

**Generierung und Charakterisierung von  
*in vitro* und *in vivo*-Modellsystemen zur  
Untersuchung des Skelettsystems**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

**Jutta Busch**  
geboren am 01.09.1972 in Worms

Mainz, 2011

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2011

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Entwicklung von Knochengewebe.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Musterbildung.....	2
1.1.2	Organogenese.....	4
1.1.3	Histogenese.....	5
1.1.4	Wachstum.....	6
1.1.5	Homöostase.....	9
<b>1.2</b>	<b>Entwicklung und Aufbau der Gelenke.....</b>	<b>9</b>
1.2.1	Gelenkknorpel.....	10
<b>1.3</b>	<b>Erkrankungen des Knorpel/Knochenapparates.....</b>	<b>13</b>
1.3.1	Osteoarthritis.....	13
1.3.2	Wachstumsstörungen.....	18
<b>1.4</b>	<b>Induzierbare Expressionssysteme.....</b>	<b>25</b>
1.4.1	Das Tetrazyklin-regulierte System.....	26
<b>1.5</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>28</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>30</b>
<b>2.1</b>	<b>Verwendete Zelllinien und Zellkulturtechniken.....</b>	<b>30</b>
2.1.1	Verwendete Zelllinien.....	30
2.1.1.1	Kultivierung der Zelllinien.....	30
2.1.1.2	Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	30
2.1.1.3	Transiente Transfektion.....	31
2.1.1.4	Stabile Transfektion und Selektion stabil transf. Zellklone.....	31
2.1.2	Kultivierung von Knorpelgewebe.....	32
2.1.2.1	Präparation und Kultivierung von Oberschenkelhalsköpfen/Rippen.....	32
2.1.2.2	Quantifizierung des Proteoglykangehaltes mittels des DMMB-Assay.....	32
<b>2.2</b>	<b>Arbeiten mit Mäusen.....</b>	<b>33</b>
2.2.1	Verwendeter Mausinzuchtstamm.....	33
2.2.2	Mäusezucht und Nummerierungssystem.....	33
2.2.3	Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien.....	33
2.2.4	Präparation von Mausgeweben.....	34
<b>2.3</b>	<b>Histologische Arbeitsmethoden.....</b>	<b>34</b>
2.3.1	Herstellung von Paraffinschnitten.....	34
2.3.1.1	Fixierung und Entkalkung von Knochengewebe.....	34
2.3.1.2	Entwässerung und Paraffinierung.....	34
2.3.2	Herstellung von Gefrierschnitten.....	35
2.3.3	Färbungen.....	35

---

2.3.3.1	Toluidinblau/Alcianblau-Färbung.....	35
2.3.3.2	$\beta$ -Galaktosidase(LacZ)-Färbung von Embryonen.....	36
2.3.3.3	Gegenfärbung der LacZ-gefärbten Embryonen mit Kernechtrot.....	36
2.3.3.4	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.....	36
<b>2.4</b>	<b>Analyse von Nukleinsäuren.....</b>	<b>37</b>
2.4.1	Isolierung von DNA.....	37
2.4.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA.....	37
2.4.1.2	Isolierung von endotoxinfreier Plasmid-DNA.....	37
2.4.1.3	Isolierung kleinerer Mengen Plasmid-DNA zum Screening rekombinanter Plasmide.....	37
2.4.2	Isolierung von RNA.....	38
2.4.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen.....	38
2.4.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe.....	38
2.4.2.3	Entfernung genomischer DNA nach der RNA-Isolation.....	39
<b>2.5</b>	<b>DNA- und RNA-Standardmethoden.....</b>	<b>39</b>
2.5.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	39
2.5.2	Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen.....	40
2.5.3	Fällung von DNA.....	40
2.5.3.1	Isopropanol-Fällung.....	40
2.5.3.2	Ethanol-Fällung.....	40
2.5.4	Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	41
2.5.5	Phenol-Extraktion.....	41
2.5.6	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	41
2.5.7	Auffüllen überhängender DNA-Enden.....	42
2.5.8	Dephosphorylierung von DNA mittels alk. Phosphatase.....	42
2.5.9	Herstellung eines doppelsträngigen Linkers.....	42
<b>2.6</b>	<b>Reverse Transkription.....</b>	<b>43</b>
<b>2.7</b>	<b>Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....</b>	<b>43</b>
2.7.1	Standard-PCR und semiquantitative PCR.....	44
2.7.2	Expand-PCR.....	44
2.7.3	Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	44
<b>2.8</b>	<b>Klonierung von Plasmid-DNA.....</b>	<b>45</b>
2.8.1	Ligation.....	46
2.8.2	Transformation mittels Hitzeschock und Selektion positiver Klonen.....	46
2.8.3	Kryokonservierung von <i>E. coli</i> -Dauerkulturen.....	46
<b>2.9</b>	<b><i>In vitro</i>-Mutagenese.....</b>	<b>46</b>
<b>2.10</b>	<b>Automatische DNA-Sequenzierung.....</b>	<b>47</b>
<b>2.11</b>	<b>Computerauswertung und Datenbankanalysen.....</b>	<b>47</b>
<b>2.12</b>	<b>Radioaktive Markierungstechniken.....</b>	<b>48</b>
2.12.1	Radioaktive Markierung von PCR-Produkten mit „Prime It <sup>®</sup> Random Primer“-DNA Labeling Kit.....	48
<b>2.13</b>	<b>Hybridisierungstechniken.....</b>	<b>49</b>

2.13.1	DNA:RNA Hybridisierung (alkalischer Northern-Transfer) .....	49
2.13.2	<i>Whole Mount in situ</i> Hybridisierung (WISH).....	49
2.13.2.1	Sondenvorbereitung und nicht radioaktive DIG-Markierung durch <i>in vitro</i> -Transkription.....	50
2.13.2.2	Vorbehandlung und Hybridisierung.....	50
2.13.2.3	Waschschritte und Antikörper-Inkubation.....	51
2.13.2.4	Waschen und Histochemie.....	51
<b>2.14</b>	<b>Arbeiten mit Proteinen.....</b>	<b>52</b>
2.14.1	Isolierung von Proteinen.....	52
2.14.2	Photometrische Quantifizierung nach der Bradford-Methode.....	52
2.14.3	Fällung von Proteinen.....	53
2.14.4	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	53
2.14.5	<i>Western-Blot</i> : Proteintransfer und Immunodetektion.....	53
<b>2.15</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>55</b>
2.15.1	Verwendete Primer.....	55
2.15.2	Konditionen der Quantitativen <i>real-time</i> PCR´s .....	57
2.15.3	Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	57
2.15.4	Puffer und Lösungen.....	58
2.15.5	Enzyme und Kits.....	61
2.15.6	Molekulargewichtsstandards und Nukleotide.....	61
2.15.7	Radioisotope.....	61
2.15.8	Antikörper.....	61
2.15.9	Bakterienstämme.....	62
2.15.10	Chemikalien, Materialien und Geräte.....	62
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>64</b>
<b>3.1</b>	<b>Herstellung einer transgenen Maus als Osteoarthrose-Modell.....</b>	<b>65</b>
3.1.1	Herstellung des bifunktionalen Expressionskonstruktes.....	67
3.1.1.1	Insertion des <i>Spacers</i> und Fertigstellung der Effektor-kassette.....	67
3.1.1.2	<i>Responder</i> -kassette und Fertigstellung des Endkonstruktes.....	69
3.1.2	<i>In vitro</i> Verifizierung des Konstruktes p <i>Col2</i> -Effektor/m <i>Adamts5</i> - Responder.....	72
3.1.3	<i>In vivo</i> Verifizierung des Konstruktes p <i>Col2</i> -Effektor/m <i>Adamts5</i> - Responder.....	78
3.1.3.1	Generierung der transgenen Mäuse.....	78
3.1.3.2	Analyse der transgenen Linien.....	80
3.1.3.3	Nachweis der Knorpelspezifität.....	83
3.1.4	Funktionalität der transgenen Aggrekanase.....	90
3.1.4.1	Histologische Auswertungen.....	90
3.1.4.2	Bestimmung des Glykosaminoglykangehaltes mittels des Dimethylmethylenblau-Assay´s (DMMB-Assay).....	99
3.1.5	Erhöhte Sterblichkeit transgener Tiere infolge Doxyzyklinapplikation.....	103
<b>3.2</b>	<b>Genexpressionsanalyse FGFR3-regulierter zellulärer Prozesse.....</b>	<b>106</b>
3.2.1	Herstellung der Responderkonstrukte p <i>INSpBI/EGFP-FGFR3-mut</i> <sup>ACH</sup> und p <i>INSpBI/EGFP-FGFR3-mut</i> <sup>TDII</sup> .....	108

---

3.2.2	Generierung und Verifizierung der stabilen Zelllinien.....	109
3.2.3	Funktionalität der Zelllinien.....	115
3.2.4	Differentielle Genexpressionsanalyse mittels <i>Microarray</i> -Hybridisierung.....	122
3.2.4.1	Differentielle <i>STC1</i> Expression infolge FGFR3-Induktion.....	124
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>128</b>
<b>4.1</b>	<b>Transgene Maus als Osteoarthrose-Modell.....</b>	<b>128</b>
4.1.1	Konstruktherstellung und Verifizierung <i>in vitro</i> .....	131
4.1.2	Generierung und Analyse der transgenen Tiere.....	133
4.1.2.1	Überprüfung der Knorpelspezifität.....	136
4.1.3	Funktionalität der transgenen Aggrekanase.....	140
4.1.3.1	Histologische Analyse verschieden induzierter Tiere.....	141
4.1.3.2	Veränderungen im Glykosaminoglykan-Gehalt induzierter Tiere.....	145
4.1.4	Erhöhte Sterblichkeit transgener Tiere infolge Doxyzyklinapplikation.....	147
<b>4.2</b>	<b>Genexpressionsanalyse FGFR3-regulierter zellulärer Prozesse.....</b>	<b>148</b>
4.2.1	Generierung und Verifizierung der Zelllinien.....	149
4.2.2	Überprüfung der Funktionalität anhand bereits beschriebener Signalwege.....	151
4.2.2.1	Induktion der Matrix Metalloprotease 13 ( <i>MMP13</i> )-Expression.....	154
4.2.3	Analyse der differentiellen Genexpression mittels <i>Microarray</i> -Hybridisierung.....	156
4.2.3.1	Regulation von <i>STC1</i> durch FGFR3.....	158
<b>4.3</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>160</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>163</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>165</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>189</b>
7.1	Tabelle der <i>Microarray</i> -Ergebnisse.....	189
7.2	Lebenslauf.....	190
7.3	Kongressbeiträge.....	191
7.4	Danksagung.....	192
	Erklärung.....	193

## Tabellen

	Seite
Tab. 3.1	89
Tab. 7.1	189

## Abbildungen

Abb. 1.1	Extremitäten-Entwicklung mit Ausbildung der drei Entwicklungsachsen [nach Zabel und Winterpacht, 2000]	4
Abb. 1.2	Schematische Darstellung eines Röhrenknochens mit detailliertem Aufbau der Wachstumsfuge [nach Wallis et al., 1996]	7
Abb. 1.3	Aufbau des Aggrekan-Proteins	12
Abb. 1.4	Vereinfachte Darstellung der Extrazellulären Matrix von gesundem und arthrotischem Knorpel	14
Abb. 1.5	Schematische Darstellung eines Aggrekan-Moleküls mit Schnittstellen von MMP's und Aggrekanasen [modifiziert nach Little et al., 2007]	15
Abb. 1.6	Domänenstruktur der ADAMTS-Proteine	17
Abb. 1.7	Schematische Darstellung des FGFR3-Moleküls mit den verschiedenen Mutationen	22
Abb. 1.8	Schematische Struktur des FRS2 $\alpha$ (FGF Receptor Substrat 2 $\alpha$ )-Proteins und Negativer Rückkopplungsmechanismus über den MAPK-Signalweg	24
Abb. 1.9	Funktion des Tetrazyklin-regulierten Systems [Veränd. nach Bockamp et al., 2002]	27
Abb. 3.1	Schematische Darstellung des knorpelspezifischen und durch Doxyzyklin induzierbaren Transgens	66
Abb. 3.2	Schematische Darstellung des amplifizierten Kollagen Typ II-Promotors	68
Abb. 3.3	Linkersequenz	68
Abb. 3.4	Vereinfachte grafische Darstellung der bisherigen Klonierungsschritte	69
Abb. 3.5	Generierung der <i>Responder</i> kassette pUHD10-3**/m <i>Adamts5</i>	70
Abb. 3.6	Fertigstellung des Endkonstruktes p <i>Col2</i> -Effektor/m <i>Adamts5-Responder</i>	71
Abb. 3.7	Transiente Transfektion in SW1353-Zellen zur Verifizierung des Konstruktes <i>in vitro</i>	73
Abb. 3.8	<i>Western Blot</i> -Analyse der m <i>Adamts5</i> -Expression	74
Abb. 3.9	Darstellung der beiden stabil transfizierten Konstrukte	76
Abb. 3.10A	<i>EGFP</i> -Expression und Durchlichtaufnahmen der generierten Zellklone	76
Abb. 3.10B	Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis der Doxyzyklin-abhängigen m <i>Adamts5</i> -Expression	76
Abb. 3.10C	<i>Northern Blot</i> -Hybridisierung zur Bestätigung der stringent durch Doxyzyklin induzierbaren Expression von m <i>Adamts5</i>	77
Abb. 3.10D	<i>Western Blots</i> zur Überprüfung der stringent regulierbaren m <i>Adamts5</i> -Expression und der Funktionalität der überexprimierten Aggrekanase	77
Abb. 3.11	PCR zur Identifizierung der transgenen <i>Founder</i> -Tiere und exemplarische Genotypisierungen der vier Linien	79

Abb. 3.12	<i>Intercross</i> zur Generierung homozygoter Tiere	80
Abb. 3.13	Regulierbarkeit des transgenen <i>mAdamts5</i> -Genes infolge Doxyzyklininduktion (Linie A und B)	81
Abb. 3.14	Regulierbarkeit des transgenen <i>mAdamts5</i> -Genes infolge Doxyzyklininduktion (Linie C und D)	82
Abb. 3.15	<i>Whole mount in situ</i> Hybridisierung (WISH) an transgenen und Wildtyp FVB/N-Embryonen des Entwicklungsstadiums E 13,5 <i>dpc</i>	84
Abb. 3.16A	X-Gal-Färbungen von Embryonen des Entwicklungsstadiums E 14,5 <i>dpc</i>	86
Abb. 3.16B	X-Gal-Färbungen von Embryonen des Entwicklungsstadiums E 16,5 <i>dpc</i>	87
Abb. 3.16C	X-Gal-Färbungen von Embryonen des Entwicklungsstadiums E 18,5 <i>dpc</i>	88
Abb. 3.17	Gefärbte Kniegelenksschnitte von mit 4 mg/ml Doxyzyklin induzierten Tieren	92
Abb. 3.18	Gefärbte Kniegelenksschnitte von mit 1 mg/ml Doxyzyklin induzierten Tieren	93
Abb. 3.19	Gefärbte Kniegelenksschnitte von mit 25 µg/ml Doxyzyklin induzierten Tieren	94
Abb. 3.20	Gefärbte Kniegelenksschnitte von mit 12,5 µg/ml Doxyzyklin induzierten Tieren	95
Abb. 3.21	Gefärbte Kniegelenksschnitte von mit 0,5 µg/ml Doxyzyklin induzierten Tieren	96
Abb. 3.22	Toluidinblaugefärbte Kniegelenksschnitte von nicht induzierten Tieren	97
Abb. 3.23	Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbte Kniegelenksschnitte von 6 Monate induzierten Tieren	98
Abb. 3.24	<i>Western Blot</i> -Analyse zum Nachweis der induzierbaren <i>mAdamts5</i> -Expression im Überstand von Chondrozyten-Primärkulturen	100
Abb. 3.25	Bestimmung des Gesamt-Glykosaminoglykangehaltes nach dreimonatiger Doxyzyklininduktion	101
Abb. 3.26	Prozentuale Glykosaminoglykan-Abgabe	102
Abb. 3.27	Toluidinblaugefärbte Extremitäten- und Rippenbereiche nach Induktion mit 4 mg/ml Doxyzyklin	104
Abb. 3.28	Toluidinblaugefärbte Extremitäten- und Rippenbereiche nach Induktion mit 12,5 µg/ml Doxyzyklin	105
Abb. 3.29	Herstellung stabiler, induzierbaren <i>FGFR3</i> -mut-Zelllinien mit anschließender <i>Microarray</i> -Hybridisierung	107
Abb. 3.30	Analyse der nach Neomycin und Doxyzyklin-Selektion identifizierten Zellklone	111
Abb. 3.31	<i>Western Blot</i> zur Analyse der einsetzenden <i>FGFR3</i> -Proteinexpression	112
Abb. 3.32	Relative Quantifizierung der vier identifizierten TD II-Klone zum Nachweis der induzierbaren <i>FGFR3</i> -Expression	113
Abb. 3.33	Relative Quantifizierung der <i>FGFR3</i> -Expression nach 48h Induktion	114
Abb. 3.34	<i>Western Blot</i> -Analyse zum Nachweis der induzierbaren <i>FGFR3</i> -Proteinexpression	115
Abb. 3.35	<i>Western Blot</i> -Analyse zum Nachweis der Phosphorylierung von <i>STAT1</i> nach 4 bzw. 8 h Induktion	117
Abb. 3.36	<i>Western Blot</i> -Analyse zum Nachweis der Phosphorylierung von <i>ERK1/2</i> nach 4 bzw. 8h Induktion	118
Abb. 3.37	RT-PCR-Experimente zur induzierbaren <i>MMP13</i> -Expression	120
Abb. 3.38	Relative Quantifizierung zum Nachweis der induzierbaren <i>MMP13</i> -Expression	121
Abb. 3.39	<i>Western Blot</i> -Analyse zur induzierbaren <i>MMP13</i> -Expression	121
Abb. 3.40	<i>Microarray</i> -Ergebnisse von vier mittels RT-PCR untersuchten Genen	123
Abb. 3.41	Relative Quantifizierung zum Nachweis der induzierbaren <i>STC1</i> -Expression infolge <i>FGFR3</i> -Induktion	125
Abb. 3.42	Transiente Transfektionsexperimente von SW1353- und RCS-Zellen zum Nachweis der induzierbaren <i>STC1</i> -Expression	127
Abb. 4.1	Schematische Darstellung der statistischen Auswertung	144



## Abkürzungsverzeichnis

<	kleiner als
Abb.	Abbildung
A. bidest	Aqua bidestillata
abs.	absolut
ACH	Achondroplasie
$\alpha$	alpha
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
$\beta$	beta
ca.	Zirka
cDNA	komplementäre DNA
°C	Grad Celcius
Ci	Curie
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cpm	„Counts per Minute“
c	Konzentration
d.h.	das heißt
DMMB	<u>Dimethylmethylenblau</u>
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-triphosphat
DIG	Digoxigenin
DNA	„Desoxyribonucleic Acid“ - Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpc	„day post-coitum“)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E.coli	Escherichia coli
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ERK	<i>extracellular-regulated kinases</i>
Fa.	Firma
FGFR3	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 3 („fibroblast growth factor receptor 3“)
FKS	Fetales Kälberserum
FVB/N	Bezeichnung eines bestimmten Maus-Inzuchtstammes
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykane
<i>GFP</i>	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
kJ	Kilo Joule
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration („inhibitory concentration“)
IVT	<i>in vitro</i> Transkription
LB-Medium	Luria Broth-Medium
LB <sub>Amp</sub>	Luria Broth-Medium mit 100 µg/ml Ampizillin
λ	Lambda
mA	Milliamper
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
M	Molar
mM	Millimolar
min	Minute
ml	Milliliter
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MOPS	( N-morpholin) Propan Sulfonsäure
mRNA	„Messenger Ribonucleic Acid“
µ	Mikro
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
OA	Osteoarthrose
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PFA	Paraformaldehyd
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung („phosphate buffered saline“)
PCR	„Polymerase Chain Reaction“ - Polymerasekettenreaktion
pmol	Picomol
RNA	„Ribonucleic Acid“ - Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
SDS	“Sodium Dodecyl Sulfate”
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunden
siRNA	Small interfering RNA
SOC-Medium	SOB (Super Optimal Broth)-Medium plus 20 mM Glukose

SSC	Standard Saline Citrat
STR/1N	Bezeichnung eines bestimmten Maus-Stammes
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-hydroxymethyl-amino-methan
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
TDII	Thanatophore Dyplasie Typ II
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	“Units” (Enzymeinheiten)
Upm	Umdrehungen pro Minute
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
♀	weiblich
♂	männlich
$\infty$	unendlich

#### Aminosäuren (Einbuchstaben-Code)

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

# 1 Einleitung

Das Skelett ist ein komplexes Stützorgan bestehend aus zwei Geweben (Knorpel und Knochen), drei Zelltypen (Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoklasten) und mehr als 220 im kompletten Organismus verteilten Skelettelementen. Die drei Zelltypen sind verschiedenen Ursprungs, Chondrozyten und Osteoblasten sind mesenchymalen Ursprungs (Ducy *et al.*, 1997), Osteoklasten entstammen der hämatopoetischen Linie (Karsenty und Wagner, 2002). Chondrozyten und Osteoblasten bauen den Knorpel bzw. den Knochen auf während Osteoklasten, die die Knorpel- und Knochensubstanz resorbieren, als Antagonisten fungieren. So kann die Homöostase des Knorpels und Knochens gesteuert werden.

Die Chondrozytendifferenzierung ist ein hochkomplexer mehrstufiger Prozess und wird im Zusammenhang mit der Knochen- und Knorpelentwicklung näher erläutert. Bei der Osteoblastendifferenzierung spielt der Transkriptionsfaktor *Cbfa1* eine entscheidende Rolle (Ducy *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2001). *Cbfa1*-defiziente Mäuse zeigen eine normale Skelettmusterbildung, jedoch sind alle Skelettelemente knorpelig, da ein Mangel an Osteoblasten besteht (Otto *et al.*, 1997). Haploinsuffizienz des *Cbfa1*-Gens führt zum menschlichen Krankheitsbild der *Cleidocranialen Dysplasie* (Mundlos *et al.*, 1997). *Cbfa1* selbst wird induziert durch *Msx2* und *Bapx1* und durch *Hoxa-2* reprimiert (Satokata *et al.*, 2000; Karsenty und Wagner, 2002). Die knochenresorbierenden Osteoklasten sind mehrkernige Zellen, die durch Fusion von Vorläuferzellen der Monozyten/Makrophagen-Linie entstehen (Chambers, 2000). Zusammen mit den Osteoblasten sind sie für die Aufrechterhaltung und Regulation der Knochenmasse verantwortlich. Nach der Differenzierung der Osteoklasten bilden diese fingerförmige Zellausstülpungen („*ruffled border*“) in die Knochenoberfläche. Die Zellen produzieren proteolytische Enzyme, welche zunächst die Hydroxylapatit-Kristalle der Knochensubstanz aufspalten. Im zweiten Schritt werden die Proteine, meist Typ I-Kollagene, enzymatisch durch die Protease „Cathepsin K“ abgebaut (Karsenty, 2001, Li *et al.*, 2006).

Funktionell beschränkt sich das Skelett nicht nur auf den Bewegungsapparat, es dient auch zum Schutz der inneren Organe, als Calcium- und Phosphatreservoir sowie als Generator des Wachstums.

## 1.1 Entwicklung von Knochengewebe

Die Entstehung des Skeletts ist in verschiedene Phasen zu unterteilen. Gesteuert durch Gene der **Musterbildung** wird die Form, Gestalt und Anzahl der Knochen festgelegt. In der

**Organogenese** kommt es durch Kondensation und Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen zur Anlage der zukünftigen Knochen. Die weitere Differenzierung wird in endochondrale und desmale Ossifikation unterteilt. Bei der desmalen Ossifikation entsteht der Knochen direkt aus den Vorläuferzellen, bei der endochondralen Ossifikation wird ein knorpeliges Vorläufermodell in Knochen umgewandelt. In der **Histogenese** kommt es zur Bildung extrazellulärer Matrix. Die Phase des **Wachstums** findet ausschließlich in der Wachstumsfuge statt. Die dort befindlichen Chondrozyten proliferieren, hypertrophieren und produzieren Matrix. Diese Matrix wird im Anschluss in Knochen umgewandelt. Die Phase der **Homöostase** beinhaltet den konstanten Umbau des Knochens. Da zirka 10 % des Knochens jedes Jahr ersetzt werden, bedeutet dies statistisch die Kompletterneuerung des Knochens alle 10 Jahre (Cohen, 2006).

### 1.1.1 Musterbildung

In der Phase der Musterbildung zu Beginn der Skelettentwicklung kommt es zur Festlegung der Gesamtgestalt sowie der Anzahl und Form der einzelnen Skelettelemente. Ein vorläufiger Stützapparat entsteht (Karsenty, 1998). Systematische Studien der Gliedmaßen-Entwicklung an Mäusen und am Hühnchen führten zur Aufklärung von Genkaskaden, die die Festlegung der drei Achsen der sich entwickelnden Gliedmaßen steuern, die proximal-distale (P-D) Achse, die anterior-posterior (A-P) Achse und die dorsal-ventrale (D-V) Achse.

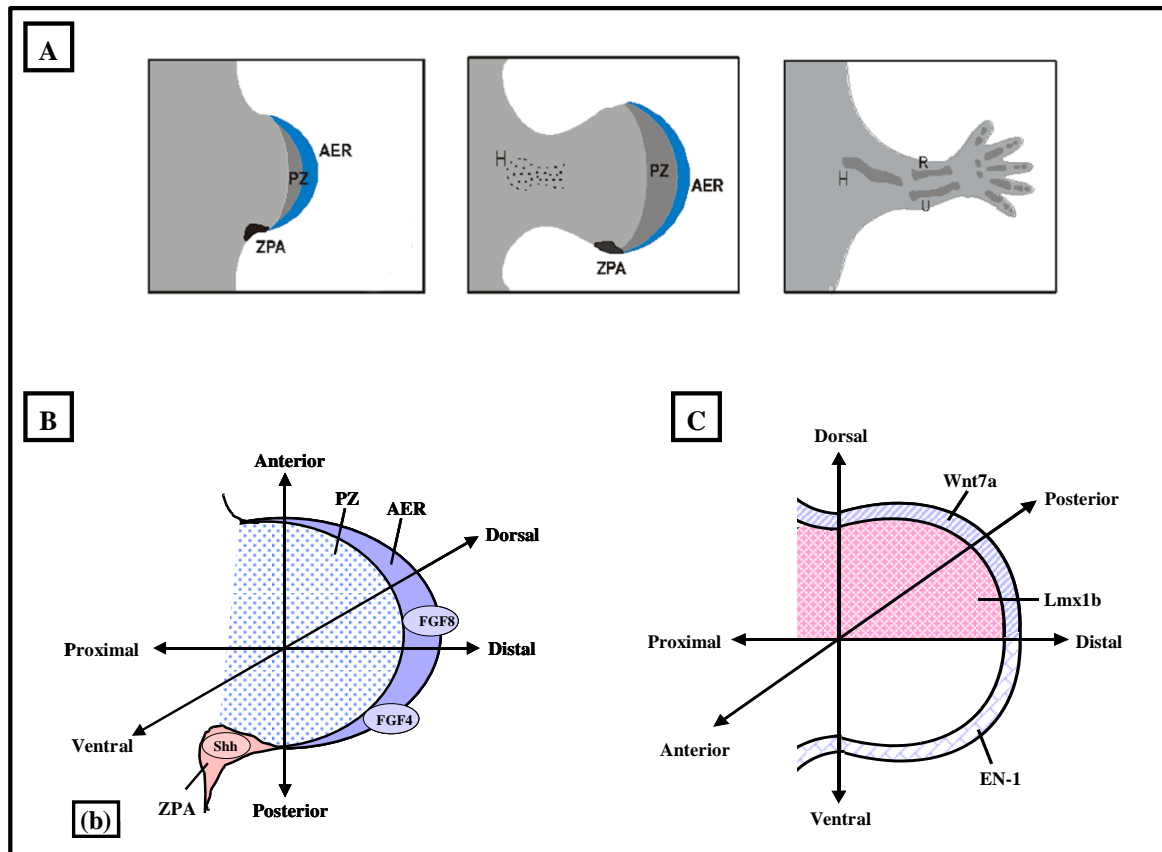
Zunächst bildet sich eine Knospe mesenchymaler Zellen, die der lateralen Platte und den Somiten entstammen (Searls *et al.*, 1971). Diese Knospe ist bedeckt von einer dicken epithelialen Schicht von Zellen, der apikalen Ektodermleiste („*apical ectodermal ridge*“ (AER)). Das darunterliegende Mesoderm („Progressionszone“ (PZ)) hält die Zellen der AER aufrecht und induziert das weitere Wachstum der Knospe (Fallon *et al.*, 1977; Karsenty, 1998). Die apikale Ektodermleiste ist für das Auswachsen in **proximal-distaler Richtung** verantwortlich. Als wesentliche Signale der AER sind die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren, im besonderen FGF2, FGF4, FGF8, FGF9, FGF10 und FGF17 zu nennen (Sun *et al.*, 2002; Duboule, 2002; Niswander, 2003). Diese als „AER-FGF's“ bezeichneten Wachstumsfaktoren stimulieren die Proliferation der unter der AER liegenden, undifferenzierten Mesenchymalzellen in der Wachstumszone und produzieren hierdurch neue Zellen, die für das Auswachsen der Extremitäten benötigt werden. Cohn und Tickle konnten 1996 zeigen, dass *FGF4* lediglich im posterioren Bereich, *FGF8* in der gesamten „AER“ exprimiert wird. *Knock-out*-Mäuse, bei denen *Fgf4* und *Fgf8* ausgeschaltet wurden, zeigten keinerlei Formierung der Gliedmaßen (Sun *et al.*, 2002).

Eine Subpopulation mesenchymaler Zellen am posterioren Rand der Progressionszone, die sogenannte „Polaritätszone“ („*Zone of polarizing activity*“ (ZPA)), bestimmt die Ausbildung der **anterior-posterior Achse** (Karsenty, 1998; Niswander, 2003). Der regulierende Schlüsselmediator ist der Wachstumsfaktor Sonic Hedgehog (*SHH*) (Chiang *et al.*, 2001; Kraus *et al.*, 2001). Riddle und Kollegen konnten 1993 zeigen, dass, wird *Shh* im anterioren Bereich exprimiert, es zum Auswachsen von spiegelbildlich duplizierten, distalen Extremitäten kommt. *Shh-knock-out*-Mäusen dagegen fehlen die distalen Gliedmaßen komplett (Chiang *et al.*, 1996). Mutationen im humanen *SHH*-Gen führen neben einer fehlerhaften anterior-posterior Achse in Form von verschiedenen Handdeformitäten auch zu schweren neurologischen und kraniofazialen Syndromen (Baldrige *et al.*, 2010).

Durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus zwischen „ZPA“ und „AER“ wird das Wachstum und die Musterung der Extremität koordiniert reguliert. Sun *et al.* konnte 2000 zeigen, dass die *SHH*-Expression im „ZPA“ die *FGF4*-Expression im „AER“ aufrecht erhält und umgekehrt. Auch die *FGF9*- und *FGF17*-Expression werden durch *Shh* gesteuert.

Die **dorso-ventrale Achse** wird von dem Transkriptionsfaktor *Engrailed-1* (*EN-1*), dem Glykoprotein *Wnt7a* sowie dem LIM-Homöobox-Gen *Lmx1b* bestimmt. *EN-1* ist im ventralen Mesoderm exprimiert und reprimiert *Wnt7a*, was auf diese Weise nur im dorsalen Ektoderm exprimiert vorliegt. *Wnt7a* wiederum induziert im dorsalen Mesenchym die Expression des Gens *Lmx1b* (Riddle *et al.*, 1995; Parr und McMahon, 1995; Loomis *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998; Pizette *et al.*, 2001). So wird durch die unterschiedliche Lokalisation der drei Gene eine dorso-ventrale Orientierung gewährleistet.

In nachfolgender Abbildung ist die Phase der Musterbildung mit der Ausbildung der drei Entwicklungsachsen vereinfacht dargestellt.



**Abb. 1.1:** Extremitäten-Entwicklung mit Ausbildung der drei Entwicklungsachsen [nach Zabel und Winterpacht, 2000]

(A) Schematische Darstellung einer sich **entwickelnden Extremitätenknospe** mit der räumlichen Lage der „apikalen Ektodermleiste“ (**AER**, „*apical ectodermal ridge*“), sowie der „Progressionszone“ (**PZ**) und der „Polaritätszone“ („*Zone of polarizing activity*“, **ZPA**). Die Entwicklung verläuft von proximal nach distal (Schulter → Fingerspitze). H= Humerus, R= Radius, U= Ulna

(B) Die Signale der AER sind Fibroblasten-Wachstumsfaktoren („AER-FGF’s“), vorrangig zu nennen *FGF4* und *FGF8*, welche die Proliferation der unter der AER liegenden Zellen stimulieren, sodass durch die ständige Neubildung von Zellen ein Auswachsen der Knospe entlang der **proximal-distalen** Achse (Schulter → Fingerspitze) ermöglicht wird. Die Ausbildung der **anterior-posterior** Achse (Daumen → kleiner Finger) wird wesentlich durch den Wachstumsfaktor Sonic hedgehog (Shh) in der Polaritätszone (ZPA) bestimmt.

PZ= Progressionszone, AER= apikale Ektodermleiste („*apical ectodermal ridge*“)

(C) *Wnt7a* (dorsales Ektoderm), *EN-1* (ventrales Ektoderm) sowie *Lmx1b* bestimmen die dorso-ventrale Achse. *Wnt7a* induziert hierbei die *Lmx1b*-Expression im dorsalen Mesoderm.

### 1.1.2 Organogenese

Der erste morphologisch sichtbare Schritt in der Organogenese ist die Kondensation der mesenchymalen Vorläuferzellen. Diese wird über die Expression zelladhäsiver Matrix vermittelt. Eine entscheidende Rolle hierbei spielen zellständige Proteoglykane wie Biglycan, Fibronectin als auch verschiedene Integrine. Nach der Kondensation sind für die weitere Skelettentwicklung zwei unterschiedlich ablaufende Mechanismen verantwortlich.

Die **intramembranöse Ossifikation** findet im Wesentlichen bei der Bildung einiger flacher Schädel- und Gesichtsknochen, der Mandibula und der lateralen Clavicula statt. Nach der

Kondensierung vaskularisiert das Gewebe und die Zellen differenzieren direkt zu Osteoblasten (Ornitz und Marie, 2002; Karsenty und Wagner, 2002; Yang und Karsenty, 2002). Sie scheiden Osteoid, bestehend aus Kollagen, Proteoglykanen und Glykoproteinen, ab, mauern sich dadurch ein und werden zu Osteozyten. Der so entstandene Knochen wird als Geflechtknochen bezeichnet, der ungeordnete Kollagenfibrillen aufweist und in weiterer Folge durch Lamellenknochen ersetzt wird (Freyschmidt, 2008).

In allen langen Röhrenknochen wie auch in den Wirbeln erfolgt die Knochenbildung über die **endochondrale Ossifikation**, ein 2-Phasen-Prozess bestehend aus Chondrogenese und Osteogenese. Die mesenchymalen Zellen, die noch *Typ I-Kollagen* exprimieren, kondensieren und differenzieren zu Chondrozyten. Diese exprimieren Chondrozyten-spezifische Gene wie z.B. *Aggrekan* oder *Typ II-Kollagen*. *Typ I-Kollagen* wird ab diesem Zeitpunkt nicht mehr exprimiert. Nach dieser Phase liegt das gesamte Skelett als knorpelige Anlage vor, die in relativer Größe und Form bereits der Gestalt der Knochen gleicht. Im Anschluss hypertrophieren die Chondrozyten, wobei hier nochmals zwei Populationen unterschieden werden. Die prähypertrophen Chondrozyten exprimieren *Typ X-Kollagen* und *Typ II-Kollagen*, wobei *Typ II-Kollagen* wesentlich weniger exprimiert wird als in nicht hypertrophen Chondrozyten. Hypertrophe Chondrozyten exprimieren nur *Typ X-Kollagen* und durchlaufen nach kompletter Differenzierung die Apoptose. Gleichzeitig differenzieren Zellen des Perichondriums in *Cbfa-1*-exprimierende Osteoblasten, welche sich als Knochenmanschette um den vorläufigen Knorpelkern anordnen. Bei der sich anschließenden Vaskularisierung wandern Vorläuferzellen von Osteoblasten ein, die später differenzieren und das Knorpelmodell durch Knochen ersetzen. Typische Proteine des Knochens sind beispielsweise Typ I Kollagen und alkalische Phosphatase (Yang und Karsenty, 2002; Karsenty und Wagner, 2002).

### 1.1.3 Histogenese

Bei der Histogenese kommt es zu Bildung extrazellulärer Matrix. Über 90% der **Knochenmatrix** besteht aus Typ I Kollagen, durch Einlagerung von Hydroxyapatit kommt es zur Verkalkung (Zabel und Winterpacht, 2000). Die **Knorpelmatrix** besteht hauptsächlich aus Typ II, Typ IX und Typ XI Kollagenen, sowie aus Proteoglykanen wie z.B. Aggrekan und weiteren Proteine (Mundlos und Olson, 1997). Der Bereich der Wachstumsfuge weist eine abweichende Zusammensetzung der extrazellulären Matrix auf.



### 1.1.4 Wachstum

Nach abgeschlossener Organogenese folgt die Wachstumsphase, die beim Menschen vom Beginn der Fetalzeit bis zur Pubertät andauert. Das komplette Längenwachstum findet ausschließlich in den knorpeligen Teilen der langen Röhrenknochen statt. In dem zukünftigen Knochen bildet sich in der Mitte das primäre Ossifikationszentrum. Von hier aus entsteht auf beiden Seiten der Röhrenknochen die sogenannten „Wachstumsfugen“, hochspezialisierte Gewebebereiche zwischen Epiphyse und Diaphyse. Im Laufe des Wachstums vergrößert sich das primäre Ossifikationszentrum und die beiden Wachstumsfugen wandern in Richtung Knochenenden. Innerhalb der Wachstumsfuge durchlaufen Chondrozyten eine Abfolge von Proliferation- und Differenzierungsschritten und werden letztendlich durch Knochen ersetzt. Histologisch kann die Wachstumsfuge in 4 Zonen eingeteilt werden (Mundlos, 2004):

Reservezone (Ruhezone): Hier sind die Chondrozyten rund, klein und von viel knorpeliger Matrix umgeben. Diese Zellen bilden die Ressource für die Proliferationszone.

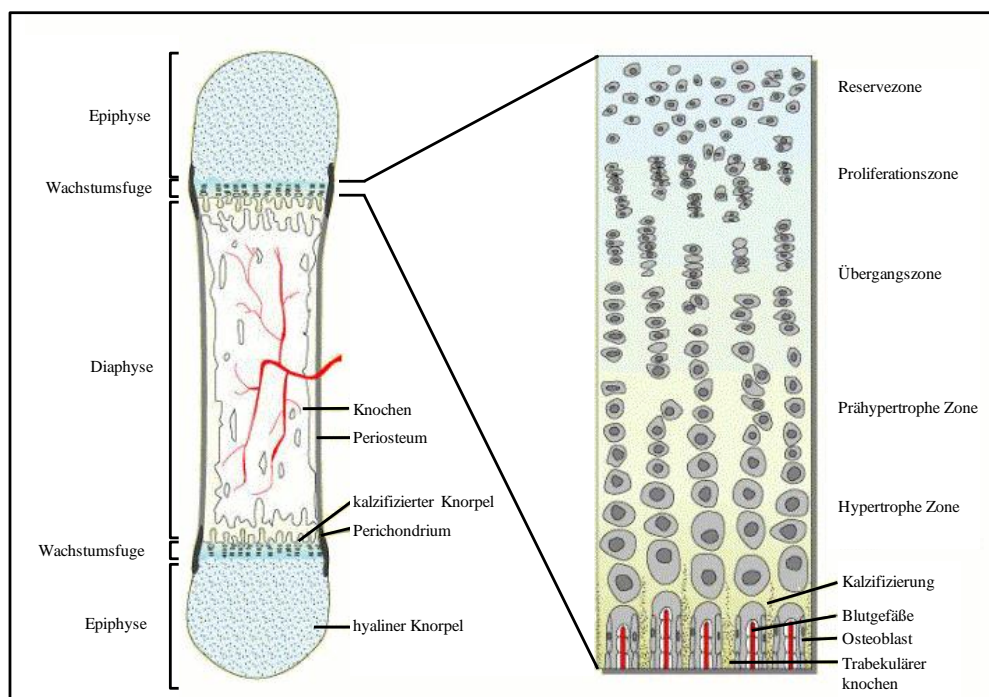
Proliferationszone: Hier findet der höchste Grad der Proliferation statt. Die proliferierenden Chondrozyten sind dichter gepackt und säulenartig angeordnet. Verschiedene Faktoren beeinflussen die Proliferation. Beispielsweise fungiert der Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor 3 (*FGFR3*) als ein negativer Regulator der Chondrozytenproliferation. Weitere Regulatoren sind *Indian Hedgehog (IHH)*, *C-type natriuretic peptide (CNP)* und der Transkriptionsfaktor *SOX9* (Bi *et al.*, 1999; Ingham und McMahon, 2001; Chusho *et al.*, 2001). Durch die spezifische Expression von Knorpelmatrixproteinen findet neben der Proliferation auch noch Matrixsynthese statt.

Hypertrophe Zone: Die Proliferation kommt zum Stillstand und *IHH*, *FGFR1* und *Cbfa1* werden exprimiert, die Transkription von *Typ II-Kollagen* geht zurück. Diese hypertrophe Zone ist zweigeteilt, eine Zellschicht prähypertrophischer Chondrozyten, abgeflachte und in langen Säulen angeordnete Zellen, die an der Längsrichtung des Knochens ausgerichtet sind. Die zweite Zellschicht beinhaltet hypertrophe Chondrozyten, große, runde Zellen mit wenig extrazellulärer Matrix umgeben, welche ausschließlich *Typ X-Kollagen* exprimieren und in Folge durch Apoptose absterben. Regulatoren der Chondrozyten-Hypertrophierung sind z.B. *parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)*, *WNT4* oder *insulin-like growth factor 1 (IGF1)* (St-Jacques *et al.*, 1999; Hartmann und Tabin, 2001; Lupu *et al.*, 2001).

Verknöcherungszone: Kurz bevor die Chondrozyten den Knochen erreichen, verkalkt die extrazelluläre Matrix. Die Zellen werden apoptotisch und von Osteoklasten abgebaut. Die verkalkte knorpelige Matrix wird durch Knochen ersetzt. Der Abbau von Knorpel und dessen Ersatz durch Knochen wird primäre Ossifikation genannt. Charakteristisch hierfür ist das

Vorhandensein von Typ I Kollagen und alkalischer Phosphatase. Nach Beendigung des Längenwachstums wird die Wachstumsfuge durch spongiösen Knochen ersetzt (Dreyer, 1999; Zabel und Winterpacht, 2000; Karsenty und Wagner, 2002; Ornitz und Marie, 2002).

Abbildung 1.2 zeigt schematisch die Darstellung eines sich entwickelnden Röhrenknochens und die vergrößerte Ansicht der Wachstumsfuge.



**Abb 1.2: Schematische Darstellung eines Röhrenknochens mit detailliertem Aufbau der Wachstumsfuge [nach Wallis *et al.*, 1996]**

Auf der linken Seite ist ein sich entwickelnder Röhrenknochen dargestellt. Aus der Mitte des vorläufigen Knorpelmodells bildet sich ein Ossifikationszentrum, welches zu beiden Seiten sogenannte Wachstumsfugen aufweist. Durch Vergrößerung des Ossifikationszentrums entfernen sich die Wachstumsfugen voneinander und wandern in Richtung Epiphyse.

Die rechte Seite zeigt den schematischen Ausschnitt einer Wachstumsfuge mit den verschiedenen histologisch differenzierbaren Zonen. Das Längenwachstum wird durch eine gesteuerte Abfolge von Proliferation, Differenzierung mit anschließendem Ersatz des Knorpels durch Knochen gewährleistet. Nach Abschluss des Wachstums wird die Wachstumsfuge ebenfalls durch Knochen ersetzt.

Die verschiedenen Differenzierungsschritte der Chondrozyten in der Wachstumsfuge sind von verschiedenen Signalwegen gesteuert. Das Zusammenspiel der Faktoren und Rezeptoren gewährleisten den korrekten zeitlichen und örtlichen Verlauf der Chondrozyten-differenzierung. Die drei Hauptsignalwege sind der *Indian hedgehog (IHH) / Parathyroid-hormone-related peptide (PTHrP)*-Signalweg; die Signalvermittlung über die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren sowie der Signalweg über die *Bone Morphogenic Proteins (BMPs)* und deren Rezeptoren (Jüppner, 2000; Reddi 2001; Vortkamp, 2001; Ornitz *et al.*, 2002). Bei dem *Indian hedgehog (IHH) / Parathyroid-hormone-related peptide (PTHrP)*-Signalweg wird *IHH* in den prähypertrophen Chondrozyten exprimiert und reguliert

indirekt die Expression von *PTHrP*, welches die Chondrozyten im proliferierenden Zustand belässt. *IHH* und *PTHrP* bilden einen Rückkopplungsmechanismus, bei dem *IHH* *PTHrP* hochreguliert und somit indirekt die Chondrozytenhypertrophierung verlangsamt. Direkt wirkt *IHH* als positiver Regulator der Chondrozytenproliferation (Mundlos, 2004). Mutationen im Rezeptor des *PTHrP*, *PTHR1*, führen zu unterschiedlichen Krankheitsbildern. Aktivierende Mutationen verursachen beispielsweise die Metaphysäre Chondrodysplasie Typ Jansen, die unter anderem durch Wachstumsretardierung mit Knochendemineralisierung und Hyperkalzämie charakterisiert ist. Inaktivierende Mutationen, wie beispielsweise bei der Blomstrand-Chondrodysplasie, führen zu schweren Skelettveränderungen mit erhöhter Knochendichte und gesteigerter Knochenformation (Ganten *et al.*, 2004; Baldrige *et al.*, 2010). Bei der Signalweiterleitung der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren sind im Knorpel besonders die Rezeptoren *FGFR1* und *FGFR3* wichtig. *FGFR1* wird überwiegend in prähypertrophen und hypertrophen, *FGFR3* in proliferierenden Chondrozyten exprimiert. *FGFR3* wirkt als Regulator der Chondrozyten-Proliferation und -Hypertrophierung, wobei er hier einen hemmenden Einfluss ausübt. Die *Bone Morphogenic Proteins* (BMPs) werden teilweise im Perichondrium (*BMP2*, *BMP4*), teilweise in hypertrophen Chondrozyten (*BMP6*) exprimiert. Einerseits regulieren BMPs die Chondrozytenproliferation, andererseits koordinieren sie über die Expressionsregulation von *IHH* die Chondrozytenproliferation und das Einsetzen der hypertrophen Differenzierung. Weiterhin wird über den BMP-Signalweg die Differenzierung der terminalen hypertrophen Chondrozyten verzögert (Mundlos, 2004).

Der letzte Schritt der Chondrozytendifferenzierung, der Ersatz des hypertrophen Knorpels durch Knochen, setzt eine Vaskularisierung voraus, ein durch verschiedene Faktoren genauestens regulierter Prozess (Gerber, 2000). Die einziehenden Blutgefäße beinhalten Osteoblasten als auch Osteoklasten. Die hypertrophen Chondrozyten exprimieren *Vascular Endothelial Growth Factor* (*VEGF*), welcher durch die von den Osteoklasten produzierte Matrixmetalloprotease *MMP9* aktiviert wird. Zusätzlich unterstützt der Chondrozyt seine eigene Beseitigung, indem er *MMP13* exprimiert. *MMP13* selbst hat nur sehr wenig proteolytische Aktivität, wird allerdings durch *MMP9* aktiviert. Nach Degradation der knorpeligen Extrazellulären Matrix kommt es zur Ausschüttung von *VEGF*, welcher durch Bindung an seinen Rezeptor die Vaskularisierung und den Ersatz des Knorpels durch Knochen vorantreibt. Durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren wird so der Knorpel abgebaut und durch Knochen ersetzt (Karsenty und Wagner, 2002; Mundlos, 2004).

### 1.1.5 Homöostase

Im Rahmen der Homöostase findet ein ständiger Umbau des Knochens statt. Bei konstanter Knochenmasse entfernen Osteoklasten alte Knochensubstanz und Osteoblasten bauen neue Knochenmatrix auf. Störungen der Homöostase führen zu Osteoporose (Verlust der Knochensubstanz durch gesteigerte Osteoklastenaktivität), Osteopetrose (Überproduktion der Knochensubstanz durch eine defekte Osteoklastendifferenzierung) als auch zu Osteosklerose (Überproduktion der Knochensubstanz durch gesteigerte Osteoblastenaktivität) (Lazner *et al.*, 1999, Teitelbaum, 2000). Faktoren zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen Knochenauf- und -abbau sind Parathyroid Hormon (PTH),  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ , Calcitonin oder auch Östrogene (Karsenty, 1999).

## 1.2 Entwicklung und Aufbau der Gelenke

Eine weitere wichtige Aufgabe der Chondrozyten ist die Entwicklung der Gelenke, die zeitgleich mit der frühen Chondrozytendifferenzierung stattfindet. An Stelle des zukünftigen Gelenks kommt es zur Bildung einer „Interzone“, einer Region höherer Zelldichte abgeflachter Chondrozyten (Archer *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2004)). Diese Interzonenzellen exprimieren Gelenksspezifische Marker wie z.B. der *Growth Differentiation Factor 5* (*GDF5*), *Growth Differentiation Factor 6* (*GDF6*), *wingless-Type MMTV integration site family, member 9A* (*Wnt9a*), *Chordin* und *cut-like homeobox 1* (*Cux-1*) (Hartmann und Tabin, 2001; Lizarraga *et al.* 2002; Settle *et al.*, 2003; Pacifici *et al.*, 2006). In einem zweiten Schritt differenzieren diese Zellen in eine dreischichtige Struktur aus. Die zentrale Schicht mit geringer Zelldichte (*central intermediate lamina, CIL*), in der die Zellen später durch Apoptose absterben und den Gelenkspalt bilden, und beidseitig der zentralen Lage jeweils eine Schicht mit hoher Zelldichte, die sich zu den Gelenkknorpeln entwickeln (*high-cell density layers, High CDL*). Im letzten Schritt kommt es durch Apoptose der Zellen der *CIL* zur Bildung des Gelenkspaltes. Die Zellen der beiden Schichten mit höherer Zelldichte bilden den späteren Gelenkknorpel aus (Karsenty und Wagner, 2002).

Bisher ist kein Gen bekannt, welches notwendig und hinreichend für die Gelenkbildung ist. Das molekulare „Markergen“ *Wnt9a* (früher als *Wnt14* bezeichnet), welches als frühester „Induzierer“ der Gelenkbildung angesehen wird, ist nach künstlicher Überexpression zwar in der Lage, Gelenkstrukturen mit der passenden Morphologie zu induzieren, *Wnt9a-knock-out*-Mäuse jedoch weisen keine Gelenkveränderung auf (Spater *et al.*, 2006). Ein weiteres interessantes Gen in der Gelenkentwicklung ist der *Growth Differentiation Factor 5* (*GDF5*), auch als *cartilage-derived morphogenetic protein 1* (*CDMP1*) bezeichnet (Karsenty und

Wagner, 2002). Mutationen im humanen GDF5/CDMP1-Protein sind für verschiedene Typen der Chondrodysplasie verantwortlich (Thomas *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 1997; Polinkovsky *et al.*, 1997). *GDF5-knock-out*-Mäuse zeigen weniger Gelenke, jedoch kann durch eine Überexpression von *GDF5* kein Gelenk induziert werden (Storm *et al.*, 1994; Francis-West *et al.*, 1998; Merino *et al.*, 1999).

Die Chondrozyten im artikulären Knorpel unterscheiden sich von denen der Wachstumsfuge dahingegen, dass bei den artikulären Zellen keine Hypertrophierung mehr stattfindet. Der differenzierte Phänotyp bleibt erhalten und die Zellen können ein Leben lang artikulären Knorpel bilden (Goldring *et al.*, 2006). Verschiedene Faktoren spielen bei der Aufrechterhaltung des zellulären Phänotyps eine Rolle. Zum einen der erniedrigte Sauerstoffgehalt in dem avaskulären Gewebe, aber auch vor allem Wachstumsfaktoren, wie der *Transforming Growth Factor-β1* (*TGF-β1*) und der *Insulin-like Growth Factor I* (*IGF-I*), sowie die Mechanotransduktion (Roark and Greer, 1994; Wang *et al.*, 1995; Szafranski *et al.*, 2004).

### 1.2.1 Gelenkknorpel

Der hyaline Gelenkknorpel ist ein nicht innerviertes, avaskuläres und alymphatisches Bindegewebe (Aigner *et al.*, 2002) und besteht zu 95% aus Extrazellulärer Matrix und mit weniger als 5% aus Chondrozyten, die als isogene Gruppen von bis zu 10 Zellen vorliegen (Mankin and Thrasher, 1975; Lohmander, 1991; Cole *et al.* 2002). Er ermöglicht eine reibungslose Bewegung der Gelenke und eine Abpufferung bei Druckbelastungen. Die Eigenschaften des Knorpels werden gewährleistet durch die Zusammensetzung und Struktur seiner Extrazellulären Matrix, die aus Proteoglykanen eingebettet in ein Netzwerk von Kollagenfasern und Wasser besteht. Der hohe Wasseranteil (zirka 70%) zusammen mit den beiden Makromolekülen Kollagen und Proteoglykan, die 70% bzw. 20% der Trockenmasse ausmachen, gewährleisten eine hohe Druck- und Zugfestigkeit. Die in das Kollagen-Netzwerk eingebetteten Proteoglykane erzeugen durch ihre polyanionischen Glykosaminoglykan-Seitenketten einen hohen osmotischen Schwelldruck, dem das Kollagennetzwerk entgegenwirkt (Hardingham *et al.*, 1992). Hierdurch entstehen die stoßdämpfenden, elastischen Eigenschaften des Knorpels. Unter Druck strömt Wasser aus, der Knorpel verformt sich, bei Entlastung wird durch das Zurückströmen des Wassers die ursprüngliche Form des Knorpels wieder hergestellt.

Der Gelenkknorpel in seiner Gesamtheit wird in vier oberflächenparallele Zonen unterteilt. Von Knorpeloberfläche zu Knochenoberfläche unterscheidet man die **Tangentialzone**, in der

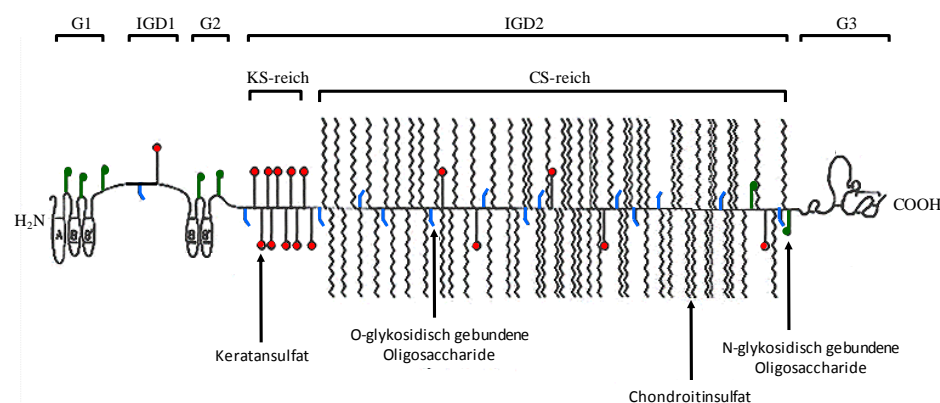
die Chondrozyten parallel zur Oberfläche angeordnet sind, die **Transitionalzone**, eine Zone geringerer Zelldichte mit einer willkürliche Anordnung der Zellen, die **Radialzone**, die die geringste Zelldichte aufweist und bei der die Chondrozyten fast senkrecht in die kalzifizierte Zone einstrahlen und die an den subchondralen Knochen angrenzende **kalzifizierte Mineralisierungszone**, die den Übergang zum subchondralen Knochen darstellt (Pullig *et al.*, 2001; Hunziker *et al.*, 2002; Aigner *et al.*, 2002).

Die Tangentialzone, die dünnste der vier Zonen, besteht aus feinen Kollagenfibrillen mit tangentialer Orientierung, einem geringen Proteoglykangehalt und langgestreckten Chondrozyten, die parallel zur Oberfläche angeordnet sind. Die Tangentialzone hat den direkten Kontakt zur Synovialflüssigkeit und ist überwiegend verantwortlich für die Zugfestigkeit des Knorpels. Die Transitionalzone bildet 40-60% des Knorpels, besteht aus Proteoglykanen und dicken Kollagenfibrillen und die Chondrozyten haben eine runde Form. Die darauffolgende Radialzone zeigt die größten Kollagenfibrillen sowie den höchsten Aggrekangehalt. Die kalzifizierte Mineralisierungszone ist von den anderen Zonen durch die *Tidemark* abgetrennt, und trennt somit den hyalinen Knorpel von dem darunterliegenden subchondralen Knochen. Die Hauptfunktion dieser Zone ist die Verankerung des Knorpels im Knochen, da die Kollagenfibrillen der Radialzone bis in die kalzifizierte Zone durchdringen (Martel-Pelletier *et al.*, 2008).

Die von den Chondrozyten gebildete Extrazelluläre Matrix (ECM) des artikulären Knorpels besteht neben Wasser aus drei Klassen von Molekülen: Kollagene (Kollagen II, IX und XI), Glycosaminoglykane und Proteoglykane (Aggrekan, Biglycan, Decorin, Fibromodulin) und nichtkollagene Proteine (COMP, Thrombospondin 1, Matrilin 1, Matrilin 3). Kollagen Typ II, welches 90-98% des kompletten Gewebeskollagens ausmacht (Martel-Pelletier *et al.*, 2008), Typ IX und Typ XI bilden ein fibrilläres Netzwerk, in das die Chondrozyten sowie weitere Bestandteile der ECM eingebettet sind. Dieses Netzwerk verleiht dem Gewebe die Form und gewährleistet die Reißfestigkeit des Knorpels. Weitere Kollagene wie z.B. Kollagen Typ III, VI, X, XII und XIV sind an Quervernetzungen des Kollagengerüsts beteiligt (Buckwalter und Mankin, 1998; Reginato *et al.*, 2002). Die nichtkollagenen Proteine wie beispielsweise das *cartilage oligomeric matrix protein (COMP)* tragen durch Interaktion mit den Kollagenen ebenfalls zur Reißfestigkeit bei (Rowan, 2001). Die Proteoglykane machen den zweitgrößten Teil der festen Bestandteile des Knorpels aus. Aggrekan stellt dabei das Hauptproteoglykan im artikulären Knorpel dar und verleiht ihm durch seine enorme Wasserbindungskapazität über die mit dem Molekül assoziierten Glykosaminoglykane wie das Chondroitin- und Keratansulfat, Elastizität und Druckfestigkeit. Jeweils mit einem Link-Protein stabilisiert sind

bis zu 100 Aggrekanmoleküle an ein Hyaluronsäuremolekül gebunden, welches selbst an die Chondrozytenoberfläche gekoppelt ist (Knudson *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2005). Das Interagieren dieser beiden Komponenten, Kollagenen und Proteoglykanen, gewährleistet sowohl Reißfestigkeit als auch Elastizität. In arthrotischem Knorpel sind Aggrekan und Kollagenfasern degradiert, gehen verloren und bedingen dadurch eine dünnere Knorpelschicht mit geringeren hydromechanischen Eigenschaften. Aggrekan ist hierbei eines der ersten Moleküle, die in arthrotischem Knorpel abgespalten werden (Thomas, 1956; Pond *et al.*, 1973; Martel-Pelletier *et al.*, 2008).

Aufgrund des schützenden Effekts von Aggrekan auf die Kollagen Degradation (Pratta *et al.*, 2003) ist die Ursachenforschung bezüglich der Aggrekanolyse von großer Bedeutung. Aggrekan besteht aus drei globulären Domänen (G1-G3), die über zwei Interglobuläre Domänen (IGD1, IGD2) miteinander verbunden sind. Die G1-Domäne am N-terminalen Ende weist Unterdomänen auf, die für die Interaktion zwischen dem Linkprotein und der Hyaluronsäure verantwortlich sind. Die Funktion der G2-Domäne ist zurzeit noch unbekannt. Die G3-Domäne am C-Terminus ist essentiell für die normale posttranslationale Modifikation des Aggrekanmoleküls und die nachfolgende Aggrekansekretion (Chen *et al.*, 2002). Zwischen der zweiten und dritten globulären Domäne sind bis zu 100 Chondroitinsulfat-Ketten, 40-50 Keratansulfatketten und 60-70 O-glykosidisch sowie 6-8 N-glykosidisch gebundene Oligosaccharidketten substituiert (Smith, 1999) (Abb. 1.3). Durch die Proteolyse von Aggrekan unter pathologischen Bedingungen wie beispielweise bei der Osteoarthritis gehen die für die biomechanischen Eigenschaften verantwortlichen Chondroitin- bzw. Keratansulfatketten verloren und dies ist am nachteiligsten für die Knorpelfunktion.



**Abb. 1.3: Aufbau des Aggrekan-Proteins**

Aggrekan besteht aus drei globulären Domänen, zwei N-terminal (G1 und G2) und eine C-terminal (G3). Die dazwischen liegenden Regionen werden als Interglobuläre Domäne 1 bzw. 2 bezeichnet (IGD1, IGD2). Über die G1-Domäne erfolgt die Bindung an die Hyaluronsäure. Die IGD2 Domäne ist mit zahlreichen wasserbindenden Glykosaminoglykanen wie dem Chondroitin (CS)- und Keratansulfat (KS) besetzt. Dadurch verleiht das Aggrekan dem Knorpel durch seine hohe Wasserbindungskapazität Elastizität und durch die Einbindung in das Kollagenfasernetz Reißfestigkeit. [modifiziert nach Hardingham *et al.*, 1992]

## 1.3 Erkrankungen des Knorpel/Knochenapparates

### 1.3.1 Osteoarthrose

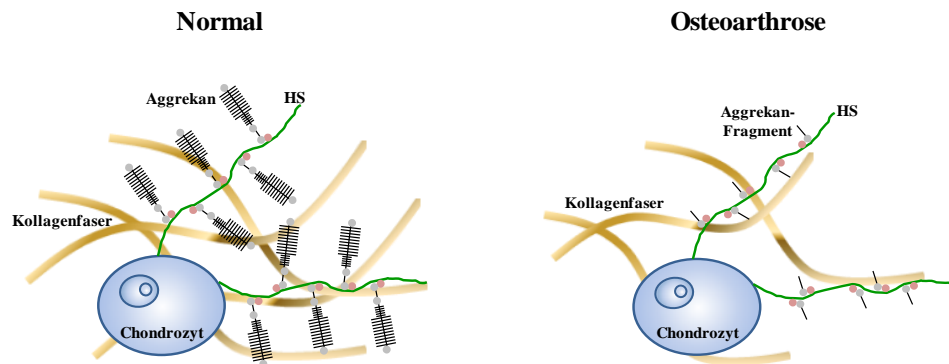
Osteoarthrose (OA) ist eine weltweit verbreitete, progressiv verlaufende Erkrankung charakterisiert durch die Degeneration des artikulären Knorpels, aber auch das komplette Gelenk, einschließlich Synovialmembran, Gelenkkapsel, subchondralem Knochen, Bänder und periartikulärer Muskel sind betroffen (Brandt *et al.*, 2006). Die überwiegende Mehrheit der Personen über 65 Jahren zeigen radiologische und/oder klinische Anzeichen einer Osteoarthrose. Die meist frequentierten Gelenke sind die Knie-, Hüft-, Handgelenke sowie das Rückgrat, wobei die beiden erst genannten aufgrund ihrer gewichtstragenden Eigenschaften die am häufigsten betroffenen Gelenke sind. Die Symptome der OA sind assoziiert mit Entzündung einschließlich Schmerzen, Steifheit und Verlust der Mobilität. All dies führt zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Lebensqualität (Felson, 2006; Goldring *et al.*, 2007). Die Ursachen der Osteoarthrose sind multifaktoriell. Die Progression der Erkrankung wird beeinträchtigt durch Gelenkinstabilitäten, Übergewicht, zunehmendes Alter, assoziierte intraartikuläre Kristallablagerungen sowie Muskeler schlaffungen (Goldring *et al.*, 2007). Epidemiologische Studien, Zwilling- und Familienuntersuchungen zeigten, dass die hereditäre Prädisposition ebenfalls einen Risikofaktor der OA darstellt. Beispielsweise zeigen Zwillingstudien, dass der genetische Einfluss der Osteoarthrose bei fast 70% liegt. Genomweite Kopplungs-Analysen zeigten, dass Polymorphismen wie auch Mutationen in Extrazelluläre Matrix kodierenden Genen die Prädisposition einer Osteoarthrose bedingen (Valdes *et al.*, 2007). Bukulmez und Kollegen konnten 2006 zeigen, dass auch geschlechtsspezifische Faktoren die genetische Ursache der Osteoarthrose beeinflussen können.

Ätiologisch kann die Osteoarthrose in zwei Klassen eingeteilt werden. Die primäre auch als idiopathisch bezeichnete Osteoarthrose ist die erst im Alter auftretende Krankheitsform ohne klar ersichtliche Prädisposition, während die sekundäre Form in relativ jungen Jahren entsteht und eindeutig identifizierbare Ursachen wie beispielsweise Entwicklungs-Abnormalitäten wie Achsenfehlstellungen der Gelenke oder schwerwiegende Verletzungen aufweist (Rowan, 2001; Loughlin, 2005).

Normaler artikulärer Knorpel besteht aus Kollagen Typ II-Netzwerk, in das Proteoglykane über Hyaluronsäure gebunden, eingebettet sind. Die Proteoglykane verleihen dem Knorpel aufgrund ihrer Wasserbindungskapazität Elastizität. Es herrscht ein Gleichgewicht zwischen Degradation und Neusynthese der extrazellulären Matrixkomponenten durch die



Chondrozyten (Hedbom *et al.*, 2002). In osteoarthrotischem Knorpel sind die meisten Proteoglykane fragmentiert. Dies führt zu einem erhöhten mechanischen Stress auf das Kollagenetzwerk, welches ebenfalls degradiert (Abb. 1.4). Die Chondrozyten, der einzige Zelltyp im artikulären Knorpel, sind sehr anfällig für mechanische Stimulationen und spielen im Pathogeneseprozess der OA eine wichtige Rolle (Aigner *et al.*, 2002).

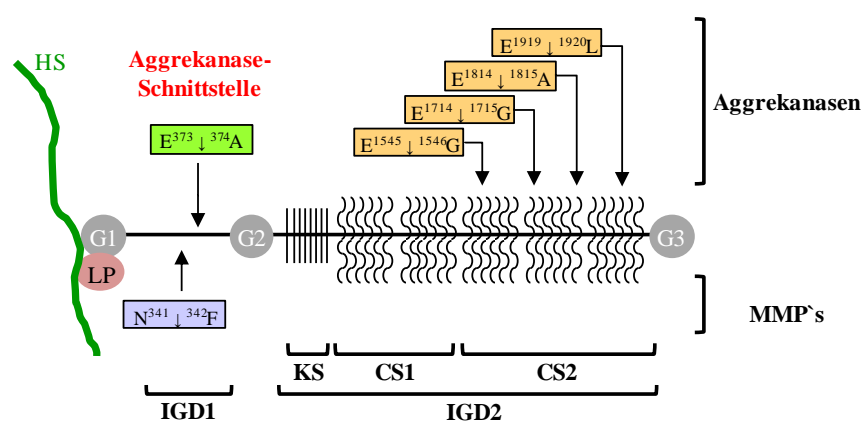


**Abb. 1.4: Vereinfachte Darstellung der Extrazellulären Matrix von gesundem und arthrotischem Knorpel**  
Dargestellt ist schematisch ein Ausschnitt der Extrazellulären Matrix von normalem und arthrotischem Knorpel. Die Aggrekan-Aggregate, bestehend aus mehreren Aggrekan-Monomeren gebunden an Hyaluronsäure (HS), formen stabile Komplexe. Diese sind in das Kollagen-Netzwerk eingebunden. Durch die Glykosaminoglykane (GAG`s) und der Einbettung in das Kollagenetzwerk verleihen sie dem Knorpel Elastizität und Reißfestigkeit. Werden diese GAG`s im arthrotischen Knorpel durch Aggrekanasen abgespalten, gehen die biomechanischen Eigenschaften verloren und der Knorpel wird anfälliger für Stöße und Risse.

Durch die anormale mechanische Belastung sowie durch Synovial-Entzündungen kommt es zu einer Dysregulation der Chondrozytenfunktion, was zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen anabolen und katabolen Prozessen zugunsten des Katabolismus führt. Initial kommt es an der Knorpeloberfläche zu einem Verlust der Proteoglykane und Typ II Kollagene. Dies führt zu einer gesteigerten Wasseraufnahme, was eine geringere Zugfestigkeit des Knorpels bedingt. Des Weiteren dringt durch kleinere Risse die Synovialflüssigkeit bis zu den Chondrozyten vor, die als Folge dessen zum einen versuchen durch eine gesteigerte Synthese den Verlust zu kompensieren (Aigner *et al.*, 2002; Poole *et al.*, 2007). Zum anderen kommt es zu einer gesteigerten Cathepsin B-Freisetzung, was eine Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen zur Folge hat. Im weiteren Verlauf wird die *Aggrekan-* und *Kollagen Typ II*-Expression unterdrückt mit nachfolgendem quantitativem Verlust der beiden Moleküle. Dies wiederum führt zu einem erhöhtem mechanischen Stress auf das Kollagen-Netzwerk, was in Folge die weitere Zerstörung des Knorpels und einen weiteren Verlust der Proteoglykane bedingt.

Zusätzlich kommt es durch eine entzündliche Reaktion zu Beginn der Osteoarthritis zur Freisetzung inflammatorischer Mediatoren, die sich durch Veränderung des Chondrozyten-Metabolismus auf die komplette Matrixhomöostase auswirken können. Das Hauptaugenmerk wird hier auf das proinflammatorische Cytokin IL-1 $\beta$  gelegt, aber auch TNF- $\alpha$ , Oncostatin M (*OSM*), IL-6, *leukemia inhibitory factor (LIF)*, IL-17 und IL-18 sind am Pathogeneseprozess der Osteoarthritis beteiligt.

Ein weiteres wichtiges Charakteristikum der Osteoarthritis ist die verstärkte Degradation des Proteoglykans Aggrecan, was mit einer gesteigerten Produktion von Matrix-Metalloproteasen und Aggrecanasen, insbesondere ADAMTS5 assoziiert ist (Cawston und Wilson, 2006; Plaas *et al.*, 2007; Little *et al.*, 2007). Der überwiegende Teil der Aggrecanfragmente entsteht über die Spaltung durch Aggrecanasen. Jedoch auch die Matrixmetalloproteinasen (MMP's) sind an der Proteolyse beteiligt, allerdings erst in späten Stadien der Erkrankung und auch anderer Stelle im Molekül (Chambers *et al.*, 2001; Struglics *et al.*, 2006). Sandy und Kollegen konnten 2001 durch Analysen mit spezifischen Antikörpern zeigen, dass in frühen Stadien der Erkrankung überwiegend durch Aggrecanasen bedingte Aggrecan-Fragmente entstehen und diesen Enzymen bei der frühen Osteoarthritis eine wichtige Rolle zukommt. Die spezifische Spaltung durch die Aggrecanasen an Stelle E<sup>373</sup>↓<sup>374</sup>A des Aggrecan-Moleküls verursacht, obwohl dies nicht die präferentielle Schnittstelle ist (Tortorella *et al.*, 2000 und 2002; Porter *et al.*, 2005), doch den meisten Schaden, da der größte Teil des Aggrecans verloren geht (Abb. 1.5). Blockierung dieser sogenannten Aggrecanase-Schnittstelle alleine schützt vor Knorpelerosionen und aktiviert sogar Knorpelreparaturmechanismen (Little *et al.*, 2007).



**Abb. 1.5: Schematische Darstellung eines Aggrecan-Moleküls mit Schnittstellen von MMP's und Aggrecanasen [modifiziert nach Little *et al.*, 2007]**

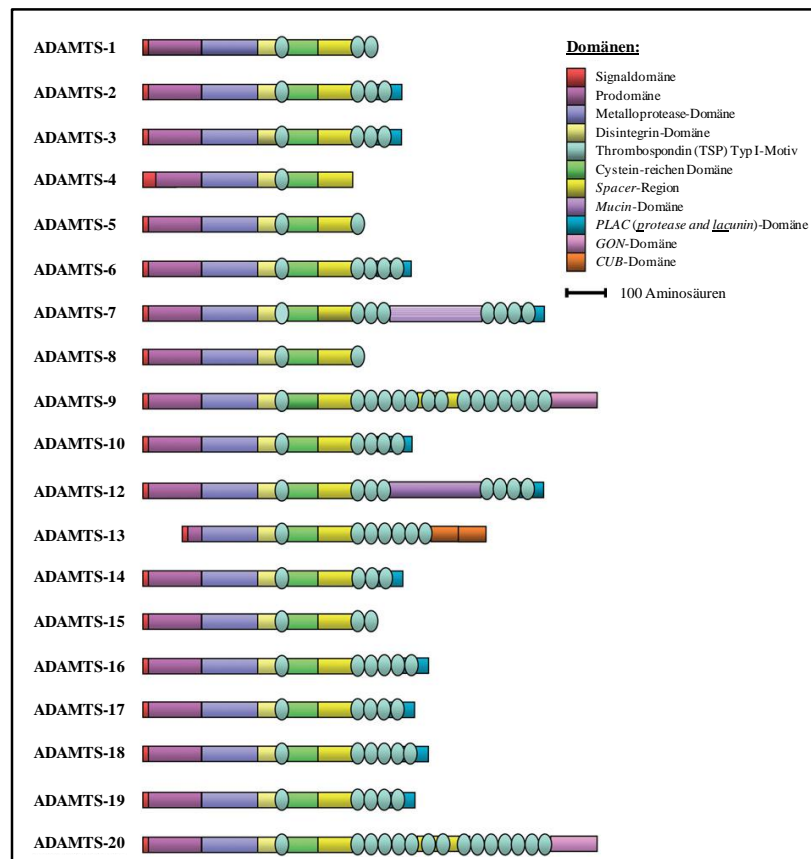
Ein Aggrecan-Molekül, bestehend aus drei globulären und zwei Interglobulären Domänen, ist über ein Linkprotein (LP) mit der Hyaluronsäure (HS) verbunden, welche wiederum mit dem Chondrozyten assoziiert ist. Durch Spaltung des Moleküls an der sogenannten **Aggrecanase-Schnittstelle** E<sup>373</sup>↓<sup>374</sup>A gehen die an der IGD2 gebundenen Sulfate verloren. Auch MMP's spalten Aggrecan in der IGD1, jedoch erst in späten Stadien der Erkrankung. Spaltungen an C-Terminal gelegenen Stellen erhalten teilweise die wichtigen Glykosaminoglykane und verursachen dadurch einen geringeren Schaden.

Aggrekanasen gehören zur ADAMTS (*a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs*)-Familie, eine Gruppe löslicher Proteine, welche insgesamt 19 Gene umfasst. Aufgrund der Ähnlichkeit der Metalloprotease-Domäne bilden die ADAMTS eine Untergruppe der 1995 erstmals beschriebenen ADAM (*a disintegrin and metalloprotease*)-Proteine, die wiederum neben den MMPs, Reprolysinen, Serralysinen und Astacinen zur Superfamilie der zinkabhängigen Metalloproteasen, den Metzincinen, gehört (Wolfsberg *et al.*, 1995; Mullberg *et al.*, 2000; Porter *et al.*, 2005).

Die als inaktives Zymogen vorliegenden ADAMTS-Proteine weisen eine gemeinsame Domänen-Struktur auf: (I) eine N-terminale Signal-Domäne, (II) eine Prodomäne, (III) eine katalytische Metalloprotease-Domäne mit Zinkbinde-Motiv vom Reprolysin Typ (HEXXHXXG/N/SXXHD), (IV) eine Disintegrin-ähnliche Domäne, (V) einem zentralen Thrombospondin (TSP) Typ I-Motiv, (VI) eine Cystein-reichen Domäne bestehend aus 10 konservierten Cystein-Resten, (VII) eine *Spacer*-Region variabler Länge ohne charakteristische strukturelle Eigenschaft und (VIII) eine variable Anzahl C-terminaler TSP Typ I-Motive (Porter *et al.*, 2005). Einige ADAMTS weisen C-Terminal weitere Module auf, wie beispielweise ADAMTS7 und ADAMTS12 eine *Mucin*-Domäne, ADAMTS20 eine sogenannte *GON* (zuerst in *gon-1* bei *C. elegans* beschrieben)-Domäne (Blelloch *et al.*, 1999), ADAMTS13 zwei *CUB* (*complement subcomponent Clr/Clf/embryonic sea urchin protein Uegf (urchin epidermal growth factor)/bone morphogenic protein 1*) Domänen (Zheng *et al.*, 2001) oder auch ADAMTS-2, -3, -10, -12, -14, -17 und -19 eine sogenannte *PLAC* (*protease and lacunin*)-Domäne (Nardi *et al.*, 1999; Cal *et al.*, 2001; Engle *et al.*, 2001).

Zur Aktivierung der ADAMTS-Proteine wird am N-terminalen Ende meist durch Furin die Prodomäne abgespalten, bei manchen Mitgliedern der Familie kommt es zusätzlich noch zu einer C-Terminalen Prozessierung. Diese ist für ADAMTS-1, -4, -8, -9 und -12 beschrieben, wobei die bestuntersuchtesten Daten für ADAMTS-1 und -4 vorliegen. Die C-Terminale Spaltung erfolgt innerhalb der *Spacer*-Region und im Falle von ADAMTS-12 innerhalb der *Mucin*-Domäne (Porter *et al.*, 2005).

In nachfolgender Abbildung 1.6 ist die Domänenstruktur der ADAMTS-Proteine dargestellt.



**Abb. 1.6: Domänenstruktur der ADAMTS-Proteine**

Abgebildet sind verschiedenen ADAMTS-Proteine (bei Proteinen mit variierenden Isoformen wurde die längste Isoform dargestellt). Die Thrombospondin Typ 1 Motive sind in ovalen Kreisen abgebildet. [nach Porter et al 2005]

Bei der Proteolyse der Interglobulären Domäne des Proteoglykans Aggrecan gehen die für die biomechanischen Eigenschaften verantwortlichen Chondroitin- bzw. Keratansulfatketten verloren. Hauptverantwortlich für diese Proteolyse sind die Aggrecanasen. Diese spalten das Aggrecan an der charakteristischen Aggrecanase-Schnittstelle  $E^{373} \downarrow^{374} A$ , sowie an vier weiteren spezifischen Stellen in der Chondroitinreichen Interglobulären Domäne 2 (IGD2) (East *et al.*, 2007). Matrix-Metalloproteasen spalten ebenfalls Aggrecan an sechs verschiedenen Stellen, jedoch liegt die Hauptschnittstelle an Position  $N^{341} \downarrow^{342} F$  (Nagase *et al.*, 2003), sodass beispielsweise mit Hilfe spezifisch generierter Antikörper aufgrund der verschiedenen Spaltstellen unterschieden werden kann, durch welche Protease das Aggrecan gespalten wurde. Spaltprodukte, die durch die Spaltung an der Aggrecanase-Schnittstelle entstanden, konnten in der Synovialflüssigkeit von Osteoarthritis-Patienten in frühen Krankheitsstadien nachgewiesen werden, sodass nahe lag, dass den Aggrecanasen eine relevante Rolle in der Degradation und folglich dem Verlust von Aggrecan in osteoarthrotischem Knorpel zukommt. Die beiden Hauptaggrecanasen sind ADAMTS-4 (Aggrecanase-1) und ADAMTS-5 (Aggrecanase-2), die effizientesten Aggrecanasen, aber

auch ADAMTS-1, -8, -9, -15, -16 und -18 weisen eine schwache Proteaseaktivität gegenüber Aggrecan auf (East *et al.*, 2007; Fosang *et al.*, 2008a; Fosang *et al.*, 2008b). Im Jahre 2005 konnten Glasson *et al.* und Stanton *et al.* an *knock-out*-Mausmodellen zeigen, dass ADAMTS-5-defiziente Mäuse einen Schutz vor Knorpelerosionen zeigten, während dies bei ADAMTS-4-defizienten Mäusen nicht der Fall war. So rückte ADAMTS-5 als primäre Aggrecanase verantwortlich für die Aggrecan-Degradation im Osteoarthrose-Mausmodell in den Vordergrund. Allerdings zeigten *in vitro* Studien, dass auch ADAMTS-4 eine nicht unerhebliche Rolle in der Aggrecanolyse spielt (Tortorella *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2007; Powell *et al.*, 2007). Zurzeit ist nach wie vor nicht genau geklärt, welche der beiden Proteasen die Haupt-Aggrecanase darstellt oder ob möglicherweise beide an der Aggrecanolyse beteiligt sind.

Dennoch kristallisiert sich durch die verschiedenen Experimente eindeutig heraus, dass die Inhibition der Aggrecanolyse ein vielversprechender Ansatzpunkt für mögliche Osteoarthrose-Therapien darstellt, insbesondere die Inhibition der beiden Aggrecanasen ADAMTS-4 und ADAMTS-5. Die Generierung eines *in vitro*- als auch *in vivo*-Modells, bei dem gezielt eine der beiden Aggrecanasen überexprimiert wird, kann einerseits zur weiteren Aufklärung dienen, wie groß die Relevanz dieser Protease im Pathogeneseprozess der Osteoarthrose ist. Andererseits können aber auch bereits bekannte als auch neue Inhibitoren ausgetestet werden. Im Gegensatz zu den bereits bestehenden Modellen kann weiterhin bei diesem Modell der Simulierung einer Osteoarthrose noch untersucht werden, bis zu welchem Zeitpunkt das Ungleichgewicht zwischen katabolen und anabolen Prozessen vom Knorpel toleriert wird. Durch eine initiale Überexpression kann eine initiale Schädigung verursacht werden und der potentielle Selbstheilungsprozess des Knorpels analysiert werden.

### 1.3.2 Wachstumsstörungen

Die Entstehung des menschlichen Skeletts ist ein hochkomplexer, mehrstufiger Prozess, bei dem Störungen in jedem einzelnen Entwicklungsschritt zu ganz unterschiedlichen Krankheitsbildern führen. Verschiedene Signalwege, unter anderem der FGF (*Fibroblast Growth Factor*)-, der TGF $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* )-, der BMP (*Bone Morphogenic Protein*)-, der WNT (*Wingless*)-, der NOTCH- als auch der Hedgehog-Signalweg, sind dabei essentiell für die Skelettentwicklung, häufig liegen den verschiedenen Krankheitsbildern Dysregulationen der Signalwege zugrunde (Baldrige *et al.*, 2010).

Im Jahre 1997 wurde von einer internationalen Arbeitsgruppe für konstitutionelle Skeletterkrankungen die *International nomenclature and classification of the*

*osteochondrodysplasias* vorgelegt, welche 2001 aktualisiert wurde (Hall, 2001), um die Vielzahl der verschiedenen Krankheitsbilder nach klinischen, molekularpathogenetischen, sowie radiologischen Kriterien systematisch einzuteilen. Die 2006 von Superti-Furga und Kollegen neu etablierte Nosologie und Klassifizierung der Skelettdysplasien fasste die ca. 370 verschiedenen Krankheitsbilder aufgrund molekularer, biochemischer und/oder radiologischen Kriterien in 37 verschiedene Gruppen zusammen (Superti-Furga, Unger *et al.*, 2007).

Die konstitutionellen Störungen des Skelettsystems werden formal in Dysostosen und Osteochondrodysplasien untergliedert. Dysostosen sind Organdefekte umschriebener Skelettelemente und resultieren aus einem gestörten Mechanismus der frühen Skelettentwicklung (Zellinduktion, Proliferation, Differenzierung, Kondensation, Apoptose) (Spranger, 1997; Zelzer *et al.*, 2003). Sie werden in drei Subgruppen eingeteilt: (1) mit überwiegend kraniofazialer Beteiligung, (2) mit überwiegender Beteiligung des Achsenskelett und (3) mit überwiegender Beteiligung der Extremitäten. Die zweite Gruppe, die Osteochondrodysplasien, werden untergliedert in die mit Abstand größte Subgruppe der Dysplasien, dem entsprechen Abweichungen im Knochen- bzw. Knorpelwachstum, sowie in die Subgruppe der Osteodystrophien, dem entsprechen Störungen der Knochen- bzw. Knorpeltextur. Die Dysplasien werden hervorgerufen durch Störungen der Zellproliferation und -differenzierung sowie Defekte der Zellfunktion, welche die Entwicklung und das Wachstum der meisten Skelettelemente beeinflussen (Spranger, 1997, Zelzer *et al.*, 2003). Während bei den Dysostosen aufgrund der Störung in der frühen Skelettentwicklung ein statisches Bild der Ausprägung vorliegt, kann bei den Dysplasien aufgrund der verschiedenen Expression der beteiligten Gene die phänotypische Ausprägung variieren.

Dysplasien, die aus einer defekten Zellfunktion resultieren, basieren auf pathogenen Mutationen in Genen, die für Proteine der Matrixbildung, -Homöostase sowie deren Substrattransport kodieren. Hier sind beispielsweise die Mukopolysaccharidosen, die Diatrophische Dysplasie oder auch die Kollagenopathien zu nennen. Letztere werden durch Mutationen in den *Kollagen*-Genen *Typ I, II, III, IX, X* und *XI* verursacht. Beispielsweise führen Mutationen im *COL10A1*-Gen zu der autosomal-dominant verlaufenden Chondrodysplasie Typ Schmid. Die rund zehn autosomal-dominanten Krankheitsbilder basierend auf pathologischen Veränderungen im *COL2A1*-Gen bilden nach der Klassifizierung von 2006 eine eigene Gruppe. Hierunter fallen beispielsweise das Stickler Syndrom Typ 1, die Kniest Dysplasie oder auch die Spondyloepiphyshäre Dysplasie congenita (SEDC).

Zu den durch Störungen der Zellproliferation und -differenzierung verursachten Dysplasien zählt die Gruppe der *FGFR3*-assoziierten Erkrankungen. Mutationen im *Fibroblasten-Wachstumsfaktor Rezeptor 3 (FGFR3)* bedingen unter anderem das autosomal-dominante Krankheitsbild der Achondroplasie (ACH), das mit einer Frequenz von 1:15000-16000 die häufigste Form der genetisch bedingten Skeletterkrankung darstellt, der Hypochondroplasie (HCH) als leichtere bzw. der Thanatophoren Dysplasie Typ I und II (TD I, TD II) als schwerere Erkrankungsvariante, sowie der *Severe Achondroplasia with Developmental Delay and Acanthosis Nigricans (SADDAN)* (Zabel., 2004; Superti-Furga, Unger *et al.*, 2007; Harada 2009). Die gemeinsamen Hauptsymptome, bei den verschiedenen Krankheitsbildern variabel ausgeprägt, sind der disproportionierte Kleinwuchs mit rhizomel verkürzten Extremitäten. Das CATSHL (*camptodactyly, tall stature, and hearing loss*)-Syndrom ist ebenfalls verursacht durch eine Mutation im *FGFR3*-Gen, nur hier kommt es durch die Mutation nicht zu einer überschießenden Tyrosinkinase-Aktivität wie beispielsweise bei der Achondroplasie, sondern die Tyrosinkinase-Domäne des Rezeptors wird durch die Mutation zerstört, sodass der hemmende Einfluss wegfällt (Baldrige *et al.*, 2010).

*FGFR3* gehört neben *FGFR1*, -2 und -4 zur Familie der membranassoziierten Rezeptor-Tyrosinkinasen, die die intrazelluläre Signalweiterleitung von mindestens 21 Liganden übertragen und spielt eine entscheidende Rolle als negativer Regulator des Knochenwachstums (Deng *et al.*, 1996; De Luca *et al.*, 1999; Harada, 2009). Die Rezeptoren sind strukturell ähnlich aufgebaut und weisen drei extrazellulär gelegene Immunglobulin(Ig)-ähnliche Domänen (IgI, IgII, IgIII), eine Transmembran- (TM) sowie eine zweigeteilte, intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne (TK1 und TK2) auf.

Eine besondere Eigenschaft der *FGFRs* ist die Existenz von Isoformen, die durch alternatives Spleißen in der dritten Immunglobulin-Domäne entstehen. Diese Domäne ist kodiert durch zwei Exons, wobei das zweite alternativ gespleißt wird. Dadurch ergeben sich die beiden Isoformen IIIb (Exon 7 und Exon 8) beziehungsweise IIIc (Exon 7 und Exon 9). Alle *FGFRs* außer *FGFR4* weisen alternatives Spleißen auf. Durch die verschiedenen Isoformen variieren die Spezifitäten. Beispielsweise wird Isoform IIIb von *FGFR2* als auch *FGFR3* in Zellen epithelialer, Isoform IIIc in Zellen mesenchymaler Herkunft exprimiert (Murgue *et al.*, 1994; Kannan *et al.*, 2000, Martinez-Frias *et al.*, 2010).

Inaktiv liegen die Rezeptoren als Monomer vor. Nur nach spezifischer Bindung der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGFs) zusammen mit Heparansulfat-Proteoglykanen an die IgII-Domäne, die Bindestelle der FGFs, kommt es zur Dimerisierung von zwei *FGFR*-Molekülen. Die Tyrosinkinase 1-Domäne phosphoryliert die Tyrosinkinase 2-Domäne des

anderen Rezeptors. Diese Autophosphorylierung löst die Aktivierung der FGFR-Signaltransduktionskaskaden aus, was die Weiterleitung des Signals in den Zellkern initiiert (Zabel 2004; Harada 2009).

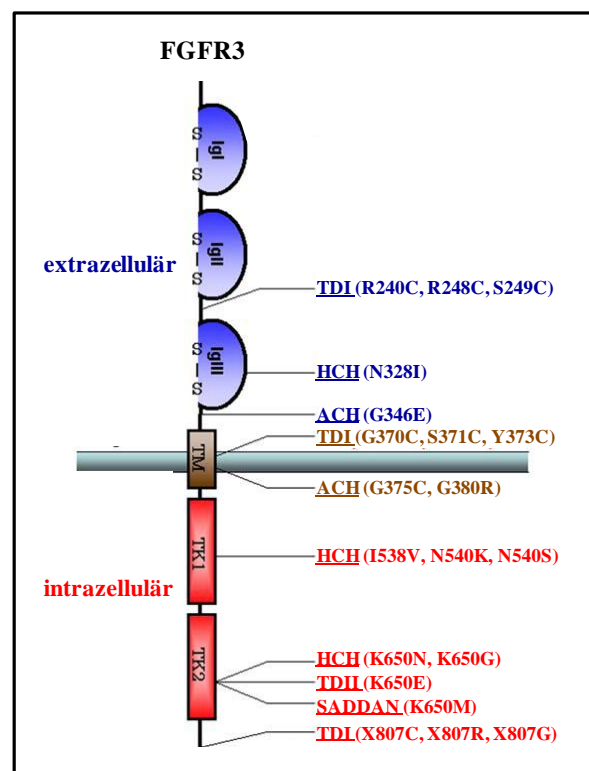
Liegen beispielsweise aktivierende Mutationen im *FGFR3*-Gen vor, führt die daraus resultierte Konformationsänderung zu einer konstitutiven, ligandenunabhängigen Aktivierung des Rezeptors. Daraus folgernd ergibt sich eine dauerhafte Inhibition des Knochenwachstums, was das Krankheitsbild des Kleinwuchses bedingt. Je nach Art und Lokalisation der aktivierenden Mutation im *FGFR3*-Gen zeigen sich unterschiedliche klinische Krankheitsbilder. Der zugrunde liegende Defekt ist bei allen eine Störung der normalen, regulierten Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten, welche während der Skelettentwicklung in den Wachstumsfugen der Röhrenknochen stattfindet (Webster und Donoghue, 1997). Bei der für die Achondroplasie typischen Mutation G380R kommt es zum Beispiel zu einer ligandenunabhängigen Dimerisierung und Autophosphorylierung durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Arginin-Seitenkette des mutierten Rezeptor- und der Carboxylgruppe des Wildtyp-Rezeptor-Moleküls. Die verschiedenen Thanatophore Dysplasie Typ I-Mutationen werden in zwei Gruppen eingeteilt. Mutationen in der extrazellulären Domäne, die zu einem Aminosäureaustausch zu schwefelhaltigem Cystein führen. Dies bewirkt eine Dimerisierung zweier Rezeptoren über Disulfidbrückenbindungen. Die zweite Gruppe der Mutationen betrifft das Stopkodon. Hierdurch kommt es zu einer Verlängerung des Proteins um 141 Aminosäuren (Brodie *et al.*, 1999; Harada, 2009). Die einzige Mutation für das sehr schwere Krankheitsbild der Thanatophoren Dysplasie Typ II ist die Mutation K650E. Diese Veränderung scheint die mit der Autophosphorylierung einhergehenden, aktivierenden Konformationsänderung zu imitieren, was zur Kinaseaktivierung des Rezeptors ohne eine Dimerisierung führt. Webster und Kollegen konnten zeigen, dass der Austausch an Position 650 durch andere Aminosäuren ebenfalls eine Kinaseaktivität hervorruft, jedoch unterschiedlich stark. Mutationen, die das klinische Bild der Hypochondroplasie verursachen, liegen sowohl extra- als auch intrazellulär. Hier ist ebenfalls die Aminosäureposition K650 betroffen, allerdings kommt es durch die Mutationen K650N und K650G zu einer geringeren Autophosphorylierung, was den milden Phänotyp der Erkrankung erklärt (Webster und Donoghue, 1997; L'Hote *et al.*, 2005; Horton, 2007).

Zusätzlich spielt der Mechanismus der Ubiquitylierung und der Rezeptordegradation eine Rolle in der durch die Mutationen hervorgerufenen, ligandenunabhängigen Kinaseaktivität. Unter physiologischen Bedingungen wird die Degradation der aktivierten FGF-Rezeptoren



nach Dimerisierung und Autophosphorylierung über die E3 Ubiquitin Ligase Cbl (*Casitas B-lineage Lymphoma*) gesteuert. Mutierte Rezeptoren weisen eine gestörte Cbl-vermittelte Ubiquitinylierung auf, was zu einer gestörten Degradation und folglich durch vermehrtes Recycling zu einer Akkumulation des aktivierten Rezeptors führt. Die gestörte Ubiquitinylierung scheint mit dem Umfang der gesteigerten Kinaseaktivität, verursacht durch die Mutation, zu korrelieren. Zum Beispiel geht eine moderate Kinaseaktivität mit einem moderaten Ubiquitinylierungsdefekt bei der ACH-Mutation und bei TD-Mutationen eine ausgeprägte Kinaseaktivität mit einem ausgeprägten Ubiquitinylierungsdefekt einher (Monsonigo-Ornan *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2004; Horton, 2007; Guo *et al.*, 2008). Dieser zusätzliche Wirkmechanismus trägt ebenfalls zur Verstärkung des durch die Mutationen hervorgerufenen, ligandenunabhängigen Rezeptorsignals bei.

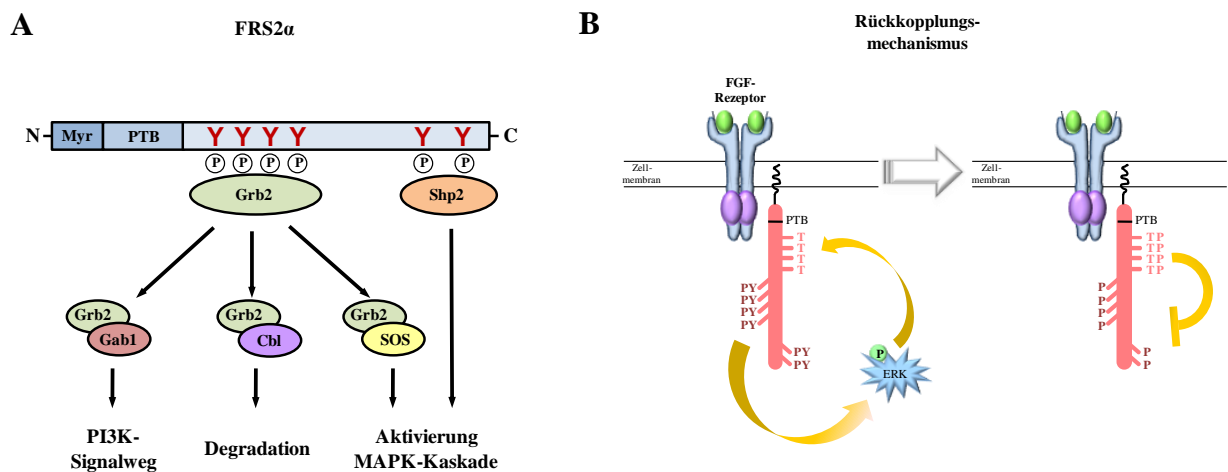
Nachfolgende Abbildung zeigt schematisch den Aufbau des FGFR3-Moleküls und die Lokalisation einer Reihe von typischen *FGFR3*-Mutationen mit ihren assoziierten Krankheitsbildern.



**Abb 1.7: Schematische Darstellung des FGFR3-Moleküls mit den verschiedenen Mutationen**

Das FGFR3-Molekül besteht aus drei extrazellulär gelegenen Immunglobulin(Ig)-ähnlichen Domänen (**IgI**, **IgII**, **IgIII**), einer Transmembran- (TM) und einer intrazellulären, zweigeteilten Tyrosinkinase-Domäne (**TK1** und **TK2**). In fast allen Fällen der Achondroplasie (**ACH**) sind die Mutationen in der Transmembran-Domäne lokalisiert, nur in einigen wenigen Fällen sind Mutationen in unmittelbarer Nachbarschaft beschrieben worden (Zabel *et al.*, 2004). Mutationen bei der Thanatophoren Dysplasie Typ II (**TDII**) und der *Servere Achondroplasia with Developmental Delay and Acanthosis Nigricans* (**SADDAN**) sind nur als K650-Veränderungen, K650E und K650M, beschrieben. Mutationen bei der Thanatophoren Dysplasie Typ I (**TDI**) finden sich in der Ig- und der Transmembrandomäne sowie im Stopkodon. Mutationen bei der milden Hypochondroplasie (**HCH**) sind sowohl extrazellulär in der Ig- als auch intrazellulär in den beiden Tyrosinkinase-Domänen lokalisiert. [modifiziert nach Harada *et al.*, 2009]

Die Signalweiterleitung über den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 3 erfolgt über mehrere Signalkaskaden: 1) den *mitogen activated protein kinase* (MAPK)-, 2) den *signal transducer and activator of transcription* (STAT), 3) den Phospholipase-C $\gamma$ /Proteinkinase C (PKC)- und 4) den Phosphatidylinositol-3- Kinase (PI3K)/AKT-Signalweg (Harada *et al.*, 2009, Baldrige *et al.*, 2010). Von diesen vier Kaskaden sind die ersten beiden die relevantesten (Lievens *et al.*, 2004; Murakami *et al.*, 2004; Horton, 2007; Martinez-Frias *et al.*, 2010). Der Signalweg über STAT1 bewirkt die Inhibition der Chondrozytenproliferation, über die MAPK-Kaskade erfolgt die Inhibition der Chondrozytendifferenzierung (Sahni *et al.*, 1999; Murakami *et al.*, 2004; L'Hote *et al.*, 2005; Martinez-Frias *et al.*, 2010). Eine Schlüsselrolle bei der Signalweiterleitung spielt das Membrangebundene Protein FRS2 $\alpha$  (FGF Receptor Substrat 2  $\alpha$ ) (Kouhara *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1998; Hadari *et al.*, 2001). Dieses Protein besitzt N-Terminal Myristylierungsstellen zur Lokalisation an der Plasmamembran und PTB (Phosphotyrosin-bindende)-Domänen zur Bindung der Rezeptortyrosinkinase. Nach Aktivierung werden die Tyrosinreste von FRS2 $\alpha$  phosphoryliert. Dies wiederum führt zur Bindung an Grb2 (Growth factor receptor bound Protein 2), ein weiteres SH(*Src* *homology*) $_2$ -Domänen enthaltendes Adaptermolekül, und an Shp2, eine Tyrosinphosphatase. Grb2 hat über seine SH3-Domänen wiederum weitere Proteine gebunden, SOS (*Son of Sevenless*), Cbl (*Casitas B-lineage Lymphoma*) und Gab1 (*GRB2-associated binding protein 1*). SOS ist ein Guanin Nukleotid Exchange Faktor (GEF) für Ras und die FRS2 $\alpha$ -vermittelte Rekrutierung des Grb2/SOS-Komplexes führt zur Aktivierung der Ras-MAPK-Kaskade. Die Ubiquitinligase Cbl und der daraus entstehende Dreifachkomplex FRS2 $\alpha$ /Grb2/Cbl navigieren die Ubiquitylierung und die Degradation von FRS2 $\alpha$  und FGFR3. Über die Bindung FRS2 $\alpha$ /Grb2 mit Gab1 erfolgt die Signalweiterleitung über den Phosphatidylinositol-3- Kinase (PI3K)/AKT-Signalweg (Wong *et al.*, 2002; Gotoh, 2008). Durch diese multiplen Funktionen kann FRS2 $\alpha$  wie eine Art Kommandozentrale die Dauer und die Stärke des FGF-Signals steuern (Abb1.8A). Weiterhin wird über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Stärke des Rezeptorsignals über den MAPK-Weg kontrolliert (Abb. 1.8B). Nach Aktivierung von FRS2 $\alpha$  und Weiterleitung des Signals über den Grb2/SOS-Komplex kommt es zur Phosphorylierung von ERK innerhalb der MAPK-Kaskade. Diese wiederum phosphorylieren FRS2 $\alpha$  an mehreren Threoninresten, was zu einer verminderten Thyrosinphosphorylierung führt. So kann über die Schlüsselkomponente FRS2 $\alpha$  eine balancierte Signaltransduktion erfolgen (Lax *et al.*, 2002; Lievens *et al.*, 2006; Gotoh, 2008).



**Abb. 1.8: Schematische Struktur des FRS2 $\alpha$  (FGF Receptor Substrat 2  $\alpha$ )-Proteins und Negativer Rückkopplungsmechanismus über den MAPK-Signalweg**

(A) Die N-Terminus gelegenen Myristylierungsstellen (Myr) und die sich anschließenden PTB (Phosphotyrosin-bindenden)-Domänen dienen der Lokalisation an der Plasmamembran bzw. der Bindung der Rezeptortyrosinkinase. Die Tyrosin („Y“) –phosphorylierten Grb2 (Growth factor receptor bound protein 2)-Bindestellen aktivieren über die Bindung von Gab1 (GRB2-associated binding protein 1) den PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase)-Signalweg und über Bindung mit Cbl (Casitas B-lineage Lymphoma) die Ubiquitinierung und Degradation von FRS2 $\alpha$  und FGFR3. Die Aktivierung der MAPK-Kaskade erfolgt sowohl über die Bindung von Grb2 an SOS (Son of Sevenless) und die damit verbundene Weiterleitung des Signals, wie auch über die Tyrosin-phosphorylierten Shp2-Bindestellen am C-Terminus des Proteins. [modifiziert nach Gotoh, 2008]

(B) Aktivierte FGF-Rezeptoren phosphorylieren die Tyrosinreste („PY“) von FRS2 $\alpha$ . Die Weiterleitung des Signals führt zur Aktivierung von ERK. Dies resultiert wiederum in der Phosphorylierung der Threoninreste („TP“), die die Tyrosin-Phosphorylierung ihrerseits inhibieren. [modifiziert nach Gotoh 2008]

Neben der Schlüsselrolle von FRS2 $\alpha$  und dem Rückkopplungsmechanismus via ERK 1/2 gibt es noch weitere Möglichkeiten der Modulation des FGFR3-Signales. Das am besten untersuchte ist zurzeit die Regulierung über das C-Typ Natriuretische Peptid (CNP) (Schulze, 2005). Die Familie der natriuretischen Peptide umfasst drei strukturverwandte Proteine: das atriale natriuretische Peptid (ANP), das Neurohormon BNP (*brain natriuretic Peptide*) und das C-Typ Natriuretische Peptid (CNP) (Rosenzweig *et al.*, 1991; Nakao *et al.*, 1992a). Ihren biologischen Einfluss erzielen sie durch die Akkumulation von intrazellulärem cGMP (*cyclic Guanosine Monophosphat*) vermittelt durch zwei verschiedene, membrangebundene Guanylyl Cyclase (GC)-gekoppelte Rezeptoren: Guanylyl Cyclase-A (GC-A) für ANP und BNP und Guanylyl Cyclase-B (GC-B) für CNP (Garbers, 1990; Nakao *et al.*, 1992b). Obwohl Natriuretische Peptide auch im Rahmen der Regulierung des Kardiovaskulären Systems wirken, spielt vor allem das C-Typ Natriuretische Peptid (CNP) eine wichtige Rolle in der Regulation der endochondralen Ossifikation (Yasoda *et al.*, 1998; Suda *et al.*, 1998; Chusho *et al.*, 2001, Baldrige *et al.*, 2010). *In vivo* Versuche an CNP-knock-out-Mäusen zeigten durch eine reduzierte Chondrozytenproliferation und Differenzierung verschiedenste Formen von Skelettdysplasien (Miyazawa *et al.*, 2002; Tamura *et al.*, 2004). Homozygote oder

compound-heterozygote Mutationen im humanen *NPR2*-Gen, welches für den Rezeptor von CNP, NPR-B, kodiert, führen zum Krankheitsbild der akromesomelen Dysplasie Typ Maroteaux, eine Erkrankung mit starkem Kleinwuchs und abnormalen Wachstumsfugen sowie Verkürzungen der mittleren und distalen Extremitäten-Segmente (Bartels *et al.*, 2004). Durch die CNP-vermittelte Akkumulation von cGMP kommt es zur Antagonisierung der durch FGFR3 aktivierten MAPK-Kaskade. Durch diese Blockade kann der durch FGFR3 vermittelte inhibitorische Effekt aufgehoben werden (Yasoda *et al.*, 2004; Krejci *et al.*, 2005, Baldrige *et al.*, 2010).

Der komplexe, molekulare Wirkmechanismus des Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptors 3 auf das Knochenwachstum konnte in den letzten Jahren weiter aufgeklärt werden und infolge dessen Ansatzpunkte potenzieller Therapieansätze ausgearbeitet werden. Aber nach wie vor ist der Pathomechanismus nicht vollständig geklärt, beispielsweise das durch die diversen Mutationen veränderte Signalverhalten aber auch die Identifizierung weiterer differentiell regulierter Zielgene von FGFR3.

#### 1.4 Induzierbare Expressionssysteme

In den letzten Jahren wurde die gentechnisch modifizierte Maus ein immer wichtigeres Werkzeug zur funktionellen Klärung medizinischer Fragestellungen. Mit der konventionellen *Knock-out*-Strategie, dem irreversiblen Ausschalten kompletter Gene bzw. spezifischer Sequenzen, konnten bereits wichtige Informationen bezüglich der Genfunktion aufgeklärt werden. Dennoch war diese Methodik durch ihre Irreversibilität der Veränderung limitiert (Bockamp *et al.*, 2002). Durch das Ausschalten eines Genes bereits in der Keimbahn konnte es unter Umständen zu schweren Konsequenzen bei der Entwicklung kommen, was zu einem embryonal letalen Phänotyp führte und die Analyse des ausgeschalteten Gens im adulten Tier unmöglich machte. Aus diesem limitierenden Grund wurden in den letzten Jahren Technologien entwickelt, die diese Problematik umgingen. Die Entwicklung des Cre/LoxP-Systems zur gezielten Entfernung bestimmter DNA-Sequenzen bzw. bestimmter Gene (Lasko *et al.*, 1992; Orban *et al.*, 1992) war ein erster Schritt zur Etablierung konditionaler Tiermodelle. Vor und nach der zu entfernenden DNA-Sequenz werden sogenannte loxP-Stellen eingefügt, die in gleicher Orientierung angeordnet sind. Die Cre-Rekombinase, eine aus Bakteriophagen isolierte und klonierte Rekombinase, bindet an diese spezifischen, sogenannte loxP-Stellen, es kommt zur Rekombination und die durch die loxP-Stellen flankierte, spezifische DNA-Sequenz wird entfernt (Gu *et al.*, 1993). Da nur bei gleichzeitiger Expression von Cre-Rekombinase als auch Zielsequenz eine Rekombination stattfinden kann,

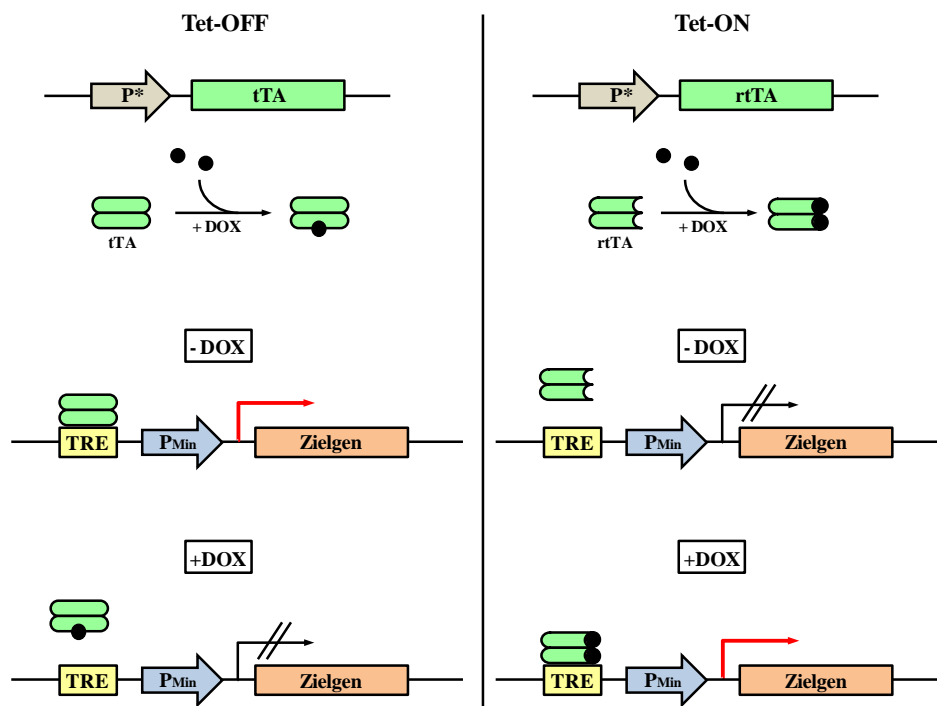
ist durch zelltyp- bzw. gewebsspezifischer Promotoren eine Kontrolle möglich. Aber auch dieses System war irreversibel. Eine weitere Entwicklung stellte die spatiotemporale und **regulierbare** Expression eines Zielgenes dar. Die Gemeinsamkeiten fast aller dieser Systeme sind: 1) Eine Liganden-vermittelte Aktivierung eines transkriptionellen Aktivators, 2) die Bindung des Transaktivators an eine spezifische DNA-Sequenz und 3) die Transaktivator-induzierte Aktivierung des zu regulierenden Zielgenes (Bockamp *et al.*, 2002). Auf ein Mausmodell bezogen bedeutet dies, dass eine Effektormaus, die einen Liganden-induzierbaren Transaktivator transkribiert, mit einer Respondermaus, die das Zielgen nur nach Stimulation durch den Transaktivator exprimiert, verpaart werden muss. Die aus der Verpaarung resultierenden doppeltransgenen Tiere, die beide Kassetten (Effektor- und Responderkassette) tragen, sind in der Lage, das Zielgen konditional zu exprimieren. Durch Entfernen des Liganden wird die Expression des Zielgenes gestoppt, die Expression ist somit reversibel (Bockamp *et al.*, 2002). Mehrere solcher Systeme wurden in den letzten Jahren etabliert. Beispielsweise Modelle auf der Basis von gentechnisch veränderten Hormonrezeptoren (Brasemann *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994; No *et al.*, 1996; Gardner *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999; Zajchowski *et al.*, 2000; Saez *et al.*, 2000). Diese veränderten Hormonrezeptoren, wie zum Beispiel die Steroidhormone Progesteron, Östrogen oder auch das Insektenhormon Ecdyson, dimerisieren nach Stimulation durch einen Liganden, binden an die spezifische DNA-Sequenz und initiieren hierdurch die Transkription des Zielgenes. Eines der bisher erfolgreichsten Systeme zur induzierbaren Genexpression ist das Tetrazyklin (Tet)-regulierte System und wird im Folgenden näher erläutert.

#### 1.4.1 Das Tetrazyklin-regulierte System

Gossen und Bujard entwickelten 1992 den Tetrazyklin (Tet)-abhängigen Transaktivator (tTA), welcher zur Regulation transgener Expression in Säugerzellen verwendet werden kann. Dieses Fusionprotein besteht aus dem Tet-Resistenzoperon (TetR) von *E. coli* und der VP16 Domäne des *Herpes simplex* Virus. Das zu exprimierende Zielgen wird unter die Kontrolle eines synthetischen, transkriptionell inaktiven Minimalpromotors gestellt, dem repetitive Tet-Operator(TetO)-Konsensussequenzen vorgeschaltet sind (**T**etrazyklin-**r**esponsives **E**lement, TRE). Das Tet-System besteht somit aus zwei Komponenten, dem exogen und reversibel induzierbaren Effektor tTA und dem über die TRE-Minimalpromotorkassette gesteuerten Zielgen.

In Abwesenheit von Tetrazyklin (oder dessen Analogon Doxyzyklin) binden tTA-Dimere an die spezifische Konsensussequenz (TRE), es kommt zur Aktivierung des nachgeschalteten

Minimalpromotors und zur Expression des Zielgenes. Zugabe von Tetrazyklin bzw. Doxyzyklin bewirkt eine Konformationsänderung des tTA, wodurch eine Anlagerung an das TRE verhindert und die Genexpression des Zielgenes unterbunden wird (**Tet-OFF-System**). Trotz des beeindruckenden Induktionslevels und der hervorragenden Kinetik, war doch dieses System mit bestimmten Nachteilen behaftet: 1) Tetrazyklin musste kontinuierlich verabreicht werden, d.h. auch bereits während der Embryonalentwicklung und 2) der langsame Abbau des Antibiotikums störte *in vivo* die schnelle Transkriptionsinduktion (Kistner *et al.*, 1996; Rüllicke, 2001). Dies führte zur Entwicklung des reversen Tetrazyklin-abhängigen Transaktivators (rtTA), der im Gegensatz zum tTA nur nach Applikation von Tetrazyklin (Doxyzyklin) an das Tet-responsive Element (TRE) bindet, den nachgeschalteten Minimalpromotor aktiviert und somit das Zielgen exprimiert (Gossen *et al.*, 1995) (**Tet-ON-System**). Bei diesem reversen System konnte die Aktivierungskinetik im Vergleich zum tTA wesentlich beschleunigt werden (Kistner *et al.*, 1996; Hasan *et al.*, 2001). In nachfolgender Abbildung ist die Funktionsweise des Tet-ON/OFF-Systems schematisch dargestellt.



**Abb. 1.9: Funktion des Tetrazyklin-regulierten Systems [Verändert nach Bockamp *et al.*, 2002]**

Durch einen gewebsspezifischen Promotor wird der tTA bzw. der rtTA in dem Gewebe exprimiert, in dem das Zielgen angeschaltet werden soll. Beim **Tet-Off-System** wird in Abwesenheit des Liganden Tetrazyklin bzw. dessen Analogon Doxyzyklin (DOX) die Genexpression induziert. Die tTA-Dimere binden an das Tet-responsive Element (TRE) und über den nachgeschalteten Minimalpromotor (P<sub>Min</sub>) kommt es zur Zielgenexpression. Durch Zugabe von Doxyzyklin wird die Konformation der tTA-Dimere verändert, sodass die Anlagerung an das TRE nicht mehr möglich und die Genexpression blockiert ist. Umgekehrt, beim **Tet-ON-System** sind die rtTA-Dimere ohne Doxyzyklin nicht in der Lage, an das TRE zu binden, das Zielgen wird nicht exprimiert. Erst nach Doxyzyklingabe kommt es durch die dadurch verursachte Konformationsänderung zur Bindung der rtTA-Dimere an das TRE, das Zielgen wird transkribiert.

P\* = gewebsspezifischer Promotor; ● = Doxyzyklin; tTA = Tetrazyklin (Tet)-abhängiger Transaktivator; rtTA = reverser Tetrazyklin (Tet)-abhängiger Transaktivator

Trotz der vorteilhaften Eigenschaften des rtTA's war die Anwendung limitiert, da auch in Abwesenheit des Induktors eine basale Grundaffinität für die TetO-Sequenz bestand. Ein weiterer Nachteil war die geringe Stabilität des Proteins und eine ungenügende Induzierbarkeit durch Tetrazyklin bzw. Doxyzyklin. Um diese limitierenden Eigenschaften ebenfalls noch zu eliminieren, wurden durch Mutationsexperimente fünf weitere rtTA-Proteine entwickelt, unter anderem der in der Arbeit verwendete rtTA2<sup>S</sup>-M2, die neben einer reduzierteren Grundaktivität und gesteigerter Doxyzyklin-Sensitivität auch eine wesentlichere Stabilität aufwiesen (Urlinger *et al.*, 2000).

Überdies hinaus wurden Responderkassetten entwickelt, die eine simultane Expression zweier Zielgene durch eine **bidirektionale** TRE-Minimalpromotor-Einheit ermöglichten. Die kombinierte Expression des Zielgenes mit einem Reportergen, z.B. des Luziferase-Gens, erlaubte eine direkte Visualisierung der gleichzeitigen Expression von Reporter- und Zielgen. Hierdurch war es möglich, den Expressionsstatus des Zielgenes nichtinvasiv zu verfolgen (Hasan *et al.*, 2001; Krestel *et al.*, 2001).

Um aufwendige Kreuzungsexperimente von Effektor- und Respondermäusen zu umgehen, wurden weiterhin Konstrukte generiert, die beide Kassetten mit einem Zwischenfragment zur Vermeidung von Wechselwirkungen, beinhalteten (**bifunktionales** System). Somit konnten zeit- und kostenaufwendige Kreuzungsexperimente umgangen werden (Schultze *et al.*, 1996; Utomo *et al.*, 1999).

Mit Hilfe des Tet-Systems ist es relativ einfach möglich, durch exogene Zugabe des Antibiotikums Tetrazyklin bzw. dessen Analogon Doxyzyklin, das zu untersuchende Zielgen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch entsprechende Promotoren Zelltyp- oder auch gewebsspezifisch zu regulieren und somit seine Funktion in einem spezifischen Zeitfenster oder in einem bestimmten Organ zu analysieren.

## 1.5 Zielsetzung

Wie in den vorangegangenen Kapiteln erläutert, sind Erkrankungen des Knorpel/Knochenapparates, wie beispielsweise die genetisch bedingten Chondrodysplasien, aber auch degenerative Erkrankungen wie die Osteoarthritis, sowohl im physiologischen als auch pathophysiologischen Kontext noch nicht vollständig erforscht.

Entscheidend für den Fortschritt effektiver Therapiekonzepte ist eine detaillierte Aufklärung der pathophysiologischen Wirkmechanismen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch verschiedene experimentelle Ansätze zur Aufklärung zweier unterschiedlicher Erkrankungen des Skelettsapparates beizutragen:

1) Mittels eines *in vivo*-Modells sollte die Theorie überprüft werden, ob eine Osteoarthrose-ähnliche Situation generiert und damit Pathogenesemechanismen dargestellt werden können. Durch eine gezielte Überexpression der Aggrekanase Adamts5 mittels des Tet-ON-Systems im Knorpel der Tiere wäre die Möglichkeit geschaffen, die Folgen dieser Überexpression im Hinblick auf eine Osteoarthrose-ähnliche Situation zu analysiert und somit Rückschlüsse auf die Relevanz dieser Aggrekanase auf den Pathogeneseprozess der **Osteoarthrose** zu ziehen.

Gegenstand der durchzuführenden experimentellen Ansätze war nach Herstellung eines bifunktionalen Konstruktes zunächst die Überprüfung des Konstruktes auf Induzierbarkeit und Funktionalität (Substrattests) der transgenen Aggrekanase *in vitro*. Im Anschluss sollten in Kooperation mit dem Labor von Prof. Dr. Brendan Lee (Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Houston, Texas) transgene Tiere generiert werden, die das transgene *mAdamts5*-Gen regulierbar mittels des Tet-ON-Systems überexprimieren. Nach initialer Charakterisierung (Induzierbarkeit, Knorpelspezifität) der transgenen Tiere sollte im Folgenden überprüft werden, ob durch gezielte Überexpression des Transgens ein verstärkter Aggrekanabbau im Knorpel der Mäuse festzustellen ist, was einer Osteoarthrose-ähnlichen Situation gleichzusetzen wäre, und in wie fern sich dies auf den Knorpel auswirkt. Wäre die Funktionalität des induzierbaren Transgens, sowohl für das *in vitro* als auch das *in vivo* Modell, nachweisbar, könnten beide Modelle zur Optimierung bereits bestehender bzw. Etablierung neuer pharmakologischer Wirkstoffe herangezogen werden.

2) Der zweite Teil der Arbeit widmete sich der Aufklärung **FGFR3-regulierter zellulärer Prozesse**, insbesondere der Identifizierung neuer involvierter Gene. Nach Herstellung der entsprechenden Konstrukte sollten zwei mittels des Tet-ON-Systems regulierbare, stabile Zelllinien generiert werden, die jeweils eine Chondrodysplasie-assoziierte Mutation (Achondroplasie-Mutation G380R, Thanatophore Dysplasie Typ II-Mutation K650E) im *FGFR3*-Gen tragen. Im Folgenden war es nun das Ziel, nach Überprüfung der Induzierbarkeit zunächst das Signalverhalten der beiden Mutanten vergleichend zu analysieren und Rückschlüsse auf eine veränderte Signaltransduktionskaskade sowie eine veränderte Zielgenexpression zu ziehen. Der die stärkste Signalantwort verursachende Zellklon sollte weiterhin für eine Genexpressionsanalyse im Vergleich induziert/nicht induziert mittels *Mikroarray*-Hybridisierung herangezogen werden. Aus dem *Array* hervorgehende, differentiell regulierte Gene, die eine Relevanz im Knorpel/Knochengewebe zeigen, sollten näher untersucht werden, um deren Funktion im Pathogeneseprozess FGFR3-assoziiierter Erkrankungen besser einordnen zu können.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Zelllinien und Zellkulturtechniken

#### 2.1.1 Verwendete Zelllinien

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Zellkultur-Experimente wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet:

- 1) die humane Chondrosarkom-Zelllinie SW1353 der Fa. LGC Promochem/ATCC (American Type Culture Collection, # HTB-94<sup>TM</sup>). Die adhären wachsenden Zellen mit fibroblasten-ähnlicher Morphologie entstammen einem Chondrosarkom zweiten Grades.
- 2) Rattenchondrosarkomzellen (Mukhopadhyay et al., 1995), die einen differenzierten chondrozyten-ähnlichen Phänotyp repräsentieren.

##### 2.1.1.1 Kultivierung der Zelllinien

Die Zellen wurden in 25 cm<sup>2</sup>- bzw. 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Als DMEM-Vollmedium diente DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), dem 10% Tetrazyklin-freies, hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penizillin und 100µg/ml Streptomycin (alles Invitrogen, USA) hinzugefügt war.

Bei einer Klonfluenz der Zellen von 70-80% wurden sie zweimal mit PBS gewaschen, kurz mit 1ml/10cm<sup>2</sup> 1x Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und im Verhältnis 1:3-1:60 neu ausplattiert.

##### 2.1.1.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, trypsiniert und für 10 min bei 1200 Upm bei RT pelletiert. Im Anschluss wurde das Zellpellet in DMEM-Vollmedium, das 10% DMSO und weitere 10% Tetrazyklin-freies, hitzeinaktiviertes FKS enthielt, resuspendiert und die Zellen in 1ml-Kryoröhrchen (Fa. Nalgene, USA) zum schonenden Einfrieren zunächst einige Tage bei -80 °C gelagert und anschließend zur langfristigen Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff umgesetzt.

Zum Auftauen der in flüssigem Stickstoff gelagerten Aliquots wurden diese ca. 10 min bei 37 °C inkubiert und in 10 ml DMEM-Vollmedium aufgenommen. Nach Adhäsion der Zellen erfolgte zur Entfernung von DMSO-Resten ein Medium-Wechsel.

### 2.1.1.3 Transiente Transfektion

Die transienten Transfektionen wurden bei den humanen als auch den Rattenchondrosarkomzellen mittels *Lipofectamine*<sup>TM</sup> 2000 der Firma Invitrogen durchgeführt. Hierbei wird die einzuschleusende Plasmid-DNA zunächst in Liposomen verpackt, die dann mit der Zellmembran verschmelzen und die DNA somit in die Zelle einbringen.

Die SW1353-Zellen wurden je nach Versuchsansatz in 10 cm-Zellkulturschalen oder in 6-Well-Platten bis zu einer Konfluenz von ca. 80% angezogen. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel von DMEM-Vollmedium zu Opti-MEM<sup>®</sup> I-Medium zur Vermeidung zusätzlicher cytotoxischer Nebenwirkungen. Da Rattenchondrosarkomzellen (RCS-Zellen) sich effizienter in Suspension transfizieren lassen, wurden diese kurz vor der Transfektion ausgezählt und  $2-3 \cdot 10^5$  Zellen pro 6-Well zur Transfektion in Opti-MEM<sup>®</sup> I-Medium vorgelegt. Die im Protokoll vorgegebenen Mengen Plasmid-DNA und *Lipofectamine*<sup>TM</sup> 2000-Reagenz wurden jeweils mit Opti-MEM<sup>®</sup> I-Medium vermischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden die Ansätze zur Bildung der Liposomen vereinigt und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Die *Lipofectamine*<sup>TM</sup> 2000/DNA-Komplexe wurden entweder tropfenweise auf die Zellen (SW1353) oder zur Zellsuspension (RCS) hinzugegeben. Nach 6 h erfolgte ein Austausch des Mediums und nach weiteren 24-36 h konnten die transfizierten Zellen näher untersucht werden.

### 2.1.1.4 Stabile Transfektion und Selektion stabil transfizierter Zellklone

Bei einer stabilen Transfektion wird zuvor linearisierte Plasmid-DNA stabil in das Genom der Zelle integriert, sodass die einzuschleusende DNA nicht mehr von der Zelle abgebaut werden kann. Meist bringt die Fremd-DNA ein Antibiotika-Resistenzgen mit in die Wirtszelle um eine Selektion der stabil transfizierten Zellklone gewährleisten zu können.

Die stabile Transfektion wurde, wie auch bereits bei der transienten Transfektion beschrieben, (Kap. 2.1.1.3) mittels des *Lipofectamine*<sup>TM</sup> 2000-Reagenz der Firma Invitrogen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in 10 cm-Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von 80% in DMEM-Vollmedium angezogen und anschließend ein Mediumwechsel zu DMEM-Medium durchgeführt. Die entsprechenden Mengen *Lipofectamine*<sup>TM</sup> 2000 und Endotoxinfreie, linearisierte Plasmid-DNA wurden in Opti-MEM<sup>®</sup> I-Medium verdünnt, 5 min bei RT inkubiert und anschließend vereinigt. Nach weiteren 20 min Inkubation wurden die *Lipofectamine*<sup>TM</sup> 2000/DNA-Komplexe tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach 6 h erfolgte ein Mediumwechsel zu DMEM-Vollmedium. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf fünf bis sechs 10 cm-Zellkulturschalen verteilt und nach weiteren 24 h mit der Selektion durch Neomycin (750 µg/ml) begonnen. Eine Negativkontrolle, die keine Fremd-DNA

aufgenommen hatte, wurde mitgeführt. Die Selektion dauerte 14-18 Tage, wobei jeweils nach 2-3 Tagen ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Die bereits makroskopisch sichtbaren Zellklone wurden mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 24-Well-Platten überführt. Nachdem die Zellen in ausreichender Menge unter weiterer Neomyzinselektion kultiviert waren, konnte eine Dauerkultur hergestellt werden. Mit weiteren Analysen (RT-PCR, *Northern-Blot*, *Western-Blot*) wurden die positiven Klone zusätzlich charakterisiert und dadurch auch verifiziert.

## **2.1.2 Kultivierung von Knorpelgewebe**

### **2.1.2.1 Präparation und Kultivierung von Oberschenkelhalsköpfen/Rippen**

Die zu präparierenden Tiere wurden im Exsikkator mit einer Chloroformüberdosis abgetötet. Die Oberschenkelhalsköpfe (ohne Oberschenkel) sowie die Rippen (nur Knorpelanteile) wurden in PBS/ 5 Tropfen Amphotericin auf Eis freipräpariert, 5x in PBS/Amphotericin gewaschen und in 5 ml DMEM-Vollmedium, dem zusätzlich noch 10 mM HEPES und 50 µg/ml Ascorbat zugesetzt war, 48 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre vorkultiviert. Je nach Versuchsbedingung wurde 1 µg/ml Doxycyclin hinzugegeben. Nach 3maligem Waschen mit Serumfreiem DMEM-Vollmedium (weitere Zusätze: 10mM HEPES, 50 µg/ml Ascorbat) erfolgte die Kultivierung der Knorpelgewebe in 3 ml serumfreiem DMEM-Vollmedium (weitere Zusätze: 10mM HEPES, 50 µg/ml Ascorbat, 1 µg/ml Doxycyclin je nach Versuch) für 5 Tage.

### **2.1.2.2 Quantifizierung des Proteoglykangehaltes mittels des DMMB-Assay**

Der **Dimethylmethylblau** (DMMB)-Assay ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung des Glykosaminoglykan (GAG)-Gehaltes sowohl in Gewebe als auch in Flüssigkeiten. Glykosaminoglykane, wie z.B. Chondroitin- und Keratansulfat, sind negativ geladene sulfatierte Ketten, die nicht-kovalent an das Proteoglykan Aggregat gebunden sind.

Zur Bestimmung des GAG-Gehaltes im Überstand wurden 50 µl aus der Kultivierung der Knorpelgewebe mit 1 ml DMMB-Reagenz (46 µM 1,9-Dimethylmethylblau, 40 mM Glycin, 40 mM NaCl) durch vortexen vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Die metachromatische Verschiebung der Absorption des Farbstoffes 1,9-Dimethylmethylblau in Gegenwart von negativ geladenen Gruppen, vor allem Sulfatgruppen, wurde bei 525 nm im Photometer bestimmt. Als Referenz diente Serumfreiem DMEM-Vollmedium mit 10 mM HEPES und 50 µg/ml Ascorbat.

Zur Bestimmung des Gesamt-Glykosaminoglykangehaltes wurde zunächst der Knorpel mit Proteinase K (5 µg Proteinase K/ 1mg Knorpel) in 3 ml 100 mM Tris/Serumfreiem DMEM-

Vollmedium mit 10mM HEPES und 50 µg/ml Ascorbat pH 7,6 16 h bei 56 °C im Wasserbad verdaut. Nach der Inaktivierung des Enzyms bei 100 °C für 20 min wurde 15 min bei 4 °C und 3000 Upm (Heraeus Omnifuge2.0 RS) zentrifugiert, der Überstand entnommen und ebenfalls photometrisch bestimmt. Die Summe der beiden errechneten Glykosaminoglykanwerte (Überstand, Knorpelgewebe) ergab den Gesamt-Glykosaminoglykangehalt. Die Konzentrationen wurden mit einer zuvor erstellten Eichgerade, bei der definierte Mengen an Chondroitinsulfat C (aus Haifischknorpel) gemessen worden waren, bestimmt.

## **2.2 Arbeiten mit Mäusen**

### **2.2.1 Verwendeter Mausinzuchtstamm**

Zur Generierung der transgenen Mauslinien wurde der Mausinzuchtstamm FVB/N verwendet. Die Tiere wurden im Tierstall der Universitätsklinik Mainz unter standardisierten Bedingungen bei 22 °C Raumtemperatur, einer Luftfeuchtigkeit von 55% ± 10% und einem Hell-Dunkel-Zyklus von 12 Stunden gehalten. Als Standardfutter diente V-Alleinfutter ssniff R/M-H, extrudiert (sniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Wasser *ad libitum*.

### **2.2.2 Mäusezucht und Nummerierungssystem**

Nach der Generierung der transgenen Tiere wurden diese zum Zuchterhalt mit FVB/N-Wildtyp Tieren gekreuzt. Die heterozygot transgenen Nachkommen wurden mit Ohrenmarken durchnummeriert und erhielten zusätzlich noch eine Ohrlochung.

Zur Generierung homozygoter Nachkommen erfolgte eine Verpaarung zweier heterozygoter Tiere. Nach Mausschwanzbiopsie und DNA-Isolation (siehe Kap. 2.2.3) wurde mit Hilfe der quantitative PCR (Light-Cycler-PCR, Kap. 2.7.3) die Homozygotie nachgewiesen.

### **2.2.3 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien**

Für die Mausschwanzbiopsie wurde den Tieren ca. 0,5 cm der Schwanzspitze mit einer sterilen Schere abgetrennt und die Schwanzspitzen in Eppendorfgefäßen bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert. Bei Schwanzbiopsien von Embryonen wurde ca. die Hälfte des Schwanzes abgetrennt. Nach Zugabe von 750 µl *Tail*-Lysepuffer und 40 µl Proteinase K (10 mg/ml) wurden die Biopsien ÜN bei 55 °C im Wasserbad inkubiert. Am folgenden Tag wurde den Ansätzen 250 µl 5 M NaCl hinzugegeben, kurz gevortext und 10 min bei RT mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 750 µl in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 500 µl 100% Isopropanol versetzt, gemischt und 10 min bei RT mit 14 000 Upm (Eppendorf 5417R) gefällt. Die Pellets wurden zweimal mit 500 µl 70%

Ethanol gewaschen, getrocknet und in 400 µl A. bidest bzw. 200 µl A. bidest bei Schwanzbiospien von Embryonen gelöst.

## **2.2.4 Präparation von Mausgeweben**

Die zu präparierenden Tiere wurden durch Genickbruch oder Chloroformüberdosis im Exsikkator abgetötet. Die Organe wurden in PBS auf Eis präpariert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der entnommenen Gewebe bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## **2.3 Histologische Arbeitsmethoden**

### **2.3.1 Herstellung von Paraffinschnitten**

#### **2.3.1.1 Fixierung und Entkalkung von Knochengewebe**

Bei den abgetöteten Tieren wurden das Kniegelenk und der Knochen in PBS auf Eis von dem umliegenden Gewebe freipräpariert. Anschließend erfolgte die Fixierung in 4 % in PBS gepuffertem Formalin ÜN bei RT. Am darauf folgenden Tag wurden die Kniegelenke und der Knochen kurz in Leitungswasser gespült und anschließend, je nach Knochenalter, für 3-8 Wochen in 15%iger EDTA-Lösung entkalkt. Die EDTA-Lösung wurde 1-2mal wöchentlich ausgetauscht.

#### **2.3.1.2 Entwässerung und Paraffinierung**

Nach der Entkalkung wurden die Kniegelenke und der Knochen kurz in Leitungswasser gespült bzw. einzubettende Gewebe oder Embryonen direkt in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert:

- 1 x 30 min 50% Isopropanol
- 1 x 30 min 70% Isopropanol
- 1 x 30 min 80% Isopropanol
- 2 x 30 min 96% Isopropanol
- 3 x 30 min 100% Isopropanol

Nach der Behandlung mit Xylol (3 x 20 min), welches den Alkohol aus dem Gewebe verdrängt, wurden die Präparate 2 x 2 h bei  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  und anschließend ÜN bei  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit Paraffin durchtränkt. Am nächsten Tag wurde das Gewebe mit dem Einbettautomat „Leica EG1140H“ in Paraffin eingebettet und mit dem Mikrotom „Leica RM2165“  $4\text{ }\mu\text{m}$ -Schnitte hergestellt.

### 2.3.2 Herstellung von Gefrierschnitten

Zur Anfertigung von Gefrierschnitten wurden zunächst die Tiere mit einer Chloroform-überdosis abgetötet, die zu untersuchenden Gewebe in PBS auf Eis präpariert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im Anschluss wurden die Gewebe mit dem Auffriermedium „TissueTek“ auf dem Objektisch des Kryostates MGW Lauda (Leica) fixiert und 12 µm-Schnitte angefertigt.

### 2.3.3 Färbungen

Bevor histologische Präparate gefärbt werden können, muss zunächst das Einbettmittel (soweit dies vorhanden) entfernt und die Schnitte rehydriert werden. Im Anschluss an die Färbung wird über eine aufsteigende Alkoholreihe wieder entwässert, in Xylol eingebracht und mit einem durchsichtigen Einschlussmedium konserviert.

Auf- (zum Entwässern) bzw. absteigende (zum Rehydrieren) Alkoholreihen sind wie folgt:

Absteigend:

Aufsteigend:

3 x 10 min 100% Isopropanol

1 x 10 min 50% Isopropanol

2 x 10 min 96% Isopropanol

1 x 10 min 70% Isopropanol

1 x 10 min 70% Isopropanol

2 x 10 min 96% Isopropanol

1 x 10 min 50% Isopropanol

3 x 10 min 100% Isopropanol

#### 2.3.3.1 Toluidinblau-/Alcianblau-Färbung

Proteoglykane, wie z.B. Aggrekan, lassen sich aufgrund der stark polyanionischen Glykosaminoglykan-Seitenketten durch kationische Farbstoffe wie z.B. Toluidinblau oder Alcianblau anfärben.

Die in Kap. 2.3.1.2 hergestellten Paraffinschnitte wurden mindestens 60 min bei 60 °C im Brutschrank inkubiert, sodass das Paraffin ablaufen konnte. Nach einer 3 x 10minütigen Behandlung mit dem Intermedium Xylol erfolgte eine Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe.

Im Anschluss wurde 20 min mit einer 0,01%igen Toluidinblau/30% Ethanol-Lösung gefärbt, zweimal kurz in 96% Ethanol geschwenkt und in 100% Ethanol einer mikroskopischen Kontrolle unterzogen. Nach Einbringen in Xylol (3 x 10 min) wurden die entwässerten Schnitte mit Entellan eingedeckt und somit für lange Zeit haltbar gemacht.

Die Schnitte für die Alcianblau-Färbung wurden nach 2 minütiger Inkubation in 3%iger Essigsäure 30 min in 1%iger Alcianblau 8GS/3% Essigsäure-Lösung gefärbt, 2-3 min mit

Leitungswasser gewaschen und nach aufsteigender Alkoholreihe und Xylol mit Entellan eingedeckt.

### **2.3.3.2 $\beta$ -Galaktosidase (LacZ)-Färbung von Embryonen**

Die trächtigen Weibchen wurden nach verschiedenen Tragezeiten mit einer Chloroformüberdosis im Exsikkator abgetötet und deren Embryonen in PBS auf Eis freipräpariert. Der Hinterkopf und die Bauchdecke wurden zum besseren Eindringen der Färbelösung vorsichtig eröffnet. Zum Genotypisieren erfolgte eine Schwanzbiospie (Kap. 2.2.3).

Die Embryonen wurden 30-45 min auf dem Schüttler fixiert und anschließend 3 x 30 min gewaschen. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung erfolgte 2-3 h bei 37°C. Zum Abstoppen der Färbung wurde 3 x 20 min mit PBS und 2 x 10 min mit 70% Ethanol auf dem Schüttler gewaschen. Die Lagerung der gefärbten Embryonen erfolgte bei -20°C.

### **2.3.3.3 Gegenfärbung der LacZ-gefärbten Embryonen mit Kernechtrot**

Von den LacZ-gefärbten Embryonen wurden Paraffinschnitte (Kap. 2.3.1.2) hergestellt. Zur Vorbereitung auf die Färbung erfolgte zunächst eine Inkubation der Schnitte bei 60°C für mindesten 60 min, damit das Einbettmittel ablaufen konnte. Nach 3 x 10 min im Intermedium Xylol wurde über ein absteigende Alkoholreihe wieder rehydriert. Danach wurden die Schnitte kurz in A. bidest eingetaucht, anschließend 20 sec mit Kernechtrot gefärbt, 2-3mal in A. bidest geschwenkt und anschließend mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und dem Intermedium wieder entwässert. Um die Schnitte für längere Zeit haltbar zu machen, wurden sie mit Entellan eingedeckt.

### **2.3.3.4 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung**

Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung werden durch den positiv geladenen Farbstoff Hämatoxylin saure Bestandteile, z.B. die DNA im Zellkern, blau, durch den negativ geladenen Farbstoff Eosin die positiv geladenen Gewebebestandteile rosa angefärbt.

Die Schnitte wurden zunächst 8 min in Hämatoxylin gefärbt, 1-2mal in A. bidest. eingetaucht und 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nach kurzem Schwenken in A. bidest. erfolgte die Gegenfärbung mit angesäuertem Eosin für 1 min. Im Anschluss wurden die Präparate über eine aufsteigende Alkoholreihe und dem Intermedium Xylol dehydriert und mit Entellan eingedeckt.

## **2.4 Analyse von Nukleinsäuren**

### **2.4.1 Isolierung von DNA**

#### **2.4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA**

Die angewendete, modifizierte Methode zur Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979).

Kleinere Mengen Plasmid-DNA wurden hierbei mit Hilfe des „Rapid Pure Miniprep Kits“ (Q-Biogene) nach Herstellerangaben isoliert. Die Elution erfolgte in 50 µl A. bidest.

Die Aufreinigung größerer Mengen Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung des „Qiagen Plasmid Maxi Kit“ der Firma Qiagen. In der Regel wurden 200–400 ml Bakterienkultur abzentrifugiert (12 min, 6000 Upm (Sorvall RC5C), 4 °C), einer alkalischen Lyse unterzogen (Puffer P1, P2 und P3), über Säulen aufgereinigt und in 15 ml Puffer QF (65 °C) eluiert. Nach anschließender Fällung mit 0,7 Vol. 100% Isopropanol wurde die Plasmid-DNA zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und in 50-100 µl A. bidest gelöst. Die Konzentration bzw. der Reinheitsgrad der isolierten Plasmid-DNA wurde mittels photometrischer Quantifizierung (Kap. 2.5.4) bzw. Agarosegelelektrophorese (Kap. 2.5.1) ermittelt.

#### **2.4.1.2 Isolierung von endotoxinfreier Plasmid-DNA**

Durch einen zusätzlichen Filtrationsschritt in der Aufreinigung der Plasmid-DNA können Endotoxine effizient eliminiert und die gewonnene, endotoxinfreie Plasmid-DNA für z.B. Transfektionen eukaryotischer Zellen eingesetzt werden.

Die Präparation der endotoxinfreien Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung des „EndoFree Plasmid Maxi Kits“ der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde in 50-100 µl endotoxinfreiem A. bidest gelöst, photometrisch quantifiziert (Kap. 2.5.4) und gelelektrophoretisch überprüft (Kap. 2.5.1).

#### **2.4.1.3 Isolierung kleinerer Mengen Plasmid-DNA zum Screening rekombinanter Plasmide**

Die von Beuken *et al.* (1998) entwickelte Methode dient der effizienteren Überprüfung von Klonierungen. Hierbei wurden die zu untersuchenden Bakterienklone in 2-3 ml LB<sub>Amp</sub>-Medium (100 µg/ml Ampizillin) ÜN bei 37 °C im Schüttelinkubator angezogen. 1-1,5 ml der Bakterienkultur wurde 1 min bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert und in 30 µl 6x Blaumarker resuspendiert. Nach Zugabe von 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und kurzem Vortexen erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (5 min, maximale Geschwindigkeit, RT). Im Anschluss wurden 10 µl der oberen, wäßrigen Phase direkt auf



einem 0,8%igen Agarosegel analysiert, sodass aufgrund des unterschiedlichen Laufverhaltens Klone der richtigen Größe relativ schnell identifiziert werden konnten.

## **2.4.2 Isolierung von RNA**

### **2.4.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen**

Die Aufreinigung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mit Hilfe des „RNeasy Mini-Kits“ der Firma Qiagen (Hilden).

Die Zellen mit einer Konfluenz von bis zu 90% wurden zweimal mit PBS gewaschen, trypsiniert und mit 5-10 ml DMEM-Vollmedium bzw. PBS abgespült. Nachdem die Zellen pelletiert waren (12 min, 3200 Upm (Heraeus Omnifuge2.0 RS, Sorvall RT7), 4 °C) erfolgte die Aufreinigung der Gesamt-RNA exakt nach Herstellerangaben.

Nach Entfernung der genomischen DNA durch DNase I-Verdau (Kap. 2.4.2.3) wurde eine photometrische Messung (Kap. 2.5.4), sowie eine gelelektrophoretische Überprüfung (Kap. 2.5.1) angeschlossen.

### **2.4.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe**

Die Gewebe zur Isolation von Gesamt-RNA wurden in PBS auf Eis von mit einer Chloroformüberdosis abgetöteten Tieren freipräpariert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gewebe wurden in 1-2 ml Trizol<sup>®</sup> (saures Phenol, Gibco BRL) aufgenommen und mit einem IKA Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik, Staufen) homogenisiert. Bei Knorpel/Knochen-Gewebe wurde vor der Homogenisierung eine grobe Zerkleinerung mit Mörser und Pistill durchgeführt. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei RT wurde zur Phasentrennung 0,2 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, 15 sec gevortext und 15 min bei 4 °C und 14000 Upm (Eppendorf 5417R) zentrifugiert. Die obere, wäßrige, RNA-haltige Phase wurde abgehoben und die Phasentrennung wiederholt. Danach erfolgte die RNA-Präzipitation durch Zugabe von 0,5 Vol. eiskaltem 100% Isopropanol und 10 minütiger Inkubation bei RT. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 14000 Upm, 4 °C) wurde der Überstand abgehoben und das RNA-Pellet zweimal mit 1 Vol. 75%igem, eiskaltem Ethanol 5 min bei 4 °C und 9500 Upm (Eppendorf 5417R) gewaschen. Das Pellet wurde ca. 20 min in der *Speed Vac* ohne Heizung getrocknet und in 50 µl A. bidest gelöst.

Auch hier erfolgte die Eliminierung der genomischen DNA (Kap. 2.4.2.3), eine photometrische Konzentrationsbestimmung (Kap. 2.5.4) und eine gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 2.5.1) zur Überprüfung der Integrität der gewonnen RNA.

### 2.4.2.3 Entfernung genomischer DNA nach der RNA-Isolation

Nach der RNA-Aufreinigung (Kap. 2.4.2.1 und Kap. 2.4.2.2) erfolgte in aller Regel die Entfernung genomischer DNA durch einen DNase I-Verdau nach der Methode von Sambrook *et al.* (1989). DNase I ist eine unspezifische Endonuklease, die in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen die Phosphodiesterbindungen einzel- und doppelsträngiger DNA spaltet.

Die aufgereinigte RNA wurde in einem 200  $\mu$ l-Ansatz bestehend aus 1 x TE-Puffer, 10 mM  $MgCl_2$ , 1 mM DTT, 2  $\mu$ l RNase-Inhibitor (40 U/ $\mu$ l) und 40-60 U DNase I (RNase-frei) 2-3 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Im Anschluss erfolgte die Entfernung der für weitere Versuche störenden DNase I nach dem „RNeasy Clean-Up Protokoll“ der Firma Qiagen (Hilden) genau nach Herstellerangaben. Die aufgereinigte RNA wurde in 40  $\mu$ l A. bidest eluiert, die Konzentration photometrisch (Kap. 2.5.4) bestimmt und die Integrität der RNA gelelektrophoretisch (Kap. 2.5.1) überprüft. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -80 °C.

## 2.5 DNA- und RNA-Standardmethoden

### 2.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein biochemisches Trennverfahren, bei dem die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld zu deren Trennung nach Größe ausgenutzt wird. Je größer die Moleküle sind, desto langsamer wandern sie aufgrund des Siebeffektes des Agarosegels.

Die DNA wurde zunächst mit 1/5 Vol. *Orange Dye* versetzt und anschließend auf 0,8-2%igen, horizontalen Agarosegelen mit 1 x TBE als Laufpuffer bei ca. 80-130 V Spannung aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard dienten 3  $\mu$ l *HindIII*-restringierte  $\lambda$ -DNA (Roche Diagnostic, Mannheim), 100 bp-Marker bzw. 1 kb-Marker (Invitrogen, USA). Zur Darstellung der DNA wurde eine Ethidiumbromid-Färbung durchgeführt. Hierzu wurden die Gele 5 min in Ethidiumbromidlösung (5  $\mu$ g/ml) gefärbt, 10 min in A. bidest entwässert und unter UV-Licht ( $\lambda = 312$  nm) mit Hilfe des Gel-Imaging-Systems der Firma Fröbel und des Video Copy Prozessors (Mitsubishi, Japan) ausgewertet und dokumentiert.

Zur Auftrennung von RNA für einen Northern-Transfer wurden 1%ige, horizontale Agarosegele mit 6 % Formaldehyd und 1 x MOPS als Laufpuffer verwendet. Die RNA wurde eingedampft, in 2  $\mu$ l A. bidest, 2  $\mu$ l 10 x MOPS, 4  $\mu$ l 37% deionisiertem Formaldehyd, 10  $\mu$ l deionisiertem Formamid und 1  $\mu$ l 1:50 verdünntem Ethidiumbromid gelöst. Nach Inkubation bei 65 °C für 10 min und Abkühlen für 5 min auf Eis wurden den Proben 2  $\mu$ l 10 x

Formaldehyd-Gelladepuffer hinzugegeben und diese gelelektrophoretisch bei einer Spannung von 80-100 V aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard diente der *RNA-Ladder High Range* (Fa. MBI Fermentas). Nach der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht mit Hilfe des Video Copy Processors (Mitsubishi, Japan) dokumentiert und die RNA-Markerbanden mit einem Skalpell durchstoßen.

### **2.5.2 Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen**

Die zu isolierenden DNA wurde, wie unter Kap. 2.5.1 beschrieben, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die DNA-Banden wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraktions Kits“ der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben aus den Gel-Stücken extrahiert.

### **2.5.3 Fällung von DNA**

#### **2.5.3.1 Isopropanol-Fällung**

Bei der Isopropanol-Fällung können kleinere Fragmente (< 80 bp), z.B. Primer und Nukleotide von PCR-Produkten, entfernt werden. Das Löslichkeitsprodukt für das DNA/Salz-Gemisch ist dabei so niedrig, dass nur größere Moleküle ausfallen. Kleinere Moleküle können mit dem Überstand abgehoben werden.

Für die Fällung wurde dem Ansatz 1 Vol. 4 M Ammoniumacetat und 2 Vol. 100% Isopropanol zugegeben und das DNA/Salz-Gemisch 30 min bei maximaler Geschwindigkeit und RT pelletiert. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, erneut 10 min bei RT und 14000 Upm (Eppendorf 5417R) zentrifugiert und anschließend vakuumgetrocknet. Die DNA wurde in 10-20 µl A. bidest gelöst.

#### **2.5.3.2 Ethanol-Fällung**

Bei der Ethanol-Fällung ist das Löslichkeitsprodukt so hoch, dass auch kleinere Fragmente ausfallen.

Die zu fällende DNA wurde auf ein geeignetes Volumen (30 µl bei Sequenzfällungen, 200 µl bei Fällungen nach Phenol-Extraktion) mit A. bidest aufgefüllt und durch Zugabe von  $\frac{1}{10}$  Vol. 3 M Natriumacetat pH 5,5 und 2,5 Vol. 100% Ethanol durch Zentrifugation (30 min, maximale Geschwindigkeit, RT) gefällt. Nach Waschen mit 70%igem Ethanol wurde das Pellet getrocknet und in einem geeigneten Volumen A. bidest gelöst.

#### 2.5.4 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Absorption der Nukleinsäuren bei 260 nm ist durch deren Gehalt an heterozyklischen Basen bedingt. Die photometrische Messung der Extinktion bei 260 nm erlaubt hierbei eine Berechnung der Konzentration der Nukleinsäuren in der Probe. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht einem Gehalt von etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und etwa 40 µg/ml RNA. Der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  gilt als ein Maß für die Reinheit der Probe. Dieser sollte bei reinen Proben zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenol, welche ebenfalls im UV-Bereich Licht absorbieren, verändern das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$ .

Von der DNA- bzw. RNA-Probe wurde eine 1:50-Verdünnung hergestellt und diese gegen A. bidest als Referenz in speziellen Küvetten (Eppendorf UVette®) gemessen. Die Konzentration berechnete sich wie folgt:

$$c [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g/ml (dsDNA) bzw. } 40\mu\text{g/ml (RNA)}$$

#### 2.5.5 Phenol-Extraktion

Phenol-Extraktionen wurden durchgeführt um DNA von Proteinen, z.B. Restriktionsendonukleasen, zu trennen. Der zu extrahierende Ansatz wurde auf ein Volumen von 200 µl mit A. bidest aufgefüllt und mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Im Anschluss wurde 15 sec gevortext und 5 min bei RT und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die obere, DNA-haltige Phase wurde zweimal mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) erneut extrahiert und von der organischen, unteren Phase getrennt. Dadurch konnten noch vorhandene Phenolreste entfernt werden. Die anschließende Fällung erfolgte wie unter Kap. 2.5.3 beschrieben (je nach Bedarf Isopropanol- bzw. Ethanol-Fällung).

#### 2.5.6 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der Verdau der DNA durch Restriktionsendonukleasen erfolgte nach exakten Angaben des Enzymherstellers und unter Verwendung der empfohlenen Puffer. Die Dauer der Restriktion und die Enzymmenge variierten mit der Enzymaktivität sowie der Qualität und Quantität der zu schneidenden DNA.

### 2.5.7 Auffüllen überhängender DNA-Enden

Wird DNA durch Restriktionsendonukleasen verdaut, entstehen je nach Enzym glatte (*blunt ends*) sowie klebrige Enden (*sticky ends*). Um zwei restringierte DNA-Fragmente, die nicht kompatible, klebrige Enden besitzen, ligieren zu können, müssen bei beiden Fragmenten die klebrigen Enden aufgefüllt werden. Hier macht man sich das Klenow-Enzym zunutze. Dies besitzt nur die 5' → 3'-Polymerase- und die 3' → 5'-Exonuklease-Aktivität, während die 5' → 3'-Exonuklease-Aktivität des ursprünglichen Enzymes nicht mehr vorhanden ist. Somit können klebrige Enden mit 5'-Überhang durch Synthese eines Komplementärstranges aufgefüllt werden.

Nach dem Restriktionsverdau (Kap. 2.5.6) wurde der Ansatz mit Phenol extrahiert (Kap. 2.5.5), in 37 µl A. bidest gelöst und mit 2 µl dNTPs (10 mM), 5 µl 10 x Reaktionspuffer und 6 µl Klenow-Enzym (2 U/µl) 45 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde zur Inaktivierung des Enzyms 6 µl 0,5 M EDTA hinzugegeben, der Ansatz mit Phenol extrahiert (Kap. 2.5.5) und gefällt (Kap. 2.5.3).

### 2.5.8 Dephosphorylierung von DNA mittels alkalischer Phosphatase

Um Religationen von Vektor-DNA bei Klonierungen zu verhindern, werden die durch Restriktionsverdau (Kap.2.5.6) entstehenden Enden des Vektors mittels der alkalischen Phosphatase dephosphoryliert. Hierbei werden die Phosphatgruppen am 5'-Ende des DNA-Moleküls entfernt.

Nach dem Restriktionsverdau (Kap. 2.5.6) der Vektor-DNA erfolgte eine Phenol-Aufreinigung (Kap. 2.5.5) mit anschließender Ethanol-Fällung (Kap. 2.5.3.2). Zu dem auf 100 µl aufgefüllten Ansatz wurde 1 x alkalischer Phosphatase-Puffer und 2-4 U alkalische Phosphatase (1 U/µl, Roche) hinzupipettiert und jeweils 10 min bei 37 °C und 55 °C inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 2 U Enzym wurden die Inkubationsschritte wiederholt. Nach einer erneuten Phenol-Aufreinigung (Kap. 2.5.5) mit folgender Ethanol-Fällung (Kap.2.5.3.2) konnte die Vektor-DNA für die Ligation eingesetzt werden.

### 2.5.9 Herstellung eines doppelsträngigen Linkers

Zur Generierung des Linkers wurden jeweils 80 ng/µl Oligonukleotid Linker-F bzw. Linker-R in einem Ansatz von 50 µl mit *Annealing-Buffer* vermischt und 3 min bei 90°C erhitzt. Im Anschluss erfolgte die Hybridisierung für 60 min bei 37 °C im Wasserbad. Der Linker konnte entweder sofort in die Ligationsreaktion eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

## 2.6 Reverse Transkription

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase, einem Enzym, welches an der Replikation mehrerer Viren beteiligt ist und RNA als Matrize benutzt, ist es möglich von einer RNA den komplementären DNA-Strang zu synthetisieren (*complementary* DNA, cDNA). Im Anschluss wird eine PCR durchgeführt, die die zuvor gebildete cDNA als Matrize verwendet.

Bei der Erststrang-cDNA-Synthese wurden 4 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von 16 µl 10 min bei 70°C denaturiert, auf Eis abgekühlt, 24 µl cDNA-Synthese-Mix hinzugegeben und 100 min bei 37°C inkubiert. Nach dieser Erststrangsynthese wurde die Reverse Transkriptase 10 min bei 94°C denaturiert und der gesamte Ansatz auf 4 °C abgekühlt. Grundsätzlich wurde bei jeder Synthese eine Negativkontrolle mitgeführt, die A. bidest anstelle des Enzymes enthielt.

### cDNA-Synthese-Mix:

6,25 µM	Oligo(dT) <sub>16</sub> -Primer (Invitrogen, Karlsruhe)
1 mM	dNTP-Mix (Invitrogen, Karlsruhe)
1 U/µl	RNase-Inhibitor (MBI Fermentas, St. Leon Rot )
1 x	„1 <sup>st</sup> strand buffer“ (Invitrogen, Karlsruhe)
10 mM	DTT (Invitrogen, Karlsruhe)
7,5 U/µl	M-MLV Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe)

Die darauf folgende PCR wurde nach dem Standard-PCR-Protokoll mit 1 µl 1:10 verdünnte bzw. unverdünnte cDNA als Matrize durchgeführt. Die Amplifikate wurden mittels einer Agarosegelelektrophorese (Kap. 2.5.1) überprüft.

## 2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die 1988 von Saiki *et al.* entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der selektiven Amplifizierung eines beliebigen Abschnitts in einem DNA-Molekül, wobei die Sequenz an seinen Enden bekannt sein muss. Nach der Denaturierung der doppelsträngigen DNA hybridisieren synthetische Oligonukleotide, sogenannte „Primer“, und dienen als Startpunkt für die Synthese eines neuen Stranges mit Hilfe der thermostabilen Taq-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* und Nukleotiden. Durch zyklisches Wiederholen der Schritte Denaturierung, Annealing (Hybridisierung der Primer) und Elongation (Anlagerung komplementärer Nukleotide und Synthese eines neuen Stranges) kann so selektiv ein DNA-Fragment exponentiell vervielfältigt werden.

### 2.7.1 Standard-PCR und Semiquantitative PCR

Der Standard-PCR-Ansatz als auch das Programm sah wie folgt aus. Je nach DNA bzw. Schmelztemperatur der Primer wurde die Zyklenzahl bzw. die Annealing-Temperatur variiert. Zur Überprüfung der PCR wurde  $\frac{1}{10}$  des Ansatzes auf einem 1-2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

<u>PCR-Reaktionsansatz:</u>		<u>PCR-Programm:</u>		
5 $\mu$ l	10 x PCR-Puffer	4 min	94 °C	} 20-35 Zyklen
4 $\mu$ l	dNTP's (je 2,5 mM)	1 min	94 °C	
2 $\mu$ l	Primer 1 (10 $\mu$ M)	1 min	58 – 63 °C	
2 $\mu$ l	Primer 2 (10 $\mu$ M)	1 min	72 °C	
1 $\mu$ l	Taq-Polymerase (1 U/ $\mu$ l)	7 min	72 °C	
x $\mu$ l	DNA (50-150 ng)	$\infty$	4 °C	
ad. 50 $\mu$ l	A. bidest			

Semiquantitative PCR's wurden nach dem Standard-Protokoll der PCR durchgeführt, wobei 1  $\mu$ l 1:10 verdünnte bzw. unverdünnte revers transkribierte cDNA eingesetzt wurde. Nach meist 20, 25 und 30 Zyklen wurden 5  $\mu$ l entnommen und gelelektrophoretisch auf einem 1-2%igen Agarosegel aufgetrennt. So konnte mit einer schnellen und einfachen Methode die Genexpression zu vergleichender RNA-Populationen untersucht werden.

### 2.7.2 Expand-PCR

Mit Hilfe des „Expand<sup>TM</sup> High Fidelity PCR System“ der Firma Roche ist es möglich große DNA-Fragmente (Genomisch bis zu 5 kb, Plasmide bis zu 12 kb) zu amplifizieren. Dieses System beinhaltet eine Enzymmischung aus thermostabiler Taq- und Pwo-Polymerase. Letztere ist eine korrekturlesende 3`-5` Exonuklease, die die Fehlerrate der Amplifikation gering hält.

Die Durchführung der Expand-PCR erfolgte nach Angaben des Herstellers und variierte je nach Größe des zu amplifizierenden Fragmentes (Annealingtemperatur, Zeit und Temperatur der Elongation). Die Proben wurden auf einem 0,8%igen Agarosegel überprüft (Kap. 2.5.1) und für weitere Analysen bei -20 °C gelagert.

### 2.7.3 Quantitative *real-time* PCR

Die quantitative Real-time PCR wurde mittels des „Light Cyclers“ der Firma Roche (Mannheim) durchgeführt. Das Prinzip beruht darauf, dass SYBR Green I bei der Amplifikation in die doppelsträngige DNA interkaliert und nach jedem Zyklus die Konzentration gemessen wird. Je mehr PCR-Produkt produziert wird, desto mehr Farbstoff kann gemessen werden. So kann genau bestimmt werden, ab wann sich die Amplifikation in

der exponentiellen Phase befindet und dementsprechend Rückschlüsse gezogen werden, wie stark ein Gen in einer definierten Ausgangsmenge exprimiert wird. Um verschiedene Messungen miteinander vergleichen zu können, wird ein Haushaltsgen, welches ubiquitär in allen Zellen gleichermaßen exprimiert werden sollte, als Referenzpunkt verwendet.

Zur Bestimmung der optimalen Verdopplung innerhalb der PCR wurde zunächst eine lineare Regressionsgerade der sogenannten „Crossing Points“, die Punkte, an denen die Amplifikation in die exponentielle Phase übergeht, erstellt. Hierzu wurde von einer der zu untersuchenden DNA's 3-5 verschiedene Verdünnungen (A. bidest) angesetzt und in einer ersten PCR-Reaktion die Crossingpoints mit Hilfe der „LightCycler Software Version 3.5“ (Roche, Mannheim) bestimmt. Der optimale Regressionswert sollte bei 3,3 liegen, da dies einer Verdopplung pro Zyklus von 2 entspricht. Zur Optimierung der Regressionsgeraden wurde die Primer- und/oder die Magnesiumchlorid-Konzentration variiert.

Der Ansatz sah wie folgt aus:

10 µl- Ansatz:	
1-2 µl	verdünnte DNA
1 µl	LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche, Mannheim)
1,2-1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> (Roche, Mannheim)
4 - 5 pmol	Primer 1
4 - 5 pmol	Primer 2
ad. 10 µl	A. bidest (Roche, Mannheim)

Nach der Optimierung der Geraden wurde die Genexpression der Proben bestimmt und gegen die Expression des Haushaltsgenes abgeglichen. Bei der Analyse des genetischen Status (Hetero-/Homozygotie) transgener Tiere wurde die aus Schwanzbiopsien gewonnene DNA auf eine Konzentration von 50 ng/µl eingestellt, 1:50 mit A. bidest verdünnt und gegen eine heterozygote Maus gemessen. Die Amplifikation des *Wt1*-Wildtyp-Lokus wurde als Referenzpunkt verwendet.

Die optimierten Bedingungen der untersuchten Gene sind im Anhang aufgelistet.

## 2.8 Klonierung von Plasmid-DNA

Bei der Klonierung wird ein DNA-Fragment (Insert), welches in aller Regel das zu klonierende Gen enthält, in einen Vektor - ein ringförmiges DNA-Molekül -, der linearisiert wurde, eingefügt. Nachdem mit Hilfe der DNA-Ligase Vektor und Insert verknüpft wurden, erfolgt die Transformation in Bakterien, in denen der Vektor vermehrt wird.



### 2.8.1 Ligation

Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 1 x Ligationspuffer, 1-2 µl 1:4 verdünnter, hochkonzentrierter T4-DNA-Ligase (Invitrogen, 5 U/µl) und ca. 100-150 ng Gesamt-DNA, wobei das Verhältnis Vektor zu Insert bei ca. 1:3-4 lag. Auf das Endvolumen wurde mit A. bidest aufgefüllt. Die Ligation wurde ÜN bei 16 °C im Wasserbad durchgeführt.

### 2.8.2 Transformation mittels Hitzeschock und Selektion positiver Klone

Von dem Ligationsansatz wurden 5-10 µl in chemokompetente *E.coli* TOP 10 (Stratagene) Bakterien transformiert. Hierfür wurden 100 µl Bakterien auf Eis aufgetaut, mit der in den Angaben des Herstellers angegebenen Menge β-Mercaptoethanol versetzt und mit 5-10 µl Ligationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock für 30 sec bei 42 °C im Wasserbad wurden 250 µl SOC-Medium (Invitrogen) hinzugegeben und die Bakterien 1 h bei 37 °C und 220 Upm geschüttelt. In aller Regel wurden 50 µl und 200 µl Transformationsansatz auf LB<sub>Amp</sub>-Platten mit X-Gal und IPTG zur Blau-Weiss-Selektion ausgestrichen und ÜN im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden weisse Kolonien gepickt und über PCR (Kap. 2.7.1) auf erfolgreiche Ligation hin überprüft. Gleichzeitig wurden die Klone in 1-5 ml LB<sub>Amp</sub>-Medium kultiviert (ÜN, 37 °C, 220 Upm) und für eine DNA-Minipräparation (Kap. 2.4.1.1) oder zur Kryokonservierung (Kap. 2.8.3) verwendet. Die Überprüfung größerer Mengen Klone erfolgte nach der von Beuken *et al.* (1998) entwickelten Methode (Kap. 2.4.1.3).

### 2.8.3 Kryokonservierung von *E. coli*-Dauerkulturen

Die Herstellung von *E. coli*-Dauerkulturen erfolgte durch Mischen von 500 µl frischer Bakterienkultur mit 500 µl 2 x FM-Medium in Kryoröhrchen (Nalgene, USA). Die Dauerkulturen wurden bei -80 °C gelagert.

## 2.9 *In vitro*-Mutagenese

Mit der *in vitro*-Mutagenese können gezielte Punktmutationen in einem relativ schnellen Verfahren eingefügt werden. Mit Hilfe zweier synthetischer Oligonukleotide, die die gewünschte Punktmutation tragen, wird die parentale DNA an der speziellen Stelle mutiert und die veränderte Plasmid-DNA mittels der *PfuTurbo*<sup>®</sup> DNA-Polymerase in einer PCR amplifiziert. Im Anschluss wird die parentale DNA mit *Dpn I* restringiert und die übrig gebliebene mutierte Plasmid-DNA in XL10-Gold ultrakompetente Zellen transformiert.

Die *In vitro*-Mutagenese wurde mit Hilfe des „QuickChange<sup>®</sup> XL Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene nach Herstellerangaben mit kleineren Änderungen durchgeführt. In

einem 50 µl-Ansatz wurden ca. 200 ng Matrizen-DNA mit 1 x Reaktionspuffer, jeweils 125 ng der zu mutagenisierenden Primer (30-33mer), 1 µl dNTP-Mix ( je 1,25 mM), 3 µl Quick Solution und 2,5 U *PfuTurbo*<sup>®</sup> DNA-Polymerase in einer PCR gleichzeitig mutagenisiert und amplifiziert. Im Anschluss wurde die parentale DNA durch Zugabe von 2 µl *Dpn I* verdaut, 2 µl des Ansatzes in 50 µl XL10-Gold ultrakompetente Zellen mittels Hitzeschock transformiert und die komplette Bakteriensuspension auf LB<sub>Amp</sub>-Agarplatten ausgestrichen (Kap. 2.8.2). Die Selektion der positiven Klone erfolgt über Restriktion (Kap. 2.5.6) und/oder Sequenzierung (Kap. 2.10).

## 2.10 Automatische DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten beruht auf der von Sanger *et al.* (1977) beschriebenen Kettenabbruchmethode, die 1992 von Lee *et al.* durch Markierung mit fluoreszierenden Didesoxynukleotiden modifiziert wurde.

In einem Sequenzieransatz von 10 µl wurden ca. 100 ng PCR-Produkt bzw. 3 µg Plasmid-DNA mit 1 µM des spezifischen Primers, 2 µl 5 x Sequenzierungspuffer Version 3.1 und 2 µl „ABI PRISM<sup>™</sup> BigDye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix Version 3.1“ (Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt) vermischt. Nach einem einleitenden Denaturierungsschritt (4 min bei 96 °C) erfolgte die Zyklussequenzierung (30 Zyklen, 10 sec 96 °C – 4 min 55 °C). Im Anschluss wurde der Ansatz auf 4 °C abgekühlt.

Der Sequenzieransatz wurde mit Ethanol gefällt (Kap. 2.5.3.2), vakuumgetrocknet und in 3 µl „Loading Buffer“ für Sequenzgele gelöst. Vor dem Auftragen wurden die Proben 2 min bei 96 °C denaturiert und ca. 0,8 µl Proben-DNA auf einem Polyacrylamidgel (4,5 % Polyacrylamid, 7 M Harnstoff) des automatischen Sequenziergerätes „ABI PRISM<sup>™</sup> 377 Sequenzer“ (Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion und die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgte mit der „ABI PRISM<sup>™</sup> 377 Collection Software“ Version 2.6 (Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt) bzw. der „Sequencing Analysis Software“ Version 3.4 (Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt).

## 2.11 Computerauswertung und Datenbankanalysen

Zur Auswertung sequenzierter DNA-Fragmente wurde das Programm „Sequencher<sup>™</sup> Version 4.1“ (Gene Codes Corporation Inc., USA) verwendet. Hierbei konnten Sequenzüberlappungen graphisch dargestellt werden und bei sequenzierten Teilabschnitten eine komplette

Basenabfolge generiert werden. In der Regel wurde eine 80%ige Übereinstimmung überlappender Bereiche bei einer Mindestüberlappung von 20 bp als Kriterium festgesetzt. Homologievergleiche von Nukleotidsequenzen mit öffentlichen Datenbanken erfolgten mit Hilfe der Programme „BlastN“ (Vergleich von Nukleotidsequenzen mit Einträgen aus Nukleotiddatenbanken) und „BlastX“ (Übertragung einer Nukleotidsequenz in die sechs möglichen Aminosäureabfolgen und anschließender Vergleich mit Einträgen in Protein-Datenbanken) des NCBI („US National Center for Biotechnology Information“) (Pearson & Lipman *et al.*, 1988; Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997).

## 2.12 Radioaktive Markierungstechniken

### 2.12.1 Radioaktive Markierung von PCR-Produkten mit „Prime It<sup>®</sup> Random Primer“-DNA Labeling Kit

Die radioaktive Markierung von PCR-Produkten erfolgte nach der erstmals von Feinberg und Vogelstein (1983) beschriebenen Methode des „Random Primed Oligolabelling“. Hierbei lagern sich Hexanukleotide an verschiedenen Orten in der zu markierenden Sequenz an und ermöglichen eine Neusynthese des Gegenstranges unter Einbau radioaktiv markierter Nukleotide mittels des Klenow-Enzyms.

Die Markierung erfolgte mit Hilfe des kommerziellen „Prime It<sup>®</sup> Random Primer Labelling Kit“ der Firma Stratagene. Aufgereinigte PCR-Produkte (ca. 25 ng) wurden mit 10 µl Random Oligonukleotid Primer (Stratagene, Amsterdam) vermischt und auf 34 µl mit A. bidest aufgefüllt. Nach 5 min. Denaturierung bei 100 °C und kurzem Abkühlen auf Eis wurden 50 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (Amersham Life Science, Braunschweig), 10 µl „5 x dCTP Primer Buffer“ (Stratagene, Amsterdam) und 5 U Exo(-) Klenow-Enzym (Stratagene, Amsterdam) hinzupipettiert. Anschließend wurde der Ansatz 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl „Stop Mix“ (Stratagene, Amsterdam) wurden nicht eingebaute, radioaktive Nukleotide über Microspin G50-Säulen (Pharmacia, Schweden) nach Herstellerangaben entfernt. Zur Überprüfung der Markierungseffizienz wurden 1/50 des Ansatzes in 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Roth, Karlsruhe) im Szintillationszähler LS1801 der Firma Beckman gemessen.

## 2.13 Hybridisierungstechniken

### 2.13.1 DNA:RNA Hybridisierung (alkalischer Northern-Transfer)

Von der isolierten und aufgereinigten Gesamt-RNA wurden 15-20 µg gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 2.5.1), 20 min in Transferpuffer vorequibriert und anschließend kapillarelektrophoretisch auf eine Hybond<sup>TM</sup>-XL-Membran (Amersham, Braunschweig) transferiert. Für den Größenvergleich wurden die durchstochenen Markerbanden mit einem Fettstift eingezeichnet, die Membran 5 min in 6x SSC geschwenkt, auf 3 MM-Papier getrocknet und die übertragene RNA durch zweimaliges UV-Crosslinking (2x 1200 kJ) mit dem UV-Stratalinker<sup>TM</sup> 1800 (Stratagene) fixiert.

Nach der Prähybridisierung des Filters für 1 h bei 68 °C mit 5 ml ExpressHyb-Solution (Clontech Laboratories Inc., USA) erfolgte die Hybridisierung der Membran mit 1-2 x 10<sup>6</sup> cpm markiertem, zuvor denaturiertem und abgekühltem (5 min 100 °C, 5 min Eis) PCR-Produkt pro ml ExpressHyb-Solution ÜN bei 68 °C.

Am nächsten Tag wurde durch 2 x 5 min und 3 x 10 min bei RT mit Waschpuffer I und 2 x 5-20 min bei 50 °C mit Waschpuffer II unspezifisch bzw. nicht gebundene Sonde entfernt, sodass die Aktivität des Blots ca. 50 counts/sec entsprach. Der Filter wurde in Frischhaltefolie verpackt und in einer mit Verstärkerfolie ausgekleideten Röntgenkassette auf Hyperfilm<sup>TM</sup>-MP RPN8 (Amersham Life Science) für 4 h bis 5 Tage bei -80 °C zur besseren Quantenausbeute exponiert. Durch die energiereiche Strahlung der gebundenen, radioaktiven Probe erfolgte eine Schwärzung des Röntgenfilmes.

### 2.13.2 Whole Mount *in situ* Hybridisierung (WISH)

Die *in situ* Hybridisierung an ganzen Embryonen ist eine RNA:RNA-Hybridisierungstechnik, die erstmals von Rosen und Beddington (1993) beschrieben wurde.

Für die WISH wurden Embryonen des Entwicklungsstadiums E 13,5 dpc verwendet. Um schwangere Weibchen zu erhalten, wurden am späten Nachmittag zwei 6-8 Wochen alte FVB/N-♀ mit einem FVB/N-♂ zusammengesetzt. War die Kopulation erfolgreich, bildete sich bei den Weibchen ein Vaginalpfropf, da das Ejakulat koagulierte. Am nächsten Morgen wurden die Weibchen auf diesen Pfropf hin untersucht und der Zeitpunkt als E 0,5 dpc (Embryonal-stadium 0,5 „day post-coitum“) festgelegt.

Die schwangeren Weibchen wurden an Tag 13,5 mit einer Chloroformüberdosis im Exsikkator abgetötet und die Embryonen in PBS auf Eis freipräpariert. Nach der Fixierung in 4 % PFA/PBS (Paraformaldehyd) ÜN bei 4 °C und zweimaligem Waschen für 30 min in PBS auf Eis erfolgte die Dehydrierung der Embryonen über 25%, 50%, 75% und 100%

Methanol/PBS (je 10 min, auf Eis). Bis zur weiteren Verwendung lagerten die Embryonen bei -20°C.

### **2.13.2.1 Sondenvorbereitung und nicht radioaktive DIG-Markierung durch *in vitro* Transkription**

Der zu markierende Genabschnitt wurde zunächst über eine Standard-PCR (Kap. 2.7.1) amplifiziert, in den pCR<sup>®</sup>II-TOPO-Vektor (Invitrogen, USA) nach Herstellerangaben inkloniert und durch Sequenzierung (Kap.2.10) mit den Primern M13-F und M13-R überprüft. Von einem Klon wurde Plasmid-DNA (Kap. 2.4.1.1) isoliert und 20 µg je nach gewünschter Antisense- bzw. Sense-Sonde durch Restriktion (Kap. 2.5.6) linearisiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung des Enzymes durch Proteinase K (200 µg/ml, 0,5% SDS, 1h bei 37 °C) und Aufreinigen des Ansatzes durch Phenol-Extraktion (Kap. 2.5.5) und Ethanol-Fällung (Kap. 2.5.3.2). Mit Hilfe des „Digoxigenin RNA Labelling Kits“ und den entsprechenden RNA-Polymerasen wurde die linearisierte und aufgereinigte DNA über *in vitro* Transkription in RNA umgeschrieben und gleichzeitig mit Digoxigenin markiert.

Von der linearisierten DNA wurden 2,5 µg mit 2 µl 10 x Transkriptionspuffer, 2 µl „DIG- Labelling Mix“, 2 µl SP6- bzw. T7-Polymerase, 1 µl RNase Inhibitor (40 U/µl) und 8 µl A. bidest vermischt und 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl DNase I (RNase-frei) und erneuter Inkubation für 15 min bei 37 °C erfolgte die Fällung mit 1 µl tRNA (10 µg/µl), 100 µl A. bidest, 33 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 300 µl 100 % Ethanol ÜN bei -80°C. Nach Zentrifugation (30 min, 4 °C, 14000 Upm) mit anschließendem Waschschrift (250 µl 70% Ethanol, 10 min, 4 °C, 14000 Upm) wurde das Pellet vakuumgetrocknet, in 100 µl A. bidest plus 1 µl RNase Inhibitor (40 U/µl) gelöst und gelelektrophoretisch (Kap. 2.5.1) überprüft. Die Aufbewahrung der markierten RNA-Sonden erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C.

### **2.13.2.2 Vorbehandlung und Hybridisierung**

Die Embryonen mit dem Entwicklungsstadium E 13,5 dpc wurden wie folgt vorbehandelt:

- Rehydrierung: je 10 min in 75%, 50%, 25% Methanol/PBS auf Eis
- Waschen: 2 x 10 min in PBT auf Eis
- Bleichen: 1 h in 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf Eis
- Waschen: 3 x 30 min in PBT bei RT
- Proteinase K-Behandlung (20 µg/ml in Proteinase K-Puffer): 5 min
- Waschen: 2 x 5 min in PBT mit 2mg/ml Glycin
- 2 x 5 min in PBT

3 x 5 min in RIPA-Puffer

- Nachfixieren: 20 min in 4% Paraformaldehyd/0,2% Glutaraldehyd
- Waschen: 3 x 5 min in PBT
- Prähybridisierung: 2 h 65 °C in Hybridisierungspuffer/PBT (1:1)
- Hybridisierung: ÜN bei 65 °C mit ca. 25 µg/ml denaturierter (3 min, 80 °C), DIG-markierter Sonde (Kap. 2.13.2.1)

### 2.13.2.3 Waschschritte und Antikörper-Inkubation

Durch Waschschritte und RNase-Verdau wurde ungebundene Sonde entfernt und im Anschluss die Antikörper-Inkubation durchgeführt:

- Waschen: 2 x 30 min bei 65 °C in Hybridisierungspuffer
- Abkühlen der Embryonen auf RT (5-10 min)
- Pufferwechsel: 5 min bei RT in Hybridisierungspuffer/RNase-Puffer (1:1)
- RNase-Verdau: 1 h bei 37 °C mit 100 µg/ml RNase A in RNase-Puffer
- Pufferwechsel: 5 min bei RT in RNase-Puffer/ (SSC/Formamid/Tween 20) (1:1)
- 10 min in SSC/Formamid/Tween 20 von RT auf 65 °C erhitzen
- Waschen: 1 x 10 min und 4 x 30 min bei 65 °C in SSC/Formamid/Tween 20
- Abkühlen der Embryonen auf RT (5-10 min)
- 1 x kurz in (SSC/Formamid/Tween 20)/ 1x TBST (1:1) schwenken
- 2 x 10 min bei RT in MABT
- Blocken: 1 h bei RT in 10% Blocking-Lösung
- gleichzeitig: DIG-Antikörper (Fab-Fragment, mit alkalischer Phosphatase gekoppelt) 1:5000 in 1 % Blocking-Lösung 1 h bei 4 °C inkubieren
- Antikörper-Inkubation: DIG-Antikörper (1:5000 in 1% Blocking-Lösung) zu den Embryonen geben und ÜN bei 4 °C unter ständiger Agitation inkubieren.

### 2.13.2.4 Waschen und Histochemie

Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurde 3 x 5 min und 8 x 1 h bei RT in 1x TBST gewaschen. Im Anschluss wurden die Embryonen 2-3 Tage lang mit 1x TBST bei 4 °C gespült. Mittels des „BM Purple AP Substrat“ (Roche) erfolgte die Antikörperdetektion. Dabei wurde zunächst 3 x 10 min mit alkalischem Phosphatase-Puffer gewaschen und anschließend die Färbelösung nach Herstellerangaben hinzugegeben. Die Inkubation (Über Tag bei RT oder ÜN bei 4 °C, Schüttler, Lichtgeschützt) erfolgte bis zur gewünschten Farbintensität (2 h - 4 Tage), wobei die Färbelösung einmal pro Tag ausgetauscht wurde.

Nach dem Abstoppen der Reaktion durch 2 x 10 min Waschen mit alkalischem Phosphatase-Puffer wurden die Embryonen ÜN in 4% Paraformaldehyd /PBS bei 4 °C fixiert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C in PBS.

Die gefärbten Embryonen wurden über ein Stereomikroskop (Olympus SZH10 mit Kamera „Color View 8“) mit Hilfe des Programmes „AnalySIS 3.0“ von Soft Imaging Systems dokumentiert.

## **2.14 Arbeiten mit Proteinen**

### **2.14.1 Isolierung von Proteinen**

Zur Extraktion von Proteinen wurden Zellen zunächst in 10cm-Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von 70-80% angezogen. Der Überstand wurde zur Bestimmung sezernierter Proteine abgenommen, um tote Zellen zu eliminieren 5 min bei RT und 1200 Upm (Heraeus Omnifuge2.0 RS) zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Bei den adhärent gewachsenen Zellen erfolgte nach zweimaligem Waschen mit PBS die Zelllyse mit 250 µl *IP-Lysepuffer*. Die Zellen wurden mit einem Schaber abgelöst, in Eppendorfgefäße überführt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 4 °C, 14000 Upm) wurde der Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Bei der Isolierung phosphorylierter Proteine wurde direkt heißer IP-Lysepuffer zu den Zellen gegeben, diese mit einem Schaber abgelöst und in Eppendorfgefäße überführt. Im Anschluss wurden die Proteine mit 2 x 10 Stößen am Ultraschallgerät Sonifier Cell Disrupter B15 geschallt (Leistung 40 %, Out put 4%).

### **2.14.2 Photometrische Quantifizierung nach der Bradford-Methode**

Eine einfache Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration ist der Bradford Protein Assay, der erstmalig von Bradford *et. al.* 1976 beschrieben wurde.

Zur Quantifizierung wurden 1 µl Proteinextrakt bzw. 50 µl Zellüberstand, 799 µl bzw. 750 µl A. bidest und 200 µl „BioRad Protein Assay-Reagenz“ (Fa. BioRad) vermischt, 5 min bei RT inkubiert und anschließend im Photometer bei 595 nm gegen A. bidest als Referenz gemessen. Mit Hilfe der zuvor erstellten Eichgerade, bei der genau definierte Mengen BSA (Bovines Serumalbumin) gemessen worden waren, konnte die Proteinkonzentration errechnet werden.

### 2.14.3 Fällung von Proteinen

Nach der Quantifizierung wurde die gewünschte Proteinmenge mit dem neunfachen Volumen eiskaltem Aceton versetzt und ÜN bei -20 °C gefällt. Im Anschluss erfolgte die Pelletierung der ausgefallenen Proteine für 10 min bei 4 °C und 14 000 Upm (Eppendorf 5417R). Nach Vakuumtrocknung wurden die Proteine in 15 µl 2x Proteinladepuffer gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Fällung von Proteinen aus dem Zellüberstand erfolgte entweder mit Aceton wie oben beschrieben oder mit Trichloressigsäure. Hierbei wurde der zu fällenden Proteinmenge  $\frac{1}{10}$  Volumen 100%ige, eiskalte Trichloressigsäure zugegeben und der Ansatz ÜN auf Eis im Kühlschrank gefällt. Im Anschluss erfolgte eine Pelletierung für 45 min bei 4 °C und 11000 Upm (Sorvall RC5C) und ein zweimaliger Waschschrift mit jeweils 5 ml 100% Ethanol unter den gleichen Bedingungen wie zuvor die Fällung. Das gewaschene Proteinpellet wurde vakuumgetrocknet, in 2x Proteinladepuffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.14.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine unabhängig von ihrer Eigenladung lediglich nach dem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS, *Sodium dodecyl sulfate*) bindet an die Proteine und überdeckt dabei deren Eigenladung. Die nun einheitlich durch SDS negativ geladenen Aminosäureketten können auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch spezifisch ihrer Größe nach aufgetrennt werden.

Zunächst wurde sowohl das Sammel- als auch je nach Proteingröße das 10-15%ige Trenngel in der Gießvorrichtung hergestellt (Rezeptur siehe Kap. 2.15.3). Nachdem die bereits nach der Fällung in 2x Proteinladepuffer aufgenommenen Proteine 7-8 Minuten bei 100 °C denaturiert worden waren, erfolgte im Anschluss für 2-3 h bei 80-100 V in 1x Laufpuffer die elektrophoretische Auftrennung der Proteine. Als Marker diente der „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ bzw. der „PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus“ der Firma Fermentas.

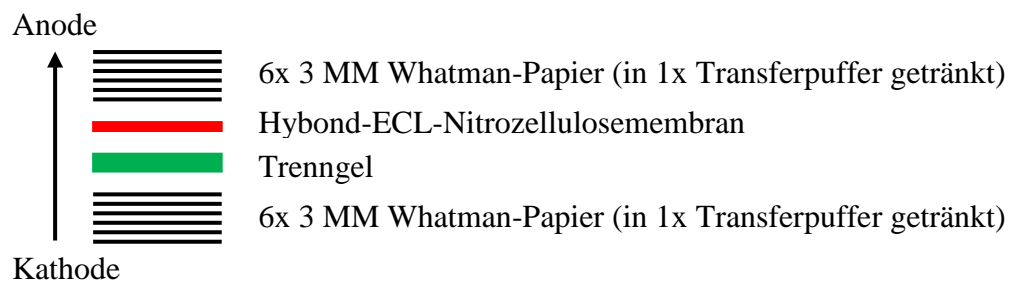
### 2.14.5 Western-Blot: Proteintransfer und Immunodetektion

Bei einem Western-Blot werden die über die SDS-Page aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran (Nitrozellulose) transferiert um spezifisch die zu untersuchenden Proteine über Immunodetektion nachzuweisen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes mittels einer *Semi-Dry-Blottingapparatur* wandern die Proteine in Richtung Anode und bleiben dabei an



der Membran haften. Das ursprünglich im Gel erhaltene Trennmuster der Proteinmoleküle bleibt dabei erhalten. Die Immunodetektion erfolgt in zwei Schritten. Der Erstantikörper bindet spezifisch an das zu untersuchende Protein, dieser wiederum wird durch einen mit einer Meerrettichperoxidase (*Horseradish Peroxidase* (HRP)) gekoppelten Zweitantikörper erkannt. Die enzymatische Aktivität dieser Peroxidase bewirkt in Anwesenheit von  $H_2O_2$  die Oxidation von Luminol, wobei Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm detektiert werden kann.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele als auch bereits vorbereitete Hybond-ECL-Nitrozellulosemembranen (Fa. Amersham, Freiburg) in 1x Transferpuffer kurz equilibriert. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut:



Der Transfer erfolgte 1 Stunde bei 180 mA. Mit Anlegen des Stromes wurden die durch das angelagerte SDS negativ geladenen Proteine auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Im Anschluss wurden die ebenfalls mit transferierten Markerbanden mit einem Fettstift markiert und die Membranen zur Blockierung freier Bindestellen 1 Stunde bei RT auf einem Schüttler in Blocking-Lösung (1x PBS, 5% Magermilchpulver, 0,05% Tween 20) inkubiert. Danach erfolgte die Hybridisierung mit dem Erstantikörper (Verdünnung 1:200-1:1000 in Blocking-Lösung) ÜN bei 4 °C auf einem Schüttler. Zur Entfernung ungebundener Erstantikörper wurden die Membranen 3 x 45 min mit 1x PBS/0,05% Tween 20 gewaschen und anschließend 1 h mit dem Zweitantikörper (1:2000-1:5000 in Blocking-Lösung) bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Nach erneuten Waschschritten (3 x 15 min mit 1x PBS/0,05 % Tween 20 und 1 x 10 min mit 1x PBS) erfolgte die Detektion der Proteine mit Hilfe des *ECL Western Blotting Detection reagent* (Fa. Amersham, Freiburg). Hierzu wurde frisch gemischte ECL-Lösung 2 min auf den Membranen inkubiert, die Blots in Klarsichtfolie verpackt und anschließend die Chemilumineszenz durch Auflegen eines Röntgenfilmes (Fa. Amersham, Freiburg) für 5 sec - 60 min detektiert.

Beim Nachweis phosphorylierter Proteine wurde als Puffersystem 1x TBS anstatt 1x PBS verwendet.

Um die Membranen für eine erneute Hybridisierung verwenden zu können wurden diese zunächst 10 min in 1x PBS und 5 min in A. bidest bei RT auf dem Schüttler gewaschen, bevor für 10 min mit 0,3 M Natronlauge die gebundenen Antikörper entfernt wurden. Im Anschluss wurde erneut 5 min mit A. bidest und 10 min mit 1x PBS gewaschen. Danach konnte, nach erneutem Blocken der Membranen, die Hybridisierung mit dem nächsten Antikörper erfolgen.

## 2.15 Anhang

### 2.15.1 Verwendete Primer

Name	Sequenz (5`-3`)
124E18-1F	5`- ATG TAG GAT CTG GGC AGT GG - 3`
pUhrT-1R	5`- GCG AGT TTC CTT GTC GTC AG - 3`
pUhrT-2F	5`- GGG TTA TTG TCT CAT GAG CGG - 3`
124E18-2R	5`- ATG GCC GAG AGT CTA CAC TG - 3`
pUHD10-3-1F	5`- CAC CTG ACG TCT AAG AAA CC - 3`
ADAM-TS5-1R	5`- CCG CCA GAG TAG AGT TGG TC - 3`
124E18-2F	5`- CAG TGT AGA CTC TCG GCC AT - 3`
124E18-3R	5`- CCA CTG CCC AGA TCC TAC AT - 3`
pAUF-8	5`- GAG GGT CG GGT CTC TTT GG - 3`
pUHD-10R	5`- CGG TCC CGG TGT CTT CTA TG - 3`
ADAM-TS5-1F	5`- GAC CAA CTC TAC TCT GGC GG - 3`
ADAM-TS5-2R	5`- CCC ATC CGT AAC CTT TGG AG - 3`
ADAM-TS5-2F	5`- TCT TTT CGC CAT GAG CAG TG - 3`
Adamts5-Xba-Start	5`- GGC TCT AGA CGC ACT ATG CGG CTC GAG - 3`
Adamts5-Xba-Stop	5`- AAA CTC TAG ACT AAC ATT TCT TCA GC - 3`
Col.2-3016-3033	5`- GGT CTC CTG CCT CCT CCT - 3`
Col.2-3120-3112	5`- GCC CTG ACA CCG TAG GAC - 3`
Col.2-R-5`-control	5`- TTT CGT GAG CCC AGC TTC - 3`
Col.2-F-3`-control	5`- TCG ATC TGG CCA TAC ACT TG - 3`
Col.2a-F	5`- TCG ACG GAA TTC GAT GCT CC - 3`
Col.2a-R	5`- TCT TCT TCT TGG GCA TGG CC - 3`
pUHD10F-3	5`- GTG TAC GGT GGG AGG CCT AT - 3`
2N-R	5`- GCT GCA GGC CCC GCC CAT - 3`
TS3-F	5`- CAA GCG TTT AAT GTC TTC AAT CC - 3`
TS4-R	5`- ACC ACA GCA CAC CAC AGC - 3`
pUHD10-3muta-1F	5`- AGG CCC TTT CGT CGT CGA CTT TAC CAC TCC - 3`
pUHD10-3muta-1R	5`- GGA GTG GTA AAG TCG ACG ACG AAA GGG CCT - 3`
pUHD10-3muta-2F	5`- GGG AAG TAT CAG GTC GAC CAA GCT TGG CGA - 3`
pUHD10-3muta-2R	5`- TCG CCA AGC TTG GTC GAG CTG ATA CTT CCC - 3`
124E18-4R	5`- CTC AAA ACA ATG GCC GAG AG- 3`
Linker-control F	5`- GCT GCT AGC TAA CCG ATC AG - 3`
pUhrT-3F	5`- TTT AGA AAA ATA AAC AAA TAG GGG TTC - 3`
124E18-5R	5`- GTG GGG GCA TTT AAT TCC TT - 3`
TS2A-R	5`- GCG ATG ATC CTC CTG TTG TT - 3`
ts5-ATG	5`- ATG CGG CTC GAG TGG GCG TC - 3`
pUHD10F-2	5`- GTA TCA CGA GGC CCT TTC GT - 3`
pUHD10-R1	5`- TTG AGC AAC TGA CTG AAA TGC- 3`
Adamts5-3F	5`- CAG ACC CAA CTA AAG CGC TAG - 3`
Xba-Stop-F	5`- GAA ATG TTA GTC TAG AGG ATC C - 3`
rtTA-For1	5`- CCA TGT CTA GAC TGG ACA AGA G - 3`

rtTA-For2	5`- TTT ACA CTG GGC TGC GTA TTG - 3`
rtTA-Rev6	5`- GGC TGG GAG CAT GTC TAA GTC - 3`
62-1rtTA-rev	5`- CAT AGA ATC GGT GGT AGG TGT C - 3`
Adam-TransgenF	5`- AGG ATC CCT GAA GGA GCA AC - 3`
SV40pA-R	5`- GGT TTG TCC AAA CTC ATC AAT G - 3`
hGFP-LacZ-12	5`- CAG GGC CGT CGC CGA TTG G - 3`
hGFP-LacZ-13	5`- GCG GAG AGG GTG AAG GTG ATG C - 3`

Name	Sequenz (5`-3`)
FGFR3-C1	5`- GGA CAG CTC AGC TCC ACA GC - 3`
FGFR3-E	5`- CTG AAT GCC TCC CAC GAG GAC T - 3`
FGFR3-F	5`- GAA CTC CCT GCC GTT CTT CAG - 3`
FGFR3-G	5`- AGC GGA TGG ACA AGA AGC TGC T - 3`
FGFR3-I	5`- CTA CAC CTG CGT CGT GGA GAA C - 3`
FGFR3-Pub II	5`- TGA ACA GGA AGA AGC CCA CC - 3`
FGFR3-Pub I	5`- GCG CTA ACA CCA CCG ACA AG - 3`
FGFR3-P1	5`- AGG CCA TCG GCA TTG ACA AGG A - 3`
FGFR3-P2	5`- GCA GAA ACT CCC GCA GGT TAC - 3`
FGFR3-R	5`- CTT CAT CAC GTT GTC CTC GGT C - 3`
FGFR3-Q	5`- CTG TAC GTG CTG GTG GAG TAC - 3`
FGFR3-T	5`- CAG CGT GAA GAT CTC CCA GAG - 3`
FGFR3-U1	5`- TGA CCG AGT CTA CAC TCA CCA - 3`
FGFR3-U2	5`- CTG CTT GAA GGT GGG CCT CTG - 3`
3`-UTR-2F	5`- CTT ATT GAC AAC CGA GAA GG - 3`
3`-UTR-1F	5`- ACA TGT CCA GCA CCT TGT GCC TG - 3`
FGFR3-TD1	5`- CCT GTC GGC GCC TTT CGA GCA GTA C - 3`
3`-UTR-1R	5`- TTC AGT CTC TGA GGG GCA GG - 3`
3`-UTR-2R	5`- CCC TGC CTG GGA CAC ACA GC - 3`
FGFR3-V	5`- GTA CAT GAT CAT GCG GGA GTG C - 3`
FGFR3-W	5`- CTC ACA TTG TTG GGG ACC AGT G - 3`
FGFR3-W1	5`- GTT TGC CCA CGA CCT GCT GCC - 3`
FGFR3-NheI-Start	5`- TTA AGC TAG CCG CCA TGG GCG CCC C - 3`
FGFR3-NheI-Stop	5`- ATC GGC TAG CAA GCT TTG AAA GGT AG - 3`
FGFR3-D	5`- ACA CTG AAG TGG CAC AGT ACG - 3`
FGFR3-UR1	5`- CGT CCC CAA GGA CTC CGA CCA - 3`
FGFR3-C	5`- CAG CAG GAG CAG TTG GTC TTC G - 3`
FGFR3-UF1	5`- TCC TCG GAG TCC TTG GGG ACG - 3`
3`-UTR-3F	5`- TGC TTC TAG AGT TTT ATA GCC - 3`
FGFR3-ACH-R	5`- GGA AGA AGC CCA CCC TGT AGC TGA GGA TGC C - 3`
FGFR3-ACH-F	5`-GGC ATC CTC AGC TAC AGG GTG GGC TTC TTC C - 3`
FGFR3-H	5`- GCA CGT CCA GCG TGT ACG TCT G - 3`
FGFR3-K	5`- GTC CTC AAA GGT GAC GTT GTG C - 3`
FGFR3-UF3	5`- ACC CTA CGT TAC CGT GCT CAA - 3`
FGFR3-M	5`- GTT GGA GCT CAT GGA CGC GTT G - 3`
FGFR3-A	5`- AGG AGC TGG TGG AGG CTG A - 3`
FGFR3-D1	5`- GCT GAG GAC ACA GGT GTG GAC - 3`
FGFR3-N1	5`-GCT GGC CAA TGT CTC CGA GCT C - 3`
FGFR3-O1	5`- GCC TCC GCC ATG ACC ACC TGG CC - 3`
FGFR3-S	5`- TGC ATC CAC AGG GAC CTG GCT G - 3`
FGFR3-TD2	5`- CAC CAG CAG CAG GGA GGG CTG CTA G - 3`
hMMP13-LC-F	5`- TGA GCT GGA CTC ATT GTC GG - 3`
hMMP13-LC-R	5`- TTG CCA GTC ACC TCT AAG CC - 3`
MMP13-F	5`- TAA ACA TCC AAA AAC GCC AGA C - 3`
MMP13-R	5`- TGA CGC GAA CAA TAC GGT TAC - 3`
rSTC1-1rqf	5`- CAG CCT GAT GGA GAA GAT CG - 3`
rSTC1-1rqr	5`- CTG CTT ACG CAT TCT CTT GG - 3`
STC-ORFf	5`- TTC ACT CAA GCC AGG AGA GG - 3`
STC-ORFr	5`- GGC AGA ATG GTC ACA TGG AT - 3`

hSTC1-F	5`- CAC ACC CAC GAG CTG ACT TC- 3`
hSTC1-R	5`- TCT CCC TGG TTA TGC ACT CTC A- 3`
ESM1-S1	5`- ATG AAG AGC GTC TTG CTG CTG- 3`
ESM1-R1	5`- CAG CGT GGA TTT AAC CAT TTC C- 3`

Name Sequenz (5`-3`)

Maus-Aktin 1	5`- GTG GGC CGC TCT AGG CAC CA - 3`
Maus-Aktin 2	5`- TAG CCC TCG TAG ATG GGC ACA G - 3`
hPDH-E9F	5`- GAC CAA TGG ACA TGG AAA CC - 3`
hPDH-E10R	5`- TGG CAA CCG TAA CAG ACA AA - 3`
pBI6	5`- AGA TGC TCA AGG GGC TTC AT - 3`
wt1-k.o.contr-F1	5`- GCT CTG TCA AAT GCG AGT GA - 3`
wt1-k.o.contr-R	5`- CAC GTT ACA GCC AAC CTC CT - 3`

## 2.15.2 Konditionen der Quantitativen *real-time* PCR's

### hPDH (Primer: E9F/E10R)

10 min	95 °C	} 40 Zyklen
2 sek	95 °C	
5 sek	63 °C	
15 sek	72 °C	

Primerkonzentration: 4 pmol  
MgCl<sub>2</sub>-Konzentration: 1,2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)

### hMMP13 (Primer: hMMP13-LC-F/R))

10 min	95 °C	} 40 Zyklen
2 sek	95 °C	
5 sek	62 °C	
8 sek	72 °C	

Primerkonzentration: 4 pmol  
MgCl<sub>2</sub>-Konzentration: 1,2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)

### hFGFR3 (Primer: U1/U2)

10 min	95 °C	} 40 Zyklen
2 sek	95 °C	
5 sek	64 °C	
8 sek	72 °C	

Primerkonzentration: 5 pmol  
MgCl<sub>2</sub>-Konzentration: 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)

### rtTA (Primer: LC-F/R))

10 min	95 °C	} 40 Zyklen
5 sek	95 °C	
5 sek	61 °C	
10 sek	72 °C	

Primerkonzentration: 5 pmol  
MgCl<sub>2</sub>-Konzentration: 1,2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)

### hSTC1 (Primer: F/R)

10 min	95 °C	} 40 Zyklen
2 sek	95 °C	
5 sek	64 °C	
6 sek	72 °C	

Primerkonzentration: 5 pmol  
MgCl<sub>2</sub>-Konzentration: 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)

### mWt1 (Primer: wt1-k.o. contr. F1/R))

10 min	95 °C	} 40 Zyklen
5 sek	95 °C	
5 sek	65 °C	
10 sek	72 °C	

Primerkonzentration: 4 pmol  
MgCl<sub>2</sub>-Konzentration: 1,2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)

## 2.15.3 Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen

Rezeptur für 2 Gele:	Sammelgel	Trenngel - 10%	Trenngel - 12,5%	Trenngel - 15%
A. bidest	3,74 ml	3,85 ml	3 ml	2,25 ml
30% Acrylamid (37,5:1)	830 µl	3,4 ml	4,2 ml	5 ml
2 M Tris pH 6,8	315 µl	-	-	-
1,5 M Tris pH 8,8	-	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml
20 % SDS	25 µl	50 µl	50 µl	50 µl
10 % APS	50 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	5 µl	4 µl	4 µl	4 µl

## 2.15.4 Puffer und Lösungen

Agarosegel ( x %ig)	X g Agarose 100 ml 1 x TBE-Puffer
Agarplatten	15 g Agar-Agar ad 1000 ml LB-Medium
alk. Phosphatase-Puffer (WISH)	1 ml 5 M NaCl 2,5 ml 1M MgCl <sub>2</sub> 50 µl Tween 20 5 ml 1M Tris, pH 9,5 2 mM Levamisole ad 50 ml A. bidest
Annealing-Buffer (Linker)	100 mM Kaliumacetat 30 mM HEPES-KOH pH 7,4 2 mM Magnesiumacetat
6x Blaumarker	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 15% Ficoll 400
10% Blocking-Lösung (WISH)	10% Blocking Reagenz in MAB lösen Autoklavieren 0,1 % Tween 20 hinzugeben
β-Galaktosidase-Färbelösung	5 mM K <sub>3</sub> Fe (CN) <sub>6</sub> 5 mM K <sub>4</sub> Fe (CN) <sub>6</sub> 2 mM MgCl <sub>2</sub> 1mg/ml X-Gal/Dimethylformamid (DMF)
deionisiertes Formamid	10 g BioRad AG501-X8 ad 100 ml Formamid 10-15 min inkubieren, filtrieren, bei -20 °C lagern
Ethidiumbromid-Lösung 15 %ige EDTA-Lösung	5 µg/ml Ethidiumbromid in A. bidest 25 g EDTA 8,25 g Tris-HCl pH 7,0 ad 250 ml A. bidest
Färbe-Lösung (WISH)	7 ml BM Purple AP Substrat 2 mM Levamisole 0,1 % Tween 20 10 min bei 3200 Upm zentrifugieren Überstand als Färbelösung verwenden
2x FM-Medium	65 % Glycerol 10 mM MgSO <sub>4</sub> 25 mM Tris-HCl, pH 8,0
Fixierlösung (β-Gal-Fbg.)	0,2 % Glutaraldehyd 5 mM EGTA pH 7,3 2 mM MgCl <sub>2</sub> 2 % gepuffertes Formalin in PBS ansetzen
4 % gepuffertes Formalin	400 ml PBS 280 ml 37 % Formaldehyd ad 2000 ml A. bidest
10x Formaldehyd -Gelladepuffer	50% Glycerol 10 mM EDTA (pH 8.0) 0.25 % Bromphenolblau 0.25 % Xylencyanol
2 x HBS-Puffer	10 g/l HEPES 16 g/l NaCl pH 7,1
Hybridisierungspuffer (WISH)	50% deionisiertes Formamid 0,75 M NaCl 1x PE 100 µg/ml tRNA 500 µg/ml Heparin 0,1% BSA

IP-Lysepuffer	0,5% SDS 10 mM Tris pH 7,5 140 mM NaCl 5 mM EDTA 1% Triton X-100 1 mM DTT (frisch zugeben) 1 mM PMSF (frisch zugeben)
LB(Luria Broth)-Medium	10 g Bacto-Tryptone 5 g Bacto-Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1000 ml A. bidest pH 7,5
LB <sub>AMP</sub> -Platten	100 µg/ml Ampicillin 40 µg/ml X-Gal 48 µg/ml IPTG ad 1 l LB-Agar
10 x Laufpuffer (Westernblot)	24,8 mM Tris 192 mM Glycin 1 % SDS
Loading-Buffer für Sequenzgele	5 Vol. deionisiertes Formamid 1 Vol. 25 mM EDTA (pH 8,0) 50 mg/ml Blue Dextran
1x MAB (WISH)	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl pH 7,5
1x MABT (WISH)	1x MAB 0,1 % Tween 20
25%, 50%, 75% Methanol/PBS	25, 50 bzw. 75 ml Methanol ad 100 ml PBS für Whole Mount
10 x MOPS (Northern)	200 mM MOPS (( N-morpholin) Propan Sulfonsäure), pH 7,0 20 mM Natriumacetat 10 mM EDTA, pH 8,0
Orange Dye Marker	30 % Sucrose 0,35 % Orange G
4% Paraformaldehyd (PFA)/PBS	4 g Paraformaldehyd ad 100 ml PBS (bei 55 °C lösen) pH 6-7
10x PBS (Western Blot) (Phosphate buffered saline)	80 g NaCl 2 g KCl 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 11,5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / 7 x H <sub>2</sub> O ad 1l A. bidest
PBT-Puffer (WISH)	PBS 0,1 % Tween 20
10 x PCR-Puffer	500 mM KCl 100 mM Tris-HCl (pH 8,3) 0,1 % Gelatine 15 mM MgCl <sub>2</sub> pH 7,2-7,4
10x PE (WISH)	100 mM PIPES pH 6,8 10 mM EDTA pH 8,0
4% PFA/0,2% Glutaraldehyd	25 ml 4% Paraformaldehyd/PBS 200 µl Glutaraldehyd
6 x Proteinladepuffer	350 mM Tris-HCl pH 6,8 34,4% Glycerol 10 % SDS 10 % β-Mercaptoethanol 0,06 % Bromphenolblau
Proteinase K-Puffer (WISH)	10 ml 1M Tris pH 7,0 1 ml 0,5 M EDTA ad 500 ml mit A. bidest
100 x PO <sub>4</sub> -Puffer	35 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

Puffer 1 (Qiagen) (Resuspendierungspuffer)	35 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA pH 8,0
Puffer 2 (Qiagen) (Lysepuffer)	200 mM NaOH 1 % SDS
Puffer 3 (Qiagen) (Neutralisierungspuffer)	2,55 M Kaliumacetat pH 4,8
10 x Puffer für DNase-Verdau	100 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM DTT
QBT- Puffer (Qiagen)	50 mM MOPS 750 mM NaCl 15 % Ethanol 0,15 % Triton X-100 pH 7,0
QC- Puffer (Qiagen)	50 mM MOPS (( N-morpholin) Propan Sulfonsäure) 1 M NaCl 15 % Ethanol pH 7,0
QF-Puffer (Qiagen)	1,25 M NaCl 50 mM Tris 15 % Ethanol pH 8,5
RIPA-Puffer (WISH)	2,5 ml 10% SDS 15 ml 5 M NaCl 5 ml NP-40 25 ml 10% Deoxycholat 1 ml 0,5 M EDTA 25 ml 1 M Tris, pH 8,0 ad 500 ml mit DEPC-Wasser
RNase-Puffer (WISH)	1 ml 5 M NaCl 100 µl 1 M Tris-HCl, pH 7,5 10 µl Tween 20 8,89 ml A. bidest
20x SSC (Standard Saline Citrat)	3 M NaCl 0,3 M tri-Natrium-Dihydrat pH 7,0
SSC/Formamid/Tween 20 (WISH)	5 ml 20x SSC, pH 7,0 25 ml deionisiertes Formamid 50 µl Tween 20 ad 50 ml A. bidest
10 x TBS (Tris Buffered Saline)	24,2 g Tris 80 g NaCl pH 7,6 ad 1000 ml A. bidest
<i>Tail</i> -Lysepuffer	50 mM Tris pH 8,0 100 mM EDTA 100 mM NaCl pH 8,0 1% SDS
10 x Transferpuffer (Westernblot)	24,8 mM Tris 192 mM Glycin 90 mM Tris 90 mM Borsäure 1,25 mM Na <sub>2</sub> EDTA
1 x TBE (Tris-Borat-EDTA)	8 g NaCl 0,2 g KCl 25 ml 1 M Tris, pH 7,5 10 ml Tween 20 ad 100 ml A. bidest
10x TBST (WISH)	100 mM Tris-HCl; (pH 7,0 – 8,0) 10 mM EDTA (pH 8,0)

Transferpuffer (Northern-Blot)	0,01 N NaOH
	3 M NaCl
Wasch-Lösung ( $\beta$ -Gal-Fbg.)	2 mM MgCl <sub>2</sub>
	0,1 % Na-Deoxycholat
	0,2 % NP-40
	in PBS ansetzen
Waschpuffer I (Northern-Blot)	2x SSC
	0,05% SDS
Waschpuffer II (Northern Blot)	0,1x SSC
	0,1% SDS

### 2.15.5 Enzyme und Kits

Taq-Polymerase	Axon
DNase I (RNase frei)	Roche Diagnostic
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen
Ribonuclease Inhibitor (RNase-Inhibitor)	Fermentas
alk. Phosphatase	Roche Diagnostic
Proteinase k	Roche Diagnostic, PeqLab
RNase A	Sigma, Deisenhofen
SP6- und T7-RNA-Polymerase	Roche Diagnostic, Mannheim
Klenow Exo <sup>-</sup>	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase <i>hc</i>	Invitrogen
Expand <sup>TM</sup> High Fidelity PCR System	Roche Diagnostic
alle weiteren Enzyme	New England Biolabs, Roche Diagnostic, Invitrogen
LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostic
QuickChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Digoxigenin RNA Labeling Kit	Roche Diagnostic
Prime It® Random Primer Labeling Kit	Stratagene
ABI PRISM <sup>TM</sup> BigDye <sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix Version 3.1	Applied Biosystems
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen

### 2.15.6 Molekulargewichtsstandards und Nukleotide

100 bp - und 1 kb-Marker	Invitrogen, New England Biolabs
Hind III-restringierte $\lambda$ -DNA	Roche Diagnostic
RNA-Ladder High Range	Fermentas
PageRuler <sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder	Fermentas
PageRuler <sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas
dNTPs	Promega, Invitrogen

### 2.15.7 Radioisotope

[ $\alpha$ <sup>32</sup> P]-dCTP	Amersham Life Science
----------------------------------	-----------------------

### 2.15.8 Antikörper

DIG-Antikörper (Fab-Fragment, mit alk. Phosphatase gekoppelt)	Roche Diagnostic
FGFR3 (Rabbit polyklonal IgG)	Santa Cruz Biotechnology
p-STAT-1 (Rabbit polyklonal IgG)	Santa Cruz Biotechnology
STAT-1 p84/p91 (Rabbit polyklonal IgG)	Santa Cruz Biotechnology
STC1 (Rabbit polyklonal IgG)	Santa Cruz Biotechnology
Aktin (Goat polyclonal IgG)	Santa Cruz Biotechnology
p-p44/42 MAPK (Rabbit polyclonal IgG)	Cell Signaling
p21 (Rabbit polyclonal IgG)	Santa Cruz Biotechnology
p44/42 MAPK (Rabbit polyclonal IgG)	Cell Signaling
ADAM-TS5 C-terminales Ende (Rabbit polyklonal)	Cerdarlane



Goat Anti-Rabbit IgG-HRP  
Rabbit Anti-Goat IgG-HRP

Santa Cruz Biotechnology  
Santa Cruz Biotechnology

### 2.15.9 Bakterienstämme

#### E. coli **DH5 $\alpha$** :

F-, supE44, hsdR17, recA1,  $\Delta$ lacU169,  $\phi$  80dlacZDM15, endA1, gyrA96, (rk-, mk+), thi-1, relA1, supE44,  $\lambda$ -

#### E. coli **TOP 10** (Fa. Stratagene):

F-, mcrA,  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC),  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ lacX74, deoR, recA1, araD139,  $\Delta$ (ara-leu)7697, galU, galK, (Str<sup>R</sup>), endA1, nupG

#### E. coli **XL-1Blue** (Supercompetent Cells; Fa. Stratagene):

recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F', proAB, lacI<sup>q</sup> Z $\Delta$ M15, Tn10, (Tet<sup>f</sup>)]

#### E. coli **XL10-Gold** (Ultracompetent Cells; Fa. Stratagene):

Tet<sup>R</sup>,  $\Delta$ (mcrA)183,  $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, rel A1, lac, The, [F'proAB lacI<sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>R</sup>) Amy Cam<sup>R</sup>]<sup>a</sup>

### 2.15.10 Chemikalien, Materialien und Geräte

#### Chemikalien:

**A**cton (Sigma, Roth); Ascorbinsäure (Invitrogen); Amphoterin (Biochrom); Agarose SeaKem LE (Invitrogen); 30 % Acrylamid (37,5:1) (Roth) ; Ammoniumacetat(Merck); Ammoniumpersulfat (Amresco); Ampizillin (Ratiopharm) ; **B**acto-Hefeextrakt(Difco); Bacto-Tryptone (Difco); BioRad AG501-X8 (BioRad) ; Blocking Reagenz (Roche Diagnostic); Blue Dextran (Fluka); Borsäure (Merck); Bromphenolblau (Sigma); BSA (Bovines Serum Albumin)(Sigma); **C**hondroitinsulfat C (Haifischknorpel) (Sigma); **D**eoxycholat (Sigma); Doxzyklin (Sigma); 1,9-Demethylmethylenblau (Sigma); DMEM (Invitrogen); **D**imethylsulfoxid (DMSO) (Merck); Dithiothreitol (DTT) (Gibco BRL); **E**osin (Sigma); Ethanol absolut (Fluka, Roth, Sigma); **E**thylenglykoltetraessigsäure (EGTA) (Roche Diagnostic); Ethidumbromid (Roth); **E**thylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Sigma); **F**KS hitzeinaktiviert, Tetrazyklin-Frei (Invitrogen); Ficoll 400 (Pharmacia); 37 % Formaldehyd (Sigma); Formamid (Roth, Fluka, Sigma); **G**lutaraldehyd (Sigma); L-Glutamin (Invitrogen); Glycerol (Sigma); Glycin (Sigma, Merck); **H**ämatoxylin (Merck); HEPES (Merck); Heparin (Sigma); **I**PTG (AppliChem); Isoamylalkohol (Merck); Isopropanol (Fluka, Sigma, Roth) ; **K**aliumacetat (Merck, Roth); Kernechtrot (Chroma); Kaliumchlorid (Merck, Roth); Kaliumhexacyanidoferrat(II) (Roche Diagnostic); Kaliumhexacyanidoferrat(III) (Roche Diagnostic); Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Roth); **L**evamisole (Sigma); **M**agnesiumchlorid (Merck); Maleinsäure (Sigma);  $\beta$ -Mercaptoethanol (BioRad) ; Methanol (Sigma, Roth); MgSO<sub>4</sub> (Merck); MOPS ((**N**-morpholin) **P**ropan Sulfonsäure) (Sigma) ; **N**atriumacetat (Merck); Natriumchlorid (Roth); Natriumdo-decylsulfat (SDS) (Fluka, Roth); di-Natriumhydrogenphosphat (Merck, Roth); Neomycin (PAA Laboratories) ; Natronlauge (Merck); NP-40 (Sigma); **O**pti-MEM-Medium (Invitrogen); Orange G (Sigma); **P**enizillin/ Streptomycin (Invitrogen); Paraformaldehyd (Merck, Fluka, Roth); Phenol/Chloroform (Roth); PBS (Zellkultur) (Invitrogen); PMSF (Sigma); PIPES (Sigma); **S**ucrose (Gibco BRL); Szintillationsflüssigkeit "Rotiszint plus" (Roth); **T**ris (Roth); Trichlormethan (Roth); TEMED (Roth) ; Tris-HCl (Roth); Triton X-100 (Sigma); Trizol<sup>®</sup> (Gibco BRL); tRNA (Roche Diagnostic); Trichloressigsäure (MP Biomedicals Inc.); Trypsin/EDTA (Invitrogen); Toluidinblau (Sigma); Tween 20 (Sigma); **W**asserstoffperoxid (Merck); **X**ylencyanol F (Sigma); X-Gal (Appli-Chem); Xylol (Roth).

Alle nicht hier aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth, Invitrogen, Roche Diagnostic oder Sigma bezogen.

#### Materialien:

**B**M Purple AP Substrat (Roche Diagnostic); BioRad Protein Assay Reagenz (BioRad); **E**xpressHyb<sup>™</sup> Solution (Clontech Laboratories) ; Entellan (Merck); ECL Western Blot detection reagent (Amersham Life Science) ; EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) ; **G**el-Blotting-Paper (3MM) (Schleicher & Schüll) ; **H**ybond<sup>™</sup>- ECL<sup>™</sup> Nitrocellulose Membran (Amersham Life Science) ; **L**ipofectamine<sup>™</sup>2000 (Invitrogen); **M**agermilchpulver (Heirler); Microspin<sup>™</sup> G50-Säulen (Pharmacia); **N**ylon Transfermembran Hybond<sup>™</sup>-XL (Amersham Life Science); **P**araffin (Sherwood Medical); **Q**IAquick Gel Extraction Kit (Qiagen); Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen); **R**apid Pure Miniprep Kit (Q-Biogene); RNeasy Mini Kit (Qiagen); Röntgenfilm Hyperfilm<sup>™</sup>-MP RPN6 (Amersham Life Science); Röntgenkassetten Quanta III, Cronex Cassette (Du Pont) ; **U**Vette (Eppendorf); **T**issue Tek (Sakura).

#### Geräte:

**B**akterienschüttelinkubator (Gallenkamp); Brutschrank (Heraeus); ; **CO**<sub>2</sub>-Brutschrank,Zellkultur (Heraeus); **D**NNA-Sequenziergerät ABI PRISM™ 377 (Applied Biosystems GmbH); **E**inbettautomat EG1140H (Leica); Entwicklermaschine X-OMAT 35 (Kodak); Elektrophoresekammer (Renner); **F**luoreszenzmikroskop IX70 (Olympus); **G**el-Imaging-System (Fröbel Labortechnik); **H**omogenisator IKA® Ultraturrax T25 (IKA® Labortechnik); Hybridisierungsöfen HB-1D (Techne); Hybridisierungsöfen (Bachhofer Laboratoriumsgeräte); **K**ryostat MGW Lauda (Leica); **L**ightCycler 1.5 (Roche ); **M**ikrotom RM 2165 (Leica); **pH**-Meter Inolab pH Level 1 (Labotech); Photometer GeneQuant, RNA/DNA-Calculator (Pharmacia Biotech); Power Supply Electrophoresis EPS300 (Pharmacia Biotech); Power Supply Electrophoresis EPS300, (Pharmacia Fine Technicals); Power Supply Electrophoresis EPS1000 (Pharmacia Biotech); Power Supply Model 250/2.5 (BioRad ); **S**peed-Vac Univapo 100H (Uniequip); Spiegelreflex-Kamera OM2 (Olympus); Sterilbank (Holten); Semi-Dry-Blotting Apparat (Biometra); Szintillationszähler Liquid Scintillation System LS1801 (Beckman); Schüttler IKA VIBRAX VXR (Janke & Kunkel); **T**hermocycler PTC-100™ (MJ Research Inc ); Thermocycler PTC-200™ (MJ Research Inc); **U**ltraschallstab Sonifier Cell Disrupter B15 (Branson); UV-Stratalinker™ 1800 (Stratagene); **W**aage LC820 (Sartorius); Wasserbad Julabo U3 (Julabo); Wasserbad Julabo 13 (Julabo); Wasserbad Haake D8 (Windaus); Wasserbad Haake G (Windaus); Wasserbad Thermomix ME7P (Braun Biotech International); **Z**entrifuge Eppendorf 5417R (Eppendorf); Zentrifuge Hettich EBA 12R (Hettich); Zentrifuge Sorvall RC5C (Du Pont); Zentrifuge Sorvall @RT7 (Du Pont); Zentrifuge Heraeus Omnifuge 2.0 RS (Heraeus).

### 3 Ergebnisse

In vielerlei Hinsicht sind Erkrankungen des Knorpel/Knochen-Apparates mit einer signifikanten Verminderung der Lebensqualität verbunden. Beispielsweise die genetisch bedingte Gruppe der Chondrodysplasien, insbesondere die durch FGFR3-Mutationen verursachten Defekte. Hier führen Veränderungen im gleichen Gen zu ganz verschiedenen „verwandten“ Erkrankungen, die sich je nach Art der Mutation in wesentlichen Merkmalen unterscheiden und daher als eigenständige Krankheitsbilder definiert wurden (z.B. Achondroplasie, Thanatophore Dysplasie, Hypochondroplasie etc. = FGFR3-Spektrum). Weiterhin ist hier auch die degenerative, idiopathische Gelenkerkrankung Osteoarthritis zu nennen, die durch die strukturelle Zerstörung des Gelenkknorpels gekennzeichnet ist. Unter den arthritischen Erkrankungen stellt die Osteoarthritis weltweit die häufigste Form dar (Creamer *et al.*, 1997; Martel, 1999). Diese Erkrankung ist eine langsam fortschreitende, dynamische Gelenkerkrankung, die sich durch morphologische, biochemische, molekulare und biomechanische Veränderungen der Chondrozyten und der extrazellulären Matrix (des Knorpels) manifestiert (Kuettnner *et al.*, 1995). Sowohl die Chondrodysplasien, die meist als sekundäre Komplikation eine Osteoarthritis entwickeln, oder auch die Osteoarthritis als Primärerkrankung selbst, sind in ihrer Pathophysiologie noch nicht vollständig geklärt. Daher ist das Therapieangebot rein auf die Linderung der Symptome beschränkt. Mit einem Beitrag zur weiteren Aufklärung sowohl der primär beteiligten Moleküle an der Entstehung der Osteoarthritis als auch der FGFR3-regulierten zellulären Prozesse können Ansatzpunkte für Therapiekonzepte geschaffen werden.

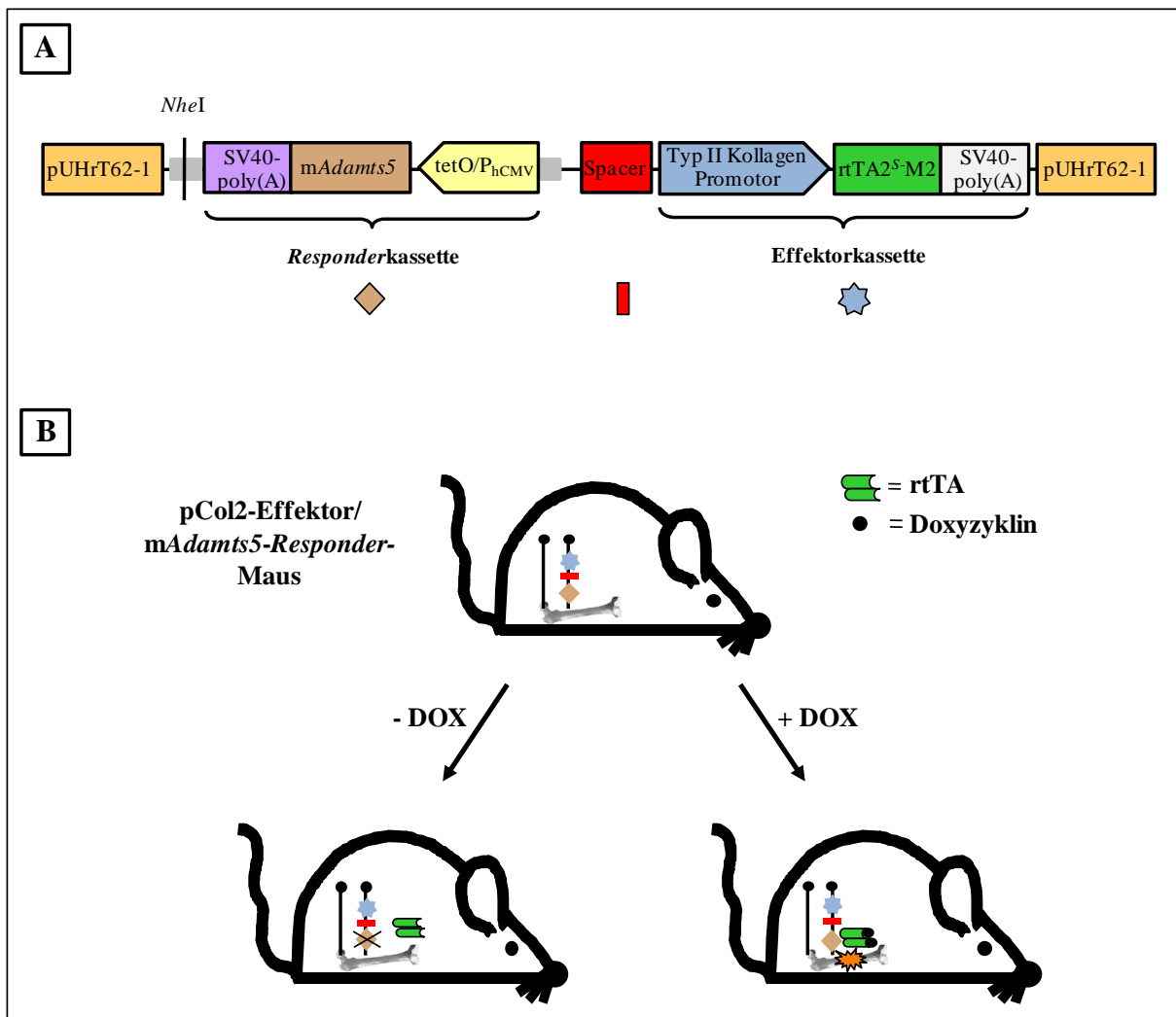
In der vorliegenden Arbeit sollte durch unterschiedliche experimentelle Ansätze zu beiden Bereichen beigetragen werden: durch ein *in vivo*-Modell zur Klärung der Relevanz der Aggrecanase ADAMTS5 im Pathogeneseprozess der Osteoarthritis (3.1) sowie durch *in vitro*-Studien zur weiteren Aufklärung FGFR3-regulierter zellulärer Prozesse und der Identifizierung neuer involvierter Gene (3.2).

### 3.1 Herstellung einer transgenen Maus als Osteoarthrose-Modell

Osteoarthrose (OA) ist eine heterogene Gelenkserkrankung charakterisiert durch pathologische Veränderungen des Knorpels und des subchondralen Knochens. Mit der Entwicklung transgener OA-Tiermodelle wurde ein vielversprechendes Instrument geschaffen um bisher noch ungeklärte Mechanismen in der Pathogenese der OA näher zu untersuchen. Neben den sich spontan entwickelnden Arthrosen (STR/1N-Maus), den chirurgisch bzw. enzymatisch und den chemisch induzierten Modellen bieten die genetisch modifizierten Modelle die Möglichkeit die funktionelle Rolle eines ganz bestimmten Moleküls näher zu untersuchen (Ameys *et al.*, 2006; Hardingham, 2008). Verschiedene *knock-out*-Modelle zeigten, dass der Aggrecanase mAdams5 eine Schlüsselrolle in der Knorpeldegradation zukommt (Stanton *et al.*, 2005; Glasson *et al.*, 2005).

In der vorliegenden Arbeit sollte mittels des Tet-Systems eine gewebspezifische, exogen induzierbare Maus generiert werden. Durch die Überexpression der Aggrecanase mAdams5 sollte eine Osteoarthrose-ähnliche Situation simuliert und somit die Relevanz dieser Protease im Pathogeneseprozess der OA untersucht werden. Ohne Einsatz mechanischer Destabilisierungen des Kniegelenkes oder auch ohne das Spritzen verschiedener Agenzien. Um aufwendige Kreuzungsexperimente zu vermeiden, wurde ein bifunktionales Expressionskonstrukt bestehend aus **Effektor-** (knorpelspezifischer Kollagen Typ II-Promotor mit nachgeschaltetem reversen Tet-abhängigen Transaktivator (rtTA2<sup>S</sup>-M2)) und **Responderkassette** (Tet-responsives Element (TRE) und das über zu exprimierende Transkript) hergestellt. Zur Vermeidung von Wechselwirkungen wurde ein Zwischenfragment (**Spacer**) eingefügt.

In Abbildung 3.1 ist schematisch das knorpelspezifische und durch Doxyzyklin (Tetrazyklin-Analog) induzierbare Transgen dargestellt.



**Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des knorpelspezifischen und durch Doxyzyklin induzierbaren Transgens**

(A) Das bifunktionale Expressionskonstrukt **pCol2-Effektor/mAdamts5-Responder** erlaubt die Herstellung einer einzigen transgenen Maus ohne weitere Kreuzungsexperimente durchführen zu müssen. Beide Kassetten sind dabei durch ein 4 kbp großes Zwischenfragment (*Spacer*) voneinander getrennt, um unerwünschte Wechselwirkungen zu vermeiden.

SV40-pA = Polyadenylierungssignal aus SV40, mAdamts5 = Base 12-2810 des murinen *Adamts5*-Gens (NM\_011782), tetO/P<sub>hCMV</sub> = humaner CMV-Minimalpromotor mit Tetrazyklin-responsivem Element (TRE), *Spacer* = 4 kbp Intron des humanen *p53*-Genes, rtTA2<sup>S</sup>-M2 = reverser Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator, *NheI* = Restriktionserkennungsstelle für *NheI*

(B) Durch die Wahl des Kollagen Typ II-Promotors soll der reverse tetrazyklin-abhängige Transaktivator rtTA2<sup>S</sup>-M2 in ruhenden, proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten der Maus exprimiert werden. In Abwesenheit von Doxyzyklin ist der rtTA2<sup>S</sup>-M2 inaktiv. Die Applikation von Doxyzyklin bewirkt die Bindung des Transaktivators an das Tet-responsive Element (TRE), was den nachgeschalteten CMV-Minimalpromotor aktiviert und das Zielgen *mAdamts5* spezifisch nur in Chondrozyten exprimiert. Durch die induzierbare Überexpression von *mAdamts5* soll *in vivo* untersucht werden, ob es zu einer Schädigung des Knorpels kommt.

### 3.1.1 Herstellung des bifunktionalen Expressionskonstruktes

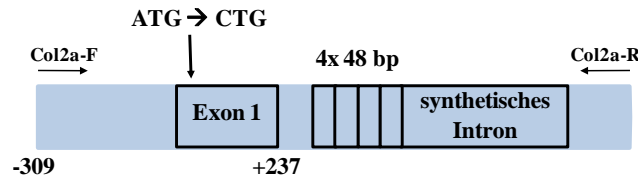
Als Grundlage zur Generierung des bifunktionalen Expressionskonstruktes wurde der freundlicherweise von Prof. Dr. Bujard (ZMBH, Heidelberg) zur Verfügung gestellte Vektor pUHRt62-1 verwendet. Dieser verfügte neben dem Ampizillin-Resistenzgen und dem Replikationsstartpunkt über einen humanen Cytomegalovirus-Minimalpromotor ( $P_{hCMV}$ ), der die Expression des reversen Tetrazyklin-abhängigen Transaktivators rtTA2<sup>S</sup>-M2 (Urlinger *et al.*, 2000) steuert. In diesen Vektor wurden in mehreren aufeinander folgenden Klonierungsschritten die verschiedenen Elemente des Expressionskonstruktes eingebracht.

#### 3.1.1.1 Insertion des *Spacers* und Fertigstellung der Effektorkassette

Zur Vermeidung von transkriptionellen Wechselwirkungen zwischen Effektor- und *Responder*kassette, als auch zur Verhinderung sterischer Probleme, wurde ein 4 kbp umfassendes DNA-Fragment aus dem Intron des humanen *p53*-Genes subkloniert. Dieser *Spacer* wurde zunächst mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Eco*RI aus dem Konstrukt pAU8-5 (Utomo *et al.*, 1999) ausgeschnitten. Im Anschluss erfolgte die Klonierung in den ebenfalls mit den gleichen Enzymen restringierten Vektor pUHRt62-1. Das neu entstandene Konstrukt wurde als **pSpacer** bezeichnet. Die Überprüfung der vollständigen Insertion erfolgte über Sequenzierung (pUHRt-2F/1R, 124E18-2F/3R) und Restriktionsverdau mit verschiedenen Endonukleasen.

Um zu gewährleisten, dass das zu untersuchende Zielgen *mAdams5* gewebsspezifisch nur in ruhenden, proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten exprimiert wird, wurden die dafür notwendigen Sequenzen aus dem von Prof. Dr. Brendan Lee (Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Houston, Texas) zur Verfügung gestellten Konstrukt Col2a-Cre-IRES-EGFP (Zhou *et al.*, 1995) mit den Primern Col2a-F/R amplifiziert, aufgereinigt und die Enden aufgefüllt. Die amplifizierte Sequenz beinhaltete 309 bp des Kollagen Typ II Promotors, 237 bp von Exon 1, vier *Tandemrepeats* des 48 bp *Enhancer* Elementes aus Intron 1 und ein synthetisches Intron zur Stabilisierung der mRNA (Abb. 3.2). Dieses 48 bp-Element gewährt, wenn es als Vierfach *Tandemrepeat* vorliegt, zusammen mit den 309 bp des Kollagen Typ II Promotors eine chondrozytenspezifische Expression des darauffolgenden Genes. Mutagenesestudien konnten drei separate Sequenzabschnitte innerhalb dieser 48 bp identifizieren, die bei der Bildung eines großen Komplexes zwischen den 48 bp, SOX 9 (SRY (sex determining region Y)-box 9) und weiteren Proteinen involviert sind und wesentlich die chondrozytenspezifische Expression steuern (Zhou *et al.*, 1998). ) Das Startkodon in Exon 1 lag mutiert vor (ATG → CTG) um die

Translationsinitiation an dieser Stelle zu inhibieren. Im Folgenden wurden die amplifizierten Fragmente mit **Kollagen Typ II-Promotor** bezeichnet.



**Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des amplifizierten Kollagen Typ II-Promotors**

Zur Generierung des knorpelspezifischen Promotors für das bifunktionale Expressionskonstrukt wurde aus dem Konstrukt Col2a-Cre-IRES-EGFP mit den Primern Col2a-F/R alle für die gewebsspezifische Expression notwendigen Sequenzen amplifiziert. Diese Sequenz beinhaltet 309 bp des Kollagen Typ II-Promotors, 237 bp von Exon 1 mit mutiertem Startkodon, vier *Tandemrepeats* des 48 bp *Enhancer* Elementes aus Intron 1 und ein synthetisches Intron zur Stabilisierung der mRNA.

Nachdem das neu entstandene Plasmid *pSpacer* mit *EcoRI* zwischen *Spacer* und *rtTA2<sup>S</sup>-M2* linearisiert, die Enden ebenfalls aufgefüllt und dephosphoryliert waren, erfolgte die Ligation des Promotors in *pSpacer* (***pSpacer/Col.2a***). Die Orientierung des Promotors wurde mittels PCR (124E18-1F/Col.2a-R-5'control) und Restriktion überprüft. Um Fehler bei der Amplifikation des Promotors auszuschließen, wurde dieser komplett sequenziert.

Um die weiteren Schritte zum Einbringen der *Responder*kassette zu gewährleisten, musste ein doppelsträngiger 35 bp Linker (Kap. 2.5.9) mit den Restriktionserkennungsstellen *Sal* I und *Nhe* I in den Zielvektor eingefügt werden. Der Linker wurde so generiert, dass an den überhängenden Enden Erkennungssequenzen entstanden, die der *Xho*I-Restriktionsschnittstelle entsprachen, allerdings diese nach Ligation zerstörten (Abb. 3.3)



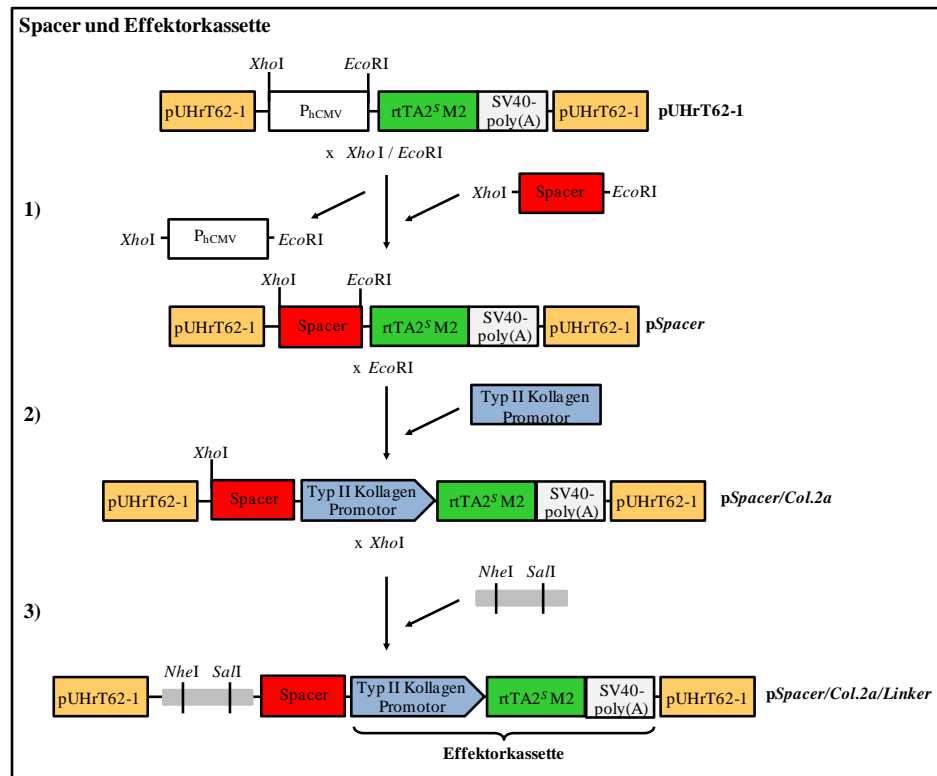
**Abbildung 3.3: Linkersequenz**

Für die weitere Klonierung musste ein doppelsträngiger Linker eingefügt werden, der die Restriktionserkennungsstellen *Sal* I und *Nhe* I beinhaltet. Zum Einfügen des Linkers in das linearisierte Konstrukt wurden überhängende Enden generiert, die einer *Xho*I-Restriktionsschnittstelle entsprechen, allerdings nach Ligation diese zerstören.

Das Konstrukt *pSpacer/Col.2a* wurde mit *Xho*I linearisiert, der Linker eingefügt und der Ansatz vor der Transformation mit *Xho*I zur Vorselektion verdaut. Die Verifikation positiver

Klone erfolgte über PCR (Linker control-F/124E18-5R), Restriktion und Sequenzierung (**pSpacer/Col.2a/Linker**).

In nachfolgender Abbildung sind schematisch die bereits beschriebenen Klonierungsschritte dargestellt.



**Abbildung 3.4: Vereinfachte grafische Darstellung der bisherigen Klonierungsschritte**

(1) Zur Vermeidung transkriptioneller Wechselwirkungen wurde zunächst aus dem Ursprungsvektor pUHRt62-1 der humane Minimalpromotor  $P_{hCMV}$  entfernt und gleichzeitig ein 4 kbp großes DNA-Fragment (*Spacer*) aus dem Intron des humanen *p53*-Genes eingefügt (**pSpacer**).

(2) Nach Linearisierung von **pSpacer** mit *EcoRI* erfolgte die Klonierung des amplifizierten und aufgereinigten Kollagen Typ II-Promotors (**pSpacer/Col.2a**).

(3) Für die weiteren Klonierungsschritte wurde das Konstrukt **pSpacer/Col.2a** mit *XhoI* linearisiert und ein doppelsträngiger Linker eingefügt, der die Restriktionsschnittstellen für *SalI* und *NheI* beinhaltet (**pSpacer/Col.2a/Linker**). Diese beiden Schnittstellen sind unentbehrlich zur Vervollständigung des Endkonstruktes.

$rtTA2^S$ -M2 = reverser Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator, SV40-pA = Polyadenylierungssignal aus SV40

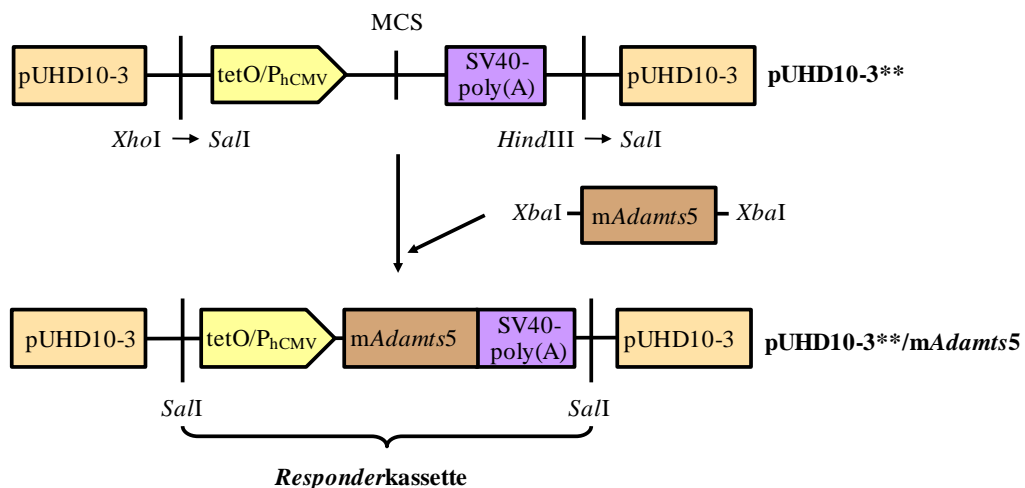
### 3.1.1.2 Responderkassette und Fertigstellung des Endkonstruktes

Ausgangspunkt für die Herstellung der *Responderkassette* war der von Manfred Gossen generierte Vektor pUHD10-3. Dieser beinhaltet sowohl das TRE mit nachgeschaltetem Minimalpromotor (tetO/ $P_{hCMV}$ ) als auch die SV40-Polyadenylierungssequenz *downstream* der multiplen Klonierungsstelle (MCS, *multiple cloning site*). Um zu einem späteren Zeitpunkt die *Responderkassette* in das Endkonstrukt einfügen zu können, musste der Vektor



pUHD10-3 mutagenisiert (Kap. 2.9) werden, sodass an zwei Stellen eine *SalI*-Schnittstelle entstand (**pUHD10-3\*\***). Die Verifikation der Mutagenesen, bei der die *XhoI*-Erkennungssequenz (Primer: pUHD10-3muta 1F/R) vor dem CMV-Minimalpromotor und die *HindIII*-Schnittstelle (Primer: pUHD10-3muta 2F/R) nach dem Polyadenylierungssignal ersetzt wurden, erfolgte über Restriktion und Sequenzierung.

Aus dem von Dr. I. Hess im Rahmen ihrer Diplomarbeit generierten Plasmid pGEM/*mAdamts5*, welches zu Beginn der Arbeiten zur Verfügung stand, wurde die kodierende Sequenz von *mAdamts5* (Position 12-2810, NM\_011782) mit zwei Primern, die zusätzlich noch *XbaI*-Erkennungssequenzen trugen, amplifiziert und der Ansatz anschließend zur Eliminierung der parentalen Ausgangs-DNA mit *DpnI* verdaut. Nach einem *XbaI*-Verdau, durch den das Amplifikat überhängende *XbaI*-Schnittstellen erhielt, erfolgte die Ligation in den ebenfalls mit *XbaI* linearisierten und dephosphorylierten Vektor pUHD10-3\*\* (**pUHD10-3\*\*/*mAdamts5***). Positive Klone wurden mittels PCR (*Adamts5*-1R/pUHD10F-3) und Restriktion verifiziert. Um Fehler bei der Amplifikation des *mAdamts5*-Genes auszuschließen, wurde der komplette Bereich sequenziert. Nachfolgend ist schematisch die Herstellung der *Responderkassette* dargestellt.

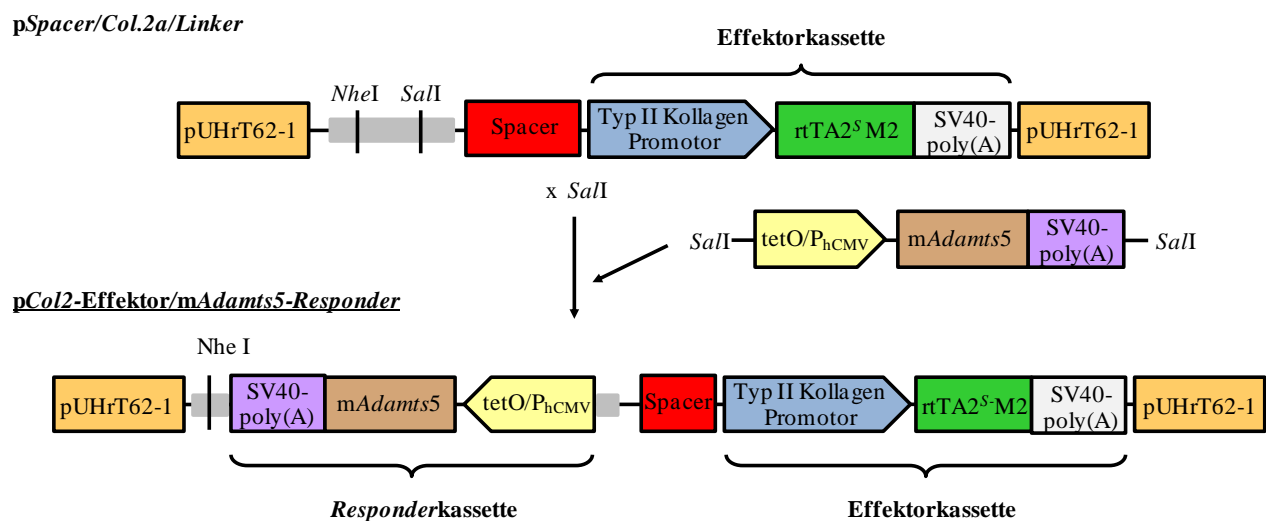


**Abbildung 3.5: Generierung der Responderkassette pUHD10-3\*\*/*mAdamts5***

Nachdem der Vektor pUHD10-3 durch Mutagenese zwei *SalI*-Schnittstellen erhalten hatte (**pUHD10-3\*\***), wurde die kodierende Sequenz (Base 12-2810) von *mAdamts5* mit *XbaI*-Erkennungssequenzen tragenden Primern amplifiziert und in die multiple Klonierungsstelle (MCS) des ebenfalls mit *XbaI* linearisierten Vektors pUHD10-3\*\* eingefügt (**pUHD10-3\*\*/*mAdamts5***).

tetO/P<sub>h</sub>CMV = humaner CMV-Minimalpromotor mit Tetrazyklin-responsivem Element (TRE),  
SV40-poly(A) = Polyadenylierungssignal aus SV40

Zur Fertigstellung des Endkonstruktes wurde aus dem Vektor pUHD10-3\*\*/mAdamts5 die *Responderkassette* mit *SalI* ausgeschnitten, über Gelextraktion aufgereinigt und in den ebenso mit *SalI* restringierten und dephosphorylierten Vektor pSpacer/Col.2a/Linker eingefügt (Abb. 3.6). Die Überprüfung der vollständigen Insertion und der richtigen Orientierung erfolgte mittels PCR (Linker-Control-F/Xba-Stop-F) und Restriktionsanalysen. Bevor die *in vitro*- als auch *in vivo*-Versuche starteten, wurde Effektor- und *Responderkassette* des Konstruktes **pCol2-Effektor/mAdamts5-Responder** komplett sequenziert.



**Abbildung 3.6: Fertigstellung des Endkonstruktes pCol2-Effektor/mAdamts5-Responder**

Zur Fertigstellung des Endkonstruktes **pCol2-Effektor/mAdamts5-Responder** wurde der Vektor pUHD10-3\*\*/mAdamts5 als auch der Vektor pSpacer/Col.2a/Linker mit *SalI* restringiert und die *Responderkassette* bestehend aus Minimapromotor mit Tetrazyklin-responsivem Element (TRE) (tetO/P<sub>hCMV</sub>), dem Zielgen mAdamts5 (Base 12-2810) und dem Polyadenylierungssignal SV40-pA in den Vektor pSpacer/Col.2a/Linker eingefügt. Die vollständige Insertion und die richtige Orientierung wurden über PCR- und Restriktionsanalysen überprüft.

Spacer = 4 kbp Intron des humanen p53-Genes, rtTA2<sup>S</sup>-M2 = reverser Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator

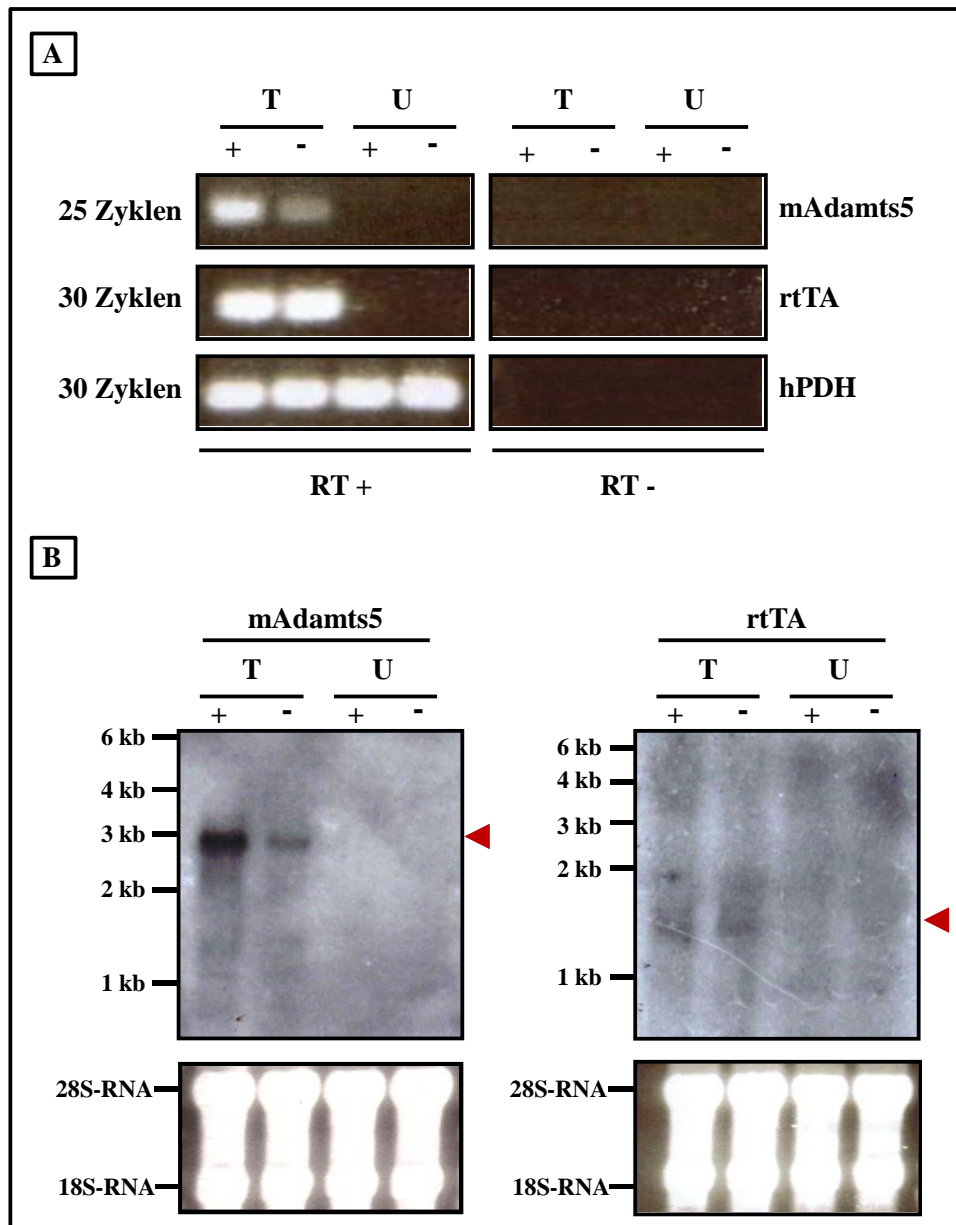
Es konnte ein bifunktionales Expressionskonstrukt generiert werden, welches chondrozytenspezifisch mAdamts5 mittels des Tet-Systems überexprimiert und die bei der *in vivo* Analyse aufwendigen Kreuzungsexperimente überflüssig macht.

### 3.1.2 *In vitro* Verifizierung des Konstruktes **pCol2-Effektor/mAdamts5-Responder**

Zur Verifizierung des Konstruktes *in vitro* wurde die humane Chondrosarkom-Zelllinie SW1353 der Firma LGC Promochem/ATCC (#HTB-94<sup>TM</sup>) verwendet. Diese adhären wachsenden Zellen mit fibroblasten-ähnlicher Morphologie entstammen einem Chondrosarkom Typ II und eigneten sich aufgrund ihrer Herkunft aus Knorpelgewebe gut als Zellkulturmodell. Auch im Hinblick auf die geringe Expression von endogenem humanem *ADAMTS5* erwies sich diese Zelllinie als geeignet, da dadurch der zu erzielende Effekt besser der induzierten Überexpression von *mAdamts5* zugeordnet werden konnte.

Die Plasmid-DNA **pCol2-Effektor/mAdamts5-Responder** wurde endotoxinfrei präpariert (Kap. 2.4.1.2), transient in SW1353-Zellen transfiziert und für 36 h mit bzw. ohne Doxyzyklin (1 µg/ml) inkubiert. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte Zellen mitgeführt. Durch die Induktion mit Doxyzyklin sollte der in der Effektor-kassette enthaltene reverse tetrazyklinabhängige Transaktivator (*rtTA2<sup>S</sup>-M2*) die Expression des transgenen, murinen *mAdamts5*-Genes initiieren, die kontinuierliche Expression des *rtTA2<sup>S</sup>-M2* selbst sollte Doxyzyklinunabhängig sein. Nach der Induktion wurde aus den Zellen RNA extrahiert, revers transkribiert und mittels semiquantitativen RT-PCR-Experimenten die murine *mAdamts5*- (*Adamts5-1F/2N-R*) als auch die *rtTA2<sup>S</sup>-M2*-Expression (*rtTAFor1/62-1rtTA rev*) untersucht. Als Referenzgen zur Überprüfung der eingesetzten cDNA-Mengen diente die humane *Pyruvat-Dehydrogenase* (*PDH-E9F/PDH-E10R*). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.7A dargestellt. Es zeigte sich eine gleichbleibende *rtTA2<sup>S</sup>-M2*- und eine induzierbare murine *mAdamts5*-Expression, wobei hier auch ohne Doxyzyklin-Induktion ein leichter Anstieg der Genexpression feststellbar war. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Transfektion transient mit nicht linearisiertem Plasmid stattfand und somit der Vektor beim DNaseI-Verdau nach der RNA-Extraktion nicht eliminiert wurde. So wurde bei der PCR nicht nur exprimierte RNA, sondern auch noch vorhandener Vektor amplifiziert.

Zusätzlich zum Nachweis der Induzierbarkeit von *mAdamts5* erfolgte eine Analyse mittels *Northern Blot*-Hybridisierung. Hierzu wurde mit einer *rtTA*- (*rtTA-For1/rtTA-Rev6*, 668 bp) als auch einer *mAdamts5*- (*Adamts5-1F/2N-R*, 631 bp) spezifischen Sonde transfizierte (T) und untransfizierte (U) SW1353-Zellen mit und ohne Doxyzyklin-Applikation (+/-) auf ihre Expression der beiden Gene hin untersucht. Der *Northern Blot* zeigte eine induzierbare *mAdamts5*- und eine gleichbleibende *rtTA2<sup>S</sup>-M2*-Expression. Die schwache Bande bei transfizierten, nicht induzierten Zellen ist eventuell durch ein Überlaufen der Probe zu erklären oder es kommt auch ohne Doxyzyklin zu einer schwachen Expression des *mAdamts5* Genes (Abb. 3.7B).



**Abbildung 3.7: Transiente Transfektion in SW1353-Zellen zur Verifizierung des Konstruktes *in vitro***

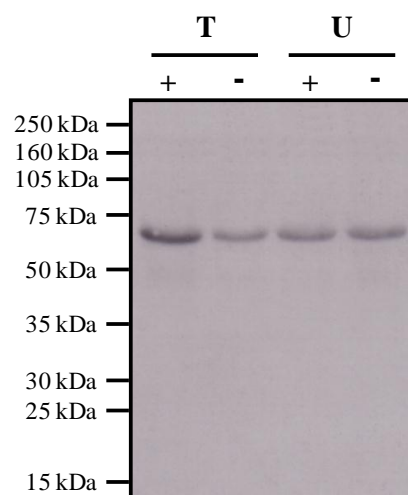
**A:** **Semiquantitative RT-PCR** zum Nachweis der differentiellen Expression von *mAdamts5* (**mAdamts5**) nach Induktion mit bzw. ohne Doxyzyklin („+“; „-“). Die Expression des *rtTA<sup>S</sup>-M2* (**rtTA**) zeigte keine Expressionsunterschiede. Als Kontrolle wurde die Expression des humanen Haushaltsgenes *Pyruvatdehydrogenase* (**hPDH**) untersucht. Die Anzahl der Zyklen ist am linken, das untersuchte Gen am rechten Bildrand aufgeführt. RT+: Ansatz mit reverser Transkriptase, RT -: Ansatz ohne reverser Transkriptase

**B:** Das Autoradiogramm eines **Northern Blots** zur zusätzlichen Bestätigung der Induzierbarkeit. Nach 36-stündiger Doxyzyklinapplikation wurden 15 µg Gesamt-RNA aus transfizierten und untransfizierten SW1353-Zellen gelelektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und der Filter mit einer radioaktiv markierten *mAdamts5*-(*Adamts5*-1F/2N-R) bzw. einer *rtTA*- (*rtTA*-For1/*rtTA*-Rev6) spezifischen Sonde hybridisiert. Auch hier zeigte sich die induzierbare Expression von *mAdamts5* bei schwacher, jedoch gleichbleibender *rtTA<sup>S</sup>-M2*-Expression. Als Kontrolle der gleichmäßigen Beladung und der Integrität der RNA wurde das mit Ethidiumbromid gefärbte Agarosegel mit 18S- und 28S-rRNA abgebildet. Die Positionen des RNA-Längenstandards sind am linken Bildrand eingezeichnet.

Transkriptgrößen: *mAdamts5* 2,8 kbp, *rtTA<sup>S</sup>-M2* 1,3 kbp

T= transfizierte SW1353-Zellen; U= untransfizierte SW1353-Zellen

Nachdem auf RNA-Ebene die Induzierbarkeit des Konstruktes gezeigt werden konnte, sollte über *Western Blot*-Analyse die Expression des Proteines mAdamts5 nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den mAdam-Proteasen besitzt mAdamts5 keine Transmembrandomäne und ist ein lösliches Protein. Es verfügt über eine Furin-Spaltstelle zwischen der Pro- und Metalloprotease-Domäne, sodass die intrazellulär stattfindende Aktivierung des als Zymogen exprimierten Enzymes mittels Furin möglich ist. Das Molekulargewicht von mAdamts5 beträgt ca. 100 kDa, wobei durch Glykosylierungen und Cysteinreste das Zymogen im *Western Blot* bei ca. 120 kDa läuft. Nach der Aktivierung und Sezernierung kann das Protein im Überstand mit einer Größe von ca. 73 kDa detektiert werden. Nachdem gleiche Mengen transfizierter als auch untransfizierter SW1353-Zellen für 36 h mit beziehungsweise ohne Doxyzyklin inkubiert worden waren, wurde aus den Zellüberständen die Proteine gefällt und gleiche Volumina im *Western Blot* auf ihre induzierbare mAdamts5-Proteinexpression überprüft. Auch auf Proteinebene konnte eine induzierbare mAdamts5-Expression gezeigt werden (Abb. 3.8). Die leichte Expression bei nicht induzierten, transfizierten und untransfizierten Zellen könnte auf das endogene Transkript zurückzuführen sein, da der verwendete Antikörper sowohl das humane als auch das murine Protein detektiert.



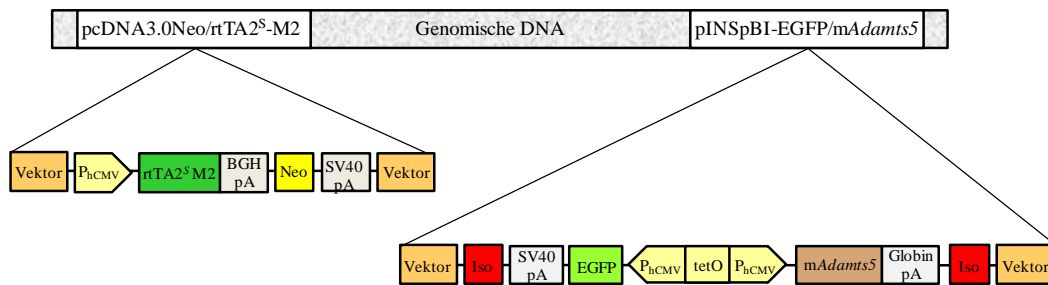
**Abbildung 3.8: Western Blot-Analyse der mAdamts5-Expression**

Nach +/- 36 stündiger Doxyzyklininduktion („+“, „-“) wurde aus den Zellüberständen von transfizierten (T) und untransfizierten (U) SW1353-Zellen die Proteine gefällt und gleiche Volumina im *Western Blot* auf ihre mAdamts5-Proteinexpression überprüft. Transfizierte, induzierte Zellen zeigten eine stärkere mAdamts5-Expression. Die Detektion erfolgte mit dem Antikörper anti-ADAMTS5 (C-term. Ende) der Firma CERDARLANE. Die Größen des verwendeten Längenstandards sind am linken Bildrand eingezeichnet.

Zusätzlich zu den transienten Versuchen wurde die Regulation von mAdamts5 sowie die Funktionalität des überexprimierten Proteines auch an einer stabilen Zelllinie untersucht (betreute Diplomarbeit B. Linke). Die kodierende Sequenz von mAdamts5 (Position 12-2810, NM\_011782) wurde zunächst mit *NheI*-Schnittstellen tragenden Primern amplifiziert und in den mit *NheI* eröffneten Vektor pINSpBI-EGFP eingefügt. Das Konstrukt pINSpBI-EGFP wurde freundlicherweise von Dr. T. Pabst (geb. Trost) zur Verfügung gestellt und besitzt ein TRE, dem beiderseits CMV-Minimalpromotoren ( $P_{hCMV}$ ) angefügt sind. Diese Bidirektionalität gewährleistet die gleichzeitige Expression des grün fluoreszierenden Induktionsmarkers *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) und des zu analysierenden Zielgenes. Dieser zusammengesetzte Vektor besteht aus pBI-EGFP der Firma Clontech und pINS, welcher im Rahmen der Dissertation von Dr. M. Maringer (AG PD Dr. E. Bockamp, Universität Mainz) generiert wurde. Der Vektor pINS beinhaltet zwei Matrix-Anheftungsregionen (MAR, Isolatoren) des menschlichen  $\beta$ -Globin-Genes (Fleenor *et al.*, 1993; Fukumura *et al.*, 1998). Diese schützen durch die ungerichtete Integration des Plasmides ins Genom vor *Enhancer*- und/oder *Silencer*-Elementen, die sonst die Funktion des Promotors beeinträchtigen könnten (Pikaart *et al.*, 1998; Bell *et al.*, 1999 und 2001).

Nach Fertigstellung des *Responder*-Konstruktes **pINSpBI-EGFP/mAdamts5** erfolgte die Kotransfektion mit dem Effektor **pcDNA3.0Neo/rtTA2<sup>S</sup>-M2** in SW1353-Zellen. Dieses freundlicherweise zur Verfügung gestellte Plasmid wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Dr. T. Pabst (geb. Trost) generiert und besteht aus dem Vektor pcDNA3Neo der Firma Invitrogen, in den die cDNA des reversen Tetrazyklin-abhängigen Transaktivators rtTA2<sup>S</sup>-M2 (Urlinger *et al.*, 2000) als Effektor in die multiple Klonierungsstelle eingefügt worden war. Als Promotor diente ein humaner CMV-Minimalpromotor ( $P_{hCMV}$ ), der neben der rtTA2<sup>S</sup>-M2-Expression auch die des Neomycin-Resistenzgenes zur Selektion reguliert. Nach Gabe von Neomycin und Doxyzyklin wurden so positive Zellklone selektiert und diese durch weitere Analysen auf RNA- als auch auf Protein-Ebene auf ihre Regulation hin verifiziert. Zur Überprüfung der Funktionalität des Proteines wurde ein rekombinantes Aggrekan-Substrat (Firma Invitex) hinzugegeben, welches bei Expression von mAdamts5 gespalten wird und im *Western Blot* detektierbar ist. Als Kontrollzelllinie wurde der Vektor pINSpBI/EGFP ohne Insert ebenfalls stabil mit dem Effektor pcDNA3.0Neo/rtTA2<sup>S</sup>-M2 kotransfiziert.

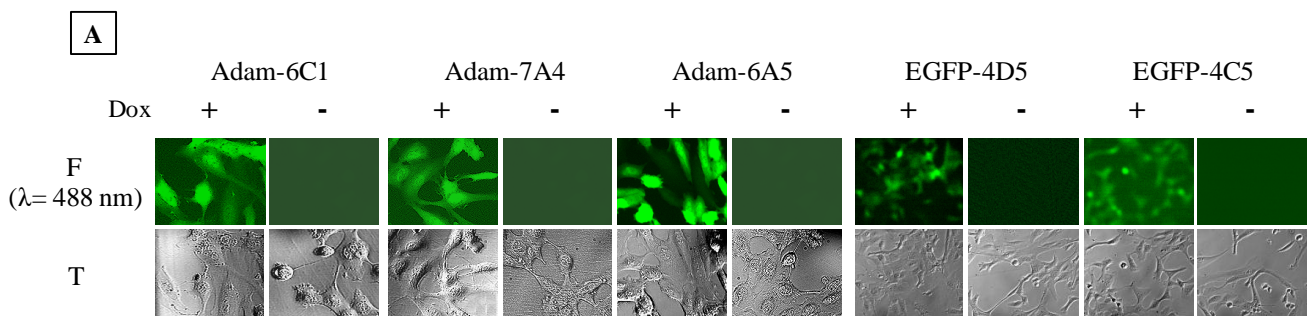
Im Rahmen der Diplomarbeit von B. Linke konnte sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene eine induzierbare mAdamts5-Expression sowie die Funktionalität des Proteines nachgewiesen werden. In Abbildung 3.9 sind die beiden stabil transfizierten Konstrukte dargestellt, Abbildung 3.10 zeigt die relevanten Ergebnisse der Diplomarbeit von Frau Linke.



**Abbildung 3.9: Darstellung der beiden stabil transfizierten Konstrukte**

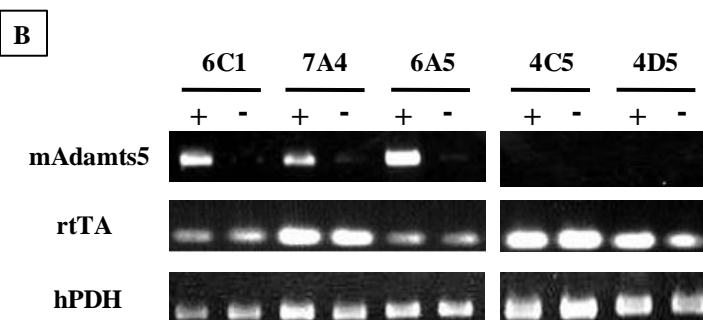
Schematisch dargestellt ist die stabile Integration des Effektoronstruktes **pcDNA3.0Neo/rtTA2<sup>S</sup>-M2** und des Responderkonstruktes **pINSpBI-EGFP/mAdamts5** in das Zellgenom der SW1353-Zellen. Der Einbau erfolgte unabhängig voneinander

P<sub>hCMV</sub> = humaner CMV-Minimalpromotor, rtTA2<sup>S</sup>-M2 = reverser Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator, BGH-pA bzw. Globin-pA = Polyadenylierungssignal aus  $\beta$ -Globinen, Neo = Neomycin-Resistenzgen, SV40-pA = Polyadenylierungssignal aus SV40, Iso = Isolatorsequenz, EGFP = *enhanced green fluorescent protein-Gen*, P<sub>hCMV-1&2</sub> + tetO = bidirektionalen CMV-Minimalpromotor mit Tetrazyklin-responsivem Element (TRE), mAdamts5 = Base 12-2810 des murinen mAdamts5-Gens (NM\_011782)



**Abbildung 3.10A: EGFP-Expression und Durchlichtaufnahmen der generierten Zellklone**

Nach zweitägiger Inkubation in An- (+) und Abwesenheit (-) von Doxyzyklin wurden die generierten mAdamts5-Zellklone 6C1, 7A4 und 6A5 als auch die beiden EGFP-Kontrollklone 4D5 und 4C5 am Fluoreszenzmikroskop bei 488 nm fotografiert. Die stringente Regulation von EGFP nach Doxyzyklinapplikation ist deutlich erkennbar. Als Kontrolle wurden die Durchlichtaufnahmen abgebildet. [modifiziert nach B. Linke]

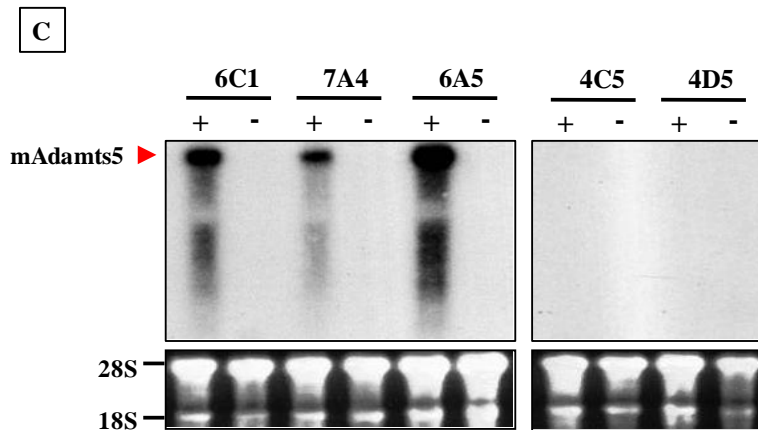


**Abbildung 3.10B: Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis der Doxyzyklin-abhängigen mAdamts5-Expression**

Nach Induktion mit (+) und ohne (-) Doxyzyklin wurde von den drei mAdamts5- und den beiden EGFP-Kontrollklonen RNA isoliert, 4  $\mu$ g revers transkribiert und auf ihre mAdamts5- (Adamts5-2R/TS3-F) als auch rtTA2<sup>S</sup>-M2-Expression (rtTAFor1/62-1-rtTA-rev) überprüft. Alle drei mAdamts5-

Klone zeigten eine stringent durch Doxyzyklin regulierbare mAdamts5-Expression, während die rtTA2<sup>S</sup>-M2-Expression unbeeinflusst blieb. Die Kontrollklone wiesen bei ebenfalls gleichbleibender rtTA2<sup>S</sup>-M2-Expression keine mAdamts5-Expression auf. Als Kontrolle wurde die Transkription des humanen Haushaltsgenes *Pyruvatdehydrogenase* (hPDH, PDH-E9F/E10R) untersucht. Durchgeführte Negativkontrollen wiesen keine Amplifikate auf (nicht abgebildet). [modifiziert nach B. Linke]

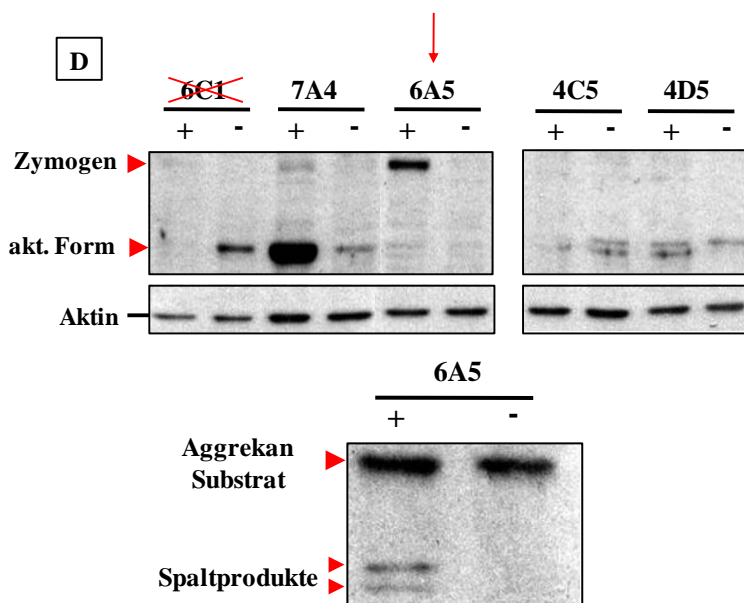
Die Amplifikationszyklen entsprachen: mAdamts5 22 Zyklen, rtTA 28 Zyklen, hPDH 30 Zyklen



**Abbildung 3.10C: Northern Blot-Hybridisierung zur Bestätigung der stringent durch Doxyzyklin induzierbaren Expression von mAdamts5**

Nach Doxyzyklininduktion wurden jeweils 15 µg der aus den Zellklonen isolierten Gesamt-RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und der Filter mit einer mAdamts5-spezifischen Sonde (ADAMTS5-1F/2N-R) hybridisiert. Wie auch bereits in Abb. 3.10B zeigte sich auch hier

die stringent regulierbare Expression des Zielgenes durch Doxyzyklin. Als Kontrolle der gleichmäßigen Beladung und der Integrität der RNA wurde das mit Ethidiumbromid gefärbte Agarosegel mit 18S- und 28S-rRNA dargestellt. [modifiziert nach B. Linke]



**Abbildung 3.10D: Western Blots zur Überprüfung der stringent regulierbaren mAdamts5-Expression und der Funktionalität der überexprimierten Aggrekanase**

Nach Induktion mit (+) und ohne (-) Doxyzyklin wurden 20 µg Proteinzell-extrakt im Western Blot eingesetzt. Nur die mAdamts5-Klone 7A4 und 6A5 zeigten eine stringente Regulation von mAdamts5 infolge Doxyzyklininduktion, wobei der Klon 7A4 die aktive Form (73 kDa) und der Klon 6A5 das Zymogen (120 kDa) exprimierte. Die beiden Kontrollklone wiesen keine Expression auf. Zum Abgleich wurde der Blot mit Aktin-Antikörpern hybridisiert. [modifiziert nach B. Linke]

Zum Funktionalitätsnachweis wurde repräsentativ der Zellüberstand des Klones 6A5 mit dem rekombinanten Aggrekan-Substrat *Aggrekan-IGDI (His-tag)* der Firma Invitex inkubiert und in An- (+) bzw. Abwesenheit (-) von Doxyzyklin überprüft, ob die nach Doxyzyklinapplikation überexprimierte Aggrekanase mAdamts5 funktional war, d.h. sie in der Lage war das angebotene Substrat zu spalten. Die Detektion erfolgte mittels eines His-tag-Antikörpers. Nur in Anwesenheit von Doxyzyklin wurde das Aggrekan-Substrat gespalten (Pfeile, Spaltprodukte), was zeigte, dass die überexprimierte Aggrekanase auch funktional war. [modifiziert nach B. Linke]



### 3.1.3 *In vivo* Verifizierung des Konstruktes **pCol2-Effektor/mAdamts5-Responder**

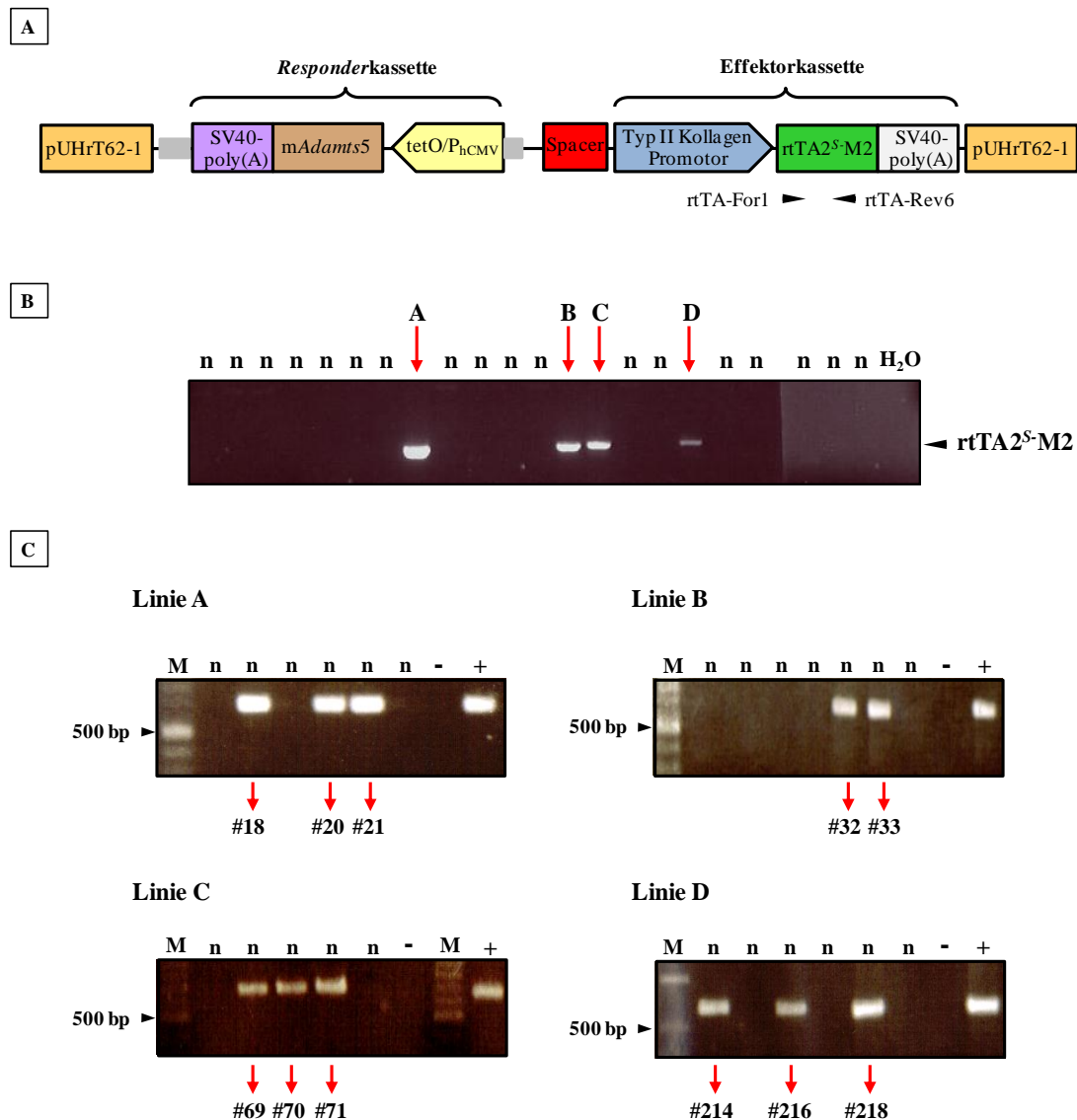
Nach Fertigstellung und Überprüfung des Konstruktes *in vitro* sollten transgene Tiere mit exogen induzierbarer Expression der Aggrecanase mAdamts5 generiert werden. Im Unterschied zu bereits bestehenden Mausmodellen sollte hier die Knorpelschädigung ohne exogene Reize lediglich durch Überexpression von mAdamts5 hervorgerufen werden.

#### 3.1.3.1 Generierung der transgenen Mäuse

Zur Generierung der transgenen Mäuse wurden 50 µg der Plasmid-DNA **pCol2-Effektor/mAdamts5-Responder** endotoxinfrei präpariert und mit den Enzymen *DrdI* und *NheI* zur Entfernung des Replikationsursprungs und des Ampizillin-Resistenzgenes linearisiert und aufgereinigt. Die Superovulation der Mäuse des verwendeten albino Inzuchtstammes FVB/N, die Pronukleusinjektion selbst als auch die Reimplantation in scheinchwangere Ammenmütter wurde freundlicherweise im Labor von Prof. Dr. Brendan Lee (Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Houston, Texas) von Yuqing Chen durchgeführt. Nach der Superovulation, bei der durch Hormonbehandlung die Anzahl reifender Follikel erhöht wird, erfolgt die Pronukleusinjektion in den paternalen Vorkern der fertilisierten Oozyte. Im Anschluss werden die Oozyten in scheinchwangere Ammenweibchen reimplantiert, von den Nachkommen Schwanzbiopsien entnommen und daraus DNA präpariert. Die potentiellen *Founder*-Tiere werden über PCR identifiziert.

Die Pronukleusinjektion ergab 22 potentiell transgene Tiere. Von allen wurden Schwanzbiopsien entnommen und daraus DNA extrahiert. Zum Nachweis des reversen tetrazyklinabhängigen Transaktivators (rtTA<sup>S</sup>-M2) erfolgte im Anschluss die Genotypisierung mittels PCR (rtTA-For1/rtTA-Rev6). Die Analyse ergab vier positive *Founder*-Tiere für den rtTA<sup>S</sup>-M2, die im Folgenden mit **pCol2A5 Linie A** bis **Linie D** bezeichnet wurden.

Der Zuchtaufbau der 4 Linien erfolgte durch Verpaarung mit FVB/N-Wildtypieren, dessen Nachkommen ebenfalls über PCR (rtTA-For1/rtTA-Rev6) auf die Expression des *rtTA<sup>S</sup>-M2* überprüft wurden. Bei allen vier Linien wurde das Transgen an die Nachkommen weitergegeben. Folgende Abbildung 3.11 zeigt die Lage der zur Genotypisierung verwendeten Primer als auch die PCR zur Identifizierung der transgenen *Founder*-Tiere und exemplarisch Genotypisierungen der einzelnen Linien zur Identifizierung transgener Nachkommen.



**Abbildung 3.11: PCR zur Identifizierung der transgenen *Founder*-Tiere und exemplarische Genotypisierungen der vier Linien**

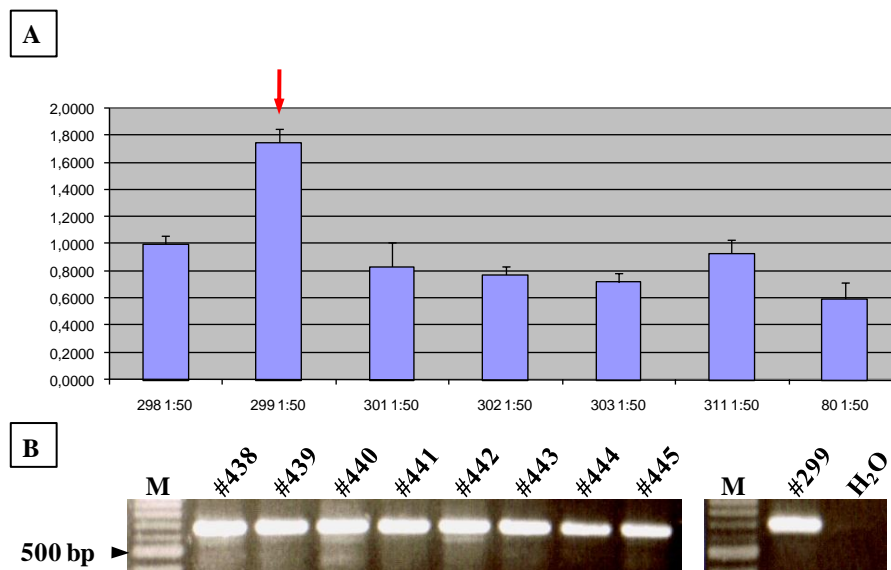
**A:** Zeigt das Endkonstrukt **pCol2-Effektor/mAdamts5-Responder** und die Lage der zur Genotypisierung verwendeten Primer **rtTA-For1** und **rtTA-Rev6**

**B:** Dargestellt ist die PCR-Genotypisierung der transgenen *Founder*-Tiere. Von insgesamt 22 potentiell transgenen Tieren konnte bei vier Tieren der **rtTA2<sup>S</sup>-M2** (**rtTA-For1/Rev6**) nachgewiesen werden. Die vier Tiere und nach Aufzucht auch deren Nachkommen wurden mit Linie **pCol2A5-A** bis **pCol2A5-D** bezeichnet  
n= negative Tiere, H<sub>2</sub>O = Wasserkontrolle

**C:** Exemplarische Genotypisierungen von Nachkommen der vier Linien. Nachgewiesen wurde der **rtTA2<sup>S</sup>-M2** (**rtTA-For1/Rev6**). Bei allen vier Linien konnte das Transgen an die Nachkommen weitergegeben werden  
M = 100 bp-Marker, n= nicht transgene Tiere, (-) = Wasserkontrolle, (+) = Positivkontrolle mit Plasmid-DNA als Matrize

Nachdem bei allen vier Linien gezeigt werden konnte, dass das Transgen an die Filialgeneration weitergegeben wurde, erfolgte zur Verstärkung der induzierbaren Überexpression des transgenen *mAdamts5* ein *Intercross* zur Generierung homozygoter Tiere. Hierzu wurden positiv transgene Nachkommen über quantitative *real-time* PCR (Kap. 2.7.3) auf ihren genetischen Status überprüft und potentiell homozygote Tiere durch Rückkreuzung mit einem FVB/N-WildtypTier verifiziert. Abbildung 3.12 zeigt exemplarisch eine *real-time*

PCR mit potentiell homozygoten Tieren als auch die Ergebnisse der Rückkreuzung, bei der alle Nachkommen positiv sein mussten.



**Abbildung 3.12: Intercross zur Generierung homozygoter Tiere**

**A:** Abgebildet ist hier exemplarisch eine *real time* PCR, bei der Nachkommen eines *Intercross* auf ihren genetischen Status überprüft wurden. Das Tier #299 ist potentiell homozygot (Pfeil), da die Dosis des nachgewiesenen  $rtTA2^S$ -M2 im Verhältnis zu den anderen Tieren zirka um den Faktor 2 erhöht vorlag.

**B:** Nach Rückkreuzung des Tieres #299 mit FVB/N-Wildtyptieren trugen alle Nachkommen (#438-445) das Transgen, das Tier #299 war somit homozygot. M= 100 bp-Marker, H<sub>2</sub>O = Wasserkontrolle

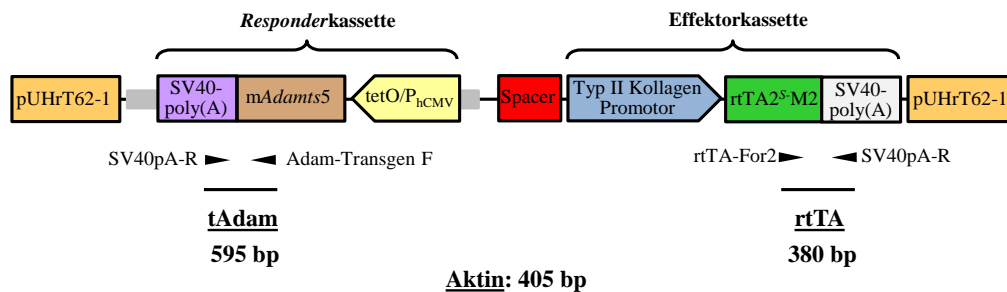
Bei allen Linien außer Linie C wurden homozygote Tiere identifiziert als auch durch *Incross* homozygote Nachkommen generiert. Die Linie C konnte nur im heterozygoten Status untersucht werden.

Nachdem für alle Linien die Zucht aufgebaut und ausreichend transgene Tiere gezüchtet worden waren, konnte mit der Charakterisierung begonnen werden.

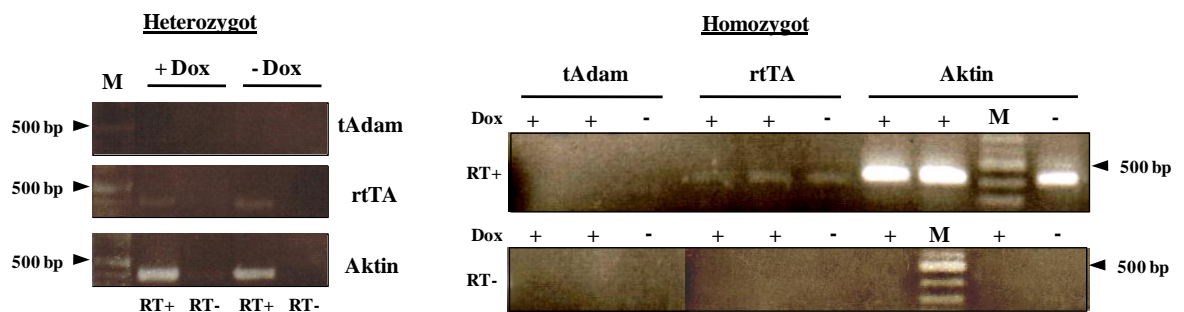
### 3.1.3.2 Analyse der transgenen Linien

Die Genotypisierung zeigte, dass eine Selektion aufgrund der Expression des  $rtTA2^S$ -M2 möglich war. Im Folgenden wurde analysiert, in wie weit eine Doxyzyklin-Applikation eine stringente Expression des Transgens über das Tet-ON-System gewährleistet. Hierzu wurden Tiere aller vier Linien, sowohl hetero- als auch homozygote, vier Wochen lang mit 4 mg/ml Doxyzyklin (5% Saccharose) induziert, aus dem präparierten Knochen RNA isoliert und diese mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Als Kontrolle wurden Tiere ohne Doxyzyklininduktion verwendet. Die Quantifizierung der transgenen *mAdamts5*-Expression erfolgte über RT-PCR, wobei die Primer (Adam-Transgen-F/SV40-pAR) so gewählt waren,

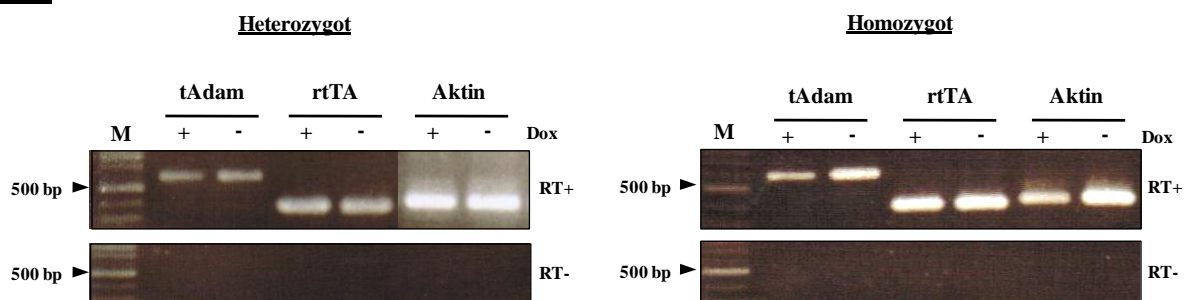
dass das endogene *mAdamts5* nicht amplifiziert wurde. Des Weiteren wurde die Expression des *rtTA2<sup>S</sup>-M2* (*rtTA-For2/SV40pA-R*) nachgewiesen. Folgende zwei Abbildungen 3.13 und 3.14 zeigen exemplarisch die Ergebnisse der durchgeführten RT-PCRs. Alle Ergebnisse wurden mit mehreren Tieren reproduziert.



## Linie A



## Linie B

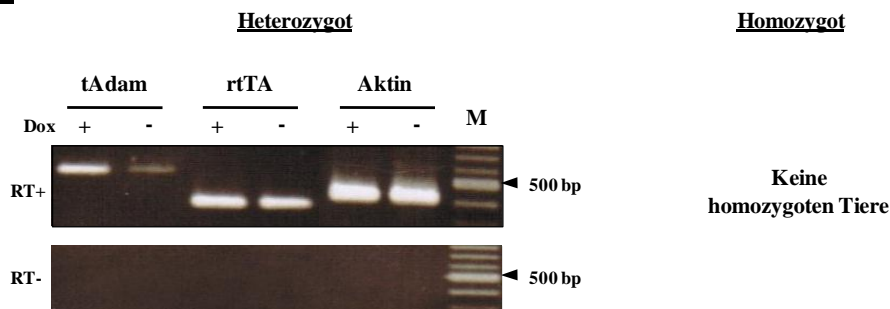
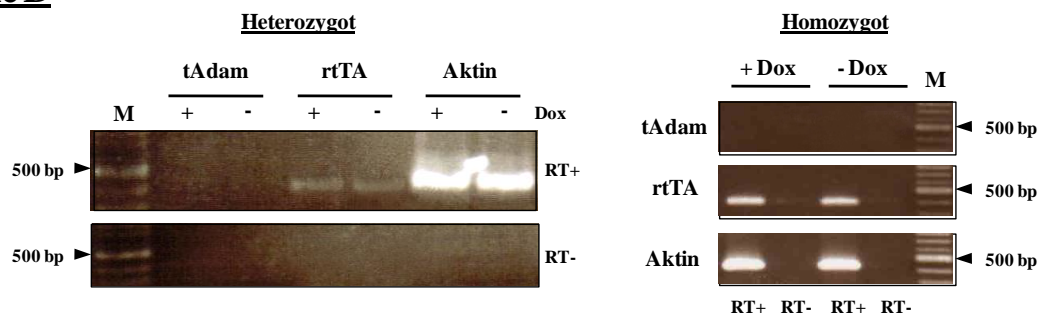


**Abbildung 3.13: Regulierbarkeit des transgenen *mAdamts5*-Genes infolge Doxyzyklininduktion (Linie A und B)**

Abgebildet ist das Konstrukt **pCol2-Effektor/*mAdamts5*-Responder** und die für die RT-PCR verwendeten Primer zum Nachweis der transgenen *mAdamts5*-(*Adam-Transgen-F/SV40-pAR*) und der *rtTA2<sup>S</sup>-M2*-Expression (*rtTA-For2/SV40pA-R*). Das endogene *mAdamts5* wurde durch die gewählten Primer nicht amplifiziert. Die Produktgrößen der beiden Gene und des zur Kontrolle verwendeten Haushaltsgenes *Aktin* (MAK 1/2) sind in der Abbildung angegeben.

Nach 4-wöchiger Doxyzyklininduktion wurde aus dem präparierten Knochen RNA isoliert und revers transkribiert. **Linie A** zeigte weder heterozygot noch homozygot eine Expression des transgenen *mAdamts5* (**tAdam**) und eine sehr schwache Expression des *rtTA2<sup>S</sup>-M2*. Bei **Linie B** wurde bei gleichbleibendem *rtTA2<sup>S</sup>-M2*-Transkript das transgene *mAdamts5* unabhängig von der Doxyzyklinapplikation konstitutiv exprimiert. Beide Linien schieden für die weitere Bearbeitung aus.

M = 100 bp-Marker, RT+ = mit reverser Transkriptase, RT- = ohne reverse Transkriptase

**Linie C****Linie D**

**Abbildung 3.14: Regulierbarkeit des transgenen *mAdams5*-Genes infolge Doxyzyklininduktion (Linie C und D)**

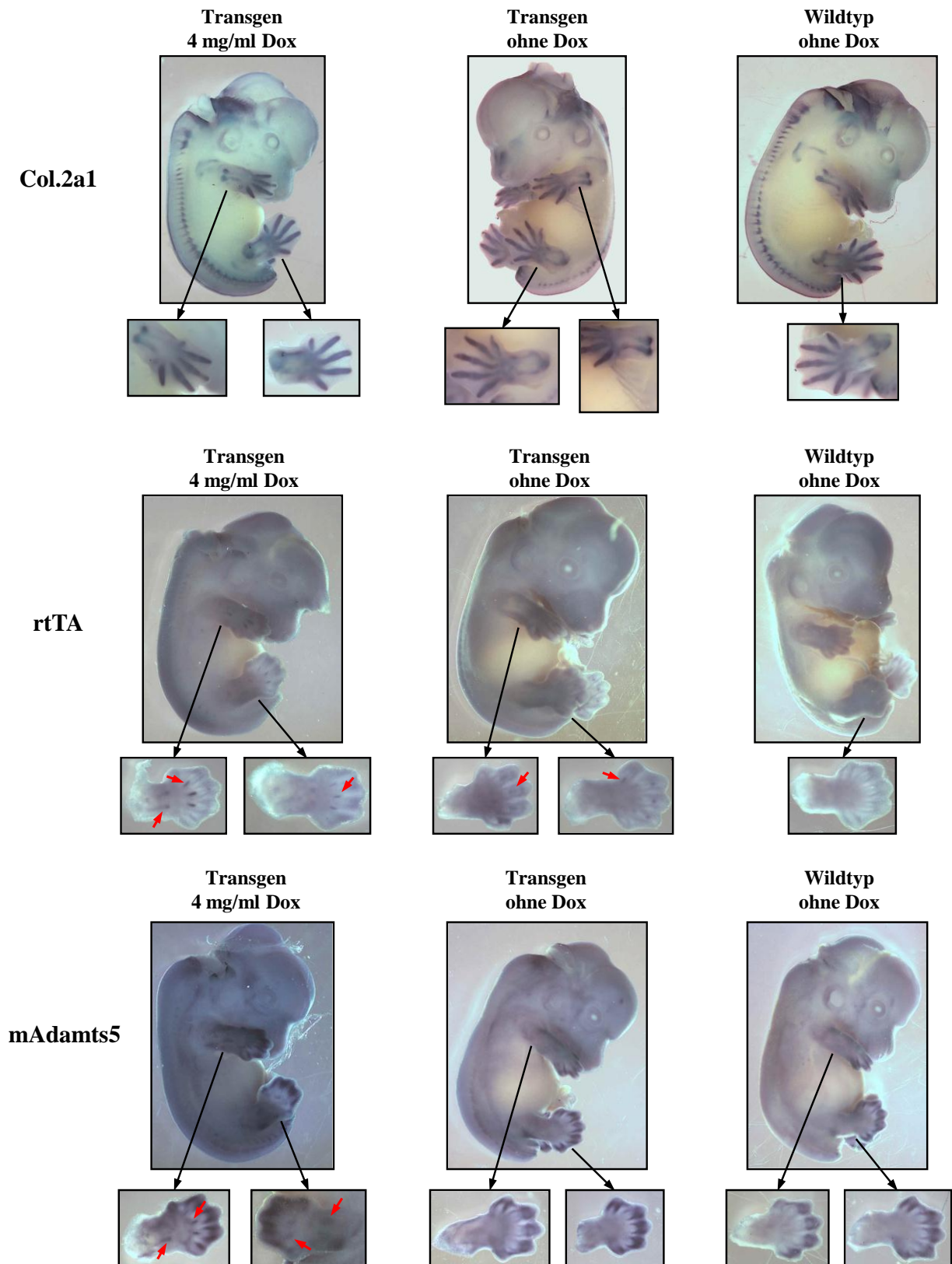
**Linie C** zeigte nach 4 wöchiger Doxyzyklinapplikation bei gleichbleibender *rtTA2<sup>S</sup>-M2*- eine exogen induzierbare transgene *mAdams5*-Expression (**tAdam**) mit leichter basaler Grundaktivität. Als Kontrolle gleicher Mengen eingesetzter cDNA wurde auch hier die Expression von *Aktin* überprüft. Bei Linie C war es nicht möglich homozygote Tiere zu generieren, sodass diese regulierbare Linie nur im heterozygoten Status untersucht werden konnte. Bei **Linie D** war nach Induktion mit Doxyzyklin weder heterozygot noch homozygot bei gleichbleibend schwacher *rtTA2<sup>S</sup>-M2*-Expression eine transgene *mAdams5*-Expression (**tAdam**) nachweisbar. Diese Linie wurde daher ebenfalls nicht weiterbearbeitet.

M = 100 bp-Marker, RT+ = mit reverser Transkriptase, RT- = ohne reverse Transkriptase

Bei hetero- und homozygoten Tieren der Linien A und D wurde nach Doxyzyklininduktion im Knochen keine Expression des transgenen *mAdams5*-Genes (tAdam) detektiert, die Transkription des *rtTA2<sup>S</sup>-M2* war unabhängig von der Induktion gleichbleibend, allerdings sehr schwach. Im Gegensatz hierzu zeigte Linie B, hetero- und homozygot, eine konstitutive Expression des Transgens. Aufgrund der fehlenden beziehungsweise der konstitutiven, nicht induzierbaren Expression wurden diese drei Linien nicht zur Generierung des Osteoarthrose-Modells herangezogen. Die Linie C zeigte bei gleichbleibender *rtTA2<sup>S</sup>-M2*- eine induzierbare transgene *mAdams5*-Expression mit leichter basaler Grundaktivität. Im Folgenden wurde als einzig regulierbare Linie C (*pCol2A5*) weiter analysiert.

### 3.1.3.3 Nachweis der Knorpelspezifität

Nach Bestätigung der Regulation durch RT-PCR Experimente wurde die Knorpelspezifität des Kollagen Typ II-Promotors embryonal und im adulten Tier analysiert. Dieser aus den relevantesten Elementen zusammengesetzte Promotor gewährleistet die Expression des Transgens in ruhenden, proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten (Zhou *et al.*, 1995). Zur Analyse der Knorpelspezifität und zur zusätzlichen Bestätigung der induzierbaren Expression wurde eine *Whole Mount in situ* Hybridisierung (WISH) an Embryonen des Entwicklungsstadiums E 13,5 *dpc* durchgeführt. Hierzu wurden zwei 6-8 Wochen alte transgene als auch Wildtyp-FVB/N-♀ mit einem transgenen bzw. Wildtyp-FVB/N-♂ verpaart und die Weibchen am nächsten Morgen auf einen Vaginalpfropf untersucht. Schwangere FVB/N-♀ erhielten sofort zur Induktion übers Trinkwasser 4 mg/ml Doxyzyklin mit 5% Saccharose. Parallel dazu wurden schwangere Weibchen ohne Doxyzyklin-Applikation mitgeführt. An Tag 13,5 wurden die trächtigen Weibchen abgetötet, die Embryonen freipräpariert und zur Genotypisierung eine Schwanzbiopsie entnommen (Kap. 2.2.3). Nach Fixierung in 4% PFA erfolgte die Hybridisierung. Über *in vitro* Transkription (IVT) wurden DIG-markierte Sonden sowohl des *rtTA2<sup>S</sup>-M2* (668 bp, *rtTA-For1/rtTA-Rev6*) als auch des *mAdamts5* (1308 bp, Position 982-2289) hergestellt (Kap. 2.13.2.1). Zum Nachweis der *mAdamts5*-Expression war es nicht möglich eine IVT-Sonde zu generieren, die spezifisch nur das Transgen detektierte. Aber aufgrund des Kollagen Typ II-Promotors und der daraus für dieses Entwicklungsstadium resultierenden Gewebsspezifität war es möglich die Expression des endogenen und des transgenen *mAdamts5*-Genes in den sich entwickelnden Extremitäten, insbesondere in den Fingern, zu unterscheiden. Als Positivkontrollsonde wurde ein 405 bp umfassendes Fragment des murinen Kollagen Typ II  $\alpha$  I-Transkriptes (Position 872-1275, NM\_001113515, *Col2a1*) verwendet. Nachfolgende Abbildungen zeigen die Ergebnisse der *Whole mount in situ* Hybridisierung (WISH) (Wildtyp: exemplarisch Embryonen ohne Doxyzyklinapplikation).



**Abbildung 3.15: *Whole mount in situ* Hybridisierung (WISH) an transgenen und Wildtyp FVB/N-Embryonen des Entwicklungsstadiums E 13,5 dpc**

Zum Nachweis der Knorpelspezifität und zur zusätzlichen Bestätigung der induzierbaren Expression wurden transgene und Wildtyp-Embryonen mit DIG-markierte Sonden hybridisiert, die zum einen den *rtTA2<sup>S</sup>-M2* als auch das *mAdamts5* detektieren. Die *mAdamts5*-Sonde (1308 bp, Position 982-2289) konnte nicht spezifisch für das Transgen generiert werden. Durch die Verwendung des knorpelspezifischen Kollagen Typ II-Promotors

konnte jedoch das Transgen von der endogen exprimierten *mAdamts5*-Variante unterschieden werden. Als Positivkontrollsonde wurde ein 405 bp umfassendes Fragment des murinen Kollagen Typ II  $\alpha$  I-Transkriptes (Position 872-1275, NM\_001113515, **Col2a1**) verwendet.

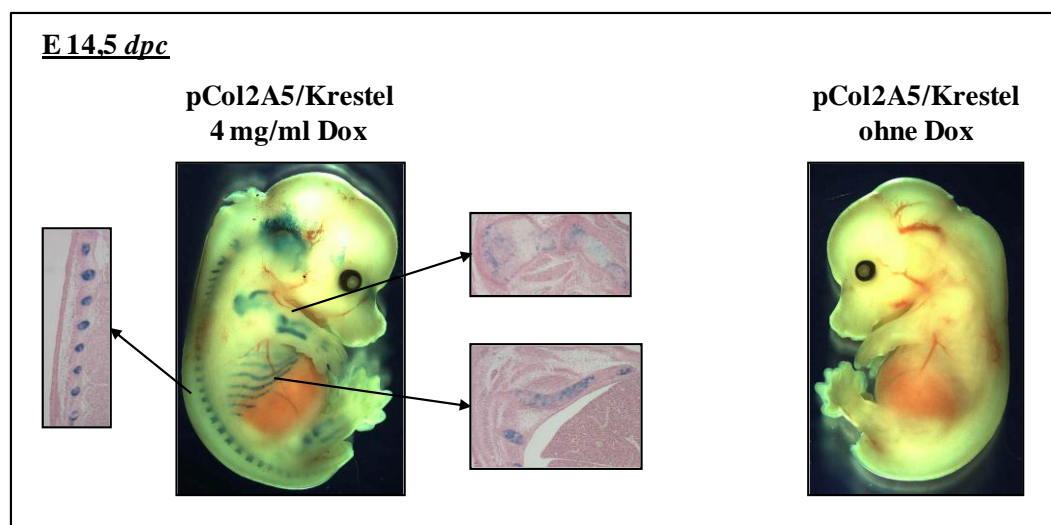
Die Hybridisierung mit der **rtTA**-Sonde (668 bp, rtTA-For1/Rev6) zeigte bei transgenen Tieren Doxyzyklin-unabhängig eine knorpelspezifische Expression in den sich entwickelnden Extremitätenknochen (Pfeile), während bei Wildtyp-Tieren keine Expression auftrat (auch bei den nicht abgebildeten induzierten Wildtyp-Tieren). Die Hybridisierung mit der **mAdamts5**-Sonde wies nur nach Doxyzyklininduktion ein knorpelspezifisches Signal auf (Pfeile). Bei transgenen Tieren bzw. Wildtyp-Tieren ohne Doxyzyklin wurde nur das endogene Transkript in den distalen Fingerbereichen detektiert. Die Kontrollhybridisierung zeigte deutliche Signale in den sich entwickelnden Extremitätenknochen, der Wirbelsäule und im Schädelbereich, dies deckte sich mit dem Expressionsprofil des murinen Kollagen Typ II  $\alpha$  I-Transkriptes.

Die Hybridisierung mit der **rtTA2<sup>S</sup>-M2**-Sonde zeigte bei transgenen Tieren, induziert als auch nicht induziert, Signale in den sich entwickelnden Extremitäten. Wildtyp-Tiere wiesen keine Expression auf. Bei dem Nachweis des *mAdamts5* wurde das endogene Transkript in den distalen Fingerbereichen detektiert. Das transgene wurde durch den gewebsspezifischen Kollagen Typ II-Promotor in den sich entwickelnden Fingerknochen exprimiert. Bei nicht induzierten Embryonen zeigte sich keine Expression des transgenen *mAdamts5*. Auch bei Wildtyptieren war nur das endogene Transkript nachweisbar. Mit der WISH konnte auf Transkriptebene gezeigt werden, dass das Transgen nach Induktion mit Doxyzyklin gewebsspezifisch in den sich entwickelnden Extremitäten exprimiert wurde.

Durch Verpaarung mit Reportermausen ist es ebenfalls möglich die gewebsspezifische Expression des zu analysierenden Transgens nachzuweisen. Diese durch das TRE mit nachgeschaltetem Minimalpromotor ( $tetO/P_{hCMV}$ ) Doxyzyklin-sensitiven Gene erlauben eine visuelle Dokumentation der Gewebsspezifität. Weiterhin kann auch die Doxyzyklinabhängige Regulation des Reportertranskriptes und dementsprechend sehr wahrscheinlich die des zu untersuchenden Transgens analysiert werden. Als Reportermaus wurde die von Krestel *et al.* (2001) publizierte *TetO<sub>bi</sub>-LacZ/GFP*-Maus (*Krestel-Maus*) verwendet. Das transgene Konstrukt dieser Mauslinie beinhaltet neben dem bidirektionalen TetO-Promotor die Gene *LacZ* und *GFP*. So kann durch eine X-Gal-Färbung sehr einfach die Expression von *LacZ* am kompletten Embryo und auf zellulärer Ebene visualisiert und dementsprechend Rückschlüsse auf die Regulation und Spezifität der transgenen *mAdamts5*-Expression gezogen werden. Zwei transgene *pCol2A5*-Weibchen wurden mit einem *Krestel*-Männchen verpaart und direkt mit 4 mg/ml Doxyzyklin im Trinkwasser (5 % Saccharose) induziert. Gleichermaßen erfolgten Verpaarungen ohne Applikation. Trächtige Weibchen wurden zur Analyse verschiedener Entwicklungsstadien an Embryonaltag E 14,5 *dpc*, E 16,5 *dpc* und E 18,5 *dpc* abgetötet, die Embryonen freipräpariert und Schwanzbiopsien zur Genotypisierung entnommen. Nachdem über PCR (*Krestel*-Transgen: hGFP-LacZ-12/13; *pCol2A5*-Transgen:



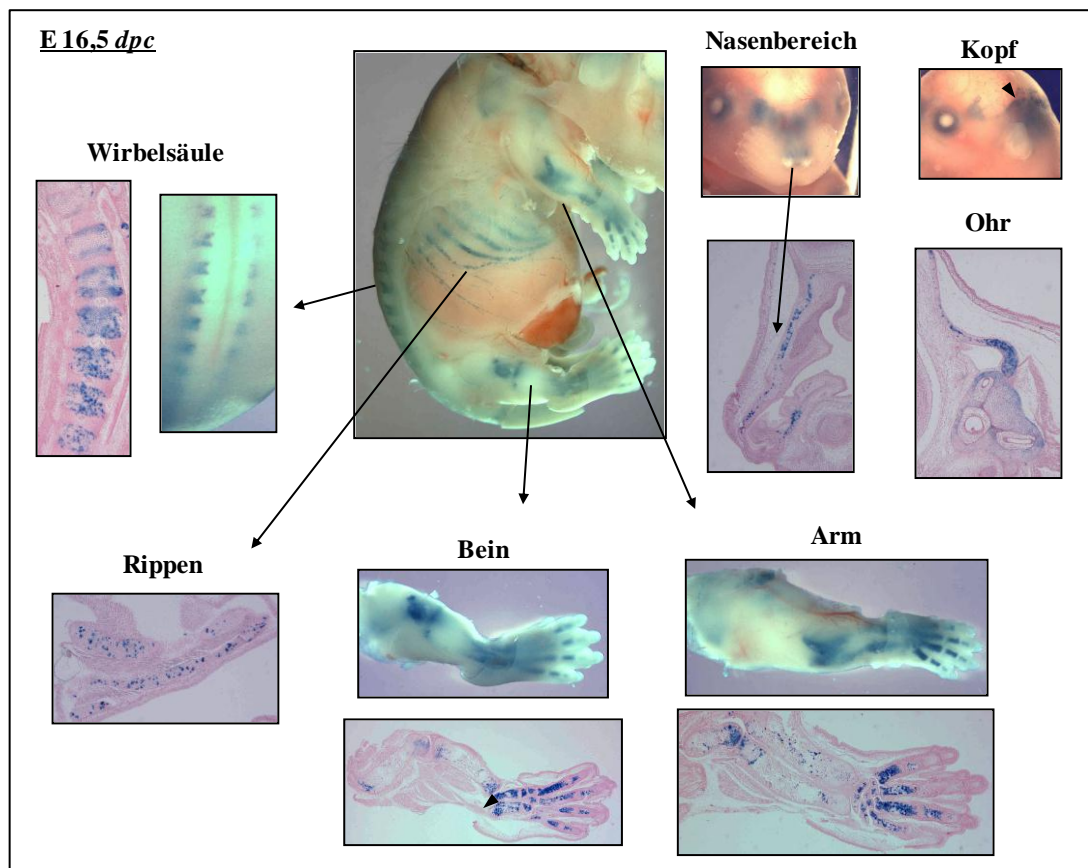
rtTA-For1/rtTA-Rev6) der Genotyp der Embryonen ermittelt war, erfolgte die LacZ-Färbung (Kap. 2.3.3.2) und im Anschluss an die Fotodokumentation die Herstellung der Paraffinschnitte (4  $\mu$ m). Bei Entwicklungsstadium E 14,5 *dpc* und E 16,5 *dpc* wurde der komplette Embryo gefärbt, bei E 18,5 *dpc* die Organe zuvor entnommen. Nachfolgend sind die Ergebnisse der X-Gal-Färbungen dargestellt (Abb. 3.16 A-C).



**Abbildung 3.16A: X-Gal-Färbungen von Embryonen des Entwicklungsstadiums E 14,5 *dpc***

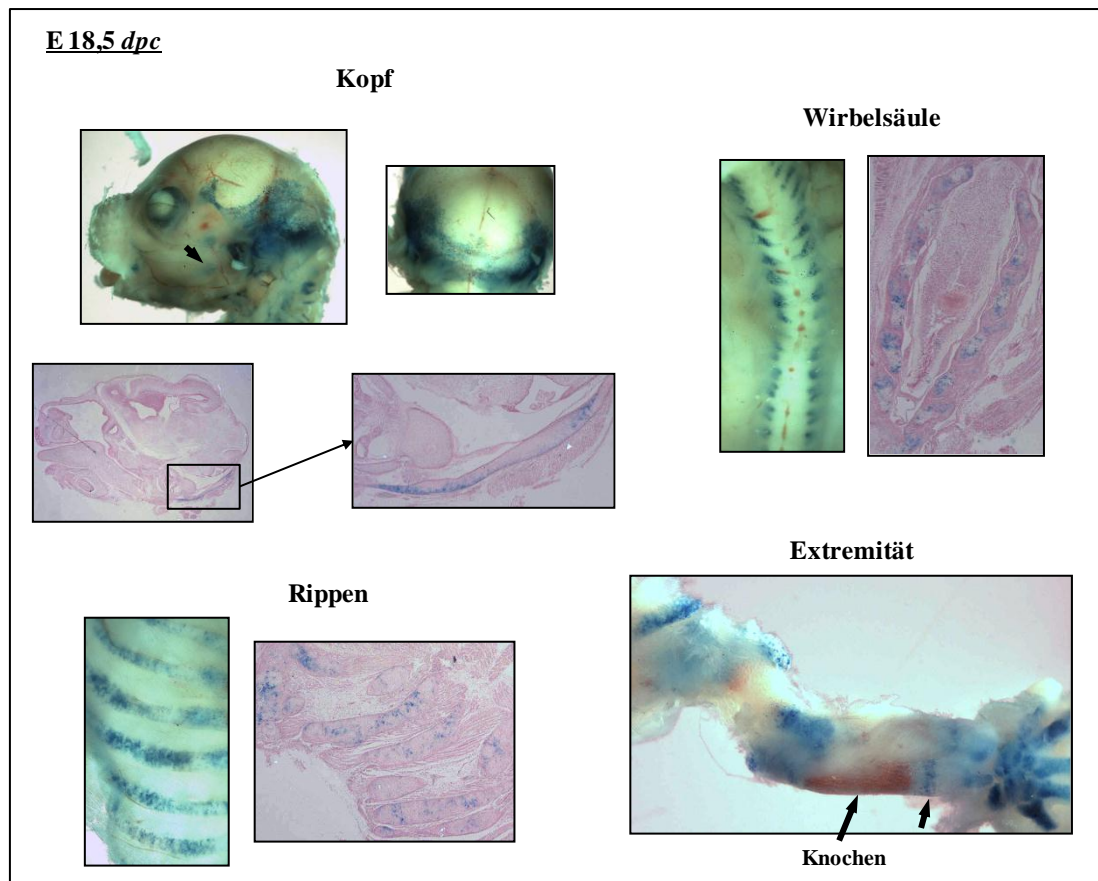
Nach Verpaarung von *Krestel*-Reporter-mäusen mit transgenen pCol2A5-Mäusen unter Doxyzyklininduktion wurden Embryonen an Entwicklungstag E 14,5 *dpc* präpariert, über Schwanzbiopsien genotypisiert und mit X-Gal gefärbt. Nach Fotodokumentation des Embryos erfolgte die Herstellung der Paraffinschnitte, die mit Kernechtrot gegengefärbt wurden.

Der Kollagen Typ II-Promotor exprimiert den *rtTA2<sup>S</sup>-M2* chondrozytenspezifisch und durch das TRE mit nachgeschalteten Minimalpromotor wurde bei doppeltransgenen Tieren sowohl das transgene *mAdamts5*- als auch das *lacZ*-Gen exprimiert. Die Transkription des *lacZ*-Genes kann durch die X-Gal-Färbung visualisiert werden. Bei doppeltransgenen Tieren pCol2A5/Krestel mit 4 mg/ml Doxyzyklininduktion waren eindeutige Farbesignale in den knorpeligen Anteilen der sich entwickelnden Extremitäten, der Wirbelsäule und der Rippen erkennbar. Weiterhin waren auch die seitlichen Knochen des Hinterkopfes angefärbt. Das Expressionsmuster deckte sich mit den bereits beschriebenen Experimenten bezüglich des Kollagen Typ II Promotors (Zhou *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1998). Doppeltransgene Tiere ohne Doxyzyklinapplikation zeigten keine Anfärbungen. Tiere, die nur ein Transgen trugen, induziert und nicht induziert, als auch Wildtypiere zeigten keine Färbung (Daten nicht abgebildet).



**Abbildung 3.16B: X-Gal-Färbungen von Embryonen des Entwicklungsstadiums E 16,5 *dpc***

Hier wurden doppeltransgene Embryonen des Entwicklungstages E 16,5 *dpc* analysiert. Auch hier zeigten sich chondrozytenspezifische Signale in den sich entwickelnden Extremitäten, der Wirbelsäule, der Rippen und in den seitlichen Regionen des Schädelknochens. Die knorpeligen Anteile des Nasenseptums waren ebenfalls mit angefärbt. Nach Herstellung der sagittalen Paraffinschnitte zeigte sich auch eine Färbung im Ohrbereich. Die angeschnittenen Bogengänge sind gut zu erkennen. Die auch hier durchgeführten Negativkontrollen (nicht abgebildet) zeigten keine Färbung.



**Abbildung 3.16C: X-Gal-Färbungen von Embryonen des Entwicklungsstadiums E 18,5 dpc**

Auch die Analyse doppeltransgener Embryonen des Entwicklungsstadiums E 18,5 dpc zeigte eine chondrozytenspezifische Expression des *lacZ*- und dementsprechend sehr wahrscheinlich auch eine des transgenen *mAdamts5*-Genes. Alle knorpeligen Anteile wurden angefärbt. Bei diesem Entwicklungsstadium ist gut die Färbung in den basooccipitalen und exooccipitalen Regionen des Hinterkopfes und im Unterkiefer (Pfeil) zu erkennen. In den Extremitäten (exemplarisch dargestellt: Unterarm) ist ebenfalls gut die angefärbte Wachstumslinie (Pfeil), die aus den verschiedenen differenzierten Chondrozyten besteht, und der sich gebildete Knochen dokumentiert. Durchgeführte Negativkontrollen zeigten keine Färbung.

Wie in den Abbildungen 3.16 A-C gut zu sehen ist, zeigte sich eine stringente, Doxzyklin induzierbare Expression des Reportergenes und somit sehr wahrscheinlich auch des transgenen *mAdamts5*-Genes in allen knorpeligen Anlagen der Röhrenknochen, der Wirbelknochen, den Rippen und dem Schulterblatt. Weiterhin waren Signale in den basooccipitalen und exooccipitalen Regionen des Hinterkopfes als auch bei Entwicklungstag E 18,5 dpc im Unterkiefer zu erkennen. Auch war hier in den Extremitäten (exemplarisch abgebildet der Arm) sehr gut die angefärbte Wachstumslinie, die aus den verschiedenen differenzierten Chondrozyten besteht, und der sich bereits gebildete Knochen dokumentiert. Das Expressionsmuster deckte sich mit den bereits beschriebenen Experimenten bezüglich des Kollagen Typ II Promotors (Zhou *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1998). Keinerlei Färbung war in der Haut, dem Gehirn, den Organen und weiteren nicht-knorpeligen Geweben zu sehen

(Daten nicht abgebildet). Kontrolltiere ohne Doxyzyklinapplikation zeigten keine Expression, daher wurde nur für E 14,5 *dpc* exemplarisch das Kontrolltier abgebildet.

Zusammenfassend wurde sowohl durch die *Whole mount in situ* Hybridisierung (WISH) als auch durch die Verpaarung mit der *TetO<sub>bi</sub>-LacZ/GFP*-Reportermaus auf embryonaler Ebene die Knorpelspezifität des Kollagen Typ II-Promotors nachgewiesen. Weiterhin zeigte sich auch eine über das Tet-System regulierbare Expression des Transgens.

Im Rahmen der Analyse zur Knorpelspezifität des Promotors bei adulten Tieren wurde ein Expressionsmuster erstellt, in dem neben Knochen auch die Gewebe Niere, Herz, Lunge, Haut, Leber, Milz und Gehirn auf die Expressionsregulation des transgenen *mAdamts5* überprüft wurden. Ferner erfolgte der Expressionsnachweis des *rtTA2<sup>S</sup>-M2* und, um eventuelle kompensatorische Effekte zu analysieren, auch der des endogenen *mAdamts5*. Tiere gleichen Alters wurden zunächst vier Wochen mit 4 mg/ml Doxyzyklin (5% Saccharose) induziert, Kontrolltiere erhielten normales Trinkwasser. Von den Organen wurde RNA präpariert und revers transkribiert. Bei der sich anschließenden RT-PCR wurden die Primer so gewählt, dass nur entweder das transgene (Adam-Transgen-F/SV40-pAR) oder das endogene Transkript (Adam-Transgen F/TS2A-R) amplifiziert wurde. In folgender Tabelle sind die Expressionsstärken der untersuchten Gene dargestellt.

**Tabelle 3.1: Expression des transgenen *mAdamts5*, des *rtTA2<sup>S</sup>-M2*- und des endogenen *mAdamts5*-Transkriptes in unterschiedlichen Geweben**

Nach vierwöchiger Doxyzyklininduktion wurden die Tiere abgetötet und die Gewebe freipräpariert. Nach RNA-Isolation und reverser Transkription wurden die Expressionsstärken der drei zu untersuchenden Gene mittels RT-PCR ermittelt. Orange hervorgehoben ist das Expressionsprofil im Knochen, grün markierte Felder weisen auf eine Doxyzyklinabhängige Expressionsregulation hin.

tg = transgen; wt = Wildtyp; tAdamts5 = transgenes *mAdamts5*-Transkript; eAdamts5 = endogenes *mAdamts5*-Transkript

+++ = stark; ++ = mittel; + = schwach; (+) = sehr schwach; - = nicht exprimiert

	tAdamts5			eAdamts5			rtTA2 <sup>S</sup> -M2		
	tg + Dox	tg - Dox	wt + Dox	tg + Dox	tg - Dox	wt + Dox	tg + Dox	tg - Dox	wt + Dox
Niere	++	+	-	+	++	(+)	++	+	-
Herz	++	+	-	+	++	++	++	++	-
Lunge	++	+	-	++	+	-	+	+	-
Haut	++	+	-	++	+	-	+	+	-
Leber	(+)	(+)	-	++	-	-	(+)	(+)	-
Milz	+	(+)	-	+	++	-	++	+	-
Knochen	+++	+	-	++	++	+	+++	+++	-
Gehirn	+++	+++	-	++	(+)	(+)	+++	+++	-

Das Expressionsmuster des Effektors *rtTA2<sup>S</sup>-M2* zeigte, dass der verwendete Kollagen Typ II Promotor, der den reversen Transaktivator knorpelspezifisch exprimieren sollte, im adulten Tier auch in nicht-chondrogenen Geweben aktiv war. Der *rtTA2<sup>S</sup>-M2* war in allen untersuchten Geweben in unterschiedlicher Stärke exprimiert. Lunge, Haut und Leber zeigten bei transgenen Tieren nur eine sehr schwache Transkription, bei Niere, Herz, Milz und Gehirn war diese stärker ausgeprägt. Weiterhin zeigte sich eine starke, Doxyzyklin-unabhängige Expression im Knochen. Die Ergebnisse deckten sich zum überwiegenden Teil mit den Expressionsdaten des Kollagen Typ II- $\alpha 1$  (*Col2A1*)-Transkriptes bei NCBI („US National Center for Biotechnology Information“). Niere, Herz und Gehirn zeigen hier eine Transkription, Leber und Lunge weisen keine Expression auf.

Das Expressionsmuster des Effektors bestimmte auch das des transgenen *mAdamts5*-Genes. Neben der starken Regulation nach Doxyzyklin-Applikation im Knochen war auch eine weniger starke Regulation in Niere, Herz, Lunge und Milz zu erkennen. Auch hier zeigte sich wie auch bereits bei dem *rtTA2<sup>S</sup>-M2* eine starke, Doxyzyklin-unabhängige Expression im Gehirn. Um zu überprüfen ob bei Linie C ein Positionseffekt diese Expression im Gehirn verursachte, wurden die drei nicht weiter bearbeiteten Linien A, B und D auf ihre gehirnspezifische Expression des *rtTA2<sup>S</sup>-M2* und des transgenen *mAdamts5* untersucht. Linie A und B zeigten ebenfalls eine Transkription im Gehirn, Linie D keine (Daten nicht abgebildet).

In den Organen Niere, Herz und Milz fiel auf, dass nach Induktion mit Doxyzyklin die Expression des endogenen *mAdamts5*-Transkriptes herunter reguliert wurde, während die transgene *mAdamts5*-Expression anstieg (grün markiert).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch im adulten Tier die Doxyzyklin-Applikation eine Regulation des transgenen *mAdamts5* im Knorpel bedingt. Ferner konnte eine *rtTA2<sup>S</sup>-M2*- als auch eine transgene *mAdamts5*-Expression in nicht-chondrogenen Geweben nachgewiesen werden.

### **3.1.4 Funktionalität der transgenen Aggrekanase**

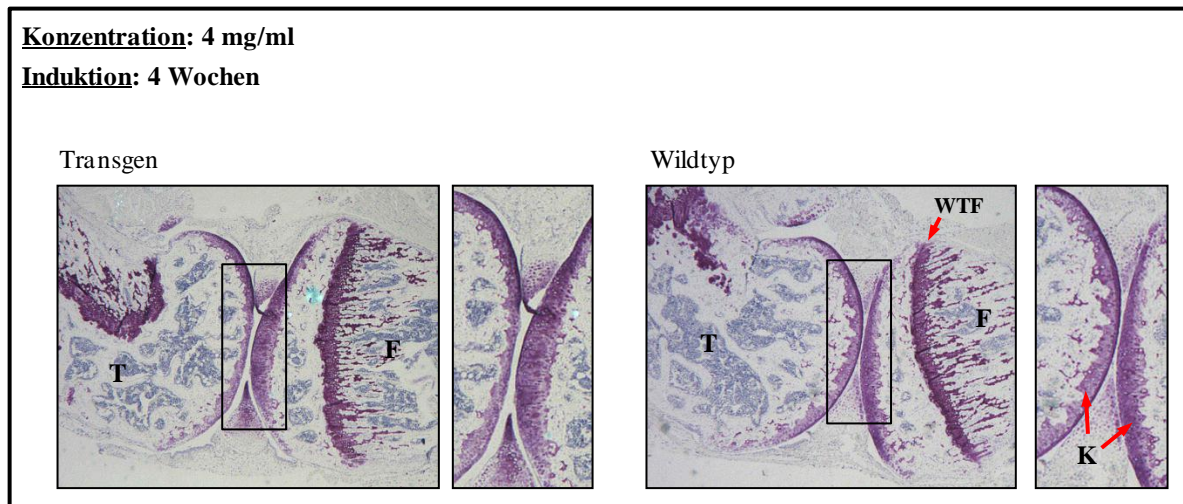
#### **3.1.4.1 Histologische Auswertungen**

Nachdem bei Linie C eine exogen induzierbare Überexpression des transgenen *mAdamts5* nachgewiesen worden war, sollte im Folgenden die Funktionalität des Transgens überprüft werden, d.h. kann Aggrekan abgebaut und eine Osteoarthritis ähnliche Situation in der Maus simuliert werden. Dies würde die Relevanz des Enzymes im Pathogeneseprozess der Osteoarthritis bestätigen.

Die Aggrekanasen, zu denen Adamts5 gehört, sind eine Untergruppe der ADAMTS (*disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs*)-Familie, welche selbst 19 Gene umfasst. Sie besitzen eine katalytische Metalloprotease-Domäne mit Zink-Bindemotiv vom Reprolysin-Typ (HEXXHXXG/N/SXXHD). Studien, in denen der inhibitorische Effekt von Doxyzyklin auf Matrix Metalloproteasen untersucht wurde, zeigten, dass aufgrund der metallbindenden Eigenschaft von Doxyzyklin diese Inhibition zustande kommt (Golub *et al.*, 1991). Für die Matrix Metalloprotease-2 und -9 zum Beispiel liegt der IC<sub>50</sub>-Wert, also die Konzentration, bei der das Enzym zur Hälfte inhibiert wird, bei 25 µg/ml (Wang *et al.*, 2005). Greenwald und Kollegen beschrieben bereits 1998 einen IC<sub>50</sub>-Wert für MMP-13 und MMP-8 von < 1 µg/ml bzw. 15-86 µg/ml. Ebenfalls konnte Ramamurthy *et al.* 1993 zeigen, dass MMP's in Osteoblasten bei einer Doxyzyklinkonzentration von 50 µM (entspricht 25 µg/ml) um die Hälfte inhibiert werden, während bei einer Konzentration zwischen 6-25 µM kein inhibitorischer Effekt mehr zu sehen war. Entsprechende Untersuchungen lagen für Aggrekanasen nicht vor. Aufgrund der Metalloprotease-Domäne mit Zink-Bindemotiv musste jedoch eine ähnlich inhibitorische Wirkung angenommen werden. Um eine optimale Doxyzyklinkonzentration zu erhalten, bei der das Transgen ausreichend für einen Aggrekanabbau überexprimiert wird und andererseits keine Inhibition durch Doxyzyklin erfolgt, wurden verschiedene Konzentrationen ausgetestet. Um ferner auszuschließen, dass eventuell die Induktionszeit von vier Wochen nicht ausreichend für einen sichtbaren Aggrekanabbau ist, wurde zusätzlich noch über einen Zeitraum von drei und sechs Monaten induziert.

Gleich alte Tiere wurden vier Wochen lang übers Trinkwasser mit verschiedenen Doxyzyklinkonzentrationen (5% Saccharose) induziert, anschließend abgetötet und das zu untersuchende Kniegelenk in PBS auf Eis freipräpariert. Nach der Fixierung (4 % gepuff. Formalin) wurde der Knochen entkalkt, eingebettet und 4 µm-Schnitte hergestellt. Mittels der Färbung mit dem kationischen Farbstoff Toluidinblau ließen sich Proteoglykane, zu denen auch das Aggrekan gehört, aufgrund ihrer polyanionischen Glykosaminoglykaneitenketten anfärben. So war es möglich, durch eine exogen induzierte Überexpression des transgenen mAdamts5 dessen Fähigkeit, Aggrekan abzubauen, zu visualisieren. Je mehr Enzym exprimiert wird, desto mehr Aggrekan müsste abgebaut werden und desto geringer dürfte die Farbintensität des Toluidinblau sein. In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Nicolai Miosge (Zentrum ZMK-Abteilung Prothetik, Georg-August-Universität Göttingen) wurden die Tiere mit 3- und 6-monatiger Induktion untersucht. Diese Langzeitinduktionen mit den verschiedenen Doxyzyklinkonzentrationen wurden in Mainz durchgeführt und die Tiere im Anschluss zur

Präparation nach Göttingen gebracht. Dort wurden die Kniegelenke präpariert und entkalkt, 4-6 µm Schnitte hergestellt und mit Alzianblau gefärbt, welcher ebenso wie Toluidinblau ein kationischer Farbstoff ist. Im Folgenden sind exemplarisch für jede Konzentration gefärbte Kniegelenksschnitte abgebildet.



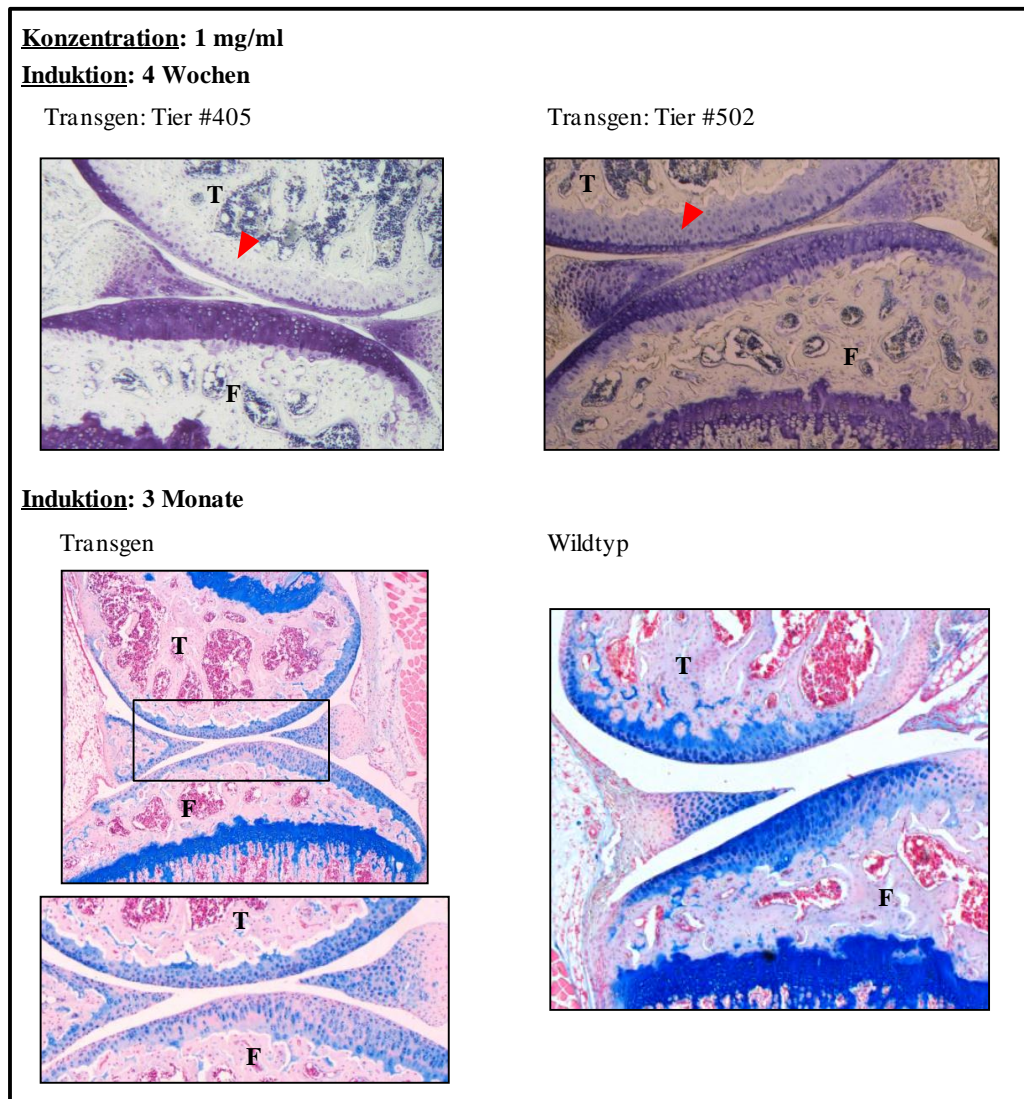
**Abbildung 3.17: Gefärbte Kniegelenksschnitte von mit 4 mg/ml Doxyzyklin induzierten Tieren**

Nach 4-wöchiger Doxyzyklininduktion wurden die Kniegelenke von transgenen und Wildtyp-Tieren freipräpariert, 4 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt und mit Toluidinblau angefärbt. Der Knorpelbereich ist vergrößert dargestellt. Es waren keine Auffälligkeiten, weder Risse noch Veränderungen in der Intensität der Proteoglykanfärbung erkennbar.

T = Tibia; F = Femur; WTF = Wachstumsfuge; K = Knorpel

Wie in Abbildung 3.17 gut zu sehen ist, zeigte sich bei einer Induktion über 4 Wochen mit 4 mg/ml Doxyzyklin keine Veränderung des Knorpels, weder in der Intensität der Proteoglykanfärbung noch in dem Vorhandensein von Knorpelerosionen. Dies deckte sich mit der Annahme, dass die Aktivität von Adamts5 durch Dox-Konzentrationen in dieser Höhe vollständig inhibiert wird.

Die Induktion mit 1 mg/ml Dox über 4 Wochen zeigte unterschiedliche Ergebnisse (Abb. 3.18). Beispielhaft wurden zwei Tiere abgebildet, die im Knorpelbereich der Tibia unterschiedlich starke Proteoglykananfärbungen aufwiesen (rote Pfeile). Bei einer Induktionszeit von drei Monaten zeigte sich eine geringere Farbintensität im Knorpelbereich, sowohl bei Femur als auch bei Tibia, was unter Umständen auf einen stärkeren Aggrecanabbau im Vergleich zum Wildtyp tier schließen ließ. Knorpelerosionen in Form von z. B. Rissen wurden nicht detektiert.



**Abbildung 3.18: Gefärbte Kniegelenksschnitte von mit 1 mg/ml Doxyzyklin induzierten Tieren**

Abgebildet sind bei einer Induktion von vier Wochen die Kniegelenksschnitte zweier transgener Tiere, die im Knorpelbereich unterschiedliche Färbungen aufwiesen. Bei beiden war im Knorpelmittelbereich der Tibia eine leicht verminderte Farbintensität dokumentiert (Pfeil). Knorpelerosionen waren nicht zu erkennen. Schnitte von Wildtyptieren zeigten keine Veränderungen (nicht abgebildet). Die Langzeitinduktion von drei Monaten wies im Vergleich zum induzierten Wildtyptier ebenfalls eine leicht verminderte Knorpelfärbung auf. Der Knorpelbereich selbst wurde vergrößert dargestellt. Knorpelerosionen waren auch hier nicht zu sehen.

T = Tibia; F = Femur

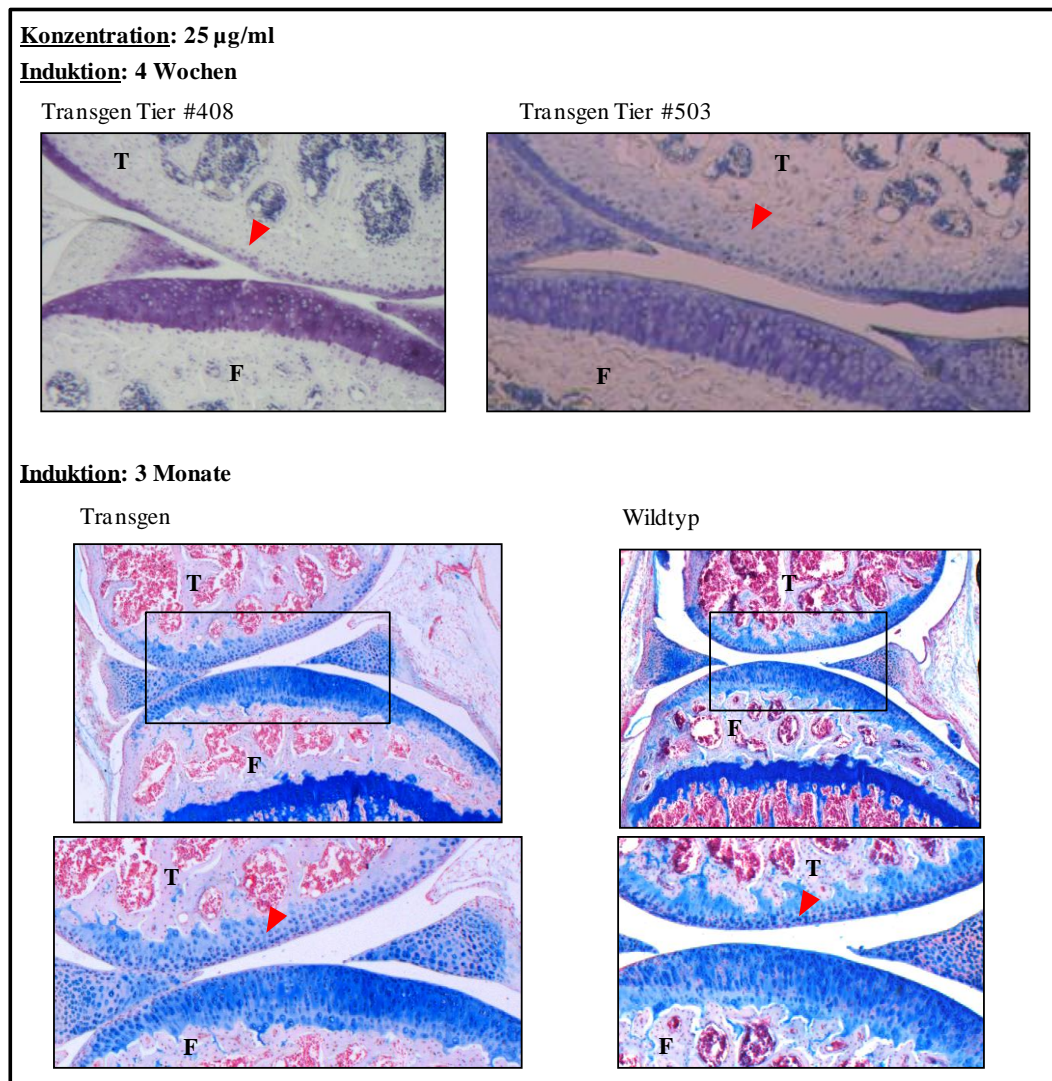
Induktion 4 Wochen: Toluidinblaufärbung; Induktion 3 Monate: Alzianblaufärbung

Auch bei einer Konzentration von 25 µg/ml, welcher dem IC<sub>50</sub>-Wert von MMP's in Osteoblasten entspricht (Ramamurthy *et al.*, 1993) und für die Aggrekanase Adamts5 in diesem Versuch angenommen wurde, zeigten sich unterschiedliche Befunde (Abb. 3.19). Exemplarisch sind die Kniegelenke zweier Tiere abgebildet, die vier Wochen lang mit 25 µg/ml Doxyzyklin induziert worden waren. Wie auch bereits bei der Induktion mit 1 mg/ml zeigten sich im Knorpelbereich der Tibia unterschiedliche Farbintensitäten (Pfeile). Die Induktion über drei Monate zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine leicht verminderte



Färbung im Randbereich des Tibiaknorpels. Auch hier konnte über den längeren Induktionszeitraum eine verminderte Farbintensität und somit eventuell ein verringerter Proteoglykangehalt festgestellt werden. Jedoch war der Farbunterschied sehr gering und die daraus resultierende Interpretation der Aggrekanmenge beziehungsweise des Aggrekanverlustes nach Induktion schwierig.

Alle untersuchten Tiere wiesen keine Knorpelbeschädigungen in Form von Rissen auf.

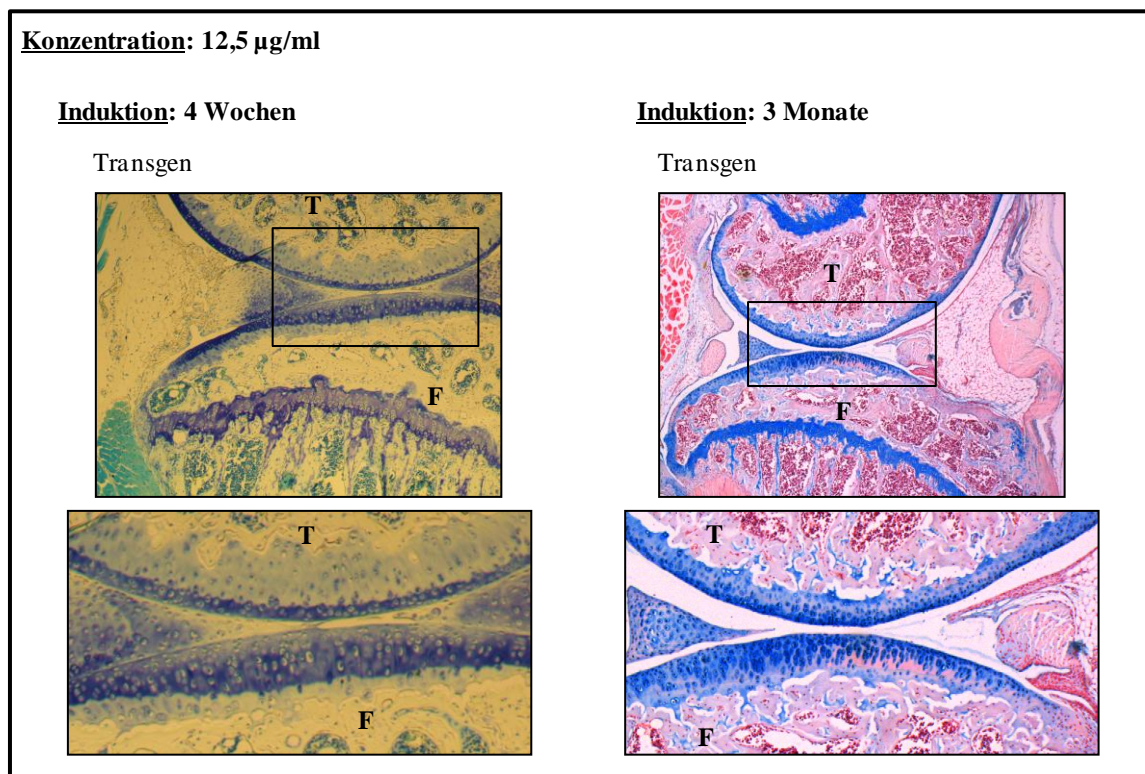


**Abbildung 3.19: Gefärbte Kniegelenksschnitte von mit 25 µg/ml Doxzyklin induzierten Tieren**

Nach 4-wöchiger Induktion mit 25 µg/ml Doxzyklin zeigten sich, hier exemplarisch die Schnitte zweier transgener Tiere abgebildet, unterschiedliche Farbintensitäten (Pfeil). Der Knorpelmittelbereich wies eine schwächere Färbung auf, was möglicherweise auf eine geringere Aggrekanmenge schließen lassen könnte. Knorpelerosionen konnten nicht detektiert werden. Auch die Langzeitinduktion von drei Monaten zeigte die gleichen Ergebnisse, leicht verminderte Farbintensität im Vergleich zum WildtypTier ohne erkennbare Erosionen. T = Tibia; F = Femur

Induktion 4 Wochen: Toluidinblaufärbung; Induktion 3 Monate: Alzianblaufärbung

Da bei 12,5 µg/ml Doxyzyklin (entspricht 25 µM) für MMP's in Osteoblasten kein inhibitorischer Effekt mehr nachgewiesen werden konnte (Ramamurthy *et al.*, 1993), wurde auch diese Konzentration in Bezug auf Aggrekanasen untersucht. Wie in Abbildung 3.20 zu sehen ist, konnte weder bei 4 Wochen noch bei 3 Monaten eine Abnahme der Farbintensität, also ein verminderter Proteoglykangehalt, festgestellt werden.



**Abbildung 3.20: Gefärbte Kniegelenksschnitte von mit 12,5 µg/ml Doxyzyklin induzierten Tieren**

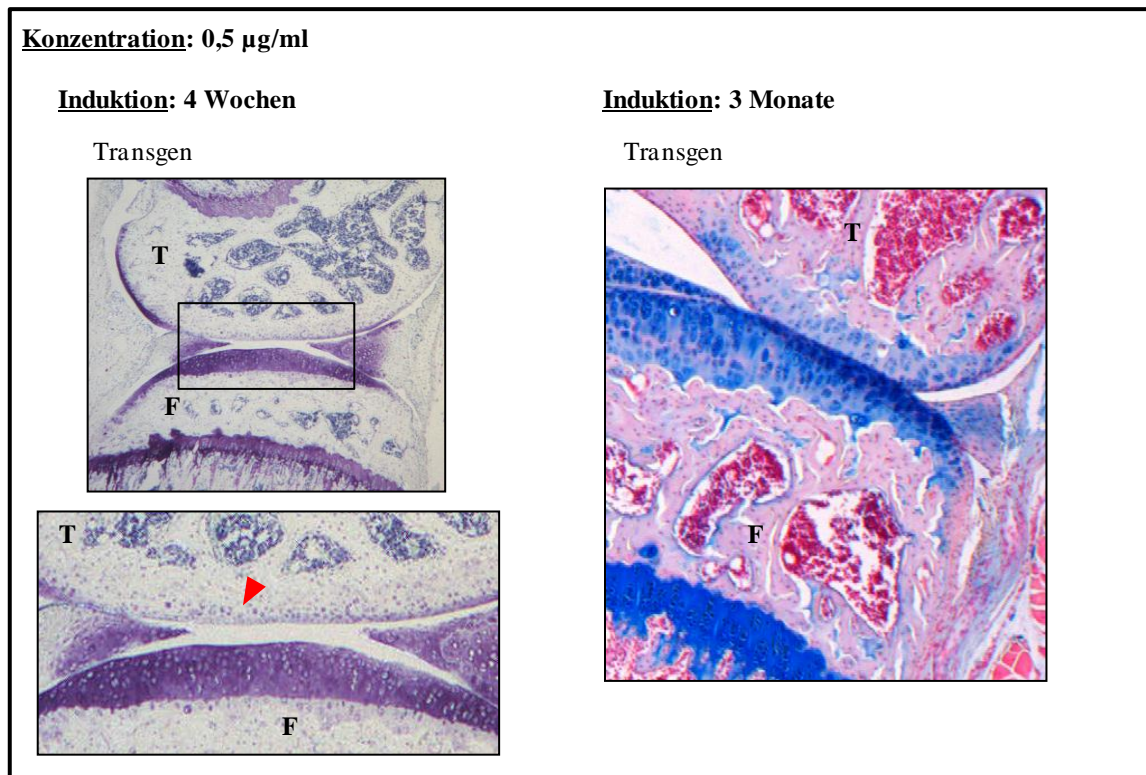
Zu sehen sind die Kniegelenksschnitte und Vergrößerungsaufnahmen von mit 12,5 µg/ml Doxyzyklin induzierten transgenen Tieren. Bei beiden Induktionszeiten konnte keine Abnahme der Farbintensität detektiert werden. Negativkontrollen (nicht abgebildet) wurden mitgeführt und zeigten keine Auffälligkeiten.

T = Tibia; F = Femur

Induktion 4 Wochen: Toluidinblaufärbung; Induktion 3 Monate: Alzianblaufärbung

Die Induktion mit 0,5 µg/ml Doxyzyklin (Abb. 3.21) wies nach 4 Wochen Induktion im Knorpelbereich der Tibia eine verminderte Farbintensität auf (roter Pfeil). Der Knorpel des Femurs zeigte keine Veränderung. Beide Knorpelbereiche zeigten keine Erosionen. Nach drei Monaten Induktion konnte widersprüchlicherweise keine starke Abnahme der Blaufärbung mehr beobachtet werden, was aufgrund der 4 Wochen Induktion zu erwarten gewesen wäre. Da jedoch schon bei einer Induktion mit 12,5 µg/ml keine Veränderungen im Proteoglykangehalt mehr festgestellt werden konnten, war es sehr wahrscheinlich, dass auch

mit dieser geringen Konzentration kein Effekt mehr zu erwarten war. Es könnte sich bei der 4 Wochen Induktion um einen Präparationsartefakt gehandelt haben.



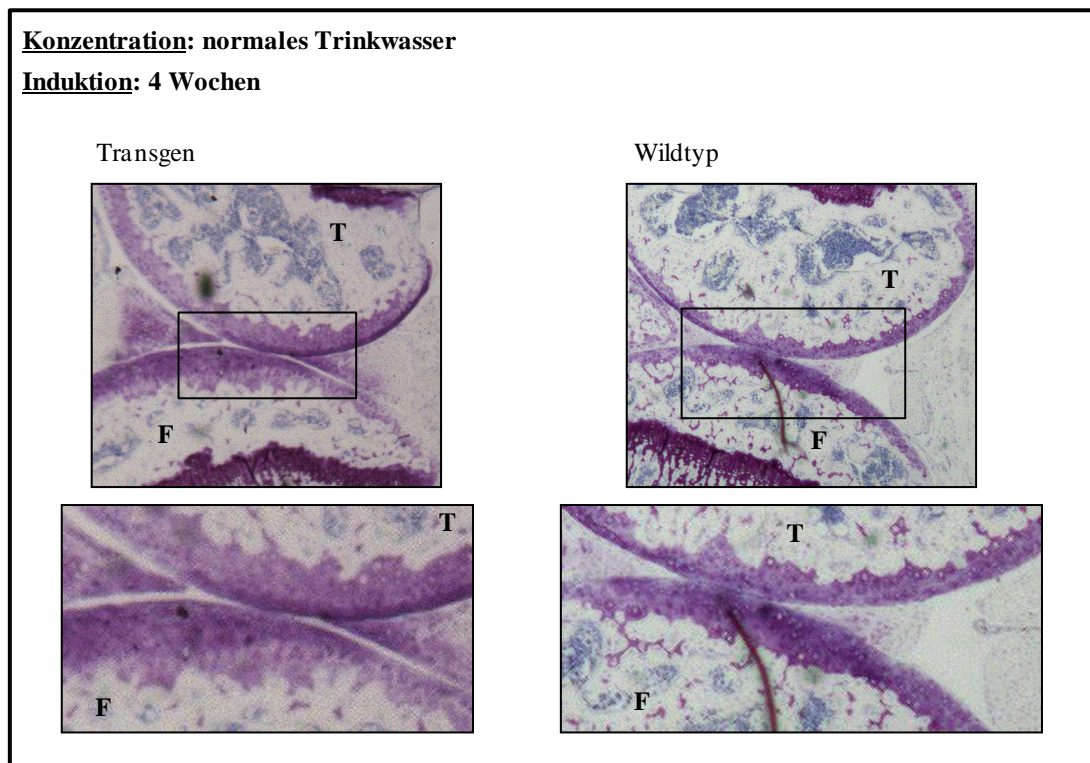
**Abbildung 3.21: Gefärbte Kniegelenksschnitte von mit 0,5 µg/ml Doxyzyklin induzierten Tieren**

Die Induktion mit 0,5 µg/ml Doxyzyklin brachte widersprüchliche Ergebnisse. Nach 4 Wochen Induktion war im Knorpelbereich der Tibia (Pfeil) eine verminderte Farbintensität detektierbar, jedoch konnte nach dreimonatiger Induktion dies nicht bestätigt werden. Geeignete Negativkontrollen wurden mitgeführt (Daten nicht abgebildet) und zeigten keine Auffälligkeiten.

T = Tibia; F = Femur

Induktion 4 Wochen: Toluidinblaufärbung; Induktion 3 Monate: Alzianblaufärbung

Als Negativkontrolle wurden transgene als auch nicht transgene Tiere ohne Doxyzyklin-Induktion untersucht (Abb. 3.22). Die analysierten Tiere zeigten wie erwartet weder verminderte Proteoglykanfärbungen noch Knorpelerosionen.



**Abbildung 3.22: Toluidinblaugefärbte Kniegelenksschnitte von nicht induzierten Tieren**

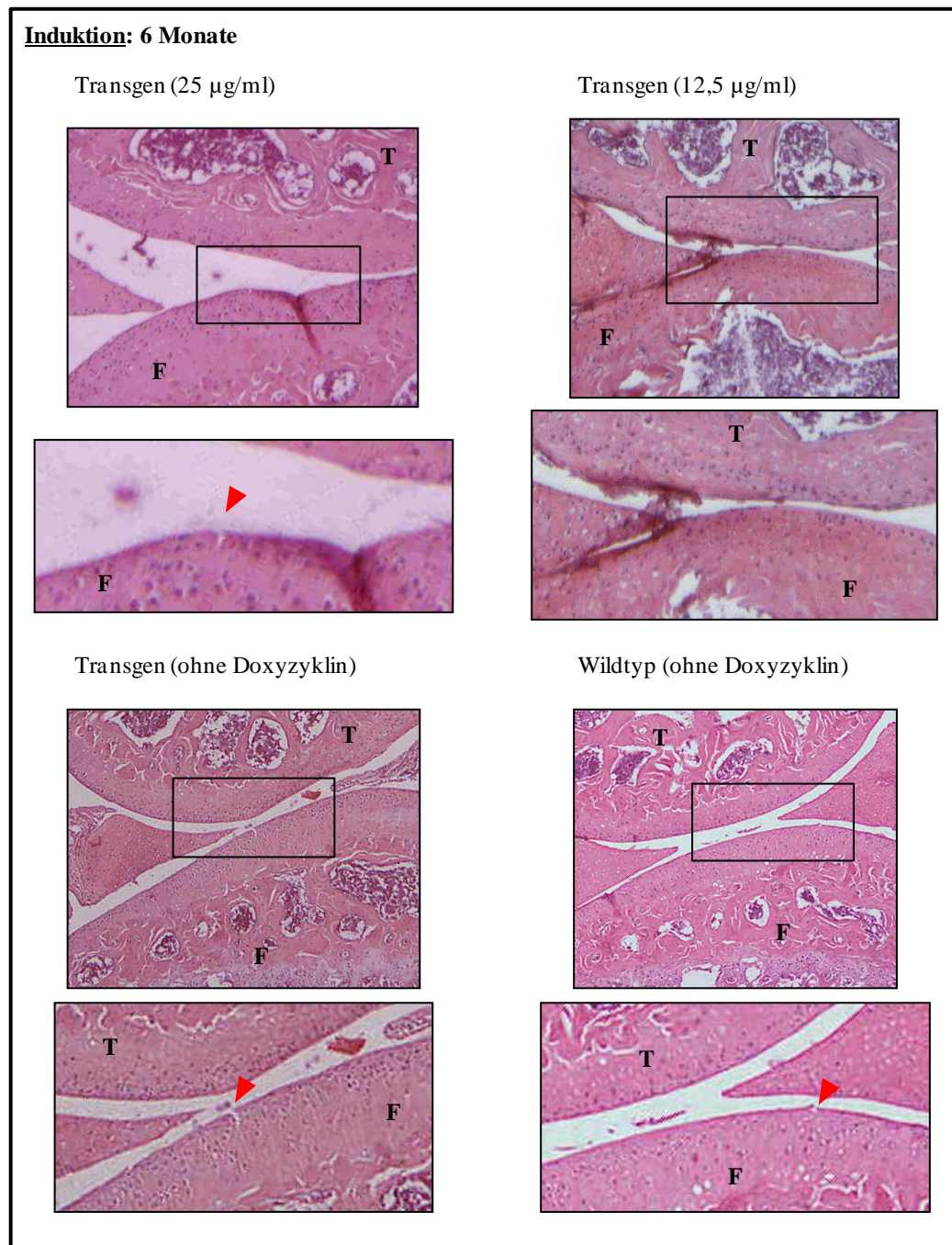
Als Kontrolle wurden die Kniegelenke von transgenen und Wildtyp-Tieren ohne Doxzyklinapplikation analysiert. Die Knorpelbereiche wurden vergrößert dargestellt. Die untersuchten Tiere wiesen weder verminderte Farbtintensitäten noch Knorpelerosionen auf.

T = Tibia; F = Femur

Aufgrund der theoretischen Annahme, dass auch Aggrekanasen bei einem  $IC_{50}$ -Wert von  $25 \mu\text{g/ml}$  um die Hälfte inhibiert werden, wurde die Langzeitinduktion über sechs Monate nur mit den Konzentrationen  $25 \mu\text{g/ml}$  und  $12,5 \mu\text{g/ml}$  gleichzeitig mit den anderen Versuchen angesetzt. Nach der Dosisoptimierung nach 4 Wochen bzw. 3 Monaten stellte sich jedoch heraus, dass das präferentielle Konzentrationsfenster zwischen  $1 \text{ mg/ml}$  und  $25 \mu\text{g/ml}$  lag. Da die Tiere durch die 6-monatige Induktion älter als die bereits untersuchten waren, mussten die präparierten Kniegelenke, um sie schneiden zu können, ca. 6-7 Monate entkalkt werden, sodass der ganze Versuch über ein Jahr dauerte. Durch diesen langen Versuchszeitraum war es nicht mehr möglich, diesen mit den optimalen Konzentrationen zu wiederholen. Es konnten daher nur die Konzentrationen  $25 \mu\text{g/ml}$  und  $12,5 \mu\text{g/ml}$  analysiert werden.

Weiterhin stellte sich heraus, dass aufgrund der langen Entkalkung die Schnitte nicht mehr mit Alzianblau anfärbbar waren, sodass lediglich eine Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung zur Identifizierung möglicher Knorpelerosionen durchgeführt werden konnte. Die nachfolgende Abbildung 3.23 zeigt exemplarisch mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte Kniegelenksschnitte. Bei mit  $25 \mu\text{g/ml}$  induzierten Tieren wurden Risse im Knorpelbereich des Femurs nachgewiesen. Allerdings konnten diese Risse auch bei sowohl transgenen als auch nicht transgenen Tieren

ohne Doxyzyklinapplikation festgestellt werden. Eventuell kann dies auf den natürlichen Alterungsprozess zurückzuführen sein oder es handelt sich um Präparationsartefakte.



**Abbildung 3.23: Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbte Kniegelenksschnitte von 6 Monate induzierten Tieren**  
 Tiere wurden 6 Monate mit 25  $\mu\text{g/ml}$ , 12,5  $\mu\text{g/ml}$  bzw. ohne Doxyzyklin induziert, die Kniegelenke präpariert, entkalkt, geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) angefärbt. Alzianblau- als auch Toluidinblaufärbungen konnten aufgrund der langen Entkalkungszeit nicht durchgeführt werden. Bei Kniegelenksschnitten von mit 25  $\mu\text{g/ml}$  induzierten Tieren waren Risse im Femur zu sehen (Pfeil). Transgene, nicht induzierte bzw. Wildtyp-Tiere, ebenfalls nicht induziert, zeigten die gleichen Risse (Pfeile).  
 T = Tibia; F = Femur

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den Konzentrationen 1 mg/ml und 25 µg/ml über 4 Wochen und 3 Monate leichte Veränderungen im Proteoglykangehalt festgestellt werden konnten. Knorpelerosionen in Form von Rissen wurden nicht identifiziert. Geringere Konzentrationen konnten keine sichtbare Verminderung des Proteoglykangehaltes hervorrufen. Auch der Versuch über 6 Monate, bei dem durch eine längere Induktionszeit (6 Monate) und niedrigere, nur gering inhibierende Doxyzyklin-Konzentrationen (25 µg/ml und 12,5 µg/ml) dennoch einen sichtbarer Effekt erzielt werden sollte, brachte keine Knorpelerosionen hervor.

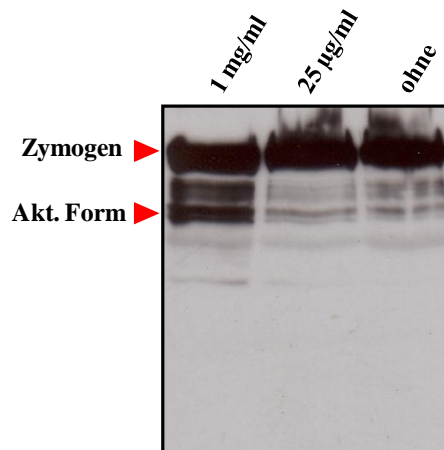
#### **3.1.4.2 Bestimmung des Glykosaminoglykangehaltes mittels des Dimethylmethylenblau-Assay's (DMMB-Assay)**

Im Rahmen der histologischen Analysen zeigte sich, dass der durch die Überexpression der Aggrekanase Adams5 verursachte Effekt auf den Proteoglykangehalt im Knorpel bei 1 mg/ml und 25 µg/ml am größten war. Mit Hilfe des Dimethylmethylenblau-Assay's (DMMB-Assay) ist es möglich quantitativ den Gehalt an Glykosaminoglykanen (GAG) sowohl in Geweben als auch in Flüssigkeiten zu bestimmen. Durch die Komplexbildung zwischen DMMB und GAG kommt es zu einer metachromatischen Verschiebung der Absorption des Farbstoffes, welche quantitativ gemessen werden kann. Glykosaminoglykane (GAG's) bestehen aus sich wiederholenden Disacchariden, die aus Uronsäure und einem Aminozucker zusammengesetzt sind. Der größte Teil dieser GAG's sind kovalent an ein zentrales Protein gebunden, man spricht dann von Proteoglykanen. Das im Knorpel überwiegend vorkommende Proteoglykan ist das Aggrekan. Dieses trägt zahlreiche polysulfatierte GAG's wie das Chondroitin- und Keratansulfat, welche dem Aggrekan durch ihre hohe Wasserbindungskapazität eine elementare Rolle in Bezug auf die Elastizität des Knorpels zukommen lassen. In Wechselwirkung mit den vernetzten Kollagenfasern wird die hydromechanische Eigenschaft des Knorpels gewährleistet. Durch die Aggrekanase Adams5 werden die Teile des Aggrekans, die die meisten GAG tragen, abgespalten und ins umliegende Kompartiment abgegeben. Dadurch verliert der Knorpel seine elastischen Eigenschaften, es kommt insgesamt zu einer Erweichung des Gewebes und mechanische Belastungen wie z.B. Stöße können zu Schädigungen des Knorpels führen.

Durch Messung dieser abgegebenen GAG im Verhältnis zum Gesamtgehalt kann bestimmt werden, ob durch die Überexpression des transgenen mAdams5 dieses aktiv ist und vermehrt Aggrekan spaltet. Dies sollte zu einem gesteigerten Glykosaminoglykangehalt im umliegenden Kompartiment führen.

Nachdem gleich alte Tiere über 3 Monate mit 1 mg/ml und 25 µg/ml Doxyzyklin induziert worden waren, wurden die Oberschenkelhalsköpfe und die knorpeligen Anteile der Rippen in Kultur genommen und für 5 Tage in An- bzw. Abwesenheit des Induktors kultiviert. Im Anschluss wurde der Überstand, der die ausgeschwemmten GAG enthielt, abgenommen und von dem Knorpelgewebe und dem entnommenen Überstand der Gesamt-Glykosaminoglykangehalt errechnet (Kap. 2.1.2.1).

Zunächst wurde über *Western Blot*-Analyse überprüft, ob das Enzym mAdamts5 nach Induktion im Medium überexprimiert wurde. In Abbildung 3.24 ist eindeutig eine Überexpression des Transgens nach Applikation mit 1 mg/ml Doxyzyklin nachweisbar, während bei 25 µg/ml kein Unterschied zum nichtinduzierten Tier im *Western Blot* zu sehen ist. Die schwache Expression der aktiven Form bei 25 µg/ml und bei nichtinduzierten Tieren könnte dadurch zu erklären sein, dass der Antikörper auch das endogene Protein detektierte.

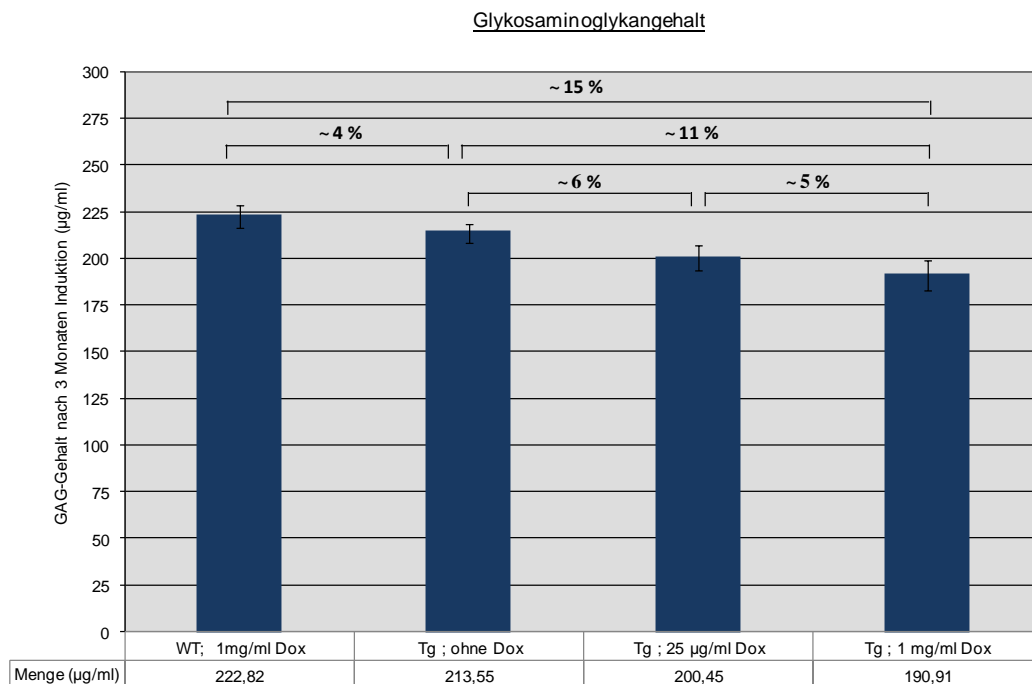


**Abbildung 3.24: Western Blot-Analyse zum Nachweis der induzierbaren mAdamts5-Expression im Überstand von Chondrozyten-Primärkulturen**

Nach dreimonatiger Induktion mit 1 mg/ml und 25 µg/ml Doxyzyklin wurden die Oberschenkelhalsköpfe und die knorpeligen Anteile der Rippen in Kultur genommen und der Überstand auf die Expression von mAdamts5 untersucht. Bei der höheren Konzentration war eindeutig sowohl das Zymogen als auch die aktive Form (Pfeile) von mAdamts5 detektierbar. Die geringere Konzentration als auch die nicht induzierte Kontrolle zeigten das Zymogen und schwach die aktive Form. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass der Antikörper auch das endogene Protein detektierte.

Im Anschluss wurde überprüft, ob sich nach dreimonatiger Induktion der Gesamt-Glykosaminoglykangehalt verringert hatte. Wie in Abbildung 3.25 zu sehen ist, zeigte sich eine zirka 15%ige Abnahme des GAG-Gehaltes im Vergleich Wildtyp (WT)- zu transgenem Tier, welche beide mit 1 mg/ml Doxyzyklin induziert worden waren. Im Vergleich Wildtyp- zu transgenem, nicht induziertem Tier war eine Reduktion des GAG-Gehaltes um 4 % messbar. Dies deckte sich mit den RT-PCR Analysen (Abb. 3.14, Linie C), die zeigten, dass auch ohne Induktion das transgene mAdamts5 leicht exprimiert war. Bei transgenen Tieren ohne Induktion und mit 1 mg/ml Doxyzyklin zeigte sich eine Abnahme von zirka 11 %. Mit diesem Experiment konnte nachgewiesen werden, dass durch die Applikation von 1 mg/ml Doxyzyklin mAdamts5 überexprimiert, das translatierte Protein aktiv ist und vermehrt Aggrecan gespalten wird. Jedoch scheint, vergleicht man die Daten mit den histologischen Analysen, die Verringerung der GAG von 11% nicht ausreichend zu sein um eindeutige

Knorpelerosionen hervorrufen zu können, da die Kniegelenke auch keinen mechanischen Destabilisierungen in Form von Durchschneiden von Bändern etc. ausgesetzt waren.

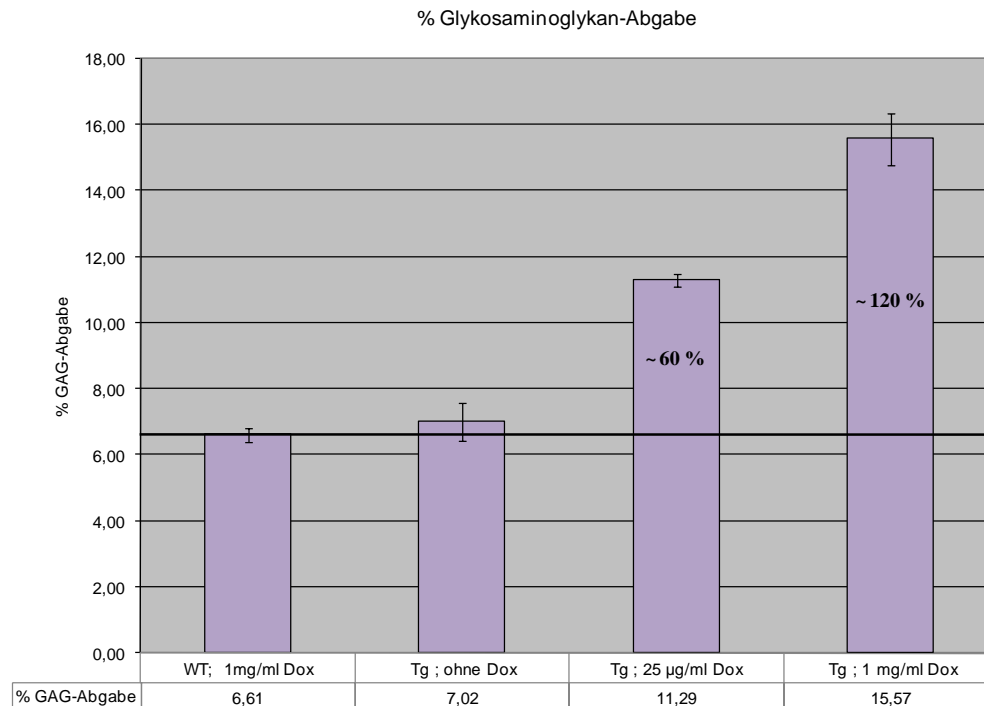


**Abbildung 3.25: Bestimmung des Gesamt-Glykosaminoglykangehaltes nach dreimonatiger Doxyzyklininduktion**

Nach dreimonatiger Doxyzyklinapplikation mit 1 mg/ml bzw. 25 µg/ml wurde mittels des DMMB-Assay der Gesamt-Glykosaminoglykangehalt bestimmt. Die angegebene Glykosaminoglykan-Konzentration [µg/ml] wurde anhand einer zuvor erstellten Eichgerade berechnet. Die jeweiligen prozentualen Abnahmen sind in der Grafik eingetragen. Tg = Transgen; WT = Wildtyp

Im Rahmen der weiteren Untersuchungen wurde auch die prozentuale Glykosaminoglykanabgabe in Bezug zum Gesamt-GAG-Gehalt bestimmt (Abb. 3.26). Im Verhältnis zum induzierten Wildtyp-Tier zeigte sich bei einem transgenen, nicht-induzierten eine leicht erhöhte prozentuale GAG-Abgabe ins Medium. Nach Induktion mit 25 µg/ml wurden bereits zirka 60 % mehr GAG ins Medium abgegeben und bei 1 mg/ml sogar zirka 120%. Durch das induzierte Wildtyp-Tier konnte auch ein möglicher Doxyzyklin-Effekt auf die GAG-Abgabe ausgeschlossen werden. Es zeigte sich für 25 µg/ml und 1 mg/ml Doxyzyklinapplikation, dass zum einen *mAdamts5* überexprimiert wurde und zum anderen so wenig Inhibition des Enzymes stattfand, dass erhöhte Mengen Glykosaminoglykane im Medium gemessen werden konnten. Folglich war die überexprimierte Aggrekanase *mAdamts5* funktional, d.h. sie konnte Aggrekan spalten.





### Abbildung 3.26: Prozentuale Glykosaminoglykan-Abgabe

Nach Doxyzyklininduktion mit 1 mg/ml und 25 µg/ml wurde mit Hilfe des DMMB-Assay die prozentuale Glykosaminoglykan-Abgabe in Bezug zum Gesamt-GAG-Gehalt errechnet. Es zeigte sich deutlich eine Zunahme der Glykosaminoglykan-Abgabe ins Medium nach Doxyzyklinapplikation, wobei die Stärke der Abgabe Konzentrationsabhängig war. Die prozentualen Steigerungen der Abgabe im Vergleich zu einem induzierten Wildtyp-Tier sind in der Grafik eingetragen. Tg = Transgen; WT = Wildtyp

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aufgrund des inhibitorischen Effektes von Doxyzyklin auf die Aggrekanase mAdamts5 eine Konzentration gefunden werden konnte, die die Überexpression des Enzymes gewährleistete, andererseits die Inhibition gering hielt. Die histologischen Analysen mit mehreren Konzentrationen ergab, dass 25 µg/ml und 1mg/ml leichte Veränderungen im Proteoglykangehalt verursachten, jedoch ohne Knorpelerosionen hervorzurufen. Auch der DMMB-Assay bestätigte diese Ergebnisse. Insgesamt war der Gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalt bei einem mit 1 mg/ml induzierten, transgenen Tier um 15 % niedriger als bei einem ebenso behandelten Wildtyp-Tier. Die prozentuale Glykosaminoglykan-Abgabe zeigte ebenfalls eine Korrelation zwischen Aggrekanspaltung und mAdamts5-Überexpression, da nach Induktion von mAdamts5 mit 1 mg/ml die prozentuale GAG-Abgabe um 120 % anstieg. Da allerdings keine Knorpelerosionen zu detektieren waren, musste davon ausgegangen werden, dass die Menge der abgegebenen Glykosaminoglykane nicht ausreichend war um die Elastizität des Knorpels dermaßen zu beeinträchtigen, dass er anfälliger für Belastungen in Form von Stößen wurde. Außerdem

wurde im Gegensatz zu anderen Mausmodellen absichtlich keine mechanische Destabilisierung, wie z. B. das Durchschneiden von Bändern, vorgenommen, sodass der externe, möglicherweise auslösende Reiz nicht vorlag. Es sollte durch Überexpression von mAdamts5 die Relevanz dieses Enzymes in der Pathogenese der Osteoarthritis untersucht werden. Durch einen externen Reiz wären möglicherweise zusätzliche Faktoren mit eingeflossen, die eine Interpretation erschwert hätten.

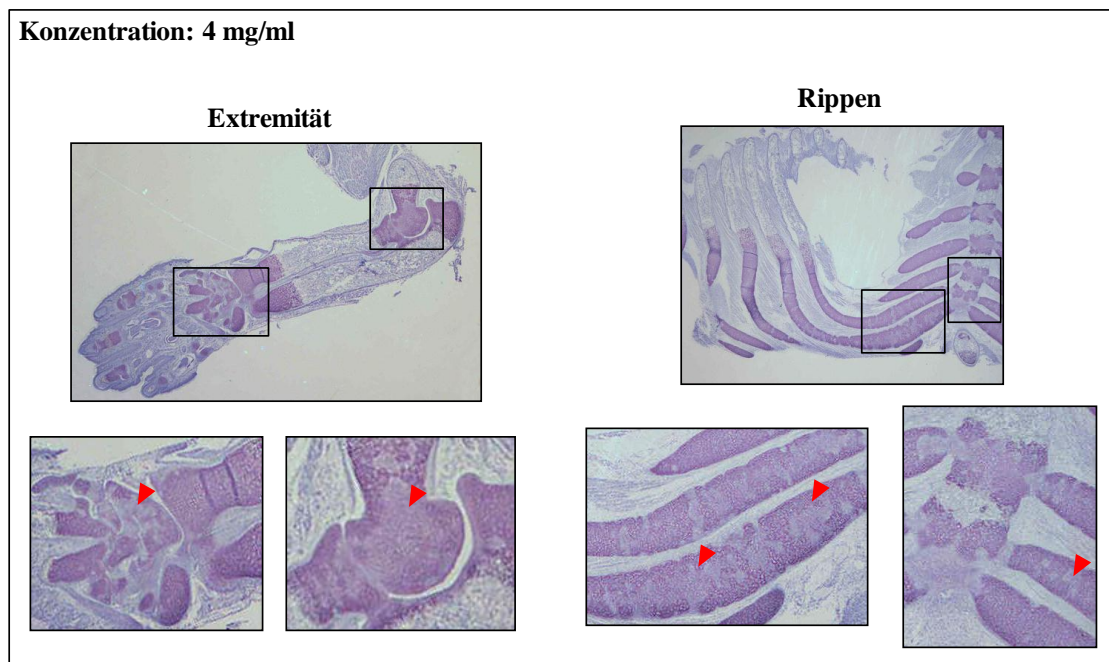
### **3.1.5 Erhöhte Sterblichkeit transgener Tiere infolge Doxyzyklinapplikation**

Im Rahmen der Induktionsexperimente konnte beobachtet werden, dass transgene Nachkommen von direkt bei der Verpaarung mit 4 mg/ml Doxyzyklin induzierten Tieren sofort nach der Geburt verstarben, während Wildtyp-Tiere überlebten. Die Induktion mit geringeren Konzentrationen (12,5 µg/ml und 25 µg/ml) ergab unterschiedliche Ergebnisse. Hier überlebten sowohl transgene als auch Wildtyp-Tiere.

Um dies genauer zu analysieren, wurden gezielt Tiere direkt bei der Verpaarung induziert. Zunächst wurden Wildtyp-Tiere mit 4 mg/ml (2 Würfe) und transgene ohne Doxyzyklinapplikation (4 Würfe) verpaart, um zu überprüfen, ob zum einen Doxyzyklin in dieser Konzentration Auswirkungen auf die Wurfgröße hatte und zum anderen, ob bei transgenen Verpaarungen ohne Dox auch Tiere verstarben. Weder hatte Doxyzyklin einen Effekt auf die Wurfgröße, noch starben Tiere bei transgenen Verpaarungen ohne Induktion.

Bei der Verpaarung transgener Tiere mit 4 mg/ml Doxyzyklin wurden 4 Verpaarungen mit insgesamt 7 Würfen untersucht. Alle transgenen Nachkommen verstarben direkt nach der Geburt, alle Wildtyp-Tiere überlebten. Da keine Tiere direkt bei der Geburt beobachtet werden konnten, wurden die verstorbenen Nachkommen untersucht. Bei der Präparation der Organe konnten makroskopisch keine Auffälligkeiten festgestellt werden. Weiterhin wurden Gefrierschnitte hergestellt und diese mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Auch hier konnten keine Veränderungen identifiziert werden (Daten nicht abgebildet). Zur Repräsentation des Knorpel/Knochen-Apparates wurden die Extremitäten und die Rippen präpariert, in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit Toluidinblau angefärbt (Abb. 3.27). Es zeigten sich Auffälligkeiten in der strukturellen Anordnung der Chondrozyten. Gerade die Rippen sahen „durchlöchert“ aus. Es waren immer wieder Bereiche zu sehen, die keine blaugefärbten Chondrozyten enthielten (rote Pfeile). Möglicherweise könnte dies eine Erklärung für die Sterblichkeit der transgenen Tiere sein. Diese Art „Vakuolisierung“ könnte zu Instabilitäten der Rippen geführt haben, die den Tod des Tieres durch Ersticken zur Folge hatte. Die

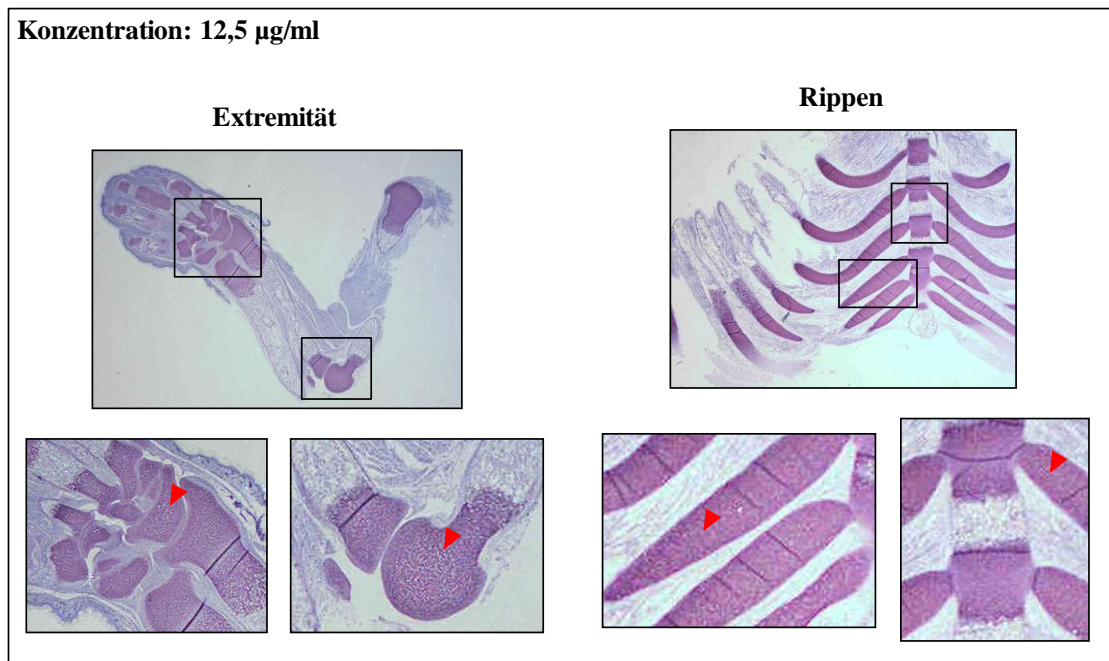
abgebildeten Resultate konnten bei allen untersuchten Tieren mit 4 mg/ml Doxyzyklin nachgewiesen werden, sodass ein Präparationsartefakt ausgeschlossen werden konnte.



**Abbildung 3.27: Toluidinblaugefärbte Extremitäten- und Rippenbereiche nach Induktion mit 4 mg/ml Doxyzyklin**

Nach Verpaarung transgener Tiere unter Doxyzyklineinfluß (4 mg/ml) konnte nach Genotypisierung festgestellt werden, dass die direkt nach der Geburt verstorbenen Tiere alle transgen, die überlebenden alle wildtypisch waren. Zur Untersuchung des Knorpel/Knochen-Apparates wurden die Extremitäten und die Rippen präpariert, paraffiniert, geschnitten und mit Toluidinblau angefärbt. Ausschnittsweise sind Vergrößerungen dargestellt. Es zeigte sich eine anormale strukturelle Anordnung der Chondrozyten. Es waren immer wieder hellere Bereiche zu sehen, die keine Chondrozyten enthielten (Pfeile).

Bei der Gabe geringerer Konzentrationen (12,5 µg/ml und 25 µg/ml) wurden 6 Verpaarungen mit insgesamt 12 Würfen analysiert. Bei der Konzentration 12,5 µg/ml überlebten transgene Nachkommen von zwei Würfen, bei 25 µg/ml von einem Wurf. Direkt nach der Geburt verstorbene, transgene Tiere wurden ebenfalls präpariert und die Extremitäten und die Rippen näher untersucht. Die Veränderungen so wie sie bei der Gabe mit 4 mg/ml festgestellt wurden, konnten bei diesen beiden Konzentrationen nicht identifiziert werden. Weder im Extremitäten- noch im Rippenbereich. In Abb. 3.28 sind stellvertretend für beide Konzentrationen ausschnittsweise die Ergebnisse für 12,5 µg/ml Doxyzyklinapplikation dargestellt.



**Abbildung 3.28: Toluidinblaugefärbte Extremitäten- und Rippenbereiche nach Induktion mit 12,5 µg/ml Doxyzyklin**

Nach Doxyzyklinapplikation mit 12,5 µg/ml direkt bei der Verpaarung wurden von den sofort nach der Geburt verstorbenen, transgenen Jungtieren die Extremitäten und die Rippen präpariert und die im Anschluss hergestellten Paraffinschnitte mit Toluidinblau angefärbt. Ausschnittsweise sind Vergrößerungen abgebildet. Es konnten keinerlei Anomalitäten festgestellt werden.

Bei den beiden geringeren Konzentrationen (12,5 µg/ml und 25 µg/ml) konnte keine direkte Verbindung zwischen „Vakuolisierung“ mit entsprechender Instabilität der Rippen und Sterblichkeit transgener Tiere hergestellt werden. Hier musste die Sterblichkeit eine andere Ursache gehabt haben.

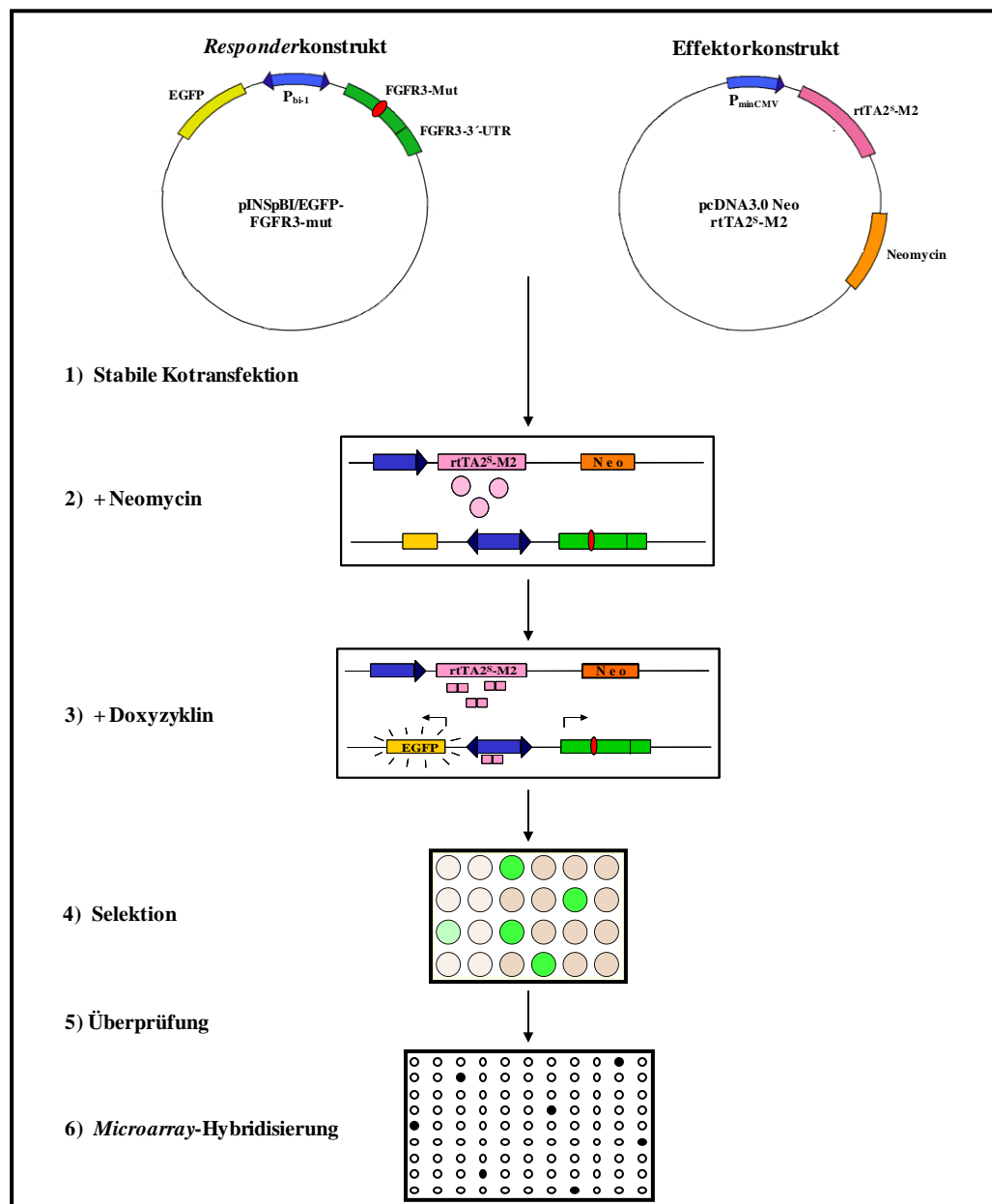
Die genaue Klärung dieser transgenen Mortalität war mit den bis zum Abschluss dieser Arbeit durchgeführten Analysen noch nicht möglich. Dies müsste in einem gesonderten Projekt ausführlicher untersucht werden.

### 3.2 Genexpressionsanalyse FGFR3-regulierter zellulärer Prozesse

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit *in vitro*-Studien zur Aufklärung FGFR3-regulierter, zellulärer Prozesse. Trotz des großen Spektrums der FGFR3-assoziierten Skelettdysplasien ist der Wirkmechanismus noch nicht vollständig geklärt, auch beteiligte Zielgene sind noch weitgehend unbekannt. Mittels des Tet-ON-Systems sollten daher exogen steuerbare *in vitro*-Modellsysteme generiert werden, um zum einen weitere Zielgene zu identifizieren. Zum anderen sollte zur Aufklärung des Pathomechanismus der mutationsbedingten Skelettentwicklungsstörungen durch *FGFR3* beigetragen werden. Dadurch könnten vorhandene Behandlungsstrategien verbessert, beziehungsweise neue Ansatzpunkte für mögliche Therapiekonzepte geschaffen werden.

Die Auswirkungen der typischen ACH-Mutation (G380R) und der TDII-Mutation (K650E) auf die nachgeschaltete Signaltransduktionskaskade, insbesondere auf die differentielle Expression von FGFR3-Zielgenen, sollte im Folgenden näher analysiert werden. Hierzu wurden die generierten *Responder*konstrukte mit den entsprechenden Mutationen (pINSpBI/EGFP-FGFR3-mut) mit dem Effektor pcDNA3.0Neo/rtTA2<sup>S</sup>-M2 stabil in die humane Chondrosarkom Zelllinie SW1353 kotransfiziert, positive Zellen mittels Neomycin und Doxyzyklin-Gabe selektiert und geeignete Klone verifiziert. Die anschließende *Microarray*-Hybridisierung erfolgte mit dem die TDII-Mutation tragenden Zellklon, da die zu erwartende Auswirkung auf nachgeschaltete Zielgene am höchsten war. Regulierte Zielgene konnten im Anschluss auch bei dem die ACH-Mutation tragenden Zellklon vergleichend studiert werden.

Nachfolgend ist die schematische Vorgehensweise graphisch dargestellt (Abb. 3.29).



**Abbildung 3.29: Herstellung stabiler, induzierbaren FGFR3-mut-Zelllinien mit anschließender Microarray-Hybridisierung**

- (1) stabile Kointransfektion der humanen Chondrosarkom-Zelllinie SW1353 mit dem *Responderkonstrukt* pINSpBI/EGFP-FGFR3-mut und dem Effektor pcDNA3.0Neo/rTA2<sup>S</sup>-M2.
- (2) Nach Zugabe von Neomycin können die Zellen selektiert werden, die die Antibiotika-Resistenz des „Effektors“ tragen.
- (3) Nach Induktion mit Doxyzyklin (Dox) kommt es zu einer Konformationsänderung des bisher inerten rTA2<sup>S</sup>-M2 und dieser kann daraufhin an das TRE mit den beiden benachbarten Minimalpromotoren ( $P_{bi-1}$ ) binden. Dadurch kommt es zu einer Koexpression von *FGFR3-mut* und *EGFP* (*Enhanced Green Fluorescent Protein*). Das Protein lässt die Zellen bei einer Wellenlänge von 488 nm grün fluoreszieren.
- (4) Im Anschluss werden die Zellen selektiert, die nach Neomycin-Gabe wachsen und nach Doxyzyklin-Induktion grün fluoreszieren.
- (5) Nach Überprüfung der Induktion durch *Northern*- bzw. *Western Blot*-Analysen
- (6) kann eine *Microarray*-Hybridisierung erfolgen.

### 3.2.1 Herstellung der Responderkonstrukte *pINSpBI/EGFP-FGFR3-mut<sup>ACH</sup>* und *pINSpBI/EGFP-FGFR3-mut<sup>TDII</sup>*

Das zu mutierende FGFR3-Gen (NM\_000142), Isoform 1 (IIIc) lag zu Beginn der Arbeit in dem Vektor pcDNA3 (Invitrogen) vor. Die nach Herstellerangaben durchgeführte Mutagenese der Achondroplasie (ACH)-Mutation (Kap. 2.9) erfolgte an Position 1138 (Basenaustausch Guanin nach Adenin). Dies bewirkte einen Aminosäureaustausch von Glycin nach Arginin an Stelle 380 (G380R) und entspricht der typischen Achondroplasie-Mutation in der Transmembrandomäne. Die Verifizierung der Mutagenese erfolgte über Sequenzierung. Im Anschluss wurde das mutierte *FGFR3*-Gen inklusive dem 3'-untranslatierten Bereich (*FGFR3-mut<sup>ACH</sup>*) mit *NheI*-spezifischen Primern (*FGFR3-Nhe-Start/Stop*) mittels PCR zwischen Position 36 und 3856 amplifiziert, zur Eliminierung des Ausgangsplasmides mit *DpnI* und zur Generierung überhängender Enden mit *NheI* verdaut. Nach Phenol-Extraktion erfolgte die Einklonierung in den ebenfalls mit *NheI* linearisierten und dephosphorylierten Vektor pINSpBI-EGFP. Dieser aus pINS und pBI-EGFP (Invitrogen) zusammengesetzte Vektor wurde von Dr. M. Maringer (AG Dr. Bockamp) und Dr. T. Pabst (geb. Trost) generiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt (detaillierte Beschreibung des Vektors siehe Kap. 3.1.2). Er gewährleistet durch die Bidirektionalität seines Promotors die gleichzeitige Expression des Induktionsmarkers *EGFP* (*enhanced green fluorescent protein*) und des zu untersuchenden Zielgenes. Positive Klone mit richtiger Orientierung des einzuklonierenden Fragmentes *FGFR3-mut<sup>ACH</sup>* wurden mittels PCR (3'-UTR-3F/pBI-6) und Restriktion verifiziert. Um Amplifikationsfehler auszuschließen wurde das komplette *FGFR3*-Gen sequenziert. Dieses Konstrukt wurde im Folgenden mit *pINSpBI/EGFP-FGFR3-mut<sup>ACH</sup>* bezeichnet.

Die Mutagenese zur Herstellung der Thanatophoren Dysplasie Typ II (TDII)-Mutation erfolgte an Position 1948 (Basenaustausch von Adenin nach Guanin) und bewirkt einen Aminosäureaustausch von Lysin nach Glutamat an Stelle 650 (K650E). Diese TD II-Mutation liegt im Bereich der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne und bedingt direkt eine überschießende Tyrosinkinase-Aktivität. Wie auch bei der ACH-Mutagenese wurde hier über Sequenzierung verifiziert. Bei der Herstellung dieses Konstruktes war es nicht möglich das mutagenisierte *FGFR3*-Fragment zu amplifizieren. Daher wurde ein 1.5 kbp großes, die TDII-Mutation enthaltendes Fragment mit *RsrII/SphI* aus dem Vektor pcDNA3/*FGFR3-mut<sup>TDII</sup>* ausgeschnitten und in den mit den gleichen Enzymen restringierten Vektor pINSpBI/EGFP-*FGFR3-mut<sup>ACH</sup>* eingefügt. Dadurch wurde die ACH- durch die TDII- Mutation ersetzt

(*pINSpBI/EGFP-FGFR3-mut<sup>TDII</sup>*). Die Verifikation erfolgte mittels Restriktion und vollständiger Sequenzierung des integrierten, mutierten *FGFR3*-Genes.

### 3.2.2 Generierung und Verifizierung der stabilen Zelllinien

Nach Verifizierung der Konstrukte erfolgte die stabile Kotransfektion mit dem Effektor-konstrukt *pcDNA3.0Neo/rtTA2<sup>S</sup>-M2* in die humane Chondrosarkom-Zelllinie SW1353 der Firma LGC Promochem/ATCC (#HTB-94<sup>TM</sup>). Diese Zelllinie wurde bereits bei den *in vitro* Versuchen der transgenen Maus verwendet und eignet sich aufgrund ihrer Herkunft aus Knorpelgewebe gut, um zelluläre Prozesse im Knorpelsystem näher untersuchen zu können.

Die Plasmid-DNA der Konstrukte *pINSpBI/EGFP-FGFR3-mut<sup>ACH</sup>*, *pINSpBI/EGFP-FGFR3-mut<sup>TDII</sup>*, *pINSpBI/EGFP* und *pcDNA3.0Neo/rtTA2<sup>S</sup>-M2* wurden endotoxinfrei präpariert, mit den entsprechenden Enzymen linearisiert (*pINSpBI/EGFP*-Konstrukte mit und ohne Insert: *XmnI*; *pcDNA3.0Neo/rtTA2<sup>S</sup>-M2*: *ScaI*) und aufgereinigt. Im Anschluss erfolgte die stabile Kotransfektion in SW1353-Zellen. Das Verhältnis von *Responder*- zu Effektor-konstrukt wurde 4:1 gewählt, um, da nur das Effektor-konstrukt den Selektionsmarker Neomycin enthielt, möglichst nur die Zellklone zu erhalten, die beide Konstrukte stabil in ihr Genom integriert hatten. Als Kontrollzelllinie wurde der Leervektor *pINSpBI/EGFP* stabil kotransfiziert.

Nach 10-14 tägiger Selektion mit 750 µg/ml Neomycin wurden die entstandenen Zellklone gepickt und in zunächst 96- dann 24-well-Platten unter weiterer Neomycinselektion angezogen. Zur Überprüfung der Selektion wurden untransfizierte Zellen mitgeführt, diese gingen aufgrund des fehlenden Neomycin-Genes nach zirka 7 Tagen zu Grunde. Durch Gabe von 1 µg/ml Doxyzyklin wurde fluorimetrisch auf die Expression des Induktionsmarkers *EGFP* (*enhanced green fluorescent protein*) hin überprüft und eine Vorauswahl der Klone vorgenommen, die beide Konstrukte trugen und stringent regulierbar waren. Die positiven Zellklone wurden durch weitere Analysen auf RNA- als auch auf Protein-Ebene verifiziert.

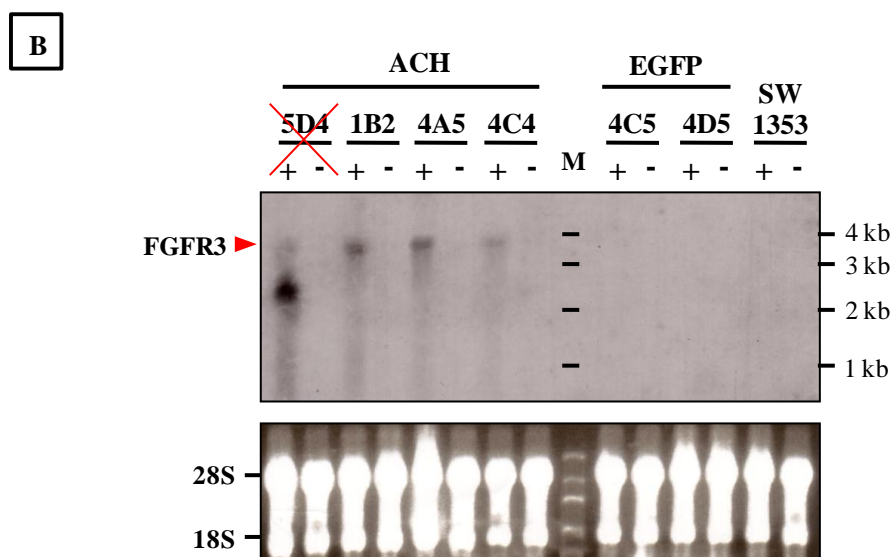
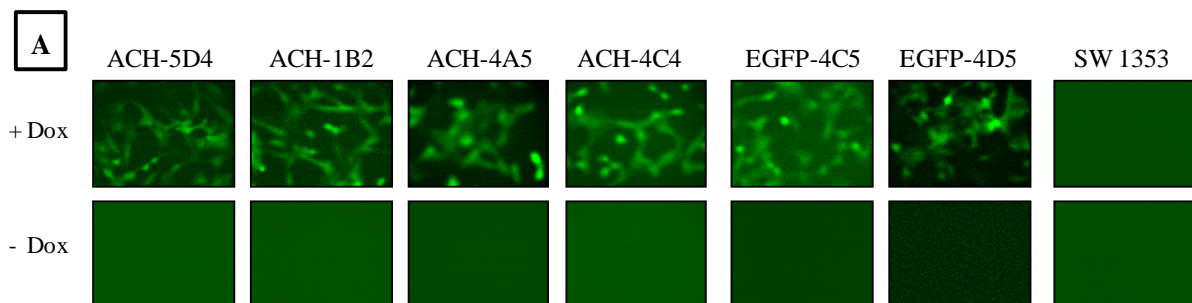
Die Neomycin- und Doxyzyklin-Selektion ergab zwei induzierbare Kontrollzelllinien (*EGFP-4C5*; *EGFP-4D5*), vier *FGFR3-mut<sup>ACH</sup>*-induzierbare (*ACH-5D4*; *ACH-1B2*; *ACH-4A5*; *ACH-4C4*) und ebenfalls vier *FGFR3-mut<sup>TDII</sup>*-induzierbare Zelllinien (*TDII-3B4*; *TDII-4A1*; *TDII-4A2*; *TDII-4C4*). Da die Generierung der *TDII*-Zelllinien zeitlich versetzt stattfand, wurden zunächst die vier *FGFR3-mut<sup>ACH</sup>*- und die zwei Kontroll-Zelllinien analysiert. Hierzu wurde aus den generierten Zelllinien und untransfizierten SW1353-Zellen RNA als auch Proteine isoliert. Für die Analyse auf RNA-Ebene mittels *Northern Blot* wurde eine *FGFR3*-

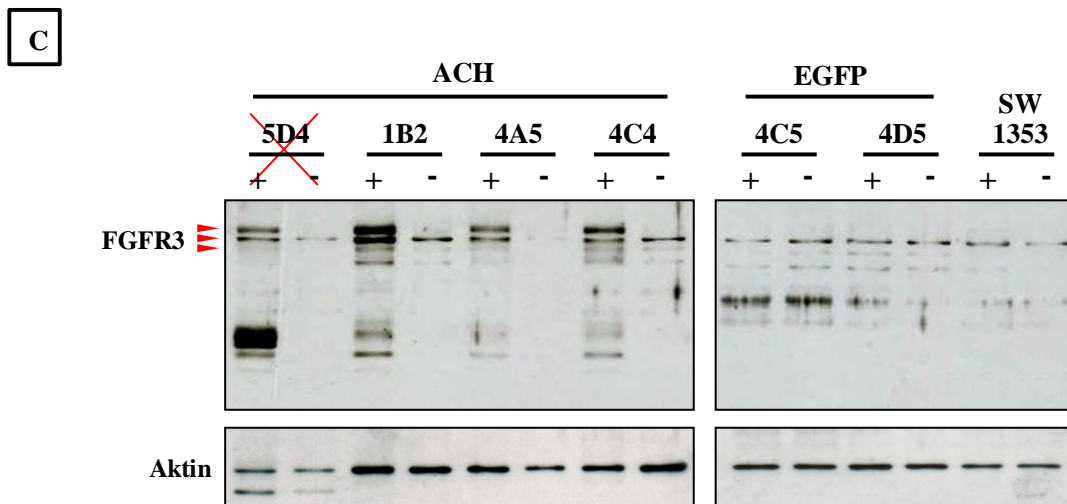


spezifische Sonde (Primer: FGFR3-C/D) verwendet, der Nachweis stringenter Regulation auf Proteinebene erfolgte über Antikörper-Detektion (Antikörper: FGFR3 (C-15)). In Abbildung 3.30 sind die fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen zum Nachweis der *EGFP*-Expression (A) und *Northern*- (B) als auch *Western-Blots* (C) zum Nachweis der stringenten *FGFR3*-Expression dargestellt.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der vier ACH- und der zwei EGFP-Kontrollklone zeigten nach acht Stunden Doxyzyklininduktion eine stringente Regulation der *EGFP*-Expression. Untransfizierte SW1353-Zellen wiesen nach Applikation mit Doxyzyklin keine Fluoreszenz auf. Der Nachweis der regulierbaren *FGFR3*-Expression konnte sowohl durch die *Northern*- als auch die *Western-Blot* Analyse erbracht werden, wobei der Klon ACH-4A5 sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene die stringenteste Regulation aufwies. Daher wurde mit dieser Zelllinie stellvertretend für die ACH-Mutation weitergearbeitet. Der Klon ACH-5D4 wies im *Northern-Blot* ein zirka 2,4 kbp großes Fragment auf, was nicht der Größe des *FGFR3*-Transkriptes entsprach.

Als EGFP-Kontrollklone wurde der Klon EGFP-4D5 gewählt, da dieser im *Western Blot* die geringsten Hintergrundsignale zeigte.





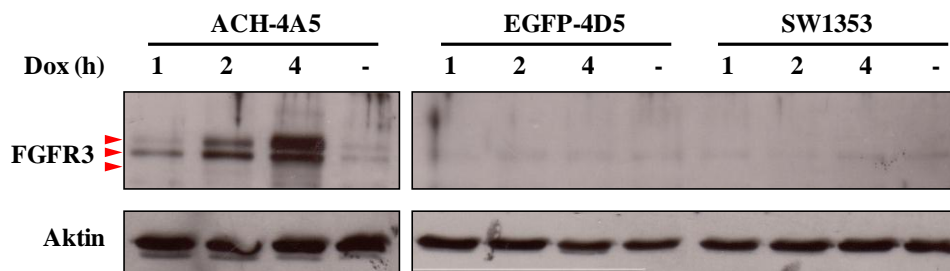
**Abbildung 3.30: Analyse der nach Neomycin und Doxyzyklin-Selektion identifizierten Zellklone**

**A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zum Nachweis der EGFP-Expression.** Dargestellt ist die fluoreszenzmikroskopische Dokumentation der vier identifizierten ACH-Zellklone, der zwei EGFP-Kontrollklone als auch untransfizierter SW1353-Zellen in An- (+) und Abwesenheit (-) von Doxyzyklin. Es zeigte sich eine deutliche, stringente Expressionsregulation von *EGFP* in Abhängigkeit von Doxyzyklin.

**B: Northern Blot-Analyse zum Nachweis der stringenten FGFR3-Expression nach Doxyzyklinapplikation.** Nach 8-stündiger Induktion der identifizierten Klone als auch untransfizierter SW1353-Zellen mit 1 µg/ml Doxyzyklin („+“ ; „-“) wurden 15 µg Gesamt-RNA in einem *Northern Blot* auf ihre stringent regulierbare *FGFR3*-Expression untersucht. Der Blot wurde mit einer *FGFR3*-spezifischen, radioaktiv markierten Sonde (Primer: *FGFR3*-C/D) hybridisiert. Als Kontrolle der gleichmäßigen Beladung wurde das mit Ethidiumbromid gefärbte Agarosegel abgebildet. Die Größen des verwendeten Längenstandards („M“) sind am rechten Bildrand eingezeichnet.

**C: Western Blot-Analysen zum Nachweis der stringenten FGFR3-Proteinexpression.** Nach Inkubation in An- (+) und Abwesenheit (-) von Doxyzyklin wurden 20 µg Proteinextrakt für die Analyse im *Western Blot* verwendet. Es zeigte sich eine stringent regulierbare *FGFR3*-Proteinexpression in Abhängigkeit von Doxyzyklin. Die drei Isoformen von *FGFR3* (130 kDa, 120 kDa und 98 kDa) sind am linken Bildrand markiert (rote Pfeile). Zum Abgleich wurde der *Western Blot* mit Aktin-Antikörpern hybridisiert.

Mit Hilfe eines Zeitverlaufs sollte im Folgenden analysiert werden, ab wann die *FGFR3*-Expression einsetzt. Von den zu untersuchenden Zelllinien (*ACH*-4A5, *EGFP*-4D5) als auch von untransfizierten Zellen wurden nach ein, zwei und vierstündiger Doxyzyklininduktion Proteine isoliert und im *Western Blot* analysiert. Die *FGFR3*-Proteinexpression setzte, wie in Abbildung 3.31 zu sehen ist, bereits nach einer Stunde ein und nahm im weiteren Zeitverlauf zu.

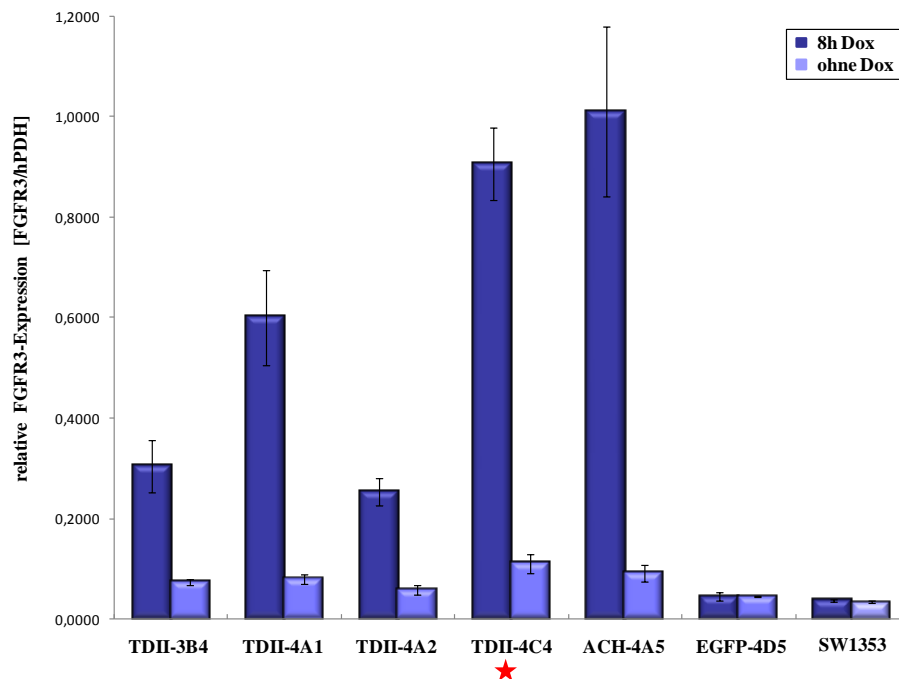


**Abbildung 3.31: Western Blot zur Analyse der einsetzenden FGFR3-Proteinexpression**

Nach ein, zwei und vierstündiger Doxyzyklinapplikation wurden von den Zellklonen ACH-4A5, EGFP-4D5 als auch von untransfizierten SW1353-Zellen Proteine isoliert und 20 µg im *Western Blot* analysiert. Nach bereits einer Stunde war eine FGFR3-Expression detektierbar. Kontrollklon und untransfizierte Zellen zeigten keine Expression. Als Kontrolle wurde der *Western Blot* mit Aktin-Antikörpern hybridisiert.

Nach Generierung der TDII-Zelllinien wurden diese ebenfalls auf ihre regulierbare *EGFP*-Expression hin untersucht. Vier der selektionierten Klone zeigten eine stringente *EGFP*-Regulation (fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nicht abgebildet). Die Verifizierung der identifizierten TDII-Klone erfolgte ebenfalls auf RNA-Ebene mittels *real time* PCR (Abb. 3.32) und auf Proteinebene über *Western Blot*-Analyse (Abb. 3.34).

Von den induzierten bzw. nicht induzierten Zellen wurde RNA isoliert, revers transkribiert und über *real time* PCR (Primer: FGFR3-U1/U2) quantifiziert. Der Mengenabgleich erfolgte gegen das humane Haushaltsgen *Pyruvatdehydrogenase (hPDH)*. Bei allen TDII-Klonen als auch beim mitgeführten ACH-Klon 4A5 zeigte sich eine Regulation der *FGFR3*-Expression nach Induktion mit Doxyzyklin. TDII-Klon 4C4 wies nach 8 Stunden Induktion eine ähnlich starke *FGFR3*-Expression wie der ACH-Klon 4A5 auf, daher wurde, um bei späteren Genexpressionsanalysen von gleichen *FGFR3*-Expressionsstärken ausgehen zu können, stellvertretend für die TDII-Mutation der Klon TDII-4C4 ausgewählt. Kontrollklon EGFP-4D5 als auch untransfizierte Zellen zeigten wie erwartet keine Regulation von *FGFR3* durch Doxyzyklin. Nachfolgende Abbildung 3.32 zeigt die relative Quantifizierung nach 8 Stunden Doxyzyklininduktion.

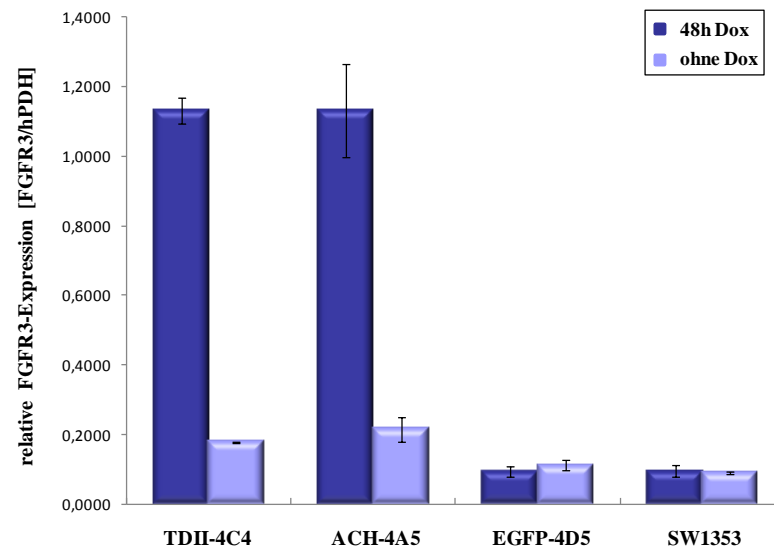


**Abbildung 3.32: Relative Quantifizierung der vier identifizierten TD II-Klone zum Nachweis der induzierbaren *FGFR3*-Expression**

Nach 8 stündiger Induktion in An (+)- und Abwesenheit (-) von Doxyzyklin wurde die aus den Zellen isolierte Gesamt-RNA revers transkribiert und über *real time* RT-PCR im *Light Cycler* auf ihre *FGFR3*-Expression untersucht (Primer: *FGFR3*-U1/U2). Der ACH-Klon 4A5, Kontrollklon EGFP-4D5 und untransfizierte Zellen wurden zum Vergleich mitgeführt. Alle TDII- als auch der ACH-Klon zeigten eine induzierbare *FGFR3*-Expression. Stellvertretend für die TDII-Mutation wurde der Klon 4C4 (Stern) ausgewählt, da dieser eine ähnlich starke *FGFR3*-Expression wie der ACH-Klon 4A5 aufwies. Um sicher zu stellen, dass gleiche cDNA-Mengen eingesetzt wurden, erfolgte der Abgleich gegen das humane Haushaltsgen *Pyruvatdehydrogenase* (*hPDH*).

Da dennoch geringe Unterschiede in der *FGFR3*-Expression zwischen ACH- und TDII-Klon zu identifizieren waren, wurde überprüft, ob sich die *FGFR3*-Expressionsstärken durch eine längere Induktionszeit von 48 Stunden angleichen. Der TDII-, der ACH- und der Kontrollklon als auch untransfizierte Zellen wurden 48 Stunden mit und ohne Doxyzyklin inkubiert, die im Anschluss isolierte RNA revers transkribiert und eine *real time* PCR durchgeführt. Als Haushaltsgen wurde auch hier die humane *Pyruvatdehydrogenase* (*hPDH*) verwendet.

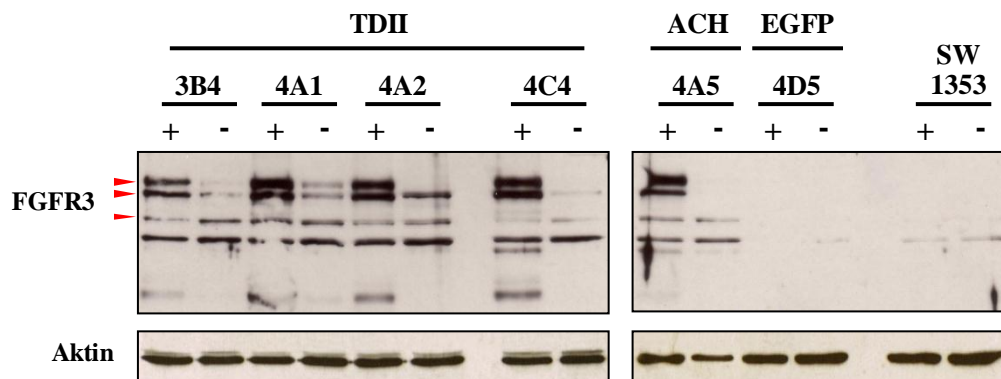
Es zeigte sich eindeutig, dass nach 48 Stunden Induktion die *FGFR3*-Expression beider Klone (ACH-4A5 und TDII-4C4) gleich stark war. Kontrollklon EGFP-4D5 und untransfizierte Zellen zeigten dagegen keine *FGFR3*-Regulation (Abb. 3.33).



**Abbildung 3.33: Relative Quantifizierung der FGFR3-Expression nach 48h Induktion**

Der TDII-Klon 4C4, der ACH-Klon 4A5 als auch der Kontroll-Klon 4D5 und untransfizierte SW1353-Zellen wurden 48 h in An (+)- und Abwesenheit (-) von Doxyzyklin induziert, Gesamt-RNA isoliert, diese revers transkribiert und über *real time* RT-PCR im *Light Cycler* auf ihre *FGFR3*-Expression untersucht. Der TDII- als auch der ACH-Klon zeigten nach 48 h Induktion vergleichbare *FGFR3*-Expressionsstärken, während der Kontrollklon und die untransfizierten Zellen wie erwartet keine Regulation durch Doxyzyklin aufwiesen. Zur Gewährleistung gleicher cDNA-Mengen wurde mit dem humanen Haushaltsgen *Pyruvatdehydrogenase* (hPDH) abgeglichen.

Die bereits auf transkriptioneller Ebene nachgewiesene stringent regulierbare *FGFR3*-Expression der vier TDII-Klone konnte auch auf Proteinebene bestätigt werden (Abb. 3.34). Nach Induktion (8h) der Zellen zeigte die *Western Blot*-Analyse eine eindeutige Regulation von *FGFR3* in allen vier TDII-Klonen. Der ACH-Klon 4A5 als auch der Kontrollklon EGFP-4D5 und untransfizierte Zellen wurden mitgeführt und zeigten die erwarteten Ergebnisse. Der bereits bei den *real time* PCR-Analysen ausgewählte TDII-Klon 4C4 zeigte auch hier eine stringente Regulation.



**Abbildung 3.34: Western Blot-Analyse zum Nachweis der induzierbaren FGFR3-Proteinexpression**

Nach Induktion wurden von den vier TDII-, dem ACH- und dem Kontroll-Klon als auch von untransfizierten SW1353-Zellen 20 µg Proteinextrakt für die *Western Blot* Analyse verwendet. Alle vier TDII-Klone als auch der ACH-Klon zeigten eine induzierbare FGFR3-Proteinexpression, während der Kontrollklon und die untransfizierten Zellen keine Regulation aufwiesen. Der TDII-Klon 4C4 zeigte eine stringente Regulation. Als Abgleich wurde der *Western Blot* mit Aktin-Antikörpern hybridisiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für zwei krankheitsrelevante Mutationen im *FGFR3*-Gen Zelllinien generiert wurden, bei denen mittels des Tet-ON -Systems das mutierte Zielgen *FGFR3* sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationaler Ebene stringent reguliert werden konnte..

Diese induzierbaren Zelllinien können daher genutzt werden die FGFR3-regulierten zellulären Prozesse - und dabei insbesondere die Auswirkungen der Mutationen - näher zu analysieren.

### 3.2.3 Funktionalität der Zelllinien

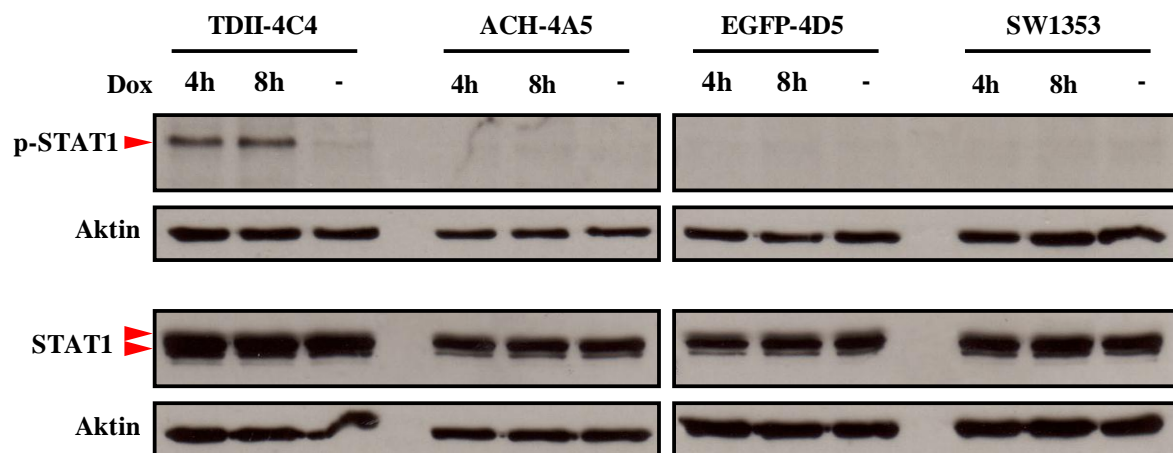
Nachdem für beide Mutationen stringent regulierbare Zelllinien generiert waren, sollte im Folgenden die Funktionalität dieser anhand bereits beschriebener Signalkaskaden überprüft werden. Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor-3 (FGFR3) gehört zu den Rezeptortyrosinkinasen und spielt im Knorpel, insbesondere in der Wachstumsfuge, eine wichtige Rolle als inhibierender Regulator der Chondrozyten-Proliferation und -Differenzierung. Die Aktivierung des Rezeptors, entweder durch Ligandenbindung über sulfatierte Glykosaminoglykane oder durch Mutationen bedingt, führt zu dessen Dimerisierung und zur Transphosphorylierung der konservierten Tyrosinreste innerhalb der cytoplasmatischen Domäne. Diese Tyrosinreste fungieren als „Andockstellen“ für verschiedene Adapterproteine, die ebenfalls phosphoryliert das Signal über unterschiedliche Kaskaden in den Zellkern weiterleiten und somit die Expression diverser Zielgene steuern.

Mutationen wie die beiden hier vorliegenden ACH- und TDII-spezifischen führen zu einer ligandenunabhängigen Rezeptoraktivität, was einen dauerhaft inhibierenden Einfluss zu Folge hat.

Derzeit werden mehrere Signalwege mit der Weiterleitung des FGFR3 Signals in Verbindung gebracht. Überwiegend wird das Augenmerk auf die Phosphorylierung des *signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1) und die Signalübertragung über die Mitglieder der *mitogen activated protein kinase* (MAPK)-Familie gelegt. Aber auch die Aktivierung der Phospholipase-C $\gamma$  und die Rekrutierung der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) spielen eine Rolle (Horton *et al.*, 2007). Die Aktivierung über den MAPK-Signalweg führt zur Inhibition der Extrazellulären Matrixsynthese als auch der Chondrozytendifferenzierung, während die Inhibition der proliferierenden Zellen sowohl über den MAPK-Weg als auch über die Phosphorylierung von STAT1 reguliert wird (Murakami *et al.*, 2004; L'Hote und Knowles, 2005; Horton *et al.*, 2007). Dem MAPK-Weg wird eine favorisierendere Rolle in der Inhibition der Chondrozytenproliferation zugeschrieben (Krejci *et al.*, 2008).

Zur Überprüfung der Funktionalität der generierten Zelllinien wurde im Folgenden die Phosphorylierung von STAT1 als auch die Signalübertragung über den MAPK-Weg mittels Phosphorylierung der *extracellular signal regulated* Kinasen -1 und -2 (ERK1/2) untersucht. Hierzu wurden die Klone TDII-4C4, ACH-4A5, EGFP-4D5 und untransfizierte SW1353-Zellen 4 und 8 Stunden mit bzw. ohne Doxyzyklin behandelt, anschließend die Gesamtproteine extrahiert und im *Western Blot* auf ihre Funktion, nachgeschaltete Signalwege zu aktivieren, hin überprüft.

Nachfolgende Abbildung 3.35 zeigt die Phosphorylierung und somit die Aktivierung von STAT1 lediglich bei dem TDII-Klon 4C4, während der ACH-Klon 4A5 ebenso wie der Kontrollklon EGFP-4D5 und die untransfizierten Zellen nach Induktion keine STAT1-Phosphorylierung aufweisen. Die Expression des nicht phosphorylierten STAT1-Proteines wurde ebenso dokumentiert, diese blieb unbeeinflusst von der Doxyzyklinapplikation.



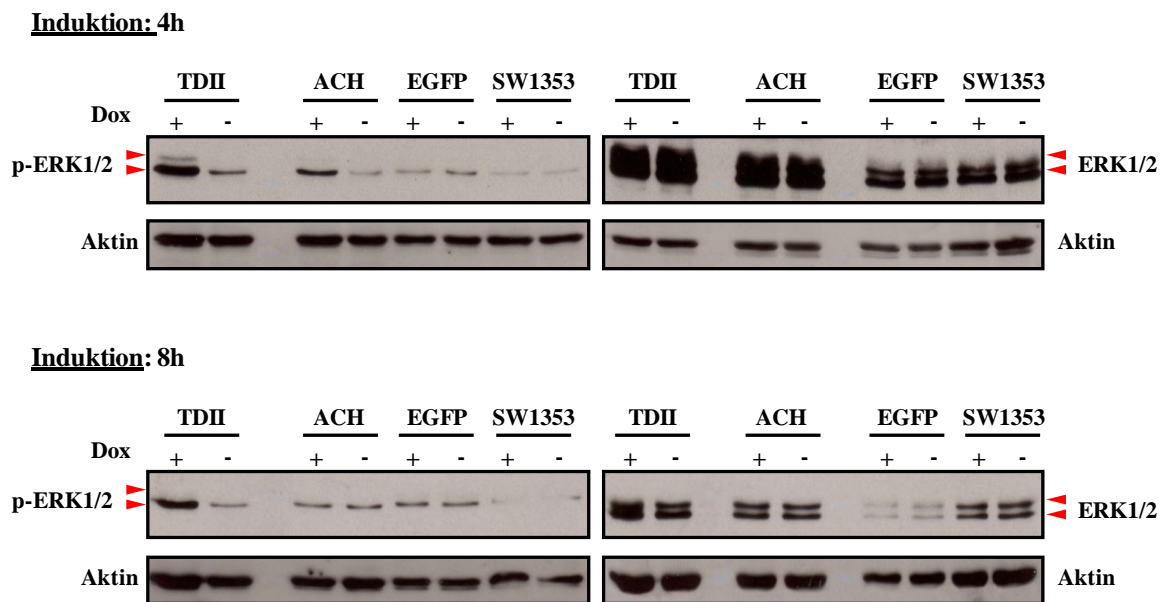
**Abbildung 3.35: Western Blot-Analyse zum Nachweis der Phosphorylierung von STAT1 nach 4 bzw. 8 h Induktion**

Nach den jeweiligen Induktionszeiten wurden 20 µg Proteinextrakt des TDII-, des ACH- und des Kontrollklones als auch von untransfizierten SW1353-Zellen im *Western Blot* eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit den spezifischen Antikörpern. Lediglich der TDII-Klon 4C4 zeigte eine Phosphorylierung von STAT1, der ACH- als auch der Kontrollklon und untransfizierte SW1353-Zellen wiesen keine Aktivierung auf. Die Expression des nicht phosphorylierten STAT1-Proteines blieb bei allen untersuchten Klonen und auch den untransfizierten Zellen unbeeinflusst von der Doxyzyklinapplikation. Die beiden Isoformen von STAT1 (91 kDa, 84 kDa) sind am linken Bildrand markiert (rote Pfeile). Als Kontrolle wurde mit Aktin-Antikörpern hybridisiert.

Zum Nachweis der Signalweiterleitung über den MAPK-Weg wurde die Phosphorylierung der beiden Isoformen *extracellular signal regulated* Kinasen -1 (p44MAPK) und -2 (p42MAPK) (ERK1/2) gewählt. Die mitogen-aktivierenden Proteinkinasen (MAPK) sind eine der bekanntesten Signalweg-Familien, über dessen Kaskaden Signale in den Zellkern weitergeleitet werden und deren funktionelle Bedeutung äußerst vielfältig ist. Beispielweise sind sie an der Regulation von Proliferation und Differenzierung beteiligt (Seger und Krebs, 1995; Chang und Karin, 2001). Die einzelnen Kinasen werden dabei in drei Gruppen eingeteilt: Der *extracellular-regulated kinases* (ERK)-Signalweg, der wohl best-untersuchtete, wird überwiegend durch Wachstumsfaktoren aktiviert und ist an der Regulation von Zellteilung und Proliferation beteiligt (Chang und Karin, 2001; Johnson und Lapadat, 2002). Daher konnte durch die Phosphorylierung von ERK1 und 2, d.h. die Aktivierung dieser beiden Kinasen, die Funktionalität des in den generierten Zelllinien induzierten Wachstumsfaktorrezeptor FGFR3 überprüft werden. Die beiden weiteren Gruppen werden überwiegend durch physikalischen Stress aktiviert und wurden zum Nachweis der Funktionalität nicht herangezogen.



Abbildung 3.36 zeigt nach vier Stunden Induktion eindeutig, dass durch die stringent regulierbare FGFR3-Expression der beiden Klonen TDII-4C4 und ACH-4A5 eine Aktivierung der Kinasen über eine gesteigerte Phosphorylierung erfolgte. Kontrollklon EGFP-4D5 als auch untransfizierte Zellen wiesen wie zu erwarten keine Phosphorylierung der Kinasen auf. Die Expressionsstärke der Kinasen selbst blieb von der Doxyzyklinapplikation unbeeinflusst. Nach 8 stündiger Induktion konnte nur noch bei TDII-Klon 4C4 die Aktivierung des ERK-Signalweges gezeigt werden.



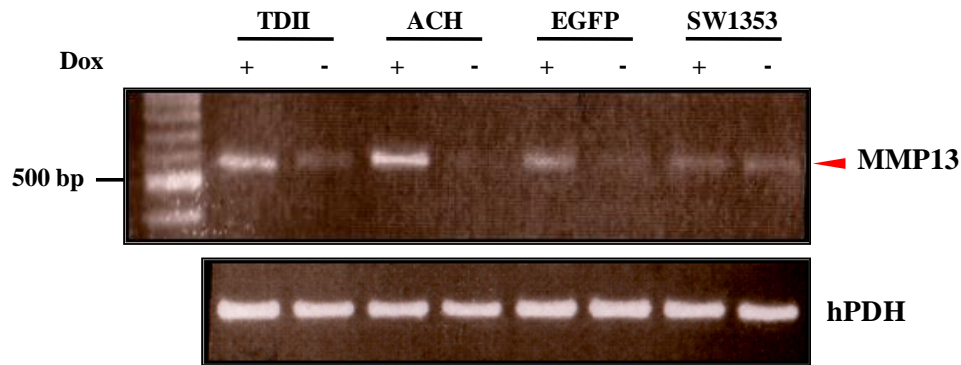
**Abbildung 3.36: Western Blot-Analyse zum Nachweis der Phosphorylierung von ERK1/2 nach 4 bzw. 8h Induktion**

Nach 4 bzw. 8 stündiger Doxyzyklininduktion wurden 20 µg Proteinextrakt der zu untersuchenden Klone und von untransfizierten SW1353-Zellen im *Western Blot* auf ihre Aktivierung der Kinasen untersucht. TDII- und ACH-Klon zeigten nach 4h Induktion eine Aktivierung der Kinasen, während die Kontrollen unbeeinflusst blieben. Nach 8 stündiger Induktion wies nur noch der TDII-Klon eine Aktivierung auf. Die Expression der Kinasen selbst blieb bei beiden Induktionszeiten unbeeinflusst von der Doxyzyklinapplikation. Als Kontrolle der gleichmäßigen Beladung wurde der *Western Blot* mit Aktin-Antikörpern hybridisiert.

Sowohl über die Phosphorylierung von STAT1 als auch von ERK1/2 konnte gezeigt werden, dass die generierten Zelllinien, die stringent regulierbar FGFR3 mit den jeweiligen Mutationen exprimieren, funktional waren und für Genexpressionsanalysen verwendet werden konnten. Der Zellklon mit der TDII-Mutation K650E war in der Lage beide Signalwege zu aktivieren, während der ACH-Zellklon mit der Mutation G380R nur die MAPK-Kaskade anschaltete. Auch wies der TDII-Klon in Relation zum ACH-Zellklon stets eine stärkere Aktivität auf, was sich in einem höheren Phosphorylierungsgrad der untersuchten Signalwege äußerte.

Zur weiteren Verifizierung der Funktionalität sollte im Folgenden die Regulation eines bekannten Zielgenes von FGFR3 untersucht werden. Im Rahmen von Genexpressionsanalysen identifizierten Dailey und Kollegen (2003) Zielgene, die nach FGF1-Stimulation von Rattenchondrosarkom (RCS)-Zellen reguliert wurden. Da in diesen Fall zum einen ein anderes Zellsystem, zum anderen die Stimulation des Wildtyp-Rezeptors verwendet wurde, konnte nicht zwingend von der gleichen Regulation der Zielgene ausgegangen werden. Dennoch bot sich hier eine geeignete Gruppe möglicher Zielgene von FGFR3 an. Ein aus dieser Veröffentlichung nach Stimulation mit FGF-1 stark reguliertes Gen war die Matrix Metalloproteinase 13, auch als Kollagenase-3 bekannt (*MMP13*). Auch konnte Uria *et al.* bereits 1998 zeigen, dass durch Gabe des *basic fibroblast growth factor* (bFGF bzw. FGF-2), welcher unter anderem auch FGFR3 stimuliert, die *MMP-13*-Expression zeit- und dosisabhängig induziert wurde. MMP13 ist ein Mitglied der Matrix Metalloproteinasen, eine Familie Zink-abhängiger Endopeptidasen, die eine zentrale Rolle in der Degradation der Extrazellulärmatrix spielen. Weiterhin übernehmen sie aber auch als multifunktionale Gruppe biologisch relevanter Moleküle verschiedenste Aufgaben im Zellwachstum, der Differenzierung und der Zellregulation (Murray, 2001; Leeman *et al.*, 2002).

Durch diese Veröffentlichungen konnten bereits Zusammenhänge zwischen den Fibroblasten-Wachstumsfaktoren und der Matrix Metalloproteinase-13 aufgezeigt werden, jedoch noch keinen FGFR3-spezifischen - insbesondere keine möglichen Auswirkungen von Mutationen auf die *MMP13*-Expression. Daher lag es nahe, auch als zusätzlichen Funktionalitätsnachweis, die *MMP13*-Expression nach Induktion der Zelllinien näher zu untersuchen. Nach zweitägiger Doxyzyklininduktion wurde nach RNA-Isolation und reverser Transkription alle drei generierten Zellklone als auch untransfizierte Zellen mittels RT-PCR-Experimente (Primer: MMP13-F/R, 561 bp) auf ihre *MMP13*-Expression untersucht (Abb. 3.37). Sowohl der TDII- als auch der ACH-Klon zeigten eine Regulation der *MMP13*-Expression nach Induktion mit Doxyzyklin, wobei der ACH-Klon eine stärkere Expression aufwies. Jedoch auch der Kontrollklon EGFP-4D5 zeigte eine schwache Regulation.

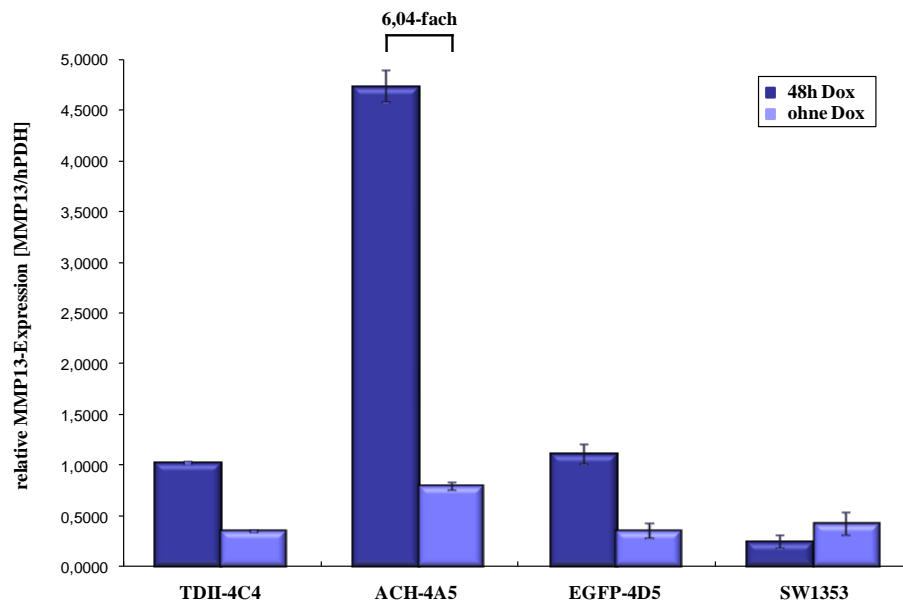


### Abbildung 3.37: RT-PCR-Experimente zur induzierbaren *MMP13*-Expression

Nach zweitägiger Doxyzyklinapplikation wurde von den drei generierten Zellklonen als auch von untransfizierten SW1353-Zellen Gesamt-RNA isoliert, diese revers transkribiert und mittels RT-PCR (Primer: *MMP13*-F/R, 561 bp) auf ihre *MMP13*-Expresison untersucht. TDII- und ACH-Klon zeigten eine *MMP13*-Regulation nach Induktion von FGFR3 mit Doxyzyklin. Der Kontrollklon wies ebenfalls eine leichte Regulation auf. Zur Kontrolle gleicher eingesetzter cDNA-Mengen wurde die Expression des humanen Haushaltsgenes *Pyruvatdehydrogenase* (**hPDH**, PDH-E9F/E10R) untersucht. Mitgeführte Negativkontrollen wiesen keine Amplifikate auf (nicht abgebildet).

Bereits bei den RT-PCR-Analysen zeigte sich, dass die beiden Mutationen womöglich auch differentielle *MMP13*-Expressionen nach sich ziehen, wobei die einen schwächeren Phänotyp auslösende ACH-Mutation eine stärkere *MMP13*-Expression aufzuweisen schien. Um dies näher zu untersuchen wurden relative Quantifizierungen mittels *real-time* RT-PCR (Primer: h*MMP13*-LC-F/R, 210 bp) im *Light Cycler* durchgeführt. Auch hier bekräftigte sich die Annahme, dass die beiden Mutationen unterschiedliche Auswirkungen auf die *MMP13*-Expression haben. Der Klon mit der ACH-Mutation G380R wies nach Induktion mit Doxyzyklin eine zirka 6 fach erhöhte *MMP13*-Expression in Relation zu nicht induzierten Zellen auf. Der TDII-Klon mit der Mutation K650E dagegen zeigte zwar eine Regulation nach Induktion, jedoch könnte dies unter Umständen auch eine Doxyzyklineffekt sein, da der Kontrollklon ebenfalls eine derartige Regulation aufwies (Abb. 3.38).

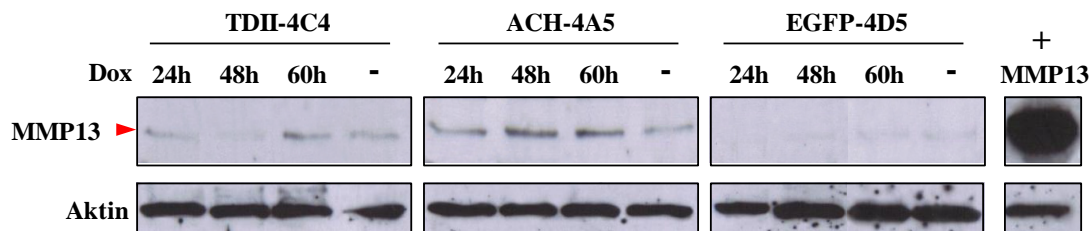
Somit konnte auf transkriptioneller Ebene die Regulation des Zielgenes *MMP13*, welches vorab in der Literatur nur mit dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 in Verbindung gebracht wurde, durch FGFR3 nachgewiesen werden. Insbesondere könnte es auch sein, dass verschiedene Mutationen im *FGFR3*-Gen eine unterschiedliche Auswirkung auf die *MMP13*-Expression haben.



**Abbildung 3.38: Relative Quantifizierung zum Nachweis der induzierbaren *MMP13*-Expression**

Nach Doxyzyklininduktion (48h) wurde von den zu untersuchenden Klonen und von untransfizierten SW1353-Zellen Gesamt-RNA isoliert, diese revers transkribiert und mittels *real time* RT-PCR auf ihre *MMP13*-Expression untersucht. Der ACH-Klon zeigte eine 6,04-fach erhöhte *MMP13*-Expression in Relation zu nicht induzierten Zellen. Als Abgleich wurde die Expression des humanen Haushaltsgenes *Pyruvatdehydrogenase* (*hPDH*) bestimmt.

Um die Regulation auch auf Proteinebene nachzuweisen, wurden induzierte und nicht induzierte Zellen der drei generierten Zelllinien mittels *Western Blot*-Analysen auf ihre *MMP13*-Expression überprüft (Abb. 3.39). Der TDII- wie auch der Kontrollklon zeigten nach 48 h Induktion, wie auch bereits bei der RT-PCR, fast keine Regulation. Nach 60stündiger Induktion konnte bei dem TDII-Klon eine schwache *MMP13*-Expression detektiert werden. Der in der relativen Quantifizierung am vielversprechendsten ACH-Klon zeigte überraschenderweise nur eine geringe Regulation von *MMP13* nach Doxyzyklinapplikation. Die 6-fach stärkere Regulation, die in der RT-PCR festgestellt werden konnte, trat nicht ein, dennoch war eine Erhöhung der *MMP13*-Expression nach Induktion feststellbar.



**Abbildung 3.39: Western Blot-Analyse zur induzierbaren *MMP13*-Expression**

Nach den entsprechenden Induktionszeiten wurden 50 µg Proteinextrakt der drei generierten Zellklone im *Western Blot* eingesetzt. Als Positivkontrolle diente ein freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Dr. E. Lausch zur Verfügung gestellter Proteinextrakt aus HEK-293T-Zellen, die mit dem Vektor pcDNA3/*MMP13*-wt transfiziert worden waren. Es zeigte sich bei dem ACH-Klon eine *MMP13*-Regulation infolge Doxyzyklininduktion. Als Abgleich wurde mit Aktin-Antikörpern hybridisiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch das Anschalten der zwei wichtigsten Signalwege von FGFR3 und die Regulation eines Zielgenes gezeigt werden konnte, dass die generierten Zelllinien funktional waren und für weitere Studien als *in vitro*-Modellsystem zur Analyse FGFR3 regulierter Prozesse verwendet werden konnten. Vergleichend zwischen den beiden eingefügten Mutationen zeigte der generierte TDII-Klon eine stärkere Signalantwort beim Aktivieren der Signalkaskaden, wogegen der ACH-Klon keine (Phosphorylierung von STAT1) bzw. eine schwache Aktivierung (MAPK-Weg) aufwies. Daher wurde für die differentielle Genexpressionsanalyse mittels *Microarray*-Hybridisierung nur der TDII-Klon 4C4 vergleichend induziert/nicht induziert verwendet, da hier wahrscheinlich von einer stärkeren Signalantwort ausgegangen werden konnte.

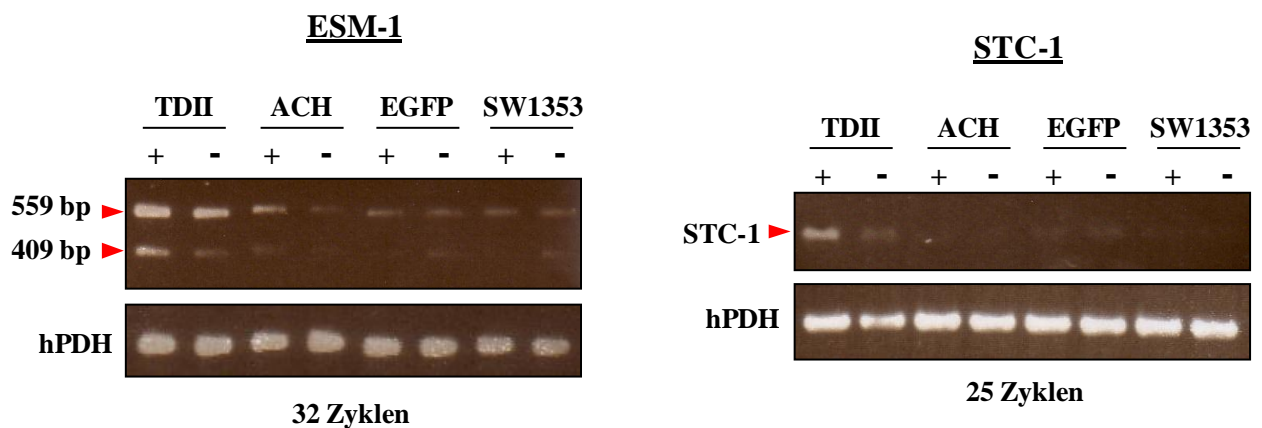
### **3.2.4 Differentielle Genexpressionsanalyse mittels *Microarray*-Hybridisierung**

Wie bereits näher erläutert, hat die konstitutive Aktivierung von FGFR3 durch Mutationen einen dauerhaft inhibierenden Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten in der Wachstumsfuge des Knorpels. Dies führt zu unterschiedlich stark ausgeprägten Formen des Kleinwuchses. Trotz intensiver Grundlagenforschung sind nach wie vor einige der zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht vollständig geklärt. Durch differentielle Genexpressionsanalysen mittels *Microarray*-Hybridisierung bietet sich die Möglichkeit, FGFR3-regulierte Zielgene zu identifizieren und somit die Zusammenhänge im pathophysiologischen Kontext der FGFR3-bedingten Skelettentwicklungsstörungen besser zu verstehen.

Die *Whole Human Genome Microarray*-Hybridisierung zur differentiellen Genexpressionsanalyse wurde in Kooperation mit der *Core Facility Genomics* (Dr. Thorsten Kurz) des Universitätsklinikums Freiburg und der Firma Agilent durchgeführt. Dieser Oligo-Array umfasst zirka 41 000 Transkripte mit öffentlichen Annotierungen, wobei die 60mer-Oligos mehrfach Gene repräsentieren. Als zu vergleichende Proben wurden 48 Stunden induzierte und nicht induzierte Zellen des TDII-Klones 4C4 verwendet. Nach Doxyzyklinapplikation wurde RNA isoliert, aufgereinigt und jeweils zirka 25 µg RNA an die *Core Facility Genomics* weitergeleitet. Die weitere Durchführung z.B. die Markierung mit den fluoreszierenden Farbstoffen Cy3- und Cy5 als auch die Hybridisierung selbst erfolgte nach dem Protokoll der *Core Facility Genomics*. Nach fluorimetrischer Auswertung wurden die Gene als differentiell exprimiert angesehen, die um den Faktor 2 hoch- bzw. herunterreguliert waren. Die Liste der regulierten Gene ist im Anhang Tabelle 7.1 dargestellt, wobei überexprimierte Gene rot, reprimierte Gene blau dargestellt sind.

Überraschenderweise konnten bei der Hybridisierung nur insgesamt 9 regulierte Gene identifiziert werden, 7, die nach Induktion überexprimiert und 2, die reprimiert waren. Zur Überprüfung der Daten wurden semiquantitative RT-PCRs einiger Gene durchgeführt. Von insgesamt vier untersuchten Genen konnten zwei in ihrer Regulation über RT-PCR nicht bestätigt werden (Daten nicht abgebildet). Bei den beiden anderen Genen konnte die differentielle Expression nach FGFR3-Induktion über semiquantitative RT-PCR bestätigt werden. In nachfolgenden Abbildung 3.40 sind die untersuchten Gene, deren differentielle Expression laut *Array*-Hybridisierung und die beiden semiquantitativen RT-PCR-Analysen der nachgewiesenen Regulationen dargestellt.

Gen	Genbank	48h Dox	RT-PCR
CHRNA7	NM_000746	3,002	✗
CAMK1G	NM_020439	2,429	✗
ESM-1	NM_007036	3,141	✓
STC-1	NM_003155	2,429	✓



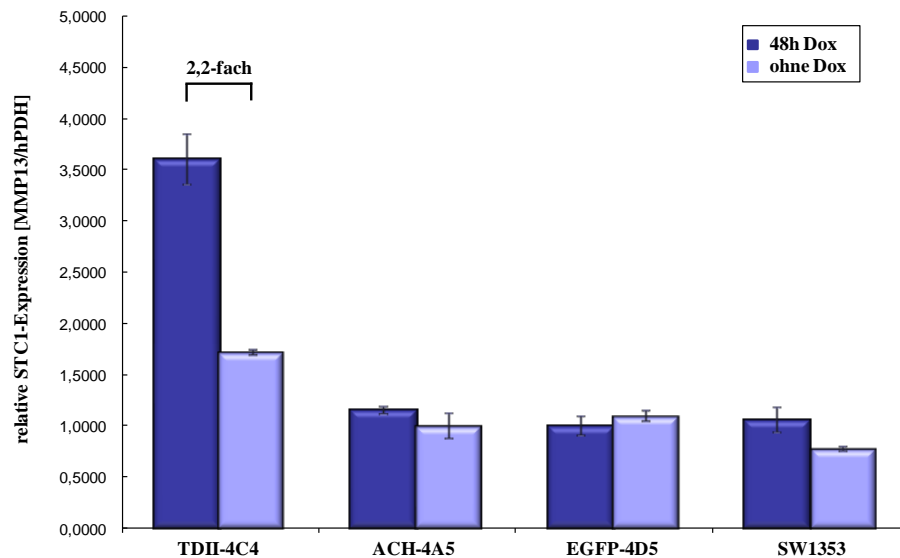
**Abbildung 3.40: Microarray-Ergebnisse von vier mittels RT-PCR untersuchten Genen**

Nach 48 stündiger Induktion in An (+)- und d Abwesenheit (-) von Doxyzyklin wurde die im Anschluss isolierte RNA im *Microarray* der Firma Agilent untersucht. In der Tabelle sind die vier mittels semiquantitativer RT-PCR überprüften Gene und ihre *Microarray*-Daten eingetragen. Bei den durchgeführten RT-PCRs der Gene *CHRNA7* und *CAMK1G* konnten die Daten des Arrays nicht bestätigt werden (nicht abgebildet), *ESM1* (*ESM1-S1/R1*) und *STC1* (*hSTC1-F/R*) dagegen konnten als positiv verifiziert werden. Die unteren beiden Abbildungen zeigen die semiquantitativen RT-PCR-Experimente nach 32 Zyklen (*ESM1*) bzw. nach 25 Zyklen (*STC1*). Bei *ESM1* wurden beide Splicevarianten des Genes amplifiziert. Als Abgleich diente der Expressionsnachweis des humanen Haushaltsgenes *Pyruvatdehydrogenase* (**hPDH**, *PDH-E9F/E10R*).

### 3.2.4.1 Differentielle *STC1* Expression infolge *FGFR3*-Induktion

Aufgrund der Literaturrecherche erwies sich das Gen *STC1* (Stanniocalcin-1) als interessant, da es wie auch *FGFR3* selbst an der Regulation des Längenwachstums der Röhrenknochen beteiligt ist (Wu *et al.*, 2006). Stanniocalcin ist ein Glykoprotein, welches erstmals in Knochenfischen entdeckt wurde und dessen humanes Homolog *STC1* im Gegensatz zu seinem Vertreter bei den Knochenfischen ein weitreichendes Expressionsprofil aufweist. Neben dem Effekt auf den Phosphatmetabolismus scheint *STC1* auch eine wichtige Rolle sowohl in der Knochenentwicklung als auch in der Chondrogenese der Wachstumsfuge selbst zu haben (Yoshiko *et al.*, 1999 und 2004; Jiang *et al.*, 2000; Stasko und Wagner, 2001; Filvaroff *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2006, Johnston *et al.*, 2010). Versuche an Organkulturen (fetale Mittelfußknochen) zeigten, dass durch Zugabe von rekombinantem humanem *STC1* sowohl die Chondrozyten-Proliferation und -Differenzierung als auch die extrazelluläre Matrixsynthese unterdrückt wird (Wu *et al.*, 2006). Ähnliche Resultate ergaben sich bei *FGFR3*-Überexpression bzw. konstitutiver *FGFR3*-Expression durch aktivierende Mutationen (Li *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999b; Horton *et al.*, 2002; Minina *et al.*, 2002; Murakami *et al.*, 2004). Auch der zweite humane Vertreter *STC2* scheint inhibitorische Funktionen im Knorpel/Knochenapparat zu haben, sodass diese Gewebe spezifische physiologische Zielbereiche der Stanniocalcine zu sein scheinen (Gagliardi *et al.*, 2005).

Bei der Verifizierung der *Microarray*-Daten konnte bereits über semiquantitative RT-PCR die Regulation von *STC1*-Expression infolge *FGFR3*-Induktion nachgewiesen werden. Zur zusätzlichen Bestätigung wurde eine relative Quantifizierung mittels *real time* PCR (Primer: hSTC1-F/R, 140 bp) im *Light Cycler* durchgeführt. Von allen Zellklonen als auch von untransfizierten Zellen wurde nach Induktion RNA isoliert, diese revers transkribiert und auf ihre *STC1*-Expression untersucht (Abb. 3.41). Wie bereits in den semiquantitativen RT-PCR-Experimenten konnte auch hier die Regulation der *STC1*-Expression infolge *FGFR3*-Induktion bestätigt werden. Der ACH-Klon 4A5 zeigte wie auch der Kontrollklon 4D5 und untransfizierte SW1353-Zellen keine transkriptionelle Regulation von *STC1*.



**Abbildung 3.41: Relative Quantifizierung zum Nachweis der induzierbaren *STC1*-Expression infolge *FGFR3*-Induktion**

Nach 48 h Induktion in An (+)- und Abwesenheit (-) von Doxyzyklin wurden von den zu untersuchenden Klonen und auch von untransfizierten SW1353-Zellen Gesamt-RNA isoliert, diese revers transkribiert und über *real time* RT-PCR (hSTC1-F/R, 140 bp) auf ihre *STC1*-Expression nach *FGFR3*-Induktion untersucht. Der TDII-Klon zeigte als einziger eine Regulation um das 2,2-fache. Als Kontrolle wurde die Expression des humanen Haushaltsgenes *Pyruvatdehydrogenase* (*hPDH*) bestimmt.

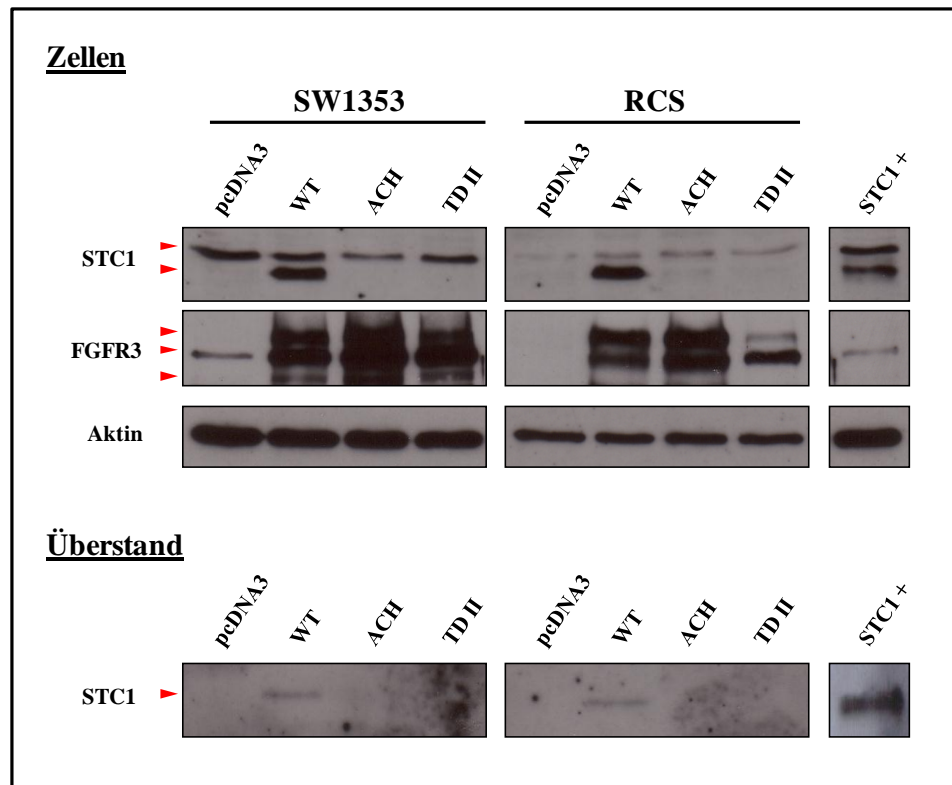
Um auch auf Proteinebene die Regulation von *STC1* durch *FGFR3* nachzuweisen, wurden *Western Blot* Analysen durchgeführt. Nach wiederholten Versuchen und auch nach unterschiedlichen Induktionszeiten bis zu drei Tagen konnte mit den stabil transfizierten Zelllinien keine *STC1*-Proteinexpression nachgewiesen werden. Unter Umständen könnte sich das Zellsystem der SW1353-Zellen als ungeeignet erweisen, da eventuell die zelluläre Antwort so gering ist, dass Zielgene nicht mehr im *Western Blot* detektierbar sind. Um dies zu überprüfen wurden zusätzlich zu der humanen Zelllinie SW1353 noch Rattenchondrosarkomzellen (RCS), ebenfalls häufig verwendete Zellen für *in vitro*-Analysen des Knorpel/Knochensystems, auf ihre *STC1*-Expression überprüft. Da die Generierung stabiler Zelllinien mit dem Tet-System aufwendig ist, wurden für diese transienten Experimente konstitutiv *FGFR3*-exprimierende Zellen hergestellt. Hierzu wurden die beiden die Mutationen tragenden Varianten (ACH und TDII) und die Wildtyp-Variante des *FGFR3*-Genes, die zu Beginn der Arbeit in den Vektor pcDNA3Neo der Firma Invitrogen kloniert und bei den beiden Mutanten mutagenisiert worden waren, transient mittels der *Lipofectamine*<sup>TM</sup> 2000-Methode in die beiden Zellsysteme transfiziert. Zusätzlich wurde als



---

Positivkontrolle die kodierende Sequenz des humanen *STC1*-Genes (NM\_003155, Position 202-1248) in den Vektor pcDNA3Neo kloniert und ebenfalls transfiziert. In Zellenextrakten ist STC1 im *Western Blot* als 31 kDa- und 33 kDa-Bande zu detektieren, während im Zellüberstand, wo nur geringe Mengen des Proteins sezerniert werden, eine starke 35 kDa- und eine schwächere 31 kDa-Bande zu detektieren sein sollte. Die unterschiedlichen Größen des Proteines kommen durch Glykosylierungen zustande (Jellinek *et al.*, 2000).

Bei den transienten Experimenten konnte sowohl bei den SW1353- als auch den Rattenchondrosarkom-Zellen (RCS) im Extrakt nur beim konstitutiv exprimierten Wildtyp-FGFR3 beide Formen detektiert werden. Die 33 kDa-Bande erschien bei allen transfizierten Zellen, auch bei jenen, die nur mit dem Vektor transfiziert worden waren, wobei bei den Rattenchondrosarkomzellen diese Bande schwächer ausgeprägt war. Als Kontrolle zur Transfektionseffizienz wurde auch die Expression von FGFR3 nachgewiesen. Im Zellüberstand konnte nur bei der konstitutiv exprimierten Wildtyp-Variante von FGFR3 eine STC1-Expression nachgewiesen werden, beide Mutanten zeigten keine STC1-Regulation (Abb. 3.42).



**Abbildung 3.42: Transiente Transfektionsexperimente von SW1353- und RCS-Zellen zum Nachweis der induzierbaren STC1-Expression**

SW1353- und RCS-Zellen wurden transient mit dem Vektor pcDNA3Neo, der die beiden die Mutationen tragenden Varianten als auch die Wildtyp-Variante des *FGFR3*-Genes enthielt, transfiziert. Als Positivkontrolle wurde der gleiche Vektor mit der kodierenden Sequenz des *STC1*-Genes transfiziert. Nach Proteinisolierung wurden 100 µg Extrakt bzw. gleiche Mengen Zellüberstand im *Western Blot* eingesetzt. Im Zellextrakt ist STC1 als 31 kDa- und 33 kDa-, im Überstand als 31 kDa- und 35 kDa-Bande zu detektieren. Es zeigte sich bei SW1353- und RCS-Zellen nur bei der Wildtyp-Variante von *FGFR3* eine STC1-Expression, im Extrakt und auch im Überstand. Die beiden die Mutation tragenden Varianten wiesen keine Regulation auf. Als Kontrolle wurde der *Western Blot* mit den Zellextrakten mit *FGFR3*- und Aktin-Antikörpern hybridisiert.

Mit Hilfe dieser transienten Experimente konnte auf Proteinebene eine Korrelation zwischen *FGFR3*- und *STC1*-Expression demonstriert werden. Auch konnte dies in einem weiteren Zellsystem nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass stabil transfizierte Zelllinien generiert wurden, die zwei verschiedene mutierte Varianten des *FGFR3*-Genes stringent regulierbar mittels des Tet-Systems überexprimieren. Es konnten beschriebene Signalkaskaden sowie das mit *FGFR3* in Zusammenhang gebrachte Gen *MMP13* angeschaltet beziehungsweise reguliert werden. Nach der *Array*-Hybridisierung wurde ein mit *FGFR3* bisher noch nicht in Verbindung gebrachtes Gen, Stanniocalcin-1, identifiziert. Dieses möglicherweise neue durch *FGFR3* regulierte Zielgen wurde nur durch die Wildtyp-Form von *FGFR3* sezerniert, die beiden mutierten Varianten ACH und TDII zeigten keine Sekretion des Proteins.

## 4 Diskussion

Die komplexen Vorgänge im Auf- und Umbau des Knorpel-/Knochensystems sind vielfältig ineinander verschachtelte Mechanismen, deren Funktionen selbst im physiologischen Kontext noch nicht genau geklärt sind. Das Verhalten unter pathologischen Bedingungen, wie zum Beispiel bei Wachstumsstörungen, Skelettdysplasien und Osteoarthritis, ist darüber hinaus von besonderem Interesse. Hier können Rückschlüsse auf die Relevanz eines Gens oder Proteins im Bezug auf die zu untersuchende Erkrankung gezogen werden.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden zwei Ansätze verfolgt, um unterschiedliche Erkrankungen des Skelettsystems zu charakterisieren. Über ein *in vivo*-Modell wurde die Relevanz der Aggrecanase mAdamts5 im Pathogeneseprozess der Osteoarthritis untersucht. Mit Hilfe des Tet-Systems und einem gewebspezifischen Promotor sollte diese Protease im Knorpel von Mäusen überexprimiert werden. Nach Konstruktion und -Verifizierung erfolgte im Anschluss die Charakterisierung der transgenen Tiere. Der zweite Teil der Arbeit widmete sich der Aufklärung FGFR3-regulierter zellulärer Prozesse, insbesondere der Identifizierung neuer involvierter Gene. Es wurden zwei induzierbare, stabile Zelllinien generiert, die jeweils eine Chondrodysplasie-assoziierte Mutation trugen. Zum einen wurde die Signalweiterleitung der beiden Mutanten vergleichend studiert, zum anderen über *Microarray*-Hybridisierung ein weiteres, bisher noch nicht mit FGFR3 in Verbindung gebrachtes Gen identifiziert.

### 4.1 Transgene Maus als Osteoarthritis-Modell

Die Osteoarthritis (OA) ist eine progressiv verlaufende Gelenkerkrankung, charakterisiert durch Knorpeldegradation, Veränderungen des periartikulären und subchondralen Knochens und sie bedingt dabei intraartikuläre Entzündungen mit Synovitis. Zu den Ursachen der Erkrankung zählen neben Alter und Gewicht auch Gelenkinstabilitäten bzw. Schiefstellungen der Gelenke, die zu einseitiger Belastung führen (Goldring *et al.*, 2007). Neben diesen mehr mechanischen Ursachen spielen jedoch auch genetische Faktoren eine nicht unerhebliche Rolle. Epidemiologische Studien ergaben, dass der genetische Einfluss bei dieser Erkrankung zwischen 40-70% liegt; ca. 40% bei Kniegelenks-Osteoarthrosen, 65% bei Hand- oder Hüftgelenks-Osteoarthrosen und sogar 70% bei Osteoarthrosen der Wirbelsäule (Spector *et al.*, 2004; Fernández- Moreno *et al.*, 2008).

Trotz der weltweit stark verbreiteten Krankheit mit enormer Beeinträchtigung der Lebensqualität gibt es momentan keine effektiven Behandlungsstrategien. Das Therapieangebot beschränkt sich überwiegend auf die Bekämpfung beziehungsweise Linderung der Symptome. Das Verständnis der molekularen Pathomechanismen der Osteoarthritis, die sowohl bei der Krankheitsentstehung als auch dem -Verlauf eine Rolle spielen, ist dabei von großer Bedeutung für die Konzipierung wirkungsvoller Therapieansätze. Die Entwicklung von OA-Tiermodellen, bei denen entweder durch spontan verlaufende Arthrosen oder durch genetisch modifizierte *knock-out*- und *knock-in*-Modelle Arthrosen simuliert werden, bieten eine äußerst vielversprechende Option, die Pathogenese der Osteoarthritis näher zu untersuchen. Hier können Rückschlüsse auf das zu untersuchende Gen in Bezug zur Osteoarthritis-Entstehung gezogen werden. Bei den bisher verwendeten Modellen muss zu der genetischen Komponente ein zusätzlicher mechanischer oder chemischer Reiz zur Arthrosebildung hinzukommen. Es wird entweder chirurgisch durch Destabilisierung des medialen Meniskus (DMM-Modell) oder enzymatisch bzw. chemisch durch zum Beispiel Injektion von methyliertem BSA ins Kniegelenk (AIA-Modell = Antigen-induzierte Arthritis) ein exogener Reiz als Auslöser der OA verwendet.

Normales Knorpelgewebe besteht aus einem zähen Geflecht aus Kollagen Typ II-Fasern, in die das Hauptproteoglykan Aggrecan über Hyaluronsäure eingebunden ist. Da Proteoglykane über ihre assoziierten Glykosaminoglykane, wie beispielsweise das Chondroitin- und Keratansulfat, eine große Wasserbindungskapazität aufweisen, verleihen sie dem Knorpel Elastizität. In arthrotischem Knorpel ist der überwiegende Teil des Aggrecans degradiert. Durch diesen Abbau gehen die für die biomechanischen Eigenschaften verantwortlichen Chondroitin- bzw. Keratansulfatketten verloren und dies ist am nachteiligsten für die Knorpelfunktion. Durch den Verlust der Elastizität wird der mechanische Stress auf das Kollagenetzwerk größer, sodass es auch hier zur Degradation kommt.

Der größte Teil der Aggrecanfragmente entsteht über die Spaltung durch Aggrecanasen. Jedoch auch die Matrixmetalloproteinasen (MMP's) sind an der Proteolyse beteiligt, allerdings erst in späten Stadien der Erkrankung und auch an anderer Stelle im Molekül (Chambers *et al.*, 2001; Struglics *et al.*, 2006, Kawaguchi *et al.*, 2008). Sandy und Kollegen konnten 2001 durch Analysen mit spezifischen Antikörpern zeigen, dass in frühen Stadien der Erkrankung überwiegend durch Aggrecanasen bedingte Aggrecan-Fragmente entstehen und diesen Enzymen bei der frühen Osteoarthritis eine wichtige Rolle zukommt. Die spezifische Spaltung durch die Aggrecanasen in der Interglobulären Domäne 1 an Stelle E<sup>373</sup>↓<sup>374</sup>A

verursacht, obwohl dies nicht die präferentielle Schnittstelle ist (Tortorella *et al.*, 2000 und 2002; Porter *et al.*, 2005), doch den meisten Schaden, da der größte Teil des Aggrekans verloren geht. Blockierung dieser sogenannten Aggrekanase-Schnittstelle in der Interglobulären Domäne 1 alleine schützt vor Knorpelerosionen und aktiviert sogar Knorpelreparaturmechanismen (Little *et al.*, 2007).

Mehrere Studien zeigten, dass die Aggrekanase-2 mAdamts5 die primär für die Aggrekanalyse verantwortliche Protease im Knorpel ist (Glasson *et al.*, 2005; Stanton *et al.*, 2005; Little *et al.*, 2007; Kawaguchi, 2008; van den Berg, 2008). Aber auch die Aggrekanase-1 mAdamts4 scheint in die knorpeldegradierenden Mechanismen involviert zu sein (Hardingham, 2008; Fosang *et al.*, 2008a). Zum einen weisen *in vitro* Studien mit siRNAs (Song *et al.*, 2007), neutralisierenden Antikörpern (Powell *et al.*, 2007) und Immunopräzipitationen mit Anti-Adamts Antikörpern (Tortorella *et al.*, 2001) auf mAdamts4 als signifikantes Molekül in der Aggrekanalyse hin. Andererseits zeigen ganz eindeutig mAdamts5, aber nicht mAdamts4 defiziente Mäuse einen Schutz vor Knorpelerosionen in chirurgisch destabilisierten Mausmodellen (Glasson *et al.*, 2005; Stanton *et al.*, 2005). Welche der beiden Aggrekanasen oder ob möglicherweise beide Enzyme eine kritische Rolle in der Pathogenese der Osteoarthritis spielen, ist zurzeit noch unklar. Auch zeigte sich durch die verschiedenen klinischen Studien, die generierten Tiermodelle als auch die *in vitro*-Systeme, dass gewisse Kriterien wie z.B. verschiedene Stadien der Osteoarthritis, unterschiedlich untersuchte Gelenke (Hüfte, Knie, Hand) als auch Tiermodelle verschiedener Spezies zu unterschiedlichen Ergebnissen in der Expression bzw. der Aktivität der beiden Aggrekanasen führen (Fosang *et al.*, 2008b).

Die Inhibition der Aggrekanasen stellt eine zentrale Rolle in der Entwicklung von Therapiekonzepten dar. Die Schaffung eines Tiermodells mit exogen induzierbarer Überexpression einer der relevanten Aggrekanasen kann dabei entscheidend zur weiteren Aufklärung der Pathogenese beitragen. Weiterhin kann es auch als Grundlage zur Optimierung bereits bestehender beziehungsweise Etablierung neuer pharmakologischer Wirkstoffe dienen.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein Tiermodell entwickelt, bei dem exogen mittels des Tet-Systems die Aggrekanase mAdamts5 gewebspezifisch überexprimiert wird. Ohne exogene Reize konnte so die pathogene Relevanz dieses Enzymes analysiert werden. Nach Generierung eines bifunktionalen Konstruktes wurde dies zunächst *in vitro* auf Induzierbarkeit und Funktionalität überprüft, im Anschluss erfolgte die Herstellung und Charakterisierung des Tiermodells.

#### 4.1.1 Konstruktherstellung und Verifizierung *in vitro*

Utomo und Kollegen entwickelten 1999 ein universales Expressionssystem zur zeitlichen und gewebsspezifischen Kontrolle zu analysierender Gene in transgenen Tieren. Dieser bifunktionale Expressionsvektor beinhaltete sowohl Effektor- als auch *Responder*kassette in einem Transgen und vereinfachte somit aufwendige Kreuzungsexperimente. Zusätzlich sollte auch durch die gleiche Anzahl an Effektor- und *Responder*molekülen eine quantitative Regulation des Zielgenes gewährleistet sein. Ein 4 kbp großes Zwischenfragment verhinderte transkriptionelle Interferenzen der beiden Einheiten. Auf der Basis dieses Systems wurde der Vektor pUHRt62-1, der den reversen Tetrazyklin-abhängigen Transaktivators *rtTA2<sup>S</sup>-M2* (Urlinger *et al.*, 2000) beinhaltet, derart modifiziert, dass das Zielgen *mAdamts-5* induzierbar mittels des Tet-ON-Systems und durch den Kollagen Typ II Promotor gewebsspezifisch nur in ruhenden, proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten exprimiert wird.

Der die Gewebsspezifität steuernde Kollagen Typ II Promotor spielte dabei eine wichtige Rolle. Zhou *et al.* konnte 1998 zeigen, dass vier *Tandemrepeats* eines 48 bp *Enhancer* Elementes aus Intron 1, 309 bp des Kollagen Typ II Promotors, 237 bp von Exon 1 und ein synthetisches Intron zur Stabilisierung der mRNA ausreichend sind, um eine chondrozytenspezifische Expression zu gewährleisten. Innerhalb dieser 48 bp-Elemente konnten drei Sequenzabschnitte identifiziert werden, die bei der Komplexbildung mit SOX9 (SRY (sex determining region Y)-box 9) und weiteren Proteinen eine entscheidende Rolle spielen. Analysen der drei Sequenzbereiche zeigten, dass Mutationen in den Abschnitten zum Verlust der Chondrozyten Spezifität führen (Zhou *et al.*, 1998). Die in der Arbeit verwendete Variante entsprach der Wildtypsequenz und gewährleistete die gewebsspezifische Expression des nachgeschalteten *rtTA2<sup>S</sup>-M2*. Weiterhin wurde im Exon 1-Fragment das Startkodon (ATG → CTG) mutiert, um die Translationsinitiation zu inhibieren.

Der bei Utomo verwendete *rtTA* in der Effektorkassette wurde ersetzt durch den neueren, optimierteren *rtTA2<sup>S</sup>-M2*. Trotz der vorteilhaften Eigenschaften der *rtTA*-Proteine war die Anwendung limitiert, da auch in Abwesenheit von Tetrazyklin bzw. Doxyzyklin eine basale Grundaffinität des *rtTA*'s für die TetO-Sequenz bestand. Ein weiterer Nachteil war die geringe Stabilität des *rtTA*-Proteins und eine ungenügende Induzierbarkeit durch Tetrazyklin bzw. Doxyzyklin. Um diese limitierenden Eigenschaften ebenfalls noch zu eliminieren, entwickelten Urlinger und Kollegen fünf weitere *rtTA*-Proteine, unter anderem den hier verwendeten *rtTA2<sup>S</sup>-M2*, die neben einer reduzierteren Grundaktivität und gesteigerter Doxyzyklin-Sensitivität auch eine wesentlichere Stabilität aufwiesen (Urlinger *et al.*, 2000). Nach Fertigstellung und Verifizierung der **Effektorkassette**, bestehend aus Kollagen Typ II

Promotor mit nachgeschaltetem *rtTA2<sup>S</sup>-M2*, erfolgte die Herstellung der *Responderkassette* in einem zweiten Vektor, der die dafür erforderlichen Elemente enthielt. Die ***Responderkassette***, bestehend aus Tet-responsivem Element (TRE) und Zielgen *mAdamts5*, wurde in dem Vektor pUHD10-3 generiert und die verschiedenen Klonierungs- und Mutagenisierungsschritte verifiziert. Im Anschluss erfolgte die Zusammenführung beider Kassetten. Nach Fertigstellung und Überprüfung des Endkonstruktes durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung war ein bifunktionaler Expressionsvektor generiert worden (Abb. 3.6), der die für die Analyse *in vivo* aufwendigen Kreuzungsexperimente überflüssig machte.

Generell erweist es sich als sehr schwierig, geeignete Zellkultursysteme zur Analyse der Prozesse im Knorpelapparat zu finden. Primäre artikuläre Chondrozyten sind ungeeignet, da sie im Rahmen der Kultivierung ihren Expressionsphänotyp als auch ihre Morphologie verändern. Daher war die Etablierung entsprechender Zellkulturmodelle unerlässlich. So wurden im Laufe der letzten Jahre mehrere Systeme etabliert, die den artikulären Chondrozyten Phänotyp imitierten und die wichtigsten Charakteristiken erhielten (Robbins *et al.*, 2000; Kokenyesi *et al.*, 2000; Saas *et al.*, 2004; Majumdar *et al.*, 2008). Bei der hier verwendeten humanen Chondrosarkom-Zelllinie SW1353 (#HTB-94<sup>TM</sup>) konnte gezeigt werden, dass ein Vergleich zu Primärchondrozyten möglich ist (Gebauer *et al.*, 2005). Diese Zelllinie entstammt aus einem Chondrosarkom des Types II und eignete sich aufgrund ihrer Herkunft aus Knorpelgewebe als Zellkulturmodell zur Verifizierung des Konstruktes. Neben der hohen Verdopplungsrate und der leichten Transfizierbarkeit hatte diese Linie noch den Vorteil, dass hier keine Matrixbildung stattfand, ganz im Gegensatz zu den ebenfalls sehr häufig für Experimente des Knorpel/Knochensystems verwendeten Rattenchondrosarkomzellen (Mukhopadhyay *et al.*, 1995).

Transiente Transfektionsexperimente an der humanen Chondrosarkom-Zelllinie SW1353 (#HTB-94<sup>TM</sup>) lieferten erste Hinweise auf die Regulierbarkeit des generierten, bifunktionalen Konstruktes. Sowohl auf RNA-, mittels RT-PCR und *Northern Blot* Analysen (Abb. 3.7), als auch auf Protein-Ebene mittels *Western Blot* (Abb. 3.8) konnte eine durch Doxyzyklin induzierbare *mAdamts5* Überexpression nachgewiesen werden. Zur endgültigen Bestätigung der induzierbaren Regulation von *mAdamts5* wurde im Rahmen der von mir überwachten Diplomarbeit von Frau Bona Linke ein dieses Projekt ergänzendes Zellkulturmodell entworfen. Frau Linke generierte eine stabile Zelllinie, bei der ebenfalls mittels des Tet-ON-Systems die Regulation als auch die Funktionalität der überexprimierten Aggrekanase

analysiert werden sollte. Sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene (Abb. 3.10) wurde eine stringent regulierbare mAdamts5-Expression nachgewiesen. Zur Überprüfung der Funktionalität war die exogene Zugabe von Aggrecan notwendig, da die verwendeten SW1353-Zellen nicht ausreichend Aggrecan exprimierten (Gebauer *et al.*, 2005). Nach Zugabe eines rekombinanten Aggrecansubstrates wurde gezeigt, dass nach Doxyzyklinapplikation die überexprimierte Aggrecanase fähig war, die wichtigste Aggrecanase-Schnittstelle (E<sup>373</sup>↓<sup>374</sup>A) zu nutzen und das rekombinante Aggrecan zu schneiden.

Durch das *in vitro*-Modell wurde die Funktionalität des Transgens demonstriert, da die induzierbar überexprimierte Aggrecanase mAdamts5 in der Lage war, Aggrecan an der entscheidenden Stelle zu spalten. Dieses System der induzierbaren Überexpression konnte im Mausmodell angewendet werden.

Weiterhin kann dieses Modell genutzt werden, um bereits bekannte, wie beispielsweise Pentosan polysulfat (Ghosh, 1999), Ciclosporin A (Little *et al.*, 2002), Diacerhein (Rintelen *et al.*, 2006; Fidelix *et al.*, 2006) oder auch Glukosamine (Reginster, 2007), aber auch neue Substanzen auf die Inhibition der Aggrecanolyse zu testen. Gleichzeitig wird in diesem Zusammenhang die Relevanz von mAdamts5 analysiert. Mit Hilfe dieses Modells können Inhibitoren getestet werden, bevor sie dann im Tiermodell oder auch als Ansatzpunkt für ein Therapiekonzept ihre Anwendung finden.

#### 4.1.2 Generierung und Analyse der transgenen Tiere

In den letzten Jahren wurden vielfältige Osteoarthrose-Tiermodelle entwickelt. Sie liefern grundlegende Informationen über die zelluläre und molekulare Basis der Osteoarthrose. Aufgrund der unvollständig geklärten Krankheitsursache gestaltet es sich nach wie vor äußerst schwierig, das optimale Tiermodell zu finden, welches einen direkten Vergleich zur humanen Osteoarthrose gewährleisten würde. Spontane Modelle können am besten das langsame Fortschreiten der Erkrankung imitieren, sind jedoch sehr kostspielig und variabel (Jallali *et al.*, 2005; Blaney *et al.*, 2005). Chirurgisch und enzymatisch induzierte Modelle wie beispielsweise die Menisektomie (Quasnichka *et al.*, 2005), das Knorpelrillen-Modell, bei dem Einkerbungen im Knorpel vorgenommen werden (Mastbergen *et al.*, 2006), oder auch die Injektion von Kollagenasen (Blom *et al.*, 2004) entwickeln schnelle Schäden am Knorpel. Diese sind jedoch eher für die Erforschung posttraumatischer Formen der Osteoarthrose geeignet. Durch Chemikalien verursachte Arthrosen entstehen relativ schnell, jedoch wird ihre Relevanz derzeit noch diskutiert (Fernihough *et al.*, 2004). Bei der Gabe von



Pharmazeutika bei den einzelnen Tiermodellen zeigte sich, dass es zu kontroversen Ergebnissen je nach Tiermodell kommen kann (Schwartz *et al.*, 1981, Kraus *et al.*, 2004) und dass verschiedene Modelle je nach Osteoarthrose-Ursache nötig sind. Genetisch modifizierte Mausmodelle stellen das beste Werkzeug dar, um die Funktion eines bestimmten Moleküls, entweder ausgeschaltet oder überexprimiert, in der Knorpelhomöostase und dem Pathogeneseprozess zu analysieren (Glasson *et al.*, 2005; Stanton *et al.*, 2005; Morko *et al.*, 2005; Wadhwa *et al.*, 2005; De Hooge *et al.*, 2005).

Bei der Simulierung einer Osteoarthrose im Tiermodell und im folgenden dessen Behandlung mit Therapeutika muss daher darauf geachtet werden, welche Ursache der zu simulierenden Osteoarthrose zugrunde liegt und dementsprechend welches *in vivo* Modell verwendet wird. Die mittels des Tet-System induzierbare Simulation einer Osteoarthrosesituation bietet zusätzlich zu den Optionen, die auch andere Modelle liefern, eine weitere Möglichkeit. Initial kann durch kurze Doxyzyklingabe eine Schädigung oder auch nur eine Verminderung zum Beispiel der Glykosaminoglykane verursacht und im Anschluss der Heilungsprozess der simulierten frühen Arthrose analysiert werden.

Nach der Fertigstellung des bifunktionalen Konstruktes und der Verifizierung mittels transienten und stabilen Transfektionsexperimenten an SW1353-Zellen erfolgte die Generierung des *in vivo* Modells. Exogen wurde über das Tet-System *mAdamts5* gewebsspezifisch überexprimiert. Dadurch konnte die Rolle eines einzelnen Enzymes in der Osteoarthrose-Entstehung analysiert werden. Auch wurden hier absichtlich keine externen Reize wie beispielsweise mechanische Destabilisierungen oder das Spritzen diverser Agenzien verwendet, um eine Korrelation zwischen *mAdamts5* Überexpression und Knorpelschädigung eindeutig definieren zu können. Weiterhin sollte auch die Situation der humanen Arthrose, bei der ebenfalls nicht zwangsläufig eine Verletzung als Ursache vorliegt, besser wiedergespiegelt werden.

Durch die Mikroinjektion in den paternalen Vorkern erfolgt die Integration in aller Regel im Einzellstadium und der Ort der Integration und die Kopienzahl ist für jede *Founder*-Maus unterschiedlich. Jedes Tier begründet eine eigene Linie (Gordon *et al.*, 1983; Palmiter *et al.*, 1985). Nach der Pronukleusinjektion in FVB/N-Mäuse wurden aus 22 potentiell transgenen Tieren vier *Founder*-Linien über PCR identifiziert, die das Transgen ins Genom integriert hatten (Abb 3.11B). Diese wurden im Folgenden mit pCol2A5 Linie A bis Linie D bezeichnet. Die Anzahl der positiv transgenen Tiere entsprach in etwa den Erwartungen bei einer Mikroinjektion. Generell überleben 65% der fertilisierten Eier die Injektionsprozedur,

davon wiederum entwickeln sich zirka 25% zu lebensfähigen Nachkommen. Ein Viertel davon trägt das Transgen (Dingermann, 1999).

Um zu überprüfen, ob die *Founder*-Tiere das bifunktionale Konstrukt an die Filialgenerationen weitergeben, wurden Verpaarungen mit Wildtyp-FVB/N-Mäusen durchgeführt. Über die Expression des *rtTA2<sup>S</sup>-M2* wurde gezeigt, dass alle vier Linien das Transgen an die Nachkommen weitergeben und dass das Verhältnis transgene zu Wildtyp-Tiere den Erwartungen entsprach (Abb. 3.11C). Im Folgenden wurde die Induzierbarkeit der Linien getestet, auch vor dem Hintergrund des Fehlens von Isolatorsequenzen. Ohne einen Isolator ist das einzubringende Transgen durch die ungerichtete Integration ins Genom ungeschützt vor Positionseffekten und kann durch benachbarte *Enhancer*- und/oder *Silencer*-Elemente beeinträchtigt werden. Oft werden Matrix-Anheftungsregionen (MAR) des menschlichen  $\beta$ -Globin-Genes verwendet. Solche Elemente gewährleisten trotz eines nicht komplett zu unterbindenden Einflusses benachbarter Elemente dennoch in aller Regel eine wesentlich verbesserte positionsunabhängige, regulierbare Genexpression (Fleenor *et al.*, 1993; Rival-Gervier *et al.*, 2003). Aber auch durch ungünstige Chromatinstrukturen oder Methylierungsmuster kann die transgene Expression verhindert sein (Schenkel, 1995). Die Kontrolle auf transkriptioneller Ebene war daher essentiell. Ein ungünstiger Integrationsort könnte sowohl die Expression des Zielgenes *mAdamts5* als auch die des *rtTA2<sup>S</sup>-M2* beeinträchtigen. Die veränderte Transkription des *rtTA2<sup>S</sup>-M2* wiederum würde unweigerlich auf die Expression des Zielgenes Einfluss nehmen.

Nach Induktion mit 4 mg/ml Doxyzyklin wurde aus dem Knochen transgener, heterozygoter als auch homozygoter, Tiere RNA isoliert und über RT-PCR-Analysen die Regulation über den Induktor Doxyzyklin untersucht. Als Kontrolle wurden Tiere ohne Induktion mitgeführt. Bei zwei der vier Linien (pCol2A5-A und pCol2A5-D) wurde im Knochen keine Expression des Zielgenes nachgewiesen, eine Linie (pCol2A5-B) zeigte eine konstitutive, Doxyzyklinunabhängige Expression des Zielgenes *mAdamts5* (Abb. 3.13, 3.14). Möglicherweise wurde bei diesen drei Linien durch Positionseffekte die Transkription des *Responders* bzw. beider des Effektors und des *Responders* beeinträchtigt. Entweder durch die ungünstige Integration in die Nähe eines *Silencers* bzw. *Enhancers* oder der Integrationsort selbst beeinträchtigte die Transkription der beiden Gene. Aufgrund der fehlenden oder konstitutiven Expression des Zielgenes waren diese drei Linien ungeeignet zur Generierung eines Osteoarthrose-Modells.

Bei Linie C konnte erfreulicherweise bei gleichbleibender Effektortranskription eine induzierbare transgene *mAdamts5*-Expression nachgewiesen werden (Abb. 3.14). Hier wurde eine leichte basale Grundaktivität auch im nichtinduzierten Zustand detektiert, was ebenfalls möglicherweise auf ungünstige Integration schließen lassen könnte. Dennoch war bei dieser Linie eindeutig eine induzierbare Regulation des Zielgenes nachweisbar. Weiterhin fiel bei Linie C auf, dass hier nach mehreren Rückkreuzungen bei gleichbleibender Wurfgröße und einer geschlechtsunabhängigen Weitergabe des Transgens, keine homozygoten Tiere generiert werden konnten. Eventuell fand bei der Transgenintegration eine Insertionsmutagenese, eine funktionelle Beeinträchtigung eines wichtigen Genes, statt und die Tiere waren im homozygoten Status nicht lebensfähig. Durch die Homozygotie käme es zu einem Komplettausfall der Funktion und die Tiere würden vor der Geburt bereits sterben. Jedoch ergaben die Zahlenverhältnisse der Genotypisierungen keinerlei Hinweise auf diese mögliche Art der Erklärung. Bis zum Abschluss der Arbeit war es nicht möglich homozygote Tiere der Linie C zu generieren.

Von den vier *Founder*-Linien wurde bei heterozygoten Tieren der Linie C eine Regulation des Transgens mittels Doxyzyklin gezeigt. Alle weiteren Charakterisierungsexperimente erfolgten daher mit dieser Linie.

#### 4.1.2.1 Überprüfung der Knorpelspezifität

Nachdem eine induzierbare Überexpression der Linie C gezeigt werden konnte, wurde im Folgenden die Knorpelspezifität der Aggrekanase embryonal und im adulten Tier analysiert. Zhou und Kollegen (1998) zeigten, dass embryonal der verwendete Promotor, der alle relevanten Elemente beinhaltet, das Transgen in ruhenden, proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten exprimiert. Im adulten Tier sollte sich der zusammengesetzte Promotor ebenso wie der endogene verhalten.

Zum Nachweis dieser Knorpelspezifität und auch zur weiteren Bestätigung der Induzierbarkeit wurden *Whole mount in situ* Hybridisierungen (WISH) durchgeführt. Nach der Verpaarung von 6-8 Wochen alten Tieren wurden die Weibchen am nächsten Tag auf einen Vaginalpfropf untersucht und die Hälfte der schwangeren Tiere sofort mit 4 mg/ml Doxyzyklin induziert. Die andere Hälfte wurde als eine der Kontrollen ohne Doxyzyklinapplikation mitgeführt. Nach Präparation und Fixierung der Embryonen an Entwicklungstag E 13,5 *dpc* wurde mit DIG-markierten Sonden sowohl die Expression des *rtTA2<sup>S</sup>-M2* als auch die des *mAdamts5*-Gens nachgewiesen (Abb. 3.15). Als Kontrollsonde diente ein Teil des murinen Kollagen Typ II alpha I-Transkriptes. Die *mAdamts5*-Sonde

konnte aufgrund der hohen Sequenzüberlappung von transgenem und endogenem Transkript nicht spezifisch nur für das Transgen generiert werden. Jedoch aufgrund des verwendeten Kollagen Typ II-Promotors war es möglich, beide Transkripte voneinander zu unterscheiden. Das endogene *mAdamts5*-Transkript zeigt bis Entwicklungstag E 12,5 *dpc* eine spezifische Expression in den sich entwickelnden Extremitäten, an Entwicklungstag E 13,5 *dpc* ist die Expression allerdings nur noch auf die distalen Fingerzwischenräume beschränkt (Diplomarbeit Isabel Hess, 2002). Das transgene *mAdamts5*-Gen dagegen wird an diesem Entwicklungstag durch den Kollagen Typ II-Promotor weiterhin Chondrozyten-spezifisch exprimiert, d.h. unter anderem in den knorpeligen Anlagen sich entwickelnder Extremitätenknochen.

Durch den gewebsspezifischen Promotor konnten die beiden Transkripte *rtTA2<sup>S</sup>-M2* und *mAdamts5* in den sich entwickelnden Extremitäten nachgewiesen werden, wie erwartet der Effektor *rtTA2<sup>S</sup>-M2* Doxyzyklin unabhängig und das transgene Zielgen *mAdamts5* nur nach Induktion mit Doxyzyklin. Durch die Positiv- als auch Negativkontrolle konnte ein Fehler bei der Hybridisierung selbst ausgeschlossen werden. Im Vergleich zur Positivkontrolle fiel auf, dass die spezifischen Signale schwächer waren. Eventuell lag der Grund hierfür bei der Sondenherstellung bzw. -Markierung oder bei der Auswahl der markierten Bereiche. Um diese Fehlermöglichkeit auszuschließen, sollte die Hybridisierung mit neuen Sonden wiederholt werden. Unter Umständen könnte aber auch der hier verwendete Promotor nicht stark genug sein, um eine entsprechende Expression von Effektor- und *Responder*transkript zu gewährleisten. Um dieser Vermutung nachzugehen, müssten neue transgene Tiere mit einem anderen zirka 6 kbp großen Kollagen Typ II Promotor generiert und charakterisiert werden. Dieser größere Promotor besteht aus einem 3 kbp großen Fragment des Kollagen Typ II Promotors, dem ersten Exon mit einem mutierten Initiationskodon und 3,02 kbp des ersten Introns (Ovchinnikov *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 1995). So könnte überprüft werden, ob die spezifische, jedoch schwache Expression des *rtTA2<sup>S</sup>-M2*- und *mAdamts5*-Genes auf den verwendeten 3 kbp großen Kollagen Typ II Promotor zurückzuführen ist. Die Generierung und Charakterisierung dieser neuen transgenen Tiere war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchführbar.

Zusammenfassend konnte mit der Whole mount in situ Hybridisierung (WISH) an Entwicklungstag E 13,5 *dpc* gezeigt werden, dass das transgene *mAdamts5*-Gen nach Doxyzyklininduktion gewebsspezifisch exprimiert wurde.

Darüber hinaus wurde über Verpaarungen mit der Reportermauslinie *TetO<sub>bi</sub>-LacZ/GFP* (Krestel *et al.*, 2001) die gewebsspezifische Regulation des Effektortranskriptes und

dementsprechend auch die des zu analysierenden Zielgenes nachgewiesen. Nach Verpaarung und Induktion wurden Embryonen der Entwicklungsstadien E 14,5 *dpc*, E 16,5 *dpc* und E 18,5 *dpc* präpariert, genotypisiert und doppeltransgene Tiere mit X-Gal gefärbt. Wie im Folgenden erläutert, konnte durch die Visualisierung der LacZ-Expression am kompletten Embryo und auch an histologischen Präparaten Rückschlüsse auf die Regulation und Spezifität des Zielgenes gezogen werden. Bei allen drei untersuchten Entwicklungsstadien wurde erwartungsgemäß eine stringent induzierbare und gewebspezifische Expression des LacZ-Genes und dementsprechend auch des Zielgenes nachgewiesen (Abb. 3.16A-C). Alle knorpeligen Anlagen der Röhrenknochen (*Ossa longa*), der Wirbelkörper (*Corpus vertebrae*), der Rippen (*Costae*) und dem Schulterblatt (*Scapula*) waren angefärbt. Weiterhin konnte an den Entwicklungsstadien E 16,5 *dpc* und E 18,5 *dpc* eine Expression in den basooccipitalen und exooccipitalen Regionen des Hinterkopfes (*Os occipitale*), des Nasenknorpels (*Cartilagine nasi*) und bei Entwicklungsstadium E 18,5 *dpc* auch im Unterkiefer (*Mandibula*) nachgewiesen werden. Andere Bereiche wie beispielsweise das Gehirn, die Haut, die Organe oder weitere nicht-knorpelige Gewebe zeigten keinerlei Färbung. Dieses spezifische Expressionsmuster an den Entwicklungsstadien E 14,5 *dpc*, E 16,5 *dpc* und E 18,5 *dpc* deckte sich mit den bereits beschriebenen Experimenten bezüglich des verwendeten 3 kbp großen Kollagen Typ II Promotors (Zhou *et al.*, 1995 und 1998).

Bei einem Vergleich beider Nachweismethoden zur embryonalen Knorpelspezifität fiel auf, dass die WISH auf eine schwächere Expression des Zielgenes hindeutete, während bei dem Nachweis über die Verpaarung mit der Reportermaus eine starke Expression zumindest des LacZ-Genes aber auch daraus folgernd des Transgens suggeriert wurde. Da bei der Verpaarung mit der Reportermaus und der anschließenden Nachweismethodik der verwendete Farbstoff X-Gal in den spezifischen Geweben akkumuliert, wäre es möglich, dass trotz augenscheinlich starker Expression die Transkription des transgenen *mAdams5* schwach sein könnte. Dies würde dann auch mit den Ergebnissen der WISH übereinstimmen, bei der nur die Expression des spezifischen Transkriptes nachgewiesen wurde.

Trotz der schwächeren Expression bei der WISH kann jedoch nichts über die Funktionalität des Enzymes ausgesagt werden. Stimulationsstudien *in vitro* als auch *in vivo* zeigten, dass posttranskriptionelle Regulationsmechanismen die Aggrecanase-Aktivität verändern können (Vankemmelbeke *et al.*, 2001; Nagase *et al.*, 2003; Porter *et al.*, 2005; Bondeson *et al.*, 2007; East *et al.*, 2007b). Flannery und Kollegen konnten nachweisen, dass IL-1, TNF- $\alpha$  oder auch Retinsäure die Enzym-Aktivität steigern ohne einen Einfluss auf die Transkription des Genes zu haben (Flannery *et al.*, 1999). Andere Studien allerdings zeigten eine positive Korrelation

zwischen IL-1 und der *mAdamts5*-Expression auf transkriptioneller Ebene (Little *et al.*, 2002; Koshy *et al.*, 2002; Stanton *et al.*, 2005). Diese Variabilität der Ergebnisse deutet darauf hin, dass möglicherweise die regulatorischen Mechanismen der Aggrekanasen von der Spezies, dem Alter des Gewebes und den Kulturbedingungen der isolierten Zellen abhängig sind. Weiterhin spielt der Stimulus selbst und die Stabilität der mRNA eine wichtige Rolle (Arner, 2002; Nagase *et al.*, 2003). Es konnte bei augenscheinlich schwacher *mAdamts5*-Genexpression durch eventuelle posttranskriptionelle Regulationsmechanismen keine Aussage darüber getroffen werden, wie sich diese auf Proteinebene auswirkte und wie funktional das Protein letztendlich war.

Nachdem embryonal eine stringent induzierbare und gewebsspezifische Regulation nachgewiesen wurde, erfolgte im Rahmen der Analyse zur Knorpelspezifität auch die Untersuchung der Organe adulter Tiere. Gleich alte Tiere wurden mit 4 mg/ml Doxyzyklin induziert, Kontrolltiere erhielten normales Trinkwasser. Nach Präparation der RNA verschiedener Organe und reverser Transkription wurde die Expression des *rtTA2<sup>S</sup>-M2*- und des transgenen *mAdamts5*-Genes untersucht (Tab. 3.1). Um eventuell entstandene kompensatorische Effekte aufzudecken, wurde ebenfalls das endogene Transkript analysiert. Das Expressionsmuster des *rtTA2<sup>S</sup>-M2* deckte sich zum überwiegenden Teil mit dem Expressionsmuster des Kollagen Typ II-alpha 1 (*Col2A1*)-Transkriptes bei NCBI („US National Center for Biotechnology Information“). Alle untersuchten Gewebe zeigten in unterschiedlicher Stärke eine Expression des Effektors. Lunge, Haut und Leber wiesen eine sehr schwache Transkription auf, bei Niere, Herz, Milz und Gehirn war diese stärker ausgeprägt. Wie erwartet war auch eine starke, Doxyzyklin-unabhängige Expression im Knochen feststellbar. Das Kollagen Typ II-alpha 1 (*Col2A1*)-Transkript wird adult ebenfalls in Niere, Herz und Gehirn exprimiert, Leber und Lunge weisen eine sehr schwache bis keine Expression auf. Durch diese überwiegende Übereinstimmung der Expressionsmuster, und auch durch die embryonal nachgewiesene Knorpelspezifität, konnte davon ausgegangen werden, dass der verwendete, zusammengesetzte Kollagen Typ II-Promotor funktional war. Durch das Expressionsmuster des Effektors wurde auch das des transgenen *mAdamts5*-Genes bestimmt. Hier war neben der zu erwartenden starken, Doxyzyklin-abhängigen Regulation im Knochen eine weit geringere in Niere, Herz, Lunge und Milz detektierbar. Auffällig war eine starke und Doxyzyklin-unabhängige Expression des transgenen *mAdamts5*-Genes im Gehirn. Durch den verwendeten Kollagen Typ II-Promotor, der adult ebenfalls im Gehirn aktiv war und den *rtTA2<sup>S</sup>-M2* exprimierte, dürfte hier nur nach Doxyzyklininduktion eine Expression

des Transgens nachweisbar sein. Unter Umständen könnte hier aufgrund der fehlenden Isolatoren ein gehirnspezifischer *Enhancer* in der Nähe des Integrationsortes Grund für die Doxyzyklin-unabhängige Expression sein. Um dies zu testen, wurden die drei anderen, nicht weiter bearbeiteten Linien A, B und D auf ihre gehirnspezifische Expression des *rtTA2<sup>S</sup>-M2*- und des transgenen *mAdamts5*-Genes untersucht. Linie A und B wiesen eine gleich starke, Linie D keine Transkription beider untersuchter Gene auf. Ein gehirnspezifischer *Enhancer* bei Linie C als Grund für die Doxyzyklin-unabhängige Expression war insofern unwahrscheinlich, da auch Linie A und B diese Doxyzyklin-unabhängige Expression im Gehirn zeigten und bei diesen beiden Linien der Integrationsort ein ganz anderer war. Wahrscheinlich wurde das transgene *mAdamts5*-Gen durch den verwendeten Kollagen Typ II-Promotor induktionsunabhängig im Gehirn exprimiert und bei Linie D wurde aufgrund von Positionseffekten bei der Transgenese das komplette Konstrukt stillgelegt. Die Klärung der Doxyzyklin-unabhängigen Expression des transgenen *mAdamts5*-Genes im Gehirn war bis zum Abschluss der Arbeit nicht mehr möglich.

Ein weiteres interessantes Phänomen zeigte sich bei den Organen Niere, Herz und Milz. Nach Induktion mit Doxyzyklin wurde die Expression des endogenen *mAdamts5*-Transkriptes herunter reguliert, während gleichzeitig die transgene *mAdamts5*-Expression anstieg. Vermutlich handelt es sich in diesen Organen um einen kompensatorischen Effekt. Dieses müsste noch eingehender untersucht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass embryonal das transgene *mAdamts5*-Gen nur nach Doxyzyklininduktion gewebsspezifisch exprimiert wurde. Im adulten Tier deckte sich das Expressionsmuster des hier verwendeten, zusammengesetzten Kollagen Typ II-Promotors mit dem endogenen, sodass von einer Funktionalität des Promotors ausgegangen wurde. Auch im adulten Tier wurde im Knochen die Regulation des Transgens mittels Doxyzyklin nachgewiesen.

#### **4.1.3 Funktionalität der transgenen Aggrekanase**

Nachdem bei der Linie C die exogen induzierbare Überexpression des Transgens gezeigt werden konnte, wurde nun im Folgenden überprüft, ob die Aggrekanase unter den gegebenen Bedingungen funktional war. Durch die Überexpression sollte verstärkt Aggrekan abgebaut werden und dies zu einer Osteoarthritis ähnlichen Situation in der Maus führen. *Adamts5* gehört zur Familie der ADAMTS (*a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs*) und besitzt neben weiteren wichtigen Domänen eine katalytische Metalloprotease-Domäne. Diverse Studien zeigten, dass Tetrazyklin beziehungsweise dessen Analogon

Doxyzyklin über diese Metalloprotease-Domäne bei Matrix Metalloproteasen einen inhibitorischen Effekt ausübt (Golub *et al.*, 1991; Ramamurthy *et al.*, 1993; Greenwald *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2005). Für Aggrekanasen lagen diesbezüglich keine Daten vor. Da diese jedoch ebenfalls eine Metalloprotease-Domäne besitzen, musste in den folgenden funktionalen Analysen mit einer Inhibition durch das Antibiotikum Doxyzyklin gerechnet werden. Um den potentiell inhibitorischen Effekt möglichst gering zu halten, wurden verschiedene Doxyzyklin-Konzentrationen und auch Induktionszeiten in den folgenden Experimenten ausgetestet.

#### 4.1.3.1 Histologische Analyse verschieden induzierter Tiere

Mit der Vermutung, dass auch bei Aggrekanasen eine Inhibition von Doxyzyklin möglich war, wurden die Tiere mit unterschiedlichen Doxyzyklinkonzentrationen induziert. Da die bereits beschriebenen  $IC_{50}$ -Werte, die Werte, bei denen das Enzym um die Hälfte inhibiert wird, bei Matrix Metalloproteasen (MMP) im  $\mu$ M-Bereich lagen (Ramamurthy *et al.* 1993; Greenwald *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2005), wurden zusätzlich zu der bereits verwendeten Konzentration von 4 mg/ml noch vier weitere Konzentrationen ausgetestet (1 mg/ml; 25  $\mu$ g/ml; 12,5  $\mu$ g/ml; 0,5  $\mu$ g/ml). Um auszuschließen, dass die Induktionszeit von vier Wochen nicht ausreichend für einen sichtbaren Aggrekanabbau war, wurde außerdem über einen Zeitraum von drei und sechs Monaten induziert. Gleich alte Tiere wurden nach den verschiedenen Induktionen abgetötet und die Kniegelenke histologisch analysiert.

Um einen möglichen Aggrekanabbau nach Doxyzyklininduktion darstellen zu können, wurden die Präparate mit den kationischen Farbstoffen Toluidin- bzw. Alcianblau angefärbt. Diese lagern sich an die polyanionischen Glykosaminoglykan-Seitenketten des Aggrekans an. Je mehr Enzym exprimiert wird, desto mehr Aggrekan inklusive der polyanionischen Seitenketten müsste abgebaut werden und desto geringer sollte die Farbeintensität sein. Bei einer Induktion mit der höchsten Doxyzyklinkonzentration von 4 mg/ml (Abb. 3.17), die eine vollständig Inhibition von Matrix Metalloproteasen bewirken sollte, konnte auch bei den untersuchten Tieren keine Veränderung der Knorpelfärbung festgestellt werden. Dies deckte sich mit der Annahme, dass auch Aggrekanasen durch Doxyzyklin inhibiert werden. Bei den beiden Konzentrationen 1 mg/ml (Abb. 3.18) und 25  $\mu$ g/ml (Abb. 3.19), der Konzentration, welcher dem  $IC_{50}$ -Wert von MMPs in Osteoblasten entspricht (Ramamurthy *et al.*, 1993), konnten verminderte Knorpelfärbungen detektiert werden. Dies ließ auf einen stärkeren Aggrekanabbau schließen. Knorpelerosionen, die bei einer Erweichung des Gewebes



aufgrund gesteigerten Aggrekanabbaus die Folge sind, waren nicht zu beobachten. Die verwendete Konzentration von 12,5 µg/ml (entspricht 25 µM) (Abb. 3.20), bei der Ramamurthy und Kollegen keinen inhibitorischen Effekt mehr beobachten konnten, und die geringste Konzentration 0,5 µg/ml (Abb. 3.21) zeigten keine Veränderung in der Knorpelfärbung. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass durch diese beiden Konzentrationen (12,5 µg/ml und 0,5 µg/ml) zwar kein inhibitorischer Effekt mehr verursacht wurde, jedoch die Überexpression der transgenen Aggrekanase nicht ausreichend war, um einen sichtbaren Aggrekanabbau hervorzurufen.

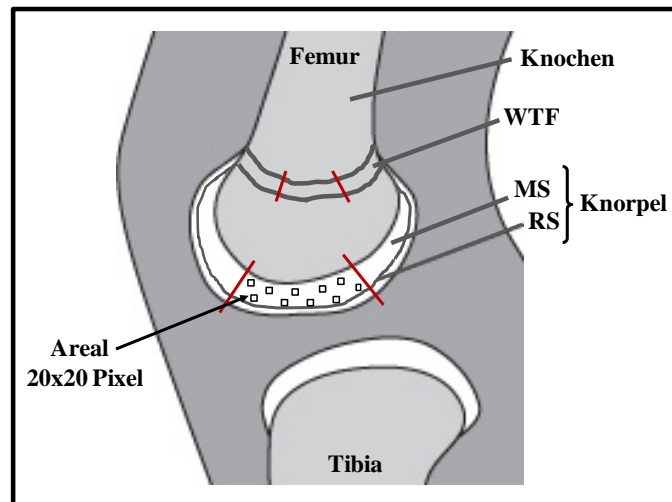
Bei der Langzeitinduktion von sechs Monaten traten unerwartete Schwierigkeiten auf (Abb. 3.23). Die präparierten Kniegelenke, beziehungsweise der umliegende Knochen musste, um ihn schneiden zu können, 6-7 Monate entkalkt werden. Dies beeinträchtigte wahrscheinlich die Färbbarkeit des Gewebes mit Alcianblau. Daher konnten nur die mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Präparate zur Analyse herangezogen werden. Die ausgewerteten Schnitte wiesen Risse im Knorpelgewebe auf. Jedoch schien es sich hier um Präparationsartefakte zu handeln, da auch Wildtyp-Tiere ohne Induktion solche Veränderungen zeigten. Die Langzeitinduktion über sechs Monate wurde aufgrund der theoretischen Annahme, dass auch Aggrekanasen bei einem  $IC_{50}$ -Wert von 25 µg/ml um die Hälfte inhibiert werden, mit den Konzentrationen 25 µg/ml und 12,5 µg/ml gleichzeitig mit den anderen Versuchen angesetzt. Nach der Dosisoptimierung nach 4 Wochen bzw. 3 Monaten stellte sich jedoch heraus, dass das optimale Konzentrationsfenster zwischen 1 mg/ml und 25 µg/ml lag. Da dieser Langzeitversuch insgesamt über ein Jahr dauerte, war es nicht mehr möglich, diesen mit den optimalen Konzentrationen im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu wiederholen. Eventuell sollte bei einem erneuten Versuch auch eine andere Methodik gewählt werden, bei der der Knochen nicht entkalkt werden muss. Beispielsweise muss bei der Einbettung in Methylmethacrylat der Knochen nicht entkalkt werden und kann im Anschluss immer noch mit Toluidinblau angefärbt werden (Dissertation Markus Peter Regauer, 2009).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den beiden Konzentrationen 1 mg/ml und 25 µg/ml über 4 Wochen und drei Monaten leichte Veränderungen in der Knorpelfärbung, also im Aggrekangehalt, festgestellt werden konnten. Geringere Konzentrationen, die keinen oder einen minimalen inhibitorischen Effekt auf das Enzym ausüben, zeigten keine Knorpelveränderungen, wahrscheinlich aufgrund einer zu geringen Überexpression der Aggrekanase. Obwohl makroskopisch keine Veränderungen dokumentiert werden konnten, wäre dennoch zu überprüfen, ob unter Umständen ein verändertes Expressionsprofil der

Chondrozyten vorliegt, ob beispielsweise Reparatur-Gene angeschaltet werden. In transgenen Mausmodellen, in denen zum Beispiel die Aggrekanase-Schnittstelle E<sup>373</sup>↓<sup>374</sup>A blockiert wurde, konnte im Antigen-induzierten Arthritismodell (AIA) von homozygot transgenen Tieren eine gesteigerte Matrixreparatur nachgewiesen werden (Little *et al.*, 2007).

Bei den histologischen Experimenten war zu bedenken, dass es sich hierbei um eine semiquantitative Analysemethode handelte und dass nur große Unterschiede in der Knorpelfärbung und eindeutige Risse wahrgenommen werden konnten. Weiterhin konnten auch Präparationsartefakte nicht komplett ausgeschlossen werden, allein bei einer dreimonatigen Induktion musste der Knochen länger entkalkt werden und dies könnte bereits Auswirkungen auf die Färbbarkeit gehabt haben. Um solche Unsicherheiten auszuschließen, müssten wesentlich mehr Tiere und mehr Doxyzyklin-Konzentrationen zwischen 1 mg/ml und 25 µg/ml ausgetestet werden.

Um auch geringe Unterschiede in der Knorpelfärbung detektieren zu können, wurde eine quantitative Auswertung der Daten mittels des Programmes „AnalySIS 3.0“ der Firma Soft Imaging Systems durchgeführt. Die Blauintensität der Färbungen wurde über Pixelbestimmung gleich großer Areale in Form von Zahlenwerten dokumentiert, wobei 0 schwarz und 255 weiß bedeutete. Anschließend wurde der Mittelwert der Pixel pro Areal berechnet. Um die Intensität der Knorpelfärbung verschiedener Tiere miteinander vergleichen zu können, wurde angenommen, dass die Knorpelfärbung der Wachstumsfuge bei jedem Tier annähernd gleich ist. Durch die Bestimmung der Blauintensität der Wachstumsfuge konnten die einzelnen Aufnahmen damit „normiert“ und miteinander verglichen werden. Um eine Aussage über Unterschiede in der Farbintensität treffen zu können, wurden die Aufnahmen statistisch ausgewertet. Dabei wurde sowohl von Femur als auch von Tibia die Wachstumsfuge und auch Knorpelmittel- und Knorpelrandschicht in drei gleich große Bereiche aufgeteilt und in jeweils einem Bereich 10 Areale bestimmt (Abb. 4.1). So lagen pro Tier 180 berechnete Areale vor.



**Abb. 4.1: Schematische Darstellung der statistischen Auswertung**

Die Wachstumsfuge (WTF) und die Knorpelmittel (MS)- und -Randschicht (RS) von Femur als auch Tibia wurden in drei gleich große Bereiche unterteilt (rote Striche). Gleichmäßig verteilt wurden innerhalb der Bereiche jeweils 10 Areale mit 20x20 Pixel mittels des „AnalySIS 3.0“-Programmes untersucht. Durch die Bestimmung der Blauintensität der Wachstumsfuge können die einzelnen Aufnahmen normiert und somit verglichen werden.

Um eine sichere wissenschaftliche Aussage treffen zu können, müssten mindestens 10 Tiere pro Ansatz (d.h. 3-4 verschiedene, weitere Konzentrationen mit jeweils 2-3 unterschiedlichen Induktionszeiten) ausgewertet werden. Dies würde die Auswertung von 60-120 Tieren bedeuten, wovon bei jedem Tier 180 Werte bestimmt werden müssten. Neben den eingeschränkten Möglichkeiten im Tierstall war es auch aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes und der zeitlichen Begrenzung nicht mehr möglich, bis zum Abschluss der Arbeit diese quantitative Analyse komplett durchzuführen.

Prinzipiell stellte sich die Frage, ob und wie der inhibitorische Effekt minimiert oder ganz ausgeschaltet werden könnte. Zum einen bestünde die Möglichkeit im Rahmen des Induktionssystems die Tet-OFF-Variante zu wählen, bei der nach Entzug des Induktors das Zielgen exprimiert wird. Somit könnte die inhibitorische Wirkung über Doxzyklin komplett ausgeschaltet werden. Allerdings wird aus kinetischen Gründen das Tet-ON-System bevorzugt verwendet (Kistner *et al.*, 1996; Urlinger *et al.*, 2000). Würde die Induktion über den tTA (Tet-OFF-System) erfolgen, würde nach Anschalten des Systems, also nach Entzug des Induktors, dieser durch seine Halbwertszeit noch im Organismus verbleiben (Kistner *et*

*al.*, 1996). Somit könnte keine klare Aussage darüber getroffen werden, ab welchem Zeitpunkt die Überexpression des Transgens in vollem Umfang erfolgt. Eine weitere Möglichkeit den inhibitorischen Effekt zu minimieren, könnte die Gabe von Zink darstellen. Golub und Kollegen konnten 1991 bei Matrix Metalloproteasen zeigen, dass die inhibitorische Wirkung von Tetrazyklin bzw. dessen Analogon Doxyzyklin durch die Bindung an das zentrale Metall-Ion Zink erfolgt. Durch Gabe dieses Metallions in  $\mu\text{M}$ -Konzentrationen war es möglich, die Blockierung der Aktivität zu minimieren (Golub *et al.*, 1991). Für Aggrekanasen, die ebenfalls Zink als zentrales Metallion besitzen, wäre eine ähnliche Wirkung denkbar. Zink ist ein essentielles Spurenelement und spielt eine wichtige Rolle in zahlreichen metabolischen Prozessen und wird auch für das normale Knochenwachstum benötigt. Dimai und Kollegen konnten 1998 im Rahmen einer Studie zeigen, dass erwachsene Mäuse täglich zirka 5 g Futter und 6 ml Wasser zu sich nehmen, sodass über diese Annahme mittels verschiedener Zinkkonzentrationen im Futter getestet werden könnte, in wie weit sich die inhibierende Wirkung von Doxyzyklin minimieren ließe.

#### 4.1.3.2 Veränderungen im Glykosaminoglykan-Gehalt induzierter Tiere

Über die histologischen Analysen stellte sich heraus, dass eine Induktion mit 1 mg/ml und 25  $\mu\text{g/ml}$  den größten Effekt auf den Proteoglykangehalt hatte. Da jedoch makroskopisch nur ungefähre Angaben gemacht werden konnten, wurde mit Hilfe des Dimethylmethylenblau-Assay's (DMMB-Assay) quantitativ der Gehalt der Glykosaminoglykane, die durch Spaltung der Aggrekanase ins umliegende Kompartiment abgegeben werden, bestimmt. Der Farbstoff bildet einen Komplex mit den Glykosaminoglykanen (GAG) und demzufolge kommt es zu einer metachromatischen Verschiebung der Absorption, die im Photometer gemessen werden kann (Farndale, 1986). Aggrekan trägt zwischen der zweiten und dritten globulären Domäne zahlreiche polysulfatierte GAG's wie das Chondroitin- und Keratansulfat. Durch die Aggrekanase wird das Aggrekan an der Stelle E<sup>373</sup>↓<sup>374</sup>A gespalten, was die Freisetzung der GAG zur Folge hat. Über die Messung der abgegebenen GAG im Verhältnis zum Gesamtgehalt war es somit möglich, eine Aussage darüber zu treffen, ob durch die Überexpression der Aggrekanase mittels Doxyzyklinapplikation vermehrt Aggrekan gespalten wird und dies zu einer verstärkten Freisetzung der GAG führt.

Gleich alte Tiere wurden mit den beiden Konzentrationen 1 mg/ml und 25  $\mu\text{g/ml}$  über drei Monate induziert und anschließend die Oberschenkelhalsköpfe und die knorpeligen Anteile der Rippen präpariert und in Kultur genommen. Über *Western Blot* Analyse konnte in den Primärkulturen bei 1 mg/ml Doxyzyklin Induktion gezeigt werden, dass stringent regulierbar

die aktive Form von mAdamts5 ins Medium sezerniert wurde (Abb. 3.24). Weiterhin konnte noch eine Bande bei ca. 90 kDa detektiert werden, die die katalytische Domäne als auch die C-terminale Region enthält und eine weitere Form des Zymogens darstellt (Powell *et al.*, 2007). Bei der zweiten Konzentration (25 µg/ml) war keine über den *Western Blot* detektierbare Überexpression feststellbar, möglicherweise war die Menge nicht ausreichend um mit dieser Methode nachgewiesen zu werden.

Bei der Bestimmung des Gesamt-Glykosaminoglykan-Gehaltes zeigte sich, dass infolge der Überexpression der Aggrekanase über einen Zeitraum von drei Monaten eine Abnahme des Gehaltes von 15% im Vergleich zum induzierten Wildtyp-Tier eintrat (Abb. 3.25). Bei 1 mg/ml Doxyzyklin konnte das transgene mAdamts5 überexprimiert werden, das translatierte Protein war aktiv und in der Lage, Aggrekan zu spalten. In Anbetracht der histologischen Analysen, bei denen keine Knorpelerosionen detektiert werden konnten, scheint jedoch die 15%ige Abnahme des Gesamt-Glykosaminoglykan-Gehaltes nicht ausreichend zu sein, um schwerwiegende Konsequenzen für den Knorpel hervorzurufen.

Die Messung der Glykosaminoglykan-Abgabe (GAG-Abgabe) ins Medium ergab nach einer Induktion mit 25 µg/ml eine um 60% erhöhte, mit 1 mg/ml sogar eine um 120% erhöhte GAG-Abgabe im Vergleich zu einem induzierten Wildtyp-Tier (Abb. 3.26). Dies bekräftigte die Aussage, dass die überexprimierte Aggrekanase funktional war und Aggrekan spalten konnte. Aufgrund des inhibitorischen Effektes und des schmalen Konzentrationsbereiches, in dem eine minimale Inhibition aber eine maximale Induktion erfolgt, musste allerdings davon ausgegangen werden, dass die Menge der abgegebenen Glykosaminoglykane nicht ausreichend war. Der Knorpel bzw. dessen Elastizität wurde nicht dermaßen beeinträchtigt, dass das Gewebe erweichte und dementsprechend anfälliger für mechanische Belastungen war. Von Vorteil wäre sicherlich noch das Austesten weiterer Doxyzyklin-Konzentrationen. Eventuell sollte doch die Möglichkeit nicht außer Acht gelassen werden, durch einen exogenen Reiz eine initiale Schädigung zu simulieren, um den durch die überexprimierte Aggrekanase verursachten Aggrekanabbau zu fördern. Beispiele exogener Reize wären das entzündliche Modell der Antigen-induzierten Arthritis (AIA), bei dem intraartikulär methyliertes BSA injiziert wird um eine monoartikuläre Arthritis zu induzieren, oder auch das nichtentzündliche Modell der Destabilisierung des medialen Meniskus (DMM), bei dem das mediale meniskotibiale Ligament durchtrennt wird. Weiterhin könnte aber auch durch Gabe des Zytokins IL-1 $\alpha$  die Aktivität der Aggrekanase gesteigert werden (Stanton *et al.*, 2005; Glasson 2005).

Mit dem generierten Mausmodell konnte die Aggrekanase mAdamts5 induzierbar über das Tet-ON-System überexprimiert werden. Von den bisher ausgetesteten Doxyzyklin-Konzentrationen war die Aggrekanase mit 1 mg/ml Doxyzyklin funktional, d.h. es konnte ein verstärkter Aggrekanabbau nachgewiesen werden. Knorpelerosionen wurden jedoch nicht identifiziert. Durch die nachgewiesene Funktionalität der überexprimierten Aggrekanase mAdamts5 ohne ersichtliche Knorpelerosionen konnte zusätzlich gezeigt werden, dass der Knorpel in der Lage ist, einen 15%igen Verlust der Gesamt-Glykosaminoglykane zu tolerieren.

#### **4.1.4 Erhöhte Sterblichkeit transgener Tiere infolge Doxyzyklinapplikation**

Bei den Induktionsexperimenten mit 4 mg/ml Doxyzyklin direkt bei der Verpaarung fiel auf, dass alle transgenen Nachkommen nach Geburt verstarben, während Wildtyp-Tiere überlebten. Kontrollen zeigten, dass weder ein Einfluss auf die Wurfgröße vorlag noch dass das transgene Konstrukt selbst Auswirkungen auf die Sterblichkeit hatte. Die toten Neugeborenen wurden präpariert und sowohl die Organe als auch zur Repräsentation des Knorpel-Knochen-Apparates die Extremitäten und die Rippen histologisch untersucht. Die Organe zeigten makroskopisch keine Auffälligkeiten in Größe und Form und auch histologisch konnten keine offensichtlichen Veränderungen festgestellt werden. Die knorpeligen Anteile der Rippen und der Extremitäten wiesen dagegen eine Art Vakuolisierung auf. Die strukturelle Anordnung der Chondrozyten war verändert, beziehungsweise es waren gar keine Chondrozyten vorhanden. Im Falle der Rippen könnte dies zu Instabilität geführt haben, sodass die Tiere nach der Geburt nicht in der Lage waren, selbstständig zu atmen. Die Untersuchung toter, transgener Nachkommen, mit geringeren Doxyzyklinkonzentrationen (12,5 µg/ml und 25 µg/ml) induziert, zeigte allerdings weder im Extremitäten- noch im Rippenbereich diese Vakuolisierung und dennoch verstarben transgene Tiere, wenn auch in geringerer Zahl.

Durch die hohe Doxyzyklinkonzentration von 4 mg/ml müsste bei einem angenommenen IC<sub>50</sub>-Wert von 25 µg/ml die komplette Aktivität des Aggrekanase inhibiert sein. Daraus folgernd könnte eine Akkumulation der überexprimierten, jedoch komplett inhibierten Aggrekanase zum Tode der Tiere geführt haben. Immunhistochemische Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen mAdamts5 könnten hier Aufschluss geben.

Möglicherweise kam es aber auch durch die gewebsspezifischen, pharmakokinetischen Eigenschaften zu unterschiedlichen Doxyzyklin-Konzentrationen in den Organen, sodass die Aggrekanase unter Umständen durch eine nicht mehr inhibierende Doxyzyklinkonzentration

aktiv war. Kistner und Kollegen zum Beispiel zeigten, dass gleiche Doxyzyklin-Konzentrationen je nach untersuchtem Organ unterschiedliche Auswirkungen auf die Zielgen-Expression hatten (Kistner *et al.*, 1996). Durch die Verpaarungen mit der *TetO<sub>hi</sub>-LacZ/GFP*-Reportermaus (Kap. 3.1.3.3) konnte gezeigt werden, dass der Kollagen Typ II-Promotor bis Embryonaltag E 18,5 *dpc* knorpelspezifisch war. Da bei dem Expressionsmuster der adulten Tiere allerdings eine Transkription unter anderem im Gehirn und im Herz detektiert wurde, könnte eine funktionale Aggrecanase schwere Schäden verursacht haben. Bei Untersuchungen an Hirntumoren beispielsweise konnte nachgewiesen werden, dass die Aggrecanase-2 mit den Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) im Gehirn interagiert und unter anderem in der Lage ist, Brevican, eine Komponente der ECM, zu degradieren (Held-Feindt *et al.*, 2006).

Bis zum jetzigen Stand der Untersuchungen bleibt unklar, in welche komplexen Vorgänge die Überexpression des Transgens noch zusätzlich eingreift. Die genaue Klärung dieses Effektes bedarf einer intensiven Untersuchung und müsste in einem gesonderten Projekt ausführlicher analysiert werden.

#### **4.2 Genexpressionsanalyse FGFR3-regulierter zellulärer Prozesse**

Die membranassoziierte Rezeptor-Tyrosinkinase FGFR3 (Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptor 3) gehört zu einer Genfamilie von insgesamt 4 Rezeptoren, die nach Ligandenbindung eine große Vielfalt biologischer Prozesse abhängig von Zelltyp und Entwicklungsphase steuern. Nach Bindung des Liganden in Anwesenheit von Heparansulfat-Proteoglykanen kommt es zur Dimerisierung, zur Autophosphorylierung und zur Aktivierung der interzellulär gelegenen Tyrosinkinasedomäne. Die aktivierten Rezeptoren phosphorylieren im Anschluss weitere Proteine und übertragen so das biologische Signal in den Zellkern. Ein Hauptwirkort von FGFR3 ist das Skelett-System, insbesondere die Steuerung der Proliferations- und Differenzierungsschritte der Chondrozyten während der endochondralen Ossifikation. Der Rezeptor sorgt für einen Gleichgewichtszustand der verschiedenen Zonen in der Wachstumsfuge, wobei er hier durch seinen inhibierenden Einfluss ein beschleunigtes Aufbrauchen der einzelnen Zellschichten verhindert. Fällt dieser hemmende Einfluss weg, kommt es zu einem überschießenden Wachstum, eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors wiederum führt zu dem entgegengesetzten Phänomen.

Eine Vielzahl humaner Skeletterkrankungen gehen mit Mutationen im *FGFR3*-Gen einher (Webster *et al.*, 1997). So bedingen bestimmte Mutationen in der extrazellulären Domäne des Genes das letale Krankheitsbild der Thanatophoren Dysplasie Typ I, während bei der Achondroplasie in 97 % aller Fälle die Mutation G380R in der Transmembrandomäne ursächlich ist. Mutationen in der intrazellulär gelegenen Kinase-Domäne dagegen zeigen eine große Variationsbreite was die Schwere der Erkrankung angeht, von der relativ milden Hypochondroplasie bis zur neonatal letalen Thanatophoren Dysplasie Typ II (Hart *et al.*, 2001). All diese Mutationen bedingen eine konstitutive, Liganden-unabhängige Aktivierung des Rezeptors und somit eine dauerhaft inhibierende Wirkung. Die Schwere der Erkrankungen variiert entsprechend den verschiedenen Mutationen und deren spezifischen Effekte auf das Protein. Mausmodelle mit den humanen Varianten entsprechenden Mutationen zeigen eine verminderte Chondrozytenproliferation und eine reduzierte hypertrophe Zone in der Wachstumsfuge (Li *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999; Kannan *et al.*, 2000). *Knock-out*-Mäuse dagegen zeigen einen Überwuchs des Skeletts (Deng *et al.*, 1996). Auch trotz bisher intensiver Studien ist nach wie vor die Identifizierung von durch *FGFR3* regulierten Genen von großer Bedeutung. Ein detailliert aufgeklärter Wirkmechanismus bietet eine molekulare Basis zum besseren Verständnis des Pathogeneseprozesses von Skelettentwicklungsstörungen und somit auch für neue Ansatzpunkte potenzieller Therapieansätze.

Im Rahmen des zweiten Teiles dieser Arbeit sollte daher mittels Generierung exogen induzierbarer Zelllinien die Auswirkung der typischen ACH- (G380R) und TDII-Mutation (K650E) auf die nachgeschaltete Signaltransduktionskaskade und die Zielgenexpression untersucht werden.

#### **4.2.1 Generierung und Verifizierung der Zelllinien**

Die Analyse der Vorgänge nach Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase *FGFR3*, ob durch einen Ligand oder durch eine aktivierende Mutation verursacht, wurde bereits in verschiedenen Zellkulturmodellen, z.B. in PC12- (Raffioni *et al.*, 1998; Nowroozi *et al.*, 2005), in HEK293- (Lievens *et al.*, 2003; Lievens *et al.*, 2004), in ATDC5- (Ozasa *et al.*, 2005; Harada *et al.*, 2007) als auch in Rattenchondrosarkomzellen (RCS) (Dailey *et al.*, 2003; Lievens *et al.*, 2004), untersucht. Die in diesem Experiment verwendete Zelllinie SW1353 (#HTB-94<sup>TM</sup>) entstammt einem Chondrosarkom Typ II und eignet sich, vergleicht man diese beispielsweise mit den ebenfalls häufig verwendeten RCS-Zellen (Mukhopadhyay *et al.*,



1995), durch die fehlende Matrixbildung und die leichte Transfizierbarkeit gut als Zellkulturmodell.

Bei der Auswahl der geeigneten Zelllinie zu Untersuchungen des Knorpelapparates beziehungsweise der Knorpelzellen muss darauf geachtet werden, dass die Eigenschaften der Knorpelzellen repräsentiert werden. Die Reaktion auf anabole und katabole Faktoren stellt dabei ein wichtiges Charakteristikum dar. Anabole Faktoren, wie beispielsweise BMP-2 (*Bone Morphogenic Protein 2*), bewirken eine gesteigerte Expression von Aggrecan, Kollagen Typ II und auch SOX-9. Katabole Faktoren wie z.B. Interleukin-1 dagegen mindern die Expression von Aggrecan, Kollagen Typ II und steigern gleichzeitig die Expression matrixdegradierender Komponenten (Grunder *et al.*, 2004; Majumdar *et al.*, 2008). Das geeignetste *in vitro*-Modell wären primäre artikuläre Chondrozyten aus der Wachstumsfuge, jedoch verändern diese während der Kultivierung sehr schnell ihre Morphologie, dedifferenzieren und verlieren ihren Expressionsphänotyp (Benoist-Lasselin *et al.*, 2007; Majumdar *et al.*, 2008). Dadurch sind Expressionsstudien nur schwer möglich. Bei der hier verwendeten Zelllinie konnte gezeigt werden, dass Genexpressionsanalysen Korrelationen zu Primärchondrozyten erlauben (Gebauer *et al.*, 2005).

Zur Generierung der Zelllinien wurde die cDNA des humanen *FGFR3*-Genes mit der Isoform 1 (IIIc) gewählt, da diese in Zellen mesenchymaler Herkunft, wozu Knorpel- und Knochenzellen zählen, exprimiert wird (Murgue *et al.*, 1994; Kannan *et al.*, 2000). Um die Auswirkung von Mutationen im *FGFR3*-Gen auf die Expression nachgeschalteter Zielgene näher zu untersuchen, wurden die beiden Mutationen G380R und K650E, stellvertretend für die unterschiedlich schweren Krankheitsbilder Achondroplasie und Thanatophore Dysplasie Typ II, ausgewählt. Nach Generierung und Verifizierung der *Responder*-Konstrukte mit den jeweiligen mutierten Varianten von *FGFR3* erfolgte die stabile Kotransfektion mit dem Effektor-konstrukt und anschließend die Selektion positiver Zellen mittels Neomycin und Doxyzyklin. Die Überprüfung der Klone ergab insgesamt 4 induzierbare Zelllinien mit dem *FGFR3-mut<sup>ACH</sup>*-Konstrukt (ACH-5D4; ACH-1B2; ACH-4A5; ACH-4C4), ebenfalls vier induzierbare mit dem *FGFR3-mut<sup>TDII</sup>*-Konstrukt (TDII-3B4; TDII-4A1; TDII-4A2; TDII-4C4) und zwei induzierbare Kontrollzelllinien (EGFP-4C5; EGFP-4D5). Von den Zelllinien mit der typischen ACH-Mutation zeigte nach *Northern*- und *Western Blot*-Analyse der Klon ACH-4A5 die stringenteste Regulation, bei den Kontrolllinien wurde der Klon EGFP-4D5 ausgewählt, da dieser die geringsten Hintergrundsignale aufwies (Abb. 3.30). Da die Generierung der Zelllinien mit der TDII-Mutation zeitlich versetzt stattfand, wurden nach Überprüfung der Induzierbarkeit alle vier TDII-Klone über relative Quantifizierung auf ihre

*FGFR3*-Expression im Verhältnis zum ACH-Klon 4A5 untersucht, um für die späteren Genexpressionsanalysen von gleichen Transkriptstärken ausgehen zu können (Abb. 3.32). Nach einer Induktionsoptimierung zeigte sich, dass nach 48 h Doxyzyklinapplikation der TDII-Klon 4C4 eine gleich starke *FGFR3*-Expression wie der ACH-Klon 4A5 aufwies (Abb. 3.33). Für die weiteren funktionellen Analysen wurden daher die Klone ACH-4A5, TDII-4C4 und der Kontrollklon EGFP-4D5 verwendet.

#### 4.2.2 Überprüfung der Funktionalität anhand bereits beschriebener Signalwege

Das Verständnis der molekularen Vorgänge *FGFR3* bedingter Skeletterkrankungen ist unabdingbar zur Entwicklung weiterer Therapiekonzepte. Neben der Identifizierung weiterer Mutationen, die ebenfalls Veränderungen in der Rolle als negativer Regulator der Chondrozytenproliferation und -differenzierung bedingen, ist die detaillierte Aufklärung der beteiligten Kaskaden besonders im Hinblick auf das durch Mutationen veränderte Signalverhalten von Bedeutung. Vier Signalwege werden mit der Weiterleitung des *FGFR3* vermittelten Signals in Verbindung gebracht: (1) der *mitogen activated protein kinase* (MAPK)-, (2) der *signal transducer and activator of transcription* (STAT), (3) der Phospholipase-C $\gamma$ /Proteinkinase C (PKC)- und (4) der Phosphatidylinositol-3- Kinase (PI3K)/AKT-Signalweg (Harada *et al.*, 2009, Baldrige *et al.*, 2010). Den ersten beiden Signalwegen kommt die größte Aufmerksamkeit zu (Horton, 2007). Die Phosphorylierung von STAT1 bewirkt eine Inhibition der proliferierenden Zellen. Die Aktivierung über den MAPK-Signalweg führt neben der Inhibition der Extrazellulären Matrixsynthese und der Chondrozytendifferenzierung ebenfalls zu einer Inhibition der Chondrozytenproliferation (Murakami *et al.*, 2004; L'Hote und Knowles, 2005; Horton *et al.*, 2007).

Zum einen wurde die Signalweiterleitung über den MAPK-Weg mittels Phosphorylierung der *extracellular signal regulated* Kinasen -1 und -2 (ERK 1/2) in Abhängigkeit von *FGFR3* untersucht. Die funktionelle Bedeutung der mitogen-aktivierenden Proteinkinasen (MAPK) ist vielfältig, unter anderem sind sie an der Regulation von Proliferation und Differenzierung beteiligt (Seger *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 2001). Die Einteilung erfolgt in drei Gruppen: der Signalweg über die *extracellular-regulated kinases* (ERK) ist an der Regulierung der Zellteilung und der Proliferation beteiligt und wird vornehmlich über Wachstumsfaktoren aktiviert (Chang *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2002). Daher konnte über die Phosphorylierung der Kinasen ERK 1/2, also deren Aktivierung, die Funktionalität des induzierten Wachstumsfaktors *FGFR3* getestet werden. Die zwei weiteren Gruppen beinhalten die p38-

MAP- und die *c-jun N-terminale* Kinasen (JNK), die überwiegend durch physikalischen Stress aktiviert werden. Diese wurden zum Funktionalitätsnachweis nicht herangezogen.

Die Klone mit den beiden Mutationen TDII-4C4 und ACH-4A5 zeigten nach vier Stunden Doxyzyklininduktion eindeutig eine gesteigerte Phosphorylierung und somit eine Aktivierung der Kinasen ERK 1 und 2 (Abb. 3.6). Nach 8-stündiger Induktion wurde nur bei dem TDII-Klon eine Aktivierung des ERK-Signalweges detektiert. Hier zeigte sich bereits, dass, von vergleichbaren *FGFR3*-mRNA-Levels ausgehend, durch die beiden unterschiedlichen Mutationen Veränderungen in der Signalantwort festzustellen waren. Der Klon mit der TDII-Mutation, die im Gegensatz zu der ACH-Mutation einen schwereren Phänotyp beim Menschen verursacht, zeigte auch eine stärkere Aktivierung der MAPK-Kaskade. Der Kontrollklon und untransfizierte Zellen wiesen als Negativkontrollen wie erwartet keine Phosphorylierung der beiden Kinasen ERK 1 und 2 auf. Über das Rekrutieren der MAPK-Kaskade konnte die Funktionalität der Zelllinien bestätigt werden.

Um eine weitere Bestätigung der Funktionalität zu erhalten, wurde die Phosphorylierung von *signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1) untersucht. Die Familie der STATs sind DNA-bindende Proteine, die eine vielfältige Diversität biologischer Effekte vermitteln, von antiviralen Reaktionen bis hin zur Zelltransformation (Ihle, 1996). STATs sind in latentem Status im Zytoplasma lokalisiert. Nach Tyrosinphosphorylierung durch Wachstumsfaktor-Rezeptoren kommt es zur Homo- bzw. Heterodimerisierung und zur Translokation in den Nukleus. Innerhalb des Nukleus binden sie dann an spezifische DNA-Elemente und modulieren so die Genexpression (Darnell *et al.*, 1994; Darnell *et al.*, 1997, Leonard *et al.*, 1998; Citores *et al.*, 2007). Es wird angenommen, dass die *FGFR3*-vermittelte Inhibition des Chondrozytenproliferation via Aktivierung der STAT-Proteine verläuft, wobei der exakte Mechanismus weiter unklar ist. Hinweise auf die Beteiligung an der wachstumshemmenden Eigenschaft lieferten unter anderem *in vitro*-Versuche an RCS-Zellen. Nach Aktivierung von *FGFR3*, entweder durch eine aktivierende Mutation oder auch nach Stimulation durch einen Liganden, konnte die Phosphorylierung und anschließende nukleäre Lokalisation von STAT1 nachgewiesen werden. Weiterhin zeigten neben den *in vitro*-Systemen auch *in vivo*-Modelle eine Akkumulation und nukleäre Lokalisation von STAT1 nach *FGFR3*-Aktivierung (Chen *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999).

Im weiteren Verlauf der Signalweiterleitung über STAT1 scheint p21<sup>Cip1</sup>, ein Mitglied der CIP/KIP-Familie von Cdk Inhibitoren, die den Zellzyklus durch Blockierung des G1-S-Übergangs regulieren, eine Rolle zu spielen (Chin *et al.*, 1996; Su *et al.*, 1997; Legeai-Mallet *et al.*, 1998 und 2004; Sherr *et al.*, 1999; Sahni *et al.*, 1999; Lievens *et al.*, 2003; Nowroozi *et*

*al.*, 2005). Legeai-Mallet und Kollegen konnten 2004 mittels immunohistochemischen Färbungen zeigen, dass eine Überexpression von p21<sup>Cip1</sup> in prähypertrophen und hypertrophen Zellen von ACH- und TDII-Feten zu finden war. Auch wies ein transienter Anstieg der p21<sup>Cip1</sup>-Expression in differenzierenden ATDC5-Zellen, allerdings nicht in undifferenzierten Zellen, auf eine Beteiligung bei der Progression der Chondrozytendifferenzierung hin (Negishi *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass durch die p21<sup>Cip1</sup>-Überexpression am Übergang von proliferierenden zu prähypertrophen Zellen ein vorzeitiger Ausstieg der Zellen aus dem Zellzyklus stattfindet, was zu einer gesteigerten Chondrozytendifferenzierung führt (Legeai-Mallet *et al.*, 2004). So würde indirekt über die Aktivierung des STAT1 die Chondrozytenproliferation inhibiert werden. Dennoch besteht weiter eine Diskussion um die Relevanz der p21-Expression. Versuche an FGFR3-TDII *knock-in*-Mäusen wiesen beispielsweise keinen Anstieg der p21-Expression auf. Es konnte auch kein Ausgleich des TD-Phänotyps an p21-*knock-out*-Mäusen festgestellt werden, bei denen *FGFR3* mit der TDII-Mutation exprimiert worden war (Li *et al.*, 1999). Somit scheint p21 zwar zum Erhalt des Wachstumsarrestes nötig, jedoch nicht der Hauptakteur zu sein (Dailey *et al.*, 2003; L'Hote *et al.*, 2005).

Nach Induktion mit Doxyzyklin wurden die Klone TDII-4C4, ACH-4A5, der Kontrollklon EGFP-4D5 und untransfizierte SW1353-Zellen auf ihre Phosphorylierung von STAT1 untersucht. Wie erwartet, zeigten die Negativkontrollen keine Phosphorylierung. Bei den Klonen mit den mutierten FGFR3-Varianten zeigte nur der TDII-Klon eindeutig eine Phosphorylierung von STAT1 nach FGFR3-Induktion (Abb. 3.35). Der ACH-Klon wies keine Aktivierung von STAT1 auf. Auch hier zeigten sich wieder die unterschiedlichen Signalantworten aufgrund der zwei Mutationen. Wie bereits von Su *et al.* 1997 beschrieben, bedingt die TDII-Mutation FGFR3-K650E eine spezifische Aktivierung von STAT1 als auch die Translokation in den Nukleus. Harada und Kollegen konnten 2007 und Krejci *et al.* 2008 im Rahmen von *in vitro*-Studien an ATDC5- bzw. RCS-Zellen zeigen, dass aktivierende Mutationen im *FGFR3*-Gen Unterschiede im Phosphorylierungsstatus von STAT1 zur Folge haben. Bei diesen Analysen zur Aktivierung von STAT1 zeigte sich, dass die Mutationen K650E und K650M, TDII- bzw. SADDAN-assoziierte Mutationen, eine Phosphorylierung von STAT1 bewirkten, nicht dagegen die ACH- und HCH-Mutationen G380R bzw. K650N. Die Ergebnisse von Harada und Krejci bezüglich der ACH- und der TDII-Mutation konnten mit den generierten, regulierbaren Zelllinien bestätigt werden.

#### 4.2.2.1 Induktion der Matrix Metalloprotease 13 (*MMP13*)-Expression

Die Matrix Metalloproteasen sind eine Familie von Zink-abhängigen Endopeptidasen, die alle Komponenten der Extrazellulären Matrix degradieren können. Diese Gruppe von multifunktionalen Proteinen spielt eine wichtige Rolle im Zellwachstum, in der Differenzierung und der Zellzyklusregulation. Weiterhin kommt ihnen eine nicht unerhebliche Funktion in der Tumorinvasion und der Metastasierung zu (Curran *et al.*, 1999; Curran *et al.*, 2000; Murray, 2001). *MMP13* wurde erstmals 1994 aus einer Brustkrebs-cDNA-Bank isoliert (Freije *et al.*, 1994) und aufgrund ihrer verwandten Eigenschaft zu der Kollagenasen-Subfamilie als Kollagenase-3 bezeichnet. Das Protein hat eine zentrale Rolle in der Modulation der Extrazellulären Matrix Degradation, aber auch andere Funktionen in Zellwachstum und Regulation wurden nach und nach identifiziert (Leeman *et al.*, 2002). Bereits beschriebene Regulatoren der *MMP13*-Transkription sind unter anderem Wachstumsfaktoren und Hormone. Von dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF2) oder auch dem Blutplättchen-Wachstumsfaktor PDGF (*platelet-derived growth factor*) konnte gezeigt werden, dass sie die *MMP13*-Transkription stimulieren (Uria *et al.*, 1998; Varghese *et al.*, 2000; Rydzziel *et al.*, 2000). Auch konnte Krejci und Kollegen 2005 an Rattenchondrosarkomzellen (RCS) die FGF2-induzierte Expression, Freisetzung und Aktivierung der Matrix-degradierenden Moleküle MMP2, MMP3, MMP9, MMP10 und MMP13 nachweisen. Weiterhin zeigten Dailey und Kollegen 2003 durch *Microarray*-Analysen, dass die *MMP13*-Expression in RCS-Zellen nach Stimulation mit FGF1 anstieg. In diesen Studien allerdings wurde ein anderes Zellsystem und weiterhin stimulierte Wildtyp- und nicht mutierte, eventuell abweichend reagierende Rezeptoren, verwendet, sodass nicht zwingend von einer vergleichbaren Signalantwort ausgegangen werden konnte. Da durch die Veröffentlichungen jedoch bereits eine Korrelation zwischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor und Matrix Metalloprotease 13 belegt war, allerdings noch keine FGFR3-spezifische, lag es nahe, die *MMP13*-Expression nach Induktion der Zelllinien zu analysieren.

Nach 48-stündiger Doxyzyklinapplikation zeigten die quantitativen (Abb. 3.38) RT-PCR-Experimente bei dem ACH-Klon 4A5 eine zirka 6-fach erhöhte *MMP13*-Expression. Der TDII-Klon 4C4 dagegen wies nach Induktion lediglich eine leicht erhöhte Transkription von *MMP13* auf, wobei es sich hier um einen Doxyzyklineffekt handeln könnte, da dies auch bei Kontrollzellen nachweisbar war. Hier zeigten sich eindeutig die Auswirkungen zweier verschiedener Mutationen auf die Expression von *MMP13*. Eigentlich wäre zu erwarten, dass der TDII-Klon, der eine stärkere Signalantwort beim Aktivieren der Signalkaskaden zeigte, auch eine stärkere *MMP13*-Expression im Vergleich zum ACH-Klon aufweist. So scheint

eine starke Tyrosinkinase-Aktivität, wie sie durch die TDII-Mutation verursacht wurde, in dem Fall eine schwächere Transkription von *MMP13* zu bewirken. Die Analyse auf Proteinebene (Abb. 3.39) bestätigte die Ergebnisse der mRNA-Analyse, allerdings zeigte die Zelllinie mit der ACH-Mutation nach Induktion eine schwächere Proteinexpression von MMP13 als auf Grundlage der Ergebnisse der RT-PCR-Experimente mit einer 6-fach erhöhten mRNA-Expression zu erwarten gewesen wäre.

Die induzierte, allerdings unterschiedliche *MMP13*-Expression durch zwei verschieden starke FGFR3-Mutationen stellt ein bisher neues Ergebnis dar. Da die molekularen und zellulären Konsequenzen diverser FGFR3-Mutationen nach wie vor nicht vollständig geklärt sind, können auch bezüglich der differentiellen *MMP13*-Expression nur verschiedene Möglichkeiten diskutiert werden. Nach einer Hypothese von Krejci *et al.* 2005 begründet sich die inhibierende Wirkung des Rezeptors unter anderem mittels des MAPK-Signalweges durch Inhibition der Proliferation und Steigerung der Matrix Degradation. Diese wiederum äußert sich in einer gesteigerten Expression von Matrix Metalloproteasen. Eine mögliche Erklärung für die fehlende *MMP13*-Induktion des TDII-Klones könnte die wesentlich stärkere Tyrosinkinase-Aktivität sein, die im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor um das 100-fache erhöht ist (Yamanaka *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die FGF2-induzierte *MMP13*-Expression sowohl Zeit- als auch Dosis-abhängig ist (Uria *et al.*, 1998) und so könnte durch die wesentlich stärkere Tyrosinkinase-Aktivität des TDII-Klones für diese Zelllinie ein falsches Zeitfenster für den MMP13-Nachweis gewählt worden sein. Um diese Vermutung zu bekräftigen müsste zusätzlich eine zeitabhängige Induktionsoptimierung bezüglich der *MMP13*-Expression durchgeführt werden.

Möglicherweise ist aber auch die Expression und die Synthese von MMP13, welche durch Parathyroid Hormon (PTH) reguliert wird, durch die übermäßig starke Tyrosinkinaseaktivität der TDII-Mutation beeinflusst (Walling *et al.*, 1998; Leeman *et al.*, 2002). Entscheidend für die Balance zwischen Chondrozytenproliferation und -Differenzierung ist ein ausgewogenes Zusammenspiel hemmender und positiv beeinflussender Faktoren. Der *parathyroid hormone related peptide* (PTHrP)/PTHrP-Rezeptor/Indian hedgehog (IHH)-Regelkreis, dessen Rezeptor auch vom Parathyroid Hormon verwendet wird, und die Modulation über *bone morphogenic proteins* (BMPs) agieren dabei als Gegenspieler zu der negativen Rolle von FGFR3 auf die Zellproliferation (Amizuka *et al.*, 2000; Minina *et al.*, 2002). Aktivierende Mutationen im *FGFR3*-Gen bewirken hierbei eine Verminderung der PTHrP-Expression (Yamanaka *et al.*, 2003; Harada *et al.*, 2009). Die übermäßige Kinaseaktivität (100-fach) der verwendeten Mutation könnte sich also auch negativ auf die *MMP13*-Expression und

Synthese auswirken. Dies würde auch die induzierbare *MMP13*-Expression des ACH-Klones erklären, da hier nur eine 10-fach stärkere Tyrosinkinase-Aktivität vorliegt. Die Generierung weiterer Zelllinien mit Hypochondroplasie (HCH)-auslösenden Mutationen, die eine schwächere Kinase-Aktivierung auslösen, könnte diesen Zusammenhang klären.

Mittels Anschalten der beiden bekannten Signalwege von *FGFR3* und der Regulation von *MMP13* konnte gezeigt werden, dass die generierten Zelllinien als Modellsystem zur Analyse *FGFR3*-regulierter zellulärer Prozesse herangezogen werden können. Neben der Bestätigung der Funktionalität konnte hier bereits auch eine Aussage über das veränderte Signalverhalten bezüglich der beiden Mutationen getroffen werden. Im Vergleich zur ACH-assoziierten zeigte die TDII-Zelllinie eine stärkere Signalantwort in beiden untersuchten Kaskaden. Daher wurde diese für die differentielle Genexpressionsanalyse mittels *Microarray*-Hybridisierung ausgewählt.

#### **4.2.3 Analyse der differentiellen Genexpression mittels *Microarray*-Hybridisierung**

Durch die mutationsbedingte Aktivierung von *FGFR3* kommt es zu einem übermäßigen inhibitorischen Effekt auf die Proliferations- und Differenzierungsschritte der Chondrozyten. Die Identifizierung differentiell regulierter Gene infolge mutationsbedingter *FGFR3*-Aktivierung spielt hierbei eine wichtige Rolle. Mittels der *Microarray*-Technologie kann diese pathologisch veränderte Genexpression analysiert werden. Über *Microarray* und biochemische Analysen FGF-behandelter Rattenchondrosarkom (RCS)-Zellen beispielsweise zeigten Dailey und Kollegen 2003, dass die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren die Chondrozytenproliferation über die Induktion antiproliferativer Funktionen und der Herunterregulation wachstumsfördernder Moleküle inhibieren.

Aufgrund der problematischen Kultivierung (Benoist-Lasselin *et al.*, 2007) primärer artikulärer Chondrozyten aus der Wachstumsfuge bieten gut charakterisierte Tumorzelllinien wie die hier verwendete SW1353-Zelllinie ein alternatives System, um die Konsequenzen der *FGFR3*-Überexpression näher zu untersuchen. Für die *Array*-Hybridisierung wurde der Klon mit der TDII-Mutation gewählt, da durch zirka 10-fach stärkere Kinase-Aktivität als der ACH-Klon und insgesamt 100-fach stärkere Aktivität im Vergleich zum Wildtyp (Yamanaka *et al.*, 2003) von der stärksten Signalantwort ausgegangen werden konnte. Durch die vergleichbaren *FGFR3*-Transkriptstärken von ACH- und TDII-Klon können die differentiell regulierten Gene des TDII-Klones nach Verifizierung auch bei dem ACH-Klon vergleichend studiert werden.

Die *Whole Human Genome Array*-Hybridisierung zur differentiellen Genexpressionsanalyse wurde in Kooperation mit der *Core Facility Genomics* (Dr. Thorsten Kurz) des Universitätsklinikums Freiburg und der Firma Agilent durchgeführt. Der verwendete Oligo-Array umfasst zirka 41000 Transkripte, wobei Gene mehrfach repräsentiert wurden. Zur Analyse der differentiellen Genexpression wurden Zellen des TDII-Klones 4C4 48 h nach Doxyzyklininduktion im Vergleich zu nicht induzierten TDII-Zellen verwendet. Nach Auswertung der Daten wurden alle die Gene als differentiell exprimiert angesehen, deren Expression sich um mindestens den Faktor 2 von der uninduzierter Zellen unterschied. Insgesamt zeigten 9 Gene (davon 7 überexprimiert, 2 reprimiert) beim Vergleich 48h induziert/uninduziert unterschiedliche Expressionsmuster. Unter den 7 überexprimierten Genen war auch wie erwartet das *FGFR3*-Gen, was die Zuverlässigkeit der *Array*-Analyse bestätigte. Zur Überprüfung der Daten wurden einige Gene (*CHRNA7*, *CAMK1G*, *ESM-1*, *STC1*) mittels semiquantitativer RT-PCR (Abb. 3.40) verifiziert. Bei zwei der vier untersuchten Stichproben (*ESM-1*, *STC1*) konnte eine differentielle Expression bestätigt werden. Die anderen beiden Gene zeigten keine Regulation.

Die geringe Gesamtzahl der regulierten Gene war unerwartet. Dailey und Kollegen führten 2003 einen ähnlichen Versuch durch. Sie stimulierten Rattenchondrosarkom (RCS)-Zellen mit FGF1 und untersuchten die Genexpression mittels *Microarray*-Hybridisierung. Hier zeigten mehr Gene eine differentielle Expression. Jedoch sind auch relevante Unterschiede im Vergleich zu dem in dieser Arbeit durchgeführten Versuch zu nennen. Dailey und Kollegen (2003) stimulierten mit einem Ligand, der neben *FGFR3* auch weitere Wildtyp-Rezeptoren unter anderem auch *FGFR1* und *FGFR2* aktiviert. Bei dem in dieser Arbeit durchgeführten Versuch wurde nur die Signalantwort nach Anschalten der mit der TDII-Mutation versehenen Variante des *FGFR3*-Genes untersucht. Bei der Analyse der *MMP13*-Expression konnte bereits gezeigt werden, dass selbst zwei verschiedene Mutationen im *FGFR3*-Gen (G380R und K650E) unterschiedliche Zielgenexpressionen nach sich ziehen, sodass bei der mit der TDII-Mutation versehenen Variante des *FGFR3*-Genes nicht zwingend von der gleichen Zielgenantwort ausgegangen werden kann wie nach Aktivierung des Wildtyp-Rezeptors. Möglichweise sind bei dieser veränderten Variante des *FGFR3*-Genes weniger Gene differentiell exprimiert.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das auszulösende Signal durch die Doxyzyklininduktion zu schwach war, um die Zielgene derart zu beeinflussen, dass sie im *Array* detektierbar wurden. Unter Umständen könnten aber auch die verwendeten SW1353-Zellen zu geringe Signalantworten bedingen. Vergleichende Experimente zwischen primären Chondrozyten und



SW1353-Zellen zeigten reduzierte Expressionsstärken im Vergleich zu Primärchondrozyten (Gebauer *et al.*, 2005).

Im Rahmen der Analyse der regulierten Gene fiel das Gen *STC1* auf, da dieses ebenfalls eine Rolle in der Chondrogenese spielt und bisher noch nicht mit *FGFR3* in Verbindung gebracht wurde.

#### 4.2.3.1 Regulation von *STC1* durch *FGFR3*

Das differentiell regulierte Gen *STC1* (Stanniocalcin 1) war insofern interessant, da es ebenso wie *FGFR3* an der Regulation des Längenwachstums der Röhrenknochen beteiligt ist (Wu *et al.*, 2006). Eine mögliche Regulation von *STC1* durch *FGFR3* wurde bis jetzt noch nicht beschrieben.

Stanniocalcin, ein sezernierendes, homodimeres Glykoprotein, wurde erstmals in den endokrinen Drüsen von Knochenfischen identifiziert. Die primäre Funktion dieses Proteins innerhalb der Knochenfische ist die Regulation der Calcium- und Phosphathomöostase (Wagner *et al.*, 1986; Lafeber *et al.*, 1988; Lu *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 2006). Die humanen Vertreter der Familie, *STC1* und *STC2*, zeigen keinerlei signifikante Homologie zu anderen bekannten Proteinen und auch weisen sie keine bisher bekannten Proteinmotife auf (Wagner *et al.*, 2006). Ursprünglich wurde angenommen, dass das humane *STC1* eine ähnliche Funktion bezüglich der Calcium- und Phosphat-Homöostase wie das Stanniocalcin in den Knochenfischen hat (Olsen *et al.*, 1996; Wagner *et al.*, 1997; Madsen *et al.*, 1998). Auf der Basis von Expressionsprofilen (Chang *et al.*, 2003), transgenen Tiermodellen (Filvaroff *et al.*, 2002; Varghese *et al.*, 2002) und zellulären Lokalisationsexperimenten (McCudden *et al.*, 2002; Paciga *et al.*, 2003) zeigte sich jedoch, dass dieser humane Vertreter eine weitreichendere Rolle innerhalb der Säugetiere spielen muss, unter anderem eine nicht unerhebliche in der Knochenentwicklung (Jiang *et al.*, 2000; Stasko *et al.*, 2001; Filvaroff *et al.*, 2002; Yoshiko *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2006, Johnston *et al.*, 2010). Johnston und Kollegen (2010) beispielsweise konnten an transgenen Tiermodellen zeigen, dass es durch Überexpression von *STC1* zu einer verzögerten intramembranösen Ossifikation und schweren Hypoplasie der Schädelnaht kommt. Wu und Kollegen (2006) zeigten an Kulturen von fetalen Mittelfußknochen, dass durch Zugabe von rekombinantem humanem *STC1* das Längenwachstum der Knochen inhibiert wird. Sowohl die Chondrozyten-Proliferation und -Differenzierung als auch die extrazelluläre Matrixsynthese wurden unterdrückt. Sie postulierten, dass die *STC1*-vermittelte Inhibition des Längenwachstums bzw. der damit verbundenen Chondrogenese auf einer gesteigerten Phosphataufnahme in die Chondrozyten

beruht, was zu einer vermehrten Apoptose führt. Diese durch die gesteigerte Phosphataufnahme induzierte Apoptose konnte bereits auch an Osteoblasten-ähnlichen (Meleti *et al.*, 2000) und chondrogenen Zelllinien (Magne *et al.*, 2003) demonstriert werden. Die Befunde von Wu *et al.* (2006) bezüglich STC1 untermauern die Annahme, dass dieses Gen an der Regulation der Chondrogenese innerhalb der Wachstumsfuge beteiligt ist. Ähnlich wie bei STC1 wurde auch bei der Überexpression bzw. der konstitutiven Expression von *FGFR3* durch aktivierende Mutationen ein inhibitorischer Effekt auf Chondrozyten-Proliferation und -Differenzierung beschrieben (Li *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999b; Horton *et al.*, 2002; Minina *et al.*, 2002; Murakami *et al.*, 2004).

Die quantitativen RT-PCR-Experimente (Abb. 3.41) bestätigten die Regulation der *STC1*-Expression infolge *FGFR3*-Induktion. Der mitgeführte ACH-Klon 4A5 zeigte keine *STC1*-Transkription. Um die Ergebnisse auch auf Proteinebene nachzuweisen, wurden *Western Blot* Analysen durchgeführt. Nach wiederholten Versuchen und auch nach verschiedenen Induktionszeiten bis zu drei Tagen konnte mit den regulierbaren Zelllinien keine *STC1*-Proteinexpression detektiert werden. Möglicherweise war die durch *FGFR3* induzierte *STC1*-Expression in diesem Zellsystem nicht ausreichend, um detektierbare Mengen des Proteins zu produzieren. Um die verwendeten Zellen auf ihre Zielgenexpression im Vergleich zu anderen Zellen zu überprüfen, wurden transiente Experimente mit konstitutiv *FGFR3*-exprimierenden Zellen durchgeführt (Abb. 3.42). Neben den beiden die Mutation tragenden Varianten (ACH und TDII) wurde auch der Wildtyp des *FGFR3*-Genes sowohl in SW1353-Zellen als auch in Rattenchondrosarkomzellen (RCS) transient transfiziert. *STC1* ist in Zellextrakten als 31 kDa- und 33 kDa-Bande zu detektieren, während im Zellkulturüberstand, wo nur geringe Mengen des Proteins sezerniert werden, eine starke 35 kDa- und eine schwächere 31 kDa-Bande zu detektieren sein sollte. Die verschiedenen Größen des Proteins entstehen durch Glykosylierungen (Jellinek *et al.*, 2000). In beiden Zellsystemen konnte in den Zellextrakten nur bei der konstitutiv exprimierten Wildtyp-Variante beide Formen detektiert werden. Die 33 kDa-Bande wurde bei allen transfizierten Zellen nachgewiesen, auch bei Kontrollzellen. Eine *STC1*-Expression im Zellkulturüberstand konnte nur bei mit Wildtyp-*FGFR3* transfizierten Zellen festgestellt werden, bei mit den Mutanten transfizierten Zellen war keine detektierbar. Da der Nachweis des Proteins im Überstand nur schwach war, konnte auch nur die starke 35 kDa-Bande nachgewiesen werden. Die schwächere 31 kDa-Bande konnte im *Western Blot* nicht mehr detektiert werden.

Intrazellulär wird *STC1* in großen Mengen produziert, ist gering glykosyliert und nicht phosphoryliert. Die sezernierte Form dagegen ist hoch glykosyliert und phosphoryliert. Dies

deutet auf eine regulierte Sekretion hin (Jellinek *et al.*, 2000). Der Mechanismus der Phosphorylierung, welcher ein spätes Ereignis posttranslationaler Modifikation darstellt, ist noch unklar. Sowohl die regulierte Sekretion als auch die Phosphorylierung von STC1 sind für dessen biologische Aktivität von Bedeutung. Durch den Nachweis von STC1 im Überstand konnte gezeigt werden, dass FGFR3 möglicherweise eine Rolle in der Sekretion von STC1 spielt und dass durch die eingefügten Mutationen diese fehlerhaft wird. In wie weit diese fehlerhafte Sekretion von STC1 von Bedeutung für die FGFR3-vermittelte Inhibition der Chondrogenese ist, muss noch untersucht werden.

### 4.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Projekte im Bezug auf Erkrankungen des Skelettsystems bearbeitet. Zum einen wurde *in vivo* die Relevanz der Aggrekanase mAdams5 im Pathogeneseprozess der Osteoarthritis untersucht. Über ein *in vitro*-Modell wurde zunächst gezeigt, dass die induzierbar überexprimierte Aggrekanase mAdams5 das Substrat Aggrekan spalten kann und dass das generierte, bifunktionale Konstrukt funktional war. Dieses *in vitro*-System kann im Folgenden dazu genutzt werden, um bekannte, wie beispielsweise Diacerhein (Rintelen *et al.*, 2006), Ciclosporin A (Little *et al.*, 2002) oder Glukosamine (Reginster, 2007), als auch neue Inhibitoren der Aggrekanolyse zu untersuchen. Die Charakterisierung der transgenen Tiere ergab eine Linie (pCol2A5-C), die nach exogener Doxyzyklingabe mAdams5 regulierbar überexprimierte. Die Funktionalität des transgenen mAdams5 konnte durch eine erhöhte Glykosaminoglykan (GAG)-Abgabe primärer Chondrozyten nachgewiesen werden. Makroskopisch sichtbare Knorpelerosionen waren bei einem 15%igen Verlust der Gesamt-Glykosaminoglykane nicht detektierbar, sodass dieser GAG- und infolge Elastizitäts-Verlust von dem Knorpel toleriert werden kann. Durch eine Optimierung der Doxyzyklinkonzentration und der Induktionszeit könnte der GAG-Abbau möglicherweise gesteigert werden, sodass Knorpelerosionen in Form von Rissen detektierbar würden. So könnte bestimmt werden, ab wann der Knorpel den Gesamt-Glykosaminoglykan-Verlust nicht mehr auffangen kann. Auch bei diesem *in vivo* Modell können Inhibitoren ausgetestet werden, in wie weit sich die Funktionalität der Aggrekanase verändern lässt, ob der einmal gesteigerte Aggrekanabbau rückgängig gemacht werden kann und welche Mechanismen dabei zu Grunde liegen.

Um die Pathogenese der Osteoarthrose allerdings vollständig zu rekapitulieren und auch um schneller eine Osteoarthrose-ähnliche Situation bei der Maus zu schaffen, sollte eventuell doch ein zusätzlicher Stimulus (BSA-Injektion, mechanische Belastung) gesetzt werden, der bei der entsprechenden genetischen Prädisposition der *mAdamts5*-Überexpression zur eindeutigen Osteoarthrose-Bildung in Form von Knorpelerosionen führt.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der weiteren Aufklärung FGFR3-regulierter zellulärer Prozesse. Bei den generierten Zelllinien mit Achondroplasie (ACH)- und Thanatophore Dysplasie Typ II (TDII) -assoziierten Mutationen zeigte sich ein verändertes Signalverhalten zweier bekannter Signalwege. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass das bereits mit den Fibroblasten-Wachstumsfaktoren in Verbindung gebrachte Gen *MMP13* durch FGFR3 reguliert wird und dass dies mutationsabhängig ist. Nur die Zelllinie mit der Achondroplasie-assoziierten Mutation zeigte einen Einfluss auf die *MMP13*-Transkription. Weitere MMPs könnten auf ihre Regulation durch FGFR3-Expression, insbesondere durch die Achondroplasie-assoziierte Mutation, untersucht werden, da die inhibierende Wirkung des Rezeptors unter anderem mit einer Steigerung der Matrix Degradation einhergeht.

Die *Microarray*-Hybridisierung erfolgte mit der die Thanatophoren Dysplasie Typ II-Mutation tragenden Zelllinie. Das Gen *MMP13*, welches ebenfalls auf dem Array war, zeigte wie erwartet keine differentielle Expression, da über die Experimente mit der TDII-Zelllinie auch keine veränderte *MMP13*-Transkription festgestellt werden konnte.

Über die *Array*-Hybridisierung konnte das Gen *STC1* identifiziert werden, welches bisher noch nicht mit FGFR3 in Verbindung gebracht wurde. Auf Proteinebene konnte gezeigt werden, dass die Wildtyp-Variante von FGFR3 möglicherweise eine Funktion in der regulierten Sekretion des Protein STC1 hat und dass durch die beiden eingefügten Mutationen diese aufgehoben ist. Im Folgenden sollte analysiert werden, über welche Signalwege *STC1* reguliert wird und ob zum Beispiel das C-Typ Natriuretische Peptid (CNP), das inhibitorisch in die MAPK-Kaskade eingreift und Grundlage eines Achondroplasie-Therapiekonzepts ist (Zabel, 2004), eine Auswirkung auf die *STC1*-Expression hat.

Weiterhin könnte eine *Array*-Hybridisierung mit der die ACH-Mutation tragenden Zelllinie erfolgen. Neben der Bestätigung der differentiellen *MMP13*-Expression könnte hier auch die Regulation weiterer Gene unter anderem auch weiterer MMPs aufgezeigt werden. Diese *Array*-Daten könnten vergleichend mit denen aus der Hybridisierung mit der TDII-tragenden Zelllinie studiert werden. Dadurch bekäme man Erkenntnisse darüber, welche Gene bei einer Mutation mit 10-fach stärkerer (Achondroplasie) im Vergleich zu 100-fach stärkerer

Tyrosinkinaseaktivität (Thanatophore Dysplasie Typ II) differentiell exprimiert werden und welche nicht, womit sich weitere Rückschlüsse auf die Auswirkungen der beiden krankheitsverursachenden Mutationen im Bezug zur Zielgenexpression ziehen ließen.

Um zu überprüfen, ob die verschieden starken Tyrosinkinase-Aktivitäten der verwendeten Mutationen mit der differentiellen Expression verschiedener Zielgene korrelieren oder ob möglicherweise eine überschießende Aktivität einen gegenteiligen Effekt hat, wäre empfehlenswert, noch weitere Zelllinien zu generieren. Als Beispiel könnten hier Zelllinien mit einer typischen Mutation für die Hypochondroplasie von Vorteil sein. Diese könnten stellvertretend für eine schwache Tyrosinkinase-Aktivität für weitere Untersuchungen vergleichend zu den beiden anderen Mutationen herangezogen werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Entstehung und Aufrechterhaltung von Knorpel- und Knochengewebe wird durch eine Vielzahl von hemmenden oder fördernden Faktoren hoch komplex reguliert, wobei die dabei involvierten physiologischen Prozesse bisher nur teilweise verstanden werden. Auch die Ursachen sowohl degenerativer Erkrankungen, aber auch durch Mutationen im FGFR3-Gen verursachter Chondrodysplasien sind in ihrer Ätiopathogenese noch nicht vollständig erforscht. In dieser Arbeit wurden verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt, die zur weiteren Aufklärung der Pathophysiologie zweier unterschiedlicher Skeletterkrankungen beitragen sollten.

Ein relevantes Charakteristikum der degenerativen Gelenkserkrankung Osteoarthritis ist der Verlust an Aggrecan, hauptverantwortlich verursacht durch die Aggrecanase ADAMTS5. Es wurde ein Tiermodell generiert, bei dem gezielt mittels des Tet-ON-Systems die Aggrecanase mAdamts-5 überexprimiert werden kann. Nach Konstruktion und Generierung als auch Charakterisierung des *in vitro*-Modells wurde das Tiermodell hergestellt, um die Folgen der Überexpression im Hinblick auf einen verstärkten Aggrecanabbau im Knorpel der Mäuse zu analysieren. Nach initialer Charakterisierung auf Induzierbarkeit zeigte eine Gründerlinie eine induzierbare transgene mAdamts5-Expression. Die Überprüfung auf Knorpelspezifität zeigte, sowohl embryonal als auch im adulten Tier, dass sich der verwendete, zusammengesetzte Kollagen-Typ II Promotor wie der endogene verhielt und somit funktional war. Nach Doxyzyklininduktion wurde bei der optimalen Dosis von 1 mg/ml im Vergleich zum induzierten Wildtyp-Tier eine 15%ige Abnahme des Gesamt-Glykosaminoglykan(GAG)-Gehaltes und eine um 120% erhöhte GAG-Abgabe ins Medium detektiert, was eine verstärkte Spaltung von Aggrecan bedeutete. Die transgene Aggrecanase wurde überexprimiert und spaltete verstärkt Aggrecan. Da aufgrund der histologischen Untersuchungen jedoch keine Knorpelerosionen feststellbar waren, konnte im Umkehrschluss gefolgert werden, dass der Knorpel einen Verlust an Glykosaminoglykanen bis zu einer gewissen Grenze tolerieren kann. Mit dem generierten und charakterisierten Tiermodell konnte mit dem Verlust an GAG eine Osteoarthritis-ähnliche Situation simuliert werden, insbesondere im Hinblick auf frühe Stadien der Erkrankung, bei denen noch keine makroskopisch eindeutig sichtbare Knorpelerosionen vorliegen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Zellkulturexperimente zur weiteren Aufklärung FGFR3-regulierter Prozesse durchgeführt. Nach Generierung und Verifizierung der stabilen

Zelllinien, die mittels des Tet-ON-Systems das FGFR3-Gen mit jeweils einer Chondrodysplasie-assoziierten Mutation (Achondroplasie-Mutation G380R, Thanatophore Dysplasie Typ II-Mutation K650E) induzierbar überexprimieren, wurden die Auswirkungen der zwei verschiedenen Mutationen anhand bereits beschriebener Signalwege untersucht. Über die Rekrutierung des ERK-Signalweges konnte bei beiden Zelllinien die Funktionalität nachgewiesen werden, wobei die Zelllinie mit der einen schwereren Phänotyp beim Menschen verursachenden TDII-Mutation eine stärkere Aktivierung zeigte. Bei der Aktivierung von STAT1 wies nur die TDII-Zelllinie eine Phosphorylierung auf, nicht jedoch die ACH-Zelllinie; dies deckte sich mit bereits publizierten Untersuchungen. Beide Kaskaden zeigten eine unterschiedliche Signalantwort aufgrund der verschiedenen Mutationen. Des Weiteren konnte eine unterschiedliche MMP13-Zielgenexpression nachgewiesen werden, wobei lediglich die ACH-Zelllinie eine erhöhte MMP13-Expression (6-fach) zeigte. Zur Identifizierung neuer involvierter FGFR3-Zielgene wurde die differentielle Genexpression der TDII-Zelllinie im Vergleich induziert/nicht induziert mittels Microarray-Hybridisierung untersucht. Als interessantes Zielgen fiel STC1 auf, welches ebenfalls eine Rolle in der Chondrogenese spielt und bislang nicht mit FGFR3 in Verbindung gebracht wurde. Es konnte jedoch nur auf RNA-Ebene eine Regulation nachgewiesen werden. Nachfolgend durchgeführte transiente Experimente zeigten, dass die Wildtyp-Variante von FGFR3 möglicherweise eine Funktion in der Sekretion des Proteins STC1 hat und dass durch die beiden eingefügten Mutationen (ACH, TDII) diese aufgehoben ist. Der Einfluss von FGFR3 auf die Sekretion von STC1 stellt ein neues Ergebnis dar, insbesondere auch die Auswirkungen der beiden für die unterschiedlichen Krankheitsbilder stehenden Mutationen. Welche Relevanz allerdings die STC1-Sekretion im Rahmen FGFR3-assoziiierter Erkrankungen hat, kann nicht eindeutig beurteilt werden. Weitere Faktoren aus dem hoch komplexen Zusammenspiel während der Knorpel/Knochenentwicklung müssen untersucht werden, um eine definitive Einordnung zu ermöglichen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aigner T, McKenna L (2002): Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage *Cell Mol Life Sci.* 59(1): 5-18
- Aigner T, Kurz B, Fukui N, Sandell L (2002): Roles of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 14(5): 578-84
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215 : 403-410
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997): Gapped Blast and Psi-Blast: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402
- Ameye LG, Young MF (2006): Animal models of osteoarthritis: lessons learned while seeking the "Holy Grail". *Curr Opin Rheumatol.* 18(5): 537-47
- Amizuka N, Ozawa H, Sasaki T (2000): The biological action of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) and fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) on bone and cartilage. *Kaibogaku Zasshi* 75(5): 415-25
- Arbabi S, Maier RV (2002): Mitogen-activated protein kinases *Crit.Care Med.* 30 (1. Supp), Seite S74-S79
- Archer CW, Dowthwaite GP, Francis-West P (2003): Development of synovial joints. *Birth Defects Research* 69: 144–15
- Arner EC (2002): Aggrecanase-mediated cartilage degradation. *Curr Opin Pharmacol* 2(3): 322-9
- Baldridge D, Shchelochkov O, Kelley B, Lee B (2010): Signaling pathways in human skeletal dysplasias. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 11:189-217
- Bartels CF, Bükülmez H, Padayatti P, Rhee DK, van Ravenswaaij-Arts C, Pauli RM, Mundlos S, Chitayat D, Shih LY, Al-Gazali LI, Kant S, Cole T, Morton J, Cormier-Daire V, Faivre L, Lees M, Kirk J, Mortier GR, Leroy J, Zabel B, Kim CA, Crow Y, Braverman NE, van den Akker F, Warman ML (2004): Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux. *Am. J. Hum. Genet* 75:27–34
- Bell AC, Felsenfeld G (1999): Stopped at the border: boundaries and insulators. *Curr Opin Genet Dev.* 9(2): 191-8
- Bell AC, West AG, Felsenfeld G (2001): Insulators and boundaries: versatile regulatory elements in the eukaryotic genome. *Science* 2001 291 (5503): 447-50
- Benoist-Lasselien C, Gibbs L, Heuertz S, Odent T, Munnich A, Legeai-Mallet L (2007): Human immortalized chondrocytes carrying heterozygous FGFR3 mutations: an in vitro model to study chondrodysplasias. *FEBS Lett.* 12: 581(14): 2593-8



- Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, De Crombrugge B (1999): Sox9 is required for cartilage formation. *Nature Genet.* 22: 85-89
- Birnboim HC, Doly J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc. Acid. Res.* 7: 1513-1523
- Blaney Davidson EN, Scharstuhl A, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB (2005): Reduced transforming growth factor-beta signaling in cartilage of old mice: role in impaired repair capacity. *Arthritis Res Ther.* 7(6): R1338-47
- Blelloch R, Kimble J (1999): Control of organ shape by a secreted metalloprotease in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 399: 586-590
- Blom AB, van Lent PL, Holthuysen AE, van der Kraan PM, Roth J, van Rooijen N, van den Berg WB (2004): Synovial lining macrophages mediate osteophyte formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 12(8): 627-35
- Bockamp E, Maringer M, Spangenberg C, Fees S, Fraser S, Eshkind L, Oesch F, Zabel B. (2002): Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiol Genomics* 11(3): 115-32
- Bondeson J, Lauder S, Wainwright S, Amos N, Evans A, Hughes C, Feldmann M, Caterson B (2007): Adenoviral gene transfer of the endogenous inhibitor IkappaBalpha into human osteoarthritis synovial fibroblasts demonstrates that several matrix metalloproteinases and aggrecanases are nuclear factor-kappaB-dependent. *J Rheumatol* 34: 523-533
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254
- Brandt KD, Radin EL, Dieppe PA, van de Putte L (2006): Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. *Ann Rheum Dis.* 65(10): 1261-4
- Brasemann S, Graninger P, Busslinger M (1993): A selective transcriptional induction system for mammalian cells based on Gal4-estrogen receptor fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1657-1661
- Brodie SG, Kitoh H, Lachman RS, Nolasco LM, Mekikian PB, Wilcox WR (1999): Platyspondylic lethal skeletal dysplasia, San Diego type, is caused by FGFR3 mutations. *Am J Med Genet* 84(5): 476-480
- Brodie SG, Deng C-X (2003): Mouse models orthologous to FGFR3-related skeletal dysplasias. *Ped Pathol Molec Med* 22: 87-103
- Brunet LJ, McMahon JA, McMahon AP, Harland RM (1998): Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* 29: 1455-7
- Buckwalter JA, Mankin HJ (1998): Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect.* 47: 477-86

- Bukulmez H, Matthews AL, Sullivan CM, Chen C, Kraay MJ, Elston RC, Moskowitz RW, Goldberg VM, Warman ML (2006): Hip joint replacement surgery for idiopathic osteoarthritis aggregates in families. *Arthritis Res Ther* 8(1): R25
- Bursavich MG, Gilbert AM, Lombardi S, Georgiadis KE, Reifenberg E, Flannery CR, Morris EA (2007) 5'-Phenyl-3'H-spiro[indoline-3,2'-[1,3,4]thiadiazol]-2-one inhibitors of ADAMTS-5 (Aggrecanase-2). *Bioorg Med Chem Lett* 17: 5630-5633
- Cal S, Arguelles JM, Fernandez PL, López-Otín C (2001): Identification, characterization, and intracellular processing of ADAM-TS12, a novel human disintegrin with a complex structural organization involving multiple thrombospondin-1 repeats. *J. Biol. Chem.* 276: 17932–17940
- Cawston TE, Wilson AJ (2006): Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 20(5): 983-1002
- Chambers TJ (2000): Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *J. Pathol.* 192: 4-13
- Chambers MG, Cox L, Chong L, Suri N, Cover P, Bayliss MT, Mason RM (2001): Matrix metalloproteinases and aggrecanases cleave aggrecan in different zones of normal cartilage but colocalize in the development of osteoarthritic lesions in STR/ort mice. *Arthritis Rheum* 44: 1455-1465
- Chang L, Karin M (2001): Mammalian MAP kinase signaling cascades *Nature* 410(6824): 37-40
- Chang AC, Jellinek DA, Reddel RR (2003): Mammalian stanniocalcins and cancer. *Endocr Relat Cancer* 10(3): 359-73
- Chen H, Lun Y, Ovchinnikov D, Kokubo H, Oberg, KC, Pepicelli CV, Lee B, Johnson RL (1998): Limb and kidney defects in *Lmx1b* mutant mice suggest an involvement of LMX1B in human nail patella syndrome. *Nat Genet.* 19: 51-55
- Chen L, Adar R, Yang X, Monsonogo EO, Li C, Hauschka PV, Yayon A, Deng CX (1999): Gly369Cys mutation in mouse *FGFR3* causes achondroplasia by affecting both chondrogenesis and osteogenesis. *J Clin Invest.* 104(11): 1517-25
- Chen L, Wu Y, Lee V, Kiani C, Adams ME, Yao Y, Yang BB (2002): The folded modules of aggrecan G3 domain exert two separable functions in glycosaminoglycan modification and product secretion. *J Biol Chem.* 277(4): 2657-65
- Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA (1996): Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383: 407-413
- Chiang C, Litingtung Y, Harris MP, Simandl BK, Beachy PA, Fallon JF (2001): Manifestation of the Limb Prepattern: Limb Development in the Absence of Sonic Hedgehog Function. *Dev. Biol.* 236 (2): 421-435

- Chin YE, Kitagawa M, Su W-CS, You Z-H, Iwamoto Y, Fu X-Y (1996): Cell growth arrest and induction of cyclin dependent kinase inhibitor p21 mediated by Stat 1. *Science* 272: 719-22
- Cho JY, Guo C, Torello M, Lunstrum GP, Iwata T, Deng C, Horton WA (2004): Defective lysosomal targeting of activated fibroblast growth factor receptor 3 in achondroplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(2): 609-14
- Chusho H, Tamura N, Ogawa Y, Yasoda A, Suda M, Miyazawa T, Nakamura K, Nakao K, Kurihara T, Komatsu Y *et al.* (2001): Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 4016-4021
- Citores L, Bai L, Sørensen V, Olsnes S (2007): Fibroblast growth factor receptor-induced phosphorylation of STAT1 at the Golgi apparatus without translocation to the nucleus. *J Cell Physiol.* 212(1): 148-56
- Cohen Jr. MM (2006): The new bone biology: Pathologic, molecular and clinical correlates. *Am. Jour. Med. Gen. Part A* 140A: 2646-2706
- Cohn MJ, Tickle C (1996): Limbs: a model for pattern formation within the vertebrate body plan. *Trends Genet.* 12: 253-257
- Cole AA, Kuettner KE (2002): Molecular basis for differences between human joints. *Cell Mol Life Sci.* 59(1): 19-26
- Craig FM, Bentley G, Archer CW (1987): The spatial and temporal pattern of collagens I and II and keratan sulphate in the developing chick metatarsophalangeal joint. *Development* 99: 383-391
- Creamer P, Hochberg MC (1997): Osteoarthritis. *Lancet* 350: 503-508
- Curran S, Murray GI (1999): Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J. Pathol.* 189: 300–308
- Curran S and Murray GI (2000): Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur. J. Cancer*, 36: 1621–1630
- Dailey L, Laplantine E, Priore R, Basilico C (2003): A network of transcriptional and signaling events is activated by FGF to induce chondrocyte growth arrest and differentiation. *Jour. Cell Biol.* 161(6): 1053-66
- Darnell JE Jr., Kerr IM, Stark GR (1994): Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264: 1415–1421
- Darnell JE Jr. (1997): STATs and gene regulation. *Science* 277: 1630–1635
- De Hooge AS, van de Loo FA, Bennink MB, Arntz OJ, de Hooge P, van den Berg WB (2005): Male IL-6 gene knockout mice developed more advanced osteoarthritis upon aging. *Osteoarthritis Cartilage* 13(1): 66-73

- De Luca F, Baron J (1999): Control of bone growth by fibroblast growth factors. *Trends Endocrinol Metab* 10(2): 61–65
- Demircan K, Hirohata S, Nishida K, Hatipoglu OF, Oohashi T, Yonezawa T, Apte SS, Ninomiya Y (2005): ADAMTS-9 is synergistically induced by interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha in OUMS-27 chondrosarcoma cells and in human chondrocytes. *Arthritis Rheum* 52(5): 1451-60
- Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P (1996): Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 84: 911–921
- Dimai HP, Hall SL, Stilt-Coffing B, Farley JR (1998): Skeletal response to dietary zinc in adult female mice. *Calcif Tissue Int* 62(4): 309-15
- Dingermann T (1999): *Gentechnik-Biotechnik; Lehrbuch und Kompendium für Studium und Praxis*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Dreyer SD (1999): *Transkriptionsfaktoren und Skelettentwicklungsstörungen – Klonierung und Charakterisierung von Kandidatengen*. Dissertation im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Duboule D (2002): *Developmental biology: Making progress with limb models*, *Nature* 418: 492-493
- Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffrey V, Amling M, Karsenty G (1999): A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev.* 13: 1025-1036
- East CJ, Stanton H, Golub SB, Rogerson FM, Fosang AJ (2007a): ADAMTS-5 deficiency does not block aggrecanolytic activity at preferred cleavage sites in the chondroitin sulfate-rich region of aggrecan. *J Biol Chem.* 282(12): 8632-40
- East CJ, Rogerson FM, Lawlor KE, Stanton H, Fosang AJ (2007b): ADAMTS-5 activity in synovial fibroblasts is different to chondrocytes. *Trans Orthop Res Soc, San Diego*, 576
- Engle JM, Tam L, Goldring M, Apte SS (2001): ADAMTS-9 and ADAMTS-10, two novel, unusual ADAMTS proteases and regulation of the ADAMTS family in three human chondrocyte cell lines. 47th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society
- Fallon JF, Kelley RO (1977): Ultrastructural analysis of the apical ectodermal ridge during vertebrate limb morphogenesis. *J Embryol Exp Morph* 41: 223–232
- Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ (1986): Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta* 883(2): 173-7
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983): A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13
- Felson DT (2006): Clinical practice. Osteoarthritis of the knee *N Engl J Med.* 2006 354(8):841-8

- Fernández-Moreno M, Rego I, Carreira-Garcia V, Blanco FJ (2008): Genetics in osteoarthritis. *Curr Genomics* 9(8): 542-7
- Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, Fox A, Rediske J, Pellas T, Kidd B, Bevan S, Winter J (2004): Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain*. 112(1-2): 83-93
- Fidelix TS, Soares BG, Trevisani VF (2006): Diacerein for osteoarthritis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 1. Art. No.: CD005117
- Filvaroff EH, Guillet S, Zlot C, Bao M, Ingle G, Steinmetz H, Hoeffel J, Bunting S, Ross J, Carano RAD, Powell-Braxton L, Wagner GF, Eckert R, Gerritsen ME, French DM (2002): Stanniocalcin 1 Alters Muscle and Bone Structure and Function in Transgenic Mice *Endocrinology* 143: 3681-3690
- Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Caterson B (1999): Expression of ADAMTS homologues in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun*. 260(2): 318-22
- Fleenor DE, Kaufman RE (1993): Characterization of the DNase I hypersensitive site 3' of the human beta globin gene domain. *Blood* 81(10): 2781-90
- Fosang AJ, Rogerson FM, East CJ, Stanton H (2008a): ADAMTS-5: the story so far. *Eur Cell Mater*. 15: 11-26
- Fosang AJ, Little CB (2008b): Drug insight: aggrecanases as therapeutic targets for osteoarthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 4(8): 420-7
- Francis-West P, Ladher R, Barlow A, Graveson A (1998): Signaling interactions during facial development. *Mech Dev* 75: 3-28
- Freije JMP, Díez-Itza I, Balbín M, Sánchez LM, Blasco R, Tovilia J, and López-Otín C (1994): Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J. Biol. Chem*. 269: 16766–73
- Freyschmidt J (2008): *Skeletterkrankungen: klinisch-radiologische Diagnose und Differential- diagnose* 3.Auflage Springer Verlag
- Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, Selig M, Nielsen G, Taksir T, Jain RK, Seed B (1998): Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 94(6): 715-25
- Gagliardi AD, Kuo EYW, Raulic S, Wagner GF, DiMattia GE (2005): Human stanniocalcin-2 exhibits potent growth-suppressive properties in transgenic mice independently of growth hormone and IGFs *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E92–E105
- Ganten D, Ruckpaul K, Wauer RR (2004): *Molekularmedizinische Grundlagen von fetalen und neonatalen Erkrankungen (Molekulare Medizin)*, Springer Verlag, ISBN: 3-540-20138-6
- Garbers DL (1990): Guanylate cyclase receptor family. *Recent. Prog. Horm. Res*. 46: 85–96
- Gardner DP, Byrne GW, Ruddle FH, Kappen C (1996): Spatial and temporal regulation of a lacZ reporter transgene in a binary transgenic mouse system. *Transgenic Res* 5: 37–48

- Gebauer M, Saas J, Sohler F, Haag J, Söder S, Pieper M, Bartnik E, Beninga J, Zimmer R, Aigner T (2005): Comparison of the chondrosarcoma cell line SW1353 with primary human adult articular chondrocytes with regard to their gene expression profile and reactivity to IL-1beta. *Osteoarthritis Cartilage*. 13(8): 697-708
- Gerber HP, Ferrara N (2000): Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med*. 10(5): 223-228
- Ghosh P (1999) The pathobiology of osteoarthritis and the rationale for the use of pentosan polysulfate for its treatment. *Semin Arthritis Rheum* 28: 211–267
- Gilbert AM, Bursavich MG, Lombardi S, Georgiadis KE, Reifenberg E, Flannery CR, Morris EA (2007): 5-((1H-pyrazol-4-yl)methylene)-2-thioxothiazolidin-4-one inhibitors of ADAMTS-5. *Bioorg Med Chem Lett* 17: 1189-1192
- Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, Flannery CR, Peluso D, Kanki K, Yang Z, Majumdar MK, Morris EA (2005): Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature*. 31; 434(7033): 644-8
- Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K (2006): The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97: 33-44
- Goldring MB, Goldring SR (2007): Osteoarthritis. *J Cell Physiol*. 213(3): 626-34
- Golub LM, Ramamurthy NS, McNamara TF, Greenwald RA, Rifkin BR (1991): Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2(3): 297-321
- Gordon JW, Ruddle FH (1983): Gene transfer into mouse embryos: production of transgenic mice by pronuclear injection. *Methods Enzymol* 101: 411- 433
- Gossen M, Bujard H (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(12): 5547-51
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Müller G, Hillen W, Bujard H (1995): Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268(5218): 1766-9
- Gotoh N (2008): Regulation of growth factor signaling by FRS2 family docking/scaffold adaptor proteins. *Cancer Sci*. 99(7): 1319-25
- Greenwald RA, Golub LM, Ramamurthy NS, Chowdhury M, Moak SA, Sorsa T (1998): In vitro sensitivity of the three mammalian collagenases to tetracycline inhibition: relationship to bone and cartilage degradation. *Bone*. 22(1): 33-8
- Grunder T, Gaissmaier C, Fritz J, Stoop R, Hortschansky P, Mollenhauer J, Aicher WK (2004): Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads. *Osteoarthritis Cartilage* 12: 559-567

- Gu H, Zou YR, and Rajewsky K (1993): Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* 73: 1155–1164
- Guo X, Day TF, Jiang X, Garrett-Beal L, Topol L, Yang Y (2004): Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation. *Genes Dev* 218: 2404–2417
- Guo C, Degen CR, Laederich MB, Lunstrum GP, Holden P, Bihlmaier J, Krakow D, Cho YJ, Horton WA (2008): Sprouty 2 disturbs FGFR3 degradation in thanatophoric dysplasia type II: a severe form of human achondroplasia. *Cell Signal*. 20(8): 1471-1477
- Hadari YR, Gotoh N, Kouhara H, Lax I, Schlessinger J (2001): Critical role for the docking-protein FRS2 alpha in FGF receptor-mediated signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(15): 8578-83
- Hall CM (2001): International nosology and classification of constitutional disorders of bone *Am J Med Genet* 113(1): 65-77
- Harada D, Yamanaka Y, Ueda K, Nishimura R, Morishima T, Seino Y, Tanaka H (2007): Sustained phosphorylation of mutated FGFR3 is a crucial feature of genetic dwarfism and induces apoptosis in the ATDC5 chondrogenic cell line via PLCgamma-activated STAT1. *Bone* 41(2):273-81
- Harada D, Yamanaka Y, Ueda K, Tanaka H, Seino Y (2009): FGFR3-related dwarfism and cell signaling. *J Bone Miner Metab.* 27(1): 9-15
- Hardingham TE, Fosang AJ, Dudhia J (1992): Aggrecan, the chondroitin sulfate/keratan sulfate proteoglycan from cartilage. *Articular cartilage and osteoarthritis*. K.E. Kuettner Raven Press, New York. 5-19
- Hardingham T (2008): Extracellular matrix and pathogenic mechanisms in osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 10(1): 30-6
- Hart KC, Robertson SC, Donoghue DJ (2001): Identification of tyrosine residues in constitutively activated fibroblast growth factor receptor 3 involved in mitogenesis, Stat activation, and phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Mol Biol Cell* 12(4): 931-42
- Hartmann C, Tabin CJ (2001): Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. *Cell* 104: 341-351
- Hasan MT, Schönig K, Berger S, Graewe W, Bujard H (2001): Long-term, noninvasive imaging of regulated gene expression in living mice. *Genesis* 29(3): 116-22
- Hedbom E, Häuselmann HJ (2002): Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. *Cell Mol Life Sci.* 59(1): 45-53
- Held-Feindt J, Paredes EB, Blömer U, Seidenbecher C, Stark AM, Mehdorn HM, Mentlein R (2006): Matrix-degrading proteases ADAMTS4 and ADAMTS5 (disintegrins and metalloproteinases with thrombospondin motifs 4 and 5) are expressed in human glioblastomas. *Int J Cancer* 118(1): 55-61

- Hess I (2002): Von Chondrozyten exprimierte Gene als Ausgangspunkt zur Identifizierung und Charakterisierung Osteoarthritis-relevanter Faktoren, Diplomarbeit Dezember 2002 im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Horton WA, Lunstrum GP (2002): Fibroblast growth factor receptor 3 mutations in achondroplasia and related forms of dwarfism. *Rev Endocr Metab Disord.* 3(4): 381-5
- Horton WA, Hall JG, Hecht JT (2007): Achondroplasia *The Lancet* 370 (9582): 162-72
- Hui W, Barksby HE, Young DA, Cawston TE, McKie N, Rowan AD (2005): Oncostatin M in combination with tumour necrosis factor  $\alpha$  induces a chondrocyte membrane associated aggrecanase that is distinct from ADAMTS aggrecanase-1 or -2. *Ann Rheum Dis.* 64(11): 1624-32
- Hunziker EB, Quinn TM, Hauselmann HJ (2002): Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 564-72
- Ihle JN (1996): STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 84(3): 331-4
- Ingham PW, McMahon AP (2001): Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 15: 3059-3087
- Jallali N, Ridha H, Thrasivoulou C, Underwood C, Butler PE, Cowen T (2005): Vulnerability to ROS-induced cell death in ageing articular cartilage: the role of antioxidant enzyme activity. *Osteoarthritis Cartilage* 13(7): 614-22
- Jellinek DA, Chang AC, Larsen MR, Wang X, Robinson PJ, Reddel RR (2000): Stanniocalcin 1 and 2 are secreted as phosphoproteins from human fibrosarcoma cells *Biochem. J.* 350:453-461
- Jiang WQ, Chang AC, Satoh M, Furuichi Y, Tam PP, Reddel RR (2000): The distribution of stanniocalcin 1 protein in fetal mouse tissues suggests a role in bone and muscle development. *J Endocrinology* 165: 457-466
- Johnson GL, Lapadat R (2002): Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases *Science* 298(5600): 1911-1912
- Johnston J, Ramos-Valdes Y, Stanton LA, Ladhani S, Beier F, Dimattia GE (2010): Human stanniocalcin-1 or -2 expressed in mice reduces bone size and severely inhibits cranial intramembranous bone growth. *Transgenic Res.* (6):1017-39
- Jüppner H (2000): Role of parathyroid hormone & related peptide and Indian hedgehog in skeletal development. *Pediatr Nephrol* 14: 606-11
- Kannan K, Givol D (2000): FGF receptor mutations: dimerization syndromes, cell growth suppression, and animal models. *IUBMB Life* 49(3): 197-205
- Karsenty G (1998): Genetics of Skeletogenesis. *Developm. Genetics* 22: 301-313
- Karsenty G (1999): The genetic Transformation of Bone Biology. *Genes & Dev.* 13: 3037-3051



- Karsenty G (2001): When developmental biology meets human pathology. *PNAS* 98: 5385-5386
- Karsenty G, Wagner EF (2002): Reaching a Genetic and Molecular Understanding of Skeletal Development. *Developmental Cell* 2: 389-406
- Kawaguchi H (2008): Endochondral ossification signals in cartilage degradation during osteoarthritis progression in experimental mouse models. *Mol Cells*. 25(1): 1-6
- Kellum R, Schedl P (1991): A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains. *Cell*. 64(5): 941-50
- Kimura S, Shiota K (1996): Sequential changes of programmed cell death in developing fetal mouse limbs and its possible roles in limb morphogenesis. *J Morphol* 229: 337-346
- Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, Jerecic J, Ullmer C, Lübbert H, Bujard H (1996): Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93: 10933-10938
- Knudson W, Loeser RF (2002): CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis. *Cell Mol Life Sci*. 59: 36-44
- Kokenyesi R, Tan L, Robbins JR, Goldring MB (2000): Proteoglycan production by immortalized human chondrocyte cell lines cultured under conditions that promote expression of the differentiated phenotype. *Arch Biochem Biophys*. 383(1): 79-90
- Koshy PJ, Lundy CJ, Rowan AD, Porter S, Edwards DR, Hogan A, Clark IM, Cawston TE (2002): The modulation of matrix metalloproteinase and ADAM gene expression in human chondrocytes by interleukin-1 and oncostatin M: a time-course study using real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum* 46(4): 961-7
- Kouhara H, Hadari YR, Spivak-Kroizman T, Schilling J, Bar-Sagi D, Lax I, Schlessinger J (1997): A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* 89(5): 693-702
- Kraus P, Fraidtenraich D, Loomis CA (2001): Some distal limb structures develop in mice lacking Sonic hedgehog signaling. *Mech. Dev.* 100 (1): 45-58
- Kraus VB, Huebner JL, Stabler T, Flahiff CM, Setton LA, Fink C, Vilim V, Clark AG (2004): Ascorbic acid increases the severity of spontaneous knee osteoarthritis in a guinea pig model. *Arthritis Rheum* 50(6): 1822-31
- Krejci P, Masri B, Fontaine V, Mekikian PB, Weis M, Prats H, Wilcox WR. (2005): Interaction of fibroblast growth factor and C-natriuretic peptide signaling in regulation of chondrocyte proliferation and extracellular matrix homeostasis. *J Cell Science* 118: 5089-100
- Krejci P, Salazar L, Goodridge HS, Kashiwada TA, Schibler MJ, Jelinkova P, Thompson LM, Wilcox WR (2008): STAT1 and STAT3 do not participate in FGF-mediated growth arrest in chondrocytes. *Jour. Cell Sci.* 121: 272-81

- Krestel HE, Mayford MR, Seeburg PH, Sprengel R (2001): A GFP-equipped bidirectional expression module well suited for monitoring tetracycline-regulated gene expression in mouse. *Nucleic Acids Research* 29(7): 39-44
- Kuettner KE, Goldberg VM (1995): Osteoarthritic Disorders. American Academy of Orthopaedic Surgeons
- Lafeber FP, Flik G, Wendelaar Bonga SE, Perry SF (1988): Hypocalcin from Stannius corpuscles inhibits gill calcium uptake in trout. *Am J Physiol* 254: R891-R896
- Lakso M, Sauer B, Mosinger B Jr., Lee EJ, Manning RW, Yu SH, Mulder KL, Westphal H (1992): Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6232-6236
- Lax I, Wong A, Lamothe B, Lee A, Frost A, Hawes J, Schlessinger J (2002): The docking protein FRS2alpha controls a MAP kinase-mediated negative feedback mechanism for signaling by FGF receptors. *Mol Cell*. 10(4): 709-19
- Lazner F, Gowen M, Pavasovic D, Kola I (1999): Osteopetrosis and osteoporosis: two sides of the same coin. *Hum Mol Genet*. 8: 1839-1846
- Lee LG, Connell CR, Woo SL, Cheng RD, McArdle BF, Fuller CW, Halloran ND, Wilson RK (1992): DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effect of dyes and dNTPs on incorporation of dyeterminators and probability analysis of termination fragments. *Nucl. Acids Res.* 20 : 2471-2483
- Leeman M, Curran S, Murray GI (2002): The Structure, Regulation, and Function of Human Matrix Metalloproteinase-13, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 37(3): 149-166
- Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B (1997): SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol*. 17(4): 2336-46
- Legeai-Mallet L, Benoist-Lasselin C, Delezoide AL, Munnich A, Bonaventure J (1998): Fibroblast growth factor receptor 3 mutations promote apoptosis but do not alter chondrocyte proliferation in thanatophoric dysplasia. *J Biol Chem*. 273(21): 13007-14
- Legeai-Mallet L, Benoist-Lasselin C, Munnich A, Bonaventure J (2004): Overexpression of FGFR3, Stat1, Stat5 and p21Cip1 correlates with phenotypic severity and defective chondrocyte differentiation in FGFR3-related chondrodysplasias. *Bone*. 34(1): 26-36
- L'Hôte CG, Knowles MA (2005): Cell responses to FGFR3 signalling: growth, differentiation and apoptosis *Exp. Cell Res.* 304(2): 417-31
- Leonard WJ, O'Shea JJ (1998): Jaks and STATs: Biological implications. *Annu Rev Immunol* 16: 293-322
- Linke B (2006): Generierung eines *in vitro*-Modellsystems zur Charakterisierung der Aggrekanase ADAMTS-5, Diplomarbeit Februar 2006 im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

- Li C, Chen L, Iwata T, Kitagawa M, Fu XY, Deng CX (1999): A Lys644Glu substitution in fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) causes dwarfism in mice by activation of STATs and ink4 cell cycle inhibitors. *Hum Mol Genet.* 8(1): 35-44
- Li Z, Kong K, Qi W (2006): Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling. *Biochem Biophys Res Commun* 343(2): 345-350
- Lievens PM-J, Liboi E (2003): The thanatophoric dysplasia type II mutation hampers complete maturation of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3), which activates signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) from the endoplasmic reticulum *J Biol Chem.* 278(19): 17344-9
- Lievens PM, Mutinelli C, Baynes D, Liboi E (2004): The kinase activity of fibroblast growth factor receptor 3 with activation loop mutations affects receptor trafficking and signaling. *J Biol Chem.* 279(41): 43254-60
- Lievens PM, Roncador A, Liboi E (2006): K644E/M FGFR3 mutants activate Erk1/2 from the endoplasmic reticulum through FRS2 alpha and PLC gamma-independent pathways. *J Mol Biol.* 357(3): 783-92
- Little CB, Hughes CE, Curtis CL, Jones SA, Caterson B, Flannery CR (2002): Cyclosporin A inhibition of aggrecanase-mediated proteoglycan catabolism in articular cartilage. *Arthritis Rheum* 46: 124–129
- Little CB, Meeker CT, Golub SB, Lawlor KE, Farmer PJ, Smith SM, Fosang AJ (2007): Blocking aggrecanase cleavage in the aggrecan interglobular domain abrogates cartilage erosion and promotes cartilage repair. *J Clin Invest.* 117(6): 1627-36
- Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Himeno M, Narai S, Yamaguchi A, Komori T (2001): Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J. Cell Biol.* 155: 157-166
- Liu RQ, Trzaskos JM (2005): Aggrecanase: The Family and Its Inhibitors. *Cur Med Chem - Anti-Infl. & Anti-Allergy Agents* 4(3): 251-264
- Lizarraga G, Lichtler A, Upholt WB, Kosher RA (2002): Studies on the role of Cux1 in regulation of the onset of joint formation in the developing limb. *Dev Biol* 243: 44–54
- Lohmander LS (1991): Rolle und Bedeutung von Bindegewebsmarkern in Synovia und Serum in der Therapiekontrolle. *Therapeutische Zugänge zu Gelenkerkrankungen*, Zuckerschwerdt Verlag München, 28-36
- Loomis CA, Harris E, Michaud J, Wurst W, Hanks M, Joyner AL (1996): The mouse *Engrailed-1* gene and ventral limb patterning. *Nature* 382: 360-363
- Loughlin J (2005): The genetic epidemiology of human primary osteoarthritis: current status. *Expert Rev Mol Med.* 7(9): 1-12
- Lu M, Wagner GF, Renfro JL (1994): Stanniocalcin stimulates phosphate reabsorption by flounder renal proximal tubule in primary culture. *Am J Physiol* 267: R1356–R1362

- Lupu F, Terwilliger JD, Lee K, Segre GV, Efstratiadis A (2001): Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. *Dev. Biol.* 229: 141-162
- Madsen KL, Tavernini MM, Yachimec C, Mendrick DL, Alfonso PJ, Buergin M, Olsen HS, Antonaccio MJ, Thomson AB, and Fedorak RN (1998): Stanniocalcin: a novel protein regulating calcium and phosphate transport across mammalian intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 274: G96–G102
- Magne D, Bluteau G, Faucheux C, Palmer G, Vignes-Colombeix C, Pilet P, Rouillon T, Caverzasio J, Weiss P, Daculsi G, Guicheux J (2003): Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and apoptosis-associated mineralization: possible implication of apoptosis in the regulation of endochondral ossification. *J Bone Miner Res.* 18(8): 1430-42
- Majumdar MK, Chockalingam PS, Bhat RA, Sheldon R, Keohan C, Blanchet T, Glasson S, Morris EA (2008): Immortalized mouse articular cartilage cell lines retain chondrocyte phenotype and respond to both anabolic factor BMP-2 and pro-inflammatory factor IL-1. *J Cell Physiol* 215(1): 68-76
- Mankin HJ and Thrasher AZ (1975): Water content and binding in normal and osteoarthritic human cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 57: 76-80
- Maringer MH (2003): Ansatz zur Etablierung von konditional/reversiblen knock-out Mäusen für das zellspezifische T-Zell Onkogen SCL. Dissertation im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier J-P, Roughley PJ (2008): Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Prac & Res. Clin. Rheum* 22(2): 351-384
- Martel PJ (1999): Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 7: 371-373
- Martínez-Frías ML, de Frutos CA, Bermejo E, Nieto MA (2010): Review of the recently defined molecular mechanisms underlying thanatophoric dysplasia and their potential therapeutic implications for achondroplasia. *Am J Med Genet A* 152A(1): 245-55
- Mastbergen SC, Marijnissen AC, Vianen ME, van Roermund PM, Bijlsma JW, Lafeber FP (2006): The canine 'groove' model of osteoarthritis is more than simply the expression of surgically applied damage. *Osteoarthritis Cartilage* 14(1): 39-46
- McCudden CR, James KA, Hasilo C, Wagner GF (2002): Characterization of mammalian stanniocalcin receptors. Mitochondrial targeting of ligand and receptor for regulation of cellular metabolism. *J Biol Chem.* 277: 45249-45258
- Meleti Z, Shapiro IM, Adams CS (2000): Inorganic phosphate induces apoptosis of osteoblast-like cells in culture. *Bone* 27(3): 359-66
- Merino R, Macias D, Ganan Y, Economides AN, Wang X, Wu Q, Stahl N, Sampath KT, Varona P, Hurler JM (1999): Expression and function of Gdf-5 during digit skeletogenesis in the embryonic chick leg bud. *Dev Biol* 206: 33-45

- Minina E, Kreschel C, Naski MC, Ornitz DM, Vortkamp A (2002): Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev Cell.* 3(3): 439-49
- Miyazawa T, Ogawa Y, Chusho H, Yasoda A, Tamura N, Komatsu Y, Pfeifer A, Hofmann F, Nakao K (2002): Cyclic GMP-dependent protein kinase II plays a critical role in C-type natriuretic peptide-mediated endochondral ossification. *Endocrinology* 143(9): 3604-10
- Monsonogo-Ornan E, Adar R, Rom E, Yayon A (2002): FGF receptors ubiquitylation: dependence on tyrosine kinase activity and role in downregulation. *FEBS Lett.* 528(1-3): 83-9
- Morko J, Kiviranta R, Joronen K, Säämänen AM, Vuorio E, Salminen-Mankonen H (2005): Spontaneous development of synovitis and cartilage degeneration in transgenic mice overexpressing cathepsin K. *Arthritis Rheum* 52(12): 3713-7
- Mukhopadhyay K, Lefebvre V, Zhou G, Garofalo S, Kimura JH, de Crombrughe B (1995): Use of a new rat chondrosarcoma cell line to delineate a 119-base pair chondrocyte-specific enhancer element and to define active promoter segments in the mouse pro-alpha 1(II) collagen gene. *J Biol Chem.* 270(46): 27711-9
- Mullberg J, Althoff K, Jostock T, Rose JS (2000): The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology. *Eur. Cytokine Netw.* 11: 27-38
- Mundlos S, Otto F, Mundlos C *et al.* (1997): Mutations involving the transcription factor *Cbfa1* cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89: 773-779
- Mundlos S, Olsen BR (1997): Heritable Diseases of the Skeleton. Part II: Molecular insights into skeletal development-matrix Components and their Homeostasis. *The FASEB Jour.* 11(4): 227-233
- Mundlos S (2004): Entwicklung und Wachstum des Skeletts – biologische Grundlagen. *Genetik der Skelettdysplasien*, Verlag Medizinische Genetik 2004
- Murakami S, Balmes G, McKinney S, Zhang Z, Givol D, 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: 290–305
- Murgue B, Tsunekawa S, Rosenberg I, de Beaumont M, Podolsky DK (1994): Identification of a novel variant form of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3 IIIb) in human colonic epithelium. *Cancer Res.* 54: 5206–5211
- Murray GI (2001): Matrix metalloproteinases: a multifunctional group of molecules *Journal of Pathology* 195(2): 135-7
- Nagase H, Kashiwagi M (2003): Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther* 5(2): 94-103
- Nakao K, Ogawa Y, Suga S, Imura H (1992a): Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. I: Natriuretic peptides. *J. Hypertens.* 10: 907–912

- Nakao K, Ogawa Y, Suga S, Imura H (1992b): Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. II: Natriuretic peptide receptors. *J. Hypertens.* 10: 1111–1114
- Nardi JB, Martos R, Walden KK, Lampe DJ, Robertson HM (1999): Expression of lacunin, a large multidomain extracellular matrix protein, accompanies morphogenesis of epithelial monolayers in *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29: 883–897
- Negishi Y, Ui N, Nakajima M, Kawashima K, Maruyama K, Takizawa T, Endo H (2001): p21<sup>Cip-1/Sdi-1/Waf-1</sup> gene is involved in chondrogenic differentiation of ATDC5 cells in vitro. *J Biol Chem* 276: 33249–56
- Niswander L (2003): Pattern formation: old models out on a limb. *Nat Rev Genet* (2): 133–43
- No D, Yao TP, Evans RM (1996): Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3346–3351
- Nowroozi N, Raffioni S, Wang T, Apostol BL, Bradshaw RA, Thompson LM (2005): Sustained ERK1/2 but not STAT1 or 3 activation is required for thanatophoric dysplasia phenotypes in PC12 cells. *Hum Mol Genet.* 14(11): 1529–38
- Olsen HS, Cepeda MA, Zhang QQ, Rosen CA, and Vozzolo BL (1996): Human stanniocalcin: a possible hormonal regulator of mineral metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1792–1796
- Orban PC, Chui D, Marth JD (1992): Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6861–6865
- Ornitz DM, Marie PJ (2002): FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Gene and Development* 16: 1446–1465
- Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GWH, Beddington RSP, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, M. Owen J (1997): *Cbfa1*, a Candidate Gene for Cleidocranial Dysplasia Syndrome, Is Essential for Osteoblast Differentiation and Bone Development. *Cell* 89: 765–771
- Ovchinnikov DA, Deng JM, Ogunrinu G, Behringer RR (2000): *Col2a1*-directed expression of Cre recombinase in differentiating chondrocytes in transgenic mice. *Genesis* 26(2): 145–6
- Ozasa A, Komatsu Y, Yasoda A, Miura M, Sakuma Y, Nakatsuru Y, Arai H, Itoh N, Nakao K (2005): Complementary antagonistic actions between C-type natriuretic peptide and the MAPK pathway through FGFR-3 in ATDC5 cells. *Bone* 36(6): 1056–64
- Pacifici M, Koyama E, Shibukawa Y, Wu C, Tamamura Y, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M (2006): Cellular and Molecular Mechanisms of Synovial Joint and Articular Cartilage Formation *Ann NY Acad Sci.* 1068: 74–86
- Paciga M, McCudden CR, Londos C, DiMattia GE, Wagner GF (2003): Targeting of big stanniocalcin and its receptor to lipid storage droplets of ovarian steroidogenic cells. *J Biol Chem.* 278: 49549–49554
- Palmiter RD, Brinster RL (1985): Transgenic mice. *Cell* 41: 343–345

- Parr BA, McMahon AP (1995): Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature* 374: 350-353
- Pikaart MJ, Recillas-Targa F, Felsenfeld G (1998): Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes & Development* 12: 2852-2862
- Pearson WR, Lipman DJ (1988): Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 2444-2448
- Pizette S, Abate-Shen C, Niswander L (2001): BMP controls proximodistal outgrowth, via induction of the apical ectodermal ridge, and dorsoventral patterning in the vertebrate limb. *Development* 128: 4463-4474
- Plaas A, Osborn B, Yoshihara Y, Bai Y, Bloom T, Nelson F, Mikecz K, Sandy JD (2007): Aggrecanolytic in human osteoarthritis: confocal localization and biochemical characterization of ADAMTS5-hyaluronan complexes in articular cartilages. *Osteoarthritis Cartilage* 15(7): 719-34
- Polinkovsky A, Robin NH, Thomas JT, Irons M, Lynn A, Goodman FR, Reardon W, Kant SG, Brunner HG, van der Burgt I *et al.* (1997): Mutations in CDMP1 cause autosomal dominant brachydactyly type C. *Nat. Genet.* 17: 18-19
- Pond MJ, Nuki G (1973): Experimentally induced osteoarthritis in the dog. *Ann Rheum Dis* 32: 387-388
- Poole AR, Guilak F, Abramson SB (2007): Etiopathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis: Diagnosis and medical/surgical management* 4<sup>th</sup> edition, Williams and Wikins, pp. 27-49
- Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR (2005): The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J* 386: 15-27
- Powell AJ, Little CB, Hughes CE (2007): Low molecular weight isoforms of the aggrecanases are responsible for the cytokine-induced proteolysis of aggrecan in a porcine chondrocyte culture system. *Arthritis Rheum.* 56(9): 3010–3019
- Pratta MA, Yao W, Decicco C, Tortorella MD, Liu RQ, Copeland RA, Magolda R, Newton RC, Trzaskos JM, Arner EC (2003): Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage. *J Biol Chem* 278: 45539-45545
- Pullig O, Pfander D, Swoboda B (2001): Molecular principles of induction and progression of arthrosis. *Orthopade* 30: 825-33
- Quasnicka HL, Anderson-MacKenzie JM, Tarlton JF, Sims TJ, Billingham ME, Bailey AJ (2005): Cruciate ligament laxity and femoral intercondylar notch narrowing in early-stage knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 52(10): 3100-9
- Raffioni S, Zhu YZ, Bradshaw RA, Thompson LM (1998): Effect of transmembrane and kinase domain mutations on fibroblast growth factor receptor 3 chimera signaling in PC12 cells. A model for the control of receptor tyrosine kinase activation. *J. Biol. Chem.* 273: 35250–35259

- Ramamurthy NS, Vernillo AT, Greenwald RA, Lee HM, Sorsa T, Golub LM, Rifkin BR (1993): Reactive oxygen species activate and tetracyclines inhibit rat osteoblast collagenase. *J Bone Miner Res* 8(10): 1247-53
- Reddi AH (2001): Interplay between bone morphogenetic proteins and cognate binding proteins in bone and cartilage development: noggin, chordin and DAN. *Arthritis Res* 3: 1-5
- Regauer MP (2009): Knochenneubildung und Knochendefektheilung durch den rekombinanten humanen Wachstumsfaktor Osteogenic Protein-1 (BMP-7). Dissertation im Fachbereich Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität München
- Reginato AM, Olsen BR (2002): The role of structural genes in the pathogenesis of osteoarthritic disorders. *Arthritis Res.* 4(6): 337-45
- Reginster JY (2007): The efficacy of glucosamine sulfate in osteoarthritis: financial and nonfinancial conflict of interest. *Arthritis Rheum* 56: 2105–2110
- Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C (1993): Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75: 1401-1416
- Riddle RD, Ensini M, Nelson C, Tsuchida T, Jessell TM, Tabin C (1995): Induction of the LIM homeobox gene *Lmx1* by WNT7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell* 83: 631-640
- Rintelen B *et al.* (2006): A meta-analysis of controlled clinical studies with diacerein in the treatment of osteoarthritis. *Arch Intern Med* 166: 1899–1906
- Rival-Gervier S, Pantano T, Viglietta C, Maeder C, Prince S, Attal J, Jolivet G, Houdebine LM (2003): The insulator effect of the 5'HS4 region from the beta-globin chicken locus on the rabbit WAP gene promoter activity in transgenic mice. *Transgenic Res* 12(6): 723-30
- Roark EF, Greer K (1994): Transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein-2 act by distinct mechanisms to promote chick limb cartilage differentiation in vitro. *Dev. Dyn.* 200: 103-16
- Robbins JR, Thomas B, Tan L, Choy B, Arbiser JL, Berenbaum F, Goldring MB (2000): Immortalized human adult articular chondrocytes maintain cartilage-specific phenotype and responses to interleukin-1beta. *Arthritis Rheum* 43(10): 2189-201
- Rogerson FM, Stanton H, East CJ, Golub SB, Tutolo L, Farmer PJ, Fosang AJ (2008): Evidence of a novel aggrecan-degrading activity in cartilage: Studies of mice deficient in both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Arthritis Rheum* 58(6): 1664-73
- Rosen B, Beddington RSP (1993): Whole-mount in situ hybridization in the mouse embryo: Gene expression in three dimensions. *Trends Genet.* 9: 162-167
- Rosenzweig A, Seidman C (1991): Atrial natriuretic factor and related peptide hormones. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 229-255
- Rowan AD (2001): Cartilage catabolism in arthritis: factors that influence homeostasis. *Expert Rev Mol Med.* 5: 1-20



- Rülicke T (2001): *Transgene, Transgenese, transgene Tiere: Methoden der nichthomologen DNA-Rekombination* Karger Publishers, ISBN: 3805571631
- Rydzziel S, Durant D, Canalis E (2000): Platelet-derived growth factor induces collagenase 3 transcription in osteoblasts through the activator protein 1 complex. *J. Cell. Physiol.* 184: 326–33
- Saas J, Lindauer K, Bau B, Takigawa M, Aigner T (2004): Molecular phenotyping of HCS-2/8 cells as an in vitro model of human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 12(11): 924-34
- Saez E, Nelson MC, Eshelman B, Banayo E, Koder A, Cho GJ, Evans RM (2000): Identification of ligands and coligands for the ecdysone-regulated gene switch. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14512–14517
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- Sahni M, Ambrosetti DC, Mansukhani A, Gertner R, Levy D, Basilico C (1999): FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes Dev.* 13: 1361-1366
- Sandy JD, Verscharen C (2001): Analysis of aggrecan in human knee cartilage and synovial fluid indicates that aggrecanase (ADAMTS) activity is responsible for the catabolic turnover and loss of whole aggrecan whereas other protease activity is required for C-terminal processing in vivo. *Biochem J* 358: 615-626
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 74 : 5463-5467
- Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heaney S *et al.* (2000): Mxs2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat. Genet.* 24: 391-395
- Saunders JW (1948): The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *J Exp Zool.* 108: 363-403
- Schenkel J (1995): "Transgene Tiere" Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg
- Schultze N, Burki Y, Lang Y, Certa U, Bluethmann H (1996): Efficient control of gene expression by single step integration of the tetracycline system in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 14: 499–503
- Schulz S(2005):C-type natriuretic peptide and guanylyl cyclase B receptor. *Pep.* 26:1024-34
- Schwab G. (2007): *Habilitationsschrift: Molekulare Grundlagen von Organmalformationen am Beispiel kongenitaler Extremitätenfehlbildungen und eines Lateralisierungsdefekts* Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

- Schwartz ER, Oh WH, Leveille CR (1981): Experimentally induced osteoarthritis in guinea pigs: metabolic responses in articular cartilage to developing pathology. *Arthritis Rheum* 24(11): 1345-55
- Searls RL, Janners MY (1971): The initiation of limb bud outgrowth in the embryonic chick. *Dev Biol* 24: 198–213
- Seeger R, Krebs EG (1995): The MAPK signaling cascade *FASEB J.* 9(9): 726-735
- Settle SH Jr, Rountree RB, Sinha A, Thacker A, Higgins K, Kingsley DM (2003): Multiple joint and skeletal patterning defects caused by single and double mutations in the mouse *Gdf5* and *Gdf6* genes. *Dev Biol* 254: 116–130
- Sherr CJ, Roberts JM (1999): CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13: 1501–12
- Shieh HS, Mathis KJ, Williams JM, Hills RL, Wiese JF, Benson TE, Kiefer JR, Marino MH, Carroll JN, Leone JW, Malfait AM, Arner EC, Tortorella MD, Tomasselli A (2008): High resolution crystal structure of the catalytic domain of ADAMTS-5 (aggrecanase-2). *J Biol Chem* 283(3): 1501-7
- Smith RL (1999): Degradative enzymes in osteoarthritis. *Front Biosci.* 15(4): D704-12
- Song RH, Tortorella MD, Malfait AM, Alston JT, Yang Z, Arner EC, Griggs DW (2007): Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5 *Arthritis Rheum* 56(2): 575-85
- Spater D, Hill TP, O'Sullivan R J, Gruber M, Conner DA, Hartmann C (2006): Wnt9a signaling is required for joint integrity and regulation of *Ihh* during chondrogenesis. *Development* 133: 3039-3049
- Spector TD, McGregor AJ (2004): Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage* 12 Suppl A: S39-44
- Spranger J (1997): Irrtümer der Skelettentwicklung. *Monatsschr Kinderheilkd.* 145: 334-341
- Stanton H, Rogerson FM, East CJ, Golub SB, Lawlor KE, Meeker CT, Little CB, Last K, Farmer PJ, Campbell IK, Fourie AM, Fosang AJ (2005): ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature* 434(7033): 648-52
- Stasko SE, Wagner GF (2001): Possible roles for stanniocalcin during early skeletal patterning and joint formation in the mouse. *J Endocrinology* 171: 237–248
- Stelzer C (2000): Molekulargenetische Untersuchungen von Komponenten des Knorpel-/Knochengewebes. Dissertation im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Stief A, Winter DM, Strätling WH, Sippel AE (1989): A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity. *Nature* 341(6240): 343-5

- St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP (1999): Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of Chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* 13: 2072-2086
- Storm EE, Huynh TV, Copeland NG, Jenkins NA, Kingsley DM, Lee SJ (1994): Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily. *Nature* 368: 639-643
- Storm EE, Kingsley DM (1996): Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. *Development* 1996 122(12): 3969-79
- Struglics A, Larsson S, Pratta MA, Kumar S, Lark MW, Lohmander LS (2006): Human osteoarthritis synovial fluid and joint cartilage contain both aggrecanase- and matrix metalloproteinase-generated aggrecan fragments. *Osteoarthritis Cartilage* 14: 101-113
- Su WC, Kitagawa M, Xue N, Xie B, Garofalo S, Cho J, Deng C, Horton WA, Fu XY (1997): Activation of Stat1 by mutant fibroblast growth-factor receptor in thanatophoric dysplasia type II dwarfism. *Nature* 386(6622): 288-92
- Suda M, Ogawa Y, Tanaka K, Tamura N, Yasoda A, Takigawa T, Uehira M, Nishimoto H, Itoh H, Saito Y, Shiota K, Nakao K (1998): Skeletal overgrowth in transgenic mice that overexpress brain natriuretic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2337–2342
- Summerbell D (1974): A quantitative analysis of the effect of excision of the AER from the chick limb-bud. *J Embryol Exp Morph.* 32: 651-660
- Sun X, Lewandoski M, Meyers EN, Liu Y, Maxson RE Jr., Martin GR (2000): Conditional inactivation of Fgf4 reveals complexity of signalling during limb bud development. *Nature Gen.* 25 (1): 83-86
- Sun X, Mariani FV, Martin GR (2002): Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature* 418: 501-508
- Superti-Furga A, Unger S (2007): Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2006 revision. *Am J Med Genet A.* 143(1): 1-18
- Szafranski JD, Grodzinsky AJ, Burger E, Gaschen V, Hung HH and Hunziker EB (2004): Chondrocyte mechanotransduction: effects of compression on deformation of intracellular organelles and relevance to cellular biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage* 12: 937-46
- Sztrolovics R, Recklies AD, Roughley PJ, Mort JS (2002): Hyaluronate degradation as an alternative mechanism for proteoglycan release from cartilage during interleukin-1beta-stimulated catabolism. *Biochem J.* 362(2): 473-9
- Tamura N, Doolittle LK, Hammer RE, Shelton JM, Richardson JA, Garbers DL (2004): Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(49): 17300-5
- Teitelbaum SL (2000): Bone Resorption of Osteoclasts. *Science* 289: 1504-1508

- Thomas L (1956): Reversible collapse of rabbit ears after intravenous papain, and prevention of recovery by cortisone. *J Exp Med* 104: 245-261
- Thomas JT, Lin K, Nanderkar M, Camargo M, Cervenka J, Luyten FP (1996): A human chondrodysplasia due to a mutation in a TGF-beta superfamily member. *Nat. Genet.* 12: 315-317
- Thomas JT, Kipatrick MW, Lin K, Erlacher L, Lembessis P, Costa T, Tsipouras P, Luyten FP (1997): Disruption of human limb morphogenesis by a dominant negativ mutation in CDMP1. *Nat. Genet.* 17: 58-64
- Tortorella MD, Pratta M, Liu RQ, Austin J, Ross OH, Abbaszade I, Burn T, Arner E (2000): Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1 (ADAMTS-4). *J Biol Chem* 275: 18566-18573
- Tortorella MD, Malfait AM, Deccico C, Arner E (2001): The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 9(6): 539-52
- Tortorella MD, Liu RQ, Burn T, Newton RC, Arner E (2002): Characterization of human aggrecanase 2 (ADAMTS5): substrate specificity studies and comparison with aggrecanase 1 (ADAM-TS4). *Matrix Biol* 21: 499-511
- Trost T (2005): Konditionale Modellsysteme zur Untersuchung der ERBB2-induzierten Tumorgenese. Dissertation im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Uria JA, Balbín M, López JM, Alvarez J, Vizoso F, Takigawa M, López-Otín C (1998): Collagenase-3 (MMP-13) expression in chondrosarcoma cells and its regulation by basic fibroblast growth factor. *Am J Pathol.* 153(1): 91-101
- Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, Hillen W (2000): Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 7963-8
- Utomo AR, Nikitin AY, Lee WH (1999): Temporal, spatial, and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice. *Nat Biotechnol.* 17(11): 1091-6
- Valdes AM, Loughlin J, Oene MV, Chapman K, Surdulescu GL, Doherty M, Spector TD (2007): Sex and ethnic differences in the association of ASPN, CALM1, COL2A1, COMP, and FRZB with genetic susceptibility to osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 56(1): 137-46
- van den Berg WB (2008): Lessons from animal models of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 10(1): 26-9
- Vankemmelbeke MN, Holen I, Wilson AG, Ilic MZ, Handley CJ, Kelner GS, Clark M, Liu C, Maki RA, Burnett D, Buttle DJ (2001): Expression and activity of ADAMTS- 5 in synovium. *Eur J Biochem* 268: 1259-1268

- Varghese S, Rydziel S, and Canalis E (2000): Basic fibroblast growth factor stimulates collagenase-3 promoter activity in osteoblasts through an activator protein-1-binding site. *Endocrinology* 141: 2185–91
- Varghese R, Gagliardi AD, Bialek PE, Yee SP, Wagner GF, DiMattia GE (2002): Overexpression of human stanniocalcin affects growth and reproduction in transgenic mice. *Endocrinology* 143: 868-876
- Vortkamp A (2001): Interaction of growth factors regulating chondrocyte differentiation in the developing embryo. *Osteoarthritis Cartilage* 9 Suppl A: S109-17
- Wadhwa S, Embree MC, Kilts T, Young MF, Ameye LG (2005): Accelerated osteoarthritis in the temporomandibular joint of biglycan/fibromodulin double-deficient mice. *Osteoarthritis Cartilage* 13(9): 817-27
- Wagner GF, Hampong M, Park CM, Copp DH (1986): Purification, characterization, and bioassay of teleocalcin, a glycoprotein from salmon corpuscles of Stannius. *Gen Comp Endocrinol* 63: 481–491
- Wagner GF, Vozzolo BL, Jaworski E, Haddad M, Kline RL, Olsen HS, Rosen CA, Davidson MB, and Renfro JL (1997): Human Stanniocalcin inhibits renal phosphate excretion in the rat. *J Bone Miner Res* 12: 165–171
- Wagner GF, Dimattia GE (2006): The stanniocalcin family of proteins. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* 305(9): 769-80
- Walling HW, Chan PT, Omura TH, Barmina OY, Fiancco GJ, Jeffrey JJ, Partridge NC (1998): Regulation of the collagenase-3 receptor and its role in intracellular ligand processing in rat osteoblastic cells. *J. Cell. Physiol.* 177: 563–574
- Wallis GA (1996): Bone growth: Coordinating chondrocyte differentiation. *Curr Biol*, 6(12): 1577-1580
- Wan M, Yang C, Li J, Wu X, Yuan H, Ma H, He X, Nie S, Chang C, Cao X (2008): Parathyroid hormone signaling through low-density lipoprotein-related protein 6. *Genes Dev.* 22:2968–79
- Wang Y, O'Malley BW Jr., Tsai SY, O'Malley BW (1994): A regulatory system for use in gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8180-8184
- Wang E, Wang J, Chin E, Zhou J and Bondy CA (1995): Cellular patterns of insulin-like growth factor system gene expression in murine chondrogenesis and osteogenesis. *Endocrinology* 136: 2741-51
- Wang Y, Tsai SY, O'Malley BW (1999): Antiprogestin regulable gene switch for induction of gene expression in vivo. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 306: 281-294
- Wang Y, Spatz MK, Kannan K, Hayk H, Avivi A, Gorivodsky M, Pines M, Yayon A, Lonai P, Givol D (1999b): A mouse model for achondroplasia produced by targeting fibroblast growth factor receptor 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(8): 4455-60

- Wang Y, Morlandt AB, Xu X, Carnes DL Jr, Chen Z, Steffensen B (2005): Tetracycline at subcytotoxic levels inhibits matrix metalloproteinase-2 and -9 but does not remove the smear layer. *J Periodontol* 76(7): 1129-39
- Webster MK, Donoghue DJ (1997): FGFR activation in skeletal disorders: too much of a good thing. *Trends Genet.* 13(5): 178-82
- Wolfsberg TG, Primakoff P, Myles DG, White JM (1995): ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J.Cell Biol.* 131: 275-278
- Wong A, Lamothe B, Lee A, Schlessinger J, Lax I (2002): FRS2 alpha attenuates FGF receptor signaling by Grb2-mediated recruitment of the ubiquitin ligase Cbl. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(10): 6684-9
- Wu S, Yoshiko Y, De Luca F (2006): Stanniocalcin 1 Acts as a Paracrine Regulator of Growth Plate Chondrogenesis *J. Biol. Chem.* 281(8): 5120-5127
- Xu H, Lee KW, Goldfarb M (1998): Novel recognition motif on fibroblast growth factor receptor mediates direct association and activation of SNT adapter proteins. *J. Biol. Chem.* 273: 17987–17990
- Yamanaka Y, Tanaka H, Koike M, Nishimura R, Seino Y (2003): PTHrP rescues ATDC5 cells from apoptosis induced by FGF receptor 3 mutation. *J Bone Miner Res.* 18(8): 1395-403
- Yang X, Karsenty G (2002): Transcription factors in bone: developmental and pathological aspects. *Trend Mol. Med.* 8 (7): 340-345
- Yasoda A, Ogawa Y, Suda M, Tamura N, Mori K, Sakuma Y, Chusho H, Shiota K, Tanaka K, Nakao K (1998): Natriuretic peptide regulation of endochondral ossification. Evidence for possible roles of the C-type natriuretic peptide/guanylyl cyclase-B pathway. *J. Biol. Chem.* 273: 11695–11700
- Yasoda A, Komatsu Y, Chusho H, Miyazawa T, Ozasa A, Miura M, Kurihara T, Rogi T, Tanaka S, Suda M, Tamura N, Ogawa Y, Nakao K (2004): Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat Med.* 10(1): 80-6
- Yoshiko Y, Son A, Maeda S, Igarashi A, Takano S, Hu J, Maeda N (1999): Evidence for stanniocalcin gene expression in mammalian bone *Endocrinology* 140:1869–1874
- Yoshiko Y, Aubin J (2004): Stanniocalcin-1 as a pleiotropic factor in mammals *Peptides* 25: 1663-1669
- Zabel BU, Winterpacht A (2000): Osteochondrodysplasien - genetisch bedingte Störungen der Skelettentwicklung. In: Ganten, D. und Ruckpaul, K. (Hrsg.) *Handbuch der molekularen Medizin, Band 7: Monogen bedingte Erbkrankheiten, Teil 2.* Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York
- Zabel B (2004): FGFR3-Spektrum. *Genetik der Skelettdysplasien*, Verlag Medizinische Genetik 2004

Zajchowski DA, Kauser K, Zhu D, Webster L, Aberle S, White FA III., Liu HL, Humm R, MacRobbie J, Ponte P, Hegele-Hartung C, Knauthe R, Fritzemeier KH, Vergona R, Rubanyi GM (2000): Identification of selective estrogen receptor modulators by their gene expression fingerprints. *Journal of Biological Chemistry* 275: 15885-15894

Zelzer E, Olsen BR (2003): The genetic basis for skeletal diseases. *Nature* 423(6937): 343-8

Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler JE, Fujikawa K (2001): Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Biol. Chem.* 276: 41059–41063

Zhou G, Garofalo S, Mukhopadhyay K, Lefebvre V, Smith CN, Eberspaecher H, de Crombrughe B (1995): A 182 bp fragment of the mouse pro alpha 1(II) collagen gene is sufficient to direct chondrocyte expression in transgenic mice. *J Cell Sci.* 108 (P12): 3677-84

Zhou G, Lefebvre V, Zhang Z, Eberspaecher H, de Crombrughe B (1998): Three high mobility group-like sequences within a 48-base pair enhancer of the Col2a1 gene are required for cartilage-specific expression in vivo. *J Biol Chem.* 273(24): 14989-97

## 7 Anhang

### 7.1 Tabelle der *Microarray*-Ergebnisse

Gen	Regulation nach 48h Dox	UniGene
FGFR3: Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 3, transcript variant 1	17,39	Hs.1420
ESM1: Homo sapiens endothelial cell-specific molecule 1	3,141	Hs.129944
CHRNA7: Homo sapiens cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 7	3,002	Hs.511772
PREDICTED: Homo sapiens similar to KIAA1501 protein (LOC388255)	2,714	Hs.460661
PREDICTED: Homo sapiens similar to KIAA1501 protein (LOC388255)	2,477	Hs.460661
STC1: Homo sapiens stanniocalcin 1	2,429	Hs.25590
CAMK1G: Homo sapiens calcium/calmodulin-dependent protein kinase IG	2,429	Hs.199068
TNFSF15: Homo sapiens tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 1	2,334	Hs.241382

Gen	Regulation nach 48h Dox	UniGene
DKFZp761L1417: Homo sapiens hypothetical protein DKFZp761L1417	2,301	Hs.270753
DIO2: Homo sapiens deiodinase, iodothyronine, type II	2,09	Hs.202354



## **7.2 Lebenslauf**

### 7.3 Kongressbeiträge

Stelzer, C.; Rieck, M.; **Busch, J.**; Zabel, B.: Molecular identification of genes involved in skeletogenesis – potential candidates for Osteoarthritis; 14<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society of Human Genetics together with the Austrian Society of Human Genetics and the Swiss Society of Medical Genetics, Marburg, October 1<sup>st</sup>-4<sup>th</sup>, 2003

**Busch, J.**; Spangenberg, C.; Hess, I.; Zabel, B.; Stelzer, C.: Generating a temporal and cell type-specific transgenic mouse as a model for osteoarthritis; 8<sup>th</sup> World Congress of the OsteoArthritis Research Society International, Berlin, October 12<sup>th</sup>-15<sup>th</sup>, 2003

Stelzer, C.; **Busch, J.**; Spangenberg, C.; Zabel, B.: Generating a temporal and cell type-specific Adamts-5 transgenic mouse; European Human Genetics Conference in conjunction with the European Meeting on Psychosocial Aspects of Genetics in conjunction with the Annual Meeting of the German Society of Human Genetics together with the Austrian Society of Human Genetics and the Swiss Society of Medical Genetics, Munich, June 12<sup>th</sup>-15<sup>th</sup>, 2004

**Busch, J.**; Spangenberg, C.; Keller, B.; Lee, B.; Zabel, B.; Stelzer, C.: Generation of a mouse model to analyse the role of Adamts-5 in pathogenesis of osteoarthritis; 9<sup>th</sup> World Congress of the OsteoArthritis Research Society International, Chicago, December 2<sup>nd</sup>-5<sup>th</sup>, 2004

## **7.4 Danksagung**

## Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Jutta Busch