.

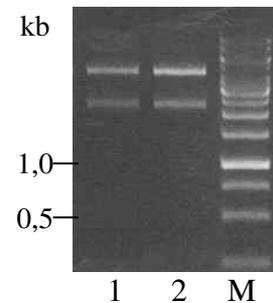
Ebenso wie für das Silencing wurde die Transfizierung mit dem Elektroporator von Amaxa (Lonza, Köln) und dem Human chondrocyte Transfection Kit (siehe 2.2.6) durchgeführt. Es wurden pro Transfizierung 2  $\mu$ g Plasmid eingesetzt. In der Abbildung 3.35 ist die das pCMV-Tag4A-Plasmid und das Insert nach Verdau mit den Enzymen *Eco* RI und *Xho* I nach gelelektrophoretischer Auftrennung zu sehen. Die erwartete Größe für das Insert war 2,22 kb und für das Plasmid 4,3 kb.



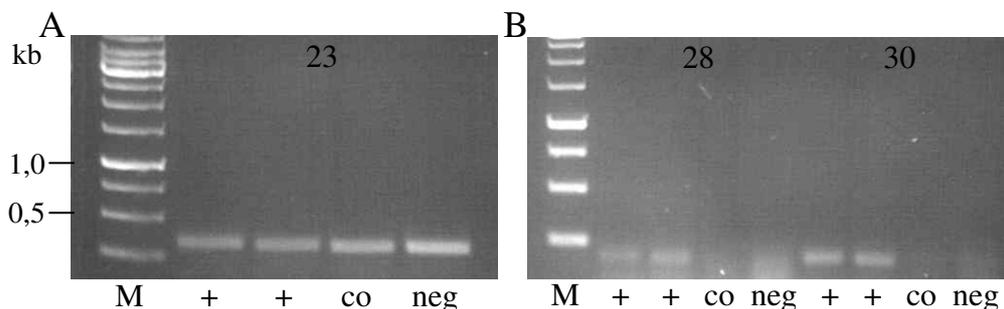
**Abbildung 3.34: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate zur Generierung des ORF von  $\alpha 1$ (VIII) aus dem Huhn ohne Stopcodon. 1 kb Gene Ruler, Insert 2,2 kb**

Als Kontrolle wurden die Zellen auch mit dem leeren pCMV-Tag 4A-Plasmid transfiziert und als zweite Negativ-Kontrolle gar nicht transfiziert. Die Zellen wurden drei Tage nach der Transfektion – Kultivierung auf Agarose - geerntet und es wurde RNA (siehe 2.3.8) isoliert. Es wurde ein Beta aktin Abgleich mittels semiquantitativer One step RT-PCR vorgenommen und anschließend eine semiquantitative One Step RT-PCR zur Überprüfung der Expression der  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA durchgeführt.

**Abbildung 3.35: Gelelektrophoretische Auftrennung nach Verdau mit *Eco* RI und *Xho* I des pCMV-Tag 4A Plasmid mit dem  $\alpha 1$ (VIII)-Insert. M: 1 kb Gene Ruler, Plasmid 4,3 kb, Insert 2,22 kb**

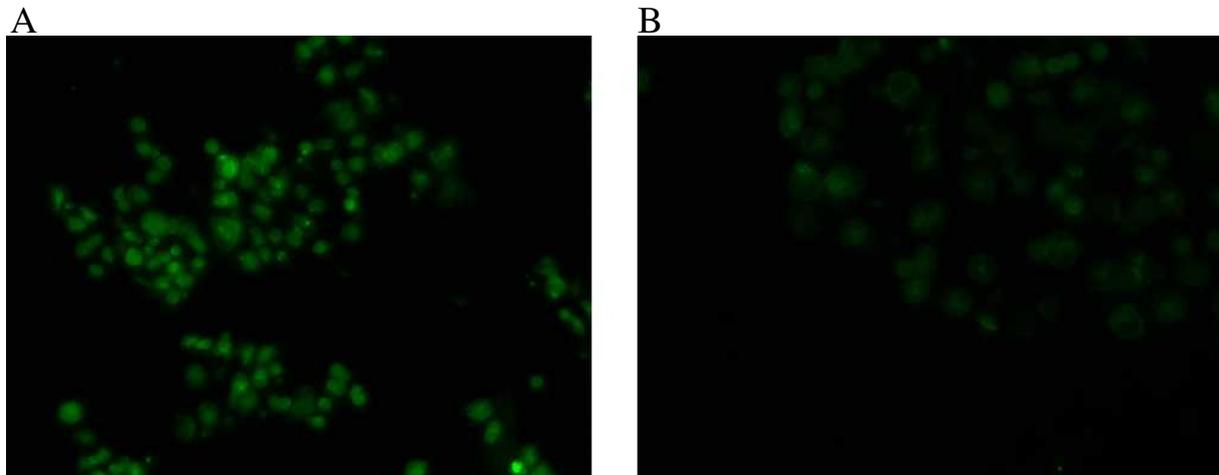


Die PCR Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Abbildung 3.36 A zeigt den Beta aktin-Abgleich und Abbildung 3.36 B Expression von  $\alpha 1$ (VIII). Es ist eine deutlich stärkere Expression in den Proben, die mit dem Plasmid und dem Insert transfiziert wurden (+) zu erkennen. In den beiden Kontrollen (co und neg) ist auch nach 30 Zyklen noch kein PCR-Produkt vorhanden. Für Beta aktin wurde eine Produktgröße von 353 bp erwartet und für  $\alpha 1$ (VIII) eine Produktgröße von 197 bp.



**Abbildung 3.36: Gelelektrophoretische Auftrennung einer semiquantitativen One Step-RT-PCR zur Überprüfung der Expression der  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA nach Transfizierung der kranialen Chondrozyten mit dem pCMV-Tag 4A-Plasmid. A: Beta aktin-Abgleich, B: Expression von  $\alpha 1$ (VIII), nach 28 (links) und 30 (rechts) PCR-Zyklen; Die Zellen der Probe + wurden mit dem Plasmid und dem Insert transfiziert, die Chondrozyten der Probe co wurde mit dem leeren Plasmid pCMV-Tag 4A transfiziert und die Chondrozyten der Probe neg wurden nicht transfiziert. M: 1kb Gene Ruler**

Für eine Immunfluoreszenzfärbung der Zellen wurden die Chondrozyten nach der Transfizierung statt auf Agarose in einer Schale ausgesät (siehe 2.2.7). Nach drei Tagen wurden die Zellen gewaschen und mit dem *Anti-Flag-Antikörper* inkubiert (2.2.7). Abbildung 3.37 zeigt die Fluoreszenzfärbung der Zellen. Im Gegensatz zu den nicht transfizierten Zellen (Abb. 3.37 B), war im Mikroskop bei den transfizierten Zellen (Abbildung 3.37 A) eine starke Fluoreszenz zu erkennen. Die Expression des gekoppelten Flags an das  $\alpha 1(\text{VIII})$ -Protein war also erfolgreich.



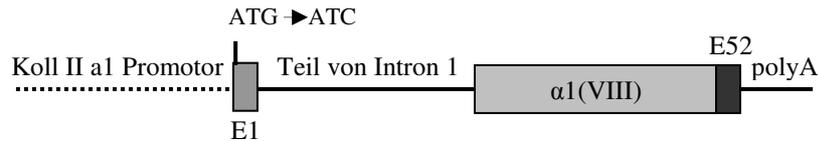
**Abbildung 3.37: Immunfluoreszenzfärbung mit einem polyklonalen Anti-Flag-Antikörper auf kranialen Sternum-Hühner-Chondrozyten.** A: Mit pCMV-Tag 4A und Insert transfizierte Chondrozyten, B: Nicht transfizierte Chondrozyten, Vergrößerung: 100-fach

Zur weiteren Auswertung der Überexpression der  $\alpha 1$ -Kette von Kollagen VIII in Hühnerchondrozyten hätten die Zellen über einen längeren Zeitraum, um die Differenzierungsmarker wie Kollagen X und die alkalische Phosphatase bestimmen zu können, in Kultur gehalten werden müssen. Unglücklicherweise starben viele Zellen bereits bei der Transfizierung, oder nach wenigen Tagen, so dass eine Beobachtung über ein bis zwei Wochen nicht möglich war. So konnte der Einfluß der Überexpression der  $\alpha 1(\text{VIII})$ -Kette auf die späte Differenzierung mit dieser Methode nicht untersucht werden.

Aus diesem Grund wurde überlegt, die  $\alpha 1(\text{VIII})$ -Kette knorpelspezifisch in Mäusen überzuexprimieren:

### 3.3.7 Überexpression der $\alpha 1$ -Kette von Kollagen VIII mit Hilfe des Kollagen II-Promotors in transgenen Mäusen

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, den ORF von *Col8a1* aus Maus in die Kollagen II Kasette zu klonieren, damit  $\alpha 1(\text{VIII})$  unter der Kontrolle des Kollagen II-Promotors knorpelspezifisch in Mäusen exprimiert werden kann. Kollagen II ist ein Protein, das besonders stark in Knorpelgewebe vorkommt. Es wurden bereits einige andere Gene unter dem Kollagen II-Promotor knorpelspezifisch exprimiert, z.B. die Cre Rekombinase und COMP (Sakai et al.,2001, Schmitz et al.,2008).



**Abbildung 3.38: Kollagen II-Promotor-Konstrukt.** Für die knorpelspezifische Expression von  $\alpha 1(\text{VIII})$  wurden das ORF-Konstrukt ohne Myc-Tag bzw. mit Myc-Tag unter die Kontrolle der regulatorischen Region des Kollagen Typ II Gens kloniert. Das fertige Transgen besteht aus der Kollagen II-Promotor-Region, dem Exon 1, bei dem das Startkodon mutiert wurde (ATG zu ATC), einem Teil von Intron 1 des *Kol2a1*-Gens, einer Splicing Akzeptor-Stelle, dem  $\alpha 1(\text{VIII})$ -Konstrukt (mit bzw. ohne Myc-Tag), dem Exon 52 und dem Polyadenylierungssignal.

Die Abbildung 3.38 zeigt das fertige Konstrukt schematisch.

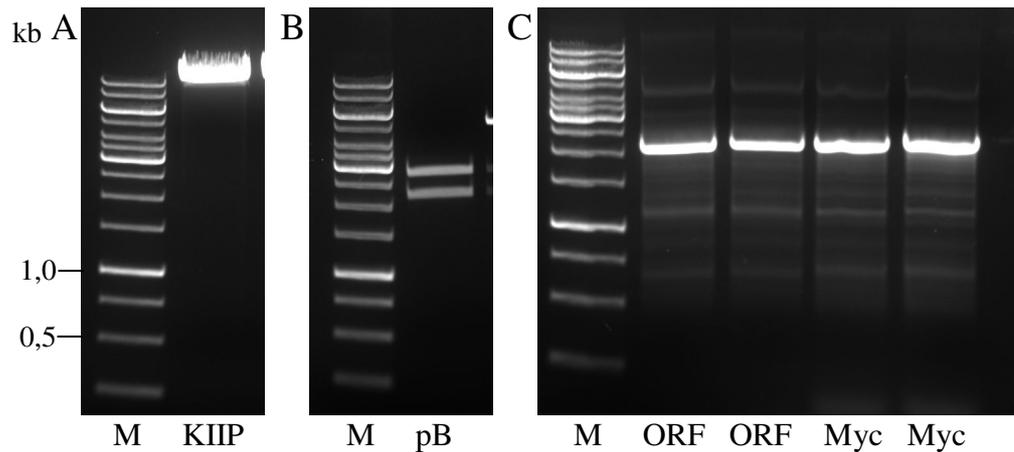
Das Kollagen II-Promotor-Plasmid wurde uns von Herrn Dr. Attila Aszodi (Martinsried) zur Verfügung gestellt, dessen Arbeitsgruppe auch die Mikroinjektion des Plasmids in den männlichen Vorkern der Oocyte der Maus durchführen wird.

Für die Generierung des ORFs von *Col8a1* aus Maus haben wir freundlicherweise die  $\alpha 1(\text{VIII})$ -cDNA von Frau Dr. Ulrike Hopfer (Basel) erhalten. Das erhaltene Blueskript-Plasmid wurde testweise mit *Eco* RI und *Xho* I verdaut, bei dem das Insert herausgeschnitten wurde (Abbildung 3.39. B). Außerdem wurde es sequenziert.

Für die Klonierung des ORFs in das Kollagen II-Promotor-Plasmid mußten Blunt-End-Schnittstellen generiert werden. *Dra* I schneidet nicht in der Sequenz der  $\alpha 1(\text{VIII})$ -cDNA und wurde deshalb ausgewählt. Es wurden Primer ausgesucht, die an das 5' und das 3'-Ende des ORFs binden und es wurde die *Dra* I-Schnittstelle an das jeweilige Ende synthetisiert. Ein zweites Konstrukt wurde geplant, an dem am C-terminalen Ende zusätzlich noch ein Myc-Tag kodiert wurde. Dieser soll später dazu dienen, die Expression der  $\alpha 1(\text{VIII})$ -Kette besser nachweisen zu können, da die verwendeten Antikörper gegen Kollagen VIII bis jetzt erfolglos auf Western Blots eingesetzt wurden. Gegen den Myc-Tag gibt es einen funktionierenden Antikörper.

Die Abbildung 3.39 C zeigt die PCR-Produkte der Synthesen des ORFs mit und ohne Myc-Tag. Als Templat für die PCR wurde das Blueskript-Plasmid mit der  $\alpha 1(\text{VIII})$ -cDNA als Insert von U. Hopfer eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden ausgeschnitten, es wurde ein A-Tailing gemacht (siehe 2.3.19.5), aufgereinigt und in TOPO kloniert (2.3.6.8). Es wurden *E.coli* 10F<sup>+</sup> mit dem TOPO-Plasmid transformiert, auf Kanamycin haltigen Agarplatten ausgestrichen, Klone gepickt und eine Plasmidpräparation vorgenommen. Die isolierten Plasmide wurden Test-verdaut und zum Sequenzieren eingeschickt (Eurofins MWG, Ebersbach). Nach der Sequenzierung wurden die ORF-Sequenzen mit *Dra* I aus dem Topo-Plasmid herausgeschnitten, der Verdau auf ein Gel aufgetragen und die Bande von  $\alpha 1(\text{VIII})$  aus dem Gel ausgeschnitten und in das Kollagen II-Promotor-Plasmid ligiert. Das Plasmid wurde zuvor mit *Eco* RV linearisiert, aufgereinigt und es wurden die überstehenden Phosphatgruppen entfernt (mit CIP, siehe 2.3.19.7), damit zwischen dem Plasmid und dem ORF eine Ligation stattfinden konnte. Nach dem Entfernen der überstehenden Phosphatgruppen wurde das Plasmid noch einmal aufgereinigt, bevor die Ligation stattfinden konnte. Die Abbildung 3.39.A zeigt das mit *Eco* RV verdaute Kollagen II-Promotor-Plasmid und B zeigt das pBluescript-Plasmid mit dem herausgeschnittenen Kollagen  $\alpha 1(\text{VIII})$ -Insert.

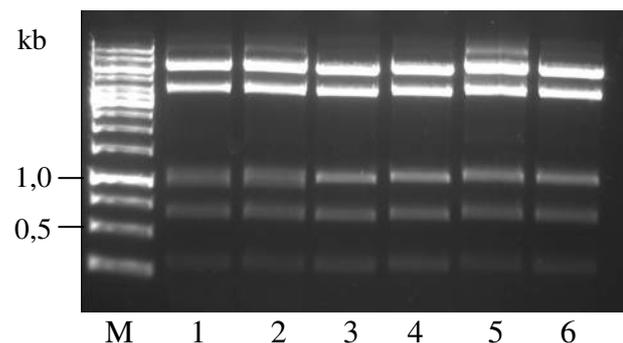
Für die Kollagen II Kasette wurde eine Größe von mehr als 10 kb erwartet (Abb. 3.39 A), für das Blueskript eine Größe von 3000 bp und für das Insert 2235 bp (Abb. 3.39 B) und für den ORF von Kollagen VIII eine Größe von 2235bp (ohne Tag) bzw. 2268 bp (mit Tag) (abb. 3.39 C).



**Abbildung 3.39: Kollagen II-Promotor-Plasmid (A) und pBluescript-Plasmid mit der  $\alpha 1(\text{VIII})$ -cDNA aus Maus als Insert nach *Eco* RI und *Xho* I-Verdau (B) nach gelelektrophoretischer Auftrennung. C zeigt die gelelektrophoretische Trennung der PCR-Produkte nach Synthese des ORFs von  $\alpha 1(\text{VIII})$  mit *Dra* I-Schnittstellen und dem ORF und dem Myc-Tag mit *Dra* I. Schnittstelle. M: 1kb Gene Ruler**

Nach der Ligation von dem Kollagen II-Promotor-Plasmid und dem ORF von  $\alpha 1(\text{VIII})$  wurde das fertige Konstrukt in *E. coli* 10F<sup>+</sup> kloniert und die Bakterien wurden auf Ampicillin-haltigen Platten ausgestrichen. Die angewachsenen Klone wurden gepickt und als eine erste Kontrolle mit *Nco* I verdaut. Bei einem Verdau des vollständigen Konstruktes wurden Banden der Größe 6442 bp, 4170 bp, 1108 bp, 687 bp, und 309 bp erwartet. Drei Schnittstellen für *Nco* I liegen in dem ORF-Insert und zwei Schnittstellen in der Kollagen II Kasette. Wenn das Insert von 3' in 5'-Richtung integriert worden war, fehlte die 1108 bp große Bande. Die Klone, bei denen die 1108 bp großen Bande nach dem *Nco* I-Verdau vorkam, wurden zur Sequenzierung zu Eurofins MWG geschickt. Die Klone mit den richtigen Sequenzen wurden dann zu einer weiteren Plasmidpräparation genutzt. Die Abbildung 3.40 zeigt die Plasmide nach einem *Nco* I-Verdau und nach Aufreinigung auf einem Agarosegel.

**Abbildung 3.40: Gelelektrophoretische Auftrennung der Kollagen II-Plasmide mit ORF-Inserts nach Verdau mit *Nco* I.** Die Reihen 1 und 2 zeigen das Plasmid mit ORF und dem Myc-Tag, die Reihen 3 bis 6 zeigen das Plasmid mit dem ORF ohne Myc-Tag. M: 1kb Gene Ruler



### 3.3.8 Immunfärbung mit Kollagen VIII-AK

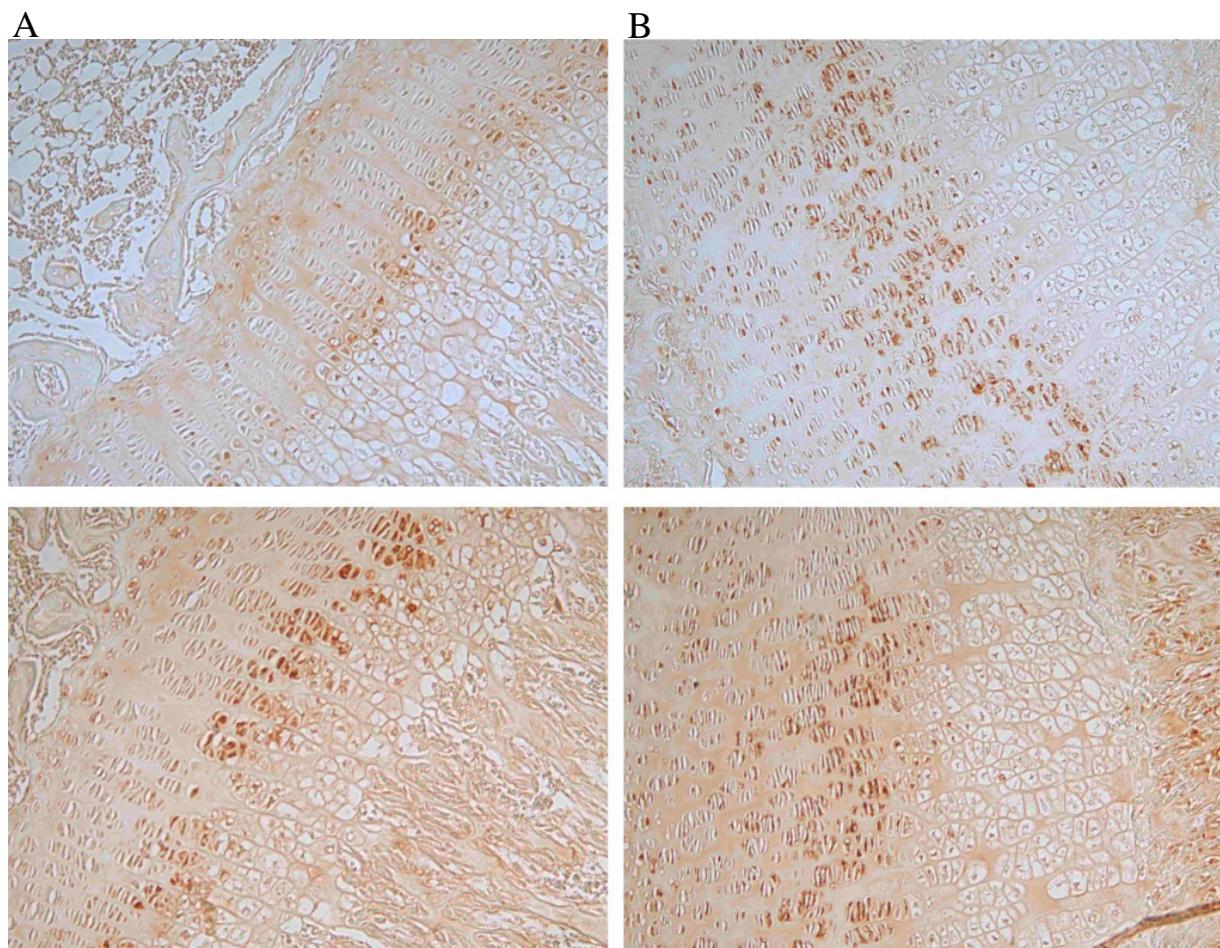
Kollagen VIII wird in der Wachstumsfuge der Tibia der Maus exprimiert: Während Untersuchungen zu der Kollagen X Knockout Maus wurde unter anderem auch die Expression von Kollagen VIII in der Wachstumsfuge mittels in situ Hybridisierung nachgewiesen (Kwan et al., 1997).

Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit die Protein-Expression von Kollagen VIII in der Wachstumsfuge nachgewiesen werden. Bisher standen 2 Antikörper zu Verfügung (siehe 2.5.3.2.1).

Der Antikörper von Gentaur wurde für Färbungen auf der menschlichen Niere eingesetzt (Gerth et al., 2007). Zunächst wurde der Antikörper auf Paraffin-Schnitten getestet und es konnte eine Färbung innerhalb der Zellen der prähypertrophen Zone detektiert werden. Als Negativ-Kontrolle wurde die *Col8a1<sup>-/-</sup>/Col8a2<sup>-/-</sup>*-Maus parallel gefärbt. Unglücklicherweise wurde bei diesen Mäusen ebenfalls eine intrazelluläre Färbung in der prähypertrophen Zone entdeckt, so dass von einer Hintergrundfärbung gesprochen werden muß. Die Abbildung 3.41 zeigt die Wildtyp- (A) und Knockout-Maus (B) Schnitte.

Für die Herstellung und Färbung von Kryoschnitten, wurden Tibien von neugeborenen Wildtyp Mäusen eingebettet, schockgefroren und in einem Kryostat geschnitten (siehe 2.5.2). Als Positiv-Kontrolle wurden bereits vorhandene Kryoschnitte von Mäusenieren verwendet.

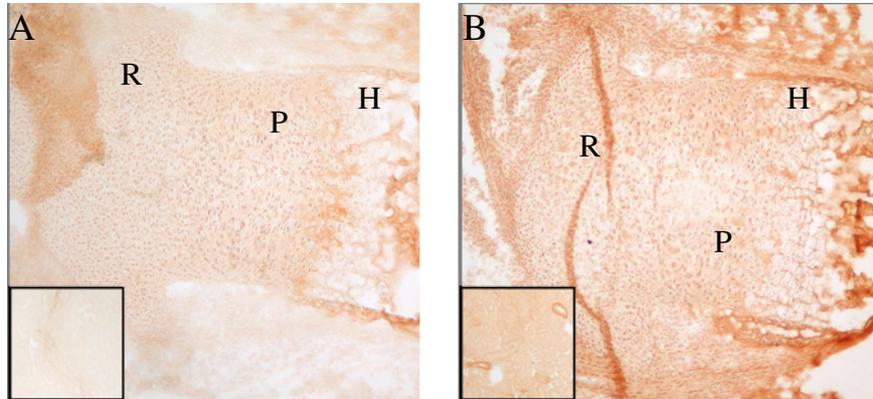
Die immunhistologische Färbung wurde wie bei den Paraffinschnitten vorgenommen.



**Abbildung 3.41: Immunhistologische Färbung von Maus-Tibia Schnitten (15,5 Tage alte Mäuse) mit einem polyklonalen Antikörper gegen Kollagen VIII. A zeigt die Wildtypmaus, B die *Col8a1<sup>-/-</sup>/Col8a2<sup>-/-</sup>*-Maus, Vergrößerung: 100-fach**

In der Abbildung 3.42 ist in der Wachstumsfuge sowohl in der Negativ-Kontrolle (A) als auch in der Probe (B), die auch mit dem 1. Antikörper behandelt wurde, eine leichte Färbung zu erkennen. In den kleinen Bildern kann man jeweils Schnitte der Niere einer Maus erkennen. In der Negativ-Kontrolle (A), ohne den ersten Antikörper, ist keine Färbung zu sehen, aber in der Probe, bei der der 1. Antikörper verwendet wurde, ist eine deutliche Färbung von

Arterienwänden zu erkennen. Der Antikörper funktioniert also auf Kryoschnitten von Nieren, allerdings nicht von Wachstumsfugen. Auf diese Weise konnte keine Expression von Kollagen VIII in der Tibia der Maus nachgewiesen werden. Der zweite Kollagen VIII-Antikörper (Abcam) konnte in der Immunhistologie bis jetzt gar nicht erfolgreich angewendet werden.



**In der Abbildung 3.42 ist die Färbung von Kryoschnitten abgebildet.** Bei der Wachstumsfuge ist sowohl in der Negativ-Kontrolle (A) als auch in der Probe (B) eine leichte Färbung zu erkennen. Unten links im Bild ist jeweils der Schnitt durch eine Mäuseniere gezeigt. Zur Kontrolle des Antikörpers wurden Nierenschnitte gefärbt. In A ist die Negativ-Kontrolle und in B die deutliche Färbung einer Arterienwand der Niere zu erkennen. R: Ruhezzone, P: Proliferative Zone, H: Hypertrophe Zone, Vergrößerung: 40-fach

### 3.3.9 Western Blot-Analyse mit Kollagen VIII-AK

Die beiden Antikörper gegen Kollagen VIII (Gentaur, Brüssel, Abcam, England) wurden auch auf Western Blots getestet. Die Western Blots wurden mit boviner Cornea und Cornea aus Huhn (bereitgestellt durch Phillip Uhlig und Lei Wang, Institut für physiologische Chemie und Pathobiochemie, Münster) und mit Medium aus der Kultur mit Hühnerchondrozyten und Mäusechondrozyten vorgenommen. Cornea wurde verwendet, weil Kollagen VIII in größeren Mengen in der Descement`s-Membran des Auges vorkommt.

Mit dem Kollagen VIII-Antikörper von Gentaur wurde kein Signal erhalten, weder für Maus noch für Huhn. Mit dem Antikörper von Abcam gab es positive Signale auf Blots, mit Proteinen aus Medium der Hühnerchondrozyten aus Kultur. Allerdings variierten die Höhe der Signale. Erwartet wurde nach Angaben des Herstellers ein Signal um die 72 kDa, jedoch gab es auch Banden von höherer Größe. Es wurden SDS-Gele mit Comassie Brilliantblau gefärbt, Banden in der erwarteten Höhe ausgeschnitten und zum Sequenzieren verschickt (siehe 2.4.8 und 2.4.9.). Kollagen VIII wurde nicht gefunden.

Da die Ergebnisse beim Hybridisieren der Western-Blots zu unterschiedlich ausfielen, wird hier auf eine Abbildung verzichtet.

### 3.3.10 Immunfärbung mit ADAMTS-like 1

ADAMTS-like 1 wurde mittels Gene Array in kaudalen Chondrozyten als achtfach hochreguliert gefunden (siehe Tabelle 3.4). Der Northern Blot bestätigte die stärkere Expression in kaudalen Chondrozyten (siehe Abbildung 3.11) und die semiquantitative One Step-PCR zeigte ebenfalls in kaudalen Zellen eine geringere Expression von ADAMTS-like 1 in der fortgeschrittenen Differenzierung (siehe Abbildung 3.15).

Aus diesen Gründen lag der Wunsch eines Nachweises von ADAMTS-like 1 auf Proteinebene nahe. Dazu wurden Wachstumsfugen von Tibien von neugeborenen und 15,5 Tage alten Mäusen mit einem monoklonalen Antikörper gegen menschliches ADAMTS-like 1 (Acris, Littleton, CO, USA) gefärbt (siehe 2.5.3.2.) und Western-Blots mit gefällttem Medium der Hühnerchondrozyten angefertigt (siehe 2.4.2, 2.4.7 und 2.4.11). Auf den Western-Blots erkannte der Antikörper entweder nichts oder verschiedene Banden, wo keine der erwarteten Größe von 55 kDa entsprach.

Die Färbung der Tibien wurde mit verschiedenen Verdünnungen des Antikörpers getestet. Es konnte kein Signal detektiert werden. Aus diesem Grund wird hier auch keine Abbildung gezeigt.

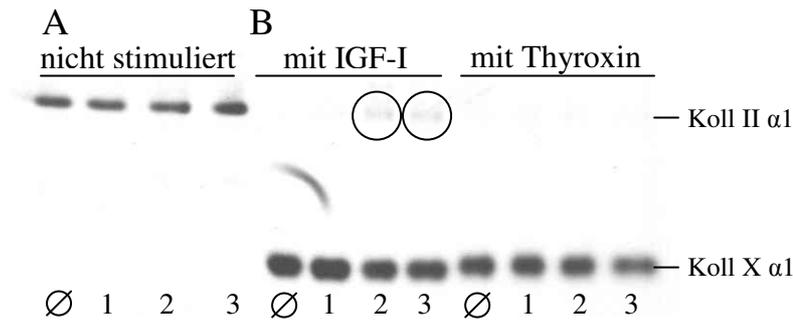
### 3.3.11 Untersuchung der Carboanhydrase, die in kranialen Chondrozyten hochreguliert ist

Die Carboanhydrase, ein Enzym, das die Reaktion von Kohlestoffdioxid und Wasser zu Kohlensäure katalysiert, wurde im Gene Array als in kranialen Zellen 40-fach hochreguliert gefunden (siehe Tabelle 3.5). Da Inhibitoren dieses Enzyms weitläufig bekannt und gut käuflich zu erwerben sind, etwa Acetazolamid (Becker, 1955), wurde ein einfacher Versuch durchgeführt:

Kraniale Chondrozyten wurden in Agarose eingebettet und für 14 Tage kultiviert. Nach Stimulation mit IGF I oder Thyroxin hypertrophieren kraniale Zellen und exprimieren typische Differenzierungsmarker wie die alkalische Phosphatase und Kollagen X. Einigen Schalen mit Zellen wurde, ebenso regelmäßig wie IGF I bzw. Thyroxin, alle 2 bis 3 Tage, der Inhibitor Acetazolamid in verschiedenen Konzentrationen (5- 2500  $\mu\text{M}$ ) zugegeben.

Nach 14 Tagen wurden die Zellen mit [ $\text{C}^{14}$ ]- Prolin stimuliert, am 15. Tag geerntete und es wurde eine Isolierung der Pepsin-resistenten Kollagene (siehe 2.4.4), eine SDS-PAGE (2.4.7) und eine Fluographie (2.4.10) vorgenommen.

In Abbildung 3.43 ist das Fluorogramm der SDS-Page zu sehen. Die kranialen Zellen, die nicht stimuliert worden sind, haben kein Kollagen X, sondern nur Kollagen II exprimiert (A). Es ist kein Unterschied zwischen der nicht mit Acetazolamid behandelten Zellen und den mit Acetazolamid in verschiedenen Konzentrationen behandelten Zellen zu erkennen. Die mit IGF-I und Thyroxin stimulierte Zellen produzierten alle Kollagen X (B) und kein Kollagen II mehr, mit Ausnahme der Zellen, die mit IGF-I stimuliert und mit 50 bzw. 500  $\mu\text{M}$  Acetazolamid behandelt worden waren (B, 2 und 3). In diesen Proben wurde noch eine kleine Menge an Kollagen II exprimiert, was ein Hinweis auf verlangsamte Differenzierung durch Inhibierung der Carboanhydrase ist. Da die Quantität an verabreichtem Inhibitor allerdings bereits ziemlich groß war, wurde hier nicht weiter experimentiert.



**Abbildung 3.43: Fluorogramm einer SDS-PAGE zur Bestimmung der Kollagen II und X Expression in kranialen Chondrozyten mit (B) und ohne (A) Stimulierung durch IGF-I bzw. Thyroxin.** Ø : nicht gehemmt mit Acetazolamid, 1: 5  $\mu$ M Acetazolamid, 2: 50  $\mu$ M Acetazolamid, 3: 500  $\mu$ M Acetazolamid. In Reihe 2 und 3 der mit IGF I und mit 50  $\mu$ M und 500  $\mu$ M Acetazolamid behandelten Proben, sind noch schwache Kollagen II  $\alpha$ 1-Banden zu erkennen, was auf eine leicht verzögerte Hypertrophierung der Zellen hinweist.

### 3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels einer suppressiven, subtraktiven cDNA-Bank und eines Micro Arrays Gene identifiziert, die in Chondrozyten, isoliert aus dem kaudalen und kranialen Teil eines embryonalen Hühnersternums, differentiell exprimiert werden.

Vergleiche der cDNA-Bank mit den Ergebnissen der Gene Arrays haben gezeigt, dass die reverse Reaktion mit RNA aus kranialen Zellen als „tester“ und RNA aus kaudalen Zellen als „driver“ große Übereinstimmungen mit den Daten des Gene Arrays zur Expression verschiedener Gene in kranialen Zellen hatte. Die forward Reaktion mit RNA aus kaudalen Zellen als „tester“ und RNA aus kranialen Zellen als „driver“ hingegen zeigte weniger Übereinstimmung mit den Daten des Gene Arrays zur Expression verschiedener Gene in kaudalen Zellen. Für Ferritin wurde per Northern Blot nachgewiesen, dass es in kranialen und nicht, wie mit der SSH identifiziert, in kaudalen Zellen stärker exprimiert wird.

Für die mRNA der  $\alpha$ 1-Kette von Kollagen VIII allerdings zeigten sowohl die Ergebnisse aus der SSH als auch die Auswertungen der Gene Arrays, dass sie in kaudalen Chondrozyten stärker exprimiert wird.

Diese Ergebnisse konnten durch Northern Blots und One Step-RT-PCRs bestätigt werden. Auch die mRNA der  $\alpha$ 2-Kette von Kollagen VIII ist in kaudalen Chondrozyten stärker exprimiert und wird, wie  $\alpha$ 1 während der späten Differenzierung *in vitro* in kaudalen Chondrozyten herunterreguliert. Gleichmaßen wie die Expression der  $\alpha$ 1(VIII)-mRNA abnimmt, steigt die Expression der mRNA der  $\alpha$ 1-Kette von Kollagen X, einem Hypertrophiemarker, in der späten Differenzierung.

Im nächsten Schritt wurde die Expression der  $\alpha$ 1(VIII)-mRNA in kaudalen Chondrozyten während der späten Differenzierung *in vitro* mit Hilfe von zwei siRNA-Sequenzen unterdrückt. Der Effekt des Silencing hielt mindestens für fünf Tage nach der Transfektion an und hatte seinen Höhenpunkt etwa drei Tage nach der Transfektion. Die Expression der  $\alpha$ 2(VIII)-mRNA wurde durch das Experiment nicht beeinflusst.

Ein Effekt des Silencing der  $\alpha$ 1(VIII)-mRNA zeigte sich in der größeren Synthese von Kollagen X und gesteigerter Aktivität der alkalischen Phosphatase am 11. Tag der Kultivierung der kaudalen Chondrozyten. Im Vergleich zu den Kontrollen war die alkalische Phosphatase um den Faktor 3,6 aktiver und das Verhältnis von Kollagen X zu Kollagen II war um den Faktor 75 höher. (Der Faktor wurde aus den Mittelwerten der gesilenceten Probe und der scrambled Kontrolle dreier unabhängiger Experimente berechnet.). Das Silencing der

$\alpha 1(\text{VIII})$ -mRNA führte also zu einer deutlichen Beschleunigung der späten Chondrozytendifferenzierung.

Der Versuch des Silencing der  $\alpha 2$ -mRNA von Kollagen VIII blieb erfolglos.

Die  $\text{Col8a1}^{-/-}/\text{Col8a2}^{-/-}$ -Maus hat eine Veränderung der Descemet-Membran im Auge (Hopfer et al., 2005) und wurde uns von Dr. Ulrike Hopfer für die nähere Untersuchung der Wachstumsfugen der Tibien zur Verfügung gestellt.

Die Auswertung einer Alzian-Blau/Sirius-Rot und einer immunhistologischen Färbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen Kollagen X zeigten keinen Unterschied bezüglich der Zellzahl oder der Größe der einzelnen Zonen zwischen der Wildtyp- und der Knockout-Maus. Die Färbung gegen Kollagen X ist sowohl in der Wildtyp- als auch in der Knockout-Maus auf die hypertrophe Zone beschränkt.

Die Überexpression der  $\alpha 1$ -Kette von Kollagen VIII mit Hilfe eines pCMV4-Plasmids in kranialen Hühner-Chondrozyten konnte mittels einer One Step-RT-PCR und einer Fluoreszenzfärbung der Zellen nachgewiesen werden, doch der Effekt konnte aufgrund der niedrigen Überlebensrate der Zellen nicht untersucht werden.

Für die Generierung einer transgenen Maus, die die  $\alpha 1(\text{VIII})$ -Kette unter der Regulierung des Kollagen II-Promotors im Knorpel überexprimiert, wurde der ORF, mit und ohne Myc-Tag, in ein pBluescript-Plasmid mit der Promotor-Region aus Kollagen II (Kollagen II Kasette) integriert. Die Herstellung der transgenen Mäuse übernimmt die Gruppe von Attila Aszodi (Fraunhofer-Institut, Martinsried).

Den Nachweis von Kollagen VIII auf Proteinebene war bis jetzt nicht möglich. Mittels Western Blot und Immunfärbung von Wachstumsfugen von Maustibien wurde versucht, ein Signal für Kollagen VIII zu erhalten, aber dies gelang bis jetzt nicht.

ADAMTS-like 1 und Ferritin wurden ebenfalls als in kaudalen Zellen stärker exprimiert gefunden.

Die Northern Blot-Analyse zu ADAMTS-like 1 bestätigte dieses Ergebnis. Während der Spätdifferenzierung von kaudalen Chondrozyten *in vitro* wurde ADAMTS-like 1 weniger exprimiert. Die weitere Analyse von ADAMTS-like 1 auf Ebene der Proteine war nicht möglich, da nur unspezifische Signale auf dem Western-Blot detektiert wurden und die immunhistologische Färbung der Wachstumsfuge von Mäusetibien kein Ergebnis brachte.

Bei Ferritin konnte eine stärkere Expression in kaudalen Zellen durch Northern Blots nicht bestätigt werden. So wurde Ferritin als ein falsch positiver Klon der SSH gewertet.

Das Enzym Carboanhydrase wurde in dem Gene Array als stärker exprimiert in kranialen Chondrozyten identifiziert. Da es 40-fach stärker exprimiert wurde, wurde *in vitro* mit einem einfachen Test überprüft, ob es für die Chondrozyten bei der späten Differenzierung wichtig ist. Azetazolamid ist ein Hemmer der Carboanhydrase und wurde in verschiedenen Mengen zu kranialen Zellen in Agarosekultur gegeben. Der Effekt auf die Differenzierung war minimal. Nur bei Zugabe einer recht großen Menge von Azetazolamid und Stimulierung durch IGF-I wurde die Differenzierung leicht verzögert.

## 4. Diskussion

Das embryonale Hühnersternum am 17. Tag der Bebrütung eignet sich sehr gut als Model zur Untersuchung der enchondralen Ossifikation.

Die Chondrozyten in verschiedenen Bereichen des Sternums besitzen in dieser Entwicklungsstufe eine unterschiedliche Ansprechbarkeit auf Differenzierungssignale (Castagnola et al., 1986, LuValle et al., 1992). Während die kranialen Zellen nach ihrer Isolierung aus dem Sternum in Kultur leicht zur Hypertrophierung angeregt werden können, bleiben die kaudalen Zellen in der ruhenden und proliferativen Phase. In Co-Kultur mit kranialen Zellen sind sie sogar in der Lage, ihre und die Hypertrophie der kranialen Zellen zu unterdrücken (Böhme et al., 1995). Um die dafür verantwortlichen Faktoren zu identifizieren, wurden mit RNA aus den kaudalen und kranialen Zellen eine suppressive, subtraktive Hybridisierung (SSH) (Clontech-Bioscience, USA) durchgeführt und ein Chicken-Gene Array (Affymetrix, USA) hybridisiert.

Diese beiden Methoden und ihre Effizienz sollen zunächst miteinander verglichen werden.

### 4.1 Methoden für die Identifikation differentiell exprimierter Gene

#### 4.1.1 Suppressive subtraktive Hybridisierung und Gene Array im Vergleich

Cao et al. (2004) haben die beiden Methoden SSH (Clontech) und Gene Array (Affymetrix) experimentell gegenübergestellt, wie es auch in der vorliegenden Arbeit geschehen ist. Aus diesem Grund eignet sich die Veröffentlichung gut, die beiden Methoden zu diskutieren. Cao et al. wollten die Expressionsmuster *in vitro* von menschlichen dendritischen Zellen während der Entwicklung vergleichen. Bei der SSH wurden 10.000 Klone untersucht und 2.000 Transkripte erfolgreich sequenziert. In dem Gene Array wurden davon 73 % (1409 Transkripte) durch eine Sonde repräsentiert, von denen 571 Transkripte mit „abwesend“ bewertet wurden; es konnte also kein Signal detektiert werden. Unter diese Zahl fielen sowohl Transkripte, die stark vertreten waren, als auch solche, die nur in sehr geringer Menge exprimiert wurden. Ein Drittel der 1409 Transkripte wurden auch in dem Gene Array als hochreguliert gefunden. Die übrigen zwei Drittel waren im Ergebnis des Gene Arrays entweder gleich oder herunterreguliert.

Es gab fälschlicherweise als "differenziell reguliert" identifizierte Transkripte, sowohl in der SSH als auch im Gene Array. Es war also bei beiden Methoden eine weitere Analyse der gefundenen Transkripte per Real-Time-PCR, Northern Blot oder Western Blot notwendig (Cao et al., 2004). In dieser Arbeit wurden ebenfalls Northern Blot-Analysen zur Bestätigung der Ergebnisse aus SSH und Gene Array durchgeführt. Ein in der SSH auffälliger Klon wurde als falsch positiv identifiziert.

Zu der Bewertung der beiden unterschiedlichen Methoden sagten die Autoren, dass die Hälfte der mit der SSH identifizierten Transkripte mit dem Gene Array nicht gefunden worden wären. Sie begründen dies mit einer schlechten Effizienz der *in vitro* Transkription.

In der vorliegenden Arbeit wurden durch das nach der Herstellung der cDNA-Bank durchgeführte Screening sieben Klone in kaudalen Zellen als stärker exprimiert identifiziert, von denen einer dreimal identifiziert wurde (Matrix Gla Protein). Sieben Klone wurden als "kranial verstärkt exprimiert" identifiziert (siehe Tabellen 3.2 und 3.3 der Ergebnisse). Um weitere Gene zu finden, hätten weitere Screenings durchgeführt werden können. Von den kaudal möglicherweise stärker exprimierten Genen wurden der Est7m5 (mittlerweile als Teil der  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA von Kollagen VIII identifiziert, siehe Anhang), und die Ferritin-H-Kette per Northern Blots untersucht. Der Est7m5 wurde als 3,5 mal stärker kaudal exprimiert bestätigt,

was die These von Diatchenko et al. (1996) bestätigt, dass auch schwach differentiell exprimierte Gene gefunden werden können. Die Northern Blots mit einer Sonde gegen Ferritin zeigten, dass Ferritin in kranialen Zellen etwa zweimal stärker als in kaudalen exprimiert wird. Das Ergebnis zeigt, dass die Kontrolle der identifizierten Gene mittels Northern Blot oder ähnlichen Methoden notwendig ist (Cao et al., 2004).

Es wurde im Gene Array für fünf Klone, die mittels der SSH als in kaudalen Zellen hochreguliert gefunden worden sind, kein Ergebnis gefunden. Für zwei der fünf Klone existierten auf den Arrays keine Sonden, für die anderen drei, welche alle das Matrix Gla Protein kodierten, gab es eine Sonde, aber es war nicht gelungen, die Hybridisierung quantitativ zu bestimmen. Für die in kranialen Zellen als hochreguliert gefundenen Sequenzen existierten für alle Sieben Sonden. Zwei konnten allerdings nicht ausgewertet werden. Natürlich wurden auch umgekehrt sehr viele Gene durch den Gene Array identifiziert, die mit der SSH, zumindest durch die Auswertung der ersten Dot Blots, nicht gefunden worden sind (vergleiche Tabelle 3.2-3.5 des Ergebnisteils).

Einen Vorteil des Gene Arrays sehen Cao et al. (2004) in der Möglichkeit, sehr viele Gene simultan betrachten zu können, während der Aufwand bei dem Screening der SSH-Transkripte sehr groß ist. Ihre Empfehlung ist, bei einer großen Anzahl an Proben, vor allem bei homogenen Zellpopulationen den Gene Array für die Analyse zu nehmen. Für Gewebe, aus dem es schwierig ist, RNA zu isolieren, oder von dem nur sehr wenig zur Verfügung steht, raten sie zu der SSH. Weder mit dem Gene Array noch mit der SSH ist es möglich, wirklich alle differentiell exprimierten Gene zu detektieren.

Die Auswertung der Gene Arrays, die innerhalb dieser Arbeit angefertigt wurden, identifizierte 22 Gene in kaudalen Zellen als signifikant hochreguliert und 28 Gene in kranialen Zellen als signifikant hochreguliert (siehe Tabellen 3.4 und 3.5 der Ergebnisse). Wie bereits im Ergebnisteil berichtet, wurden jeweils drei Chicken Gene Arrays (Affymetrix, USA) mit cRNA aus kaudalen und kranialen Zellen hybridisiert. Der Chicken Gene Array beinhaltet 32.773 Transkripte aus dem Huhn, die als Sonden für eine Hybridisierung an der Oberfläche des Arrays haften.

Für die Auswertung wurden immer die Signale jedes der drei Arrays herangezogen, so dass Daten zu Sonden, die nur in zwei Arrays auswertbar waren, nicht berücksichtigt wurden. Es wurden aber die Intensitäten aller auswertbarer Signale in einer Excel-Tabelle zusammengefaßt (hier nicht dargestellt), so dass weitere, mögliche Kandidatengene zu einem späteren Zeitpunkt untersucht werden können.

Eines der Gene, das nach den Ergebnissen des Gene Array in kaudalen Zellen hochreguliert ist, ist der Est-Klon 7m5, welcher bereits in der SSH identifiziert wurde und dessen stärkere Expression durch Northern Blots bestätigt wurde. Eine weitere hochregulierte mRNA war die von ADAMTS-like 1, die um das achtfache stärker exprimiert wurde als in kranialen Zellen. Per Northern Blots wurde eine mehr als fünffach höhere Expression bestätigt (Vergleiche Abbildung 3.11). Auffällig war, dass in kranialen Zellen eine Carboanhydrase um 40-fach stärker exprimiert wurde. Des Weiteren wurden Wachstumsfaktoren, Fibronectin, Laminin und viele Est-Klone als in kaudalen und kranialen Zellen differentiell exprimiert identifiziert. Die Ergebnisse aus dem Gene Array können als recht verlässlich eingestuft werden, da die erhöhte Expression in einem Zelltyp wie bereits angesprochen in drei verschiedenen Arrays vorhanden sein muß, die mit RNA aus den kaudalen bzw. kranialen Bereichen der Sterna, die aus drei verschiedenen Eierpopulationen stammten, hybridisiert worden sind

Als Schlussfolgerung aus den vorgestellten Ergebnissen der SSH und der Gene Arrays läßt sich sagen, dass mittels des Gene Array mit weniger Aufwand eine viel größere Zahl von potentiell hochregulierten Genen gefunden werden konnte als in der SSH. Außerdem ist der Aufwand für das Screening nach der Herstellung der SSH und die Sequenzierungen der einzelnen Klone viel größer.

In unserem Fall war das Ergebnis der SSH mit der RNA aus kaudalen Zellen als „tester“ nicht verlässlich: Es funktionierten zwar alle positiven Kontrollen, die vom Hersteller (Clontech, Bioscience, USA) empfohlen wurden, jedoch wurde, die Ferritin-H-Kette als falsch positiver Klon identifiziert. Ferner wichen einige Ergebnisse zur Expression anderer Gene von den Ergebnissen des Gene Arrays ab (vergleiche 3.2), während für die in der SSH in kranialen hoch regulierten Gene (RNA aus kranialen Zellen als „tester“) die Ergebnisse des Gene Array und der SSH übereinstimmten.

Die Ergebnisse legen nahe, in Zukunft mit Gene Arrays zu arbeiten, da schneller, mehr und zuverlässige Ergebnisse zur Verfügung stehen. Das ist vor allem zutreffend, wenn eine große Menge an Transkripten untersucht werden soll und stimmt mit der Schlussfolgerung von Cao et al. (2004) überein.

## 4.2 Analyse einiger differentiell exprimierter Transkripte

Zunächst wurde mit verschiedenen, identifizierten Sequenzen fortgefahren:

Besonders detailliert untersucht wurde der zur mRNA von  $\alpha 1$ (VIII) gehörende Est-Klon 7m5, da weder das regionale Vorkommen noch die Rolle von Kollagen VIII im Knorpel genau bekannt sind. Außerdem wurde der Klon sowohl mittels der SSH als auch mit dem Gene Array identifiziert (Tabelle 3.2 und 3.4). Auf Kollagen VIII wird unter 4.3 und 4.4 noch näher eingegangen. Per Northern Blot wurde eine stärkere Expression der  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA in kaudalen Zellen um das 3,5-fache bestätigt (Abbildung 3.13).

Des weiteren sollte ADAMTS-like 1 untersucht werden. In der Einleitung wurden die ADAMTS-Proteine bereits näher vorgestellt (1.4.1). Da die Substrate einiger ADAMTS-Proteine Proteoglykane sind und einige ADAMTS-Proteine an die ECM binden können (Porter et al., 2005), liegt der Gedanke nahe, dass sie während der enchondralen Ossifikation eine Rolle spielen. Für die ADAMTS-Proteine 4 und 5 konnte gezeigt werden, dass sie u.a. für den Abbau von ECM in degenerativen Gelenk-Krankheiten verantwortlich sind.

Bei ADAMTS-1 ist die Thrombospondin-Typ-1-Domäne wichtig für die Bindung an die ECM (Kuno und Matsushima, 1998). Die ADAMTS-1 Knockout-Maus ist deutlich kleiner als die Wildtyp-Maus, hat aber normale Proportionen (Shindo et al., 2000). Im Alter von neun Monaten besitzt die Knockout-Maus nur etwa 70% des Gewichtes der Wildtyp-Maus. Es ist also durchaus wahrscheinlich, dass ADAMTS-1 eine Rolle beim Wachstum spielt.

Die Funktion von ADAMTS-like 1 ist unbekannt (Hirohata et al., 2002). Ihm fehlt die katalytische Domäne und die Disintegrin-like-Domäne der ADAMTS-Enzyme, aber die Ankerdomäne ist vorhanden (Hirohata et al., 2002). Da ADAMTS die Ankerdomäne benötigt, um an ein Substrat zu binden und es dann zu schneiden, wäre es möglich, dass ADAMTS-like in Konkurrenz zu ADAMTS die Bindestellen besetzt und auf diese Weise das Substrat vor einem Verdau schützt.

Die im Gene Array entdeckte und durch Northern Blots bestätigte, deutlich stärkere Expression von ADAMTS-like 1 in kaudalen Chondrozyten, in welchen die terminale Differenzierung verhindert wird, unterstützt diese These der Hemmung des Matrixabbaus. Während der terminalen Differenzierung wird die ADAMTS-like 1-Expression deutlich reduziert. Die Beobachtungen von ADAMTS-like 1 per semiquantitativer One Step-PCR über 10 Tage *in vitro* zeigen auch in dieser Arbeit, dass die Expression während der Differenzierung von kaudalen Chondrozyten abnimmt (Abbildung 3.15). Vorausgesetzt die These ist richtig, könnten die ADAMTS-Proteine, z.B. ADAMTS 1, 4 und 5, mit Abnahme der Menge an ADAMTS-like 1-Proteine an die Substrate binden und damit beginnen, sie zu verdauen. Die ECM würde abgebaut und die Vaskularisierung und Mineralisierung des Gewebes stattfinden.

Eine andere Idee ist, dass ADAMTS-like die Expression von ADAMTS hochreguliert. Theoretisch wäre es möglich, dass ADAMTS-like die späte Differenzierung „einläutet“ und die ADAMTS-Expression startet, aber da ADAMTS-like vor allem in kaudalen Zellen exprimiert wird, wo die Hypertrophierung unterdrückt wird, ist diese Möglichkeit unwahrscheinlich. Die Inhibierung der ADAMTS-Expression durch ADAMTS-like ist naheliegender.

Carboanhydrasen katalysieren die Reaktion von Kohlendioxid und Wasser zu Hydrogencarbonat. Die Carboanhydrase II (NCBI: NM\_205317) wurde in dem Chicken Gene Array als fast 40 mal stärker exprimiert in kranialen Zellen gefunden (Tabelle 3.5). Störungen in der Aktivität von Carboanhydrasen führen zum Beispiel im Knochen zu Osteopetrose, in der Niere zu nephrogener Azidose und im Gehirn zu cerebraler Kalzifizierung (Sly et al., 1983, Sly und Hu, 1995). Der Osteoklast bindet an die Knochen-Oberfläche und formt eine Membran mit H<sup>+</sup>-ATPase-Komplexen und Cl<sup>-</sup>-Kanälen. So werden H<sup>+</sup>-Ionen und Cl<sup>-</sup>-Ionen in den Zwischenraum der Zelle und der Knochenoberfläche abgegeben und der pH-Wert sinkt. In nun sauren Milieu werden Enzyme wie Cathepsin K aktiviert, die dann die Knochenmatrix abbauen. Durch eine Störung der Carboanhydrase II werden keine H<sup>+</sup> Ionen mehr geliefert und der Abbau kann nicht ablaufen.

Auch in Matrixvesikeln kommt die Carboanhydrase vor. Matrixvesikel sind wichtig für die Mineralisierung des Knorpels während der enchondralen Ossifikation (Genge et al., 1989, Anderson, 1995).

In einem kleinen Experiment der vorliegenden Arbeit wurde das Enzym mittels Acetazolamid bei Hühner-Chondrozyten in Zellkultur gehemmt (3.3.11). Die Auswirkungen der Hemmung wurden anhand der Kollagen X-Synthese in den mit Thyroxin bzw. IGF-I stimulierten Chondrozyten untersucht. Da die Auswirkungen auf die Differenzierung im Vergleich zu der starken Expression der Carboanhydrase II in kranialen Zellen sehr gering bis unbedeutend war (Abbildung 3.43), wurde auf die Durchführung weiterer Versuche zu diesem Enzym verzichtet.

### 4.3 Untersuchungen zu den $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten von Kollagen VIII

Bei der Suche nach differentiell exprimierten Genen in kaudalen und kranialen Chondrozyten wurde sowohl in der SSH als auch im Gene Array der Est7m5 als in kaudalen Zellen hochreguliert identifiziert. Die Sequenz flankierte den ORF von *Col8a1* auf der 3'-Seite. Seit dem 16. November 2006, als wir also bereits mit dem Est arbeiteten, wird die Sequenz von Est7m5 der Kollagen  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA zugesprochen (NCBI-Datenbank).

Kollagen VIII wird von verschiedenen Zelltypen exprimiert, z.B. von mesangialen Zellen (Greenhill et al., 2000), von glatten Muskelzellen (Hou et al., 2000, MacBeath et al., 1996) und von Makrophagen (Weitkamp et al., 1999) und es kommt in unterschiedlichen Geweben vor, z.B. in fötalem, bovinen Ohr- und Epiphysenknorpel (Kapoor et al., 1988) und in der Nabelschnur (Sawada et al., 1990). Seine Funktionen sind aber noch nicht vollständig geklärt. Kollagen VIII wirft viele Fragen auf, von denen einige, besonders die nach seiner Rolle in der späten Chondrozytendifferenzierung während der enchondralen Ossifikation hier bearbeitet werden sollte.

#### 4.3.1 Expression während der Differenzierung *in vitro*

Nach der Bestätigung der stärkeren Expression der  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA und  $\alpha 2$ (VIII)-mRNA durch Northern Blots wurde die Expression von deren Genen, *Col8a1* und *Col8a2*, während der *in vitro* Differenzierung von Chondrozyten des kaudalen und kranialen Teiles des em-

bryonalen Sternums untersucht (Abbildung 3.14, 3.16, 3.17). Die Expression beider Kollagen VIII-Gene nahm während der terminalen Differenzierung ab, während die Produktion der  $\alpha 1(X)$ -mRNA zunahm.

Die Ketten von Kollagen X und VIII sind sehr homolog (Prockop und Kivirikko, 1995, Shuttleworth et al., 1997) und beide Kollagene bilden Netzwerke (Birk und Bruckner, 2005). Aus diesen Gründen ist es sehr interessant, dass die Expression von Kollagen X anscheinend die Expression von Kollagen VIII ablöst. Es stellt sich die Frage, ob Kollagen VIII in der frühen Phase der terminalen Chondrozyten-Differenzierung eine strukturelle Rolle spielt, wie etwa in der Descemet-Membran des Auges, durch die das Endothelium der Cornea vom Stroma getrennt wird (Sawada et al., 1990, Shuttleworth et al., 1997). Vielleicht könnte nach erfolgter Differenzierung Kollagen X die Funktion, die Kollagens VIII bei wenig differenzierten Zellen haben könnte, übernehmen, indem es ein alternatives Netzwerk für hypertrophe Chondrozyten bildet. Eine andere Möglichkeit wäre, dass Kollagen VIII eine negativ regulierende Rolle in der Differenzierung hat und deshalb seine Expression während der terminalen Differenzierung langsam herunterreguliert werden muß. Die Expression von Kollagen VIII wird durch TGF- $\beta$  und FGF *in vitro* leicht erhöht (Sibinga et al., 1997). Die beiden Proteine sind sehr wichtig für die Regulierung der terminalen Differenzierung. TGF- $\beta$  ist ein negativer Regulator und unterdrückt die späte Differenzierung der Chondrozyten (Tschan et al., 1993), (siehe 4.4.2.3 Lösliche Faktoren). Die Steigerung der Expression von Kollagen VIII, induziert durch TGF- $\beta$ , könnte also ein notwendiger Schritt zur Hemmung der terminalen Differenzierung sein. Beim Wegfall von TGF- $\beta$ , wäre es möglich, dass auch die Kollagen VIII-Expression als eine Schranke der terminalen Differenzierung abnimmt. Diese These ließe sich vielleicht mit einem Silencing-Experiment von TGF- $\beta$  und einer sich anschließenden Analyse der Kollagen VIII-Expression prüfen.

#### 4.3.2 Silencing von Kollagen VIII *in vitro*

Die Expression der  $\alpha 1(VIII)$ - und  $\alpha 2(VIII)$ -mRNA nahm während der Differenzierung der kaudalen Chondrozyten in Kultur sehr allmählich ab (Abbildung 3.16, 3.17). Um zu testen, ob Kollagen  $\alpha 1(VIII)$  einen direkten Einfluß auf die späte Differenzierung nimmt, wurde seine Expression in einem Silencing-Experiment mit Hilfe von siRNA temporär direkt zu Beginn der Kultivierung der Chondrozyten unterdrückt. Der Erfolg des Silencing wurde drei und fünf Tage nach der Transfektion durch eine semiquantitative One Step-PCR nachgewiesen (Abbildung 3.18 und 3.19). Der Verlauf der Differenzierung wurde anhand der Differenzierungsmarker alkalische Phosphatase und Kollagen X analysiert (2.4.1, 2.4.4, 2.4.7, 2.4.10). In den Proben, in welchen die  $\alpha 1(VIII)$ -mRNA herunterreguliert wurde, wurden diese beiden Marker bereits früher exprimiert als in den Kontrollen (Abbildung 3.20, 3.21 und 3.22). Dieses Ergebnis beweist eine starke Beschleunigung der Differenzierung durch das Silencing der  $\alpha 1(VIII)$ -mRNA.

Die Zellen, die nicht stimuliert worden sind, also nicht zur Differenzierung angeregt wurden, synthetisierten nur Kollagen II. Es ist auch keine Dedifferenzierung der Zellen und keine Kollagen I-Synthese zu erkennen. Hier zeigte die Regulierung von  $\alpha 1(VIII)$  keine Auswirkungen.  $\alpha 1(VIII)$  ist nicht allein in der Lage, kaudale Zellen von der weiteren Differenzierung abzuhalten.

Die Expression von Kollagen  $\alpha 2(VIII)$  wurde durch das Silencing von  $\alpha 1(VIII)$  nicht beeinflusst (Abbildung 3.18). An diesem Punkt stellt sich die Frage, ob Kollagen VIII hier als Homo- oder Heterotrimer vorkommt. Es kann laut Literatur in beiden Formen auftreten (Shuttleworth et al., 1997, Greenhill et al. 2000, Illidge et al, 1998, Illidge et al, 2001, Stephan et al., 2004) und in der Wachstumsfuge werden sowohl die mRNA von  $\alpha 1(VIII)$  als auch von  $\alpha 2(VIII)$  exprimiert (Kwan et al., 1997). Auf diesen Diskussionspunkt, ob Kollagen VIII im

Knorpel als Homo- oder Heterodimer auftritt, wird später noch einmal genauer eingegangen (4.4.1).

Auch die Kollagen II-Expression wurde nicht direkt durch das Silencing gesenkt (Abbildung 3.23), sondern erst durch die beschleunigte Differenzierung im späteren Verlauf der Differenzierung mit Steigerung der Kollagen X-Expression.

Das Experiment zur Herunterregulierung der Expression von  $\alpha 2(\text{VIII})$  in kaudalen Chondrozyten *in vitro* war nicht erfolgreich. Es wurden zwei verschiedene siRNA-Sequenz-Paare getestet, aber die Expression der  $\alpha 2(\text{VIII})$ -mRNA konnte nicht gesenkt werden (Abbildung 3.24). Hierfür könnte es verschiedene Ursachen geben. Die Auswahl der siRNA Sequenzen erfolgt nach bestimmten Design-Algorithmen, so soll z.B. normalerweise der GC-Gehalt unter 50% betragen. Schwarz et al. (2003) haben gezeigt, dass der Sense- und Antisensestrang mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit in den RISC-Komplex (RNA-induced silencing complex) eingebaut werden. Bevorzugt wird der Strang mit einem niedrigen G/C-Gehalt am 5'-Ende. Normalerweise haben die Designprogramme im Silencing eine Erfolgsrate von 50-60% (Echeverri et al., 2004). Bei einem fehlenden Effekt des Silencings wäre es möglich, dass Proteine, die an die mRNA binden, den Abbau verhindern. Eine Idee wäre auch, die mRNA-Sequenz von  $\alpha 2(\text{VIII})$  zu sequenzieren, um zu prüfen, ob sie vielleicht von der NCBI-Sequenz abweicht. Sogar geringe Sequenzunterschiede könnten die Effektivität der siRNA verringern oder ganz verhindern. Insgesamt wurden vier verschiedene Abschnitte für das Silencing von  $\alpha 2(\text{VIII})$  getestet. Jetzt sollten weitere, andere Abschnitte der Sequenz als Ziel gewählt werden.

#### 4.3.3 Die Kollagen VIII Knockout-Maus ( $Col8a1^{-/-}/Col8a2^{-/-}$ )

Nun ergab sich die Frage, ob die *in vitro* Beschleunigung der späten Differenzierung durch die  $\alpha 1$ -Kette von Kollagen VIII *in vivo* Auswirkungen zeigt. Die Gruppe um Hopfer (2005) hat eine Kollagen VIII Knockout-Maus ( $Col8a1^{-/-}/Col8a2^{-/-}$ ) generiert, bei der eine veränderte Segmentierung des vorderen Auges mit einer hervortretenden Augenkammer gefunden wurde. Mit Ausnahme dieser Veränderung wurde nichts Ungewöhnliches in den Knockout-Mäusen entdeckt, allerdings hatten sich die Verfasser auch nicht tiefgehend mit dem Skelett der Knockout-Maus befaßt. Zur genaueren histologischen Analyse stellte uns Ulrike Hopfer (Basel) freundlicherweise Tibienköpfe von jeweils 5 Knockout-Mäusen und Wildtypen (Neugeborenen und 15,5 Tage alt) und von jeweils 2 Mäusen (50 Tage alt) zur Verfügung, die wir in Paraffin eingebettet haben.

Alzian-Blau und Sirius-Rot-Färbungen von Paraffin-Schnitten der Tibienköpfe zeigten keinen auffälligen Unterschied zwischen der Wildtyp- und der Knockout-Maus (3.3.5.1). In der Wachstumsfuge der Knockout-Maus war keine ausgeprägtere Hypertrophierung gegenüber der Wildtypmaus zu erkennen. Auch die Zellen wirkten von der Form und Größe her gleich. Es waren auch sonst keine Auffälligkeiten in der Wachstumsfuge der Knockout-Maus festzustellen.

Da während der Differenzierung von Hühnerchondrozyten in Kultur die Kollagen X-Expression ansteigt, wenn die Expression von  $\alpha 1(\text{VIII})$  nachläßt, wollten wir prüfen, ob vielleicht die Kollagen X-Expression in der Wachstumsfuge der Kollagen VIII Knockout-Maus ( $Col8a1^{-/-}/a2^{-/-}$ ) verändert ist. Es wurden immunhistologische und Immunfluoreszenzfärbungen mit einem monoklonalen Antikörper gegen Kollagen X durchgeführt (Abbildungen 3.27, 3.28, 3.30 und 3.32). Es wurde die Größe der Kollagen X-positiven, hypertrophen Zone und die Zellzahl verglichen. Auch diesbezüglich konnte kein Unterschied zwischen Knockout und Wildtyp-Mäusen festgestellt werden (Abbildungen 3.29 und 3.31). Kollagen X scheint also nicht an Stelle des fehlenden Kollagens VIII in der Knockout Maus kompensatorisch hochreguliert zu werden. Die Gruppe Kwan et al. (1997) führte *in situ* Hybridisierung

auf der Wachstumsfuge von Tibienschritten von Mäusen mit Sonden gegen die  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -mRNAs von Kollagen VIII durch und konnte ebenfalls keinen Unterschied der Kollagen VIII-Expression zwischen der Kollagen X Knockout- und der Wildtyp-Maus feststellen. Allerdings fällt auf, wenn man die mikroskopischen Aufnahmen der genannten Quelle betrachtet, dass die Wachstumsfuge der Kollagen X Knockout-Maus mit der Sonde gegen die  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA insgesamt stärker gefärbt ist als die Zone des Wildtyps, besonders auch die hypertrophe Zone, die eine starke Kollagen X-Expression im Wildtypen auszeichnet (Alvarez, et al., 2000). Die Expression der  $\alpha 2$ (VIII)-mRNA scheint auf den mikroskopischen Aufnahmen in Knockout und Wildtyp identisch zu sein. Es wäre sinnvoll, die *in situ* Hybridisierungen auf diese Fragestellung hin durchzuführen. Wenn sich der Eindruck bestätigen würde, dass die  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA in der Wachstumszone der Tibia der Kollagen X Knockout-Maus stärker exprimiert wird als in der Wildtyp-Maus und das für die  $\alpha 2$ (VIII)-mRNA nicht der Fall wäre, könnte es wieder ein Hinweis dafür sein, dass die  $\alpha 1$ -Kette von Kollagen VIII, jedoch nicht die  $\alpha 2$ -Kette, in der späten Differenzierung eine Rolle spielt, vielleicht auch in Wechselwirkung mit Kollagen X.

Trotzdem scheint das Fehlen von Kollagen VIII *in vivo* keine Auswirkung auf die Differenzierung der Wachstumsfuge zu haben, obgleich die Unterdrückung der  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA *in vitro* zur beschleunigten Differenzierung führte. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Entwicklung der Wachstumsfuge der Tibia der Maus am Tag der Geburt, der hier untersucht wurde, bereits zu weit fortgeschritten ist (Aszodi, prsl. Kommentar). Es empfiehlt sich, Embryonen im Alter von etwa 15 Tagen pC zu untersuchen, um die primäre Ossifikation zu betrachten und Mäuse am Tag 11-12 nach der Geburt, um die sekundäre Ossifikation zu überprüfen. Ein weiterer Grund für den fehlenden Phänotyp könnte sein, dass *in situ* ein anderes Protein die Funktion von Kollagen VIII kompensiert. Um das zu überprüfen, könnte man die Expression verschiedener Gene in der Kollagen VIII Knockout-Maus (*Col8a1<sup>-/-</sup>/a2<sup>-/-</sup>*) mit der Expression in der Wildtypmaus vergleichen, etwa durch einen Gene Array. Interessant wären bei der Auswertung die Gene, deren Expression in der Knockout-Maus stärker ist.

#### 4.3.4 Überexpression der $\alpha 1$ -Kette von Kollagen VIII *in vitro* und *in vivo*

Da die Abwesenheit von Kollagen VIII *in vivo* keine sichtbare Auswirkungen auf die Differenzierung des Knorpelgewebes der Maus zeigte, Kollagen VIII aber *in vitro* die Differenzierung von Chondrozyten bremste, sollte eine Überexpression der  $\alpha 1$ (VIII)-Kette mehr Aufschluß über die Funktion während der Differenzierung liefern.

Kranialen Chondrozyten wurden, wie unter 3.3.6 dargestellt, mit dem ORF der  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA und einem Flag-Tag tragenden Plasmid transfiziert und es konnte zunächst eine stärkere Expression von  $\alpha 1$ (VIII) in den transfizierten Zellen per semiquantitativer PCR (Abbildung 3.36) und über einen immunhistologischen Nachweis mit einem Antikörper gegen Flag (Abbildung 3.37) auch auf der Proteinebene nachgewiesen werden. Allerdings war die Sterblichkeitsrate der Zellen sehr hoch und es war nicht möglich, die Auswirkungen der Überexpression auf die Differenzierung zu untersuchen.

Die hohe Sterblichkeit der Zellen kann verschiedene Gründe haben, die auf jeden Fall in Verbindung mit den Plasmiden gebracht werden müssen. Die Zellen der Kontrollen, die nicht transfiziert wurden, oder nur einen elektrischen Impuls bekamen, waren nicht von der hohen Sterblichkeit betroffen. Die Zellen allerdings, welche mit dem Plasmid mit dem ORF von  $\alpha 1$ (VIII) oder dem Kontrollplasmid transfiziert wurden, überlebten mehrheitlich nur einige Stunden bis Tage.

Die Überexpression der  $\alpha 1$ (VIII)-Kette kann als Ursache ausgeschlossen werden, da, wie erwähnt, auch die Chondrozyten, die mit dem Plasmid ohne den ORF von Kollagen VIII transfiziert worden waren, nicht so vital wie die nicht transfizierten Zellen waren.

Da das Experiment zur Überexpression wegen der hohen Zellsterblichkeit nicht zu Ende geführt werden konnte, sollte ein Mausstamm generiert werden, in welchem knorpelspezifisch Kollagen VIII überexprimiert wird. Dazu wurde der ORF von *Col8a1* der Maus hinter einen Kollagen II-Promotor kloniert (Kollagen II-Promotor-Konstrukt wurde freundlicherweise von Dr. Attila Aszodi (Martinsried) zur Verfügung gestellt) (Abbildungen 3.39 und 3.40), durch den die  $\alpha 1(\text{VIII})$ -Kette in der Maus knorpelspezifisch exprimiert werden kann (Sakai et al., 2001, Schmitz et al., 2008). Die Erstellung des entsprechenden Mausstamms durch Oozyteninjektion übernimmt freundlicherweise Dr. Attila Aszodi, während dessen Charakterisierung in unserem Arbeitskreis durchgeführt werden soll. Das 3' Ende des ORFs wurde mit einem Myc-Tag versehen, damit später das transgen exprimierte Protein in der Maus nachgewiesen werden kann. Der direkte Nachweis der Kollagen VIII-Ketten mit Hilfe kommerzieller und als Ketten-spezifisch bezeichneter Antikörper erwies sich bis dato mangels Spezifität als undurchführbar (siehe 3.3.8, 3.3.9).

### 4.3.5 Kollagen VIII Proteinexpression

#### 4.3.5.1 Immunfärbung

Für die proteinbiochemischen Analysen der Kollagen VIII-Expression standen zwei Antikörper zu Verfügung: Ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen Maus-Kollagen VIII (Gentaur, Belgien) und ein polyklonaler aus Kaninchen gegen die  $\alpha 1(\text{VIII})$ -Kette aus Maus (Abcam, Großbritannien). Mit ersterem wurden Paraffin- und Kryostat-Schnitte von Mäusetibien immunhistochemisch gefärbt (Abbildungen 3.41 und 3.42). Es konnte eine intrazelluläre Färbung der prähypertrophen Zone sowohl in der Wildtyp als auch in der Knockout-Maus beobachtet werden. Bei den Kryostatschnitten war keine Färbung zu erkennen, nur in den Arterienwänden der Nierenschnitte, die als Positivkontrolle dienen (Gerth et al., 2007).

Der Antikörper von Gentaur scheint sich somit nicht für Paraffinschnitte zu eignen. Hier bindet er unspezifisch. Auf Kryostatschnitten der Tibia gab es vielleicht kein Signal, weil Kollagen VIII in der Wachstumsfuge in zu geringen Mengen exprimiert wird. Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied beim Vergleich der Expression von Kollagen VIII in kranialen Zellen zu Beginn der Differenzierung *in vitro* und der Expression von Kollagen X in den hypertrophen Zellen (Abbildung 3.14). Per Reverser Transkriptions-PCR erhält man bei Kollagen X nach deutlich weniger Zyklen ein Produkt. Das Ergebnis für kaudale Zellen ist analog. Kollagen VIII ist auch kein typisches Protein des Knorpels (Kwan et al., 1997) wie etwa die Kollagene II, XI, IX und X (Cheah et al., 1991, 1995). Die immunhistochemische Färbung der Tibia einer Maus mit einem Antikörper gegen Kollagen II zeigt auch eine sehr deutliche Färbung der Wachstumsfuge (Abbildung 3.33).

Der Antikörper gegen Kollagen VIII von Abcam (Groß-Britannien) zeigte weder auf den Kryostat- noch auf den Paraffinschnitten eine Färbung.

#### 4.3.5.2 Western-Blot

Um zu testen, ob die Zellen nicht nur die mRNA von Kollagen VIII exprimieren, sondern ob auch das Protein synthetisiert wird, wäre es wünschenswert gewesen, einen proteinbiochemischen Nachweis per Western Blot zu erbringen. Unter 3.3.9 wird erklärt, dass für die Western-Blots Proteine aufgereinigt aus Medium von der Zellkultur der Hühner-Chondrozyten und Mäuse-Chondrozyten sowie boviner Cornea und Cornea vom Huhn als Proben auf die SDS-Gele aufgetragen wurden.

Mit dem Antikörper von Gentaur (Belgien) konnte kein Signal detektiert werden. Für den Antikörper von Abcam (Groß-Britannien) wurden unspezifische Signale von verschiedener Größe detektiert. Trotzdem wurden immunopositive Banden ausgeschnitten und mittels Massen-Spektrometrie sequenziert. Keine dieser Banden konnte dem Kollagen VIII Protein zugeordnet werden.

Vermutlich scheitert auch hier der Nachweis von Kollagen VIII auf Proteinebene an der geringen Menge des Proteins. Außerdem ist auch noch fraglich, ob der Antikörper auch Proteine aus Huhn erkennen kann. Zusätzlich befanden sich auf der Höhe zwischen 70 und 75 kDa verschiedene Banden, die vermutlich Proteinen entsprechen, die in größerer Quantität vorhanden sind und Kollagen VIII überlagert haben könnten.

So fehlt der biochemische Nachweis für das Kollagen VIII-Protein im Medium der Chondrozyten und in den Zellen. Um dieses Problem zu umgehen, wurde, wie bereits erwähnt, für die Transfektion der Maus ein Myc-Tag an die  $\alpha 1(\text{VIII})$ -cDNA synthetisiert, damit die Expression der  $\alpha 1(\text{VIII})$ -Kette mit einem Antikörper gegen den Tag nachgewiesen werden kann.

## 4.4 Rolle von Kollagen VIII während der Differenzierung

Das Ergebnis, dass  $\alpha 1(\text{VIII})$  Kollagen die Geschwindigkeit der späten Differenzierung der Chondrozyten negativ beeinflusst, also bremst, wirft neue Fragen auf.

### 4.4.1 Homo- oder Heterotrimer?

Die Expression der  $\alpha 2(\text{VIII})$ -mRNA wurde nach dem Silencing der  $\alpha 1(\text{VIII})$ -mRNA nicht verändert. Ferner war das alleinige Silencing der  $\alpha 1(\text{VIII})$ -mRNA ausreichend, um die Differenzierung zu beschleunigen (3.3.3.1). Leider konnte nicht gezeigt werden, ob die Herunterregulierung von  $\alpha 2(\text{VIII})$  einen ähnlichen Effekt hat, da die ausgewählten siRNA-Sequenzen mittels Transfektion der Chondrozyten nicht zu einem Silencing-Effekt führten. Zudem ist der quantitative Unterschied der Expression in kaudalen und kranialen Chondrozyten bei der  $\alpha 2$ -mRNA geringer als bei der  $\alpha 1$ -mRNA (Abbildung 3.13).

In der Literatur wird von der Möglichkeit zur Homo- und Heterotrimer-Bildung berichtet. So faßte Shuttleworth (1997) einige ältere Veröffentlichungen zusammen, nach denen Kollagen VIII *in vivo* aus Heterodimeren besteht, die aus zwei  $\alpha 1$ -Ketten und einer  $\alpha 2$ -Kette bestehen. Auch *in vitro* bildet es Heterodimere (Illidge et al., 2001). Es kann aber auch aus Homodimeren bestehen, *in vitro* (Rosenblum, 1996, Illidge et al., 1998, Stephan et al., 2004) und *in vivo* (Greenhill et al., 2000). Allerdings ist zwar das Vorkommen von Kollagen VIII in Knorpel, aber nicht die Form dieses Vorkommens beschrieben (Kapoor et al., 1988).

In der Descemet-Membran des Auges und in mesangialen Zellen scheint Kollagen VIII jeweils als Homotrimer vorzukommen, und in peritonealen Fibroblasten wurde nur die mRNA von  $\alpha 1(\text{VIII})$  gefunden (Greenhill et al., 2000). In einer neuen Veröffentlichung von 2008 (Gansner und Gitlin) wird berichtet, dass die  $\alpha 1(\text{VIII})$ -Kette eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Notochords im Zebrafisch spielt. Die Substitution einer Aminosäure im *Col8a1*-Gen führt durch unzureichende Anlagerung von  $\alpha 1(\text{VIII})$  an das Notochord und somit zur Störung des Aufbaus des Notochords. Außerdem haben sie durch *in situ* Hybridisierung festgestellt, dass während der Entwicklung des Zebrafischs die  $\alpha 1(\text{VIII})$ -mRNA nicht im Auge exprimiert wird, obwohl Kollagen VIII eine Hauptkomponente der Descemet-Membran in Vertebraten ist (Labermeier und Kenney, 1983, Kapoor et al., 1986). Kabosova et al. (2007) haben einige mikroskopische Fluoreszenz-Analysen mit Kryostatschnitten von Basalmembranen der Cornea bei neugeborenen und älteren Menschen durchgeführt und die  $\alpha 1$ -Kette von Kollagen VIII in der Descemet-Membran auf Proteinebene nachgewiesen. Gottsch et al.

(2005b) zeigten per Transmissions-Elektronen-Mikroskopie, dass sowohl die  $\alpha 1(\text{VIII})$ - als auch die  $\alpha 2(\text{VIII})$ -Protein-Ketten in der Descemet-Membran des Menschen vorkommen.

Verantwortlich für zwei verschiedene Dystrophien im menschlichen Auge allerdings, FECD (Fuchs' endothelial dystrophy of the cornea) und PPCD (Posterior polymorphous corneal dystrophy), werden verschiedene Mutationen im *Col8A2*-Gen gemacht (Biswas et al., 2001, Gottsch et al., 2005a). Vielleicht spielt im Auge im Aufbau der Descemet-Membran die  $\alpha 2(\text{VIII})$ -Kette die wichtigere Rolle oder die Zusammensetzung der Membran variiert in verschiedenen Organismen.

In der diabetischen Nephropathie scheinen Kollagen VIII-Homotrimere aus  $\alpha 1$ -Ketten eine Rolle zu spielen. Zellkulturexperimente mit mesangialen Zellen und Epithelzellen zeigten, dass die Expression der  $\alpha 1(\text{VIII})$ -mRNA durch eine hohe Konzentration an Glukose erhöht wird, während die Expression der  $\alpha 2(\text{VIII})$ -mRNA nicht zu messen ist (Hopfer et al., 2009).

Die genannten Befunde und die Ergebnisse dieser Arbeit könnten nahe legen, dass in der späten Chondrozytendifferenzierung der enchondralen Ossifikation die  $\alpha 1(\text{VIII})$ -Kette wichtiger ist als die  $\alpha 2(\text{VIII})$ -Kette.

Um einen Unterschied in der Expression von  $\alpha 1(\text{VIII})$  und  $\alpha 2(\text{VIII})$  in der Wachstumsfuge nachzuweisen, muss eine quantitative PCR mit der mRNA der Zellen aus den verschiedenen Stadien der Wachstumsfuge durchgeführt werden.

#### 4.4.2 Kollagen VIII in Wechselwirkung mit anderen Molekülen

Es soll die Frage beantwortet werden, welche Funktion Kollagen VIII haben könnte und mit welchen anderen Molekülen es gegebenenfalls wechselwirkt. Kann es direkt an Zellen binden und so Signale an Rezeptoren weitergeben? Bindet es vielleicht lösliche Faktoren und verhindert auf diese Weise eine Weiterleitung oder ist es an der Freisetzung von löslichen Faktoren beteiligt, wenn sie benötigt werden. Vermittelt es zwischen löslichen Faktoren und anderen Komponenten? Aktiviert es andere Bindungspartner?

##### 4.4.2.1 Matrixmoleküle

Es ist sinnvoll, in der Absicht, die mögliche Funktion von Kollagen VIII zu klären, die anderen Moleküle der ECM näher in Augenschein zu nehmen und sich die Frage zu stellen, in wie weit sie eine regulatorische Rolle in der späten Chondrozytendifferenzierung spielen. Komponenten der ECM sind u.a. Kollagene, Proteoglykane und Glykoproteine. Wie bereits in der Einleitung erklärt, befindet sich in der perizellulären Matrix, direkt um den Chondrozyten, ein besonders großer Anteil an Proteoglykanen, während der Anteil an Kollagen II zunimmt, je weiter die ECM von der Zelle entfernt ist (Eyre und Wu, 1987). In der perizellulären Matrix werden die typischen Komponenten der Basalmembran exprimiert, Laminin, Nidogene, Kollagen IV und Perlekan (Kvist et al., 2008). Das wirft die Frage auf, ob die Funktionen der Basalmembran und der perizellulären Matrix ähnlich sind. Die Basalmembran spielt eine Rolle in der Regulation der Diffusion, Zellanlagerung und Polarisierung, der Präsentation der Wachstumsfaktoren, Erhaltung des Zellphänotyps und der Migration (Li et al., 2003a, Miner und Yurchenco, 2004, Quondamatteo, 2002).

Bereits 1954 (Grobstein) und 1982 (Bissell et al.) wurde festgestellt, dass die ECM allgemein Auswirkungen auf den Phänotyp von Zellen hat. Es wurden Sequenzen von Glykoproteinen entdeckt, die an die Zelle binden können, etwa RGD-Domänen, oder die Sequenz GRGDSP in Fibronectin (Ruoslathi und Pierschbacher, 1987). Viele Hinweise auf die positiven und negativen Effekte der Matrix auf die Zellen wurden *in vitro* gefunden (Adams und Watt, 1993). Die Laminine sind die größte Familie der Basalmembranmoleküle und bestehen aus

Heterotrimeren, die Netzwerke formen. Über Nidogen, einer anderen Komponente der Basalmembran können sie wahrscheinlich mit Kollagen IV, das ebenfalls ein unabhängiges Netzwerk formt, verknüpft werden (Timpl, 1996). Unveröffentlichte Ergebnisse der Gruppe Hansen und Bruckner (2009) zeigen allerdings, dass die beiden Netzwerke trotz Anwesenheit von Nidogen voneinander getrennt werden können. Vermutlich wirkt hier Perlekan als Linker. Laminine beeinflussen positiv den Prozess der Osteoblasten-Bildung. Durch *in vitro* Versuche mit Osteoblasten-ähnlichen Mäusezellen und primären Knochenzellen aus Ratten auf einem rekonstruierten Basalmembran-Gel wurde entdeckt, dass Laminin die Proliferation der Zellen und die Bildung eines Netzwerks fördert (Vukicevic et al., 1990). Fibronectin, eine Komponente der ECM, ist wie Laminin ein Glykoprotein. Es besteht aus zwei Monomeren, die wiederum aus verschiedenen Domänen bestehen, unter anderem einer RGD-Domäne zur Zellbindung und einer Kollagen-Binde-Domäne. West et al. (1979) sagen, Fibronectin würde die Chondrozyten-Differenzierung negativ beeinflussen. Neuere Ergebnisse zeigen, dass Fragmente von Fibronectin (120 bzw. 110 kDa) über Bindung an Integrin  $\alpha 5 \beta 1$ , einen Zellrezeptor, die MMP-13-Synthese verstärken und so den Knorpelabbau stimulieren (Forsyth et al., 2002, Pulai et al., 2005, Del Carlo et al., 2007).

Über drei Wege kann die ECM das Zellverhalten beeinflussen: Durch ihre unterschiedliche Zusammensetzung, durch synergistische Interaktionen zwischen Matrix-Molekülen und Wachstumsfaktoren und durch Zellrezeptoren, an die sich die ECM-Komponenten anlagern können (Adams und Watt, 1993).

Die ECM-Zusammensetzung hängt von den unterschiedlichen Geweben und den verschiedenen Stadien der Entwicklung ab und liegt nicht nur an der Expression von verschiedenen Molekülen, sondern auch an den unterschiedlichen Formen bestimmter Moleküle. So besitzen manche Moleküle verschiedene Isoformen (z.B. Laminin), andere Splice-Varianten (z.B. Elastin, Fibronectin) und unterschiedliche post-translationale Modifikationen (z.B. Glycosylierung bei Laminin).

Perlekan ist ein Heparansulfat-Proteoglykan und wird in beinahe allen Basalmembranen, mesenchymalen Organen und im Bindegewebe exprimiert (Handler et al., 1997). In Basalmembranen interagiert es mit Laminin, Kollagen IV und Nidogen (Hopf et al., 1999). Neben den lethalen Auswirkungen eines Perlekan Knockouts - 70% der Mäuse sterben aufgrund funktionsuntüchtiger Basalmembranen im Herz bereits als Embryo (Costell et al., 1999) - hat die Maus auch einen deutlichen Knorpel-Phänotyp: Die Wachstumsfuge ist unorganisiert, das Kollagenetzwerk fehlt und die enchondrale Ossifikation ist gestört (Costell, 1999, Arikawa-Hirasawa et al., 1999). Ein Grund hierfür könnte sein, dass Perlekan die Bildung von Kollagen II-haltigen Fibrillen unterstützt und durch seine Abwesenheit weniger Kollagen-Fibrillen gebildet werden (Kvist et al., 2006). Die überlebenden Embryonen sterben bei der Geburt an den Defekten im Skelett und den instabilen Arterien im Herz (Costell et al., 2002).

Eine andere Funktion von Perlekan ist es, Wachstumsfaktoren, wie z.B. FGF2, VEGF oder PDGF, zu binden (Iozzo et al., 1998, Mongiat et al., 2000, Knox, 2002) und auf diese Weise als Reservoir für Wachstumsfaktoren zu dienen. Perlekan ist ein Faktor, der die Angiogenese aktiviert (Iozzo, 2005)

Eine kleine Domäne am C-terminalen Ende von Perlekan dagegen, das in isolierter Form Endorepellin genannt wird und unter anderem mit  $\alpha 2 \beta 1$ -Integrin interagieren kann, ist ein Inhibitor der Angiogenese (Mongiat et al., 2003). Da die Angiogenese eine große Rolle im Wachstum von Tumoren spielt, ist Endorepellin auch für die Krebsforschung sehr interessant. Es konnte gezeigt werden, dass rekombinantes Endorepellin aus dem Menschen das Tumorstadium in Mäusen durch die reduzierte Vaskularisierung unterdrückt (Bix, et al., 2006).

Kollagen VIII könnte in der perizellulären Matrix auf verschiedene Weise mit Matrixkomponenten interagieren. Die Expression der  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA wird z.B. in glatten Muskelzellen *in vitro* durch PDGF (platelet derived growth factor) um das 2,35-fache erhöht (Sibinga et al., 1997). So könnte das Binden von PDGF an Perlekan, bzw. das Freisetzen von PDGF einen

Einfluß auf die Expression von  $\alpha 1(\text{VIII})$  nehmen. Kollagen VIII könnte, ähnlich dem Kollagen IV, Nidogen- oder Perlekan-vermittelt ein konglomeriertes Netzwerk mit Laminin bilden. Auf diese Weise könnte Kollagen VIII bei möglichen Aufgaben der ECM, die denen der Basalmembran gleichen, wie die Regulation der Migration und Adhäsion von Zellen, eine Rolle spielen. Auf die Migration und die Adhäsion, beeinflusst durch Kollagen VIII, wird unter 4.4.2.2. und 4.4.2.4 näher eingegangen.

Die Interaktionen von Wachstumsfaktoren mit der ECM können unterschiedlich verlaufen. Die Wachstumsfaktoren können an die ECM binden, was ihre Aktivität beeinflussen kann: So wird etwa FGF langsamer abgebaut, wenn es an die Matrix gebunden ist, was seine Aktivität verlängert (Klagsbrun, 1990), während an Decorin gebundenes TGF- $\beta$  inaktiv ist (Yamaguchi et al., 1990).

Außerdem können Wachstumsfaktoren einen Einfluß auf die Synthese von ECM-Proteinen nehmen: TGF- $\beta$  reguliert die Transkription verschiedener Matrixproteine (Ignotz und Massague, 1986) und reguliert die Expression von Kollagenase und TIMP (Edwards et al., 1987). Auf die löslichen Faktoren und die Wechselwirkung mit Kollagen VIII wird unter 4.4.2.3 näher eingegangen.

Viele Matrixmoleküle haben mehr als eine Sequenz, mit der sie an Zellrezeptoren binden können. Bei den Zellrezeptoren gibt es die Integrine und die Rezeptoren, die keine Integrine sind. Zweitere können Zelloberflächenproteoglykane oder Laminin-bindende Proteine sein.

Syndekane zum Beispiel können Kollagene, Fibronectin, Thrombospondin und bFGF binden (Bernfield und Sanderson, 1990). In unterschiedlichen Geweben variiert die Zusammensetzung der Glykosaminoglykane der Syndekane, welche wiederum für die Ligandenspezifität verantwortlich sein könnte (Adams und Watt, 1993).

CD44, ein transmembranes Glykoprotein, kann Kollagen I und IV und Hyaluronsäure binden (Hardingham und Fosang, 1992). Im nächsten Abschnitt 4.4.2.2 wird detailliert auf die Zellrezeptoren Integrine und DDRs eingegangen.

#### 4.4.2.2 Zellrezeptoren Integrine und DDRs

Integrine sind wohl die bekanntesten Zelloberflächen-Rezeptoren. Sie können ECM-Komponenten wie z.B. Laminin, Fibronectin und (molekulares) Kollagen binden und sie bestehen aus nahezu promiskuitiven Kombinationen von je einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Die unterschiedlichen Kombinationen von  $\alpha$ -Untereinheiten mit der gleichen  $\beta$ -Untereinheit können zu unterschiedlicher Ligandbindung führen. Allerdings können auch Integrine aus den gleichen Untereinheiten in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Liganden binden. So kann  $\alpha 2\beta 1$ -Integrin in Blutplättchen molekulares Kollagen binden, während es in Endothelzellen molekulares Kollagen und Laminin bindet (Hynes, 1992).

Bei Fibronectin wird z.B. die EILDV-Sequenz von  $\alpha 4\beta 1$ -Integrin erkannt (Wayner et al., 1989) und die RGD-Sequenz u.a. von  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin (Ruoslahti und Pierschbacher, 1987). Wahrscheinlich ist die Erklärung für die Vielfalt der Rezeptoren, dass die Besetzung verschiedener Rezeptoren durch die gleiche Zellbindungsstelle, verschiedene Informationen auf die Zelle überträgt (Adams und Watt, 1993).

Während der Entwicklung einer Zelle wird die Expression verschiedener Integrine verändert (Damsky et al., 1985, Korhonen et al., 1990a/b, Gawantka et al., 1992). Die Anwesenheit eines Antikörpers gegen die  $\beta 1$ -Untereinheit *in vitro* hat bei Hühnerchondrozyten zu einer Inhibierung der Kollagen X-Sekretion und des Wachstums, zu schmaleren Zellen und zu einer gestiegenen Apoptose geführt (Hirsch et al., 1997). Die Knorpel-spezifische  $\beta 1$ -Integrin Knockout-Maus hat eine Chondrodysplasie. Die Säulenformation in der proliferierenden Zone der Wachstumsfuge fehlt, da die Zellen weniger beweglich sind, was mit der fehlenden Adhäsion

sion zu Kollagen II begründet wird. Auch die Bindung an Fibronectin durch Chondrozyten ist geringer (Aszodi et al., 2003).

Integrine spielen eine sehr wichtige Rolle in der Zell-ECM-Interaktion. Sie vermitteln Signale zur Zellproliferation, des Überlebens der Zelle, Verhinderung der Apoptose und zur Differenzierung (Bouvard et al., 2001). Innerhalb der Zelle regulieren sie die Aktivität von zytosolmatischen Kinasen, Wachstumsfaktor-Rezeptoren, Ionen-Kanälen und sie kontrollieren die Organisation des intrazellulären Aktin-Zytoskeletts (Giancotti, 1999).

Die Frage, die sich nun stellt, ist, ob auch Kollagen VIII die späte Differenzierung über Integrine reguliert. Die  $\alpha 1(\text{VIII})$ -Kette des Huhns besitzt keine RGD- oder EILDV-Sequenz, nur die  $\alpha 2(\text{VIII})$ -Kette besitzt eine RGD-Sequenz. Da die Sequenz hier aber in einer Triplehelix des Kollagens liegt, ist sie weniger flexibel als etwa bei Fibronectin. Vermutlich kann Kollagen VIII auch über andere Sequenzen an Integrin binden. So ist die Aggregation von Chondrozyten aus femoropatellarer Gelenkfläche aus Kalb abhängig von dem Binden der  $\beta 1$ -Untereinheit von Integrin an die tripelhelikale GFOGER-Sequenz, die häufig in Kollagenen vorkommt (Gigout, et al., 2008). Eble et al. (1993) identifizierten eine Sequenz in der  $\alpha 1$ -Kette und eine in der  $\alpha 2$ -Kette von Kollagen IV, eingebettet in ein kurzes, tripelhelikales Stück, an die Integrin  $\alpha 1\beta 1$  binden kann. Essentiell für die Bindung ist ein Arginin bei  $\alpha 2(\text{IV})$  und ein Aspartat bei  $\alpha 1(\text{IV})$ .

Als Alternative könnte Kollagen VIII auch an andere Zellrezeptoren, wie die Zelloberflächenproteoglykane binden.

Turner et al. (2006) haben bereits gezeigt, dass die  $\alpha 2(\text{VIII})$ -Kette die Adhäsion von menschlichen Endothelzellen erhöht, und sie haben ebenfalls bewiesen, dass ein Integrin die Bindung vermittelt. Vier Integrine sind bekannt, die molekulare Kollagene binden,  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 10\beta 1$  und  $\alpha 11\beta 1$  (Tulla et al., 2001). Integrin  $\alpha 2\beta 1$  ist verantwortlich für die Bindung an Kollagen X (Luckman et al., 2003) und Kollagen X und Kollagen VIII sind sich strukturell sehr ähnlich. Wechselwirkungen von glatten Muskelzellen mit Kollagen VIII werden über Integrin  $\alpha 2\beta 1$  vermittelt (Hou et al., 2000). Die Autoren führten Bindungsstudien mit einem Pepsin resistenten 50 kDa-Fragment von Kollagen VIII durch, welches an Polystyrol-Platten ge-coated war. Die glatten Muskelzellen (SMC) banden an das Kollagen. Antikörper gegen die Untereinheit  $\beta 1$  von Integrin verhinderten das Binden und die Migration der Zellen und Antikörper gegen die Untereinheiten  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  reduzierten das Binden der Zellen. So kann davon ausgegangen werden, dass  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$  und vielleicht  $\alpha 11\beta 1$  Integrine für die Interaktion von Kollagen VIII mit der Zelle in Frage kommen. Allerdings scheint hier nicht die RGD-Domäne die Bindungssequenz zu sein (Turner et al., 2006), sondern die Sequenz GLOGER, welche bereits zuvor als Motiv von Integrin  $\alpha 2\beta 1$  nachgewiesen worden war (Siljander et al., 2004). Diese Teilsequenz ist allerdings weder in der  $\alpha 1$ - und noch der  $\alpha 2$ -Kette von Kollagen VIII des Huhns enthalten.

Eine weitere Möglichkeit der Wechselwirkung zwischen Zelle und Kollagen VIII sind die DDRs (discoid domain receptor). Sie stellen eine Familie der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren dar. Es gibt DDR1 und DDR2 und von ersterem existieren drei Spliceprodukte (Vogel, 1999). DDR1 wird während der Entwicklung des Embryos und im Erwachsenen besonders im Epithel der Haut, in der Niere, Darm und Gehirn exprimiert. Die DDR1b-Expression steigert sich nach der Geburt. DDR2 wird vermehrt im skelettalen Muskel, Herz und Bindegewebe exprimiert (Vogel, 1999). Es wurde in einer Sarkoma-Zelllinie gezeigt, dass sie triple-helikale Kollagene binden können und die Produktion von MMPs erhöhen (Vogel et al., 1997, Shrivastava et al., 1997). Hou et al. (2001) wiesen eine Phosphorylierung von DDR1 durch molekulares Kollagen I und VIII *in vitro* nach. Außerdem zeigten sie an glatten Muskelzellen, isoliert aus DDR1-Null-Mäusen, dass die Bindung gegenüber Wildtyp-Zellen an Kollagen I um 55% und bei Kollagen VIII um 72% reduziert war, im Gegensatz zu Fibronectin und Vitronectin, bei denen die Bindung der Zellen nicht signifikant verändert war. Auch die *in vitro* Proliferation der glatten Muskelzellen aus DDR1 Knockout-Mäusen auf den beiden Kollagenen war ge-

genüber der Proliferation der Wildyp-Zellen verringert. Im Abschnitt über MMPs wird auch noch einmal auf die DDRs eingegangen, da Kollagen VIII eventuell über die DDRs die Synthese von MMPs anregt.

Kollagen VIII könnte also verschiedene Aufgaben während der späten Differenzierung haben: Es könnte Signale an die Zelle weitergeben und an die Zelle binden, um sie zu verankern, oder ihre Migration zu steuern.

In den meisten Veröffentlichungen zu Bindungsstudien zwischen Integrinen oder DDRs mit z.B. Kollagenen wird über Matrixliganden in molekularer Form gesprochen. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass Kollagene, die in Fibrillen oder Netzwerken vorliegen, anders mit Bindungspartnern wechselwirken. Diesem Sachverhalt wurde in der Literatur selten oder nie Rechnung getragen. Demgegenüber haben Hansen et al. (2006) die Bindungseigenschaften von organisierten Matrixaggregaten an Eap (extracellular adherence protein) studiert, einem Adhäsionsprotein, das *Staphylococcus aureus* zur Anlagerung an die ECM seines Wirts benötigt. Es wurde gezeigt, dass das Binden von Eap abhängig von der Form ist, in der das Kollagen vorliegt. So erkennt Eap Kollagen I in seiner molekularen Form, allerdings nicht, wenn es in Fibrillen assoziiert ist. Kollagen VI und IV dagegen bindet es in ihrem Verband so gut wie in der molekularen Form. Umgekehrt wurde in einer Studie von Brittingham et al. (2006) eine sehr starke Wechselwirkung zwischen Kollagen VII-haltigen Verankerungsfibrillen und quer-gestreiften, Kollagen I enthaltenden Fibrillen (Villone et al., 2008) verpaßt, weil die Autoren ausschließlich auf Interaktionen zwischen nicht supramolekular organisierten Matrixproteinen oder sogar nur deren Teildomänen fokussierten. Diese Beispiele belegen, dass Bindungsaffinitäten zwischen monomolekularen Partnern oft sowohl unter- als auch überbewertet werden. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass Bindungspartner von Kollagenen wie Integrine und DDRs ebenfalls unterschiedlich gut an Kollagene in ihrer molekularen oder fibrillären bzw. Gitternetz-artigen Struktur binden.

#### 4.4.2.3 Lösliche Faktoren

Lösliche Faktoren spielen in der späten Chondrozytendifferenzierung während der enchondralen Ossifikation ebenfalls eine große Rolle.

Sowohl FGF als auch TGF- $\beta$  führen bei Zugabe zu glatten Muskelzellen in Kultur zu einer gesteigerten Expression der  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA, bzw. der  $\alpha 2$ (VIII)-mRNA. bFGF (basic Fibroblast growth factor) führt zu einer 1,28-fachen Steigerung der  $\alpha 1$ (VIII)-Expression und TGF- $\beta 1$  zu einer 1,18-fachen Steigerung (Sibinga et al., 1997), bzw. zu einer 1,8-fachen ( $\alpha 1$ (VIII)) und einer zweifachen ( $\alpha 2$ (VIII)) Steigerung (Hirano, et al., 2004).

FGFs (Fibroblast growth factors) sind Fibroblasten-Wachstumsfaktoren. Sie besitzen eine Kernregion, die bei allen sehr homolog ist, und die sehr affin gegenüber Heparin ist (Powers et al., 2000). Sie binden über FGF-Rezeptoren an Zellen. Über FGF2 ist bekannt, dass es bei Zugabe zu einer Pellet-Kultur von Chondrozyten der Wachstumsfuge die Synthese von alkalischer Phosphatase unterdrückt (Kato und Iwamoto, 1990, Chintala et al., 1995). Sind die Chondrozyten in der Differenzierung (*in vitro*) allerdings bereits weiter fortgeschritten, wirkt FGF2 beschleunigend und die Zellen produzieren früher als in den Kontrollen die typischen Hypertrophiemarker Kollagen X und alkalische Phosphatase (Babarina et al., 2001). Mutationen bei verschiedenen FGF-Rezeptoren lösen Störungen in der Skelettbildung aus (Muenke und Schell, 1995). Der FGF-Rezeptor 3 wird in proliferierenden Chondrozyten exprimiert. Das ist die Zone, in der auch die Kollagen VIII-Expression erwartet wird. Wenn FGF an FGFR3 bindet, wird die Expression von Ihh gesenkt (Brochhausen et al., 2009).

TGF- $\beta$  (transforming growth factor) ist ebenfalls ein Wachstumsfaktor. Die aktive Form besteht aus einem Homodimer. Um Signale weiterzuleiten ist eine Interaktion mit Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren vom Typ I und II notwendig (Franzen et al., 1993). Die Iso-

formen von TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1-3) stimulieren die Differenzierung der mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten (Denker et al., 1995), während die späte Differenzierung der Chondrozyten durch TGF- $\beta$ 2 inhibiert wird (Tschan et al., 1993). TGF- $\beta$  induziert die Synthese von PTHrP, einem negativen Regulator der späten Chondrozyten-Differenzierung (Pateder et al., 2000). Zusammen mit FGF-2 unterdrückt es die Hypertrophie kranialer Zellen (Böhme et al., 1995) und in kaudalen Chondrozyten, die in Endothelzell-Medium plus Thyroxin gehalten werden, kann TGF- $\beta$  die Hypertrophie inhibieren (Babarina et al., 2001).

In Knochen von PTHrP-defizienten Mäusen wurde durch TGF- $\beta$  die Hypertrophie nicht unterdrückt (Serra et al., 1999). Allerdings wurde die Proliferation und die Mineralisierung gehemmt, so dass man davon ausgehen kann, dass TGF- $\beta$  noch andere Möglichkeiten der Hemmung der späten Differenzierung hat. Hier könnte zum Beispiel Kollagen VIII eine Rolle spielen, das, wie erwähnt, durch TGF- $\beta$ 1 leicht hochreguliert wird (Sibinga et al., 1997, Hirano et al., 2004). Es wäre interessant, in den PTHrP-defizienten Mäusen die Expression der beiden Kollagen VIII-mRNAs zu untersuchen und zu sehen, ob ein Unterschied zur Expression gegenüber dem Wildtyp besteht. Möglicherweise wird die Expression von Kollagen VIII hier hoch reguliert, um die, durch die Abwesenheit von PTHrP beschleunigte, späte Differenzierung wieder zu hemmen.

Auf jeden Fall deuten die Ergebnisse, dass TGF- $\beta$  und FGF als negative Regulatoren der späten Chondrozytendifferenzierung die Expression von  $\alpha$ 1(VIII), bzw. von  $\alpha$ 2(VIII), steigern, darauf hin, dass auch Kollagen VIII zu der Inhibierung der Differenzierung einen Beitrag leistet.

#### 4.4.2.4 MMPs

Die zu den Proteasen gehörenden MMPs sind bereits in der Einleitung unter 1.4.1 vorgestellt worden.

In der enchondralen Ossifikation werden MMP9 und MMP13 besonders stark exprimiert (Ortega et al., 2004). MMP13 wird von hypertrophen Chondrozyten und Osteoblasten exprimiert, während MMP 9 in Monozyten, Osteoklasten und Endothelzellen exprimiert wird (Vu et al., 1998, Reponen et al., 1994). MMP 2, ebenfalls eine MMP der enchondralen Ossifikation, wird diffus in Osteoblasten, im Knochenmark und im Periost exprimiert (Ortega et al., 2004). Hou et al. (2000) haben *in vitro* gezeigt, dass glatte Muskelzellen ihre MMP2- und 9-Expression erhöhen, wenn sie auf Kollagen VIII adhäreren. Adiguzel et al. konnten 2006 die Erhöhung der MMP2-Expression durch Kollagen VIII, allerdings nicht die Erhöhung der MMP9-Expression bestätigen. Glatte Muskelzellen binden in der Abwesenheit von DDR1 viel schlechter an molekulares Kollagen VIII (siehe 4.4.2.2) und glatte Muskelzellen von DDR1-Null-Mäusen besitzen keine MMP9- und sehr wenig MMP2-Aktivität (Hou et al., 2001). Zusammen betrachtet legen diese Beobachtungen eine Wechselwirkung von Kollagen VIII und DDR1 nahe, die zu einer stärkeren Expression von MMP2 und MMP9 führt. Allerdings wird MMP9 nach unseren Erkenntnissen nicht von Chondrozyten exprimiert, so dass eine Wechselwirkung über die DDRs des Chondrozyten, die die MMP9-Expression zur Folge hätten, vernachlässigt werden kann.

Außerdem könnte man sich fragen, warum Kollagen VIII als potentieller negativer Regulator der enchondralen Ossifikation die MMP-Synthese steigern und somit den ECM-Abbau unterstützen sollte. Andererseits gibt es auch Hinweise darauf, dass MMPs der Zerstörung von Knorpel entgegenwirken: Itoh et al. (2002) haben entdeckt, dass die Anwesenheit von MMP2 die entzündlichen und Knorpel-zerstörenden Auswirkungen der Antikörper-induzierten Arthritis abmildert. In der MMP2 Knockout-Maus ist die induzierte Arthritis besonders ausgeprägt. Bei der MMP9 Knockout-Maus ist es umgekehrt: Der Proteoglykan-Abbau und die zelluläre Infiltration ist deutlich geringer als in der Wildtyp-Maus. In der MMP2 und MMP9

Doppel-Knockout-Maus sind die Werte nahezu identisch mit den Werten der Wildtyp-Maus. MMP2 scheint also nicht das Knorpelgewebe abzubauen, sondern steuert dem Abbau entgegen. Es könnte z.B. entzündungsfördernde Faktoren degradieren oder entzündungshemmende Faktoren aktivieren (Itoh et al., 2002).

Vielleicht kommt MMP2 während der enchondralen Ossifikation eine ähnliche Aufgabe wie in der Arthritis zu, nämlich, die späte Differenzierung hinauszuzögern.

## 4.5 Ausblick

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich viele Möglichkeiten, weiter zu verfahren.

Wie aus der Diskussion ersichtlich geworden ist, könnte Kollagen VIII auf verschiedene Weisen Einfluß auf die Differenzierung nehmen.

In jedem Fall sollte die Expression von MMP2 nach dem Silencing der  $\alpha 1(\text{VIII})$ -mRNA von Kollagen VIII in Hühnerchondrozyten untersucht werden. Auch in der Kollagen VIII Doppelknockout-Maus wäre es interessant, die Expression von MMPs zu untersuchen. Außerdem ist es wichtig, in Erfahrung zu bringen, ob beide Kollagen VIII-Ketten bei der Regulation von MMP2 und bei der Einwirkung von TGF- $\beta$  und FGF auf die Kollagen VIII-Expression eine Rolle spielen.

Da wir davon ausgehen, dass Kollagen VIII in der frühen Phase der späten Chondrozytendifferenzierung eine Rolle spielt, ist es notwendig, die Wachstumsfugen der Kollagen VIII Knockout-Maus zu einem früheren Zeitpunkt als der Geburt zu untersuchen, etwa an E=15 Tage. Außerdem könnte das zweite Ossifikationzentrum etwa 12 Tage nach der Geburt untersucht werden, da es in dieser Zeit gebildet wird und am 12. Tag nach der Geburt vielleicht ein Unterschied zwischen der Kollagen VIII Knockout-Maus und der Wildtyp-Maus zu sehen sein könnte.

Es wäre auch möglich, Chondrozyten aus dem Sternum und den Rippen der Knockout-Tiere zu kultivieren und ihr Verhalten während der Differenzierung *in vitro* mit dem Verhalten der Wildtyp-Chondrozyten zu vergleichen. Dieser Versuch wurde bereits einmal durchgeführt -in dieser Arbeit nicht vorgestellt- führte jedoch zu keinem auswertbaren Ergebnis, da die Chondrozyten der Wildtyp-Mäuse weniger vital waren.

Sehr interessant ist natürlich auch weiterhin die Absicht, Kollagen VIII auf Proteinebene nachzuweisen. In der Immunhistologie könnte hier mit dritten und vierten Antikörpern gearbeitet werden, die das, vielleicht schwache, Signal von Kollagen VIII verstärken und sichtbar machen könnten. Hierzu eignen sich Paraffin- oder Kryostatschnitte der Tibien von neugeborenen Mäusen. Eine andere Möglichkeit wäre, einen Antikörper gegen Kollagen VIII selber herzustellen.

Natürlich wäre es auch spannend, Kollagen VIII im Medium der Hühnerchondrozyten etwa nach dem Silencing oder nach einer unterschiedlichen Anzahl von Tagen in Kultur mittels Western-Blot-Analyse nachzuweisen

Weiter könnte man an der Überexpression der  $\alpha 1(\text{VIII})$ -Kette in Hühnerchondrozyten arbeiten. Leider sind die Transfektionsbedingungen bezüglich der Zellvitalität noch nicht genügend optimiert, um eine aussagekräftige Auswertung zu ermöglichen. Bei der Überexpression der  $\alpha 1(\text{VIII})$ -Kette ist man nicht auf einen Antikörper gegen Kollagen VIII angewiesen, sondern es ist ein Proteinnachweis mit Flag-Tag möglich.

Die Auswertung der Mäuse, in denen die  $\alpha 1(\text{VIII})$ -Kette unter der Kontrolle des Kollagen II-Promotors überexprimiert wird, soll natürlich ein wichtiger Punkt in der weiteren Untersuchung von Kollagen VIII sein. Hier sollen Skelettfärbungen der Mäuse in verschiedenen Embryonalstadien und von neugeborenen Mäusen vorgenommen werden. Außerdem sind auch (immun)histologische Färbungen der Tibien, wie bei der Kollagen VIII Knockout-Maus be-

reits geschehen, geplant. Auf jeden Fall sollte auch hier die Expression und die Aktivierung von MMPs und Kollagen X untersucht werden.

Des Weiteren sind in situ Hybridisierungen auf Schnitten der Tibien von den Mäusen geplant. Außerdem sollte auch auf jeden Fall die Rolle der  $\alpha 2(\text{VIII})$ -Kette in der späten Differenzierung aufgeklärt werden. Ein weiterer Versuch des Silencing in Chondrozyten aus dem embryonalen Hühnersternums wäre eine Möglichkeit, oder auch die Generierung eines Konstrukts zur Überexpression in der Maus, für den Fall, dass die Überexpression der ( $\alpha 1$ )-Kette erfolgreich verläuft. Außerdem sollte man  $\alpha 2(\text{VIII})$  auf jeden Fall nicht, da sie ja ebenfalls während der Differenzierung herunterreguliert wird (3.3.2.2).

## 5. Zusammenfassung

Während der enchondralen Ossifikation, der indirekten Knochenbildung aus einer knorpeligen Knochenanlage, durchlaufen die Chondrozyten verschiedene Stufen der Proliferation und der Spätdifferenzierung. Diese Prozesse werden durch lokal produzierte Wachstumsfaktoren, systemische Hormone und/oder Zell-Matrix-Interaktionen reguliert. Allerdings sind die Details nur unvollständig erforscht.

Das Sternum des embryonalen Huhns eignet sich als Model zur Untersuchung der enchondralen Ossifikation, da es Zellen mit unterschiedlichen Voraussetzungen zur Differenzierung enthält. Am 17. Tag im Ei beginnen die Chondrozyten im kranialen Teil des Sternums hypertroph zu werden, während die Differenzierung in den Chondrozyten des kaudalen Teils durch autokrine und parakrine Signale unterdrückt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden mögliche Faktoren zur Kontrolle der Differenzierung, die verstärkt in kaudalen Chondrozyten exprimiert werden, mittels suppressiver, subtraktiver Hybridisierung (SSH), eines Microarrays und Abgleich mit der NCBI-Datenbank identifiziert. Ebenfalls wurden Faktoren ermittelt, die verstärkt in kranialen Chondrozyten exprimiert werden. Durch die SSH wurden sieben Gene als in kaudalen Chondrozyten und sieben Gene als in kranialen Chondrozyten stärker exprimiert identifiziert und per Array konnten 22 Gene in kaudalen Chondrozyten und 28 in kranialen Chondrozyten als signifikant stärker exprimiert entdeckt werden.

Die Kollagen  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA wurde sowohl durch die SSH als auch durch den Array als in kaudalen Zellen stärker exprimiert identifiziert. Kollagen VIII ist ein Hauptbestandteil der Descemet-Membran des Auges und kommt z.B. auch in den Wänden von Arterien und im Knorpel vor. Seine Funktion im Knorpel ist noch unbekannt. Deshalb und da es eine große strukturelle Ähnlichkeit zu Kollagen X hat, welches während der späten Differenzierung in den hypertrophen Chondrozyten stark exprimiert wird, wurde es zur weiteren molekularbiologischen, biochemischen und histologischen Analyse ausgewählt.

Mittels Northern Blotting konnte die verstärkte Expression der  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA (3,5-fach erhöht) und der  $\alpha 2$ (VIII)-mRNA (zweifach erhöht) in kaudalen Chondrozyten bestätigt werden.

Kaudale und kraniale embryonale Hühner-Chondrozyten können in Agarosekulturen unter Zugabe bestimmter Stimulanzen zur späten Differenzierung angeregt werden. Dies kann durch die Untersuchung der Hypertrophiemarker wie Kollagen X und alkalischer Phosphatase nachgewiesen werden. Es wurde per semiquantitativer reverser Transkriptions-PCR gezeigt, dass die Expression von  $\alpha 1$ (VIII) und  $\alpha 2$ (VIII) während der späten Differenzierung von Hühnerchondrozyten *in vitro* abnimmt. Um eine mögliche Funktion von Kollagen VIII in der Regulation der Differenzierung zu überprüfen, wurden Silencing-Experimente durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Reduzierung der Kollagen  $\alpha 1$ (VIII)-Expression in kaudalen Chondrozyten zu einer Beschleunigung der hypertrophen Differenzierung der Zellen führt. Die Hypertrophiemarker Kollagen X und die alkalische Phosphatase wurden zu einem früheren Zeitpunkt als in den Kontrollen exprimiert. Dies spricht für eine negative Regulation der Differenzierung durch Kollagen  $\alpha 1$ (VIII).

Die Expression der  $\alpha 2$ (VIII)-mRNA wurde durch das Silencing der  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA nicht beeinflusst.

Histologische, immunhistochemische und Immunfluoreszenz-Untersuchungen der Kollagen VIII Knockout-Maus (*Col8a1<sup>-/-</sup>/Col8a2<sup>-/-</sup>*) (hergestellt von Dr. U. Hopfer, Basel) zeigten, dass sich die Wachstumsfugen der Knockout- und Wiltyp-Mäusen bei neugeborenen, 15,5 Tage alten und 50 Tage alten Mäusen in Zellzahl und Größe der hypertrophen Zone nicht unterscheidet. Vermutlich übernimmt hier ein bis jetzt unbekannter Faktor die Aufgabe von Kollagen VIII. Die Differenzierung der Chondrozyten wird von verschiedenen Faktoren

negativ reguliert und das Wegfallen eines Regulators muß deshalb nicht immer zu einem Phänotyp führen. Aus diesem Grund wird nun eine transgene Maus generiert, in welcher die  $\alpha 1(\text{VIII})$ -Kette mit Hilfe eines Kollagen II-Promotor-Konstrukts knorpelspezifisch überexprimiert werden soll. Die Erzeugung des Konstrukts war noch Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Nach den Ergebnissen der *in vitro* Silencing-Experimente ist zu erwarten, dass sich durch die Überexpression von  $\alpha 1(\text{VIII})$  die Differenzierung der Chondrozyten in den Röhrenknochen verzögert.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit läßt sich schließen, dass Kollagen  $\alpha 1(\text{VIII})$  eine Rolle in der Regulierung der späten Chondrozytendifferenzierung während der enchondralen Ossifikation spielt. Denkbar wäre, dass Kollagen VIII ein Netzwerk um die Chondrozyten herum ausbildet, das die Chondrozytenfunktion reguliert (Kollagen VIII als strukturelle Komponente der Matrix, Chondrozytendifferenzierung wird durch Zell-Matrix-WW reguliert). Diese mögliche Funktion von Kollagen VIII als strukturelle Komponente eines Netzwerks, wurde schon in der diabetischen Nephropathie beschrieben (Gerth et al., 2007). Oder es stimuliert über WW mit Integrinen oder DDRs die Expression von für die Differenzierung wichtigen Faktoren, wie etwa MMPs, wie es bei glatten Muskelzellen bereits gezeigt wurde (Hou et al., 2000, 2001). Eine Verstärkung der Expression von Kollagen VIII kann unter anderem mit FGF und TGF- $\beta$  erreicht werden, zwei lösliche Faktoren, die ebenfalls in der späten Chondrozytendifferenzierung eine Rolle spielen. Die Möglichkeit der Wechselwirkungen von Kollagen VIII mit anderen Komponenten der Matrix ist vielfältig und bietet viel Raum für weitere Untersuchungen.

## 6. Anhang

### 6.1 Nukleotidsequenzen von Kollagen VIII

#### 6.1.1 Kollagen $\alpha 1$ (VIII)-mRNA-Sequenz 1 von *Gallus gallus*

```

1 gctctcttac agtgaaaagc aaacaacctg tccttctgcc ctttcctgaa atctgaatgt
61 gatggccgtg ctgctcattc ccacacagct gttggcagtg gctggtgcca tttccctgca
121 gctgggtgagg tccactcagg gtgggtgtcta ctatggaatc aagcagctgc caccaccagg
181 gccccagtac caagccctcg gacaacaagt acctcacatg ccgctgggca aggaaggcat
241 cccgatgcag cacatgggca aggagggtgcc acacatgcag tatggcaaaag agtaccacca
301 cctgcctcag tacatgaagg aggttcccca ggtgccaatg ctcggaagg acatggctcc
361 caagaaggaa aaagaaatac ccattgcgcag cttgagggggc gagcaaggtc cccctggtga
421 gcctggacca agaggaccac cagggccacc aggattacca ggtcatggcg tgccaggagc
481 caaaggaaaa ccgggtccac aaggatatcc aggaattggg aagccgggtt tgccagggat
541 gcctgggaaa ccagggggtga tgggaccacc tgggccaaga ggagagatgg ggccgaaagg
601 agaggttggg cccatgggga taccggggcc acagggacca ccaggacctc atggactccc
661 agggataggg aaagcgggtg ctccggggct gcagggacag ccaggaccaa agggatgaacc
721 tgggatgaaa gggcccccag gggctccctgg gatccctggt ccaaaagggtg agaagggtgt
781 tgggatcccg ggtttgccag ggctgaaggg cccacctggg ctgcccggtc cccccggccc
841 tgtgggtctg ccagggggtg ggaagccagg tatggtgggg ttccctggcc ctgagggccc
901 tgtgggtaaa cctggtcccc caggtgagct agggctgcag gggcctccgg gtgtccctgg
961 gatgcaagga cctcccggcc tgctggcgt tggcaaacc ggccaagatg gcacccctgg
1021 tcagccaggt tcccagggtg gcaaagggga gcaaggcttg ccaggcttgc caggccctcc
1081 tggctctccc ggggttggta agccaggctt ccccgcccc aaaggtagc gtgggtagg
1141 tggcctgcct ggtcctctgg ggcccaaggg ggagaaaggc catgcagggc caccaggcat
1201 gggggggcca ccaggggagc caggacaacc aggcctgccg ggcatcatgg gccccccagg
1261 tgccgtcggg tcccaggac ccaaaggaga aggcggcgt gtggggccac caggaccagt
1321 gggcccaaaa ggcgaaccag gcctgcaggg gttcccaggg aagccaggct tcccgggga
1381 agtgggagca cccgggtga gggggctgcc aggcgccact gggcccaagg gagaagcagg
1441 acacaagggc ttgccggggc tgccgggtgt cccggggctt gtggggccga agggtagacc
1501 ggggtgcct ggtgcgcagg gccttcaggc ccctcgggt atcccaggca ttgcaggccc
1561 cagtggccct attggcccc cagggtgcc aggggccaag ggggaacctg gccaccgagc
1621 tcctcctggc tttcctggcg tgggaaaacc tggggctgca gggctgcagg ggctccagg
1681 gaagcctggg gcacttggtc cccctggcca gccaggcctc caggggcctc ccggtcccc
1741 tgggccacct ggacccccag taatcatccc cccgactcca ccggctgcgg gacagtacct
1801 gcccagagtg gggccaggga tagatggcct caagcccccc tacggctatg caggcaagaa
1861 gggcaaggcc ggcggcgctg tctacgagat gcctgcattc acggcagagc tcctcactcc
1921 cttcccccg gtcgggtgtg ccgtgaagtt tgacaagctc ctctacaacg gccggcagaa
1981 ctacaaccct gcaacaggga tcttcacctg tgagatccct gggatctact actttgccta
2041 ccacgttcac tgtaaagggt cgagcgtctg ggtggctttg ttcaagaaca acgagccact
2101 gatgtacacc tacgatgagt acaagaaggg ctctcctggac caagcctctg ggagtgtgt
2161 cgttcagctg atgcccggag acaaggttta cgttcaaagt ccatccgagc aggcagcagg
2221 actctatgcc gggcaatacg ttcactcatc tttttcagga tattttattgt atcccatgta
2281 g

```

**Sequenz 6.1:**  $\alpha 1$ (VIII) mRNA-Sequenz (*Gallus gallus*), veröffentlicht am 28. Juli 2004 bei NCBI (XM\_416597, Nov. 2006 ersetzt durch 6.1.2). Die atg-Startsequenz des ORF ist fett gedruckt. Die mRNA-Länge beträgt 2281 bp und die Länge des ORF beträgt 2220 bp. Die beiden siRNA-Sequenzen sind kursiv und fettgedruckt.

6.1.2 Kollagen  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA-Sequenz 2 von *Gallus gallus*

1 gatcttgtac actcaagaaa cagaagaaag tgcagacagt cagagccctt cgcatttggat  
 61 actcagcgct attatgttct cttcattgct ggatgtcaag tctcगतatc agaacagctt  
 121 cagtgaagta ctctcctatt aagctgaggg accatcttaa agtcaacaaa ataacaacgg  
 181 gccttacaca aacaggaaat ctagtctctc tacagtgaat agcaacaac cgtgccttct  
 241 gccctttcct gaaatctgaa tgtgatggcc gtgctgctca tccccacaca gctgttggca  
 301 gtggctggtg ccatttccct gcagctggtg aggtccactc aggggtggtg ctactatgga  
 361 atcaagcagc tggcacccca ggtgccccag taccaagccc tcggacaaca agtacctcac  
 421 atgcccgtgg gcaaggaagg catcccgatg cagcacatgg gcaaggaggt gccacacatg  
 481 cagtatggca aagagtaccc ccacctgcct cagtacatga aggaggttcc ccaggtgcca  
 541 atgctcggca aggacatggc tcccaagaag gaaaaagaaa taccatgctg cagcttgagg  
 601 ggcgagcaag gtccccctgg tgagcctgga ccaagaggac caccagggcc accaggatta  
 661 ccaggctcatg gcgtgccagg agccaaagga aaaccgggtc cacaaggata tccaggaatt  
 721 ggggaagccgg gtttgccagg gatgcctggg aaaccagggg tgatgggacc acctgggcca  
 781 agaggagaga tggggccgaa aggagaggtt gggcccatgg ggataccggg gccacagggg  
 841 ccaccaggac ctcatggact cccagggata gggaaagcgg gtgctccggg gctgcagggg  
 901 cagccaggac caaagggtga acctgggatg aaaggggccc caggggtccc tgggatccct  
 961 ggtccaaaag gtgagaaggg tgttgggatc ccgggtttgc cagggctgaa gggcccacct  
 1021 gggctgcccg gtccccccgg ccctgtgggt ctgccagggg tggggaaagcc aggtatgggtg  
 1081 gggttccctg gccctcaggg ccctgtgggt aaacctggct ccccaggtga gctagggctg  
 1141 caggggcctc cgggtgtccc tgggatgcaa ggacctcccg gctgcctgg cgttggcaaa  
 1201 cccggcaag atggcatccc tggtcagcca ggtttcccag gtggcaaaag ggagcaaggc  
 1261 ttgcccaggc tggcaggccc tctggctctc cccggggttg gtaagccagg ctccccggc  
 1321 cccaaagggt agcgtggggt aggtggcctg cctggctctc tggggcccaa gggggagaaa  
 1381 ggccatgcag ggccaccagg catggggggg ccaccagggg agccaggaca accaggcctg  
 1441 ccgggcatca tgggcccccc aggtgcccgtc ggtttccag gacccaagg agaaggcggc  
 1501 gctgtggggc caccaggacc agtgggccc aaaggcgaac caggcctgca ggggttccca  
 1561 ggggaagccag gctttcccg ggaagtggga gcaccgggc tgagggggct gccaggcccc  
 1621 actgggcca agggagaagc aggacacaag ggcttgccgg ggctgcccgg tgtcccggg  
 1681 cttgtggggc cgaagggtga gccggggtg cctggctgctc agggccttca gggccctcg  
 1741 ggtatcccag gcattgcagg gcccagtggc cctattggcc cccagggct gccagggg  
 1801 aagggggaac ctggccaacc cggctctct ggtttcctg gcgtgggaaa acctggggct  
 1861 gcagggtgctc agggccctcc agggaaagct ggggcacttg gtccccctgg ccagccaggc  
 1921 ctccaggggc ctcccgtcc ccctgggcca cctggacccc cagtaatcat cccccgact  
 1981 ccaccggctg cgggacagta cctgcccag gtggggccag ggatagatgg cctcaagccc  
 2041 ccctacggct atgcaggcaa gaagggcaag gccggcggcg ctgtctacga gatgcctgca  
 2101 ttcacggcag agctcctcac tcccttcccc cgggtcgggt tgcccgtgaa gtttgacaag  
 2161 ctctctaca acggccggca gaactacaac cctgcaacag ggatcttcc ctgtgagatc  
 2221 cctgggtact actactttgc ctaccagtt cactgtaaag gtgagagcgt tgggtggtc  
 2281 ttgttcaaga acaacgagcc actgatgtac acctacgatg agtacaagaa gggcttctctg  
 2341 gaccaagcct ctgggagtgc tgtcgttcag ctgatgccc gagacaaggt ttacgttcaa  
 2401 atgccaatcc agcaggcagc aggaactctat gccgggcaat acgttcactc atctttttca  
 2461 ggatatttat tgtatcccat gtagaacgaa aaccagacac aaacacacac acacacacaa  
 2521 atctaaacct ttcttctctg cttcaaactc tcataccaca aaagatgcat ttaatgaccg  
 2581 ttttggacca ttttgttaaa aaaaaataca aaatttaaca tgcacagcta gatataaaaa  
 2641 aaaaaagcaa gtgtggtgaa catattttaa ggcgtgtatc aggttcataa acagttgttt  
 2701 cgcacccaag ggggacatat tagctgtaca ttatatatt ctgtgatgcc gtgcttcatt  
 2761 tcatcacaat aatgcagtac taaggttcaa atcagtttat gtcactcact cctgttgtgt  
 2821 attcgactga tgcattgacc atagtaatga gatgaaaaac agcgactgag aacagagttag  
 2881 gtcagtctcg aattacatgg aaaaaaatga gtggcttttt atttgtctgg ggggattctg  
 2941 gtggtggttg gtggggtttt tttgacagca gggctgcctg acaagcggag gttctcttac  
 3001 cagagagctt tcttctctct ccctctatgt aagatatacc tgcaggttcg ttattgtttt  
 3061 ttcttgagcg atttgtttat tgtggaaaag gaactactgac agcagaacgg ttccctgaaa  
 3121 gctgtctcct ggggtctgtg gactcagcac accgctttac tccagcaggc actgggttca  
 3181 cctccaaaca ccacagcacc ttccaaaagc ctccatctgt actcgcactg ttgaagcaga  
 3241 tgcggtagat cagagaaaac gtaaggactc cgctggttgc attatgccac gtgattaaga  
 3301 catcttggcc gacagtgggc gatgcagcag ggtggtataa attagcacgg ttactctgct  
 3361 tcgtgctaaa aaccgcagct ctgtccagct tgcaaaaagg acacacgat tctgccactc  
 3421 ggccaaaacg gaatcagttt actcttccgt gactaggcaa agcagaagta gctctgtttg  
 3481 ctaattaact aactcatcgc ctgagatcaa ccaataacct tatccgcagt gctgatcaca

```

3541 caaagttatc cgacaacttc gttttatcta gcggttgatt tccagtcctt gtttatacgt
3601 taccagttgt ctaggagaat ctgcaggcct ccatcttttc tgtatctggg aaaagcggct
3661 tttatgcaag aactgtctgt tcatcaatgg tgctaattctc acctcaagag tattaattta
3721 aaaacgacag tgtcctttctc tgtgtttccc tgtccagtgc tgcacgtcat acacttacgt
3781 tagttgaaag agttaattgc tcctcacttc ttccatgtct tagctaacgc taccgctttt
3841 gattcaaaaa atgaactaga gttttcacgc agaactaaaa ttggatttaa ctggcattac
3901 tgttatttaa atacagagtt taatgcagtc tgacattgac taaggactcc agtgatataa
3961 tgtgggtgctt tatctcagaa gttttatgga acgttggcag gaacggacgg acagcttacc
4021 agccactggg gactttggta tgtttccaga atatatgaga tatgtcaaaa gcaataatt
4081 ttgtatttaa aatttttgta ctgatttgaa aaaaaaata tcttattaaa tatcttgg

```

**Sequenz 6.2:  $\alpha 1$ (VIII) mRNA-Sequenz (*Gallus gallus*),** veröffentlicht am 16. November 2006 bei NCBI (XM\_416597). Die atg-Startsequenz und die tag-Stopsequenz des ORF sind fett gedruckt. Die Start-Sequenz des Est7m5 ist unterstrichen. Die mRNA-Länge beträgt 4138 bp. In der neuen Sequenz ist die Est7m5-Sequenz integriert in die  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA.

### 6.1.3 Kollagen $\alpha 2$ (VIII)-mRNA-Sequenz von *Gallus gallus*

```

1 atgacaccgg agggctctca gtccccggcg gctgcagtgg ggctggcggg ggcctgctg
61 tgtggggcacg cggctgccag ggggatacgc gccgtcccgg tgcgaacaac gcagcgcgac
121 cccgcaactgc cgcaccgcat cgcgctccga acttcgtgcg ggcacagagt caagtacatg
181 cagcccatgg tgaaggggccc cctgggaccc ccgtttcggg aaggcaaaag gcagtacctt
241 gacatgccgc cgctgctgcc catggacctc aaaggggagc cgggaccacc agggaaagccc
301 ggcccacgtg gccccccggg accccccggc taccaggaa aaccaggcac agggaaagccg
361 ggcatgcatg gtcagccggg gcctgcccgg cccctggct tctctggcat tgggaaacctt
421 ggcatcccag gactgcctgg caaggcgggt atgaagggga tgcccggagc caagggcgaa
481 cctggcatgc ggggagagca agggcccaga ggactgcccg gccctccagg gctgccaggg
541 cctgctggca tctcagtc aa tgggaaacct ggaccccagg gtggcccggg gctgccaggg
601 tttcgggggtg agcctggccc taaaggagag ccaggacccc gtggggagag agggatgaag
661 ggtgaaaatg gagtggggaa accagggtcg ccggggccac ggggcaatgg tggccctcct
721 ggccctgccc ggccgcccagg acctgttggc gttggcaaac ccggccttga tgggctgcct
781 ggccgaccag gggagaaggg tgacatgggc cccccggggg ggccgggggt cagtggggag
841 cctggccctg cagggccacg ggggcccgcct ggcatcgatg ggatcgggtg ccccggtgcc
901 gcggggggtg cagggatata gggccccatg gggccaaagg gggaaaccggg catccgcggc
961 cccccgggtt taccaggcgc cacaggctac gggaaagccag gcttgcccgg cctcaaagga
1021 gaccgcccggc agcctggggg gccaggagcc attggcgata aagggaacc cggagtcgat
1081 ggtgagccgg gcgagcaggc ccctgcccgt gtcatcgggc caccaggccc accgggtcc
1141 atgggcccac cgggcaaaaca tgggctgcca ggccccaaag gtgatgcggg gccagtgagg
1201 ccaccgggaa tgccggggat gcgaggtgac caggggccaa acggtctcgc agggaaacca
1261 ggagtgccag gagaaagggg tctgcccgga tcacagggcc cccccggccc ggcaggcccc
1321 aaaggagaac cggggttcat cggcctcccc ggggtgccgg gattgacggg cggccccggg
1381 cccaaagggg atgggtgggat cccggggcag ccggggctga ggggcccctc cggcatcccc
1441 ggcttgccag gaccgcgggg gcccatgggg cctcaggggc tgccggggct caaaggggag
1501 ccggggctcc ccgggggttc cggtgagggg aagatgggcg agcccggcat ggccggcccc
1561 atcggccccc cgggaatgcc gggaaacacc gggctcaacg ggccgcccgg cccccctggg
1621 ccaccggggc caccgggagc accgggggtg tttgacgaga cgggcatcgc ggggctgcac
1681 ctgcctgacg gcggcgtgga gggggccgtg ctgggcaacg gcaagccggg caagccgcag
1741 tacggccgag gagagctctc tgcccgcate gcgcccgcct tcaccgccat cctcacctcc
1801 cccttcccgg cgtccggcat gcctgtcaag ttcgacagga ctttgtacaa cgggcacaac
1861 ggctacaacc cggtcacggg gatcttcacc tgccccatct ccggcatcta ctactttgcc
1921 taccacgtgc acgtcaaagg gaccaacgtc tgggtggctc tttataagaa caacgtgccc
1981 gccacctaca cctacgacga gtacaaaaag gggtagctgg accaggcgtc gggcagtgcc
2041 gtgcttgaac tgaaggagaa cgaccaggtc tgggtgcaga tgccctctga ccaggccaac
2101 gggctgtact ccacggaata catccactcc tcttctctg ggttctctg gtgcccaca
2161 taa

```

**Sequenz 6.3:  $\alpha 2$ (VIII)-mRNA-Sequenz (*Gallus gallus*),** veröffentlicht am 28. Juli 2004 bei NCBI (XM\_425780, seit Nov. 2006 startet NCBI-Sequenz bei 244). Die Länge der mRNA-Sequenz beträgt 2163 bp bzw. 1920bp.

### 6.1.4 Kollagen $\alpha 1$ (VIII)-mRNA-Sequenz von *Mus musculus*

```

1 atggctgtgcc caccaggccc tctacagctg ctgggaatac tgttcatcat ttcctgaac
61 tctgtcagac tcattcaggc cgggtgacct tatggaatca agcctctgcc acctcaaatc
121 cctcctcaga taccaccaca aattccacag taccagccct tgggccagca agtcctcac
181 atgcctttgg gcaaagatgg cctttccatg ggcaaggaga tgcctcacat gcagtatggc
241 aaagagtacc cacacctacc ccaatatatg aaggaaatcc cacctgtgcc aagaatgggc
301 aaggaagtgg tgcccaaaaa aggcaaagga gaagtaccgt tagccagttt gcgcgagaa
361 caaggtcccc gtggagaacc tggaccaaga ggaccacctg ggccgccagg tttaccaggt
421 catggaatgc ctggaatcaa aggaaaacca gggcccagag gatatccagg aattggaaa
481 cccggatgac ctggaatgcc tgggaagcca ggagccatgg gaatgccagg ggcaaaaggc
541 gaaattggac ccaaagggga aatcggacct atgggaatcc cagggccaca agggcctcca
601 ggacctcatg gacttcctgg catcgggaaa ccgggtgggc cagggttacc agggcaacca
661 ggagcaaaag gtgagagggg gcccaaagga ccaccaggac ctcccggcct tcagggtccc
721 aaaggagaga agggcttcgg gatgcctggc ttgccagggtc tgaaggggtcc tccaggtatg
781 catggccctc ctggaccagt tggactaccg ggagtaggaa aaccaggagt gacaggcttt
841 cctggaccac agggctccct ggggaagcca gggcctccag gggaaacctg accacaaggc
901 cttattggtg tgccaggagt tcaaggacct cctgggatgc ctggagtgg aaagccagg
961 caggatggga tcccgggcca accaggattt ccgggtggta aaggggaaca aggattgcca
1021 ggggtgcctg gacccccagg cctcccaggg gtccgaaagc caggtttccc aggaccaaa
1081 ggggaccggg gtattggggg tgttcctggg gttcctgggc cgagagggga aaaaggacc
1141 attgggtctc ctggaatggg ggggtccact ggagagccag gcctaccgg tatcccggg
1201 cccatgggcc ctccagggtg tattggtttc cctggacca aaggagaagg tggagtgtg
1261 ggaccacagg gtccaccagg ccccaaggga gagcctggcc tccaaggctt ccctgggag
1321 ccaggttttc ttggtgaagt aggtccccct ggcattgagg gtttgctgg tcctatagga
1381 cccaagggag aaggtggtca caaagggttg ccagggttc ccggtgttcc agggctgctt
1441 ggacccaaag gagaacctgg catacctggg gatcagggtc tacagggtcc cccagggtt
1501 ccagggatcg taggacctag tggcctatt ggacccctg ggattccggg ccccaaagga
1561 gaaccaggcc tcccagggcc ccctgggttc cctggtgtag ggaagccagg agtagcagga
1621 cttcatgggc ccccggggaa acctggtgcc cttgggcctc aaggccagcc tggccttct
1681 ggacccccag gtccctcagg acccccagge cctccagctg tgatgcctac acctcacc
1741 caggagagat atctgccaga tatgggacta ggaattgatg ggggtgaaacc tccgcatgcc
1801 tatgcgggca aaaagggcaa acacggaggg ccagcctatg agatgcctgc gtttactgcc
1861 gagctgactg tacctttccc accggtgggg gccccagtga agtttgaaa gctgctctac
1921 aacggcagac agaactacaa tccgcagaca ggcatttca cctgtgaagt cccgggtgtc
1981 tactactttg cttatcatgt tcaactgcaag ggaggcaacg tatgggttgc tctcttcaag
2041 aacaacgagc ccatgatgta cacatacagc gactacaaga agggctttct ggaccaagca
2101 tctggaagcg cagtactgct tctccgtccc ggagaccagg tgtttctcca aatgccttca
2161 gaacaggctg ctggactcta tgccgggcaa tatgtccact cctccttttc aggatattta
2221 ttgtatccca tgGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGTAATTT

```

Unsere Sequenz: ATG GCT GTG **CCA CCA GGC CCT**

NCBI Sequenz: ATG GCT GTG **CCA CCC AGG CCT**

Aminosäure:

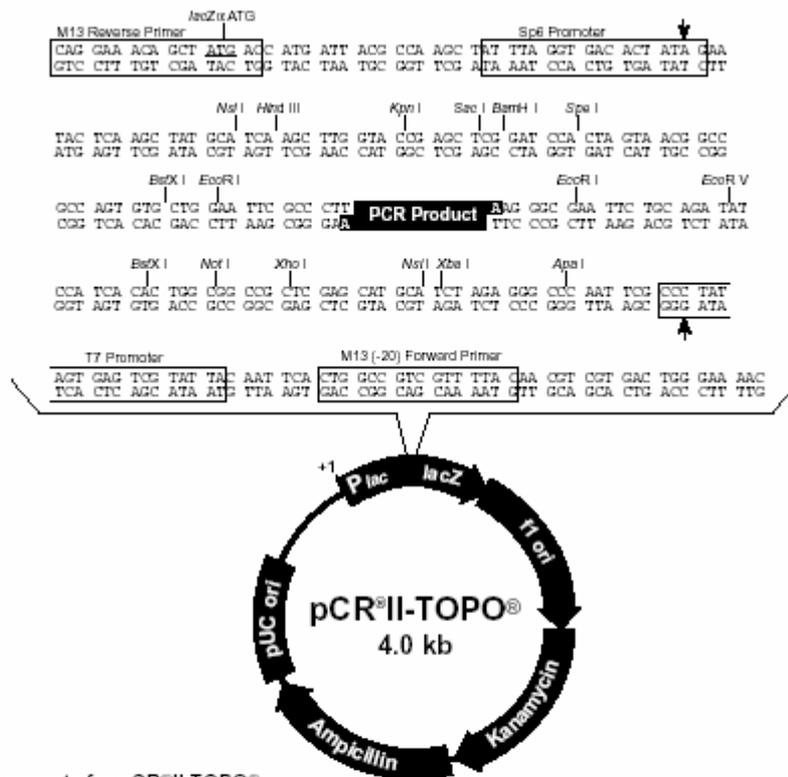
Glycin (GGC)

Arginin (AGG)

**Sequenz 6.4:**  $\alpha 1$ (VIII)-mRNA-Sequenz (*Mus musculus*), veröffentlicht am 04. Jan. 2009 bei NCBI (NM\_007739). Die eigentliche Sequenz des ORF hat eine Länge von 2235 bp. Die Sequenz mit dem Myc-Tag (Großbuchstaben) hat eine Länge von 2268 bp. Die Sequenz weicht beim Basentriple 5-7 (fettgedruckt) von der NCBI- Sequenz ab. Die genaue Abweichung der Sequenz ist unten noch einmal dargestellt. Sie führt zum Austausch einer Aminosäure.

## 6.2 Vektorkarten

### 6.2.1 Zwischenklonierungsvektor pCR<sup>®</sup> II-TOPO (Invitrogen, USA)

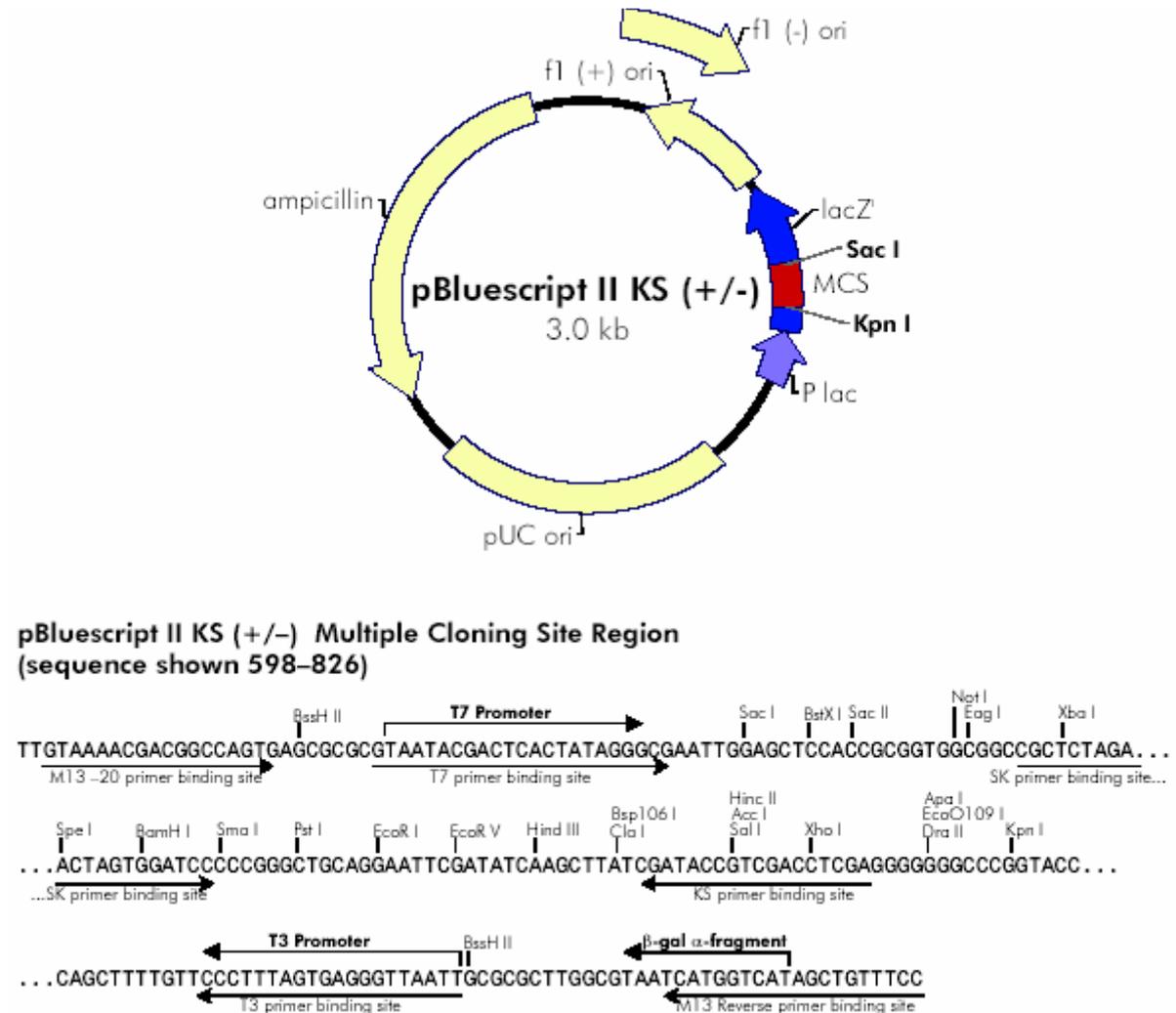


Comments for pCR<sup>®</sup> II-TOPO<sup>®</sup>  
3973 nucleotides

*LacZα* gene: bases 1-589  
M13 Reverse priming site: bases 205-221  
Sp6 promoter: bases 239-256  
Multiple Cloning Site: bases 269-383  
T7 promoter: bases 406-425  
M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448  
f1 origin: bases 590-1027  
Kanamycin resistance ORF: bases 1361-2155  
Ampicillin resistance ORF: bases 2173-3033  
pUC origin: bases 3178-3851

**Abbildung 6.1: Vektorkarte von pCR<sup>®</sup> II-TOPO.** Das Plasmid wurde zur TOPO-Klonierung verwendet. Es diente zur Zwischenklonierung und zur Sequenzierung von cDNA-Abschnitten.

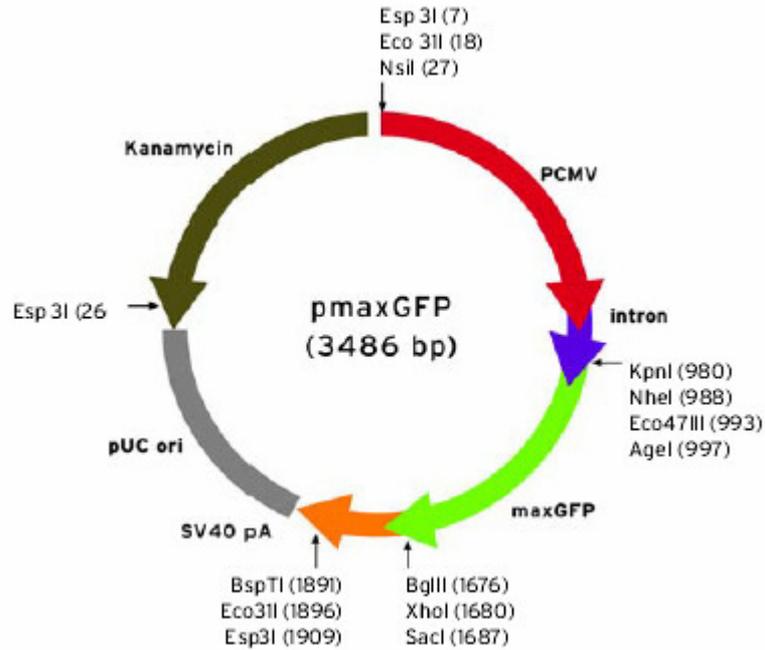
## 6.2.2 Zwischenklonierungsvektor pBluescript II KS (Stratagene, La Jolla, USA)



Feature	Nucleotide Position
f1 (+) origin of ss-DNA replication [pBluescript KS (+) only]	135–441
f1 (-) origin of ss-DNA replication [pBluescript KS (-) only]	21–327
$\beta$ -galactosidase $\alpha$ -fragment coding sequence ( <i>lacZ'</i> )	460–816
multiple cloning site	653–760
T7 promoter transcription initiation site	643
T3 promoter transcription initiation site	774
<i>lac</i> promoter	817–938
pUC origin of replication	1158–1825
ampicillin resistance ( <i>bla</i> ) ORF	1976–2833

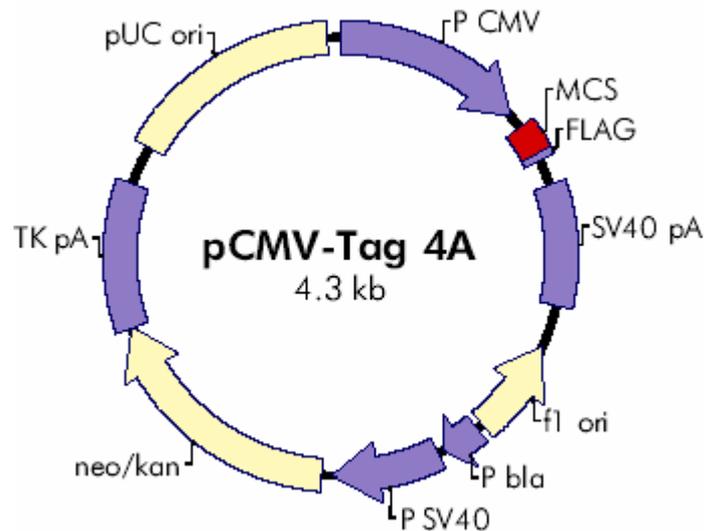
**Abbildung 6.2: Vektorkarte von pBluescript II KS.** Der Vektor wurde zur Zwischenklonierung verwendet. Außerdem ist das Kollagen II-Promotor-Konstrukts von Dr. A. Aszodi in diesen Vektor integriert.

## 6.2.3 Expressionsvektor zur Kontrolle, pmaxGFP (Lonza, Köln)



**Abbildung 6.3: Kontrollvektor zur Expression von GFP in Chondrozyten.** Das Plasmid wurde verwendet, um ein geeignetes Programm von amaxa/Lonza zur Transfektion der Hühner-Chondrozyten zu finden. Die transfizierten Chondrozyten konnten im Fluoreszenzmikroskop leicht identifiziert werden.

## 6.2.4 Expressionsvektor pCMV-Tag-4A (Stratagene, La Jolla, USA)



**CMV promoter** 1–602  
**multiple cloning site** 651–743  
**FLAG tag** 744–767  
**SV40 polyA** 852–1235  
**f1 origin** 1373–1679  
**bla promoter** 1704–1828  
**SV40 promoter** 1848–2186  
**neomycin/kanamycin resistance ORF** 2221–3012  
**HSV-TK polyA** 3013–3471  
**pUC origin** 3600–4267

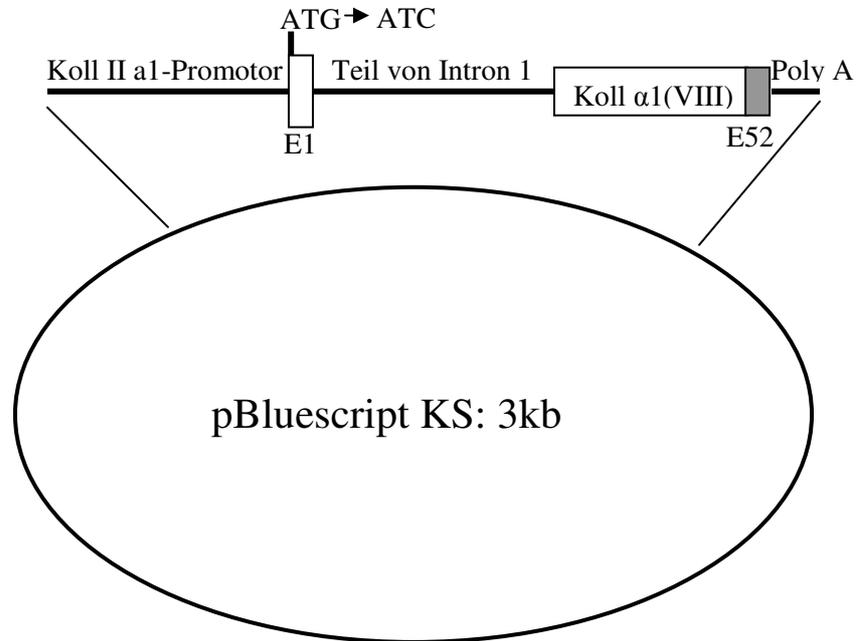
**pCMV-Tag 4A Multiple Cloning Site Region**  
 (sequence shown 620–839)

```

      T3 promoter
A ATT AAC CCT CAC TAA AGG GAA CAA AAG CTG GAG CTC CAC CGC GGT GGC GGC CGC TCT A...
      Sac I   BstX I   Sac II   Not I
      |       |       |       |
...GC CCG GGC GGA TCC CCC GGG CTG CAG GAA TTC GAT ATC AAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC...
      Srf I   BamH I   Pst I   EcoR I   EcoR V   Hind III   Acc I/Sal I
      |       |       |       |       |       |
...CTC GAG GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG TAG GGCCCGGTACCT...
      Xho I   FLAG tag
      |       |       |       |       |       |
      D Y K D D D D K
      STOP
      T7 promoter
... TAATTAATTAAGGTACCAGGTAAGTGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTA
      MULTIPLE STOP CODONS
  
```

**Abbildung 6.4: Vektor zur Expression der  $\alpha 1$ -Kette von Kollagen VIII in Hühner Chondrozyten.** Zur vereinfachten Detektion des Proteins befindet sich eine Flag-Tag-Sequenz auf dem Plasmid. Der ORF von *Col8a1* aus Huhn wurde vor den Flag-Tag kloniert.

## 6.2.5 Bausatz Kollagen VIII in Plasmid



**Abbildung 6.5: Plasmid zur Vermehrung des  $\alpha 1(\text{VIII})$ /Kollagen II-Promotor-Konstrukts in *E.coli*.** Vor der Mikroinjektion in den männlichen Vorkern einer Oozyte einer Maus, wird das Konstrukt ausgeschnitten. Die Größe der Promotor- und Intronregion beträgt 7480 bp, das Plasmid besitzt eine Größe von 3000 bp und die Kollagen  $\alpha 1(\text{VIII})$ -cDNA mit Myc-Tag hat eine Größe von 2268 bp. Die genaue Sequenz der Promotor- und Intronregion kann bei Dr. Rita Dreier, Münster, eingesehen werden. Das genaue Verfahren zur Mikroinjektion wird in der Doktorarbeit von Markus Schmitz, Köln, dargestellt.

### 6.3 Literatur

- Abad, V., Meyers, J.L., Weise, M., Gafni, R.I., Barnes, K.M., Nilsson, O., Bacher, J.D. und Baron, J. (2002). The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology*, 143 (5), 1851-1857.
- Adams, J.C. und Watt, F.M. (1993). Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development*, 117 (4), 1183-1198.
- Adams, S.L., Pallante, K.M., Niu, Z., Cohen, A.J., Lu, J. und LeBoy, P.S. (2003). Stimulation of type-X collagen gene transcription by retinoids occurs in part through the BMP signaling pathway. *J Bone Joint Surg Am.*, 85-A Suppl 3:29-33.
- Adiguzel, E., Hou, G., Mulholland, D., Hopfer, U., Fukai, N., Olsen, B. und Bendeck, M. (2006). Migration and growth are attenuated in vascular smooth muscle cells with type VIII collagen-null alleles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 26 (1), 56-61.
- Akiyama, H., Chaboissier, M.C., Martin, J.F., Schedl, A. und de Crombrughe, B. (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for Expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* 16, 2813-2828.
- Akiyama, H., Lyons, J.P., Mori-Akiyama, Y., Yang, X., Zhang, R., Zhang, Z., Deng, J.M., Taketo, M.M., Nakamura, T., Behringer, R.R., McCrea, P.D. und deCrombrughe B., (2004). Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev.*, 18 (9), 1072-1087.
- Allain, T.J. und McGregor, A.M. (1993). Thyroid hormones and bone. *J. o. Endocrinology*, 139 (1), 9-18.
- Allander E. (1994). Kashin-Beck disease. An analysis of research and public health activities based on a bibliography 1849-1992. *Scand. J. Rheumatol. Suppl.*, 99, 1-36.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410.
- Alvarez, J., Balbín, M., Santos, F., Fernández, M., Ferrando, S. und López, J.M. (2000). Different bone growth rates are associated with changes in the expression pattern of types II and X collagens and collagenase 3 in proximal growth plates of the rat tibia. *J Bone Miner Res.*, 15 (1), 82-94.
- Amizuka, N., Warshawsky, H., Henderson, J.E., Goltzman, D. und Karaplis, A.C. (1994). Parathyroid hormone-related peptide-depleted mice show abnormal epiphyseal cartilage development and altered endochondral bone formation. *J. Cell. Bio.*, 126 (6), 1611-1623.
- Anderson, H.C. (1995). Molecular biology of matrix vesicles. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, (314), 266-280.
- Apte, S.S. und Olsen, B.R. (1993). Characterization of the mouse type X collagen gene. *Matrix* 13 (2), 165-179.
- Arikawa-Hirasawa, E., Watanabe, H., Takami, H., Hassell, J.R. und Yamada, Y. (1999). Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat. Genet.*, 23 (3), 354-358.
- Arosio, P., Adelman, T.G. und Drysdale, J.W. (1978). On ferritin heterogeneity. Further evidence for heteropolymers. *J. Biol. Chem.*, 253 (12), 4451-4458.

- Asamura, K.; Abe, S.; Imamura, Y.; Aszodi, A.; Suzuki, N.; Hashimoto, S.; Takumi, Y.; Hayashi, T.; Fassler, R.; Nakamura, Y. und Usami, S. (2005). Type IX collagen is crucial for normal hearing. *Neuroscience*, 132 (2), 493-500.
- Aszodi, A., Hunziker, E.B., Brakebusch, C. und Fassler, R. (2003). Beta1 integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis. *Genes and Development*, 17 (19), 2465-2479.
- Audhya, T.K., Segen, B.J. und Gibson, K.D. (1976). Stimulation of proteoglycan synthesis in chick embryo sternum by serum and L-3,5,3'-triiodothyronine., 251 (12), 3763-7.
- Babarina, A.V., Möllers, U., Bittner, K., Vischer, P. und Bruckner, P. (2001). Role of the subchondral vascular system in endochondral ossification: endothelial cell-derived proteinases derepress late cartilage differentiation in vitro. *Matrix Bio.*, 20 (3), 205-213.
- Ballock, R.T. und Reddi, A.H. (1994). Thyroxine is the serum factor that regulates morphogenesis of columnar cartilage from isolated chondrocytes in chemically defined medium. *Cell Biology*, 126 (5), 1311-1318.
- Bateman, J.F., Lamander, S.R., Ramshaw, J.A.M. (1996). Collagen superfamily, In: *Extracellular Matrix*. W.D. Camper, ed. (Melbourne: Harwood Academic Press), pp. 22-67.
- Bates, G.P., Schor, S.L., und Grant, M.E. (1987). A comparison of the effects of different substrata on chondrocyte morphology and the synthesis of collagen types IX and X. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 23 (5), 374-380.
- Becker, B. und Middleton, W.H. (1955). Long-term acetazoleamide (diamox) administration in therapy of glaucomas. *AMA Arch. Ophthalmol.*, 54 (2), 187-92.
- Behrens, J., von Kries, J.P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. und Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, 382 (6592), 638-642.
- Belkin, A.M. und Stepp, M.A. (2000). Integrins as receptors for laminins. *Microsc. Res. Tech.* 51(3), 280-301.
- Benya, P.D. (1980). EC collagen: biosynthesis by corneal endothelial cells and separation from type IV without pepsin treatment or denaturation. *Ren. Physiol.*, 3 (1-6), 30-35.
- Benya, P.D. und Shaffer, J.D. (1982). Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell.*, 30 (1), 215-224.
- Bernfield, M. und Sanderson, R.D. (1990). Syndecan, a developmentally regulated cell surface proteoglycan that binds extracellular matrix and growth factors. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 327 (1239), 171-186.
- Bernfield, M., Kokenyesi, R., Kato, M., Hinkes, M.T., Spring, J., Gallo, R.L. und Lose, E.J. (1992). Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 8, 365-393.
- Bessey, A.O., Lowry, O.H. und Brock, M.J. (1946). A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.*, 164, 321-329.
- Bi, W., Huang, W., Whitworth, D.J., Deng, J.M., Zhang, Z., Behringer, R.R., und de Crombrughe, B. (2001). Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98 (12), 6698-6703.

- Birk, D.E. und Bruckner, P. (2005). Collagen Suprastructure. *Top Curr. Chem.*, 247, 185-205.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Bissell, M.J., Hall, H.G. und Parry, G. (1982). How does the extracellular matrix direct gene expression? *J. Theor. Biol.*, 99 (1), 31-68.
- Biswas, S., Munier, F.L., Yardley, J., Hart-Holden, N., Perveen, R., Cousin, P., Sutphin, J.E., Noble, B., Batterbury, M., Kielty, C., Hackett, A., Bonshek, R., Ridgway, A., McLeod, D., Sheffield, V.C., Stone, E.M., Schorderet, D.F. und Black, G.C. (2001). Missense mutations in COL8A2, the gene encoding the alpha2 chain of type VIII collagen, cause two forms of corneal endothelial dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 10 (21), 2415-2423.
- Bittner, K., Vischer, P., Bartholmes, P., Bruckner, P. (1998). Role of the subchondral vascular system in endochondral ossification: endothelial cells specifically derepress late differentiation in resting chondrocytes in vitro. *Exp. Cell Res.* , 238 (2), 491-497.
- Bix, G., Castello, R., Burrows, M., Zoeller, J.J., Weech, M., Iozzo, R.A., Cardi, C., Thakur, M.L., Barker, C.A., Camphausen, K. und Iozzo, R.V. (2006). Endorepellin in vivo: targeting the tumor vasculature and retarding cancer growth and metabolism. *J Natl Cancer Inst.*, 98 (22), 1634-1646.
- Blaschke, U.K., Eikenberry, E.F., Hulmes, D.J., Galla, H.J. und Bruckner, P. (2000). Collagen XI nucleates self-assembly and limits lateral growth of cartilage fibrils. *J. Biol. Chem.*, 275 (14), 10370-10378.
- Blumbach, K., Niehoff, A., Paulsson, M. und Zaucke, F. (2008). Ablation of collagen IX and COMP Disrupts epiphyseal cartilage architecture. *Matrix Biology*, 27, 306-318.
- Böhme, K., Conscience-Egli, M., Tschan, T., Winterhalter, K.H. und Bruckner, P. (1992). Induction of proliferation or hypertrophy of chondrocytes in serum-free culture: the role of insulin-like growth factor-I, insulin, or thyroxine. *J.C.B.*, 116 (4), 1035-1042.
- Böhme, K., Winterhalter, K.H. und Bruckner, P. (1995). Terminal differentiation of chondrocytes in culture is a spontaneous process and is arrested by transforming growth factor-beta 2 and basic fibroblast growth factor in synergy. *Exp.Cell Res.*, 216 (1), 191-198.
- Bord, S., Horner, A., Hembry, R.M. und Compston, J.E. (1998). Stromelysin-1 (MMP-3) and stromelysin-2 (MMP-10) expression in developing human bone: potential roles in skeletal development. *Bone.*, 23 (1), 7-12.
- Bouvard, D., Brakebusch, C., Gustafsson, E., Aszódi, A., Bengtsson, T., Berna, A. und Fässler, R. (2001). Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Circ.res.*, 89 (3), 211-223.
- Boyan, B.D.; Sylvia, V.L.; McKinney, N. und Schwartz, Z. (2003). Membrane actions of vitamin D metabolites 1alpha,25(OH)2D3 and 24R,25(OH)2D3 are retained in growth plate cartilage cells from vitamin D receptor knockout mice. *J. Cell. Biochem.*, 90 (6), 1207-1223.
- Briggs, M.D., Choi, H., Warman, M.L., Loughlin, J.A., Wordsworth, P., Sykes, B.C., Irlen, C.M., Smith, M., Wynne-Davies, R. und Lipson, M.H. ( 1994). Genetic mapping of a locus for multiple epiphyseal dysplasia (EDM2) to a region of chromosome 1 containing a type IX collagen gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 55 (4), 678-684.
- Brittingham, R., Uitto, J. und Fertala, A. (2006). High-affinity binding of the NC1 domain of collagen VII to laminin 5 and collagen IV. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 343 (3), 692-699.

- Brochhausen, C., Lehmann, M., Halstenberg, S., Meurer, A., Klaus, G. und Kirkpatrick, C.J. (2009). Signalling molecules and growth factors for tissue engineering of cartilage-what can we learn from the growth plate? *J.Tissue Eng Regen.Med.*
- Bruckner, P., Mendler, M., Steinmann, B., Huber, S. und Winterhalter, K.H. (1988). The structure of human collagen type IX and its organization in fetal and infant cartilage fibrils. *J. Biol. Chem.*, 263 (32), 16911-16917.
- Bruckner, P., Horler, I., Mendler, M., Houze, Y., Winterhalter, K.H., Eich-Bender, S.G. und Spycher, M.A. (1989). Induction and prevention of chondrocyte hypertrophy in culture. *J.Cell Biol.*, 109 (5), 2537-2545.
- Brunet, L.J., McMahon, J.A., McMahon, A.P. und Harland, R.M. (1998). Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science*, 280 (5368), 1455-1457.
- Buckwalter, J.A. und Mankin, H.J. (1998). Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr. Course Lect.*, 47, 477-486.
- Budde, B., Blumbach, K., Ylöstalo, J., Zaucke, F., Ehlen, H.W., Wagener, R., Ala-Kokko, L., Paulsson, M., Bruckner, P. und Grässel, S. (2005). Altered integration of matrilin-3 into cartilage extracellular matrix in the absence of collagen IX. *Mol. Cell Biol.*, 25 (23),10465-10478.
- Burch WM, Weir S und Van Wyk JJ., (1986). Embryonic chick cartilage produces its own somatomedin-like peptide to stimulate cartilage growth in vitro. *Endocrinology.*, 119 (3), 1370-1376.
- Byers, R.J., Hoyland, J.A., Dixon, J. und Freemont, A.J. (2000). Subtractive hybridization--genetic takeaways and the search for meaning. *Int. J. Exp. Pathol.*, 81(6), 391-404.
- Calvi, L.M. und Schipani, E. (2000). The PTH/PTHrP receptor in Jansen`s metaphyseal chondrodysplasia. *J. Endocrinol. Invest.* 23 (8), 545-54.
- Campbell, M.R., Gress,C.J., Appleman, E.H. und Jacenko, O. (2004). Chicken collagen X regulatory sequences restrict transgene expression to hypertrophic cartilage in mice. *Am. J. Pathol.*, 164 (2), 487-499.
- Camper, L., Heinegård, D., Lundgren-Akerlund, E. (1997). Integrin alpha2beta1 is a receptor for the cartilage matrix protein chondroadherin. *J. Cell Biol.*, 138 (5), 1159-1167.
- Cancedda, R., Descalzi Cancedda, F. und Castagnola, P. (1995). Chondrocyte differentiation. *Int. Rev. Cytol.*, 159, 265-358.
- Canty, E.G. und Kadler, K.E. (2005). Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J.Cell Sci.*, 118 (Pt 7), 1341-1353.
- Cao, W., Epstein, C., Liu, H., DeLoughery, C., Ge, N., Lin, J., Diao, R., Cao, H., Long, F., Zhang, X., Chen, Y., Wright, P.S., Busch, S., Wenck, M., Wong, K., Saltzman, A.G., Tang, Z., Liu, L., Zilberstein, A. (2004). Comparing gene discovery from Affymetrix GeneChip microarrays and Clontech PCR-select cDNA subtraction: a case study. *BMC Genomics*, 5 (1), 26.
- Carrascosa, A., Ferrández, M.A., Audi, L. und Ballabriga, A. (1992). Effects of triiodothyronine (T3) and identification of specific nuclear T3-binding sites in cultured human fetal epiphyseal chondrocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 75 (1), 140-144.

- Carulli, J.P., Artinger, M., Swain, P.M., Root, C.D., Chee, L., Tulig, C., Guerin, J., Osborne, M., Stein, G., Lian, J. und Lomedico, P.T. (1998). High throughput analysis of differential gene expression. *J. Cell Biochem. Suppl.* 30-31, 286-296.
- Castagnola, P., Moro, G., Descalzi-Cancedda, F. und Cancedda, R. (1986). Type X collagen synthesis during in vitro development of chick embryo tibial chondrocytes. *J. Cell. Biol.*, 102(6), 2310-2317.
- Chan, D., Weng, Y.M., Graham, H.K., Silience, D.O. und Bateman, J.F. (1998). A nonsense mutation in the carboxyl-terminal domain of type X collagen causes haploinsufficiency in schmid metaphyseal chondrodysplasia. *J.Clin.Invest.*, 101 (7), 1490-1499.
- Chan D, Ho MS, Cheah KS. (2001). Aberrant signal peptide cleavage of collagen X in Schmid metaphyseal chondrodysplasia. Implications for the molecular basis of the disease. *J. Biol. Chem.* 276 (11), 7992-7997.
- Cheah, K.S., Lau, E.T., Au, P.K. und Tam P.P. (1991). Expression of the mouse alpha 1(II) collagen gene is not restricted to cartilage during development. *Development.*, 111 (4), 945-53.
- Cheah, K.S., Levy, A., Trainor, P.A., Wai, A.W., Kuffner, T., So, C.L., Leung, K.K., Lovell-Badge, R.H. und Tam, P.P. (1995). Human COL2A1-directed SV40 T antigen expression in transgenic and chimeric mice results in abnormal skeletal development. *J. Cell Biol.*, 128 (1-2), 223-237.
- Cheung, J.O., Grant, M.E., Jones, C.J., Hoyland, J.A., Freemont, A.J. und Hillarby, M.C. (2003). Apoptosis of terminal hypertrophic chondrocytes in an in vitro model of endochondral ossification. *201 (3)*, 496-503.
- Chintala, S.K., Miller, R.R. und McDevitt, C.A. (1995). Role of heparan sulfate in the terminal differentiation of growth plate chondrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 316 (1), 227-234.
- Chu, M.L., Mann, K., Deutzmann, R., Pribula-Conway, D., Hsu-Chen, C.C., Bernard, M.P. und Timpl, R.. ( 1987). Characterization of three constituent chains of collagen type VI by peptide sequences and cDNA clones. *Eur. J. Biochem.*, 168 (2), 309-17.
- Chung UI, Lanske B, Lee K, Li E und Kronenberg H. (1998). The parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor coordinates endochondral bone development by directly controlling chondrocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 95 (22), 13030-13035
- Chung, U.I. (2004). Essential role of hypertrophic in endochondral bone development. *Endocr. J.*, 51, 19-24.
- Church, V.; Nohno, T.; Linker, C.; Marcelle, C.; Francis-West, P. (2002), Wnt regulation of chondrocyte differentiation. *J. Cell Sci.*, 115 (Pt 24), 4809-4818.
- Colige, A., Sieron, A.L., Li, S.W., Schwarze, U., Petty, E., Wertelecki, W., Wilcox, W., Krakow, D., Cohn, D.H., Reardon, W., Byers, P.H., Lapière, C.M., Prockop, D.J. und Nusgens, B.V. (1999). Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 65 (2), 308-317.
- Colnot, C., Lu, C., Hu, D., Helms, J.A. (2004). Distinguishing the contributions of the perichondrium, cartilage, and vascular endothelium to skeletal development. *Dev. Biol.*, 269 (1), 55-69.
- Compston, J.E. (1993). Thyroid hormone therapy and the skeleton. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 39, 519-520.

- Costell, M., Gustafsson, E., Aszódi, A., Mörgelin, M., Bloch, W., Hunziker, E., Addicks, K., Timpl, R. und Fässler, R. (1999). Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J. Cell Biol.*, 147 (5), 1109-1122.
- Costell, M., Carmona, R., Gustafsson, E., González-Iriarte, M., Fässler, R. und Muñoz-Chápuli, R. (2002). Hyperplastic conotruncal endocardial cushions and transposition of great arteries in perlecan-null mice. *Circ. Res.*, 91(2), 158-164.
- de Crombrughe, B.; Lefebvre, V. und Nakashima, K. (2001). Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13 (6), 721-727.
- Czarny-Ratajczak, M., Lohiniva, J., Rogala, P., Kozłowski, K., Perala, M., Carter, L., Spector, T.D., Kolodziej, L., Seppanen, U., Glazar, R., Krolewski, J., Latos-Bielenska, A. und la-Kokko, L. (2001). A mutation in COL9A1 causes multiple epiphyseal dysplasia: further evidence for locus heterogeneity. *Am. J. Hum. Genet.*, 69 (5), 969-980.
- Damsky, C.H., Knudsen, K.A., Bradley, D., Buck, C.A. und Horwitz, A.F. (1985). Distribution of the cell substratum attachment (CSAT) antigen on myogenic and fibroblastic cells in culture. *J. Cell Biol.*, 100 (5), 1528-1539.
- D'Angelo, M. und Pacifi, M. (1997). Articular chondrocytes produce factors that inhibit maturation of sternal chondrocytes in serum-free agarose cultures: a TGF-beta independent process. *J. Bone Miner. Res.* 12, 1368-1377.
- D'Angelo, M., Sarment, D.P., Billings, P.C. und Pacifici, M. (2001). Activation of transforming growth factor beta in chondrocytes undergoing endochondral ossification. *J. Bone Miner. Res.* 16, 2339-2347.
- Danielson, K.G., Baribault, H., Holmes, D.F., Graham, H., Kadler, K.E. und Iozzo, R.V. (1997). Targeted disruption of Decorin leads to abnormal Collagen fibril morphology and skin fragility. *Journal of Cell Biol.*, 136 (3), 129-743.
- Del Carlo, M., Schwartz, D., Erickson, E.A. und Loeser, R.F. (2007). Endogenous production of reactive oxygen species is required for stimulation of human articular chondrocyte matrix metalloproteinase production by fibronectin fragments. *Free Radic. Biol. Med.* 42 (9), 1350-1358.
- Denker, A.E., Nicoll, S.B. und Tuan, R.S. (1995). Formation of cartilage-like spheroids by micromass cultures of murine C3H10T1/2 cells upon treatment with transforming growth factor-beta 1. *Differentiation*, 59 (1), 25-34.
- Descalzi-Cancedda, F., Gentili, C., Manduca, P. und Cancedda, R. (1992). Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation in culture. *J. Cell Biol.*, 117 (2), 427-435.
- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., Siebert, P.D. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 93 (12), 6025-6030.
- Dietz, U.H., Ziegelmeier, G., Bittner, K., Bruckner, P. und Balling, R. (1999). Spatio-temporal distribution of chondromodulin-I mRNA in the chicken embryo: expression during cartilage development and formation of the heart and eye. *Dev. Dyn.*, 216 (3), 233-243.
- Dodgson, S.J., Forster, R.E. 2nd, Storey, B.T. und Mela, L. (1980). Mitochondrial carbonic anhydrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 77 (9), 5562-5566.

- Dodgson, S.J. und Forster, R.E. 2nd. (1986a). Carbonic anhydrase: inhibition results in decreased urea production by hepatocytes. *J. Appl. Physiol.*, 60 (2), 646-652.
- Dodgson, S.J. und Forster, R.E. 2nd. (1986b). Inhibition of CA V decreases glucose synthesis from pyruvate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 251 (1), 198-204.
- Doerge, K.J., Sasaki, M., Kimura, T., Yamada, Y. (1991). Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms. *J. Biol. Chem.* 266 (2), 894-902.
- Dreier, R., Günther, B.K., Mainz, T., Nemere, I. und Bruckner, P. (2008a). Terminal differentiation of chick embryo chondrocytes requires shedding of a cell surface protein which binds 1,25 Vitamin D3. *J. Biol. Chem.*, 283 (2), 1104-1112.
- Dreier R, Opolka A, Grifka J, Bruckner P, und Grässel S. (2008b). Collagen IX-deficiency seriously compromises growth cartilage development in mice. *Matrix Biolog.*, 27 (4), 319-329.
- Drissi, M.H., Li, X., Sheu, T.J., Zuscik, M.J., Schwarz, E.M., Puzas, J.E., Rosier, R.N. und O'Keefe, R.J. (2003). Runx2/Cbfa1 stimulation by retinoic acid is potentiated by BMP2 signaling through interaction with Smad1 on the collagen X promoter in chondrocytes. *J.C.B.*, 90 (6), 1287-1298.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L. und Karsenty, G. (1997). Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89, 747-754.
- Dürr, J., Goodman, S., Potocnik, A., von der Mark, H. und von der Mark, K. (1993). Localization of beta 1-integrins in human cartilage and their role in chondrocyte adhesion to collagen and fibronectin. *Exp. Cell Res.*, 207 (2), 235-244.
- Eble, J.A., Golbik, R., Mann, K. und Kühn, K. (1993). The alpha 1 beta 1 integrin recognition site of the basement membrane collagen molecule [alpha 1(IV)]2 alpha 2(IV). *EMBO J.*, 12 (12), 4795-47802.
- Echeverri, C., Sachse, C., Walsh, A., Grabner, A., Matz, C. und Brown, D. (2004). *BIOspektrum*, 6, 794-795.
- Echtermeyer, F., Bertrand, J., Dreier, R., Meinecke, I., Neugebauer, K., Fuerst, M., Lee, Y.J., Song, Y.W., Herzog, C., Theilmeier, G. und Pap, T. (2009). Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis. *Nat. Med.*, 15 (9), 1072-1076.
- Edwards, D.R., Murphy, G., Reynolds, J.J., Whitham, S.E., Docherty, A.J., Angel, P. und Heath, J.K. (1987). Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J.*, 6 (7), 1899-1904.
- Egeblad, M. und Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer.*, 2 (3), 161-174.
- Ekblom, M., Falk, M., Salmivirta, K., Durbeej, M. und Ekblom, P. (1998). Laminin isoforms and epithelial development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 857, 194-211.
- Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M., Nakashima, K., Mukudai, Y., Boettiger, D., Pacifici, M., Kurisu, K. und Suzuki, F. (1997). Involvement of alpha5beta1 integrin in matrix interactions and proliferation of chondrocytes. *J. Bone Miner. Res.*, 12 (7), 1124-1132.
- Enomoto, H., Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M., Nomura, S., Himeno, M., Kitamura, Y., Kishimoto, T. und Komori, T. (2000). Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J.B.C.*, 275 (12), 8695-8702.

- Evans, S.J., Datson, N.A., Kabbaj, M., Thompson, R.C., Vreugdenhill, E., De Kloet, E.R., Watson, S.J. und Akil, H. (2002). Evaluation of Affymetrix Gene Chip sensitivity in rat hippocampal tissue using SAGE analysis. *Serial analysis of gene expression. Eur. J. Neurosci.*, 16, 409-413.
- Eyre, D.R. und Wu, J.J. (1987). Type XI or 1a2a3a collagen, in: *Structure and Function of Collagen Types*. Orlando: Academic Press.
- Eyre, D.R.; Apon, S.; Wu, J.J.; Ericsson, L.H.; Walsh, K.A. (1987). Collagen type IX: evidence for covalent linkages to type II collagen in cartilage. *FEBS Lett.*, 220 (2), 337-341.
- Eyre, D. (2002). Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res.*, 4 (1), 30-35.
- Eyre, D.R., Pietka, T., Weis, M.A., Wu und J.J. (2004). Covalent cross-linking of the NC1 domain of collagen type IX to collagen type II in cartilage. *J. Biol. Chem.*, 279 (4), 2568-2574.
- Farjanel, J., Schürmann, G. und Bruckner, P. (2001). Contacts with fibrils containing collagen I, but not collagens II, IX, and XI, can destabilize the cartilage phenotype of chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 9 Suppl A, 55-63.
- Fässler, R., Schnegelsberg, P.N., Dausman, J., Shinya, T., Muragaki, Y., McCarthy, M.T., Olsen, B.R., Jaenisch, R. (1994). Mice lacking alpha 1 (IX) collagen develop noninflammatory degenerative joint disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91 (11), 5070-5074.
- Feng, H., Danfelter, M., Strömqvist, B. und Heinegård, D. (2006). Extracellular matrix in disc degeneration. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 88 Suppl. 2, 25-29.
- Fitzgerald, J., Rich, C., Zhou, F.H. und Hansen, U. (2008). Three novel collagen VI chains, alpha4(VI), alpha5(VI), and alpha6(VI). *J. Biol. Chem.*, 283 (29), 20170-20180.
- Forrest, D., Erway, L.C., Ng, L., Altschuler, R. und Curran, T. (1996b). Thyroid hormone receptor beta is essential for development of auditory function. *Nat. Genet.*, 13 (3), 354-357.
- Forrest, D., Hanebuth, E., Smeyne, R.J., Everds, N., Stewart, C.L., Wehner, J.M. und Curran, T. (1996a). Recessive resistance to thyroid hormone in mice lacking thyroid hormone receptor beta: evidence for tissue-specific modulation of receptor function. *EMBO J.*, 15 (12), 3006-3015.
- Forriol, F. und Shapiro, F. (2005). Bone development: interaction of molecular components and biophysical forces. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, (432), 14-33.
- Forsyth, C.B., Pulai, J. und Loeser RF. (2002). Fibronectin fragments and blocking antibodies to alpha2beta1 and alpha5beta1 integrins stimulate mitogen-activated protein kinase signaling and increase collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) production by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.*, 46 (9), 2368-2376.
- Fraichard, A., Chassande, O., Plateroti, M., Roux, J.P., Trouillas, J., Dehay, C., Legrand, C., Gauthier, K., Kedinger, M., Malaval, L., Rousset, B. und Samarut, J. (1997). The T3R alpha gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. *EMBO J.*, 16 (14), 4412-4420.
- Franzén, P., ten Dijke, P., Ichijo, H., Yamashita, H., Schulz, P., Heldin, C.H. und Miyazono, K. (1993). Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor. *Cell.*, 75 (4), 681-692.
- Gansner, J.M. und Gitlin, J.D. (2008). Essential role for the alpha 1 chain of type VIII collagen in zebrafish notochord formation. *Dev. Dyn.*, 237 (12), 3715-3726.

- Gara, S.K., Grumati, P., Urciuolo, A., Bonaldo, P., Kobbe, B., Koch, M., Paulsson, M. und Wagener, R. (2008). Three novel collagen VI chains with high homology to the alpha3 chain. *J. Biol. Chem.*, 283 (16), 10658-10670.
- Garcadiago-Cazares, D., Rosales, C., Katoh, M. und Chimal-Monroy, J. (2004). Coordination of chondrocyte differentiation and joint formation by alpha5beta1 integrin in the developing appendicular skeleton. *Development*, 131 (19), 4735-4742.
- Gauthier, K., Chassande, O., Plateroti, M., Roux, J.P., Legrand, C., Pain, B., Rousset, B., Weiss, R., Trouillas, J. und Samarut, J. (1999). Different functions for the thyroid hormone receptors TRalpha and TRbeta in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *EMBO J.*, 18 (3), 623-631.
- Gawantka, V., Ellinger-Ziegelbauer, H. und Hausen, P. (1992). Beta 1-integrin is a maternal protein that is inserted into all newly formed plasma membranes during early *Xenopus* embryogenesis. *Development.*, 115 (2), 595-605.
- Geduspan, J.S., Padanilam, B.J. und Solursh, M. (1992). Coordinate expression of IGF-I and its receptor during limb outgrowth. *Dev. Dyn.*, 195 (1), 67-73.
- Geduspan, J.S. und Solursh, M. (1993). Effects of the mesonephros and insulin-like growth factor I on chondrogenesis of limb explants. *Dev. Biol.*, 156 (2), 500-508.
- Gelse, K., Soder, S., Eger, W., Diemtar, T. und Aigner, T. (2003). Osteophyte development--molecular characterization of differentiation stages. *Osteoarthritis. Cartilage.*, 11 (2), 141-148.
- Genge, B.R., Wu, L.N. und Wuthier, R.E. (1989). Identification of phospholipid-dependent calcium-binding proteins as constituents of matrix vesicles. *J. Biol. Chem.*, 264 (18), 10917-10921.
- Gerber, H.P., Vu, T.H., Ryan, A.M., Kowalski, J., Werb, Z. und Ferrara, N. (1999). VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat. Med.*, 5 (6), 623-628.
- Gerth, J., Cohen, C.D., Hopfer, U., Lindenmeyer, M.T., Sommer, M., Grone, H.J. und Wolf, G. (2007). Collagen type VIII expression in human diabetic nephropathy. *Eur. J. Clin. Invest.*, 37 (10), 767-773.
- Giancotti, F.G. und Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science*, 285 (5430), 1028-1032.
- Gibson, G.J., Schor, S.L. und Grant, M.E. (1982). Effects of matrix macromolecules on chondrocyte gene expression: synthesis of a low molecular weight collagen species by cells cultured within collagen gels. *J. Cell. Biol.*, 93 (3), 767-774.
- Gibson, G.J., Beaumont, B.W., Flint, M.H. (1984). Synthesis of a low molecular weight collagen by chondrocytes from the presumptive calcification region of the embryonic chick sterna: the influence of culture with collagen gels. *J. Cell Biol.*, 99 (1 Pt 1), 208-216.
- Gibson, G.J. und Flint, M.H. (1985). Type X collagen synthesis by chick sternal cartilage and its relationship to endochondral development. *J. Cell Biol.*, 101 (1), 277-284.
- Gibson, G. (1998). Active role of chondrocyte apoptosis in endochondral ossification. *Microsc. Res. Tech.*, 43 191-204.
- Gigout, A., Jolicoeur, M., Nelea, M., Raynal, N., Farndale, R. und Buschmann, M.D. (2008). Chondrocyte aggregation in suspension culture is GFOGER-GPP- and beta1 integrin-dependent. *J. Biol. Chem.*, 283 (46), 31522-31530.

- Giordano, J., Prior, H.M., Bamforth, J.S., Walter, M.A. (2001) Genetic study of Sox9 in a case of campomelic dysplasia.
- Girbau, M., Gomez, J.A., Lesniak, M.A. und de Pablo, F. (1987). Insulin-like growth factor I and insulin regulate delta-crystallin gene expression in developing lens. *J. Biol. Chem.*, 264 (29), 17559-17563.
- Glasson, S.S., Askew, R., Sheppard, B., Carito, B., Blanchet, T., Ma, H.L., Flannery, C.R., Peluso, D., Kanki, K., Yang, Z., Majumdar, M.K. und Morris, E.A. (2005). Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature*, 434 (7033), 644-648.
- Goldoni, S., Owens, R.T., McQuillan, D.J., Shriver, Z., Sasisekharan, R., Birk, D.E., Campbell, S. und Iozzo, R.V. (2004). Biologically active decorin is a monomer in solution. *J. Biol. Chem.*, 279 (8), 6606-6612.
- Goldring, M.B., Tsuchimochi, K. und Ijiri, K. (2006). The control of chondrogenesis. *J. Cell Biochem.*, 97 (1), 33-44.
- Gottsch, J.D., Zhang, C., Sundin, O.H., Bell, W.R., Stark, W.J. und Green, W.R. (2005b). Fuchs corneal dystrophy: aberrant collagen distribution in an L450W mutant of the COL8A2 gene. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 46 (12), 4504-4511.
- Gottsch, J.D., Sundin, O.H., Liu, S.H., Jun, A.S., Broman, K.W., Stark, W.J., Vito, E.C. und Narang, A.K. (2005a). Inheritance of a novel COL8A2 mutation defines a distinct early-onset subtype of fuchs corneal dystrophy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 46 (6), 1934-1939.
- Grade, M.J., Kanwar, Y.S. und Stern, P.H. (1994). Insulin and thyroid hormone stimulate matrix metabolism in primary cultures of articular chondrocytes from young rabbits in independently and in combination. *Connect Tissue Res.*, 31, 44.
- Grant, W.T., Wang, G.J. und Balian, G. (1987). Type X collagen synthesis during endochondral ossification in fracture repair. *J. Biol. Chem.*, 262 (20), 9844-9849.
- Greenhill, N.S., Ruger, B.M., Hasan, Q. und Davis, P.F. (2000). The alpha1(VIII) and alpha2(VIII) collagen chains form two distinct homotrimeric proteins in vivo. *Matrix Biol.*, 19 (1), 19-28.
- Grimsrud, C.D., Romano, P.R., D'Souza, M., Puzas, J.E., Reynolds, P.R., Rosier, R.N. und O'Keefe, R.J. (1999). BMP-6 is an autocrine stimulator of chondrocyte differentiation. *J. Bone Miner Res.*, 14 (4), 475-482 .
- Grimsrud, C.D., Rosier, R.N., Puzas, J.E., Reynolds, P.R., Reynolds, S.D., Hicks, D.G. und O'Keefe, R.J. (1998). Bone morphogenetic protein-7 in growth-plate chondrocytes: regulation by retinoic acid is dependent on the stage of chondrocyte maturation. *J. Orthop. Res.*, 16 (2), 247-255.
- Grobstein, C. (1954). Tissue interactions in the morphogenesis of mouse embryonic rudiments in vitro. In *Aspects of Synthesis and Order in Growth.* (ed. O. Rudnik) pp 233-356. Princeton: Princeton University Press.
- Gullberg, D. und Ekblom, P. (1995). Extracellular matrix and its receptors during development. *Int. J. Dev. Biol.*, 39 (5), 845-854.
- Guo, J., Chung, U.I., Kondo, H., Bringhurst, F.R. und Kronenberg, H.M. (2002). The PTH/PTHrP receptor can delay chondrocyte hypertrophy in vivo without activating phospholipase C. *Dev. Cell.* 3 (2), 183-194.

- Haaijman, A., D'Souza, R.N., Bronckers, A.L., Goei, S.W. und Burger, E.H. (1997). OP-1 (BMP-7) affects mRNA expression of type I, II, X collagen, and matrix Gla protein in ossifying long bones in vitro. *J. Bone Miner Res.*, 12 (11), 1815-1823.
- Haaijman, A., Karperien, M., Lanske, B., Hendriks, J., Löwik, C.W., Bronckers, A.L. und Burger, E.H. (1999). Inhibition of terminal chondrocyte differentiation by bone morphogenetic protein 7 (OP-1) in vitro depends on the periarticular region but is independent of parathyroid hormone-related peptide. *Bone.*, 25 (4), 397-404.
- Hagg, R., Hedbom, E., Möllers, U., Aszódi, A., Fässler, R. und Bruckner, P. (1997). Absence of the alpha1(IX) chain leads to a functional knock-out of the entire collagen IX protein in mice. *J. Biol. Chem.*, 272 (33), 20650-20654
- Hammerschmidt, M., Brook, A. und McMahon, A.P. (1997). The world according to hedgehog. *Trends Genet.*, 13 (1), 14-21.
- Handler, M., Yurchenco, P.D. und Iozzo, R.V. (1997). Developmental expression of perlecan during murine embryogenesis. *Dev. Dyn.* 210, 130-145.
- Hansen, U., Hussain, M., Villone, D., Herrmann, M., Robenek, H., Peters, G., Sinha, B. und Bruckner P. (2006). The anchorless adhesin Eap (extracellular adherence protein) from *Staphylococcus aureus* selectively recognizes extracellular matrix aggregates but binds promiscuously to monomeric matrix macromolecules. *Matrix Biol.*, 25 (4), 252-260.
- Hardingham, T.E. und Fosang, A.J. (1992). Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.*, 6 (3), 861-870.
- Hartmann, C. und Tabin, C.J. (2000). Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb. *Development*, 127 (14), 3141-3159.
- Hartmann, C. und Tabin, C.J. (2001). Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. *Cell*, 104 (3), 341-351.
- Hashimoto, M., Nakasa, T., Hikata, T. und Asahara, H. (2008). Molecular network of cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Med. Res. Rev.*, 28 (3), 464-481.
- Hatori, M., Klatt, K.J., Teixeira, C.C. und Shapiro, I.M. (1995). End labeling studies of fragmented DNA in the avian growth plate: Evidence of apoptosis in terminally differentiated chondrocytes. *J. Bone Miner. Res.* 10, 1960-1968.
- Heinegard, D., Aspberg, A., Franzen, A. und Lorenzo, P. Glycosylated matrix proteins. In: Royce, P.M. und Steinmann, B. (2002). *Connective tissue and its heritable disorders: molecular, genetic and medical aspects*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Wiley-Liss, 271-291.
- Heinegård, D., (2009). Proteoglycans and more--from molecules to biology. *Int. J. Exp. Pathol.* 90 (6), 575-86.
- Helminen, H.J., Säämänen, A.M., Salminen, H. und Hyttinen, M.M. (2002). Transgenic mouse models for studying the role of cartilage macromolecules in osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 41 (8), 848-856.
- Hilvo, M., Supuran, C.T. und Parkkila, S. (2007). Characterization and inhibition of the recently discovered carbonic anhydrase isoforms CA XIII, XIV and XV. *Curr. Top. Med. Chem.*, 7 (9):893-899.

- Hirano, S., Yonezawa, T., Hasegawa, H., Hattori, S., Greenhill, N.S., Davis, P.F., Sage, E.H. und Ninomiya, Y. (2004). Astrocytes express type VIII collagen during the repair process of brain cold injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317 (2), 437-443.
- Hirohata, S., Wang, L.W., Miyagi, M., Yan, L., Seldin, M.F., Keene, D.R., Crabb, J.W. und Apte, S.S. (2002). Punctin, a novel ADAMTS-like molecule, ADAMTSL-1, in extracellular matrix. *J. Biol. Chem.*, 277 (14), 12182-12189.
- Hirsch, M.S., Lunsford, L.E., Trinkaus-Randall, V. und Svoboda, K.K. (1997). Chondrocyte survival and differentiation in situ are integrin mediated. *Dev. Dyn.*, 210 (3), 249-263.
- Hoang, B.H., Thomas, J.T., Abdul-Karim, F.W., Correia, K.M., Conlon, R.A., Luyten, F.P. und Ballock, R.T. (1998). Expression pattern of two Frizzled-related genes, Frzb-1 and Sfrp-1, during mouse embryogenesis suggests a role for modulating action of Wnt family members. *Dev. Dyn.*, 212 (3), 364-372.
- Holden, P., Meadows, R.S., Chapman, K.L., Grant, M.E., Kadler, K.E. und Briggs, M D. (2001). Cartilage oligomeric matrix protein interacts with type IX collagen, and disruptions to these interactions identify a pathogenetic mechanism in a bone dysplasia family. *J. Biol. Chem.*, 276 (8), 6046-6055.
- Holmbeck, K., Bianco, P., Caterina, J., Yamada, S., Kromer, M., Kuznetsov, S.A., Mankani, M., Robey, P.G., Poole, A.R., Pidoux, I., Ward, J.M. und Birkedal-Hansen, H. (1999). MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell*, 99 (1), 81-92.
- Hopf, M., Göhring, W., Kohfeldt, E., Yamada, Y. und Timpl, R. (1999). Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin. *Eur. J. Biochem.*, 259 (3), 917-925.
- Hopfer, U., Fukai, N., Hopfer, H., Wolf, G., Joyce, N., Li, E. und Olsen, B.R. (2005). Targeted disruption of Col8a1 and Col8a2 genes in mice leads to anterior segment abnormalities in the eye. *FASEB J.*, 19 (10), 1232-1244.
- Hopfer, U., Hopfer, H., Meyer-Schwesinger C., Loeffler, I., Fukai, N., Olsen, B.R., Stahl, R.A. und Wolf, G. (2009). Lack of type VIII collagen in mice ameliorates diabetic nephropathy. *Diabetes*, 58 (7), 1672-1681.
- Horton, W.A. (1993). Morphology of Connective Tissue: Cartilage. In: *Connective Tissue and its Heritable Disorders*. Wiley-Liss, 73-84.
- Horton, W.E., Yamada, Y., Hassell, J.R. (1987). Retinoic acid rapidly reduces cartilage matrix synthesis by altering gene transcription in chondrocytes. *Dev. Biol.*, 123 (2), 508-516.
- Hou, G., Mulholland, D., Gronski, M.A. und Bendeck, M.P. (2000). Type VIII collagen stimulates smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase synthesis after arterial injury. *Am. J. Pathol.*, 156 (2), 467-476.
- Hou, G., Vogel, W. und Bendeck, M.P. (2001). The discoidin domain receptor tyrosine kinase DDR1 in arterial wound repair. *J Clin Invest.*, 107 (6), 727-735.
- Howlett, C.R. (1979). The fine structure of the proximal growth plate of the avian tibia. *J. Anat.*, 128 (Pt2), 377-399.

- Huang, W., Chung, U.I., Kronenberg, H.M. und de Crombrughe, B. (2001). The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signaling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 98 (1), 160-165.
- Hummel, K.M., Petrow, P.K., Franz, J.K., Müller-Ladner, U., Aicher, W.K., Gay, R.E., Brömme, D. und Gay, S.(1998). Cysteine proteinase cathepsin K mRNA is expressed in synovium of patients with rheumatoid arthritis and is detected at sites of synovial bone destruction. *J. Rheumatol.*, 25 (10), 1887-1894.
- Huttenlocher, A., Werb, Z., Tremble, P., Huhtala, P., Rosenberg, L. und Damsky, C.H. (1996). Decorin regulates collagenase gene expression in fibroblasts adhering to vitronectin. *Matrix Biol.*, 15 (4), 239-250.
- Hunziker, E.B. (1994). Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microsc. Res. Tech.* 28 (6), 505-519.
- Hwang, S.G., Ryu, J.H., Kim, I.C., Jho, E.H., Jung, H.C., Kim, K., Kim, S.J. und Chun, J.S.(2004). Wnt-7a causes loss of differentiated phenotype and inhibits apoptosis of articular chondrocytes via different mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 279 (25), 26597-26604.
- Hynes, R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation and signalling in cell adhesion. *Cell* 69 (1), 11-25.
- Ignatz, R.A. und Massagué, J. (1986). Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.*, 261 (9), 4337-4345.
- Illidge, C., Kielty, C. und Shuttleworth, A. (1998). The alpha1(VIII) and alpha2(VIII) chains of type VIII collagen can form stable homotrimeric molecules. *J. Biol. Chem.*, 273 (34), 22091-22095.
- Illidge, C., Kielty, C. und Shuttleworth, A. (2001). Type VIII collagen: heterotrimeric chain association. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 33 (5), 521-529.
- Inada, M., Yasui, T., Nomura, S., Miyake, S., Deguchi, K., Himeno, M., Sato, M., Yamagiwa, H., Kimura, T., Yasui, N., Ochi, T., Endo, N., Kitamura, Y., Kishimoto, T. und Komori, T. (1999). Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Dev. Dyn.*, 214 (4), 279-290.
- Iozzo, R. V. (1998). Matrix proteoglycan: From molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 609-652.
- Iozzo, R.V., Moscatello, D.K., McQuillan, D.J. und Eichstetter, I., (1999). Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.*, 274 (8), 4489-4492.
- Iozzo, R.V. (2005). Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6 (8), 646-656.
- Irwin, M.H. und Mayne, R. (1986). Use of monoclonal antibodies to locate the chondroitin sulfate chain(s) in type IX collagen. *J. Biol. Chem.* 261(35), 16281-16283.
- Isgaard, J. (1992). Expression and regulation of IGF-I in cartilage and skeletal muscle. *Growth Regul.*, 2 (1), 16-22.
- Itoh, T., Matsuda, H., Tanioka, M., Kuwabara, K., Itohara, S. und Suzuki, R. (2002). The Role of Matrix Metalloproteinases-2 and Matrix Metalloproteinases-9 in Antibody-Induced Arthritis. *Journal of Immunology*, 169, 2643-2647.

- Iwamoto, M., Golden, E.B., Adams, S.L., Noji, S. und Pacifici, M. (1993). Responsiveness to retinoic acid changes during chondrocyte maturation. *Exp. Cell Res.*, 205 (2), 213-224.
- Iwamoto, M., Yagami, K., Shapiro, I.M., Leboy, P.S., Adams, S.L. und Pacifici, M. (1994). Retinoic acid is a major regulator of chondrocyte maturation and matrix mineralization. *Microsc. Res. Tech.*, 28(6), 483-941.
- Iwamoto, M., Kitagaki, J., Tamamura, Y., Gentili, C., Koyama, E., Enomoto, H., Komori, T., Pacifici, M. und Enomoto-Iwamoto M. (2003). Runx2 expression and action in chondrocytes are regulated by retinoid signaling and parathyroid hormone-related peptide (PTHrP). *Osteoarthritis Cartilage*, 11 (1), 6-15.
- Jacenko, O., LuValle, P.A. und Olsen, B.R. (1993). Spondylometaphyseal dysplasia in mice carrying a dominant negative mutation in a matrix protein specific for cartilage-to-bone transition. *Nature*, 365 (6441), 56-61.
- Jacenko, O., Roberts, D.W., Campbell, M.R., McManus, P.M., Gress, C.J. und Tao, Z. (2002). Linking hematopoiesis to endochondral skeletogenesis through analysis of mice transgenic for collagen X. *Am. J. Pathol.*, 160 (6), 2019-2034.
- Jikko, A., Kato, Y., Hiranuma, H. und Fuchihata, H. (1999). Inhibition of chondrocyte terminal differentiation and matrix calcification by soluble factors released by articular chondrocytes. *Calcif. Tissue Int.*, 65(4), 276-279.
- Kabosova, A., Azar, D.T., Bannikov, G.A., Campbell, K.P., Durbeej, M., Ghohestani, R.F., Jones, J.C., Kenney, M.C., Koch, M., Ninomiya, Y., Patton, B.L., Paulsson, M., Sado, Y., Sage, E.H., Sasaki, T., Sorokin, L.M., Steiner-Champlaud, M.F., Sun, T.T., Sundarraj, N., Timpl, R., Virtanen, I. und Ljubimov, A.V. (2007). Compositional differences between infant and adult human corneal basement membranes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 48 (11), 4989-4999.
- Kanzaki, T., Olofsson, A., Morén, A., Wernstedt, C., Hellman, U. und Miyazono, K. (1990). TGF-beta 1 binding protein: a component of the large latent complex of TGF-beta 1 with multiple repeat sequences. *Cell*, 61 (6), 1051-1061.
- Kapoor, R., Bornstein, P., Sage, E.H. (1986). Type VIII collagen from bovine Descemet's membrane: structural characterization of a triple-helical domain. *Biochemistry*, 25 (13), 3930-3937.
- Kapoor, R., Sakai, L.Y., Funk, S., Roux, E., Bornstein, P. und Sage, E.H. (1988). Type VIII collagen has a restricted distribution in specialized extracellular matrices. *J. Cell Biol.*, 107 (2), 721-730.
- Käpylä, J., Jaalinoja, J., Tulla, M., Ylostalo, J., Nissinen, L., Viitasalo, T., Vehvilainen, P., Marjomaki, V., Nykvist, P., Saamanen, A.M., Farndale, R.W., Birk, D.E., Ia-Kokko, L. und Heino, J. (2004). The fibril-associated collagen IX provides a novel mechanism for cell adhesion to cartilaginous matrix. *J. Biol. Chem.*, 279 (49), 51677-51687.
- Karp, S.J., Schipani, E., St-Jacques, B., Hunzelman, J., Kronenberg, H., McMahon, A.P. (2000). Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent pathways. *Development*, 127 (3), 543-548.
- Kato, Y. und Iwamoto, M. (1990). Fibroblast growth factor is an inhibitor of chondrocyte terminal differentiation. *J. Biol. Chem.*, 265 (10), 5903-5909.
- Kawakami, Y., Wada, N., Nishimatsu, S.I., Ishikawa, T., Noji, S. und Nohno, .T. ( 1999). Involvement of Wnt-5a in chondrogenic pattern formation in the chick limb bud. *Dev. Growth Differ.*, 41(1), 29-40.

- Keene, D.R., San Antonio, J.D., Mayne, R., McQuillan, D.J., Sarris, G., Santoro, S.A. und Iozzo, R.V. (2000). Decorin binds near the C terminus of type I collagen. *J. Biol. Chem.*, 275 (29), 21801-21804.
- Kielty, C.M., Kwan, A.P., Holmes, D.F., Schor, S.L. und Grant, M.E. (1985). Type X collagen, a product of hypertrophic chondrocytes. *Biochem. J.*, 227 (2), 545-554.
- Kim, I.S., Otto, F., Zabel, B. und Mundlos, S. (1999). Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech. Dev.*, 80 (2), 159-170.
- Kirsch, T. und von der Mark K. (1990). Isolation of bovine type X collagen and immunolocalization in growth-plate cartilage. *Biochem. J.*, 265 (2), 453-459.
- Kirsch, T., Harrison, G., Golub, E.E. und Nah, H.D. (2000). The roles of annexins and types II and X collagen in matrix vesicle-mediated mineralization of growth plate cartilage. *J. Biol. Chem.*, 275 (45), 35577-35583.
- Kittelberger, R., Davis, P.F., Flynn, D.W. und Greenhill, N.S. (1990). Distribution of type VIII collagen in tissues: an immunohistochemical study. *Connect. Tissue Res.*, 24 (3-4), 303-318.
- Klagsbrun, M. (1990). The affinity of fibroblast growth factors (FGFs) for heparin; FGF-heparan sulphate interactions in cells and extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2 (5), 857-863.
- Knox, S., Merry, C., Stringer, S., Melrose, J. und Whitelock, J. (2002). Not all perlecanans are created equal: interactions with fibroblast growth factor (FGF) 2 and FGF receptors. *J. Biol. Chem.*, 277 (17), 14657-14665.
- Kobayashi, T., Chung, U.I., Schipani, E., Starbuck, M., Karsenty, G., Katagiri, T., Goad, D.L., Lanske, B. und Kronenberg, H.M. (2002). PTHrP and Indian hedgehog control differentiation of growth plate chondrocytes at multiple steps. *Development*, 129 (12), 2977-2986.
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S. und Kishimoto, T. (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 89 (5), 677-680.
- Kontinen, Y.T., Mandelin, J., Li, T.F., Salo, J., Lassus, J., Liljeström, M., Hukkanen, M., Takagi, M., Virtanen, I. und Santavirta, S. (2002). Acidic cysteine endoproteinase cathepsin K in the degeneration of the superficial articular hyaline cartilage in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, 46 (4), 953-960.
- Korhonen, M., Ylännä, J., Laitinen, L. und Virtanen, I. (1990a). Distribution of beta 1 and beta 3 integrins in human fetal and adult kidney. *Lab. Invest.*, 62 (5), 616-625.
- Korhonen, M., Ylännä, J., Laitinen, L. und Virtanen, I. (1990b). The alpha 1-alpha 6 subunits of integrins are characteristically expressed in distinct segments of developing and adult human nephron. *J. Cell. Biol.*, 111 (3), 1245-1254.
- Koyama, E., Golden, E.B., Kirsch, T., Adams, S.L., Chandraratna, R.A., Michaille, J.J. und Pacifici, M. (1999). Retinoid signaling is required for chondrocyte maturation and endochondral bone formation during limb skeletogenesis. *Dev. Biol.*, 208 (2), 375-391.
- Kronenberg, H.M. (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, 423 (6937), 332-336.
- Kuno, K., Terashima, Y. und Matsushima, K. (1999). ADAMTS-1 is an active metalloproteinase associated with the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 274 (26), 18821-18826.

- Kuno, K. und Matsushima, K. (1998). ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through the thrombospondin type I motifs and its spacing region. *J. Biol. Chem.*, 273 (22), 13912-13917.
- Kundu, M., Javed, A., Jeon, J.P., Horner, A., Shum, L., Eckhaus, M., Muenke, M., Lian, J.B., Yang, Y., Nuckolls, G.H., Stein, G.S. und Liu, P.P. (2002). *Nat. Genet.*, 32 (4), 639-644.
- Kvist, A.J., Nyström, A., Hultenby, K., Sasaki, T., Talts, J.F. und Aspberg, A. (2008). The major basement membrane components localize to the chondrocyte pericellular matrix--a cartilage basement membrane equivalent? *Matrix Biol.*, 27 (1), 22-33.
- Kvist, A.J., Johnson, A.E., Mörgelin, M., Gustafsson, E., Bengtsson, E., Lindblom, K., Aszódi, A., Fässler, R., Sasaki, T., Timpl, R. und Aspberg, A. (2006). Chondroitin sulfate perlecan enhances collagen fibril formation. Implications for perlecan chondrodysplasias. *J. Biol. Chem.*, 281 (44), 33127-33139.
- Kwan AP, Dickson IR, Freemont AJ, Grant ME. (1989). Comparative studies of type X collagen expression in normal and rachitic chicken epiphyseal cartilage. *J. Cell Biol.*, 109 (4 Pt 1), 1849-1856.
- Kwan, K.M.; Pang, M.K.; Zhou, S.; Cowan, S.K.; Kong, R.Y.; Pfordte, T.; Olsen, B.R.; Sillence, D.O.; Tam, P.P. und Cheah, K.S. (1997). Abnormal compartmentalization of cartilage matrix components in mice lacking collagen X: implications for function. *J. Cell Biol.*, 136 (2), 459-471.
- Labermeier, U. und Kenney, M.C. (1983). The presence of EC collagen and type IV collagen in bovine descemet's membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 116, 619-625.
- Lachman, R.S., Rimoin, D.L. und Spranger, J. (1988). Metaphyseal chondrodysplasia, Schmid type. Clinical and radiographic delineation with a review of the literature. *Pediatr. Radiol.*, 18 (2), 93-102.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lanske, B., Karaplis, A.C., Lee, K., Luz, A., Vortkamp, A., Pirro, A., Karperien, M., Defize, L.H., Ho, C., Mulligan, R.C., Bou-Samra, A.B., Juppner, H., Segre, G.V. und Kronenberg, H.M. (1996). PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science*, 273 (5275), 663-666.
- Larson, C.M., Kelley, S.S., Blackwood, A.D., Banes, A.J. und Lee, G.M. (2002). Retention of the native chondrocyte pericellular matrix results in significantly improved matrix production. *Matrix Biol.*, 21 (4), 349-359.
- Lassila, M., Jandeleit-Dahm, K., Seah, K.K., Smith, C.M., Calkin, A.C., Allen, T.J. und Cooper, M.E. (2005). Imatinib attenuates diabetic nephropathy in apolipoprotein E-knockout mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16 (2), 363-373.
- Leboy, P.S., Sullivan, T.A., Nooreyazdan, M. und Venezian, R.A. (1997). Rapid chondrocyte maturation by serum-free culture with BMP-2 and ascorbic acid. *J Cell Biochem.* , 66 (3), 394-403.
- Lefebvre, V. (2002). Toward understanding the functions of the two highly related Sox5 and Sox6 genes. *J. Bone Miner. Metab.*, 20 (3), 121-130.
- Lewinson, D und Silbermann, M. (1992). Chondroclasts and endothelial cells collaborate in the process of cartilage resorption. *Anat. Rec.* 233, 504-514.
- Li Y, Lacerda DA, Warman ML, Beier DR, Yoshioka H, Ninomiya Y, Oxford JT, Morris NP, Andrikopoulos K, Ramirez F, et al. (1995). A fibrillar collagen gene, *Col1a1*, is essential for skeletal morphogenesis. *Cell.*, 80 (3), 423-430.

- Li, S., Edgar, D., Fässler, R., Wadsworth, W. und Yurchenco, P.D. (2003a). The role of laminin in embryonic cell polarization and tissue organization. *Dev. Cell.*, 4 (5), 613-624.
- Li, X., Schwarz, E.M., Zuscik, M.J., Rosier, R.N., Ionescu, A.M., Puzas, J.E., Drissi, H., Sheu, T.J. und O'Keefe, R.J. (2003b). Retinoic acid stimulates chondrocyte differentiation and enhances bone morphogenetic protein effects through induction of Smad1 and Smad5. *Endocrinology*, 144 (6), 2514-2523.
- Liang, P. und Pardee, A.B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257 (5072), 967-971.
- Little, C.B., Mittaz, L., Belluoccio, D., Rogerson, F.M., Campbell, I.K., Meeker, C.T., Bateman, J.F., Pritchard, M.A. und Fosang, A.J. (2005). ADAMTS-1-knockout mice do not exhibit abnormalities in aggrecan turnover in vitro or in vivo. *Arthritis Rheum.*, 52 (5), 1461-1472.
- Liu, J.P., Baker, J., Perkins, A.S., Robertson, E.J. und Efstratiadis, A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*, 75 (1), 59-72.
- Liu, Z., Lavine, K.J., Hung, I.H. und Ornitz, D.M. (2007). FGF18 is required for early chondrocyte proliferation, hypertrophy and vascular invasion of the growth plate. *Dev. Biol.*, 302 (1), 80-91.
- Loeser, R.F. (1993). Integrin-mediated attachment of articular chondrocytes to extracellular matrix proteins. *Arthritis Rheum.*, 36, 1103-1110.
- Loeser, R.F. (1994). Modulation of integrin-mediated attachment of chondrocytes to extracellular matrix proteins by cations, retinoic acid, and transforming growth factor beta. *Exp. Cell Res.*, 211, 17-23.
- Lucic, D., Mollenhauer, J., Kilpatrick, K.E. und Cole, A.A. (2003). N-telopeptide of type II collagen interacts with annexin V on human chondrocytes. *Connect. Tissue Res.*, 44 (5), 225-239.
- Luckman, S.P., Rees, E. und Kwan, A.P. (2003). Partial characterization of cell-type X collagen interactions. *Biochem. J.*, 372 (Pt 2), 485-493.
- Lutgens, S.P., Cleutjens, K.B., Daemen, M.J. und Heeneman, S. (2007). Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease. *FASEB J.*, 21 (12), 3029-3041.
- Luyten, F.P. (1997). Cartilage-derived morphogenetic protein-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29 (11), 1241-1244.
- LuValle, P., Daniels, K., Hay, E.D. und Olsen, B.R. (1992). Type X collagen is transcriptionally activated and specifically localized during sternal cartilage maturation. *Matrix*, 12 (5), 404-413.
- MacBeath, J.R., Kielty, C.M. und Shuttleworth, C.A. (1996). Type VIII collagen is a product of vascular smooth-muscle cells in development and disease. *Biochem. J.*, 319 (Pt3), 993-998.
- Mackie, E.J., Ahmed, Y.A., Tatarczuch, L., Chen, K.S. und Mirams, M. (2008). Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 40 (1), 46-62.
- Makihira, S.; Yan, W.; Murakami, H.; Furukawa, M.; Kawai, T.; Nikawa, H.; Yoshida, E.; Hamada, T.; Okada, Y. und Kato, Y. (2003). Thyroid hormone enhances aggrecanase-2/ADAM-TS5 expression and proteoglycan degradation in growth plate cartilage. *Endocrinology*, 144 (6), 2480-2488.
- Mangelsdorf, D.J. (1994). Vitamin A receptors. *Nutr. Rev.* 52, 32-44.

- Mann, H.H., Ozbek, S., Engel, J., Paulsson, M. und Wagener, R. (2004). Interactions between the cartilage oligomeric matrix protein and matrilins. Implications for matrix assembly and the pathogenesis of chondrodysplasias. *J. Biol. Chem.* 279 (24), 25294-25298.
- MAQC-Consortium (2006). The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat. Biotechnol.* 24 (9), 1151-1161.
- Massague, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 753-791.
- Massagué, J. und Wotton, D. (2000). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.*, 19 (8), 1745-1754.
- Massagué, J. und Chen, Y.G. (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.*, 14 (6), 627-644.
- Mayne, R., Vail, M.S., Mayne, P.M. und Miller, E.J. (1976). Changes in type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 73 (5), 1674-1678.
- McCormick, D., van der Rest, M., Goodship, J., Lozano, G., Ninomiya, Y. und Olsen, B.R. (1987). Structure of the glycosaminoglycan domain in the type IX collagen-proteoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 84 (12), 4044-4048.
- Meredith, J.E. Jr., Fazeli, B. und Schwartz, M.A. (1993). The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol. Biol. Cell.*, 4 (9), 953-961.
- Metsäranta, M., Garofalo, S., Decker, G., Rintala, M., de Crombrughe, B. und Vuorio, E. (1992). Chondrodysplasia in transgenic mice harboring a 15-amino acid deletion in the triple helical domain of pro alpha 1(II) collagen chain. *J. Cell Biol.*, 118 (1), 203-212.
- Miner, J.H. und Yurchenco, P.D. (2004). Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 20, 255-284.
- Minina, E.; Wenzel, H.M.; Kreschel, C.; Karp, S.; Gaffield, W.; McMahon, A.P. und Vortkamp, A. (2001). BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development*, 128 (22), 4523-4534.
- Minina, E., Kreschel, C., Naski, M.C., Ornitz, D.M., Vortkamp, A. (2002). Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev. Cell* 3, 439-449.
- Mongiat, M., Taylor, K., Otto, J., Aho, S., Uitto, J., Whitelock, J.M. und Iozzo, R.V. (2000). The protein core of the proteoglycan perlecan binds specifically to fibroblast growth factor-7. *J. Biol. Chem.*, 275 (10), 7095-7100.
- Mongiat, M., Sweeney, S.M., San Antonio, J.D., Fu, J. und Iozzo, R.V. (2003). Endorepellin, a novel inhibitor of angiogenesis derived from the C terminus of perlecan. *J. Biol. Chem.* 278 (6), 4238-4249.
- Montgomery, J.C., Venta, P.J., Eddy, R.L., Fukushima, Y.S., Shows, T.B. und Tashian, R.E. (1991). Characterization of the human gene for a newly discovered carbonic anhydrase, CA VII, and its localization to chromosome 16. *Genomics*, 11 (4), 835-848.
- Moreno-Reyes, R., Mathieu, F., Boelaert, M., Begaux, F., Suetens, C., Rivera, M.T., Nève, J., Perlmutter, N. und Vanderpas, J. (2003). Selenium and iodine supplementation of rural Tibetan children affected by Kashin-Beck osteoarthropathy. *Am. J. Clin. Nutr.*, 78 (1), 137-144.

- Mörgelin, M., Paulsson, M., Hardingham, T.E., Heinegård, D. und Engel, J. (1988). Cartilage proteoglycans. Assembly with hyaluronate and link protein as studied by electron microscopy. *Biochem. J.*, 253 (1), 175-185.
- Muenke, M. und Schell, U. (1995). Fibroblast-growth-factor receptor mutations in human skeletal disorders. *Trends Genet.*, 11(8), 308-313.
- Müller-Glauser, W., Humbel, B., Glatt, M., Sträuli, P., Winterhalter, K.H., Bruckner, P., (1986). On the role of type IX collagen in the extracellular matrix of cartilage: type IX collagen is localized to intersections of collagen fibrils. *J. Cell. Biol.*, 102 (5), 1931-1939.
- Mundlos, S., Otto, F., Mundlos, C., Mulliken, J.B., Aylsworth, A.S., Albright, S., Lindhout, D., Cole, W.G., Henn, W., Knoll, J.H., Owen, M.J., Mertelsmann, R., Zabel, B.U. und Olsen, B.R. (1997). Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell.*, 89 (5), 773-779.
- Muragaki, Y., Shiota, C., Inoue, M., Ooshima, A., Olsen, B.R. und Ninomiya, Y. (1992). alpha 1(VIII)-collagen gene transcripts encode a short-chain collagen polypeptide and are expressed by various epithelial, endothelial and mesenchymal cells in newborn mouse tissues. *Eur.J.Biochem.*, 207 (3), 895-902.
- Murakami, S., Kan, M., McKeenan, W.L. und de Crombrughe, B. (2000). Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 97 (3), 1113-1138.
- Murakami, S., Balmes, G., McKinney, S., Zhang, Z., Givol, D. und de Crombrughe, B. (2004). Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse phenotype. *Genes Dev.*, 18 (3), 290-305.
- Muratoglu, S., Bachrati, C., Malpeli, M., Szabo, P., Neri, M., Dozin, B., Deak, F., Cancedda, R. und Kiss, I. (1995). Expression of the cartilage matrix protein gene at different chondrocyte developmental stages. *Eur. J. Cell Biol.* 68, 411-418.
- Nagao, Y., Srinivasan, M., Platero, J.S., Svendrowski, M., Waheed, A. und Sly, W.S. (1994). Mitochondrial carbonic anhydrase (isozyme V) in mouse and rat: cDNA cloning, expression, subcellular localization, processing, and tissue distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 91 (22), 10330-10334.
- Nakao, A., Imamura, T., Souchelnytskyi, S., Kawabata, M., Ishisaki, A., Oeda, E., Tamaki, K., Hanai, J., Heldin, C.H., Miyazono, K. und ten Dijke, P. (1997). TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J.*, 16 (17), 5353-5362.
- Ng, L.J., Tam, P.P. und Cheah, K.S. (1993). Preferential expression of alternatively spliced mRNAs encoding type II procollagen with a cysteine-rich amino-propeptide in differentiating cartilage and nonchondrogenic tissues during early mouse development. *Dev. Biol.*, 159 (2), 403-417.
- Nilsson, A., Isgaard, J., Lindahl, A., Dahlström, A., Skottner, A. und Isaksson, O.G. (1986). Regulation by growth hormone of number of chondrocytes containing IGF-I in rat growth plate. *Science*, 233 (4763), 571-574.
- Nilsson, O., Parker, E.A., Hegde, A., Chau, M., Barnes, K.M. und Baron, J. (2007). Gradients in bone morphogenetic protein-related gene expression across the growth plate. *J. Endocrinol.*, 193 (1), 75-84.

- Nishihara, A., Fujii, M., Sampath, T.K., Miyazono, K. und Reddi, A.H. (2003). Bone morphogenetic protein signaling in articular chondrocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 301 (2), 617-622.
- Norman, A.W. und Hurwitz, S. (1993). The role of the vitamin D endocrine system in avian bone biology. *J. Nutr.*, 123 (2 Suppl), 310-316.
- Ohlsson, C., Nilsson, A., Isaksson, O.G. und Lindahl, A. (1992a). Effect of growth hormone and insulin-like growth factor-I on DNA synthesis and matrix production in rat epiphyseal chondrocytes in monolayer culture. *J. Endocrinol.* 133 (2), 291-300.
- Ohlsson, C., Nilsson, A., Isaksson, O., Bentham, J. und Lindahl, A. (1992b). Effects of tri-iodothyronine and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on alkaline phosphatase activity, [3H]thymidine incorporation and IGF-I receptor mRNA in cultured rat epiphyseal chondrocytes. *J. Endocrinol.* 135 (1), 115-123.
- Okubo, Y. und Reddi, A.H. (2003). Thyroxine downregulates Sox9 and promotes chondrocyte hypertrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 306 (1), 186-190.
- Olney, R.C. und Mougey, E.B. (1999). Expression of the components of the insulin-like growth factor axis across the growth-plate. *Mol. Cell Endocrinol.*, 156 (1-2), 63-71.
- Olsen, B.R. (1995). Mutations in collagen genes resulting in metaphyseal and epiphyseal dysplasias. *Bone*, 17 (2 Suppl), 45-49.
- Oostra, R.J., van der Harten, J.J., Rijnders, W.P., Scott, R.J., Young, M.P. und Trump, D. (2000). Blomstrand osteochondrodysplasia: three novel cases and histological evidence for heterogeneity. *Virchows Arch.*, 436 (1), 28-35.
- Ornitz, D.M. und Marie, P.J. (2002). FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev.*, 16 (12), 1446-1465.
- Ortega, N., Behonick, D., Stickens, D. und Werb, Z. (2003). How proteases regulate bone morphogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 995, 109-116.
- Ortega, N., Behonick, D.J. und Werb, Z. (2004). Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol.*, 14 (2), 86-93.
- Oshima, O., Leboy, P.S., McDonald, S.A., Tuan, R.S. und Shapiro, I.M. (1989). Developmental expression of genes in chick growth cartilage detected by in situ hybridization. *Calcif. Tissue Int.*, 45 (3), 182-192.
- Otto, F., Thornell, A.P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K.C., Rosewell, I.R., Stamp, G.W., Beddington, R.S., Mundlos, S., Olsen, B.R., Selby, P.B. und Owen, M.J. (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, 89 (5), 765-771.
- Pacifici, M., Cossu, G., Molinaro, M. und Tato, F. (1980). Vitamin A inhibits chondrogenesis but not myogenesis. *Exp. Cell Res.*, 129 (2), 469-474.
- Pacifici, M., Golden, E.B., Iwamoto, M. und Adams, S.L. (1991). Retinoic acid treatment induces type X collagen gene expression in cultured chick chondrocytes. *Exp. Cell Res.*, 195 (1), 38-46.

- Pastorekova, S., Parkkila, S., Pastorek, J. und Supuran, C.T. (2004). Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 19 (3), 199-229.
- Pateder, D.B., Rosier, R.N., Schwarz, E.M., Reynolds, P.R., Puzas, J.E., D'Souza, M. und O'Keefe, R.J. (2000). PTHrP expression in chondrocytes, regulation by TGF-beta, and interactions between epiphyseal and growth plate chondrocytes. *Exp. Cell Res.*, 256 (2), 555-562.
- Pathi, S., Rutenberg, J.B., Johnson, R.L. und Vortkamp, A. (1999). Interaction of Ihh and BMP/Noggin signaling during cartilage differentiation. *Dev. Biol.*, 209 (2), 239-253.
- Pendas, A.M., Balbín, M., Llano, E., Jiménez, M.G. und López-Otín, C. (1997). Structural analysis and promoter characterization of the human collagenase-3 gene (MMP13). *Genomics.*, 40 (2), 222-233.
- Petruska, J.A., und Hodge, A.J. (1964). A subunit model for the tropocollagen macromolecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 51, 871-876.
- Pilcher, B.K., Sudbeck, B.D., Dumin, J.A., Welgus, H.G. und Parks, W.C. (1998). Collagenase-1 and collagen in epidermal repair. *Arch. Dermatol. Res.*, 290, 37-46.
- Pizette, S. und Niswander, L. (2000). BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes. *Dev. Biol.*, 219 (2), 237-249.
- Poole, C.A., Flint, M.H. und Beaumont, B.W. (1984). Morphological and functional interrelationships of articular cartilage matrices. *J. Anat.*, 138 (Pt1), 113-138.
- Porter, S., Clark, I.M., Kevorkian, L. und Edwards, D.R. (2005). The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem. J.*, 386 (Pt1), 15-27.
- Potts, W., Bowyer, J., Jones, H., Tucker, D., Freemont, A.J., Millest, A., Martin, C., Vernon, W., Neerunjun, D., Slynn, G., Harper, F. und Maciewicz, R. (2004). Cathepsin L-deficient mice exhibit abnormal skin and bone development and show increased resistance to osteoporosis following ovariectomy. *Int. J. Exp. Pathol.*, 85 (2), 85-96.
- Powers, C.J., McLeskey, S.W. und Wellstein, A. (2000). Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr. Relat. Cancer.*, 7 (3), 165-197.
- Prockop, D.J. und Kivirikko, K.I. (1995). Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 403-434.
- Provot, S. und Schipani, E. (2005). Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 328 (3), 658-665.
- Pulai, J.I., Chen, H., Im, H.J., Kumar, S., Hanning, C., Hegde, P.S. und Loeser, R.F. (2005). NF-kappa B mediates the stimulation of cytokine and chemokine expression by human articular chondrocytes in response to fibronectin fragments. *J. Immunol.* 174 (9), 5781-5788.
- Quondamatteo, F. (2002). Assembly, stability and integrity of basement membranes in vivo. *Histochem. J.*, 34 (8-9), 369-381.
- Quarto, R., Campanile, G., Cancedda, R. und Dozin, B. (1992). Thyroid hormone, insulin, and glucocorticoids are sufficient to support chondrocyte differentiation to hypertrophy: a serum-free analysis. *J. Cell Biol.*, 119 (4), 989-995.

- Quarto, R., Dozin, B., Bonaldo, P., Cancedda, R. und Colombatti, A. (1993). Type VI collagen expression is upregulated in the early events of chondrocyte differentiation. *Development*, 117 (1), 245-251.
- Reddi, A.H. und Anderson, W.A. (1976). Collagenous bone matrix-induced endochondral ossification hemopoiesis. *J.Cell Biol.*, 69 (3), 557-572.
- Reed, C.C. und Iozzo, R.V. (2002). The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconj J.*, 19 (4-5), 249-255.
- Reginato, A.M., Lash, J.W. und Jimenez, S.A. (1986). Biosynthetic expression of type X collagen in embryonic chick sternum cartilage during development. *J. Biol. Chem.*, 261(6), 2897-2904.
- Reichenberger, E., Beier, F., LuValle, P., Olsen, B.R., von der Mark, K. und Bertling, W.M. (1992). Genomic organization and full-length cDNA sequence of human collagen X. *FEBS Lett.*, 311 (3), 305-310.
- Reinecke, M., Schmid, A.C., Heyberger-Meyer, B., Hunziker, E.B. und Zapf, J. (2000). Effect of growth hormone and insulin-like growth factor I (IGF-I) on the expression of IGF-I messenger ribonucleic acid and peptide in rat tibial growth plate and articular chondrocytes in vivo. *Endocrinology*, 141 (8), 2847-2853.
- Reponen, P., Sahlberg, C., Munaut, C., Thesleff, I. und Tryggvason, K. (1994). High expression of 92-kD type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. *J. Cell Biol.*, 124 (6), 1091-1102.
- Ritvaniemi, P., Körkkö, J., Bonaventure, J., Vikkula, M., Hyland, J., Paasilta, P., Kaitila, I., Kääriäinen, H., Sokolov, B.P., Hakala, M. et al. (1995). Identification of COL2A1 gene mutations in patients with chondrodysplasias and familial osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, 38 (7), 999-1004.
- Roach, H.I. und Shearer, J.R. (1989). Cartilage resorption and endochondral bone formation during the development of long bones in chick embryos. *Bone Miner.* 6, 289-309.
- Roach, H.I.; Erenpreisa, J. und Aigner, T. (1995). Osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes involves asymmetric cell divisions and apoptosis. *J.Cell Biol.*, 131 (2), 483-494.
- Rooney, P., Wang, M., Kumar, P. und Kumar, S. (1993). Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan enhance the production of collagens by endothelial cells. *J. Cell Sci.*, 105 (Pt 1), 213-218.
- Rosenblum, N.D. (1996). Recombinant alpha 1(VIII) collagen chains form homotrimers in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 227 (1), 205-210.
- Roughley, 2001 Articular cartilage and changes in arthritis: noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of cartilage. *Arthritis Res.*, 3, 342-347.
- Roughley, P.J. (2006). The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur. Cell Mater.*, 12, 92-101.
- Rüger, B., Dunbar, P.R., Hasan, Q., Sawada, H., Kittelberger, R., Greenhill, N. und Neale, T.J. (1994). Human mast cells produce type VIII collagen in vivo. *Int. J. Exp. Pathol.* 75 (6), 397-404.
- Ruettger, A., Schueler, S., Mollenhauer, J.A. und Wiederanders, B. (2008). Cathepsins B, K, and L are regulated by a defined collagen type II peptide via activation of classical protein kinase C and p38 MAP kinase in articular chondrocytes. *J. Biol. Chem.*, 283 (2), 1043-1051.

- Rühland C, Schönherr E, Robenek H, Hansen U, Iozzo RV, Bruckner P, Seidler DG. (2007). The glycosaminoglycan chain of decorin plays an important role in collagen fibril formation at the early stages of fibrillogenesis. *FEBS J.*, 274 (16), 4246-4255.
- Ruoslahti, E. und Pierschbacher, M.D. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*, 238 (4826), 491-497.
- Sage, H., Crouch, E. und Bornstein, P. (1979). Collagen synthesis by bovine aortic endothelial cells in culture. *Biochemistry*, 18 (24), 5433-5442.
- Sage, H., Pritzl, P. und Bornstein, P. (1982). Endothelial cells secrete a novel collagen type in vitro independently of prolyl hydroxylation. *Coll Relat. Res.*, 2 (6), 465-479.
- Sahni, M., Ambrosetti, D.C., Mansukhani, A., Gertner, R., Levy, D. und Basilico, C.(1999). FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes Dev.*, 13 (11), 1361-1366.
- Sahni, M., Raz, R., Coffin, J.D., Levy, D. und Basilico, C. (2001). STAT1 mediates the increased apoptosis and reduced chondrocyte proliferation in mice overexpressing FGF2. *Development*, 128 (11), 2119-2129.
- Sakai, K., Hiripi, L., Glumoff, V., Brandau, O., Eerola, R., Vuorio, E., Bösze, Z., Fässler, R. und Aszódi, A. (2001). Stage-and tissue-specific expression of a Col2a1-Cre fusion gene in transgenic mice. *Matrix Biol.*, 19 (8), 761-767.
- Salle, B.L., Rauch, F., Travers, R., Bouvier, R. und Glorieux, F.H. (2002). Human fetal bone development: histomorphometric evaluation of the proximal femoral metaphysis. *Bone*, 30 (6), 823-828.
- Salvesen, G.S. und Dixit, V.M. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, 91 (4), 443-446.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sandberg, M. und Vuorio, E. (1987). Localization of types I, II, and III collagen mRNAs in developing human skeletal tissues by in situ hybridization. *J. Cell Biol.*, 104 (4), 1077-1084.
- Santra, M., Mann, D.M., Mercer, E.W., Skorski, T., Calabretta, B. und Iozzo, R.V. (1997). Ectopic expression of decorin protein core causes a generalized growth suppression in neoplastic cells of various histogenetic origin and requires endogenous p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J. Clin. Invest.*, 100 (1), 149-157.
- Santra, M., Reed, C.C. und Iozzo, R.V., (2002). Decorin binds to a narrow region of the epidermal growth factor (EGF) receptor, partially overlapping but distinct from the EGF-binding epitope. *J. Biol. Chem.*, 277 (38), 35671-35681.
- Sawada, H., Konomi, H. und Hirose, K. (1990). Characterization of the collagen in the hexagonal lattice of Descemet's membrane: its relation to type VIII collagen. *J. Cell Biol.* 110 (1), 219-227.
- Schipani, E., Lanske, B., Hunzelman, J., Luz, A., Kovacs, C.S., Lee, K., Pirro, A., Kronenberg, H.M. und Jüppner, H. (1997). Targeted expression of constitutively active receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide delays endochondral bone formation and rescues mice that lack parathyroid hormone-related peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 94 (25), 13689-13694.

- Schipani, E. und Provot, S. (2003). PTHrP, PTH, and the PTH/PTHrP receptor in endochondral bone development. *Birth Defects Res. C Embryo Today.*, 69 (4), 352-362.
- Schmid, T.M. und Linsenmayer, T.F. (1983). A short chain (pro)collagen from aged endochondral chondrocytes. Biochemical characterization. *J.Biol.Chem.*, 258 (15), 9504-9509.
- Schmid T.M. und Linsenmayer, T.F. (1987). Type X collagen. In: *Structure and function of collagen types*. R. Mayne und R.E. Burgeson, eds. (Orlando, Florida: Academic Press), 223-259.
- Schmitz, M. (2005). Etablierung und Charakterisierung von transgenen Mauslinien zur Untersuchung der Pathogenese von Chondrodysplasien. Promotionsarbeit.
- Schmitz, M., Niehoff, A., Miosge, N., Smyth, N., Paulsson, M. und Zaucke, F. (2008). Transgenic mice expressing D469Delta mutated cartilage oligomeric matrix protein (COMP) show growth plate abnormalities and sternal malformations. *Matrix Biol.*, 27 (2), 67-85.
- Schönherr, E., Broszat, M., Brandan, E., Bruckner, P. und Kresse, H. (1998). Decorin core protein fragment Leu155-Val260 interacts with TGF-beta but does not compete for decorin binding to type I collagen. *Arch. Biochem. Biophys.*, 355 (2), 241-248.
- Schönherr, E., O'Connell, B.C., Schittny, J., Robenek, H., Fastermann, D., Fisher, L.W., Plenz, G., Vischer, P., Young, M.F. und Kresse, H. (1999). Paracrine or virus-mediated induction of decorin expression by endothelial cells contributes to tube formation and prevention of apoptosis in collagen lattices. *Eur. J. Cell Biol.*, 78 (1):44-55.
- Schwartz, Z., Ehland, H., Sylvia, V.L., Larsson, D., Hardin, R.R., Bingham, V., Lopez, D., Dean, D.D. und Boyan, B.D. (2002). 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) and 24R,25-dihydroxyvitamin D(3) modulate growth plate chondrocyte physiology via protein kinase C-dependent phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology.*, 143 (7), 2775-2786.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. und Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115(2), 199-208.
- Scott, J.E. (1990). Proteoglycan-collagen interactions and sub-fibrillar structure in collagen fibrills: implications in the development and remodelling of connective tissue. *Biochem. Soc. Trans.*, 18 (3), 489-490.
- Scott, J.E. (1990). Proteoglycan: collagen interactions and subfibrillar structure in collagen fibrils. Implications in the development and ageing of connective tissues. *J. Anat.*, 169, 23-35.
- Scott, P.G., Grossmann, J.G., Dodd, C.M., Sheehan, J.K. und Bishop, P.N. (2003). Light and X-ray scattering show decorin to be a dimer in solution. *J. Biol. Chem.*, 278 (20), 18353-18359.
- Seals, D.F. und Courtneidge, S.A. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.*, 17 (1), 7-30.
- Sen, M., Chamorro, M., Reifert, J., Corr, M. und Carson, D.A. (2001). Blockade of Wnt-5A/frizzled 5 signaling inhibits rheumatoid synoviocyte activation. *Arthritis Rheum.*, 44 (4), 772-781.
- Serra, R., Johnson, M., Filvaroff, E.H., LaBorde, J., Sheehan, D.M., Derynck, R. und Moses, H.L. (1997). Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *J. Cell Biol.*, 139 (2), 541-552.

- Serra, R., Karaplis, A. und Sohn, P. (1999). Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)-dependent and -independent effects of transforming growth factor beta (TGF-beta) on endochondral bone formation. *J. Cell Biol.*, 145 (4), 783-794.
- Shi, H., Bencze, K.Z., Stemmler, T.L., Philpott, C.C. (2008). A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science*, 320 (5880), 1207-1210.
- Shindo, T., Kurihara, H., Kuno, K., Yokoyama, H., Wada, T., Kurihara, Y., Imai, T., Wang, Y., Ogata, M., Nishimatsu, H., Moriyama, N., Oh-hashii, Y., Morita, H., Ishikawa, T., Nagai, R., Yazaki, Y. und Matsushima, K. (2000). ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *J. Clin. Invest.*, 105 (10), 1345-1352.
- Shrivastava, A., Radziejewski, C., Campbell, E., Kovac, L., McGlynn, M., Ryan, T.E., Davis, S., Goldfarb, M.P., Glass, D.J., Lemke, G. und Yancopoulos, G.D. (1997). An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol. Cell*, 1 (1), 25-34.
- Shuttleworth, C.A. (1997). Type VIII collagen. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29 (10), 1145-1148.
- Sibinga, N.E., Foster, L.C., Hsieh, C.M., Perrella, M.A., Lee, W.S., Endege, W.O., Sage, E.H., Lee, M.E. und Haber, E. (1997). Collagen VIII is expressed by vascular smooth muscle cells in response to vascular injury. *Circ. Res.*, 80 (4), 532-541.
- Siljander, P.R., Hamaia, S., Peachey, A.R., Slatter, D.A., Smethurst, P.A., Ouwehand, W.H., Knight, C.G. und Farndale, R.W. (2004). Integrin activation state determines selectivity for novel recognition sites in fibrillar collagens. *J. Biol. Chem.*, 279 (46), 47763-47772.
- Silvestrini, G., Ballanti, P., Patacchioli, F.R., Mocetti, P., Di Grezia, R., Wedard, B.M., Angelucci, L., Bonucci, E. (2000). Evaluation of apoptosis and the glucocorticoid receptor in the cartilage growth plate and metaphyseal bone cells of rats after high-dose treatment with corticosterone. *Bone* 26, 33-42.
- Sinha, S., Kielty, C.M., Heagerty, A.M., Canfield, A.E. und Shuttleworth, C.A. (2001). Upregulation of collagen VIII following porcine coronary artery angioplasty is related to smooth muscle cell migration not angiogenesis. *Int. J. Exp. Pathol.*, 82 (5), 295-302.
- Sly, W.S., Hewett-Emmett, D., Whyte, M.P., Yu, Y.S. und Tashian R.E. (1983). Carbonic anhydrase II deficiency identified as the primary defect in the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 80 (9), 2752-2756.
- Sly, W.S. und Hu, P.Y. (1995). Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 375-401.
- Smink, J.J., Koster, J.G., Gresnigt, M.G., Rooman, R., Koedam, J.A. und Van Buul-Offers, S.C. (2002). IGF and IGF-binding protein expression in the growth plate of normal, dexamethasone-treated and human IGF-II transgenic mice. *J. Endocrinol.*, 175 (1), 143-153.
- Smits, P., Li, P., Mandel, J., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., de Crombrughe, B., Lefebvre, V. (2001). The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev. Cell* 1, 277-290.
- Smits, P., Dy, P., Mitra, S. und Lefebvre, V. (2004). Sox5 and Sox6 are needed to develop and maintain source, columnar, and hypertrophic chondrocytes in the cartilage growth plate. *J. Cell Biol.*, 164 (5), 747-758.
- Sokoloff, L. (1989). The history of Kashin-beck disease. *NY State J. Med.* 343-351.

- Spicer, S.S., Ge, Z.H., Tashian, R.E., Hazen-Martin, D.J. und Schulte, B.A. (1990). Comparative distribution of carbonic anhydrase isozymes III and II in rodent tissues. *Am. J. Anat.*, 187 (1), 55-64.
- Stanton, H., Rogerson, F.M., East, C.J., Golub, S.B., Lawlor, K.E., Meeker, C.T., Little, C.B., Last, K., Farmer, P.J., Campbell, I.K., Fourie, A.M. und Fosang, A.J. (2005). ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature*, 434 (7033), 648-652.
- Stephan, S., Sherratt, M.J., Hodson, N., Shuttleworth, C.A. und Kielty, C.M. (2004). Expression and supramolecular assembly of recombinant alpha1(viii) and alpha2(viii) collagen homotrimers. *J. Biol. Chem.*, 279 (20), 21469-21477.
- Stephens, T.D. und Segmiller, R.E. (1976). Normal production of cartilage glycosaminoglycan in mice homozygous for the chondrodysplasia gene. *Teratology* 13, 317-326.
- Stetler-Stevenson, W.G., Kruttsch, H.C. und Liotta, L.A. (1989). Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J. Biol. Chem.*, 264 (29), 17374-17378.
- Stevens, D.G., Boyer, M.I. und Bowen, C.V. (1999). Transplantation of epiphyseal plate allografts between animals of different ages. *J. Pediatr. Orthop.*, 19 (3), 398-403.
- Stevenson, S., Hunziker, E.B., Herrmann, W. und Schenk R.K. (1990). Is longitudinal bone growth influenced by diurnal variation in the mitotic activity of chondrocytes of the growth plate? *J. Orthop. Res.*, 8 (1), 132-5
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M. und McMahon, A.P. (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.*, 13 (16), 2072-2086.
- Stricker, S., Fundele, R., Vortkamp, A. und Mundlos, S. (2002). Role of Runx genes in chondrocyte differentiation. *Dev. Biol.*, 245 (1), 95-108.
- Strongin, A.Y., Marmer, B.L., Grant, G.A. und Goldberg, G.I. (1993). Plasma membrane-dependent activation of the 72-kDa type IV collagenase is prevented by complex formation with TIMP-2. *J. Biol. Chem.*, 268 (19), 14033-14039.
- Supuran, C.T. und Scozzafava, A. (2007). Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15, 4336-4350.
- Suda, N., Shibata, S., Yamazaki, K., Kuroda, T., Senior, P.V. und Hammond, V.E. (1999). Parathyroid hormone-related protein regulates proliferation of condylar hypertrophic chondrocytes. *J. Bone Miner. Res.* 14, 1838-1847.
- Suzuki, N., Asamura, K., Kikuchi, Y., Takumi, Y., Abe, S., Imamura, Y., Hayashi, T., Aszodi, A., Fassler, R. und Usami, S. (2005). Type IX collagen knock-out mouse shows progressive hearing loss. *Neurosci. Res.*, 51 (3), 293-298.
- Sylvia, V.L., Schwartz, Z., Schuman, L., Morgan, R.T., Mackey, S., Gomez, R. und Boyan, B.D. (1993). Maturation-dependent regulation of protein kinase C activity by vitamin D3 metabolites in chondrocyte cultures. *J. Cell Physiol.*, 157 (2), 271-278.
- Szűts, V., Mollers, U., Bittner, K., Schurmann, G., Muratoglu, S., Deak, F., Kiss, I. und Bruckner, P. (1998). Terminal differentiation of chondrocytes is arrested at distinct stages identified by their expression repertoire of marker genes. *Matrix Biol.*, 17 (6), 435-448

- Takeda, S., Bonnamy, J.P., Owen, M.J., Ducy, P. und Karsenty, G. (2001). Continuous expression of *Cbfa1* in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues *Cbfa1*-deficient mice. *Genes Dev.*, 15 (4), 467-481.
- Temenoff, J.S. und Mikos, A.G. (2000). Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*, 21 (2000), 431-440.
- Timpl, R. (1996). Macromolecular organization of basement membranes. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8 (5), 618-624.
- Thomas, J.T., Cresswell, C.J., Rash, B., Nicolai, H., Jones, T., Solomon, E., Grant, M.E. und Boot-Handford, R.P. (1991). The human collagen X gene. Complete primary translated sequence and chromosomal localization. *Biochem. J.*, 280 (Pt 3), 617-623.
- Thur, J., Rosenberg, K., Nitsche, D.P., Pihlajamaa, T., Ala-Kokko, L., Heinegård, D., Paulsson, M., Maurer, P. (2001). Mutations in cartilage oligomeric matrix protein causing pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia affect binding of calcium and collagen I, II, and IX. *J. Biol. Chem.*, 276 (9), 6083-6092.
- Torres, E.S., Andrade, C.V., Fonseca, E.C., Mello, M.A. und Duarte, M.E. (2003). Insulin impairs the maturation of chondrocytes in vitro. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, 36 (9), 1185-1192.
- Tsang, K.Y., Chan, D., Cheslett, D., Chan, W.C., So, C.L., Melhado, I.G., Chan, T.W., Kwan, K.M., Hunziker, E.B., Yamada, Y., Bateman, J.F., Cheung, K.M. und Cheah, K.S. (2007). Surviving endoplasmic reticulum stress is coupled to altered chondrocyte differentiation and function. *PLoS Biol.* 5 (3), 44.
- Tschan, T., Hoerler, I., Houze, Y., Winterhalter, K.H., Richter, C. und Bruckner, P. (1990). Resting chondrocytes in culture survive without growth factors, but are sensitive to toxic oxygen metabolites. *J. Cell Biol.*, 111 (1), 257-260.
- Tschan, T., Bohme, K., Conscience-Egli, M., Zenke, G., Winterhalter, K.H. und Bruckner, P. (1993). Autocrine or paracrine transforming growth factor-beta modulates the phenotype of chick embryo sternal chondrocytes in serum-free agarose culture. *J.Biol.Chem.*, 268 (7), 5156-5161.
- Tuckermann, J.P., Pittois, K., Partridge, N.C., Merregaert, J. und Angel, P. (2000). Collagenase-3 (MMP-13) and integral membrane protein 2a (*Itm2a*) are marker genes of chondrogenic/osteoblastic cells in bone formation: sequential temporal, and spatial expression of *Itm2a*, alkaline phosphatase, MMP-13, and osteocalcin in the mouse. *J. Bone Miner Res.* 15 (7), 1257-1265.
- Tulla, M., Pentikäinen, O.T., Viitasalo, T., Käpylä, J., Impola, U., Nykvist, P., Nissinen, L., Johnson, M.S. und Heino, J. (2001). Selective binding of collagen subtypes by integrin alpha 1I, alpha 2I, and alpha 10I domains. *J. Biol. Chem.*, 276 (51), 48206-48212.
- Türeci, O., Sahin, U., Vollmar, E., Siemer, S., Göttert, E., Seitz, G., Parkkila, A.K., Shah, G.N., Grubb, J.H., Pfreundschuh, M. und Sly, W.S. (1998). Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 95 (13), 7608-7613.
- Turk, B., Turk, D. und Turk, V. (2000). Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1477 (1-2), 98-111.
- Turner, N.J., Murphy, M.O., Kielty, C.M., Shuttleworth, C.A., Black, R.A., Humphries, M.J., Walker, M.G. und Canfield, A.E. (2006). Alpha2(VIII) collagen substrata enhance endothelial cell retention under acute shear stress flow via an alpha2beta1 integrin-dependent mechanism: an in vitro and in vivo study. *Circulation*, 114 (8), 820-829.

- Ueta, C., Iwamoto, M., Kanatani, N., Yoshida, C., Liu, Y., Enomoto-Iwamoto, M., Ohmori, T., Enomoto, H., Nakata, K., Takada, K., Kurisu, K. und Komori, T. (2001). Skeletal malformations caused by overexpression of *Cbfa1* or its dominant negative form in chondrocytes. *J. Cell Biol.*, 153 (1), 87-100.
- Vajo, Z., Francomano, C.A. und Wilkin, D.J. (2000). The molecular and genetic basis of fibroblast growth factor receptor 3 disorders: the achondroplasia family of skeletal dysplasias, Muenke craniosynostosis, and Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Endocr.Rev.*, 21 (1), 23-39.
- van der Rest, M. und Mayne, R. (1988). Type IX collagen proteoglycan from cartilage is covalently cross-linked to type II collagen. *J. Biol. Chem.*, 263, 1615-1618.
- Vasios, G., Nishimura, I., Konomi, H., van der Rest, M., Ninomiya, Y. und Olsen, B.R. (1988). Cartilage type IX collagen-proteoglycan contains a large amino-terminal globular domain encoded by multiple exons. *J. Biol. Chem.*, 263 (5), 2324-2329.
- Vaughan, L., Mendler, M., Huber, S., Bruckner, P., Winterhalter, K.H., Irwin, M.I. und Mayne, R. (1988). D-periodic distribution of collagen type IX along cartilage fibrils. *J. Cell Biol.*, 106 (3), 991-997.
- Vikkula, M., Mariman, E.C., Lui, V.C., Zhidkova, N.I., Tiller, G.E., Goldring, M.B., van Beersum, S.E., de Waal Malefijt, M.C., van den Hoogen, F.H. und Ropers, H.H. (1995). Autosomal dominant and recessive osteochondrodysplasias associated with the *COL11A2* locus. *Cell*, 80 (3), 431-437.
- Villone, D., Fritsch, A., Koch, M., Bruckner-Tuderman, L., Hansen, U. und Bruckner, P. (2008). Supramolecular interactions in the dermo-epidermal junction zone: anchoring fibril-collagen VII tightly binds to banded collagen fibrils. *J. Biol. Chem.*, 283 (36), 24506-24513.
- Vogel, W., Gish, G.D., Alves, F. und Pawson, T. (1997). The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol. Cell.*, 1(1), 13-23.
- Vogel, W. (1999). Discoidin domain receptors: structural relations and functional implications. *FASEB J.* 13 (Suppl.), 77-82.
- Volk, S.W., Luvalle, P., Leask, T. und Leboy, P.S. (1998). A BMP responsive transcriptional region in the chicken type X collagen gene. *J. Bone Miner. Res.*, 13 (10), 1521-1529.
- von der Mark, K., Kirsch, T., Nerlich, A., Kuss, A., Weseloh, G., Glückert, K. und Stöss, H. (1992). Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheum.*, 35 (7), 806-811.
- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G.V., Kronenberg, H.M. und Tabin, C.J. (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science*, 273 (5275), 613-622.
- Vu, T.H., Shipley, J.M., Bergers, G., Berger, J.E., Helms, J.A., Hanahan, D., Shapiro, S.D., Senior, R.M. und Werb, Z. (1998). MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell*, 93 (3), 411-422.
- Vukicevic, S., Luyten, F.P., Kleinman, H.K. und Reddi, A.H. (1990). Differentiation of canalicular cell processes in bone cells by basement membrane matrix components: regulation by discrete domains of laminin. *Cell*, 63 (2), 437-445.
- (Wallis, G.A. (1996). Bone growth: coordinating chondrocytes differentiation. *Curr. Biol.* 6, 1577-1580.)

- Wallis, G.A., Rash, B., Sykes, B., Bonaventure, J., Maroteaux, P., Zabel, B., Wynne-Davies, R., Grant, M.E. und Boot-Handford, R.P. (1996). Mutations within the gene encoding the alpha 1 (X) chain of type X collagen (COL10A1) cause metaphyseal chondrodysplasia type Schmid but not several other forms of metaphyseal chondrodysplasia. *J. Med. Genet.*, 33 (6), 450-457.
- Wang, W und Kirsch, T. (2002). Retinoic acid stimulates annexin-mediated growth plate chondrocyte mineralization. *J. Cell Biol.* 157, 1061-1069.
- Wang, W., Xu, J. und Kirsch, T. (2003) Annexin-mediated Ca<sup>2+</sup> influx regulates growth plate chondrocyte maturation and apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 278, 3762-3769.
- Wang, W., Xu, J. und Kirsch, T. (2005). Annexin V and terminal differentiation of growth plate chondrocytes. *Experim. Cell Research*, 305, 156-165.
- Wayner, E.A., Garcia-Pardo, A., Humphries, M.J., McDonald, J.A. und Carter, W.G. (1989). Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. *J. Cell Biol.*, 109 (3), 1321-1330.
- Weber, I.T., Harrison, R.W. und Iozzo, R.V. (1996). Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.*, 271 (50), 31767-31770.
- Weir, E.C., Philbrick, W.M., Amling, M., Neff, L.A., Baron, R. und Broadus, A.E. (1996). Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 93 (19), 10240-10245.
- Weitkamp, B., Cullen, P., Plenz, G., Robenek, H. und Rauterberg, J. (1999). Human macrophages synthesize type VIII collagen in vitro and in the atherosclerotic plaque. *FASEB J.*, 13 (11), 1445-1457.
- West, C.M., Lanza, R., Rosenbloom, J., Lowe, M., Holtzer, H. und Avdalovic, N. (1979). Fibronectin alters the phenotypic properties of cultured chick embryo chondroblasts. *Cell*, 17 (3), 491-501.
- Whitman, M. (1998). Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily. *Genes Dev.*, 12, 2445-2462.
- Williams, C.J. und Jimenez, S.A. (1995). Heritable diseases of cartilage caused by mutations in collagen genes. *J. Rheumatol. Suppl.*, 43, 28-33.
- Williams, J.A., Kondo, N., Okabe, T., Takeshita, N., Pilchak, D.M., Koyama, E. und Ochiai, T., Jensen, D., Chu, M.L., Kane, M.A., Napoli, J.L., Enomoto-Iwamoto, M., Ghyselinck, N., Chambon, P., Pacifici, M. und Iwamoto, M. (2009). Retinoic acid receptors are required for skeletal growth, matrix homeostasis and growth plate function in postnatal mouse. *Dev. Biol.*, 328 (2), 315-327.
- Wirth, C.J. und Rudert, M. (1996). Techniques of cartilage growth enhancement: a review of the literature. *Arthroscopy.*, 12 (3), 300-308.
- Wodarz, A. und Nusse, R. (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 14, 59-88.
- Wolbach, S.B. und Hegsted, D.M. (1952). Hypervitaminosis A and the skeleton of growing chicks. *AMA. Arch. Pathol.*, 54 (1), 30-38.
- Woods, K.A., Camacho-Hübner, C., Savage, M.O. und Clark, A.J. (1996). Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N. Engl. J. Med.*, 335 (18), 1389-1391.

Wu, J.J., Eyre, D.R. und Slayter, H.S. (1987). Type VI collagen of the intervertebral disc. Biochemical and electron-microscopic characterization of the native protein. *Biochem. J.*, 248 (2), 373-381.

Wu, J. und Xu, G.L. (1987). Plasma selenium content, platelet glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity of residents in Kashin-Beck disease affected area in China. *J Trace Elem. Electrolytes Health Dis.*, 1 (1), 39-43.

Wu, J.J., Woods, P.E. und Eyre, D.R. (1992). Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding. *J. Biol. Chem.*, 267 (32), 23007-23014.

Wu, C.W., Tchetina, E.V., Mwale, F., Hasty, K., Pidoux, I., Reiner, A., Chen, J., Van Wart, H.E. Und Poole, A.R. (2002). Proteolysis involving matrix metalloproteinase 13 (collagenase-3) is required for chondrocyte differentiation that is associated with matrix mineralization. *J. Bone Miner Res.*, 17 (4), 639-651.

Yagishita, N., Yamamoto, Y., Yoshizawa, T., Sekine, K., Uematsu, Y., Murayama, H., Nagai, Y., Krezel, W., Chambon, P., Matsumoto, T. und Kato, S. (2001). Aberrant growth plate development in VDR/RXR gamma double null mutant mice. *Endocrinology*, 142 (12), 5332-5334.

Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. (1990). Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature*, 346 (6281), 281-284.

Yang, G.Q., Ge, K.Y., Chen, J.S. und Chen, X.S. (1988). Selenium-related endemic diseases and the daily selenium requirement of humans. *World Rev. Nutr. Diet.*, 55, 98-152.

Yang, X., Chen, L., Xu, X., Li, C., Huang, C. und Deng, C. (2001). TGF- $\beta$ /Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *Cell Biol.* 153 (1), 35-46

Yokoyama, H., Wada, T., Kobayashi, K., Kuno, K., Kurihara, H., Shindo, T. und Matsushima, K. (2002). A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS)-1 null mutant mice develop renal lesions mimicking obstructive nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 17 Suppl 9, 39-41.

Yoon, B.S., Pogue, R., Ovchinnikov, D.A., Yoshii, I., Mishina, Y., Behringer, und R.R., Lyons, K.M. (2006). BMPs regulate multiple aspects of growth-plate chondrogenesis through opposing actions on FGF pathways. *Development*, 133 (23), 4667-4678.

Yoshida, C.A., Furuichi, T., Fujita, T., Fukuyama, R., Kanatani, N., Kobayashi, S., Satake, M., Takada, K. und Komori, T. (2002). Core-binding factor beta interacts with Runx2 and is required for skeletal development. *Nat. Genet.*, 32 (4), 633-638.

Yoshida, C.A., Yamamoto, H., Fujita, T., Furuichi, T., Ito, K., Inoue, K., Yamana, K., Zanma, A., Takada, K., Ito, Y. und Komori, T. (2004). Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev.*, 18 (8), 952-963.

Zagrodzki, P., Szmigiel, H., Ratajczak, R., Szybinski, Z. und Zachwieja, Z. (2000). The role of selenium in iodine metabolism in children with goiter. *Environ. Health Perspect.*, 108 (1), 67-71.

Závada, J., Závadová, Z., Pastoreková, S., Ciampor, F., Pastorek, J. und Zelník, V. (1993). Expression of MaTu-MN protein in human tumor cultures and in clinical specimens. *Int. J. Cancer*, 54 (2), 268-274.

Zelzer, E., Glotzer, D.J., Hartmann, C., Thomas, D., Fukai, N., Soker, S. und Olsen, B.R. (2001). Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mech. Dev.*, 106 (1-2), 97-106.

Zhang, C., Cho, K., Huang, Y., Lyons, J.P., Zhou, X., Sinha, K., McCrea, P.D. und de Crombrughe, B. (2008). Inhibition of Wnt signaling by the osteoblast-specific transcription factor Osterix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 105 (19), 6936-6941.

Zou, H., Wieser, R., Massagué, J. und Niswander, L. (1997). Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev.*, 11 (17), 2191-2203.

## Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Professor Dr. Peter Bruckner für die Möglichkeit danken, die Dissertation in seinem Arbeitskreis durchführen zu können, und für seine Unterstützung und Motivation, wenn die Forschung manchmal nicht sofort gelang.

Vielen Dank auch an Herrn Professor Dr. Bruno Moerschbacher für die Übernahme der externen Betreuung durch den Fachbereich Biologie!

Herzlichen Dank auch an Herrn Dr. Joachim Kremerskothen, für die Bereitschaft, als dritter Prüfer zur Verfügung zu stehen.

Natürlich vielen Dank an Dr. Rita Dreier für die Betreuung während der Doktorarbeit, für die Beratung, Diskussionen, Unterstützung und für das eifrige und schnelle Durchsehen dieser Arbeit und die konstruktive Kritik.

Vielen Dank an den gesamten Arbeitskreis 020, besonders an Marianne für das Anlernen und die Hilfe im Labor und bei Anne für das Anfertigen der Paraffinschnitte.

Für die Abwechslung im Laboralltag vielen Dank an Sandra, die mich auch im Labor noch etwas anlernen mußte und mich zur WRFS überredet hat, was ein toller Ausgleich zur Laborarbeit war. Vielen Dank auch an Andrea, Philipp und Bastian für die Unterstützung und die Ablenkung.

Danke auch an den Arbeitskreis von Hannes, der bei Fragen immer freundlich zur Verfügung stand und an Daniela, die mir die Feinheiten von Excel näher bringen konnte.

Vielen Dank an Dr. Ulrike Hopfer aus Basel, die uns die Tibien der *Col8a1<sup>-/-</sup>/Col2<sup>-/-</sup>*-Mäuse zur Verfügung stellte, und an Attila Aszodi, für die Bereitstellung des Kollagen II-Promotor-Konstrukts.

Vielen Dank an meine Eltern und meinen Bruder für die sehr verlässliche Unterstützung in allen Lebenslagen und natürlich besonders an David, welcher mir immer mit Rat und Geduld zur Seite stand und in frustrierenden Zeiten zum Durchhalten antrieb.

## Tabellarischer Lebenslauf