



Astrid Auge

Negative Regulation der Chondrozytenreifung:

**Differentielle Genexpression verschiedener Chondrozytenpopulationen des
embryonalen Hühnersternums**

2004

Biologie

Negative Regulation der Chondrozytenreifung:
Differentielle Genexpression verschiedener Chondrozytenpopulationen des
embryonalen Hühnersternums

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Astrid Auge
aus Rheine
2004

Dekan:	Prof. Dr. Alexander Steinbüchel
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Walter Stöcker
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Peter Bruckner
Tag der mündlichen Prüfung:	11.10.2004
Tag der Promotion:	22.10.2004

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Knorpelgewebe	1
1.1.1	Die extrazelluläre Matrix des hyalinen Knorpels	2
1.1.1.1	Kollagene des hyalinen Knorpels	3
1.1.1.2	Nicht-kollagene Matrixproteine des Knorpels	7
1.2	Entstehung und Aufbau der Wachstumsfuge	8
1.2.1	Enchondrale Ossifikation	9
1.2.2	Aufbau der Wachstumsfuge	10
1.3	Das embryonale Hühnersternum	13
1.3.1	Kultivierung sternaler Hühnerchondrozyten in serumfreier Agarosekultur	14
1.4	Chondrozytendifferenzierung	15
1.4.1	Differenzierungsmarker	15
1.4.2	Regulation der Chondrozytendifferenzierung	16
1.4.2.1	Einfluss der ECM	17
1.4.2.2	Parakrine Regulation	18
1.4.2.3	Einfluss löslicher Faktoren	19
1.4.2.3.1	Vitamin D-Metabolite	19
1.4.2.3.2	Retinoinsäure	20
1.4.2.3.3	Insulin und <i>Insulin-like Growth Factor</i>	22
1.4.2.3.4	Thyroidhormone	23
1.4.2.3.5	TGF- β -Familie	24
1.4.2.3.6	<i>Bone morphogenetic proteins</i> , BMPs	25
1.4.2.3.7	<i>Fibroblast Growth Factor</i>	26
1.4.2.3.8	PTHrP	28
1.4.2.3.9	<i>Indian Hedgehog</i>	29
1.4.2.3.10	Wnts	30
1.4.2.4	Regulation durch Transkriptionsfaktoren	31
1.4.2.4.1	Runx2/Cbfa1	31
1.4.2.4.2	Sox-Familie	32
1.4.2.4.3	<i>Nuclear Factor I</i> (NF-I)	33
1.5	Fragestellung der Arbeit	35
2.	Material und Methoden	36
2.1	Zellbiologische Methoden	36
2.1.1	Sternapräparation aus Hühnerembryonen	36
2.1.2	Chondrozytenisolierung	36
2.1.3	Agarose-Suspensionskulturen	37
2.1.4	Monolayerkultur	38
2.1.5	Transfektion von Chondrozyten	38
2.1.6	Immunfluoreszenz	38
2.2	Proteinchemische Methoden	40
2.2.1	Isolierung nukleärer und cytosolischer Proteine	40
2.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	40

2.2.3	Western-Blot und Immundetektion	41
2.2.4	Autoradiographie	42
2.2.5	Kollagenpräparation aus Zellkulturmedium	42
2.2.6	Bestimmung der Alkalischen Phosphatase	43
2.3	Molekularbiologische Methoden	43
2.3.1	Verwendete Bakterienstämme	43
2.3.2	Nährmedien und Nährmedienzusätze	44
2.3.3	Bakterienkultivierung und Stammhaltung	44
2.3.4	Vektoren	45
2.3.5	Primer	46
2.3.5.1	Primer zur Generierung des Volllänge-Klons von NF-I/A-1 aus Huhn	46
2.3.5.2	Primer zur Sequenzierung des kodierenden Bereiches der NF-I/A-1-cDNA	47
2.3.5.3	Primer zur Generierung der notwendigen Punktmutationen in der NF-I/A-1-cDNA	47
2.3.5.4	Primer zur Herstellung der NF-I/A-1-Sonde	47
2.3.5.5	Primer für den PCR-Nachweis der Isoformen von NF-I/A	48
2.3.5.6	Primer für den Einsatz im Subtraktions-Kit	48
2.3.5.7	Primer für den Nachweis von <i>Housekeeping</i> -Genen	49
2.3.6	Isolierung von RNA	49
2.3.7	Isolierung von mRNA	49
2.3.8	Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese	50
2.3.9	cDNA-Synthese	51
2.3.9.1	Reverse Transkription	51
2.3.9.2	PCR cDNA-Synthese	51
2.3.9.3	Säulen-Chromatographie	52
2.3.10	Plasmidisolierung	53
2.3.10.1	QIAprep-Spin-Miniprep-Kit	53
2.3.10.2	HiSpeed-Plasmid-Midi-Kit	53
2.3.11	Fällung von Nukleinsäuren	53
2.3.12	Quantifizierung von Nukleinsäuren	54
2.3.13	PCR-Reaktionen	54
2.3.14	Reinigung von Nukleinsäuren durch Gelextraktion	55
2.3.15	DNA-Gelelektrophorese	55
2.3.16	Zwischenklonierung mit dem TOPOTMTA-Cloning System	56
2.3.17	Generierung kohäsiver Enden von cDNA-Inserts und Vektoren	56
2.3.18	Ligation der NF-I/A-1-cDNA mit dem phrGFP-C bzw. pCMV-Tag-4A Expressionsvektoren	56
2.3.19	Ligationsüberprüfung	57
2.3.20	Transformation von <i>E.coli</i> Bakterien	57
2.3.21	Mutagenese zur Korrektur der NF-I/A-1-cDNA	58
2.3.22	Herstellung einer subtraktiven cDNA-Bank	58
2.3.22.1	cDNA-Synthese	59
2.3.22.2	Restriktionsverdau mit <i>RsaI</i>	59
2.3.22.3	Adapterligation	60
2.3.22.4	Subtraktive Hybridisierung	61
2.3.22.5	PCR-Amplifikation	61
2.3.22.6	PCR-Analyse der Subtraktionseffizienz	62

2.3.23	<i>Differentielles Screening der subtrahierten cDNA</i>	62
2.3.23.1	<i>Nucleo-Trap-Nucleic-Acid-Purification-Kit</i>	63
2.3.23.2	T/A-Klonierung	63
2.3.23.3	cDNA-Array	63
2.3.23.3.1	Bakterienkolonie-PCR	63
2.3.23.3.2	cDNA-Dot Blots	64
2.3.23.4	Kolonie-Array	64
2.3.23.5	Radioaktive Markierung von subtrahierter und unsubtrahierter cDNA	64
2.3.23.6	Hybridisierung der Dot Blots	65
2.3.24	Herstellung und radioaktive Markierung von cDNA-Sonden	66
2.3.25	<i>Southern Blotting</i>	66
2.3.26	<i>Northern Blotting</i>	67
2.3.27	Hybridisierung membrangebundener Nukleinsäuren	67
2.3.28	Sequenzierung	67
2.3.29	Sequenzanalysen im Internet	68
2.4	Verwendete Lösungen und Reagenzien	68
3.	Ergebnisse	70
3.1	Erstellung einer subtraktiven cDNA-Bank	70
3.1.1	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	72
3.1.2	Analyse der Adapterligation	73
3.1.3	Analyse der PCR-Amplifikationen und Kontrolle der Subtraktion	75
3.1.4	PCR-Analyse der Subtraktionseffizienz	76
3.1.5	Analyse der subtraktiven Bibliothek durch differentielles <i>Screening</i>	78
3.1.5.1	Vergleich von cDNA-Dot Blots und Kolonie-Dot Blots mit Klonen des Screenings A der subtraktiven Bibliothek	81
3.1.5.2	Vergleich von cDNA-Dot Blots des Screenings B der subtraktiven Bibliothek	85
3.1.5.3	Vergleich von cDNA-Dot Blots des Screenings C der subtraktiven Bibliothek	87
3.1.6	Sequenzergebnisse der differentiell exprimierten Klone	88
3.1.7	Vergleich der Expression ausgewählter Klone in kaudalen und kranialen Chondrozyten	94
3.1.7.1	Überprüfung der Ergebnisse des differentiellen Screenings durch <i>Virtual Northern Blots</i>	94
3.1.7.2	Überprüfung der Ergebnisse des differentiellen Screenings durch <i>Northern Blots</i>	96
3.2	Funktion des Nuklear Faktors NF-I/A-1 bei der Hypertrophie embryonaler Hühnerchondrozyten	98
3.2.1	Identifikation der Isoformen des NF-I/A und Bestätigung der differentiellen Expression von NF-I/A-1 in Hühnerchondrozyten	98
3.2.2	Amplifikation der vollständigen NF-I/A-1-Sequenz	100
3.2.3	Klonierung der Vollängesequenz des NF-I/A-1 in Expressionsvektoren	103

3.2.4	Transfektion primärer Hühnerchondrozyten und Überexpression des Transkriptionsfaktors NF-I/A-1	104
3.2.5	Einfluss von NF-I/A-1 auf die Hypertrophie kranialer Chondrozyten	108
4.	Diskussion	114
4.1	Erstellung einer subtraktiven cDNA-Bank	116
4.1.1	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	117
4.1.2	Analyse der Subtraktionseffizienz	118
4.1.3	Analyse der subtraktiven Bibliothek durch differentielles Screening	119
4.1.4	Sequenzergebnisse der differentiell exprimierten Klone	120
4.1.5	Expression ausgewählter cDNA-Klone in kaudalen und kranialen Chondrozyten	121
4.2	Funktion des Transkriptionsfaktors NF-I/A-1 bei der Hypertrophie embryonaler Hühnerchondrozyten	125
4.2.1	Transfektion primärer Hühnerchondrozyten und Überexpression des Transkriptionsfaktors NF-I/A-1	126
4.2.2	Einfluss von NF-I/A-1 auf die Hypertrophie kranialer Chondrozyten	127
4.2.2.1	Repression der Hypertrophie kranialer Chondrozyten durch NF-I/A-1	128
4.2.2.2	Stimulation der Kollagen X-Synthese durch NF-I/A-1	132
4.3	Regulation der Chondrozytendifferenzierung durch verschiedene Transkriptionsfaktoren	135
4.4	Ausblick	139
5.	Zusammenfassung	141
6.	Literatur	143
7.	Anhang	169
7.1	Sequenzen der potentiell hochregulierten Gene in kaudalen Chondrozyten	169
7.1.1	Sequenzen des ersten Screenings A	169
7.1.2	Sequenzen des ersten Screenings B	171
7.1.3	Sequenzen des ersten Screenings C	175
7.2	Vektorkarten	182
7.2.1	Zwischenklonierungsvektor pCR[®] II-TOPO	182
7.2.2	Expressionsvektor phrGFP-C	183
7.2.3	Expressionsvektor pCMV-Tag-4A	184
7.3	Protein- und cDNA-Sequenz des NF-I/A-1 aus Huhn	185

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Schematische Darstellung der enchondralen Ossifikation	9
Abbildung 1.2	Schnitt durch den proximalen Teil einer Rattentibia	10
Abbildung 1.3	Schematische Darstellung des Sternums und Verhalten der daraus gewonnenen kranialen und kaudalen Chondrozyten <i>in vitro</i>	15
Abbildung 3.1	Schema der suppressiven subtraktiven Hybridisierung (SSH), <i>forward reaction</i>	71
Abbildung 3.2	Schema der SMART-cDNA-Synthese	73
Abbildung 3.3	PCR-Analyse der Ligationseffizienz	74
Abbildung 3.4	Analyse der PCR-Amplifikationen	76
Abbildung 3.5	PCR-Analyse der GAPDH-Expression nach subtraktiver Hybridisierung	77
Abbildung 3.6	Produkte der Bakterienkolonie-PCRs der <i>Screenings</i> A, B und C	79
Abbildung 3.7	Vergleich der Kolonie-Dot Blots von Klonen der subtraktiven Bibliothek, <i>Screening</i> A	81
Abbildung 3.8	Vergleich der Dot Blots von Klonen der subtraktiven Bibliothek, <i>Screening</i> A	83
Abbildung 3.9	Vergleich der Dot Blots von Klonen der subtraktiven Bibliothek, <i>Screening</i> B	85
Abbildung 3.10	Vergleich der Dot Blots von Klonen der subtraktiven Bibliothek, <i>Screening</i> C	87
Abbildung 3.11	Vergleich der Genexpression von Klonen der subtraktiven Bibliothek durch <i>Virtual Northern</i> Blots	95
Abbildung 3.12	Vergleich der Expression von Klonen der subtraktiven Bibliothek durch <i>Northern</i> Blots	96
Abbildung 3.13	NF-I/A-Spleißvarianten in Chondrozyten	99
Abbildung 3.14	Differentielle Expression des Transkriptionsfaktors NF-I/A-1 in kaudalen und kranialen Chondrozyten	100
Abbildung 3.15	Primersequenzen zur Herstellung des NF-I/A-1-Volllängeklons	101
Abbildung 3.16	PCR zur Konstruktion des Volllängeklons von NF-I/A-1	101
Abbildung 3.17	NF-I/A-Spleißvarianten in der Leber	102
Abbildung 3.18	PCR der Plasmidpräparationen mit NF-I/A-1-Primern	102
Abbildung 3.19	GFP-Expression in mit dem Vektor phrGFP-C transfizierten Chondrozyten	104
Abbildung 3.20	Immunfluoreszenzen transfizierter kranialer Chondrozyten	106
Abbildung 3.21	Immunodetektion der NF-I/A-1-Expression in transfizierten kranialen Chondrozyten	107
Abbildung 3.22	Morphologische Veränderungen transfizierter Chondrozyten während einer Kulturdauer von 14 Tagen	108
Abbildung 3.23	Kollagen X-Expression transfizierter und nicht-transfizierter Chondrozyten nach Stimulation mit Insulin, I	109
Abbildung 3.24	Kollagen X-Expression transfizierter und nicht-transfizierter Chondrozyten nach Stimulation mit IGF-I	111
Abbildung 3.25	Kollagen X-Expression transfizierter und nicht-transfizierter Chondrozyten nach Stimulation mit Insulin, II	112
Abbildung 7.1	Vektorkarte des Zwischenklonierungsvektors pCR II-TOPO	182
Abbildung 7.2	Vektorkarte des Expressionsvektors phrGFP-C	183
Abbildung 7.3	Vektorkarte des Expressionsvektors pCMV-Tag-4A	184
Abbildung 7.4	cDNA- und Proteinsequenz des NF-I/A-1 aus Huhn	185

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Proteoglykane und nicht-kollagene Matrixproteine des Knorpels	8
Tabelle 2.1	Verwendete Bakterienstämme	43
Tabelle 2.2	Kommerzielle Vektoren	45
Tabelle 2.3	Konstruierte Vektoren	45
Tabelle 2.4	Sequenzierungsprimer	47
Tabelle 2.5	Mutationsprimer	47
Tabelle 2.6	NF-I/A-1-Sondenprimer	47
Tabelle 2.7	Isoformen-Primer	48
Tabelle 2.8	Primer des Subtraktions-Kits	48
Tabelle 2.9	<i>Housekeeping</i> -Gen-Primer	49
Tabelle 2.10	Ligationsansätze der direkten Klonierung	57
Tabelle 3.1	Gesamt-RNA Ausbeute aus kranialen und kaudalen Chondrozyten	72
Tabelle 3.2	Übersicht über die Ergebnisse des Screenings A	84
Tabelle 3.3	Übersicht über die Ergebnisse des Screenings B	86
Tabelle 3.4	Übersicht über die Ergebnisse des Screenings C	88
Tabelle 3.5	Ergebnisse der BLAST-Analyse von 2002	90
Tabelle 3.6	Ergebnisse der BLAST-Analyse vom März 2004	92

Abkürzungsverzeichnis

ALP	alkalische Phosphatase
Amp	Ampicillin
AP-1	<i>activator protein-1</i>
AS	Aminosäure
BLAST	<i>basic local alignment and search tool</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BMPR	<i>bone morphogenetic protein receptor</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Cbfa	<i>core binding factor</i>
cDNA	komplementäre DNA
CD-RAP	<i>cartilage-derived retinoic acid responsive protein</i>
CILP	<i>cartilage intermediate layer protein</i>
CMP	<i>cartilage matrix protein</i>
COMP	<i>cartilage oligomeric protein</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	entionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco`s modifiziertes Eagle Medium
DMEM/F12	DMEM/Ham`s F-12 mit L-Glutamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
<i>DpnI</i>	<i>Diplococcus pneumoniae</i>
ds	<i>double strand</i>
DS-PG	<i>dermatan sulfate proteoglycan</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EDM2	multiple epiphysäre Dysplasie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
FKS	fötales Kälberserum
GAG	Glykosaminoglykan
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GDF	<i>growth and differentiation factor</i>
gla	<i>gamma-carboxyglutamic acid</i>
gp	<i>glycoprotein</i>
GPOF	<i>growth plate-orienting factor</i>
IGF-I	<i>insulin-like growth factor I</i>
IGFBP	IGF-Bindungsprotein
Ihh	<i>Indian Hedgehog</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LB	Luria Bertani
LEF-1	<i>lymphoid-enhancing factor-1</i>
LTBP	<i>latent TGF-β binding protein</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>

β-ME	β-Mercaptoethanol
MMP	Matrixmetalloproteinase
MT-MMP	<i>membrane-type</i> Matrixmetalloproteinase
NaF	Natriumfluorid
NF	Nuklear Faktor
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	<i>proline- and arginine-rich protein</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PG	Proteoglykan
PKA	Protein Kinase A
POD	Meerettich-Peroxidase
PRELP	<i>proline- and arginine-rich end leucine-rich repeat protein</i>
PTH	<i>parathyroid hormone</i>
PTHR	<i>parathyroid hormone receptor</i>
PTHrP	<i>parathyroid hormone-related peptide</i>
RA	<i>retinoic acid</i>
RAR	<i>retinoic acid receptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
<i>RsaI</i>	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>
RT	Raumtemperatur/Reverse Transkriptase
Runx	<i>run-related</i>
RXR	<i>retinoic X receptor</i>
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i>
<i>SacI</i>	<i>Streptomyces achromogenes</i>
<i>Sall</i>	<i>Streptomyces albus</i>
SMCD	Schmid's metaphysäre Chondrodysplasie
ss	<i>single strand</i>
SZP	<i>superficial zone protein</i>
T ₃	Trijodothyronin
T ₄	Thyroxin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCF	T-Zellfaktor
TGF-β	<i>transforming growth factor-β</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TR	Thyroid-Kernrezeptor
VDR	Vitamin D-Rezeptor
Vol.	Volumen
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactosid

1. Einleitung

In mehrzelligen Organismen stellt die extrazelluläre Matrix (ECM) ein komplexes, aber geordnetes Geflecht zellumgebender Makromoleküle dar, die für den Zusammenhalt und die Dynamik des Gewebeverbandes sorgen. In den Bindegeweben nimmt die ECM im allgemeinen mehr Raum ein als die sie produzierenden Zellen und bestimmt die physikalischen Eigenschaften des Gewebes. Neben dieser Aufgabe als Struktur gebendes Netzwerk übt die Matrix aber auch Einfluss auf zelluläre Funktionen aus. Zell-Matrix-Interaktionen, vermittelt durch spezifische Zellrezeptoren bzw. durch Zell bindende Matrixmoleküle, spielen eine Rolle bei der Adhäsion und Migration, sowie bei der Differenzierung und Genexpression von Zellen. Weiterhin können Wachstumsfaktoren in der ECM gespeichert und zu den nötigen Zeitpunkten freigesetzt werden, wodurch die Morphogenese und der zelluläre Metabolismus beeinflusst werden (Behonick und Werb, 2003; Gelse et al., 2003).

Gebildet wird die ECM von unterschiedlichen, oft strukturell ähnlichen Makromolekülen, die sich in die Hauptklassen der Kollagene, Proteoglykane und strukturellen Glykoproteine unterteilen lassen (Aumailley und Gayraud, 1998; Adams und Watt, 1993; Hay, 1981).

Binde- und Stützgewebe zeichnen sich durch eine Formenvielfalt und ein entsprechendes breites Spektrum der ihnen obliegenden Funktionen aus. In der Gruppe der geformten Stützgewebe werden neben dem Sehngewebe die eigentlichen Skelettsubstanzen wie Knorpel- und Knochengewebe zusammengefasst. Diese Gewebe bilden lebensnotwendige Strukturen, welche die inneren Organe des Körpers schützen und die Körperform erhalten (Romer und Parsons, 1991).

1.1 Knorpelgewebe

Knorpel gehört zu den Binde- und Stützgeweben, die sich entwicklungsbiologisch vom Mesoderm ableiten (Krstic, 1988). In der ECM des Knorpels, die den weitaus größten Anteil dieses Gewebes ausmacht, sind einzeln oder in Gruppen die rund geformten Knorpelzellen (Chondrozyten) eingebettet. Sie stellen den einzigen Zelltyp dieses spezialisierten Gewebes dar. Der Knorpel ist weder innerviert noch vaskularisiert, was zur Folge hat, dass die

Chondrozyten mit den notwendigen Nährstoffen ausschließlich durch Diffusion aus dem Perichondrium, aus der Synovialflüssigkeit und aus dem subchondralen Knochen versorgt werden müssen. Aufgrund der Morphologie und Zusammensetzung der ECM wird Knorpel in drei Typen unterteilt (Horton, 1993; Temenoff und Mikos, 2000):

Elastischer Knorpel, der z.B. in der Ohrmuschel, der Ohrtrumpete, im äußeren Gehörgang und im Kehlkopfdeckel vorkommt, erhält seine Verformbarkeit und Biegsamkeit durch das Vorhandensein eines ausgeprägten Elastinnetzwerkes in der ECM. Er erscheint gelblich und besitzt keine kalzifizierten Bereiche.

Der am häufigsten vorkommende *hyaline Knorpel* ist biegsam und besitzt ein glasig homogenes, bläulich schimmerndes Erscheinungsbild. In Wirbeltieren ist er in zwei funktional verschiedenen Situationen, als permanenter Knorpel (z.B. in Gelenken) oder als Ersatzknorpel (z.B. in Wachstumsfugen), vorzufinden. Während der Entwicklung werden künftige Skelettanlagen aus hyalinem Knorpel gebildet, um dann später im Prozess der enchondralen Ossifikation durch Knochen ersetzt zu werden. Permanenter hyaliner Knorpel kommt im adulten Organismus neben den Gelenken in der Trachea, der Nase, dem Kehlkopf, den Bronchien und den Rippen vor.

Faserknorpel nimmt eine Zwischenstellung zwischen dem dichten Bindegewebe und dem hyalinen Knorpelgewebe ein und zeichnet sich durch eine sehnige Struktur aus. Die ECM besteht hier zum größten Teil aus Kollagenfasern. Man findet Faserknorpel in den Zwischenwirbelscheiben, der Schambeinfuge, dem Kiefergelenk und in den Menisci.

1.1.1 Die extrazelluläre Matrix des hyalinen Knorpels

Suprastrukturell besteht die ECM des hyalinen Knorpels aus zwei Komponenten: Charakteristisch gebänderte Fibrillen bilden ein dreidimensionales Netzwerk und sind von einer homogenen, raumfüllenden Matrix umgeben. Die Fibrillen bestehen zum größten Teil aus Kollagenen und gewährleisten die Beständigkeit des Knorpels gegen mechanische Spannung. Die Hauptbestandteile der extrafibrillären Matrix sind hydratisierte Proteoglykane, die für den hohen Kompressionswiderstand des Knorpels sorgen. Die funktionelle Einheit des hyalinen Knorpels wird als Chondron bezeichnet, das sich als Kapselstruktur aus einem

einzelnen Chondrozyten und der ihn konzentrisch umgebenden Matrix zusammensetzt. Hierbei variiert die Zusammensetzung der ECM in Abhängigkeit von der Distanz zum Chondrozyten. Die perizelluläre Matrix besteht aus einem dichten Proteoglykanmantel, der direkt der Plasmamembran der Zellen angelagert ist. Es folgt der territoriale Bereich, ein korbähnliches Netzwerk, welches aus tangential angeordneten Fibrillen und dünnen Filamenten besteht. Zufällig orientierte Fibrillen und Proteoglykane sind ebenfalls vorhanden. In der interterritorialen Matrix sind dickere Fibrillen in einer anderen Orientierung lokalisiert (Poole et al., 1984; Ratcliff et al., 1984).

1.1.1.1 Kollagene des hyalinen Knorpels

Kollagene gehören zu den Proteinen, deren charakteristisches Merkmal es ist, in wesentlichen Teilen tripelhelikal aufgebaut zu sein. Die Tripelhelix wird aus drei Polypeptidketten (α -Ketten) gebildet, wobei die α -Ketten eine (Gly-X-Y)_n-Sequenz aufweisen. Hierbei steht X häufig für Prolin und Y für Hydroxyprolin. Derzeit werden etwa 29 verschiedene Vertreter zu dieser heterogenen Proteingruppe gezählt, wobei im Knorpel unter physiologischen Bedingungen die Kollagene II, VI, IX, X, XI, XII, XIII, XIV, XVI, XX und XXVII vorkommen, welche unterschiedlich stark exprimiert werden und teilweise für verschiedene Differenzierungsstadien spezifisch sind (van der Rest und Garrone, 1991; Lai und Chu, 1996; Koch et al., 2001; Gelse et al., 2003; Pace et al., 2003). Kollagene bilden, zusammen mit anderen Kollagentypen oder ECM-Molekülen, viele verschiedene supramolekulare Strukturen der ECM, wobei die Fibrillenbildung einiger Kollagenspezies eine besondere Eigenschaft darstellt. Fibrillen weisen eine komplexe Struktur auf, und die verschiedenen Moleküle dürfen nicht isoliert betrachtet werden (Prockop und Kivirikko, 1995). Im embryonalen Hühnersternum z.B. sind in den heterotypischen Fibrillen der ECM die Kollagene II, IX und XI im Verhältnis 8:1:1 als eine Art Kopolymer vorhanden (Mendler et al., 1989).

Kollagen II

Kollagen II stellt die häufigste Komponente der quergestreiften Fibrillen im Knorpel (Mendler et al., 1989) und von knorpelähnlichen Geweben wie dem Glaskörper, der Cornea oder dem Nucleus pulposus dar. Es gehört zusammen mit den Kollagenen I, III, V und XI zu den fibrillenbildenden Kollagenen, die sich durch große (ca. 1000 AS) tripelhelikale Bereiche

auszeichnen. Sie werden als Prokollagene synthetisiert, und ihre N- und C-Propeptide werden extrazellulär durch spezifische Proteasen entfernt, wodurch erst die Bildung der Fibrillen ermöglicht wird. Die Tripelhelix des Kollagens II besteht aus drei identischen $\alpha 1$ -Ketten [$\alpha 1(\text{II})$]₃, die ein homotrimeres Molekül bilden, welches in der Größe und den biochemischen Eigenschaften dem Kollagen I ähnelt (Bruckner und van der Rest, 1994). Durch alternatives Spleißen wird Prokollagen II in zwei verschiedenen Varianten exprimiert. Dem Transkript IIB fehlt, im Gegensatz zu IIA, das Exon 2, welches für eine globuläre Cystein-reiche Domäne im N-terminalen Propeptid kodiert. Das Transkript IIA wird im prächondrogenen Mesenchym (Sandell et al., 1991), in Osteophyten (Matyas et al., 1997) sowie im Perichondrium oder in chondrogenen Tumoren (Aigner et al., 2000) detektiert. Der Wechsel der Expression von IIA zu IIB lässt eine unterschiedliche Rolle der Transkripte während des Entwicklungsprozesses vermuten, und die IIB-Variante repräsentiert einen spezifischen Marker für adulten Knorpel. Mutationen im humanen COL2A1-Gen führen zu unterschiedlich stark ausgeprägten Chondrodysplasien, die zu Knochendeformationen und Minderwuchs des Körpers führen (Williams und Jimenez, 1995; Olsen, 1996). Weitere Mutationen im Kollagen II-Gen sind bei 2 % der Patienten mit einer familiären frühen Osteoarthritis zu finden (Ritvaniemi et al., 1995).

Kollagen IX

Kollagen IX gehört zu der Gruppe der FACIT-*(fibril-associated collagens with interrupted triple helix)* Kollagenen (Shaw und Olsen, 1991). Die drei Ketten des heterotrimeren Kollagen IX-Moleküls, $\alpha 1(\text{IX})$, $\alpha 2(\text{IX})$ und $\alpha 3(\text{IX})$ formen tripelhelikale Domänen (COL1-3), welche durch globuläre, nicht-tripelhelikale Bereiche (NC1-4) unterbrochen sind (van der Rest und Garrone, 1991). Mit Ausnahme der N-terminalen NC4-Domäne der $\alpha 1(\text{IX})$ -Kette (243 AS-Reste) sind die anderen NC-Domänen relativ klein (< 30 AS-Reste). An der NC3-Domäne der $\alpha 2(\text{IX})$ Kette kann eine Chondroitinsulfatkette variabler Länge kovalent gebunden vorkommen (McCormick et al., 1987). Aufgrund eines alternativen Promotors wird die NC4-Domäne der $\alpha 1(\text{IX})$ -Kette nicht zwangsläufig exprimiert (Muragaki et al., 1990), so dass eine verkürzte Kollagen IX-Form existiert, die in verschiedenen embryonalen Geweben, wie dem Notochord, der Cornea und dem Glaskörper vorhanden ist (Swiderski und Solursh, 1992; Sovantaus et al., 1998).

Kollagen IX nimmt bei der Formierung der quergestreiften Fibrillen eine Schlüsselrolle ein, da es sechs verschiedene *Cross-linking sites* besitzt und somit als interfibrilläres

Adaptermolekül fungiert (Eyre et al., 2002). Durch spezifische Verankerungsbereiche haftet Kollagen IX antiparallel auf der Oberfläche von Kollagen II-Fibrillen (Wu et al., 1992). Eine „Gelenkregion“ in der NC3-Domäne erlaubt, dass diese Domäne aus der Fibrille herausragt und mit anderen Kollagen IX-Molekülen bzw. anderen Matrixkomponenten interagiert (Mayne, 1989; van der Rest und Mayne, 1988).

Das Ausschalten der $\alpha 1(\text{IX})$ -Kette (Fässler et al., 1994) führt zu einem funktionellen *Knock-out* des gesamten Kollagen IX-Proteins bei Mäusen (Hagg et al., 1997), woraus allerdings kein spezifischer Phänotyp resultiert. Homozygote *Knock-out*-Mäuse zeigen direkt nach der Geburt keine Abnormalitäten des Skelettes, entwickeln aber später eine Osteoarthrose-ähnliche Gelenkdestruktion. Obwohl bei diesen Mäusen Fibrillen mit einem knorpelspezifischen Durchmesser (20 nm) zu finden sind, ist die Matrix gegenüber mechanischen Verletzungen stärker empfindlich. Dieser Befund geht einher mit der propagierten Funktion von Kollagen IX, dass es für die Organisation und Stabilisierung von Knorpelfibrillen verantwortlich ist (Blaschke et al., 2000). Mutationen in den humanen COL9A1, -A2 und -A3 Genen führen zu multipler epiphysärer Dysplasie (EDM2), zu Osteoarthrose oder zu Schäden der Wirbelsäulenzwischenscheiben (Bonnemann et al., 2000; Annunen et al., 1999).

Kollagen XI

Kollagen XI wird im Knorpel als Heterotrimer aus den drei Polypeptidketten $\alpha 1(\text{XI})$, $\alpha 2(\text{XI})$ und $\alpha 3(\text{XI})$ gebildet (Eyre et al., 1987). Die Primärsequenz der $\alpha 3(\text{XI})$ -Kette ist identisch mit der Sequenz der $\alpha 2(\text{II})\text{B}$ -Kette, und die Unterschiede beider Ketten werden durch posttranslationale Modifikationen verursacht (von der Mark et al., 1999). Die $\alpha 1(\text{XI})$ -Kette kann Heterotrimere mit Kollagen V-Ketten bilden, die im Glaskörper und in Knochen gefunden werden (Niyibizi und Eyre, 1989; Bishop et al., 1994)). Kollagen XI bildet den Kern der quergestreiften Kollagen II-Heterofibrillen (Bateman et al., 1996). Punktmutationen in den humanen COL11A1- und COL11A2-Genen führen zu Abnormalitäten während der Skelett- und Augenentwicklung in Familien mit dem Stickler-Syndrom, welches eine spezifische Form der Chondrodysplasie darstellt (Vikkula et al., 1995). Die homozygote *cho/cho*-Maus exprimiert die $\alpha 1(\text{XI})$ -Polypeptidkette nicht und stirbt aufgrund schwerer Schäden bei der Knorpel- und Knochenentwicklung bei der Geburt. In der Knorpelmatrix dieser Maus werden anormale breit gebänderte Fibrillen gefunden (Seegmiller et al., 1971; Li et al., 1995), was die These unterstützt, dass Kollagen XI den Durchmesser von

knorpelspezifischen Fibrillen reguliert bzw. limitiert (Blaschke et al., 2000). *In vitro* Fibrillogenese-Versuche zeigen, dass bei einer knorpelspezifischen Mischung der Kollagene II und XI im Verhältnis von 8:1 *in vivo* ähnliche Fibrillen entstehen. Steigt der Anteil an Kollagen II, so wird auch hier die Bildung breiterer Aggregate (Taktoide) beobachtet.

Kollagen VI

Kollagen VI besteht als Heterotrimer aus drei verschiedenen α -Ketten, $\alpha 1(VI)$, $\alpha 2(VI)$, $\alpha 3(VI)$, die alle kurze tripelhelikale Domänen sowie große globuläre terminale NC-Domänen (Weil et al., 1988; Chu et al., 1987) besitzen. Dies gilt im Besonderen für die $\alpha 3$ -Kette, die eine wesentlich größere N-terminale Domäne als die anderen Ketten zeigt. Die terminalen Domänen entstehen sowohl durch alternatives Spleißen als auch durch intra- und extrazelluläre posttranslationale Prozessierung (Aigner et al., 2002). Innerhalb der tripelhelikalen Domänen befinden sich zahlreiche Arg-Gly-Asp-(RGD)-Sequenzen, die eine Integrin vermittelte Zelladhäsion ermöglichen. Kollagen VI-Moleküle assemblieren zu antiparallel angeordneten Dimeren, die durch laterale Aggregation parallele Tetramere formen. Nach Sekretion in die ECM bildet sich durch Verknüpfung der Tetramer-Enden ein mikrofibrilläres Netzwerk, welches in allen Bindegeweben, außer im Knochen, zu finden ist (Keene et al., 1988; von der Mark et al., 1984). Auf ultrastruktureller Ebene erscheinen Typ VI-Kollagenfibrillen als Mikrofibrillen bzw. als perlenkettenähnliche Filamente (*beaded filaments*). Im Gelenkknorpel ist Kollagen VI in der perizellulären Glykokalix und in der Chondronkapsel vorhanden, wo es eventuell Aufgaben bei der Adhäsion von Chondrozyten und der Aufrechterhaltung der Chondronintegrität übernimmt (Poole, 1997). Durch rezessive Mutationen in den Kollagen VI-Genen wird die Ullrich-Dystrophie verursacht, wohingegen dominante Mutationen zur milderen Bethlem-Myopathy führen (Myllyharju und Kivirikko, 2001; Pan et al., 2003).

Kollagen X

Das homotrimere Kollagen X gehört zu den kurzen netzwerkbildenden Kollagenen und ist charakteristisch im hypertrophen Knorpel der Wachstumsfuge, sowie in Rippen und Wirbeln zu finden (Kühn, 1986). Da es ausschließlich von hypertrophen Chondrozyten exprimiert wird, gilt es als Markerprotein für die Spätdifferenzierung dieser Zellen. Die Kollagen X-Ketten bestehen aus großen C-terminalen, kurzen N-terminalen und zentralen tripelhelikalen

Domänen, die ein Molekulargewicht von ca. 59 kDa besitzen (Schmid und Linsenmayer, 1987). Für Kollagen X wird eine Funktion während der enchondralen Ossifikation bei der Matrixkalzifizierung diskutiert, was durch die Beobachtungen gestützt wird, dass es in der mineralisierten Zone von artikulärem Knorpel spezifisch exprimiert wird (Gannon et al., 1991; Walker et al., 1995). Im fötalen Knorpel ist Kollagen X in dünnen Filamenten organisiert oder kommt assoziiert an Kollagen II-Fibrillen vor (Schmid und Linsenmayer, 1990). Mutationen im COL10A1-Gen, die zur Störung der Tripelhelix führen, verursachen eine metaphysäre Chondrodysplasie vom Schmid-Typ (SMCD), was zu verkürzten Gliedmaßen und Skelettdeformationen führt (Warman et al., 1993). Die Phänotypen von Kollagen X-defizienten Mäusen ähneln teilweise der SMCD, wobei unterschiedliche Ausprägungen beobachtet werden (Jacenko et al., 1993, Kwan et al., 1997).

1.1.1.2 Nicht-kollagene Matrixproteine des Knorpels

Viele der nicht-kollagenen Matrixproteine des Knorpels sind Proteoglykane, die nach den Kollagenen die zweithäufigste Komponente des Gewebes darstellen. Der Proteinkern der Moleküle ist mit ein oder mehreren verschiedenen Glykosaminoglykan (GAG)-Ketten assoziiert, wobei Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Dermatan-sulfat, Keratan-sulfat und Heparan-sulfat unterschieden werden. Im artikulären Knorpel sind sowohl große monomere Aggregate (z.B. Aggrekan) als auch kleine Proteoglykane (z.B. Dekorin, Biglykan, Fibromodulin) vorhanden. Die großen Proteoglykane sind für die physikalischen Eigenschaften des Knorpels verantwortlich, wohingegen den kleinen Proteoglykanen eine Rolle bei der Zellfunktion und Organisation der Kollagenmatrix zugesprochen wird (Buckwalter und Mankin, 1998; Wirth und Rudert, 1996). Im Gegensatz zu Proteoglykanen sind bei Glykoproteinen (z.B. COMP) nur wenige Oligosaccharide mit dem Proteinkern verknüpft. Diese Moleküle spielen bei der Stabilisierung der Matrix und bei Chondrozyten-Matrix-Interaktionen eine Rolle. Im artikulären Knorpel werden noch weitere nicht-kollagene Proteine in der extrazellulären Matrix gefunden (z.B. Fibronectin, Tenascin), die ähnliche Funktionen wie die Glykoproteine besitzen (Roughley, 2001). Eine Übersicht über knorpelspezifische nicht-kollagene Proteine zeigt Tabelle 1.1:

Tab. 1.1 Proteoglykane und nicht-kollagene Matrixproteine des Knorpels

Proteoglykane (PGs)	Andere Matrixproteine
Aggregat-bildende PGs	Strukturgebende Proteine
Aggrekan	COMP (Thrombospondin-5)
Versikan	Thrombospondin-1 und -3
Leucin-rich repeat PGs	CMP (Huang et al., 1999)
Biglykan (DS-PGI)	Matrilin-3
Dekoron (DS-PGII)	CILP
Epiphykan (DS-PGIII)	C-Typ Lektin
Fibromodulin	Fibronectin
Lumikan	PRELP
Andere	Chondroadherin
Perlekan	Tenascin-C
SZB/Lubrikin	Fibrillin
	Elastin
	Regulatorische Proteine
	gp-39
	Matrix Gla-Protein/MGP
	Pleiotrophin
	Chondromodulin-I
	Chondromodulin-II
	CD-RAP
	Andere
	Chondrokalzin
	PARP

CD-RAP: *cartilage-derived retinoic acid responsive protein*; CILP: *cartilage intermediate layer protein*; CMP: *cartilage matrix protein*; COMP: *cartilage oligomeric protein*; DS-PG (I, II, III): *dermatan sulfate proteoglycan (I, II, III)*; gla: *gamma-carboxyglutamic acid*; gp: *glycoprotein*; PARP: *proline- and arginine-rich protein*; PRELP: *proline- and arginine-rich end leucine-rich repeat protein*; SZP: *superficial zone protein*. Modifiziert nach Roughley, 2001.

1.2. Entstehung und Aufbau der Wachstumsfuge

Es werden zwei Prozesse der Osteogenese unterschieden. Beide Arten der Knochenbildung beginnen mit der Kondensation mesenchymaler Vorläuferzellen, verlaufen aber auf unterschiedlichem Wege weiter. Bei der *intramembranösen Ossifikation* differenzieren die mesenchymalen Zellen direkt zu Osteoblasten, welche die Knochenmatrix aufbauen (bei Plattenknochen, z.B. Schädeldeckelknochen). Bei der *enchondralen Ossifikation* hingegen wird zuerst eine knorpelige Anlage durch Chondrozyten geformt und dann später durch Knochen und Knochenmark ersetzt (Chung, 2004). Dieser Prozess findet bei den meisten Knochen mesodermalen Ursprungs, vor allem bei den Röhrenknochen, statt. Die enchondrale Ossifikation soll im Folgenden näher betrachtet werden.

1.2.1 Enchondrale Ossifikation

Die enchondrale Ossifikation beginnt mit der Kondensation mesenchymaler Vorläuferzellen an den zukünftigen Orten der Skelettelemente (Poole, 1991). Die Zellen differenzieren weiter zu funktionalen Chondrozyten, welche mit der Expression spezifischer Knorpelmatrixkomponenten, wie z.B. Kollagen II und Aggrekan, beginnen. In der Mitte der knorpeligen Anlage bildet sich das primäre Ossifikationszentrum, in dem nach Hypertrophierung der Chondrozyten die Substitution von Knorpel durch Knochen beginnt. Das knöcherne Zentrum expandiert in beide Richtungen der Längsachse der Knorpelanlage. An den Enden der Röhrenknochen entstehen zeitlich verzögert sekundäre Ossifikationszentren, die Epiphysen. Diese breiten sich ebenfalls zentrifugal aus, wobei die Gelenkflächen knorpelig bleiben. Zwischen beiden Ossifikationszentren verbleiben die Wachstumsfugen als knorpelige Zonen (siehe Abb. 1.1). Hier findet das Längenwachstum der Knochen durch die koordinierte Abfolge von Proliferation und Hypertrophie der Chondrozyten, Mineralisation und Knorpelabbau sowie Knochenneubildung statt.

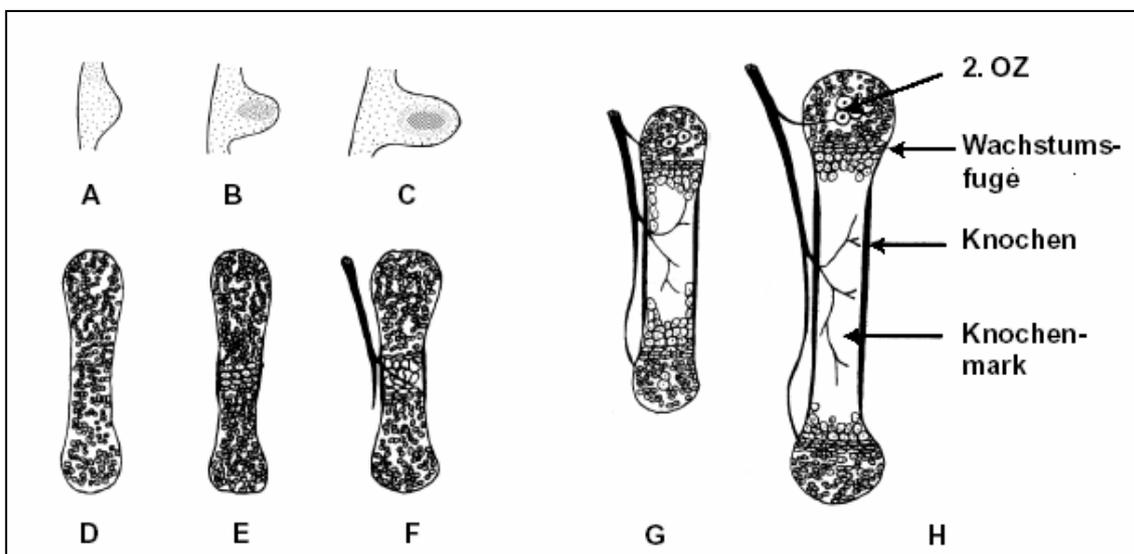


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der enchondralen Ossifikation. Mesenchymale Zellen in der Gliedmaßenknospe kondensieren (A-C) und bilden die knorpelige Anlage für den Knochen (D). In der Mitte dieser Anlage werden die Chondrozyten hypertroph (E). Es kommt zur Vaskularisierung und es wird neue Knochenmatrix gebildet (F). Die Knochenmarkhöhle und die Wachstumsfuge entstehen (G). Im epiphysären Knorpel wird das sekundäre Ossifikationszentrum (2.OZ) gebildet (G-H). Modifiziert nach Cancedda et al., 1995.

Mit dem Erreichen der Geschlechtsreife erwirkten hohe Konzentrationen an Sexualhormonen die Hypertrophie der Wachstumsfugen-Chondrozyten, so dass auch der verbleibende Knorpel durch Knochen ersetzt und das Knochenwachstum eingestellt wird.

1.2.2 Aufbau der Wachstumsfuge

Die Wachstumsfuge zeigt aufgrund der verschiedenen Differenzierungsstadien der Chondrozyten eine charakteristische horizontale Gliederung (Hunziker, 1994). Direkt benachbart zur Epiphyse werden Ruhechondrozyten gefunden. Es schließen sich proliferierende Chondrozyten in der eigentlichen Wachstumszone an. Anschließend folgen hypertrophe und apoptotische Chondrozyten, die den Übergang zum enchondralen Ossifikationsbereich der Diaphyse bilden. Die folgende Abbildung (1.2) zeigt einen Schnitt durch den proximalen Teil einer Rattentibia und eine schematische Darstellung der Wachstumsfuge.

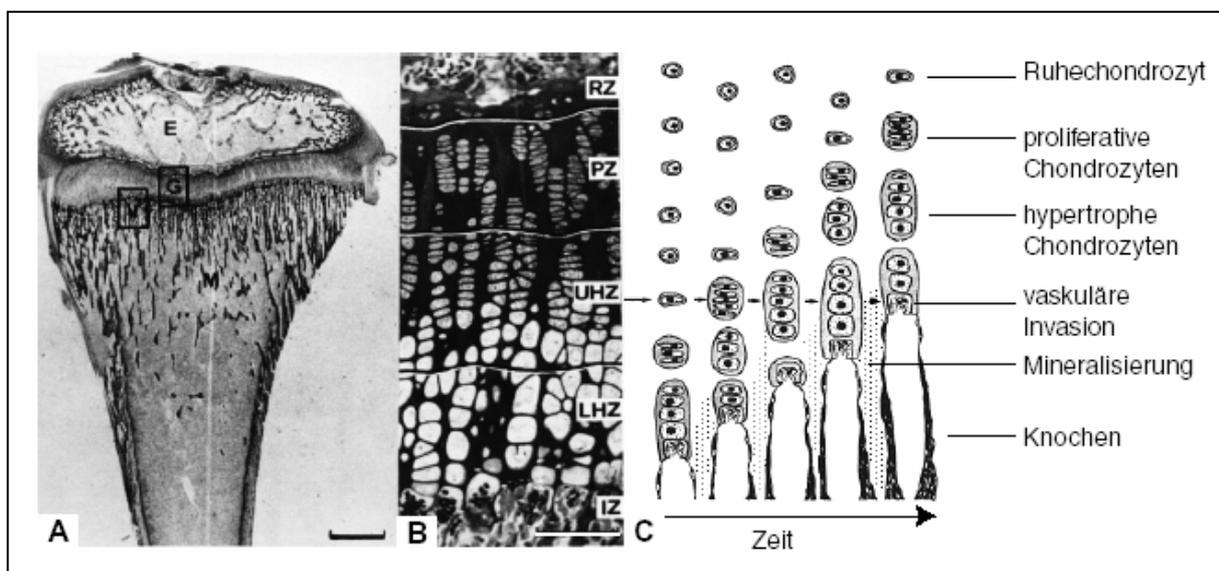


Abb. 1.2: Schnitt durch den proximalen Teil einer Rattentibia. A: E - epiphysärer Knochen, G - Wachstumsfugenknorpel, V - Vaskularisierungszone, M - Metaphyse. Balken 1 mm. B: Vergrößerung des Ausschnitts G: RZ - Ruhezone, PZ - Poliferationszone, UHZ - obere hypertrophe Zone, LHZ - untere hypertrophe Zone, IZ - Vaskularisierungszone. Balken 100 μ m. C: Schematische Darstellung der zeitlichen Änderung in der Wachstumsfuge und Lebenszyklus eines einzelnen Chondrozyten. Aus Hunziker et al., 1987. (A,B); Horton, 1993 (C).

Ruhezone

Die Chondrozyten der Ruhe- oder Reservezone sind kleine, runde, meist einzeln liegende Zellen, die mit einer für den hyalinen Knorpel typischen Matrix umgeben sind (Hunziker, 1994). Die Zellen proliferieren kaum und sind metabolisch wenig aktiv. Die Aufgabe der Ruhezone ist weitgehend ungeklärt. Abad et al. (2002) zeigten, dass in der Ruhezone Stammzellen-ähnliche Zellen vorhanden sind, die neue Klone proliferierender Chondrozyten generieren können. Die Zellen dieser Zone sind entscheidend für die Orientierung der säulenartigen Anordnung der proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten, eventuell

vermittelt durch einen *growth plate-orienting factor* (GPOF). Weiterhin wird vermutet, dass Ruhechondrozyten einen die Spätdifferenzierung der proliferierenden Zellen inhibierenden Faktor produzieren (Abad et al., 2002).

Proliferative Zone

Als Zeichen der gesteigerten Proliferation nimmt die Mitoserate der hier lokalisierten Chondrozyten stark zu, wobei sich die Mitosespindeln senkrecht zur Längsachse des Knochens anordnen (Stevenson et al., 1990). Die damit verbundene gesteigerte Produktion von ECM führt nach der Zellteilung zuerst zu einem Auseinanderdrängen der Zellen in horizontaler Ebene, und anschließend bilden sich in longitudinaler Richtung Säulen aus abgeflachten Chondrozyten aus (Hunziker, 1994). Die synthetisierte ECM ist der der Ruhezone ähnlich. Ab einem bestimmten Zeitpunkt verlieren proliferative Chondrozyten die Fähigkeit zur Zellteilung und werden prähypertroph, wobei das Zellvolumen vergrößert wird, so dass eine Übergangszone entsteht.

Hypertrophe Zone

In dieser Zone entstehen aus den prähypertrophen Chondrozyten, die am weitesten von der Epiphyse entfernt sind, durch terminale Differenzierung hypertrophe Chondrozyten. Diese zeichnen sich durch eine bis zu zehnfache Volumenzunahme gegenüber proliferativen Zellen und eine starke ECM-Synthese aus. Dieses Differenzierungsstadium der Chondrozyten ist durch einen Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels charakterisiert, was notwendig für die Sekretion von Matrixvesikeln durch hypertrophe Chondrozyten ist (Wang und Kirsch, 2002; Anderson, 2003). In Matrixvesikeln sind große Mengen an Kalzium-bindenden Annexinen vorhanden, die die Kalziumaufnahme in die Vesikel ermöglichen (Kirsch et al., 2000; Wang et al., 2003). Durch die Vesikel werden Kalziumphosphat, Hydroxylapatit, Phosphatasen (u. a. Alkalische Phosphatase, ALP) und Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sekretiert, was zur Mineralisierung und Degradation der sie umgebenden Matrix führt. Anschließend wird die mineralisierte knorpelige Matrix vaskularisiert und durch einwandernde Chondroklasten/Osteoklasten degradiert (Lewinson und Silbermann, 1992; Vu et al., 1998). Die dort angesiedelten Chondrozyten unterliegen der Apoptose, welche durch den erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel (Aktivierung von Proteasen, Lipasen und Nukleasen), durch Retinoinsäure und Vitamin D reguliert wird (Waring und Beaver, 1996;

Wang et al., 2003; Boyan et al., 2001). Zeitgleich reifen Zellen des Perichondriums zu Osteoblasten und beginnen mit der Substitution des Knorpels durch Knochen. Es wird angenommen, dass hypertrophe Chondrozyten in ihren benachbarten Geweben durch sekretierte Faktoren oder Zell-Zell-Interaktionen die Osteogenese induzieren können (Chung, 2004).

Im Vergleich zur Ruhe- und Proliferationszone weist die hypertrophe Region eine stark veränderte ECM auf. Zum einen wird der Hypertrophiemarker Kollagen X ausschließlich in diesem Bereich exprimiert und gleichzeitig die Synthese von Kollagen II, IX und XI vermindert bzw. eingestellt. Weiterhin wird ALP in den Zellmembranen und Matrixvesikeln nachgewiesen (Alvarez et al., 2000). Die hypertrophe Zone ist neben der Kalzifizierung durch einen radikalen Matrixumbau gekennzeichnet, bei dem MMPs eine große Rolle spielen. Die Spaltung von Kollagen II durch MMP-13 ist ein erforderlicher Ablauf während der Chondrozyten-Hypertrophierung und dem Matrixumbau in Wachstumsfugen zonen. MMPs werden sowohl von den Chondrozyten selbst, als auch von den Endothelzellen der einwachsenden Blutgefäße synthetisiert (Bord et al., 1998; Alvarez et al., 2000; Tuckermann et al., 2000).

Auf histologischer Ebene besitzt die Wachstumsfuge bei Vögeln nicht den deutlich zonalen Aufbau, wie er charakteristisch bei der Wachstumsfuge der Säuger vorzufinden ist. Die Organisation der Zellen in verschiedene Zonen ist weniger stark ausgeprägt. Die verschiedenen Differenzierungsstufen verlaufen parallel, so dass Gewebe mit proliferierenden Chondrozyten in einigen Bereichen schon verknöchert ist, beziehungsweise von Knochenmark durchzogen wird (Roach und Shearer, 1989). Obwohl die Wachstumsfugen des Huhns und der Säugetiere auf lichtmikroskopischer Ebene diese Unterschiede aufweisen, zeigt die elektronenmikroskopische Betrachtung viele Ähnlichkeiten zwischen den Chondrozyten in beiden Wachstumsfugen. Dieses lässt vermuten, dass die physiologischen Kontrollmechanismen in beiden Vertebratenklassen viele Gemeinsamkeiten haben (Howlett, 1979).

1.3 Das embryonale Hühnersternum

Das embryonale Hühnersternum stellt ein geeignetes Model zur Analyse der Chondrozytendifferenzierung während der enchondralen Ossifikation dar. Die Sterna enthalten mehrere Typen differenzierter Chondrozyten, die sich in ihrer Gestalt, sowie in der Propagierbarkeit der Spätdifferenzierung unterscheiden. Bis zum Tag 15 - 16 *in ovo* besteht das Sternum aus hyalinem Knorpel mit kleinen, dicht beieinander liegende Zellen. Ab Tag 17 findet man im kranialen Bereich in einer kleinen Zone auf beiden Seiten der Mittellinie hypertrophe Chondrozyten, wohingegen im peripheren Bereich proliferierende Zellen verbleiben (D'Angelo und Pacifici, 1997). Aufgrund des großen Volumens der hypertrophen Zellen nehmen diese einen relativ großen Teil des kranialen Bereiches ein, auch wenn ihre Zelldichte gering ist. Die hypertrophen Chondrozyten des Sternums beginnen mit der Kollagen X-Synthese, und am Tag 20 bestehen 50 - 80 % des gesamten synthetisierten Kollagens aus Kollagen X (Gibson und Flint, 1985; Reginato et al., 1986). Im kaudalen Bereich des Hühnersternums ist ein Gemisch aus Ruhe- und proliferativen Chondrozyten vorhanden. Diese Zellen produzieren weiterhin Kollagen II, IX und XI. Während am Tag 18 die Vaskularisierung im kranialen Teil des Sternums einsetzt und die Verknöcherung beginnt, bleiben die kaudalen Zellen bis zu zwei Monate nach dem Schlüpfen des Huhns im knorpeligen Zustand (Iwamoto et al., 1993).

Chondrozyten des Hühnersternums sind den Chondrozyten der unterschiedlichen Zonen einer Säuger-Wachstumsfuge sehr ähnlich, wobei aber die verschiedenen Zellpopulationen gleicher Differenzierungsstadien leichter zu isolieren sind. Weiterhin sind die embryonalen, nicht hypertrophen Zellen metabolisch aktiver als Gelenkchondrozyten aus adulten Tieren, so dass der Nachweis von Genexpressionen und Proteinen vereinfacht ist. Die Differenzierung der Knorpelzellen ist von der Expression Stadien-spezifischer Marker begleitet (Cancedda et al., 1995; Szüts et al., 1998).

1.3.1 Kultivierung sternaler Hühnerchondrozyten in serumfreier Agarosekultur

In Monolayerkultur wachsende Matrix-freie Chondrozyten durchlaufen den Prozess der Dedifferenzierung, welcher durch den Verlust der Expression von Kollagen II und Aggrecan und durch die Induktion der Synthese von Kollagen I biochemisch charakterisiert ist. Die Zellen verlieren ihren knorpelspezifischen Phänotyp und nehmen wieder die Fibroblasten-ähnliche Gestalt ihrer chondrogenen Vorläuferzellen an (Mayne et al., 1976; Benya und Shaffer, 1982; Binette et al., 1998). In dreidimensionalen Agarose-Suspensionskulturen lässt sich die Dedifferenzierung der Chondrozyten verhindern bzw. umkehren (Benya und Shaffer, 1982; Bruckner et al., 1989). Der differenzierte Chondrozytenphänotyp wird stabilisiert und die Zellen produzieren eine knorpelspezifische Matrix. Normalerweise in Kulturmedien enthaltenes Serum stellt ein Gemisch aus bekannten und unbekanntem Faktoren dar und ist für Chondrozyten nicht nur ein starkes Mitogen, sondern bewirkt ebenfalls deren Hypertrophie (Bruckner et al., 1989; Tschan et al., 1990). Es kann die Wirkung zugesetzter Faktoren maskieren oder verhindern, so dass zur besseren Analyse der Wirkung von Faktoren ein serumfreies Zellkultursystem entwickelt wurde (Bruckner et al., 1989; Alini et al., 1996). In serumfreier Agarose-Suspensionskultur sind Chondrozyten unter Zugabe antioxidativ wirkender Reagenzien wie Pyruvat und Cystein bei geeigneter Zelldichte ($> 10^6$ Zellen/ml) über lange Zeit kultivierbar (Tschan et al., 1990). Nach der Isolierung von Chondrozyten am Tag 17 *in ovo* aus dem gesamten kranialen Bereich eines Hühnersternum erhält man ein heterogenes Zellgemisch aus früh-hypertrophen und proliferativen Chondrozyten, so dass anfänglich kaum detektierbare Mengen der Hypertrophiemarker synthetisiert werden. Die Expression von Kollagen X und ALP dieser Zellpopulation kann in Agarose-Suspensionskultur durch Zusatz von Insulin, IGF-I und Thyroidhormonen hervorgerufen werden. Im Gegensatz dazu produzieren die kaudalen Zellen unter diesen Bedingungen selbst keine Marker der Hypertrophie (Böhme et al., 1995).

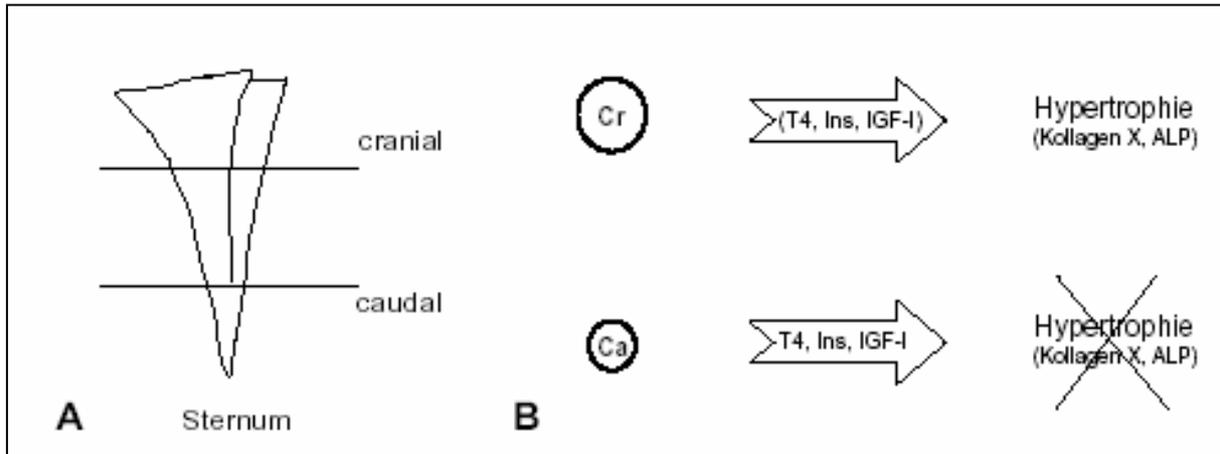


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Sternums (A) und Verhalten der daraus gewonnenen kranialen (Cr) und kaudalen (Ca) Chondrozyten *in vitro* (B). T4: Thyroxin; Ins: Insulin; IGF-I: *Insulin-like Growth Factor*; ALP: alkalische Phosphatase. Aus: Babarina, 2001.

Aufgrund dieser unterschiedlichen Befähigung der kaudalen und kranialen Chondrozyten zur Hypertrophie eignen sich die beiden Zellpopulationen gut zur Analyse der Regulation der enchondralen Ossifikation. In der vorliegenden Arbeit wurden Chondrozyten des embryonalen Sternums nach 17tägiger Bebrütung der Hühnereier für molekularbiologische Untersuchungen verwendet, und es wurde der Einfluss von verschiedenen Hypertrophie-induzierenden Faktoren in serumfreien Agarose-Suspensionskulturen untersucht.

1.4 Chondrozytendifferenzierung

1.4.1 Differenzierungsmarker

Während der enchondralen Ossifikation durchlaufen Chondrozyten eine Kaskade von Differenzierungsstadien, die durch Veränderungen in der Zellmorphologie und der Expression spezifischer Markerproteine gekennzeichnet sind. Darauf begründet erfolgt eine Einteilung in verschiedene Stadien (Cancedda et al., 1995): Im Stadium I sind proliferative Chondrozyten zusammengefasst, die die Kollagene II, IX, XI, Aggrecan und Link-Protein produzieren. Dieses Stadium unterteilt sich in die Phase Ia der früh-proliferativen Chondrozyten, gekennzeichnet durch die Expression von Kollagen VI (Quarto et al., 1993; Szüts et al., 1998), und in die Phase Ib der spät-proliferativen Chondrozyten, die sich durch die Aktivierung des Matrilin-1-Gens auszeichnen (Muratoglu et al., 1995). Beide Phasen werden an bestimmten Kontrollpunkten durch verschiedene Faktoren kontrolliert (Vortkamp et al.,

1996; Szüts et al., 1998; Crowe et al., 1999; Hartmann und Tabin, 2000). Den Übergang zum Hypertrophiestadium bildet der prähypertrophe Chondrozyt, der durch die Expression von *Ihh* (*Indian Hedgehog*) charakterisiert ist. Hypertrophe Chondrozyten stellen das Stadium II dar und produzieren die Markerproteine Kollagen X und ALP.

Eine eventuelle Weiterdifferenzierung der hypertrophen Chondrozyten wird intensiv diskutiert. Galotto et al. (Galotto et al., 1994) postulieren, dass hypertrophe Chondrozyten zu Osteoblasten-ähnlichen Zellen transdifferenzieren können (Stadium III), weil hypertrophe Chondrozyten viele charakteristische Genprodukte von Osteoblasten (z.B. Osteopontin, Osteokalzin) ebenfalls exprimieren (Oshima et al., 1989). In neuerer Zeit hingegen wird die These favorisiert, dass Chondrozyten durch Apoptose sterben, was durch morphologische und molekularbiologische Analysen gestützt wird (Hatori et al., 1995; Suda et al., 1999; Silvestrini et al., 2000; Cheung et al., 2003). Verbunden werden beide Theorien durch die Annahme, dass eine asymmetrische Zellteilung stattfindet, wobei die eine Tochterzelle durch Apoptose eliminiert wird, während die andere zu einer osteogenen Zelle differenziert (Roach et al., 1995).

Die Chondrozytenspätdifferenzierung findet beim Knochenwachstum in der Wachstumsfuge sowie bei der Heilung von Knochenfrakturen statt. Dahingegen wird im permanenten Knorpelgewebe aufgrund einer negativen Regulation durch spezifische Faktoren das Endstadium (= hypertropher Chondrozyt) der Chondrozytenspätdifferenzierung nicht erreicht.

1.4.2 Regulation der Chondrozytendifferenzierung

Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Hormonen sind an der Regulation der Chondrogenese, der Chondrozytenproliferation und der Hypertrophie beteiligt. Die Wirkungen dieser Faktoren werden durch spezifische Transkriptionsfaktoren vermittelt. Auch die Komposition der ECM spielt hierbei eine Rolle.

1.4.2.1 Einfluss der ECM

Studien an *Knock-Out*- oder transgenen Mäusen bzw. humane Mutationen in ECM-Genen zeigen, wie stark ECM-Moleküle die Differenzierung von Chondrozyten beeinflussen (1.1.1). *In vitro*-Experimente offenbaren, dass die Stimulation bzw. Ausprägung der Hypertrophie von der ECM abhängig ist. In serumhaltigen Kollagen I-Kulturen produzieren sternale Chondrozyten mehr Kollagen X als in Monolayer, und die Kollagen X-Synthese wird zusätzlich stimuliert, wenn die Kollagengele Kollagen II enthalten (Gibson et al., 1982; Bates et al., 1987). Werden hingegen embryonale Chondrozyten des Hühnersternums serumfrei in Kollagen I-Gelen kultiviert, können die Zellen den differenzierten Phänotyp verlieren, wobei fibrilläres Kollagen effektiver als lösliches, nicht aggregiertes Kollagen ist (Farjanel et al., 2001).

Die Kommunikation zwischen der ECM und den Zellen wird unter anderem durch Integrine gewährleistet. Integrine sind Transmembranrezeptoren, die aus einer α - und β - Untereinheit zusammengesetzt sind und deren Kombination die Ligandenspezifität bestimmt. Im Knorpel oder in Chondrozyten-Zellkulturen wurden die Integrine $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$ und $\alpha_V\beta_5$ detektiert (Salter et al., 1992; Enomoto et al., 1993; Dürr et al., 1993; Loeser, 1993; Woods, Jr. et al., 1994; Enomoto-Iwamoto et al., 1997; Camper et al., 1998; Hausler et al., 2002). Durch ihre extrazellulären Domänen binden sie an andere ECM-Moleküle sowie Zellrezeptoren und regulieren die Assemblierung von ECM-Proteinen, die Adhäsion, Migration und Differenzierung der Chondrozyten (Bouvard et al., 2001; Brakebusch et al., 2002; Hynes, 2002). Die cytoplasmatischen Domänen interagieren mit Cytoskelett- und Signaltransduktionsproteinen innerhalb der Zelle (Hynes, 1992). Am N-terminalen Ende der β -Untereinheit befindet sich eine Domäne, die die RGD-Sequenz bindet, welche häufig in ECM-Proteinen vertreten ist. RGD-Peptide oder anti-Integrin-Antikörper reduzieren die Bindung von Chondrozyten an die ECM in *high density*-Kulturen (Loeser, 1993; Loeser, 1994). Weiterhin führt eine Blockade der Zell-Matrix-Wechselwirkungen durch RGD-Peptide zur verminderten Proliferation der Zellen in Pellet- und Agarose-Suspensionskulturen (Enomoto-Iwamoto et al., 1997). Antikörper gegen verschiedene Integrin-Untereinheiten inhibieren sowohl das Wachstum als auch die Kollagen X-Synthese in serumfreien Organkulturen embryonaler Hühnersterna (Hirsch et al., 1997). Eine spezifische Inaktivierung des β_1 -Integrin-Gens in Mauschondrozyten führt zu einer anormalen Zellform, und die säulenartige Anordnung in der Wachstumsfuge findet aufgrund des Verlustes der Motilität und Proliferation der Zellen nicht statt (Aszodi et al., 2003).

Weiterhin spielen spezifische Enzyme, die MMPs und ihre Inhibitoren (TIMPs, *tissue inhibitor of metalloproteinases*), eine kritische Rolle bei der Modellierung und Degradation der ECM und somit bei der regulären Chondrozytenreifung sowie bei der Initiierung der Angiogenese (Werb, 1997; Ortega et al., 2003). Diese Proteolyse erlaubt die Zellmigration sowie die Freisetzung von gespeicherten Wachstumsfaktoren, wodurch deren Diffusionsverhalten und somit die Zelldifferenzierung beeinflusst wird. MMPs gehören zur Familie der Zink-abhängigen extrazellulären Proteinase und können aufgrund ihrer Substratspezifität in drei Gruppen unterteilt werden: Die Kollagenasen degradieren natives tripelhelikales Kollagen, die Gelatinasen spalten degradiertes Kollagen und die Stromelysine spalten Proteoglykane. MMP2 (Gelatinase A), MMP9 (Gelatinase B), MMP13 (Kollagenase-3) und MMP14 (MT1-MMP) sind wichtige Vermittler der enchondralen Ossifikation (Vu et al., 1998; Pendas et al., 1997; Holmbeck et al., 1999). MMP9-defiziente Mäuse zeigen eine verzögerte anormale Vaskularisierung der Wachstumsfuge, und die langen Knochen sind um 10 % kürzer als in normalen Tieren (Vu et al., 1998; Gerber et al., 1999). Die Blockierung von MMP13 führt zu einer Inhibierung der Kollagen II-Degradation und der Kollagen X-Synthese (Wu et al., 2002). Matrixvesikel beinhalten MMP2, -9, -13 und Stromelysin, so dass diese Enzyme ebenfalls bei dem Vorgang der Matrixmineralisation eine Rolle spielen (Dean et al., 1992; D'Angelo et al., 2001) Studien an MMP9 und -13 doppel *Knock-out*-Mäusen zeigen, dass diese Enzyme synergistische Effekte während der Knochenentwicklung besitzen. Bei diesen Tieren finden eine verzögerte Formierung der Knochenmarkhöhle, eine Akkumulation von hypertrophem Knorpel und eine Inhibierung der Knochenbildung statt, und die Bildung von sekundären Ossifikationszentren ist verzögert (Ortega et al., 2003; Ortega et al., 2004).

1.4.2.2 Parakrine Regulation

Viele verschiedene Hormone und Wachstumsfaktoren stimulieren die Chondrozyten auf parakrinem Wege, werden aber auch von den Zellen selbst produziert. Durch Zellkulturexperimente wurde deutlich, dass einige parakrine Faktoren, die die Chondrozytenspätdifferenzierung beeinflussen, noch nicht genau identifiziert sind.

Embryonale Chondrozyten des kaudalen Sternbereiches blockieren durch einen unbekanntem Faktor ihre eigene wie auch die Hypertrophie kranialer Chondrozyten (Böhme et al., 1995). Auch artikuläre Chondrozyten besitzen in Kokulturen mit Chondrozyten der

Wachstumsfuge oder des kranialen Sternumbereiches eine Hypertrophie-hemmende Wirkung (Jikko et al., 1999; D'Angelo und Pacifici, 1997). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass epiphysäre Chondrozyten die Differenzierung von Wachstumsfugen-Chondrozyten inhibieren (Haaijman et al., 1999; Pateder et al., 2000). Abad et al. (2002) haben direkt in Wachstumsfugen die Zone der Ruhechondrozyten um 90° gedreht und neben die proliferative Zone platziert. Sie spekulieren, dass die Ruhechondrozyten durch Sekretion eines noch unbekanntes Faktors die Spätdifferenzierung der proliferativen Chondrozyten inhibieren, da die direkt den Ruhechondrozyten benachbarten Chondrozyten nicht hypertrophieren.

Weiterhin hypertrophieren kraniale sternale Chondrozyten *in vitro* in einigen Fällen auch ohne Stimulation durch exogene Faktoren (Böhme et al., 1995; D'Angelo und Pacifici, 1997). Die genannten Befunde bestätigen, dass die Spätdifferenzierung von Chondrozyten einen spontanen Prozess darstellt, der im permanenten Knorpel teilweise durch autokrine oder parakrine Signale inhibiert wird.

1.4.2.3 Einfluss löslicher Faktoren

1.4.2.3.1 Vitamin D-Metabolite

Vitamin D gehört zur Gruppe der Steroidhormone, die unter anderem an der Regulation der extrazellulären Kalziumkonzentration beteiligt sind. Ein Mangel an Vitamin D führt zu Rachitis, und sowohl im Tiermodell als auch bei genetisch bedingter humaner Rachitis werden starke Störungen der Knochenbildung und eine Vergrößerung der hypertrophen Zone in Wachstumsfugen gefunden (Norman und Hurwitz, 1993; Yagishita et al., 2001).

Die aktiven Formen des Vitamin D, 1,25- und 24,25-Dihydroxyvitamin D₃ ($-(OH)_2D_3$), regulieren auf unterschiedliche Weise die Proliferation, Differenzierung und Matrix-Synthese von Wachstumsfugen-Chondrozyten. Ihre Wirkung ist vom Reifegrad der Zellen abhängig: 1,25-(OH)₂D₃ erzielt seine Wirkung bei proliferativen Wachstumszonen- und 24,25-(OH)₂D₃ bei Ruhechondrozyten (Sylvia et al., 1993). 24,25-(OH)₂D₃ bindet mit hoher Spezifität an die Membran von Ruhechondrozyten, wodurch unter anderem der Kalzium-Influx und somit die Aktivität der membrangebundenen Proteinkinase C (PKC) sowie die Produktion neuer Matrixvesikel, welche die PKC beinhalten, verstärkt wird. Die PKC stellt ein Enzym am Ende des cAMP-Signaltransduktionsweges dar, welches durch Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten eine Vielzahl an Zielproteinen aktiviert. Die Synthese von MMPs in

Wachstumsfugen-Chondrozyten ist ebenfalls von Vitamin D-Metaboliten abhängig und wird durch PKC-abhängige Mechanismen reguliert (Maeda et al., 2001; Dean et al., 2001). 24,25-(OH)₂D₃ stimuliert die Zellreifung der Ruhechondrozyten, so dass die Zellen weiter differenzieren und sensitiv für die Wirkung von 1,25-(OH)₂D₃ werden (Boyan et al., 2001). 1,25-(OH)₂D₃ spielt dagegen bei der Chondrozytenspätdifferenzierung und der Knorpelmineralisierung eine Rolle (White et al., 1998). Weiterhin wird durch 1,25-(OH)₂D₃ die Kollagen I- und Runx2-Expression negativ reguliert, so dass die Osteoblasten-Differenzierung ebenfalls limitiert wird (Lichtler et al., 1989; Ducy und Karsenty, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass 1,25-(OH)₂D₃ in Pellet-Kulturen von Kaninchenchondrozyten aus der Wachstumsfuge eine Erhöhung der Proteoglykan-Synthese und eine Erniedrigung der Aktivität der ALP bewirkt (Kato et al., 1990). Auch die Wirkung von 1,25-(OH)₂D₃ kann durch eine Aktivierung der PKC vermittelt werden, wobei die Aktivierung der Kinase durch die beiden Vitamin D-Metabolite durch unterschiedliche Mechanismen erfolgt, so dass die PKC-Aktivität in den verschiedenen Chondrozytenpopulationen spezifisch reguliert werden kann (Boyan et al., 2003).

Neben den schnellen Membran-assoziierten Mechanismen (Aktivierung der PKC), die durch jeweils für 1,25-(OH)₂D₃ und 24,25-(OH)₂D₃ spezifische Membran-gebundene Rezeptoren vermittelt werden (Boyan et al., 2002; Boyan et al., 2003), wird die Wirkung der Vitamin D₃-Metabolite auf die Chondrozytendifferenzierung ebenfalls durch den klassischen nukleären Homonrezeptor des Vitamin D (VDR) weiter geleitet. Eine Ligandenbindung führt zu dessen Konformationsänderung, wodurch es zu einer Interaktion zwischen dem Retinoid D-Rezeptor und dem Retinoid X-Rezeptor kommt. Es entsteht ein Heterodimer, das spezifische Bindungsstellen in den Promotorregionen von Zielgenen erkennt. Nur hypertrophe Chondrozyten der Wachstumsfugen synthetisieren *in vitro* den VDR, wohingegen bei artikulären Chondrozyten keine Expression beobachtet wird (Jikko et al., 1993).

1.4.2.3.2 Retinoinsäure

All-*trans* Retinoinsäure (*retinoic acid*, RA) ist als aktives Derivat von Vitamin A essentiell für die normale Skelettentwicklung, doch ein Überschuss des fettlöslichen Vitamin A führt zu starken Skelettanomalitäten (Wolbach und Hegsted, 1952). RA wird sowohl von embryonalen Chondrozyten als auch im Perichondrium synthetisiert (Koyama et al., 1999). Die Signale der Retinoinsäure werden durch zwei Transkriptionsfaktor-Familien vermittelt,

den Retininsäure-Rezeptoren (*retinoic acid receptors*, RARs) und den Retinoid-X-Rezeptoren (*retinoid X receptor*, RXR). Sie bilden Heterodimere und fungieren als Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren, indem sie durch direkte Bindung an die Promotoren von RA-Zielgenen deren Transkription induzieren (Mangelsdorf, 1994).

In vitro verstärken physiologischen RA-Konzentrationen (10-100 nM) die Synthese von Kollagen X, die Aktivität der ALP und die Matrixmineralisation (Pacifici et al., 1991; Iwamoto et al., 1994). Im Kollagen X-Promotor lässt sich keine Bindungsstelle für RARs detektieren, so dass die Stimulation auf anderem Wege erfolgen muss. In prähypertrophen Chondrozyten bewirkt RA die Produktion von BMP-7 (*bone morphogenetic protein*) (Grimsrud et al., 1998), und bei Abwesenheit des BMP-Signals ist die Kollagen X-Synthese trotz Stimulation durch RA abgeschwächt (Leboy et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass eine BMP-Bindungsregion im Kollagen X-Promotor ebenfalls die Stimulierung durch RA vermittelt (Adams et al., 2003; Leboy et al., 2002; Li et al., 2003). Weiterhin wird durch RA die Expression des Transkriptionsfaktors Runx2, ein Kofaktor des BMP-2-Signalweges, induziert (Iwamoto et al., 2003), welcher eine direkte Bindungsstelle im Kollagen X-Promotor besitzt. Folglich beeinflusst RA die Chondrozytendifferenzierung durch die Regulation der Runx2-Expression (Drissi et al., 2003). Des Weiteren wird durch Stimulation mit RA die Synthese von Smad1 und -5 erhöht. Sowohl die Smad- als auch die Runx-Bindungsstellen im Kollagen X-Promotor sind für die Aktivierung durch BMP-2 und RA notwendig (Li et al., 2003; Drissi et al., 2003).

In Langzeit-Monolayer-Kulturen oder nach mehrfachen Passagierungen von Kaninchen- oder Hühnerchondrozyten konnte RA die Chondrogenese inhibieren und eine Dedifferenzierung induzieren (Pacifici et al., 1980; Horton et al., 1987). Auch in kultivierten artikulären Rinderchondrozyten verursacht RA eine Dedifferenzierung, wobei BMP-7 diesem Effekt entgegen wirkt (Nishihara et al., 2003). Die unterschiedlichen durch RA induzierten Effekte werden dadurch erklärt, dass RA nur dann die Chondrozytendifferenzierung stimuliert, wenn Zellen aus eher fortgeschrittenen Stadien der Chondrozytenspätdifferenzierung (z.B. prähypertrophe Zellen) kultiviert wurden (Iwamoto et al., 1993; Dietz et al., 1999).

1.4.2.3.3 Insulin und *Insulin-like Growth Factor*

Das Hormon Insulin wird als Proinsulin in den Zellen des Pankreas gebildet und reguliert vor allem den Glukosemetabolismus. *Insulin-like growth factors* (IGFs) stellen Wachstumsfaktoren dar, die parakrin Wachstum und Differenzierung beeinflussen, unter anderem auch die Knorpelbildung. Die Bezeichnung erfolgt aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zum Insulin und der so begründeten analogen Wirkung. IGF-I und -II werden unter der Kontrolle des Wachstumshormons in der Leber produziert, wobei IGF-I seine Wirkung überwiegend während der postnatalen Entwicklung besitzt. IGF-II hat eine vorherrschende Rolle beim embryonalen Wachstum (DeChiara et al., 1991).

IGF-I und -II werden ebenfalls von Knorpelzellen synthetisiert, wobei die genaue Lokalisation nicht geklärt ist. In fötalen Chondrozyten der Rinderwachstumsfuge wurden mRNAs von IGF-I/-II hauptsächlich von proliferierenden Zellen exprimiert (Olney und Mougey, 1999), wohingegen in den Wachstumsfugen von Mäusen die IGF-I-mRNA in hypertrophen und proliferierenden Chondrozyten lokalisiert wurde (Reinecke et al., 2000; Smink et al., 2002). Die Verfügbarkeit und der Transport von IGF-I werden durch Interaktionen mit den IGF-Bindungsproteinen (IGFBP) reguliert. Die Expression von IGFBP in fötalen Chondrozyten der Wachstumsfuge wird durch IGF-I, -II, Insulin und TGF- β beeinflusst. Insulin und IGF-I binden an Zellrezeptoren, die aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten bestehen. An der α -Untereinheit findet die Ligandenbindung statt, woraufhin die Tyrosinkinase der β -Untereinheit eine Autophosphorylierung von Tyrosinresten katalysiert.

Sowohl IGF-I-defiziente Mäuse als auch Deletionen im humanen IGF-I-Gen zeigen bzw. führen zu Zwergwuchs (Liu et al., 1993; Woods et al., 1996). Bei der IGF-I-defizienten Maus sind die hypertrophen Chondrozyten in der Wachstumsfuge kleiner, so dass eine schmalere hypertrophe Zone trotz gleicher Zellzahl vorhanden ist (Wang et al., 1999).

In serumfreien Agarosekulturen von sternalen Hühnerchondrozyten stimulieren IGF-I und Insulin die Zellproliferation, allerdings hypertrophieren die Zellen nicht (Böhme et al., 1992). Werden jedoch Kulturen nur aus Chondrozyten des kranialen Teils des Hühnersternums angelegt, so wird sowohl durch Insulin als auch mit IGF-I die Produktion von Kollagen X und ALP induziert (Böhme et al., 1995; Szüts et al., 1998). In *high-density* Kulturen von Chondrozyten, die aus den Gliedknospen des Huhns isoliert wurden, wird nach Insulinstimulierung ebenfalls eine Proliferation, aber keine Hypertrophie der Zellen beobachtet (Torres et al., 2003). Gleiche Befunde werden bei Pelletkulturen aus

Ruhechondrozyten der Ratte detektiert, wo unter serumfreien Bedingungen weder IGF-I, noch geringe Insulinkonzentrationen die Hypertrophie hervorrufen. Insulin hat hier nur in hohen Konzentrationen die Kollagen X- und ALP-Synthese bewirkt (Ballock und Reddi, 1994).

1.4.2.3.4 Thyroidhormone

Thyroidhormone sind entscheidende Faktoren während des normalen postnatalen somatischen Wachstums und der Skelettentwicklung und stellen wichtige Regulatoren des Knochen- und Mineralhaushaltes dar (Allain und McGregor, 1993; Compston, 1993). Die wichtigsten Vertreter dieser Hormongruppe sind Trijodothyronin (T_3) und Thyroxin (T_4), wobei das Prohormon T_4 durch eine Dejodierung zu T_3 konvertiert wird. Die biologische Wirkung von T_3 ist stärker als die von T_4 , welches intrazellulär zu T_3 dejodiert werden muss. Die Signalvermittlung von T_3 wird direkt durch drei Thyroid-Kernrezeptoren (TR), TR α 1, TR α 2 und TR β 1, erreicht (Gauthier et al., 1999). Diese Rezeptoren sind Liganden abhängige Transkriptionsfaktoren, die durch direkte Interaktion die Expression von Zielgenen bewirken. Alle drei Rezeptoren sind in Ruhe- und proliferativen Chondrozyten zu finden, aber nicht in hypertrophen Chondrozyten. Chondrozyten in Suspensionskultur exprimieren die Rezeptoren ebenfalls (Robson et al., 2000), wodurch eine direkte Wirkung von T_3 auf Chondrozyten bewiesen ist. Bei der T_3 TR α -*Knock-out*-Maus ist keine Chondrozyten-Organisation in der Wachstumsfuge zu erkennen und die enchondrale Ossifikation ist inhibiert, was zur Wachstumshemmung führt (Fraichard et al., 1997). Dahingegen zeigt die T_3 TR β -*Knock-out*-Maus keine Effekte bei der Skelettentwicklung. Dies impliziert, dass dieser Rezeptor für die Knochenbildung nicht essentiell ist (Forrest et al., 1996a; Forrest et al., 1996b).

In vitro stimuliert T_3 humane fötale epiphysäre Chondrozyten sowie epiphysäre Rattenchondrozyten zur Synthese von ALP, wobei bei den Rattenchondrozyten eine verminderte Zellproliferation detektiert wurde (Carrascosa et al., 1992; Ohlsson et al., 1992). In Agarosekulturen von Sternachondrozyten 17 Tage alter Hühnerembryonen führt T_4 zur Kollagen X- und ALP-Synthese. Auch hier bleibt die Proliferation der Zellen aus (Böhme et al., 1992). Weitere serumfreie Studien mit embryonalen Chondrozyten aus Ratte, Huhn oder Schwein bestätigen ebenfalls, dass T_4 die Hypertrophie auslöst, und es wird kaum Einfluss auf die Proliferation der Zellen beobachtet (Burch und Lebovitz, 1982; Ballock und Reddi, 1994; Rosenthal und Henry, 1999). Des Weiteren bewirkt T_4 die Verminderung der Expression von Sox9, einem Transkriptionsfaktor, der den Übergang vom proliferativen zum hypertrophen

Chondrozyten inhibiert (Okubo und Reddi, 2003). In Kulturen von Wachstumsfugen-Chondrozyten des Kaninchens und in Wachstumsfugen-Explantaten des Schweins wird durch T_3 die Expression der Aggrecanase-2 induziert, ein Vorgang, der bei der Proteoglykan-Degradation durch hypertrophe Chondrozyten eine Rolle spielt (Makihira et al., 2003). Eine verstärkte Expression von MMP2, -3, -9 oder Aggrecanase-2, welche ebenfalls Proteoglykane abbauen, wurde in diesen Systemen nicht detektiert. Demnach scheint T_3 sowohl bei der Synthese als auch bei der Degradation von Proteoglykanen involviert zu sein, da in früheren Studien gezeigt wurde, dass es bei kultivierten embryonalen Hühnerchondrozyten und bei primären artikulären Chondrozyten die Proteoglykan-Synthese ebenso verstärken kann (Audhya et al., 1976; Grade et al., 1994).

1.4.2.3.5 TGF- β -Familie

Die *transforming growth factor- β* (TGF- β)-Superfamilie besteht aus einer Gruppe von strukturell ähnlichen Wachstumsfaktoren, die in die Gruppe der TGF- β /Aktinin-Faktoren und in die Gruppe der BMP/Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (*growth and differentiation factor*, GDF) unterteilt werden. TGF- β s werden als inaktive Komplexe synthetisiert, die aus dem reifen TGF- β und dem durch Disulfidbrücken verbundenem TGF- β Bindungsprotein bestehen (*latent TGF- β binding protein*, LTBP) (Kanzaki et al., 1990). Die Aktivierung erfolgt durch eine Proteasen-vermittelte Freisetzung des reifen TGF- β . Für die Signalwirkung werden Typ I und Typ II Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren benötigt, die als Heterodimere vorliegen (Franzen et al., 1993). Nach Bindung von TGF- β phosphoryliert der Typ II-Rezeptor den Typ I-Rezeptor, dessen Kinaseaktivität zu einer Phosphorylierung der intrazellulären Smads 2 und 3 führt, die in den Zellkern wandern und dort die Transkription der Zielgene regulieren (Nakao et al., 1997; Whitman, 1998).

Die Isoformen TGF- β 1-3 werden in der Wachstumsfuge produziert, wobei TGF- β 2 die Hauptform darstellt. Transgene Mäuse mit einem cytoplasmatisch verkürztem TGF- β -Rezeptor II zeigen einen unorganisierten Aufbau mit einer verbreiterten hypertrophen Zone der Wachstumsfuge, und im Gelenkknorpel sind frühe Formen einer Osteoarthritis erkennbar (Serra et al., 1997). TGF- β besitzt somit eine regulative Funktion bei der Differenzierung von Wachstumsfugen-Chondrozyten als auch bei Chondrozyten der Epiphyse. Es konnte gezeigt werden, dass ein Smad3-vermittelter TGF- β -Signalweg artikuläre Chondrozyten im „Ruhezustand“ hält, indem die Chondrozytendifferenzierung gehemmt wird (Yang et al.,

2001). *In vitro* stimuliert TGF- β die Chondrogenese von undifferenzierten Mesenchymzellen (Denker et al., 1994), inhibiert aber die Chondrozytenspätdifferenzierung. (Tschan et al., 1993) zeigten, dass in serumfreien Suspensionskulturen von embryonalen Chondrozyten aus vollständigen Hühnersterna TGF- β 2 die Hypertrophie inhibiert und sogar zur Dedifferenzierung der Zellen führte. Allerdings kann in Kulturen aus kranialen Chondrozyten TGF- β 2 nur in Synergie mit FGF-2 die Hypertrophie der Zellen unterdrücken (Böhme et al., 1995; Szüts et al., 1998). Werden kaudale Chondrozyten mit konditioniertem Endothelzellmedium kultiviert, so wird durch TGF- β 2 allein die durch Thyroxin induzierte Hypertrophie gehemmt (Babarina et al., 2001). Die höchste Konzentration an aktivem TGF- β wird erstaunlicherweise von hypertrophen Chondrozyten synthetisiert (D'Angelo und Pacifici, 1997). Es wird vermutet, dass so die Chondrozytenspätdifferenzierung innerhalb eines geeigneten physiologischen Rahmens begrenzt wird (D'Angelo et al., 2001).

Durch TGF- β wird die Genexpression des *parathyroid hormone-related peptide* (PTHrP) induziert, welches ebenfalls einen Faktor der negativen Regulation der Chondrozytenreifung darstellt (Pateder et al., 2000). Allerdings konnte durch TGF- β in Knochenexplantaten der PTHrP-defizienten Maus nicht die Hypertrophie, wohl aber die Zellproliferation und Matrixmineralisation unterdrückt werden, was auf einen zusätzlichen PTHrP-unabhängigen Wirkungsmechanismus des TGF- β hindeutet (Serra et al., 1999).

1.4.2.3.6 Bone morphogenetic proteins, BMPs

Bone morphogenetic proteins (Kingsley, 1994) stellen, mit Ausnahme von BMP-1, eine Gruppe von sekretierten Signalmolekülen der TGF- β Superfamilie dar, die unter anderem eine Rolle bei der Chondrogenese und Osteogenese besitzen (Reddi, 1992; Wozney, 1992). Während der Entwicklung der Knorpel Elemente konnten BMP-2, -4 und -7 im Perichondrium detektiert werden, wohingegen BMP-6 ausschließlich in prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten lokalisiert wurde. BMP-7 wurde zusätzlich in prähypertrophen Chondrozyten des Hühnersternums und in proliferativen Zellen der Maus-Wachstumsfuge entdeckt (Lyons et al., 1990; Macias et al., 1997; Grimsrud et al., 1999; Haaijman et al., 1999). Die Signalübertragung der BMPs wird durch zwei Typ I-Serin/Threoninkinase-Rezeptoren (BMPRIA und -IB) vermittelt, die mit dem Typ II-Rezeptor BMPRII dimerisieren (Zou et al., 1997). Durch Phosphorylierung werden Transkriptionsfaktoren der Smad-Familie aktiviert, die im Zellkern die Expression von Zielgenen in Kooperation mit anderen

Transkriptionsfaktoren hervorrufen (Heldin et al., 1997; Massague, 2000). Weiterhin wird sowohl die Chondrogenese wie auch die Chondrozytendifferenzierung durch Stimulation mit BMPs beeinflusst, was durch Transkriptionsfaktoren der Sox-Familie vermittelt wird (Chimal-Monroy et al., 2003).

In den Gliedmaßenknospen des Huhns stimulieren BMP-3 und -4 *in vitro* die Knorpelbildung (Carrington et al., 1991; Chen et al., 1991). BMP-4 kompensiert in diesem Kultursystem den inhibitorischen Effekt von TGF- β 1 und -2 und kann mit diesen Faktoren in Synergie die Chondrogenese induzieren. Kulturen von differenzierten Chondrozyten zeigen, dass BMP-2, -3 und -4 die Synthese von Proteoglykanen und die Aktivität der ALP stimulieren (Hiraki et al., 1991; Luyten et al., 1992; De Luca et al., 2001). Die Behandlung von chondrogenen Zellen mit BMP-6 führt zur Expression von Kollagen X und ALP (Grimsrud et al., 1999). Für die normale Chondrozytendifferenzierung ist die parallele Signalwirkung von Ihh und BMPs notwendig, wobei BMPs unabhängig vom Ihh/PTHrP-Signalweg agieren (Minina et al., 2001).

Mutationen bzw. Deletionen im *Bmp5*-Gen führen in der *short ear*-Maus zu einer fehlenden Knorpelkondensation und einer Verkürzung der Skelettstrukturen (Kingsley et al., 1992). BMP-2 und -4-defiziente Mäuse sind nicht lebensfähig (Zhang und Bradley, 1996; Winnier et al., 1995). Mäuse mit Mutationen im *BMPRII*-Gen zeigen Defekte bei der Proliferation von prächondrogenen Zellen und während der Chondrozytendifferenzierung (Yi et al., 2000). Homozygote *bmp6*-defiziente Mäuse zeigen dagegen keine Defekte in den Skelettbereichen (Solloway et al., 1998). Die Überexpression des BMP-Antagonisten Noggin verursacht ein reduziertes Knochenwachstum (Pathi et al., 1999), da während der Gliedmaßenentwicklung die Anlage von Knorpel-elementen durch Noggin negativ reguliert wird (Capdevila und Johnson, 1998; McMahon et al., 1998).

1.4.2.3.7 Fibroblast Growth Faktor

Die Familie der *fibroblast growth factors* (FGFs) besteht zur Zeit aus 23 Faktoren, die mit vier verschiedenen Rezeptoren (FGFRs) interagieren können und stellen unter anderem wichtige Effektoren der embryonalen Knochenbildung dar (Ornitz und Marie, 2002). FGF-1/FGF-2 zeigen sowohl bei prächondrogenen mesenchymalen Zellen als auch bei differenzierten Chondrozyten eine Wirkung (Gonzalez et al., 1990; Jingushi et al., 1995). Die Signaltransduktion der FGFs erfolgt durch die Bindung an Transmembran-Tyrosinkinase-

Rezeptoren: FGFR 1-4. Hierbei sind ebenso Interaktionen mit Heparansulfat-Proteoglykanen, die die Aktivität der FGFs verstärken, von großer Bedeutung (Saksela et al., 1988). Durch FGF wird die Synthese von Sox9 hochreguliert, was durch die MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinase vermittelt wird (Murakami et al., 2000; Murakami et al., 2004). Die Rezeptoren FGFR 2 und -4 werden während der Gliedknospenentwicklung und FGFR 1 während der Chondrozytendifferenzierung synthetisiert, wohingegen die Expression von FGFR 3 auf hypertrophe Chondrozyten begrenzt ist (Deng et al., 1996; Naski et al., 1998). Als Ligand für den FGFR 3 fungiert FGF-2, welches die Hypertrophie von Chondrozyten unterdrücken kann. *In vitro* stabilisiert FGF-2 den Phänotyp von in geringer Dichte ausgesäten Chondrozyten und inhibiert die Hypertrophie dieser Zellen, wobei dieser Effekt nur bei noch nicht hypertrophen Chondrozyten festgestellt werden kann (Kato und Gospodarowicz, 1984; Kato und Iwamoto, 1990). Bei der Kultivierung von kranialen embryonalen Hühnerchondrozyten inhibiert FGF-2 in Synergie mit TGF- β die terminale Differenzierung beim Übergang der Zellen von der früh-proliferativen in die spät-proliferative Phase (Böhme et al., 1995; Szüts et al., 1998). In mit Endothelzellmedium kultivierten kaudalen sternalen Hühnerchondrozyten hingegen kann FGF-2 die Synthese von Kollagen X und ALP verstärken (Babarina et al., 2001). Des Weiteren wurde in Organkulturen festgestellt, dass FGF und BMP durch ihre antagonistische Wirkung die Chondrozytenproliferation, die Ihh-Expression und die Hypertrophie beeinflussen (Minina et al., 2002).

FGFR 3-defiziente Mäuse zeigen eine verstärkte enchondrale Ossifikation, so dass die hypertrophe Zone in den Wachstumsfugen erweitert ist (Deng et al., 1996; Colvin et al., 1996). Mutationen im humanen FGFR 3-Gen, die eine Liganden unabhängige Aktivierung des Rezeptors bewirken, führen zu verschiedenen Formen des Zwergwuchses (Bellus et al., 1995; Rousseau et al., 1995; Tavormina et al., 1995). Bei vielen FGF-defizienten Mäusen werden kaum Abweichungen vom normalen Phänotyp beobachtet (Powers et al., 2000). Wahrscheinlich ist dieser Befund durch die Substitution eines FGFs durch die anderen Isoformen zu erklären.

1.4.2.3.8 PTHrP

Das sekretierte *parathyroid hormone-related peptide* (PTHrP) besitzt strukturelle Homologien zum Parathyroid-Hormon (PTH) und wird unter anderem in Osteoblasten und Chondrozyten exprimiert (Broadus und Stewart, 1994). Der PTHrP-Rezeptor (PTHR) wurde in prähypertrophen und hypertrophen Zellen der Wachstumsfuge lokalisiert (Karperien et al., 1994; Weisser et al., 2002). Durch die Bindung von PTHrP an PTHR wird die Protein Kinase A (PKA) aktiviert, die den Transkriptionsfaktor Sox9 phosphoryliert. Sox9 vermittelt *in vivo*, eventuell in Kombination mit anderen Transkriptionsfaktoren, die Wirkungen von PTHrP auf die Wachstumsfuge (Huang et al., 2001). Kürzlich konnte in den Transkriptionsfaktor Runx2 überexprimierenden Hühnerchondrozyten gezeigt werden, dass PTHrP die Matrixkalzifizierung und ALP-Aktivität blockiert. Die Mechanismen der Runx2-Inhibition durch PTHrP sind noch nicht geklärt. Es wäre möglich, dass PTHrP weitere Transkriptionsfaktoren induziert, welche die Runx2-Expression negativ regulieren (Iwamoto et al., 2003).

Ihh und PTHrP regulieren die Chondrozytendifferenzierung und Proliferation in Form eines negativen *feedback loops*. Durch die Ihh-Synthese von prähypertrophen Chondrozyten werden die Chondrozytenproliferation und die PTHrP-Expression im periartikulären Perichondrium induziert. PTHrP wiederum bindet an den PTHR (in proliferierenden und hypertrophen Zellen), wodurch es zu einer Inhibierung der Hypertrophie kommt (Chung et al., 1998; Vortkamp et al., 1996; Lanske et al., 1996; Wallis, 1996). Chondrozyten, die eventuell den hypertrophen Zustand erreichen, beginnen wieder, latent Ihh zu synthetisieren (van der Eerden et al., 2003; Chung et al., 2001). Durch die Hemmung der Hypertrophie durch PTHrP kommt es aber insgesamt zu einer verminderten Ihh-Synthese. Kürzlich wurde gezeigt, dass TGF- β 2 im Perichondrium die Effekte von Ihh vermittelt (Alvarez et al., 2002). Auch epiphysäre Chondrozyten zeigen eine hohe Synthese von PTHrP und nehmen somit an der parakrinen Regulation der Differenzierung in der Wachstumsfuge teil (Pateder et al., 2000).

In PTHrP-defizienten Mäusen sowie in Mäusen mit defektem PTHrP-Gen ist eine verfrühte Chondrozytendifferenzierung zu beobachten, was zu einer exzessiven Knochenbildung führt (Amizuka et al., 1994; Lanske et al., 1996). Im Gegensatz dazu, wird bei einer Überexpression von PTHrP in Chondrozyten eine Verzögerung der Zelldifferenzierung und fehlende Knochenbildung detektiert, so dass diese Mäuse mit einem vollständig knorpeligen Skelett geboren werden (Weir et al., 1996). Mutationen im humanen PTHR-Gen bestätigen diese Befunde; es zeigen sich zwei Formen an Skelett-Dysplasien.: Die metaphysäre

Chondrodysplasie vom Typ Jansen ist durch eine nicht vorhandene Chondrozytendifferenzierung charakterisiert, wohingegen bei der Chondrodysplasie vom Typ Blomstrand verstärkte enchondrale Ossifikation beobachtet werden kann, was zu einer extremen Knochenbildung führt (Schipani et al., 1997; Zhang et al., 1998; Jobert et al., 1998).

1.4.2.3.9 Indian Hedgehog

Indian Hedgehog (Ihh) gehört zur Familie der *Hedgehog*-Proteine, die bei der embryonalen Musterbildung und Gliedknospenentwicklung involviert sind (Hammerschmidt et al., 1997). Hedgehogs binden an Ptc- (*patched*) Rezeptoren, wodurch das Membranprotein Smo (*smoothened*) freigesetzt wird. Dieses besitzt eine intrazelluläre Aktivität, die bei Abwesenheit von Ihh durch Ptc blockiert ist. Die Freisetzung von Smo führt zu seiner Konformationsänderung und das Signal wird durch Aktivierung von Zielgenen weitergegeben.

Ihh wird von prähypertrophen und hypertrophen Hühnerchondrozyten und in fötalen Röhrenknochen der Ratte exprimiert (Bitgood und McMahon, 1995; Vortkamp et al., 1998; van der Eerden et al., 2000). Die *Ihh-Knock-out*-Maus zeigt eine reduzierte Chondrozytenproliferation, eine verstärkte Hypertrophie, aber auch eine fehlende Osteoblastenentwicklung (St. Jacques et al., 1999). Dagegen bewirkt eine gesteigerte Ihh-Expression eine verzögerte Hypertrophie der Chondrozyten (Vortkamp et al., 1996; Lanske et al., 1996). Die Daten verdeutlichen, dass Ihh normalerweise die Chondrozytenhypertrophie negativ reguliert, dagegen jedoch die Zellproliferation stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von Ihh auf die Chondrozytenhypertrophie von der PTHrP-Expression abhängig ist, wohingegen die Induktion der Zellproliferation einen PTHrP-unabhängigen Prozess darstellt (Karp et al., 2000; Kobayashi et al., 2002). Des Weiteren wird die Synthese von BMP-2 und -4 direkt durch Ihh reguliert, da eine Überexpression von Ihh in Organkulturen zu einer Expressionssteigerung dieser BMPs im Perichondrium führt. Eventuell fungieren BMP-2 und -4 als zwischengeschaltete Signalmoleküle während der Induktion der PTHrP-Effekte (Zou et al., 1997; Pathi et al., 1999).

1.4.2.3.10 Wnts

Zur Wnt-Familie werden zurzeit 22 sekretierte Cystein-reiche Glykoproteine gezählt, die bei einer Vielfalt von Entwicklungsprozessen, inklusive der Chondrogenese eine Rolle spielen (Wodarz und Nusse, 1998). Die Signale von Wnts werden durch *Frizzled*-Rezeptoren vermittelt, deren Aktivierung zur Stabilisierung von zytosolischem β -Catenin führt. β -Catenin bildet Komplexe mit den Transkriptionsfaktoren der LEF-1/TCF-(*lymphoid-enhancing-factor-1/T-cell factor*) Familie. Diese Komplexe wandern in den Zellkern und regulieren dort die Transkription von Wnt-Zielgenen (Behrens et al., 1996). Wnt4, -5a, -5b, und -14, wie auch der Wnt-Antagonist *Frzb*, sind in den Knorpelanlagen des Huhns lokalisiert worden und ihre Funktionen wurden durch Überexpressionsstudien *in vivo* analysiert. Wnt4 wird in Gelenken exprimiert und beschleunigt die Hypertrophie von Chondrozyten, wohingegen Wnt5a im Perichondrium lokalisiert ist und die Hypertrophie verzögert. Weiterhin wurde Wnt4 in einer Subpopulation hypertropher Zellen in einigen Knochen gefunden, so dass es direkt die Chondrozytendifferenzierung fördert (Church et al., 2002). Während der Chondrogenese ist Wnt5 im die Knorpelanlage umgebenden Mesenchym lokalisiert, wo es die Proliferation der mesenchymalen Stammzellen unterstützt (Church et al., 2002). Wnt14 ist ebenfalls bei den initialen Schritten der Gelenkentwicklung involviert und inhibiert in Synergie mit Wnt2 die Chondrogenese (Hoang et al., 1998; Kawakami et al., 1999; Hartmann und Tabin, 2000, 2001). Bei Wnt1, -7a und 14 wurde gezeigt, dass sie *in vitro* und/oder *in vivo* die Chondrogenese blockieren. Wnt5b und -11 werden, wie *Ihh*, von einigen prähypertrophen Chondrozyten produziert. Da aber Wnt5b sowie Wnt5a die Chondrozytendifferenzierung verzögert, und *Ihh* die Proliferation der Zellen stimuliert, wirken diese Faktoren auf antagonistische Weise (Church et al., 2002).

Störungen innerhalb des Wnt-Signalweges führen zu postnatalen Skelettdefekten wie z.B. rheumatoider Arthritis (Sen et al., 2001). So führt beispielsweise die durch Interleukin-1 β induzierte Expression von Wnt7a in arthritischen artikulären Chondrozyten zu einer Dedifferenzierung der Zellen und zur gleichzeitigen Inhibition der Apoptose (Hwang et al., 2004).

1.4.2.4 Regulation durch Transkriptionsfaktoren

1.4.2.4.1 Runx2/Cbfa1

Die Familie der *run-related* Transkriptionsfaktoren (Runx) besteht aus drei Mitgliedern, Runx1/Cbfa2 (*core binding factor 2*), Runx2/Cbfa1 und Runx3/Cbfa3, die eine DNA-Bindungsdomäne besitzen, welche homolog zum *runt*-Gen von *Drosophila* ist (Komori, 2002). Runx1 erzielt seine hauptsächliche Wirkung während der Hämatopoese (Okuda et al., 1996; Wang et al., 1996; Okada et al., 1998), ist aber auch im Knorpel exprimiert (Levanon et al., 2001). Da Runx1^{+/-}2^{-/-}-Mäuse einen identischen Phänotypen wie Runx2-defiziente Mäuse zeigen, besitzt Runx1 bei der Knorpelentwicklung eine eher untergeordnete Funktion (Yoshida et al., 2004). Das Gen von Runx2 hingegen wurde als ein an den Osteocalcin-Promotor bindender Transkriptionsfaktor identifiziert und spielt bei der Knochenentwicklung eine entscheidende Rolle (Ducy et al., 1997; Merriman et al., 1995). Die DNA-Bindung von Runx-Proteinen erfolgt durch Heterodimerisierung mit dem Kofaktor Cbfb (Kundu et al., 2002; Yoshida et al., 2002). Runx2-defiziente Mäuse sterben kurz nach der Geburt und besitzen aufgrund fehlender Osteoblastenentwicklung und Chondrozytendifferenzierung weder intramembranöses noch enchondrales Knochengewebe (Komori et al., 1997; Otto et al., 1997; Inada et al., 1999; Kim et al., 1999). Separate Promotoren des Runx2-Gens bewirken die Expression von zwei Isoformen (Runx2-I und -II), die sich in ihren jeweiligen N-Termini unterscheiden. Durch die Generierung Runx2-II-defizienter Mäuse wurde erkannt, dass Runx2-I die intramembranöse und Runx2-II die enchondrale Ossifikation beeinflusst (Xiao et al., 2004). Runx2 wurde in prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten detektiert, wo es als Kofaktor für die BMP-aktivierten Smads1 und -5 fungiert und die Kollagen X-Synthese induziert (Leboy et al., 2001). Kürzlich wurde gezeigt, dass Runx2 auch direkt an den Kollagen X-Promotor bindet und dessen Transkription bewirkt (Zheng et al., 2003; Drissi et al., 2003). Eine Überexpression von Runx2 in Hühnerchondrozyten stimuliert die Synthese von ALP, Kollagen X und MMP-13 (Inada et al., 1999; Enomoto et al., 2000; Enomoto-Iwamoto et al., 2001). Die Chondrozytenproliferation und -differenzierung wird durch Runx2 unter anderem dadurch beeinflusst, dass es ebenfalls direkt an den Promotor des *Ihh*-Gens bindet und so dessen Expression reguliert (Yoshida et al., 2004). Weil *Ihh* die Runx2 Expression in primären Chondrozytenkulturen induziert, wird ein positiver *feedback-loop* zwischen *Ihh* und Runx2 vermutet (Yoshida et al., 2004). *In vitro* verlieren Chondrozyten von Runx2^{-/-}-Mäusen den chondrogenen Phänotyp und es wird spontan eine adipogene

Differenzierung induziert, wodurch impliziert wird, dass Runx2 bei der Determination der Chondrogenese eine Rolle spielt und die Adipogenese inhibiert (Enomoto et al., 2004; Komori, 2000). Runx3 ist bei der Differenzierung von Epithelzellen bei Gastritis und während der neuronalen Entwicklung involviert, wird aber ebenfalls in Knorpel exprimiert (Inoue et al., 2002; Levanon et al., 2001; Li et al., 2002; Stricker et al., 2002). Runx3-defiziente Mäuse zeigen eine leicht beeinträchtigte Chondrozytenspätdifferenzierung, welche dagegen in Doppel-*Knock-out*-Mäusen (Runx2^{-/-}3^{-/-}) nicht vorhanden ist. Die Regulation der Chondrozytendifferenzierung ist vom Verhältnis der Transkriptionsfaktoren Runx2 und -3 abhängig (Yoshida et al., 2004).

1.4.2.4.2 Sox-Familie

Die Sox-Proteine bilden eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die vielfältige Aufgaben während der Entwicklung, inklusive der sexuellen Determination, der neuralen Induktion und der Skelettbildung besitzen (Pevny und Lovell-Badge, 1997). Sie gehören zu Superfamilie der HMG-box (*Sry-type high mobility group*) Proteine und besitzen eine HMG-Domäne deren Sequenz mehr als 50% identisch ist mit der HMG-Domäne des Geschlecht-bestimmenden Faktors SRY. Vier Mitglieder dieser Familie, Sox9, -8, -6 und L-Sox5 (ein verlängertes Produkt von Sox5) sind bei der Chondrogenese und enchondralen Ossifikation involviert (Wright et al., 1995; Bell et al., 2000; Schepers et al., 2000; Sock et al., 2001). L-Sox5 und Sox6 sind nahezu identisch, wohingegen sie mit Sox9 nur die HMG-DNA-Bindungsdomäne teilen (Lefebvre et al., 1998). Sox9 ist für die prächondrogene Zellkondensation, für die Chondrozytendifferenzierung und für die Aktivierung von Sox5, Sox6 und von Knorpelmatrixproteinen verantwortlich. Bei der Sox9^{+/-}-Maus ist eine vorzeitige Hypertrophie und Mineralisation zu beobachten, was verdeutlicht, dass Sox9 die Hypertrophie inhibiert (Bi et al., 1999; Akiyama et al., 2002). Überexpression von Sox9 in den Gliedmaßen des Huhns führt zur ektopischen Knorpelbildung (Healy et al., 1999). Beim Menschen und der Maus führt Haploinsuffizienz des Sox9-Gens zur Campomelischen Dysplasie, welche durch Skelett-Abnormalitäten charakterisiert ist (Schäfer et al., 1996; Wagner et al., 1994; Bi et al., 2001). Weiterhin regulieren Sox9, L-Sox5 und Sox6 in Kooperation die Expression der Kollagen II- und Aggrecan-Gene (Lefebvre et al., 1998; Ng et al., 1997; Sekiya et al., 2000; de Crombrugge et al., 2000). Mit den genannten Befunden einhergehend, zeigen L-Sox5 und Sox6-defiziente Mäuse verschiedene Formen an Chondrodysplasien (Smits et al., 2001).

Sox5^{+/-}Sox6^{-/-} bzw. Sox5^{-/-}Sox6^{+/-}-Mäuse lassen erkennen, dass Sox5 und Sox6 notwendig für die Chondrozytenproliferation sind und die säulenartige Anordnung der Zellen innerhalb der Wachstumsfuge unterstützen, indem sie das prähypertrophe Differenzierungsstadium und die Spätdifferenzierung verzögern (Smits et al., 2004). L-Sox5, Sox6 und -9 werden nicht in hypertrophen Chondrozyten synthetisiert (Lefebvre et al., 1998). Sox8-defiziente Mäuse sind durch eine Reduktion der Größe der Skelettelemente charakterisiert (Sock et al., 2001). Es konnte bei Knorpelanlagen im Huhn gezeigt werden, dass BMPs durch Sox8, -9 und -10 die Chondrogenese vermitteln und im weiteren Entwicklungsverlauf gemeinsam für die Determination der Chondrozyten-differenzierung notwendig sind (Chimal-Monroy et al., 2003). Die Expression der Sox-Gene erfolgt lange bevor morphologisch prächondrogene Strukturen erkennbar sind.

1.4.2.4.3 Nuclear Factor I (NF-I)

Ein Teilbereich der vorliegenden Arbeit befasst sich mit der Expression des Transkriptionsfaktors NF-I/A-1 in Chondrozyten, so dass im Folgenden diese Transkriptionsfaktor-Familie näher betrachtet werden soll.

Der Nuklear Faktor I (NF-I) wurde ursprünglich als DNA-Bindungsprotein identifiziert, welches sowohl die Replikation der adenoviralen DNA in HeLa-Zellen als auch die Transkription vieler verschiedener Gene in Säugetieren stimuliert (Nagata et al., 1982; Jones et al., 1987). NF-I-cDNAs wurden unter anderem aus humanem, Ratten- und Mausgewebe kloniert, und ein Sequenzvergleich der NF-I-Gene des Huhns führte zur Identifikation von vier verschiedenen Genen: NF-I/A, -I/B, -I/C und -I/X (Rupp et al., 1990). Von jedem Gen sind verschiedene, durch alternatives Spleißen entstandene Isoformen identifiziert worden (Santoro et al., 1988; Kruse und Sippel, 1994a; Osada et al., 1997; Osada et al., 1999), die Gen-, Zell- und Promotor-spezifische Unterschiede bei der Regulation der Transkription zeigen (Roulet et al., 1995; Apt et al., 1994; Chaudhry et al., 1998; Chaudhry et al., 1999). NF-I-Proteine beinhalten eine hoch konservierte 220 AS umfassende N-terminale Region, die für die Dimerisierung, DNA-Bindung und Aktivierung der adenoviralen DNA-Replikation verantwortlich ist (Gounari et al., 1990; Novak et al., 1992; Dekker et al., 1996). Der C-terminale Bereich fungiert als Transkriptions-Regulationsdomäne und variiert innerhalb der verschiedenen Isoformen. In dieser Region wurden bei den Faktoren NF-I/B, -I/C und -I/X Aktivierungs- und bei NF-I/A Repressionsbereiche lokalisiert (Osada et al., 1997; Mermod et

al., 1989). NF-I-Proteine binden als Homo- oder Heterodimere über die für alle Isoformen gleiche Konsensussequenz TTGGC(N)₅GCCAA an doppelsträngige DNA (Goyal et al., 1990; Kruse und Sippel, 1994b). NF-I-Faktoren stimulieren die Genexpression in fast allen Geweben und Organen, wie z.B. im Gehirn (Bedford et al., 1998; Elder et al., 1992), in der Lunge (Bachurski et al., 1997), in der Leber (Cardinaux et al., 1994) und auch in Chondrozyten (Szabo et al., 1995). Weiterhin besitzt NF-I eine Rolle während der Regulation der Genexpression in Osteoblasten. Im murinen Runx2-Promotor wurde ein Osteoblastenspezifischer Bereich lokalisiert, der NF-I und AP-1 (*activator protein-1*) homologe Bindungssequenzen besitzt. In nicht-osteoblastischen Zellen agiert NF-I/A, ein in Osteoblasten nicht synthetisierter NF-I-Faktor, als Repressor des Runx2-Gens. Im Gegensatz dazu vermittelt AP-1 in Osteoblasten die Transkription von Runx2 (Zambotti et al., 2002). Demnach ist die Aktivität des Runx2-Promotors von der konkurrierenden Wirkung beider Transkriptionsfaktoren abhängig. Des Weiteren wurde eine reprimierende NF-Bindungsstelle im Promotor von Matrilin-1 lokalisiert, welches wie Runx2 in prähypertrophen Chondrozyten exprimiert wird (Szabo et al., 1995). NF-I fungiert ebenfalls als Repressor von Kollagen I. Hier steht der nukleäre Faktor mit dem Transkriptionsfaktor Sp1 in Konkurrenz, ihre Bindungsstellen sind benachbart, und eine Aktivierung des Promotors durch Sp1 ist von der eventuellen NF-I-Bindung abhängig (Nehls et al., 1991). Die Bindung der Transkriptionsfaktoren an Promotoren ist wiederum von den Faktoren verschiedener Signalwege abhängig, die zu einer Aktivierung der entsprechenden Transkriptionsfaktoren führen. Die Expression der Gene, die eine NF-Bindungsstelle besitzen, wird durch eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen reguliert, inklusive der Kontrolle durch Insulin (Cooke und Lane, 1999a), TGF- β (Alevizopoulos et al., 1995), cAMP (Cooke und Lane, 1999b), Vitamin D (Candelieri et al., 1996) und andere (Gronostajski, 2000). Oft ist allerdings nur ein Beispiel für einen der Signaltransduktionswege bekannt, so dass ihre Generalisierung nicht möglich ist. Kürzlich wurde durch AS-Sequenzvergleiche gezeigt, dass die Smad-Faktoren und die NF-I-Transkriptionsfaktoren homologe DNA-Bindungsdomänen besitzen, wohingegen die C-terminalen Transkriptionsdomänen beider Proteinfamilien keine Ähnlichkeiten aufweisen. Aufgrund dieser signifikanten Sequenzähnlichkeiten könnte die DNA-Bindung der Mitglieder dieser Proteinfamilien durch ähnliche dreidimensionale Strukturen vermittelt werden. Es wurde postuliert, dass Smads und NF-I-Faktoren einer gemeinsamen Superfamilie von Transkriptionsfaktoren angehören (Stefancsik und Sarkar, 2003).

1.5 Fragestellung der Arbeit

Die Spätdifferenzierung von Chondrozyten ist ein teilweise negativ kontrollierter Prozess, dessen Regulation vor allem durch autokrine und parakrine Faktoren, den Proteinen der nachgeschalteten Signaltransduktionswege sowie durch Transkriptionsfaktoren erfolgt. Zur Analyse der Chondrozytendifferenzierung während der enchondralen Ossifikation stellen die verschiedenen Zellpopulationen des embryonalen Hühnersternums ein gut geeignetes Modellsystem dar. Am Tag 17 der Embryonalentwicklung des Huhns unterscheiden sich die Chondrozyten des kaudalen und kranialen Bereiches des Sternums vor allem durch ihre Befähigung zu hypertrophieren.

In vitro Untersuchungen zeigen, dass die Synthese der Hypertrophie-Markerproteine Kollagen X und ALP durch kraniale Chondrozyten in serumfreien Agarosesuspensionskulturen durch Zusatz von Insulin, IGF-I und Thyroidhormon hervorgerufen werden kann. Im Gegensatz dazu produzieren die kaudalen Zellen unter diesen Bedingungen selbst keine spezifischen Hypertrophiemarker.

In vorherigen Arbeiten konnte in Kokultur-Experimenten gezeigt werden, dass kaudale Zellen sowohl ihre eigene Hypertrophie als auch diejenige kranialer Chondrozyten verhindern. Diese Blockierung der Hypertrophie kranialer Zellen kann durch lösliche Signalfaktoren, deren Zellrezeptoren und/oder durch intrazelluläre signalvermittelnde Faktoren hervorgerufen werden. Die entsprechenden Genprodukte müssen demnach in kaudalen Chondrozyten verstärkt exprimiert werden, so dass sie die Spätdifferenzierung der kranialen Zellen hemmen können.

Zur Identifizierung von Genen, die in den beiden Zellpopulationen des embryonalen Hühnersternums differentiell exprimiert werden, sollte die Methode der suppressiven subtraktiven Hybridisierung angewendet werden. Die Erstellung einer subtraktiven cDNA-Bank sollte dazu dienen, Gensequenzen zu identifizieren, die für Proteine kodieren, welche in kranialen Chondrozyten geringer exprimiert werden. Die Analyse der Wirkung möglicher Kandidatengene auf die Synthese des Hypertrophiemarkers Kollagen X sollte durch Überexpression derselbigen in kranialen Zellen erfolgen.

2. Material und Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Sternapräparation aus Hühnerembryonen

Nach 17tägiger Bebrütung wurden Hühnereier mit 75%igem Ethanol desinfiziert und die Embryonen wurden entnommen. Die frei präparierten Sterna wurden mit sterilen Pinzetten aus den Embryonen gewonnen und durch dreimaliges Waschen in Krebs-Ringer-Puffer mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin von Geweberesten befreit. Die kaudalen und kranialen Bereiche der Sterna wurden mit einem sterilen Skalpell gewonnen.

Krebs-Ringer-Puffer: 15,7 mM Na₂HPO₄; 1,6 mM KH₂PO₄;
111,2 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 1,3 mM MgCl₂;
4 mM NaHCO₃; 13 mM Glukose; pH 7,4

2.1.2 Chondrozytenisolierung

Zur Isolierung von Chondrozyten wurden die kranialen und kaudalen Bereiche der Sterna in 1-1,5 mg/ml bakterieller Kollagenase in DMEM mit 1 mM Cystein, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin über Nacht bei 37 °C/ 5 % CO₂ verdaut.

Anschließend wurden die Zellen im Medium resuspendiert und durch Swinnex-Filter mit drei Schichten Nylongewebe (Porengröße 100 µm) filtriert. Nach dreimaligem Waschen mit je 50 ml Calcium-freiem DMEM mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin wurden die Zellen durch Zentrifugation (600 x g, 7 min, RT) sedimentiert. Die Chondrozyten wurden in 5-10 ml DMEM aufgenommen und die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Kammer bestimmt. Durch Elektroporation (2.1.5) transfizierte Chondrozyten wurden zur Abtrennung von Zelldebris bei 200 x g für 8 min bei RT zentrifugiert

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

2.1.3 Agarose-Suspensionskulturen

(modifiziert nach Benya und Shaffer, 1982)

Gleiche Volumina (pro Ansatz 175 μ l) einer 2%igen Niedertemperatur-Agarose und zweifach konzentriertes DMEM wurden vermischt und mit den Zusätzen BCP (5 μ l/ml) versetzt. Ein gleiches Volumen einer Zellsuspension mit einer Dichte von $4,2 \times 10^6$ Zellen/ml wurde mit diesem Ansatz vermennt, so dass eine Suspension mit $2,1 \times 10^6$ Zellen/ml in DMEM in 0,5 % Agarose entstand. Im Vorfeld transfizierte Zellen wurden vor der Einbettung mit 600 μ l/Schale Trypsin/EDTA-Lösung für ca. 10 min bei 37 °C bis zur Ablösung der Zellen inkubiert und die Reaktion durch 700 μ l DMEM/10 % FKS gestoppt. Die Zellen wurden in ein 15ml-Zentrifugenröhrchen (Greiner) überführt und zentrifugiert (600 x g, 5 min). Anschließend wurde die Zellzahl mittels Trypanblaufärbung in einer Neubauer-Kammer bestimmt.

700 μ l des Suspensionsansatzes wurden auf mit Hochtemperatur-Agarose (1 % in Aqua demin.) beschichtete 35 mm Kulturschalen pipettiert und diese für 15 min auf einem Wärmetisch (37 °C) aufbewahrt, so dass die Zellen auf die untere zellfreie Agaroseschicht in eine Ebene absinken konnten. Zum Verfestigen der Agarose wurden die Kulturschalen 10 min im Kühlschrank auf 4°C abgekühlt und anschließend in einem Brutschrank (37 °C / 5 % CO₂) inkubiert. Nach ca. 4 - 6 h wurden zu jeder Schale 1 ml DMEM mit den Zusätzen BCP gegeben. Der Medienwechsel fand jeden 2.-3. Tag statt, wobei dem Medium die Zusätze ABCP (5 μ l/ml) beigemischt wurden.

Nach erforderlicher Kulturdauer wurde den Kulturen [¹⁴C]-Prolin (1 μ Ci/ml) zugegeben, um die Zellen 24 h metabolisch zu markieren. Anschließend wurden sie bei - 20 °C eingefroren.

Zusätze BCP

60 μ g/ml β -Aminopropionitril;

1 mM Cystein;

1 mM Pyruvat (Endkonzentrationen)

Zusätze ABCP

25 μ g/ml Ascorbinsäure in BCP

Trypsin/EDTA-Lösung

0,05 % (w/v) Trypsin; 0,02 % (w/v) EDTA

2.1.4 Monolayerkultur

Zur Kultivierung von Chondrozyten im Monolayer wurden die Zellen entweder direkt nach Isolierung oder nach einer vorhergehenden Transfektion (2.1.5) in einer Dichte von $1 - 3,5 \times 10^6$ Zellen/Schale (35 mm) ausgesät. Die Kultivierung erfolgte – je nach Versuchsansatz – in serumfreiem oder in mit 1% bzw. 10% FKS versetztem DMEM bzw. DMEM/F12.

DMEM/F12

DMEM/Ham's F-12 mit L-Glutamin

2.1.5 Transfektion von Chondrozyten

Primäre Hühnerchondrozyten wurden mit einem *Nucleofector*TM (amaxa biosystems, Köln) und dem *Human Chondrocyte Nucleofector*TM Kit transfiziert. Bei dieser Elektroporationsmethode wird die DNA direkt in den Zellkern eingeschleust. Es wurde das vom Hersteller empfohlene Verfahren durchgeführt.

Zur Zelltransfektion wurden $1 - 3,5 \times 10^6$ Chondrozyten nach ihrer Isolation in 100 µl *Human Chondrocyte Nucleofector*-Lösung aufgenommen, mit 5 – 10 µg des entsprechenden Plasmids vermischt, in die im Kit vorhandenen Küvetten pipettiert und mit dem Programm U-24 elektroporiert. Unmittelbar im Anschluss wurden 500 µl auf 37 °C vorgewärmtes DMEM/F12 mit 20 % FKS in die Küvette gegeben und der komplette Ansatz in eine 35 mm Kulturschale überführt, die 1,5 ml vorgewärmtes DMEM/F12 mit 10 % FKS enthielt. Nach einer 24stündigen Inkubation bei 37 °C/5 % CO₂ wurde das Medium gegen frisches DMEM/F12/10 % FKS mit ABCP (2.1.3) ausgetauscht.

2.1.6 Immunfluoreszenz

Eine erfolgreiche Transfektion primärer Hühnerchondrozyten mit dem Plasmid pCMV-Tag-4A-NFIA1 (2.3.4) konnte durch Immunfluoreszenz-Studien nachgewiesen werden. Dieser Vektor besitzt am C-terminalen Ende der *Multiple Cloning Site* eine Sequenz für einen FLAG-Tag, welcher nach erfolgter Expression durch den Anti-FLAG M2-Antikörper erkannt wird.

Die transfizierten Chondrozyten wurden für 48 h in 35 mm Kulturschalen auf Deckgläschen kultiviert und mit der bewachsenen Seite nach oben in neue 35 mm Schalen überführt. Nach dreimaligem Waschen in PBS erfolgte die Fixierung der Zellen für 5 min in 3 %igem PFA in PBS. Die Chondrozyten wurden dreimal für je 5 min in PBS gewaschen und anschließend durch 0,5 % Triton X-100 (v/v) in PBS für 5 min permeabilisiert. Es wurde dreimal mit PBS gewaschen und für 15 min mit 1%igem (v/v) Ziegen Serum in PBS blockiert. Währenddessen wurden pro Deckgläschen 40 µl einer 1%igen Ziegen Serumlösung, welche den Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:100 enthielt, auf Parafilm pipettiert und die Deckgläschen *up side down* auf die Tropfen gegeben. Die Inkubation wurde bei 37 °C für 45 min durchgeführt. Nach erneutem dreimaligem Waschen (jeweils 15 min) wurden die Zellen in gleicher Weise mit dem Sekundärantikörper (1:500) für 45 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal für je 15 min mit PBS gewaschen, mit Fluoromount G eingedeckt und bis zur Betrachtung mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskopes (Eclipse E600, Nikon) abgedunkelt bei 4°C aufbewahrt.

PBS

*Phosphate Buffered Saline (Dulbecco),
w/o Ca^{2+} und Mg^{2+}*

3% PFA

*3 % Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4;
erwärmen auf ca. 60°C, pH Einstellung
mit 1 M NaOH*

Primärantikörper

Anti-FLAG M2 Antikörper (Stratagene)

Sekundärantikörper

*Alexa Flour[®] 488 goat anti mouse IgG
(Molecular Probes)*

<i>Sammelgelpuffer</i>	<i>0,5 M Tris; 0,4 % SDS; pH 6,8</i>
<i>Trenngelpuffer</i>	<i>1,5 M Tris; 0,4 % SDS; pH 8,0</i>
<i>Kammerpuffer</i>	<i>25 mM Tris; 0,1 % SDS; 0,2 M Glycin</i>
<i>Probenpuffer</i>	<i>0,1 M Tris, pH 6,8; mit 10 % Glycerin; 2 % (w/v) SDS; 0,8 M Harnstoff; 0,001% Bromphenolblau; Reduktion durch 3 % (v/v) β-Mercaptoethanol</i>

2.2.3 Western-Blot und Immundetektion

Nach erfolgter Elektrophorese (2.2.2) wurden Proteingemische mittels Elektrotransfer (Nass-Blot) auf eine Nitrocellulosemembran (Protran[®], Schleicher & Schuell) transferiert (30 V, 250 mA, 3 - 6 h), um sie immunchemisch zu untersuchen.

Hiernach wurde die Membran mit Magermilchpuffer für 1 h bei RT blockiert. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in Verdünnungspuffer (1:1000) bei 4°C über Nacht. Anschließend wurde die Membran dreimal 15 min mit TBS-T gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (POD-konjugiert) im Verdünnungspuffer (1:25.000) für 1 h bei RT inkubiert. Nach dem Waschen (dreimal 15 min mit TBS-T) wurden die Blots mit ECL-Reagenz (Rehm, 1997) entwickelt und die Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm registriert.

<i>Transfer-Puffer</i>	<i>50 mM Tris; 380 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Methanol</i>
<i>TBS-T</i>	<i>0,15 M NaCl; 50 mM Tris; pH 7,4; 0,05 % (v/v) Tween-20</i>
<i>Magermilchpuffer</i>	<i>5 % (w/v) Magermilchpulver; 1 % BSA (w/v) in TBS-T</i>

Verdünnungspuffer

Magermilchpuffer 1:1 mit TBS-T verdünnt

ECL-Reagenzien

A: 250 mM Luminol in DMSO

B: 90 mM p-Coumarsiure in DMSO

C: 1 M Tris, pH 8,5;

D: 30 %ige H₂O₂-Lsg.

200 µl Lsg. A mit 89 µl Lsg. B und 2 ml Lsg. C mischen, mit dH₂O auf 20 ml auffüllen, Detektion möglich durch Zugabe von 6-8 µl Lsg. D

Primärantikörper

Anti-FLAG M2 Antikörper (Stratagene)

Sekundärantikörper

goat-anti-mouse-IgG (F_{ab} specific, Sigma)

2.2.4 Autoradiographie

Die Gele wurden für 3x 20 min in DMSO entwässert und 3 h in 20%igem (w/v) Diphenyloxazol in DMSO inkubiert. Anschließend wurden die Gele mindestens 45 min gewässert und im Gelrockner (Biorad) getrocknet. Zur Detektion der Signale wurden Röntgenfilme bei – 80 °C für 7 – 14 Tage auf den Gelen exponiert.

2.2.5 Kollagenpräparation aus Zellkulturmedium

Zu 1 ml Kulturmedium wurden 100 µl Pepsinlösung (10 mg/ml in 1 M HCl) gegeben und der Ansatz 2 h bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 90 µl 1 M Tris (ungepuffert) wurde der pH-Wert mit 1 M NaOH bzw. 1 M HCl auf pH 7,4 eingestellt. Die Kollagene konnten anschließend mit 4,5 M NaCl über Nacht bei 4 °C gefällt werden. Es folgte eine Zentrifugation bei 17.500 x g für 20 min bei 4 °C. Das Pellet wurde in 100 µl H₂O aufgenommen und mit drei Volumina eiskaltem, 96%igem Ethanol für mindestens 2 h bei - 20 °C gefällt. Nach dem Abzentrifugieren (17.500 x g, 20 min, 4 °C) wurde das Pellet in 70 µl Probenpuffer (2.2.2) aufgenommen und vor der Gelelektrophorese 5 min auf 95 °C erhitzt.

Um gleiche Kollagenmengen pro Bahn aufzutragen, wurde die Radioaktivität bestimmt. Hierfür wurden je 2 µl der Probe mit 100 µl H₂O in Szintillationsröhrchen gegeben und mit 2 ml Szintillationslösung *Lumasafe Plus* vermischt. Die Zählrate wurde mit einem Flüssigszintillationsspektrometer (Beckman) bestimmt. Pro Bahn wurde eine Probenmenge mit einer Aktivität von 1000 – 2000 cpm aufgetragen.

2.2.6 Bestimmung der Alkalischen Phosphatase

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde in den Kulturmedien mit einer modifizierten Methode von Bessey et al. (1946) bestimmt. Dazu wurden 50 µl Medium mit 450 µl 0,2 % p-Nitrophenylphosphat in 1 M Diethanolamin/HCl, pH 9,8 bei 37 °C inkubiert. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion mit 500 µl 2 M NaOH/0,2 mM EDTA gestoppt und die Extinktion bei 405 nm bestimmt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Verwendete Bakterienstämme

Tab.: 2.1 Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Referenz	Genotyp
<i>E.coli</i> TOP 10 F'	Invitrogen, NL	F' { <i>lacI</i> ^q , Tn10(Tet ^R)} <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>
<i>E.coli</i> XL10-Gold	Bullock et al., 1987; Stratagene, USA	Tet ^R Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> Hte [F' <i>proAB</i> <i>lacI</i> ^q ΔM15 Tn10 (Tet ^R) Amy Cam ^R]
<i>E.coli</i> XL1-Blue	Bullock et al., 1987; Stratagene, USA	SupE44 <i>hsdR17</i> <i>recA</i> <i>endA1</i> <i>gyrA46</i> <i>thi</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> F'[<i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> Δm15 Tn10(<i>tet</i> ^t)]

2.3.2 Nährmedien und Nährmedienzusätze

Die Herstellung von Nährmedien und Nährmedienzusätzen erfolgte nach (Sambrook et al., 2001). Zur Selektion von Bakterien mit Resistenzgen-enthaltenden Plasmiden wurde den Medien nach Autoklavieren (121 °C; 1,2 bar; 21 min) und Abkühlung auf ca. 50 °C Ampicillin bzw. Kanamycin in einer Endkonzentration von 100 bzw. 25 µg/ml zugegeben. Zur Herstellung von Indikatorplatten für Blau-Weiß-Selektionen wurden pro Platte 40 µl X-Gal-Lösung und 40 µl IPTG zugefügt.

LB-Flüssigmedium 10 g/l Tryptonextrakt; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl;
pH 7,5

NZY-Flüssigmedium 5 g/l NaCl; 2 g/l MgSO₄ x 7H₂O; 5 g/l Hefeextrakt;
10 g/l Tryptonextrakt; pH 7,5

LB-Agarplatten 1 l LB-Flüssigmedium + 15 g Bacto Agar

Ampicillinlösung 100 mg/ml in dH₂O, sterilfiltriert

Kanamycinlösung 25 mg/ml in dH₂O, sterilfiltriert

IPTG-Lösung 100 mM IPTG in dH₂O

X-Gal-Lösung 40 mg/ml X-Gal in DMF

2.3.3 Bakterienkultivierung und Stammhaltung

Flüssigkulturen 3-5 ml (Miniansätze) oder 100 ml (Midiansätze) LB-Medium mit Antibiotika wurden mit einer Bakterienkolonie bzw. 150 µl Minikultur angeimpft und für 6 - 8 h bei 37 °C und 180 rpm im Schüttler inkubiert.

Glycerinkulturen	828 µl einer Übernachtskultur wurden mit 172 µl sterilem 87%igem Glycerin vermischt und bei – 70 °C eingefroren und aufbewahrt.
Plattenkulturen	auf LB-Antibiotika-Agarplatten wurden Vereinzelausstriche von spezifischen Bakterienkolonien bzw. Transformationsansätze auf Indikatorplatten ausplattiert und für 16 h bei 37 °C kultiviert. Die weitere Aufbewahrung erfolgte bei 4 °C.

2.3.4 Vektoren

Tab.2.2: Kommerzielle Vektoren

Vektor	Beschreibung	Referenz
pCR [®] II-TOPO	Amp ^r , Kan ^r , linearisierter Vektor mit 3`-Thymin-Überhängen, zur Blau-Weiß-Selektion	Invitrogen, NL
phrGFP-C	<i>Mammalian</i> Expressionsvektor, Amp ^r , Reporterprotein hrGFP, <i>LoxP</i> Site	Stratagene, USA
pCMV-Tag-4A	<i>Mammalian</i> Expressionsvektor, Kan ^r , FLAG-Tag-Epitop	Stratagene, USA

Tab.2.3: Konstruierte Vektoren

Vektor	Beschreibung
pCR [®] II-TOPO-NFIA1	Amp ^r , Kan ^r Zwischenklonierungsvektor mit NF-I/A-1-cDNA
phrGFPC-NFIA1	Amp ^r , Expressionsvektor mit NF-I/A-1-cDNA
pCMV-Tag-4A-NFIA1	Kan ^r , Expressionsvektor mit NF-I/A-1-cDNA

2.3.5 Primer

2.3.5.1 Primer zur Generierung des Volllänge-Klons von NF-I/A-1 aus Huhn

1. *Sense*-Primer: NFforw_lang

5' TGAAGAGCTCATGTATTCTCCGCTCTGTCTCACGCAG 3'

T_m mit Überhang: 72,8 °C

T_m ohne Überhang: 71,4 °C

Die Schnittstelle des Restriktionsenzymes *SacI* ist doppelt unterstrichen, das **Startcodon** ist fett und der Basenüberhang einfach unterstrichen dargestellt.

2. *Antisense*-Primer NFrev_lang:

5' TAATGTCGACTCCCAGGTACCAGGACTGAGTCTGTTG 3'

T_m mit Überhang: 72,8 °C

T_m ohne Überhang: 71,4 °C

Die Schnittstelle des Restriktionsenzymes *Sall* ist doppelt unterstrichen und der Basenüberhang einfach unterstrichen gekennzeichnet.

2.3.5.2 Primer zur Sequenzierung des kodierenden Bereichs der NF-I/A-1-cDNA (aus Huhn)

Tab. 2.4: Sequenzierungsprimer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	T _m
NFPrimer1	TTCCAATCCAGACCAGAAGG	63,9 °C
NFPrimer2	GGCTTCCAGGACAGTTTTGT	63,0 °C
NFPrimer3	CCATCGCCAACTGCATTA	65,6 °C
NFPrimer4	CCATTCCTTCCTACCCCAAT	63,6 °C
NFPrimer5rev	CTGGCTGGGACTTTCAGATT	63,1 °C
NFPrimer6rev	GGGACTGCTGAAACCAGACT	63,2 °C
NFPrimer7rev	GGATTTAGGAACCCACCTG	64,2 °C
NFPrimer8rev	AGACCTCCTCATTGCTCCTG	63,3 °C

2.3.5.3 Primer zur Generierung der notwendigen Punktmutationen in der NF-I/A-1-cDNA

Tab. 2.5: Mutationsprimer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	T _m
R119C-1	AGATGAGAAGAATTGACTGCCTTCGCCAGGCAG	70,7 °C
AntiR119C-1	CTGCCTGGCGAAGGCAGTCAATTCTTCTCATCT	70,7 °C
H324R-1	AAACCCCGAACACCGCGGAGCACTACATG	70,9 °C
AntiH324R-1	CATGTAGTGCTCCGCGGTGTTTCGGGGTTT	70,9 °C

2.3.5.4 Primer zur Herstellung der NF-I/A-1-Sonde

Tab. 2.6 NF-I/A-1-Sondenprimer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	T _m
Sonde NF-I/A-1_ <i>left</i>	CTTTTCTCTCTCCCGCACAC	59,9 °C
Sonde NF-I/A-1_ <i>right</i>	CTGCAGCGTGCACAAAGTAT	59,9 °C

2.3.5.5 Primer für den PCR-Nachweis der Isoformen von NF-I/A (aus Huhn)

Tab. 2.7: Isoformen-Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	T _m
NFIA1_ <i>left</i>	GAACACCGCGGAGCACTACAT	61,8 °C
NFIA1_ <i>right</i>	CGGATTGCTGGGTGTGAGAA	59,4 °C
NFIA1.1_ <i>left</i>	AAAGTCGAGGCGGGGTAAAGT	60,3 °C
NFIA1.1_ <i>right</i>	GCGTGAGACAGAGCGGAGAA	61,4 °C
NFIA3_ <i>left</i>	TGCACGCTGCAGGACATTT	56,7 °C
NFIA3_ <i>right</i>	CTCATTGCTCCTGGGCTCAT	59,4 °C
NFIA4_ <i>left</i>	GTTCCCAGCTGAGGCCATACT	61,8 °C
NFIA4_ <i>right</i>	TTTCTCTTTCGGGCTTGCAAG	57,3 °C
NFIA5_ <i>left</i>	AAAATCCGACGGTTCAAGGCT	57,9 °C
NFIA5_ <i>right</i>	TTCACGGCCCTCTCTTCCTC	61,4 °C
NFIA6_ <i>left</i>	TTCCGGATTCATCCCTTCAT	55,3 °C
NFIA6_ <i>right</i>	GAAGTCTGGACGCCCATTTTC	59,4 °C

2.3.5.6 Primer für den Einsatz im Subtraktions-Kit

Tab. 2.8: Primer des Subtraktions-Kits

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	T _m
GAPDH_5primer (human)	ACCACAGTCCATGCCATCAC	59,4 °C
GAPDH_3primer (human)	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	59,4 °C
<i>Nested</i> Primer1	TCGAGCGGCCGCCCCGGGCAGGT	73,3 °C
<i>Nested</i> Primer2R	AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT	67,6 °C
PCRPrimer1	CTAATACGACTCACTATAGGG	58,4 °C

2.3.5.7 Primer für den Nachweis von *Housekeeping*-Genen (aus Huhn)

Tab. 2.9: *Houskeeping*-Gen-Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	T _m
chGAPDH3' 25369	CTCAGCTCCCTCAGCTGATGCC	65,8 °C
chGAPDH5' 25370	GGGCCATCCACCGTCTTCTGTG	65,8 °C
chaktin_for	GGTATGTGCAAGGAAGGTTT	59,4 °C
chaktin_rev	ATGGCTGGGGTGTTGAAGGT	59,4 °C

2.3.6 Isolierung von RNA

Die RNA-Extraktion (RNeasy-Midi-Kit, Qiagen) basiert auf der selektiven Bindung von RNA an Silika-Gel-Membranen unter Verwendung eines spezifischen Hoch-Salz-Puffers. Zur Gewinnung von Gesamt-RNA aus kaudalen und kranialen Chondrozyten wurden die Zellen nach erfolgter Isolation aus dem Sterna (2.1.2) mit sterilem PBS gewaschen und das Zellpellet nach Anleitung des Herstellers weiter verarbeitet. Es wurden jeweils 20 – 50 x 10⁶ Zellen pro Isolierung eingesetzt. Die Elution der gereinigten RNA erfolgte mit 250 µl DEPC-H₂O. Die Qualität der RNA wurde in einer denaturierenden RNA-Gelelektrophorese (2.3.8) überprüft und ihre Quantität photometrisch (2.3.12) ermittelt.

DEPC-H₂O zweifach destilliertes Wasser wurde mit 0,2 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, über Nacht gerührt und anschließend zweimal autoklaviert.

2.3.7 Isolierung von mRNA

Polyadenylierte mRNA-Moleküle wurden durch Hybridisierung ihrer Poly-A-Überhänge mit dT-Oligomeren, die an Polystyrol-Latex-Partikel gekoppelt sind, im Batch-Verfahren gereinigt (Oligotex-Kit, Qiagen). Dabei wurden jeweils 500 µg Gesamt-RNA aus kranialen bzw. kaudalen Chondrozyten nach Anleitung des Herstellers verarbeitet. Die Elution der polyadenylierten mRNA erfolgte mit 2x 100 µl OEB-Puffer (Bestandteil des Kits).

2.3.9 cDNA-Synthese

2.3.9.1 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription von polyA⁺-RNA wurde die StrataScript Reverse Transkriptase (Stratagene) verwendet. Diese ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die ausgehend von der *Moloney Murine Leukemia Virus* Reversen Transkriptase durch Entfernung der RNase H-Aktivität generiert wurde. Durch diese Mutation kann das Enzym größere Mengen an Volllänge-cDNA-Transkripten produzieren.

Vor der Herstellung von cDNA wurde ein DNase-Verdau der RNA-Präparation nach Herstellerangaben mittels des DNA-free Sets (Ambion) durchgeführt.

Anschließend wurden bis zu 10 µg Gesamt-RNA in 27 µl DEPC-H₂O mit 3 µl Oligo(dT) Primern (100 ng/µl) und 11,5 µl DEPC-H₂O vermischt und bei 65 °C für 5 min inkubiert. Zur Hybridisierung der Primer mit der RNA wurde der Ansatz langsam auf RT abgekühlt. Anschließend wurden 5 µl 10x Erststrangpuffer, 1 µl RNase Inhibitor RNasin, 2 µl dNTPs (je 25 mM) und 1 µl (50 U) StrataScript Reverse Transkriptase hinzugefügt und der Ansatz bei 42 °C für 1 h inkubiert. Die Reaktion wurde bei 95 °C für 5 min inaktiviert und die cDNA bis zur weiteren Verwendung in nachfolgenden PCR-Analysen bei -20 °C gelagert. Zur Analyse einer erfolgreichen cDNA-Synthese wurde eine RT-PCR mit Huhn-spezifischen GAPDH- oder β-Aktin-Primern (2.3.5.7) durchgeführt.

2.3.9.2 PCR cDNA-Synthese

Die SMART-Technologie (SMART-Kit, Clontech) wurde bevorzugt für die Herstellung von cDNA zur Generierung der subtraktiven cDNA-Bibliothek eingesetzt, da hiermit aus geringen Mengen an Gesamt-RNA ausreichend cDNA produziert werden konnte und diese Volllänge-cDNA enthält.

Die Erststrangsynthese wurde mit je 1,5 µg Gesamt-RNA aus kranialen und kaudalen Chondrozyten durchgeführt. Je 1 µl 3' SMART-CDS-Primer (10 µM) und SMART-II-Oligonukleotid (10 µM) wurden zum Ansatz gegeben und auf ein Volumen von 5 µl mit dH₂O aufgefüllt. Anschließend wurde der Ansatz 2 min auf 72°C erhitzt, auf RT abgekühlt und mit folgenden Substanzen vermischt: 2 µl 5x Erststrangpuffer, 1 µl DTT (20 mM), 1 µl 50x dNTP-Mix (10 mM) und 1 µl Reverse Transkriptase. Die Synthese wurde 1 h bei 42 °C

durchgeführt, der Ansatz anschließend mit 40 µl TE-Puffer verdünnt, für 7 min bei 72 °C erhitzt und bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C aufbewahrt.

Die Zweitstrangsynthese ist mit einer Amplifikation der cDNA gekoppelt (*Long-Distance-PCR*). Damit die Häufigkeit einzelner RNA-Transkripte sich in der cDNA widerspiegelt, musste die Amplifikation in der exponentiellen Phase der PCR gestoppt werden.

Zusammensetzung eines Ansatzes:	72 µl dH ₂ O
	10 µl 10x <i>Advantage 2</i> PCR-Puffer
	2 µl 50 x dNTP (10 mM)
	2 µl 5' PCR Primer II A (10 µM)
	2 µl 50x <i>Advantage 2</i> Polymerase-Mix
	2 µl Erststrang-Synthese-Produkt

Folgende PCR-Bedingungen wurden gewählt: 95 °C 5 min, 95 °C 5 s, 65 °C 5 s, 68 °C 6 min. Nach 15, 18, 21, 24 und 27 Zyklen wurden jeweils 15 µl dem PCR-Ansatz entnommen und 5 µl davon auf einem 1,2%igem Agarosegel analysiert. In der Regel war die exponentielle Phase der Amplifikation nach 21 – 24 Zyklen beendet. Zur Überprüfung der cDNA-Synthese mit dieser Methode wurde die im Kit vorhandene Kontrollreaktion nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die cDNA wurde zur weiteren Verwendung in der subtraktiven Hybridisierung mittels Säulen-Chromatographie (2.3.9.3) gereinigt.

2.3.9.3 Säulen-Chromatographie

cDNA aus kaudalen bzw. kranialen Chondrozyten, die mit dem SMART-cDNA-Synthese-Kit hergestellt wurde, wurde nach Anleitung des Herstellers durch eine Säulen-Chromatographie (CHROMA SPIN-1000, Clontech) gereinigt. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Reinigung wurde ein Aliquot ungereinigter cDNA neben der eluierten gereinigten cDNA auf einem 1,2%igem Agarosegel analysiert.

2.3.10 Plasmidisolierung

2.3.10.1 QIAprep-Spin-Miniprep-Kit

Die Plasmidpräparation (Miniprep-Kit, Qiagen) basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterienzellen (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979), gefolgt von der Adsorption der freigesetzten Plasmid-DNA unter hohen Salzkonzentrationen an eine Silikagel-Membran. Die Salze werden durch Waschschriffe entfernt und die Plasmid-DNA anschließend in dH₂O gelöst.

Es wurden jeweils 4 ml einer Übernacktkultur abzentrifugiert (3800 x g, 15 min, 4°C). Die weiteren Schritte erfolgten nach Herstellerangaben. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 50 µl sterilem dH₂O, und das Eluat wurde bei – 20 °C aufbewahrt.

2.3.10.2 HiSpeed-Plasmid-Midi-Kit

Auch die Aufreinigung größerer Plasmidmengen (Midi-Kit, Qiagen) basiert auf der Grundlage der alkalischen Lyse von Bakterienzellen, gefolgt von der Bindung der Plasmid-DNA an Anionen-Austauscher-Säulen unter moderaten, geringen Salz- und pH-Bedingungen. Hier wird die Plasmid-DNA unter hohen Salzkonzentrationen eluiert und durch eine Isopropanolfällung entsalzt und konzentriert.

Es wurden jeweils 50 ml Übernacktkulturen zentrifugiert (3800 x g, 15 min, 4°C) und das Pellet anhand der Angaben des Herstellers entsprechend weiter verarbeitet. Die Plasmid-DNA wurde mit 500 - 700 µl dH₂O eluiert und bei - 20°C aufbewahrt.

2.3.11 Fällung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2, und 2,5 Volumina 95%igem Ethanol gefällt. Nach der Zentrifugation (17.530 x g, 15 min, RT) wurde das Pellet zur Entfernung der Salze mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in dH₂O aufgenommen und die Präparationen bei - 20 °C aufbewahrt.

2.3.12 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration einer DNA- oder RNA-Probe wurde durch Messen der Optischen Dichte (OD) beim Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren von 260 nm ermittelt. Eine OD₂₆₀ von 1,0 entspricht einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml und einer ssRNA-Konzentration von 40 µg/ml.

Zusätzlich wurde zur Überprüfung der Reinheit der Nukleinsäuren die OD₂₈₀ (Adsorptionsmaximum aromatischer AS von Proteinen) ermittelt. Bei einer Ratio OD₂₆₀/OD₂₈₀ zwischen 1,5 und 1,8 konnte eine ausreichende Reinheit der Nukleinsäuren angenommen werden, so dass z.B. eine Sequenzierung oder cDNA-Synthese erfolgen konnte.

2.3.13 PCR-Reaktionen

In einer PCR-Reaktion werden bestimmte DNA-Sequenzbereiche, welche durch die Wahl spezifischer Primer festgelegt sind, gezielt amplifiziert. Routinemäßig wurde für PCR-Ansätze das Enzym RED*Taq* DNA Polymerase von Sigma eingesetzt. Es handelt sich hierbei um eine DNA-Polymerase, der ein inerte roter Farbstoff beigemischt ist, der sowohl die Zugabe wie auch das richtige Vermischen des Reaktionsansatzes anzeigt, als auch die direkte Beladung eines Agarosegels mit dem PCR-Reaktionsgemisch ermöglicht.

Ein typischer PCR-Ansatz war wie folgt zusammengesetzt:

- 5 µl 10x RED*Taq* PCR-Puffer
- 4 µl MgCl₂ (25 mM)
- 2 µl dNTPs (*each* 10 mM)
- 1 µl *sense* Primer (10 µM)
- 1 µl *antisense* Primer (10 µM)
- 1,25 µl RED*Taq* (1 U/µl)
- 1-5 µl DNA
- ad 50 µl mit dH₂O

Je nach PCR-Anwendung wurden 1 µl einer Plasmidpräparation oder 2 – 5 µl cDNA für eine RT-PCR eingesetzt.

Zur Erstellung von cDNA-Sonden für *Southern* oder *Northern* Blots wurde folgendes PCR-Programm gewählt: 94 °C 10 s; 68 °C 30 s; 72 °C 1,5 min; 20 Zyklen.

Die Generierung der Volllänge-cDNA des NF-I/A-1 erfolgte nach diesem Programm: 95 °C 2 min; 94 °C 1 min; 68 °C 1 min; 72 °C 2 min; 72 °C 7 min; 38 Zyklen.

Die Identifizierung der Isoformen des NF-I/A in Hühnerchondrozyten wurde mit folgendem Programm durchgeführt: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min; 60 °C 1 min; 72 °C 1,5 min; 34 Zyklen.

Die PCR-Ansätze wurden auf Agarosegelen qualitativ überprüft und anschließend bei – 20 °C aufbewahrt bzw. im TOPO T/A Klonierungskit eingesetzt.

2.3.14 Reinigung von Nukleinsäuren durch Gelextraktion

Zur Reinigung von Restriktionsansätzen und PCR-Produkten wurden DNA-Fragmente mit Hilfe des QIAquick-Gelextraktion-Kits (Qiagen) isoliert. Die Durchführung erfolgte anhand der Anleitung des Herstellers, wobei die Proben jeweils mit 30 µl dH₂O eluiert und bei -20°C gelagert wurden.

2.3.15 DNA-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung von Plasmidpräparationen und PCR-Produkten sowie zur Gelextraktion wurde die DNA durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Ausubel et al., 1990). Je nach erwarteter Größe der DNA-Fragmente wurden 0,8-1,8%ige (w/v) Agarosegele (Agarose in 1x TAE-Puffer) verwendet. Die angelegte Spannung betrug je nach Gelgröße 80-150 V. Die DNA-Banden konnten unter UV-Licht (302 nm) durch das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid (1µg/ml) visualisiert werden.

50x TAE-Puffer *40 mM Tris-Base; 40 mM Eisessig; 2 mM EDTA; pH 7,8*

Ladepuffer, 6x *30 % (w/v) Glycerin; 1 mM EDTA; 0,04 % (w/v)*
Bromphenolblau; 0,04 % (w/v) Xylencyanolblau

2.3.16 Zwischenklonierung mit dem TOPO™ TA-Cloning-System

Zur Zwischenklonierung von generierter NF-I/A-1-cDNA wurde der linearisierte pCR®II-TOPO-Vektor (Invitrogen) eingesetzt, der an seinen 3'-Enden einzelne überhängende Desoxythymidylat-Reste besitzt. Durch ihre Template-unabhängige Transferase-Aktivität fügt die *Taq*-Polymerase an die 3'-Enden der von ihr amplifizierten DNA überhängende Desoxyadenylat-Reste an, die eine von Restriktionsschnittstellen und T4-Ligase unabhängige Insertion in diesen Vektor ermöglichen. Eine an den Vektor gebundene Topoisomerase II katalysiert den kovalenten Einbau des Amplikons in den Vektor (Shuman, 1994). Die Zwischenklonierung von PCR-Produkten wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.3.17 Generierung kohäsiver Enden von cDNA-Inserts und Vektoren

Zur Klonierung der spezifischen cDNA des Transkriptionsfaktors NF-I/A-1 mussten Inserts und Plasmide spezifisch mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *Sall* sequentiell geschnitten werden. Hierfür wurden in der Regel 10 µg DNA mit 2,5 µl *SacI*, 10µl 10x Puffer und 1 µl BSA bei einem Gesamtvolumen von 100 µl für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 5,5 µl 3 M NaCl und 5 µl *Sall* hinzugeben und wiederum für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Restriktion wurde auf einem 1%igem Agarosegel überprüft und die DNA-Fragmente durch Gelextraktion aufgereinigt.

2.3.18 Ligation der NF-I/A-1-cDNA mit den phrGFP-C bzw. pCMV-Tag-4A Expressionsvektoren

Zur Ligation wurde die T4 DNA-Ligase der Firma NEB verwendet. In der Tabelle 2.10 sind verschiedene Ligationsansätze einer direkten Klonierung dargestellt. Die Inkubationszeit betrug 16 h bei 16 °C in einem Thermocycler (PTC-200, Biozym).

Das ideale molare Verhältnis von Insert zu Vector ist variabel und kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$m(\text{Insert}) = \frac{m(\text{Vektor}) \times \text{Größe}(\text{Insert})}{\text{Größe}(\text{Vektor})} \times \text{Verhältnisfaktor}$$

wobei m die Insertmenge (in ng) angibt, die für ein 1:1 Verhältnis Insert zu Vektor steht und daher entsprechend multipliziert werden musste.

Tab. 2.10: Ligationsansätze der direkten Klonierung

	Kontrolle			Ansatz (molares Verhältnis)		
	1	2	3	4 (2:1)	5 (3:1)	6 (4:1)
Vektor (90 ng/μl)	1 μl	1 μl	/	1 μl	1 μl	1 μl
Insert (60 ng/μl)	/	/	1,5 μl	1,2 μl	1,8 μl	2,4 μl
10x T4 DNA-Ligase-Puffer	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
T4 DNA-Ligase	0,5 μl	/	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl
dH₂O	7,5 μl	8 μl	7 μl	6,3 μl	5,7 μl	5,1 μl

2.3.19 Ligationsüberprüfung

Zur Überprüfung erfolgreicher Ligationen zwischen cDNA-Inserts und Zwischenklonierungs- bzw. Expressionsvektoren wurden nach der Transformation von Bakterien (2.3.20) mit den Ligationsansätzen die jeweiligen Plasmide isoliert (2.3.10.1) und mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten.

Für eine Standardreaktion wurden 2 μg DNA, 2 μl des 10x Reaktionspuffers und 1 U Restriktionsenzym bei 20 μl Gesamtvolumen für 1 h bei dem Temperaturoptimum des Enzyms inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 6x Gelladepuffer (2.3.15) gestoppt und durch eine Gelelektrophorese (2.3.15) überprüft.

2.3.20 Transformation von *E.coli* Bakterien

Zur Kontrolle aller Klonierungen und zur weiteren Produktion von Plasmid-DNA wurden Plasmidpräparation bzw. Ligationsansätze in XL10-Gold ultrakompetente *E.coli* Zellen (Stratagene) transformiert. Dazu wurden 25 μl der auf Eis aufgetauten Bakterien zur Steigerung der Transformationseffizienz vor der Zugabe von DNA mit 1 μl β-Mercaptoethanol für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 200 ng einer Plasmidpräparation

oder 2 µl eines Ligationsansatzes zugefügt und für weitere 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Transformation mittels Hitzeschock bei 42 °C für 40 s. Unmittelbar darauf wurden die Bakterien 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 250 µl vorgewärmtes NZY-Medium zugegeben. Der Ansatz wurde 1 h auf einem Drehrad bei 37 °C rotiert und anschließend auf entsprechenden Antibiotikaplatten ausplattiert. Das Wachstum der Bakterienkolonien erfolgte bei 37 °C über Nacht.

2.3.21 Mutagenese zur Korrektur der NF-I/A-1-cDNA

Die Durchführung von Punktmutationen zur Generierung der korrekten NF-I/A-1-cDNA erfolgte nach Anleitung des Herstellers des *QuickChange Site-Directed Mutagenesis*-Kits (Stratagene). Die dazu notwendigen Mutagenese-Primer wurden mit einer eigens dafür entwickelten Primer-Design-Software von Stratagene (<http://labtools.stratagene.com/QC>) entworfen und durch die Firma MWG (Göttingen) synthetisiert.

Die Oligonukleotide, die auf beiden DNA-Strängen des Plasmids komplementär zu der zu mutierenden Sequenz waren, wurden während einer PCR durch die *Pfu*Turbo-Polymerase verlängert, so dass aufgrund des Einbaus der Primer ein die Mutation tragendes Plasmid entstand. Anschließend wurde der Ansatz mit der Endonuklease *DpnI* behandelt, welche aufgrund ihrer Spezifität für methylierte und hemimethylierte DNA den ursprünglichen Vektor enzymatisch spaltet, und dieser auf diese Weise entfernt wurde. Es schloss sich eine Transformation des mutierten Plasmids in *XL1-Blue* superkompetente Zellen an.

2.3.22 Herstellung einer subtraktiven cDNA-Bank

Für das *Screening* der differentiellen Genexpression in kaudalen gegenüber kranialen Chondrozyten und zur Erstellung einer subtraktiven cDNA-Bank (*PCR-Select*-cDNA-Subtraktions-Kit, Clontech) wurde die Methode der suppressiven subtraktiven Hybridisierung (SSH) nach (Diatchenko et al., 1996) angewendet. Die SSH ermöglicht die Identifizierung von Genen, die in einer so genannten *tester*-mRNA-Population spezifisch hochreguliert sind, wohingegen diese Gene in einer zweiten mRNA-Population, der *driver*-mRNA, nicht vorhanden sind bzw. geringer exprimiert werden. Entsprechend wurde die cDNA kranialer Chondrozyten (= *driver*) von der cDNA kaudaler Zellen (= *tester*) subtrahiert, welches als

forward Reaktion bezeichnet wird und zur Identifizierung von cDNA, die in kaudalen Zellen hochreguliert ist, dienen sollte. Parallel wurde die Reaktion auch umgekehrt (*reverse* Reaktion) durchgeführt, da dies für die Analyse der spezifisch in kaudalen Chondrozyten exprimierten oder hochregulierten Gene durch differentielles *Screening* von Bedeutung war (2.3.23). Eine anschließend erzeugte subtraktive cDNA-Bibliothek erlaubte die Detektion von Klonen mit differentiell exprimierten Genen.

Sofern nicht anders erwähnt, stammen die nachfolgend aufgeführten Reagenzien, Primer und Enzyme aus dem PCR-*Select*-cDNA-Subtraktions-Kit. Die Durchführung erfolgte größtenteils anhand der Anleitung des Herstellers, Modifikationen sind im Folgenden erwähnt.

Die Anfertigung der subtraktiven cDNA-Bibliothek lässt sich in folgende Schritte gliedern:

2.3.22.1 cDNA-Synthese

Aufgrund der geringen mRNA-Mengen, welche aus kaudalen Chondrozyten gewonnen werden konnten, wurde zur Herstellung ausreichender cDNA-Mengen kaudaler und kranialer Zellen das SMART-cDNA-Synthese-Kit (2.3.9.2) verwendet.

Damit eine Überprüfung der erfolgreichen subtraktiven Hybridisierung der analysierten *tester* und *driver* cDNA erfolgen konnte, wurde parallel eine Kontroll-Subtraktion mit RNA aus menschlichem Skelettmuskel (im Kit vorhanden) durchgeführt. Die cDNA aus der Skelettmuskel-PolyA⁺ RNA wurde nach Anleitung des PCR-*Select*-Kits hergestellt.

2.3.22.2. Restriktionverdau mit *RsaI*

Zur Erzeugung kurzer, *blunt-ended* cDNA-Fragmente, die sowohl für die folgende Adapterligation als auch für die SSH notwendig sind, wurden die Ansätze mit dem Restriktionsenzym *RsaI* gespalten.

Hierfür wurden zu ca. 400 µl Lösung der kaudalen und kranialen cDNA, 40 µl 10x *RsaI*-Puffer und 1,8 µl *RsaI* (10 U) gegeben und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 8 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Die so verdaute cDNA wurde mit Hilfe des NucleoTrap-PCR-Kits (Clontech) nach Anleitung des SMART-Handbuchs gereinigt, mit

50 µl 4 M NH₄-Acetat und 375 µl Ethanol (96 %) gefällt und nach einem Waschschriff mit 500 µl 80%igem Ethanol in 6,7 µl TNE-Puffer aufgenommen.

Von der Kontroll-Skelettmuskel-cDNA wurden 43,5 µl mit 5 µl 10x *RsaI*-Puffer und 1,5 µl *RsaI* vermischt und 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Der Restriktionsverdau wurde mit 2,5 µl 20x EDTA/Glykogen-Mix gestoppt. Anschließend erfolgte die Reinigung mit jeweils 50 µl Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol (25: 24: 1) und Chloroform: Isoamylalkohol (24: 1). Die cDNA wurde mit 25 µl 4 M NH₄-Acetat und 187,5 µl 95%igem Ethanol gefällt. Nach Waschen mit 200 µl 80%igem Ethanol und Luftrocknung für 10 min wurde das Pellet in 5,5 µl H₂O resuspendiert und bei -20 °C aufbewahrt. Zur Überprüfung der cDNA-Fragmentierung wurden jeweils nicht-gespaltene und durch *RsaI* gespaltene cDNA-Aliquots auf einem 1,2%igem Agarosegel analysiert.

TNE-Puffer

10 mM Tris; 10 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; pH 8

2.3.22.3 Adapterligation

Sowohl die aus kaudalen als auch aus kranialen Chondrozyten erzeugte cDNA wurde mit den Adaptern 1 bzw. 2R ligiert. Zur Herstellung unsubtrahierter Proben, die als Positivkontrollen der Ligationen dienten, wurden Aliquots beider cDNA-Populationen zusätzlich mit beiden Adaptern ligiert.

Nach einer 1:6 Verdünnung mit dH₂O der mit *RsaI* geschnittenen cDNA wurden davon je 2 µl entweder mit dem Adapter 1 oder dem Adapter 2R (je 2 µl, 10 µM) durch eine T4 DNA-Ligase (400 U) für 16 h bei 16 °C in einem Thermocycler (PTC-200, Biozym) ligiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 1 µl EDTA/Glykogen-Mix und durch Hitzeeinwirkung (72 °C) von 5 min gestoppt. Die Aufbewahrung der Proben bis zu ihrer Weiterverarbeitung bzw. Analyse erfolgte bei -20 °C.

Die Überprüfung der Ligation erfolgte durch eine PCR, bei der neben spezifischen GAPDH-Primern (2.3.5.7) der Primer 1 aus dem *Select*-Kit eingesetzt wurde, welcher sich an beide Adapter anlagert. Somit wurde sichergestellt, dass nur dann PCR-Produkte entstanden, wenn die Adapter nach erfolgreicher Ligation an den Enden der cDNA vorhanden waren.

2.3.22.4 Subtraktive Hybridisierung

Bei der *forward* Reaktion wurden je 1,5 µl der mit *RsaI* gespaltenen *driver* cDNA (= cDNA kranialer Chondrozyten) mit je 1,5 µl der mit Adapter 1 bzw. Adapter 2R ligierten *tester* cDNA (= cDNA kaudaler Chondrozyten) und 1 µl Hybridisierungspuffer vermischt und bei 98 °C für 1,5 min denaturiert. Die erste Hybridisierung erfolgte bei 68 °C für 8 h in einem Thermocycler (PTC-200, Biozym). Die Reaktion wurde zur Identifizierung herauf regulierter Gene in kranialen Chondrozyten ebenso in umgekehrter Reihenfolge (*reverse* Reaktion) durchgeführt, was eine Voraussetzung für das differentielle Screenen (2.3.23) der subtraktiven Bibliothek war.

Bei der sich anschließenden zweiten Hybridisierung wurden die beiden Ansätze (je 4 µl) ohne erneute Denaturierung gemischt und frisch denaturierte *driver* cDNA (1 µl) sowie Hybridisierungspuffer (1 µl) und dH₂O (2 µl) hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte bei 68 °C für 16 h. Die Ansätze wurden mit je 200 µl Verdünnungspuffer versetzt und für 7 min auf 68 °C erhitzt.

Bei beiden Hybridisierungsansätzen wurde jeweils ein Überschuss an *driver* cDNA hinzugegeben, so dass nicht differentiell exprimierte Transkripte effektiv Hybride zwischen der *tester* und *driver* cDNA bilden konnten. Dadurch wurde differentiell vorkommende cDNA angereichert, die in den folgenden PCRs exponentiell amplifiziert werden konnte.

2.3.22.5 PCR-Amplifikation

Durch die im Folgenden beschriebenen PCR-Schritte wurde differentiell exprimierte cDNA selektiv angereichert. Im ersten Schritt wurde nur die cDNA mit unterschiedlichen Adaptoren am 5'- und am 3'-Ende exponentiell amplifiziert, wohingegen in der folgenden *nested* PCR der Hintergrund reduziert und differentiell exprimierte cDNA weiter angereichert werden konnte.

In der ersten PCR wurden folgende Ansätze durchgeführt: Zu je 1 µl verdünntem Hybridisierungsansatz wurden 19,5 µl steriles H₂O, 2,5 µl 10x Reaktionspuffer, 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM), 1,0 µl Primer 1 (10 µM) und 0,5 µl *Advantage* cDNA-Polymerase-Mix pipettiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei 75 °C zur Verlängerung der Adapter wurde folgendes PCR Programm durchgeführt: 94 °C 25 s; 94 °C 10 s; 66 °C 30 s; 72 °C 1 min; 28 Zyklen.

Von einer 1:10 Verdünnung des ersten PCR-Produktes wurden je 1 µl in der sich anschließenden *nested* PCR eingesetzt. Zu jedem Ansatz wurden 18,5 µl dH₂O, 2,5 µl 10x Reaktionspuffer, je 1 µl des *Nested* PCR-Primer 1 und des *Nested* PCR-Primer 2R (10 µM), 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM) und 0,5 µl *Advantage* cDNA-Polymerase-Mix gegeben. Die Amplifikation erfolgte bei folgendem Programm: 94 °C 10 s; 68 °C 30 s, 72 °C 1,5 min; 12 Zyklen. Die Analyse der PCR-Produkte wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.3.22.6 PCR-Analyse der Subtraktionseffizienz

Vor der Generierung der subtraktiven cDNA-Bibliothek musste die Effizienz der Subtraktion überprüft werden. Es wurden spezifische GAPDH-Primer (aus Huhn, 2.3.5.7) eingesetzt, um das reduzierte Vorkommen dieses *Housekeeping*-Gens nach erfolgreicher Subtraktion zu bestimmen.

Die unsubtrahierten und subtrahierten cDNAs wurden 1:10 in dH₂O verdünnt. Je 1 µl wurde zu folgenden PCR-Ansätzen gegeben: je 1,2 µl *reverse* und *forward* GAPDH-Primer (10 µM); 22,4 µl H₂O; 3 µl 10x PCR Reaktionspuffer; 0,6 µl dNTPs (10 mM) und 0,6 µl 50 x *Advantage* cDNA-Polymerase-Mix. Die Ansätze wurden folgendem PCR-Programm unterzogen: 94°C 30 s; 65°C 30 s; 68°C 2 min; nach jeweils 18, 23, 28 und 33 Zyklen wurden 5 µl des PCR-Produkts entnommen und auf einem 2%igem Agarosegel analysiert.

2.3.23 Differentielles *Screening* der subtrahierten cDNA

Das Prinzip des differentiellen *Screenings* (*PCR-Select-Differential-Screening*-Kit, Clontech) der subtraktiven cDNA-Bibliothek beruht darauf, dass die Bibliothek neben unsubtrahierter cDNA sowohl mit der *forward* als auch mit der *reverse* subtrahierten cDNA-Probe hybridisiert wurde, so dass eine Verunreinigung durch falsch positive Klone minimiert wurde. Klone, die tatsächlich unterschiedlich exprimierte mRNA repräsentierten, durften hierbei nur mit der *forward*-subtrahierten Probe hybridisieren. Klone, die auch mit der *reverse*-subtrahierten Probe hybridisierten, mussten als Hintergrund angesehen werden (Diatchenko et al., 1996).

Zur Erstellung der Bibliothek wurde die *nested* PCR (2.3.22.5) wiederholt, wobei der Elongationsschritt der PCR bei 72 °C durchgeführt und eine zusätzliche Inkubation von 5 min

bei 72 °C angeschlossen wurde, was für eine anschließende TOPO T/A-Klonierung notwendig war.

2.3.23.1 *NucleoTrap-Nucleic-Acid-Purification-Kit*

Mit Hilfe dieser Methode (*Nucleic-Acid-Purification-Kit*, Clontech) wurden die PCR-Ansätze vor der T/A-Klonierung nach Herstellerangaben aufgereinigt, wobei die gereinigte cDNA jedes Ansatzes in 40 µl dH₂O aufgenommen wurde. Die hier verwendete *NucleoTrap*-PCR-Matrix bindet DNA-Moleküle, die größer sind als 120 bp, so dass Primer und Primer-Dimere in Lösung bleiben und vom Amplifikat getrennt werden konnten.

2.3.23.2 T/A-Klonierung

Zur Klonierung der subtrahierten cDNA in einen T/A-Vektor wurde das TOPO T/A-*Cloning*-Kit (Invitrogen) eingesetzt. Das Prinzip dieses Klonierungsverfahrens ist unter 2.3.16 erläutert. Es wurden 10 ng der *forward* subtrahierten cDNA zur Erstellung der subtraktiven Bibliothek verwendet.

2.3.23.3 cDNA-Array

2.3.23.3.1 Bakterienkolonie-PCR

Zur Erstellung von cDNA-Arrays wurden 96 Klone zufällig ausgewählt und jede Kolonie in 100 µl LB-Medium mit Ampicillin in einer 96-Well-Kulturplatte für 4-6 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Für die folgende Bakterienkolonie-PCR wurde ein 97facher PCR-Master-Mix, der die *Nested* Primer (2.3.5.5) enthielt, hergestellt (siehe Handbuch des *Differential-Screening*-Kit). Jeweils 19 µl dieses Mixes wurden mit je 1 µl Bakterienkultur in einer 96-Well-PCR-Platte vermischt. Anschließend wurde das entsprechende PCR-Programm durchgeführt und die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarosegel analysiert. Zur eventuellen Weiterverwendung wurden von den Minikulturen Einzelausstriche erstellt und bei 4°C gelagert.

2.3.23.3.2 cDNA-Dot Blots

Die PCR-Reaktionen wurden 1:1 mit 0,6 N NaOH verdünnt und jeweils 2 µl des Gemisches auf Nylonmembranen (Hybond-N, *amersham pharmacia*) aufgetupft. Auf diese Weise wurden vier identische Dot Blots hergestellt. Nach kurzer Lufttrocknung wurden die Membranen für 2 min in 0,5 M Tris/HCl (pH 7,5) neutralisiert und unter fließendem dH₂O vorsichtig gewaschen. Die Immobilisierung der DNA auf den Membranen erfolgte durch UV-Bestrahlung mit 120 mJ. Die fertigen Membranen konnten für einige Tage zwischen 3 MM Whatman-Papier bei RT oder in Folie eingeschweißt bei – 20 °C gelagert werden.

2.3.23.4 Kolonie-Array

Für einen Kolonie-Array wurden dieselben 96 Minikulturen wie bei der Bakterienkolonie-PCR eingesetzt.

Ein entsprechend passendes Stück Nylonmembran (Hybond-N, *amersham pharmacia*) wurde auf große LB-Agarplatten mit Ampicillin aufgelegt und von jeder Bakterienkultur wurde 1 µl auf diese Membran aufgetupft. Es wurden vier identische LB-Agarplatten mit aufgelegten Membranen und aufgetupften Bakterienkulturen hergestellt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zur Denaturierung der Kolonien wurden die Nylonmembranen für 4 min auf mit 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl getränkte 3MM Whatman-Papiere gelegt und anschließend in gleicher Weise für 4 min mit 0,5 M Tris/HCl (pH 7,4) neutralisiert. Es folgte eine 30minütige Lufttrocknung mit anschließender Fixierung der DNA auf den Filtern für 90 min bei 80 °C im Wärmeofen.

2.3.23.5 Radioaktive Markierung von subtrahierter und unsubtrahierter cDNA

Durch enzymatischen Einbau von [³²P]-dCTP wurden die subtrahierten und unsubtrahierten cDNA-Proben radioaktiv markiert. Dazu wurden diese jeweils auf 75 – 100 ng /µl verdünnt und entsprechend der Anleitung des Handbooks des PCR-*Select-Differential-Screening-Kits* (Clontech) behandelt. Nicht eingebautes [³²P]-dCTP wurde durch das PCR-*Purification-Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben entfernt, wobei die Elution der Proben mit zweimal 50 µl EB-Puffer (Bestandteil des Kits) erfolgte.

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der Proben wurden die cpm-Werte von je 2 µl mit einem β-Counter (Beckmann) bestimmt.

[α-³²P] dCTP Isoblu > 3000 Ci/mmol, ICN

2.3.23.6 Hybridisierung der Dot Blots

Die Dot Blots wurden in Hybridisierungs-Röhren eingelegt und mit sterilem dH₂O befeuchtet. Für jede Membran wurden 50 µl 20x SSC-Puffer und 50 µl Blockierungslösung (Bestandteil des *Differential-Screening-Kits*) vermischt und nach Erhitzen auf 95 °C für 5 min mit 5 ml Hybridisierungslösung (*ExpressHyb Hybridization Solution*, Clontech) aufgefüllt. Jede Membran wurde mit dieser Lösung für 60 – 80 min bei 72 °C prähybridisiert. Die Hybridisierungssonden wurden vorbereitet, indem 50 µl 20x SSC, 50 µl Blockierungslösung und 10⁷ cpm/100 ng cDNA-Sonde vereinigt und aufgeköcht wurden. Die Inkubation mit den Sonden erfolgte bei 72 °C für ca. 16 h. Anschließend wurden die Blots dreimal 20 min und einmal 45 min mit *Low-Stringency-Puffer* und 2 x 20 min mit *High-Stringency-Puffer* bei 68 °C gewaschen, bis die gemessene Radioaktivität der Waschlösung < 1 cpm betrug. Die Dot Blots wurden in Folie eingeschweißt und die *Screens* aufgelegt, so dass die Signale nach ca. 1 h bei RT durch *Phosphoimaging* (Storm 860, Molecular Dynamics) detektiert werden konnten.

20 x SSC 175,3 g NaCl; 88,2 g Na₃Citrat x H₂O;
pH 7,0

20 % SDS 200 g/l, zum Lösen auf 65 °C erhitzen

Low-Stringency-Puffer 2 x SSC; 0,5 % SDS

High-Stringency-Puffer 0,2 x SSC; 0,5 % SDS

2.3.24 Herstellung und radioaktive Markierung von cDNA-Sonden

Die cDNA-Sonden, die zur Hybridisierung von *Virtual Northern Blots* (= cDNA *Southern Blots*) oder *Northern Blots* eingesetzt werden sollten, wurden durch PCR-Reaktionen, in denen die *Nested Primer 1* und *2R* des *PCR-Select-Subtraction-Kits* eingesetzt wurden, hergestellt. Die PCR-Produkte wurden nach Elektrophorese aus 1,2%igen Agarosegelen ausgeschnitten und mit Hilfe des Gelextraktions-Kits von Qiagen aufgereinigt (2.3.14). Die Konzentration der Sonden wurde auf einem 1,2%igem Agarosegel durch Vergleich mit einem definierten Standard (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, NEB) bestimmt.

Die radioaktive Markierung der Sonden erfolgte mit dem *Prime-a-Gene-Labeling-Kit* von Promega, wobei je 30 ng DNA eingesetzt wurden und die Inkubation der Ansätze für 30 min bei 37 °C erfolgte. Zur Entfernung von nicht inkorporiertem [³²P]-dCTP wurde die DNA mittels des *PCR-Purification-Kits* (2.3.23.5) aufgereinigt und mit zweimal 50 µl EB-Puffer eluiert. Zur Bestimmung der Einbaurate des [³²P]-dCTP wurde die Radioaktivität von 2 µl des Eluates mit einem Szintillationszähler bestimmt. Für alle Hybridisierungsreaktionen wurden ausschließlich Sonden mit einer spezifischen Aktivität von mindestens 10⁶ cpm/µg DNA verwendet.

2.3.25 Southern Blotting

Die mit dem SMART-cDNA-Synthese-Kit hergestellte cDNA aus kaudalen bzw. kranialen Chondrozyten (je 7 µg) wurde elektrophoretisch in einem 1,2%igem Agarosegel aufgetrennt (ca. 3 h bei 80 – 120 V). Das Gel wurde 20 min in Depurinierungspuffer geschwenkt, 30 min mit Denaturierungspuffer gespült und anschließend zweimal 15 min mit Neutralisationspuffer gewaschen. Der Aufbau des Blots und der Kapillartransfer auf die Nylonmembran (Hybond-N, *amersham pharmacia*) erfolgten mit 10x SSC-Puffer bei 4 °C über Nacht nach Standardvorschrift (Sambrook et al., 2001). Die Membran wurde anschließend bei RT getrocknet und die transferierte cDNA durch Bestrahlung mit UV-Licht fixiert.

Depurinierungspuffer 0,25 M HCl

Denaturierungspuffer 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl

Neutralisationspuffer

1 M Tris/HCl; 1,5 M NaCl; pH 7,4

2.3.26 Northern Blotting

Gleiche Mengen (15 – 30 µg) isolierter RNA wurden wie unter 2.3.6 beschrieben vorbereitet und auf ein großes denaturierendes RNA-Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in 1x MOPS-Puffer (2.3.8) mit 80 – 120 V bei 4 °C für 3 – 4 h durchgeführt. Anschließend wurde das Gel für dreimal 20 min in 10x SSC (2.3.23.6) zur Entfernung des Formaldehyds gewaschen. Der Aufbau des Blots, der Kapillartransfer sowie die Fixierung der Proben durch UV-Licht erfolgten wie unter 2.3.25 beschrieben.

2.3.27 Hybridisierung membrangebundener Nukleinsäuren

Die Hybridisierung der *Southern* und *Northern* Blots erfolgte anhand des Protokolls des ExpressHyb Hybridisierung Benutzerhandbuchs (Clontech). Bei den *Southern* Blots wurden die Prähybridisierungs- und die Hybridisierungsschritte bei 60 °C und bei den *Northern* Blots bei 68 °C durchgeführt. Nach Auflegen eines Screens für ca. 2 - 3 h (*Southern* Blot) bzw. über Nacht (*Northern* Blot) erfolgte die Detektion der Signale durch *Phosphoimaging* (Storm 860, Molecular Dynamics). Zur Vorbereitung erneuter Hybridisierungen wurden die Blots für 10 min in 90 – 100 °C heißer 0,5%iger SDS-Lösung gewaschen, luftgetrocknet und nach Einschweißen in Folie bei – 20 °C aufbewahrt.

2.3.28 Sequenzierung

Die Sequenzierungen der cDNA-Klone erfolgten nach der Didesoxy-Methode von (Sanger et al., 1977) durch die Firma MWG, Göttingen.

2.3.29 Sequenzanalysen im Internet

Sequenzen der cDNA-Klone wurden mit dem Programm BLAST (Altschul et al., 1990) mit Datenbankeinträgen verglichen. Das Programm ist über die Internetadresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> abrufbar. Weitere zur Sequenzanalyse verwendete Adressen waren die EMBL-Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk/embl>) für Nukleinsäuren oder die SwissProt-Proteindatenbank (<http://www.ebi.ac.uk/swissprot>). Eine Huhn-spezifische EST-Datenbank ist unter <http://www.chick.umist.ac.uk> zu finden.

2.4 Verwendete Lösungen und Reagenzien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Reagenzien und Lösungsmittel von Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt) bzw. Fluka (St. Gallen, Schweiz) bezogen. Die Restriktionsenzyme stammten von der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt a.M.).

Acryl/Bisacrylamid-Lsg.	Roth, Karlsruhe
Ampicillin-Na-Salz	Biomol, Hamburg
Bacto Agar	Difco, Sparks (USA)
Bacto Hefe-Extrakt	Difco, Sparks, (USA)
Bacto Trypton Extrakt	Difco, Sparks, (USA)
BSA	Serva, Heidelberg
Coomassie Blue R-250	Serva, Heidelberg
³² P-dCTP	ICN Biomedicals Inc., Eschwege
Diethanolamin	Roth, Karlsruhe
DMEM (4,5 g/ml Glucose)	Gibco BRL, Eggenstein
DMSO	Roth, Karlsruhe
Diphenyloxazol	Roth, Karlsruhe
Flourmount G	<i>Southern</i> Biotechnologies, Birmingham,
Fötale Kälberserum	Gibco BRL, Eggenstein
Glukose	Gibco BRL, Eggenstein
Hepes	Biomol, Hamburg
IPTG	ICN Biomedicals Inc., Eschwege
Kollagenase B aus <i>Clostridium histolyticum</i>	Roche Applied Science, Mannheim
<i>Lumasafe Plus</i>	Lumac LSC, Groningen (Niederlande)
Nieder – und Hochtemperatur-Agarose	FMC Bioproducts, Rockland
dNTPs	Eppendorf, Hamburg
Penicillin/Streptomycin, 100x	Gibco BRL, Eggenstein
Pepsin	Serva, Heidelberg
[¹⁴ C]-Prolin	ICN Biomedicals Inc., Eschwege
RNase away	Molecular Bioproducts, San Diego
RNasin	Eppendorf, Hamburg
Seakam-Agarose	Biozym, Oldendorf

Tris	ICN Biomedicals Inc., Eschwege
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Trypsin/EDTA	ICN Biomedicals Inc., Eschwege
Ziegenserum	Dako, Hamburg

3. Ergebnisse

3.1 Erstellung einer subtraktiven cDNA-Bank

Chondrozyten des embryonalen Hühnernersternums besitzen unterschiedliche Differenzierungseigenschaften, die durch ihre anatomische Lokalisation im Sternum begründet sind (Iwamoto et al., 1993). In vorhergehenden Arbeiten konnte durch Kokultur-Experimente gezeigt werden, dass kaudale Chondrozyten sowohl ihre eigene als auch die Hypertrophie kranialer Chondrozyten verhindern können, wenn diese durch IGF-1 oder Insulin induziert wird (Böhme et al., 1995). Diese Blockierung der Hypertrophie kranialer Zellen wird durch lösliche Signalfaktoren, deren Zellrezeptoren und/oder intrazelluläre Signalvermittler hervorgerufen. Die entsprechenden Genprodukte müssen demnach in kaudalen Zellen verstärkt exprimiert werden, so dass deren eigene und die Spätdifferenzierung kranialer Zellen verhindert wird. Zur Klärung dieses Mechanismus wurde eine subtraktive cDNA-Bank erstellt, damit spezifisch exprimierte Gene kaudaler Chondrozyten identifiziert werden können.

Um dies zu erreichen, wurde die Methode der suppressiven subtraktiven Hybridisierung (SSH) gewählt (Diatchenko et al., 1996). Zum einen wurde die cDNA kranialer Zellen (= *driver*) von der cDNA kaudaler Chondrozyten (= *tester*) subtrahiert, was im Folgenden als *forward reaction* bezeichnet wird und zur Identifizierung von Genen führte, die in kaudalen Chondrozyten hochreguliert waren. Zum anderen wurde die Reaktion in umgekehrter Reihenfolge (*reverse reaction*) durchgeführt, um einen cDNA-Pool mit in kranialen Chondrozyten verstärkt exprimierten Genen zu erhalten. Durch die SSH konnte eine Angleichung der Häufigkeit der differentiellen cDNAs erreicht werden, so dass stark und schwach exprimierte Gene in der subtraktiven Bank gleichermaßen vertreten waren. Das Funktionsprinzip der SSH ist in Abb. 3.1 dargestellt.

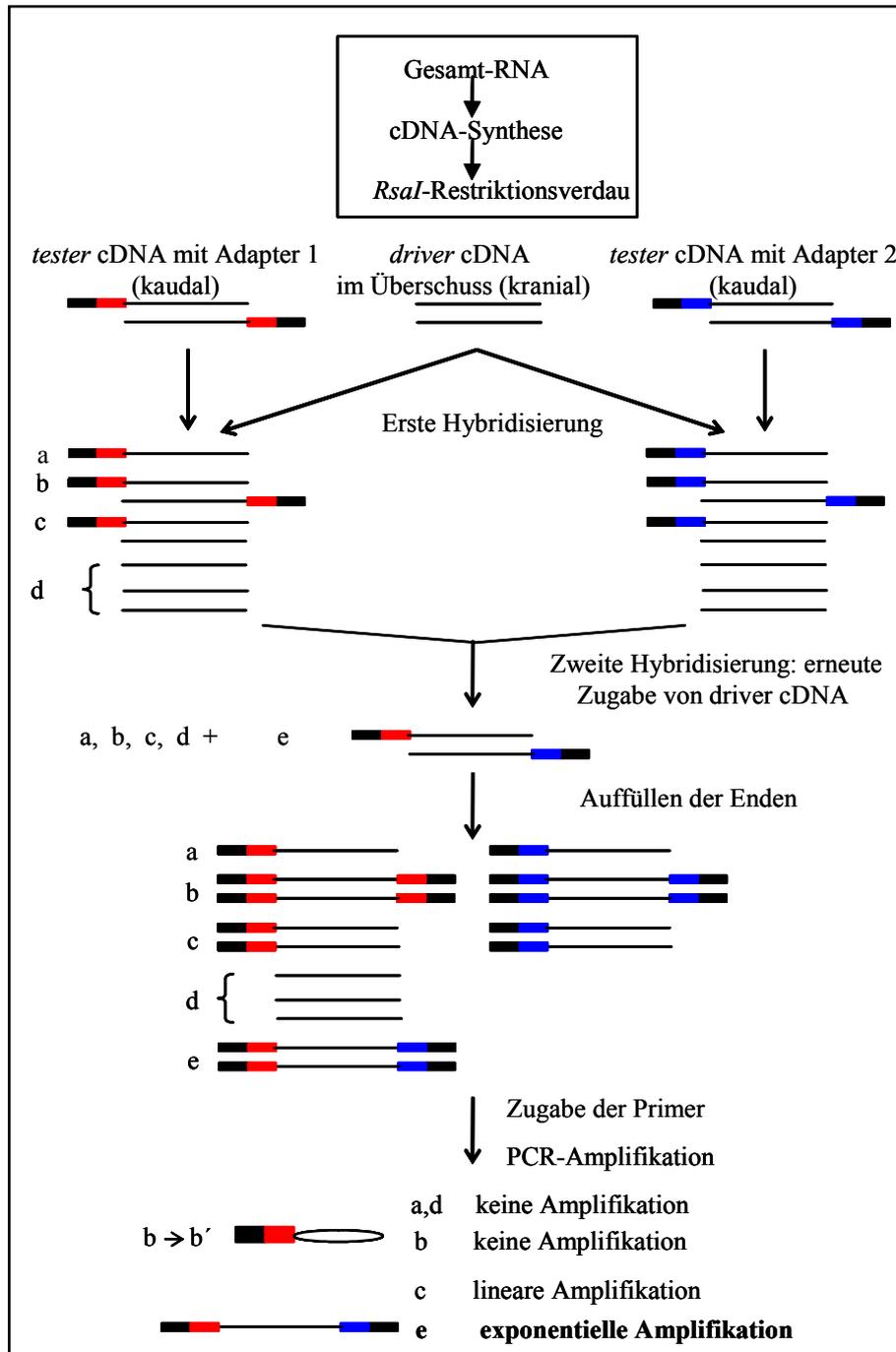


Abb. 3.1: Schema der suppressiven subtraktiven Hybridisierung, *forward reaction*.

Die SSH ermöglicht die Anreicherung von cDNAs, die spezifisch in einer so genannten *tester*-, aber nicht bzw. deutlich reduziert in einer anderen, so genannten *driver* cDNA-Population vorkommen. Die ds cDNA von *driver* und *tester* wird mit dem Restriktionsenzym *RsaI* geschnitten. Nur die *tester* cDNA-Fragmente werden in getrennten Ansätzen mit verschiedenen Adaptoren ligiert und in zwei aufeinander folgenden Hybridisierungen mit einem Überschuss an *driver* cDNA inkubiert. In den folgenden PCR-Reaktionen werden nur solche cDNA-Fragmente exponentiell amplifiziert, die unterschiedliche Adapter besitzen. Dadurch wird einerseits eine effektive Subtraktion von nicht differentiell exprimierten Genen erreicht, andererseits findet auch eine Angleichung der Häufigkeit differentiell exprimierter Gene (Suppression) statt. Die Suppression beruht darauf, dass in großer Anzahl vorhandene cDNA-Fragmente mit höherer Wahrscheinlichkeit bereits in der ersten Hybridisierung einen Bindungspartner finden. Schema verändert nach Diatchenko et al., 1996.

3.1.1 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Zur Isolation von RNA aus kranialen und kaudalen Chondrozyten wurden Hühnersterna mit bakterieller Kollagenase über Nacht verdaut und die Zellen am nächsten Tag aufgearbeitet (2.1.1). Aus 200 embryonalen Hühnersterna konnten in der Regel $2-4 \times 10^7$ kaudale Zellen und $2,3-3,5 \times 10^8$ kraniale Zellen isoliert werden. Zu Beginn der Arbeit wurde die Gesamt-RNA dieser Chondrozyten mit dem RNeasy Midi-Kit (2.3.6) aufgereinigt, wobei immer die gesamten kaudalen Zellen und eine entsprechende Anzahl kranialer Zellen eingesetzt wurden. Tabelle 3.1 zeigt repräsentativ die Ausbeute an Gesamt-RNA aus jeweils vier Präparationen von kaudalen (ka) bzw. kranialen (kr) Chondrozyten.

Tab. 3.1: Gesamt-RNA Ausbeute aus kranialen und kaudalen Chondrozyten

Probe	Zellzahl [$\times 10^7$]	Gesamt-RNA [μg]
ka 1	2,0	70
ka 2	2,5	70
ka 3	4,0	100
ka 4	3,0	80
kr 1	4,5	220
kr 2	3,7	200
kr 3	6,2	430
kr 4	4,2	180

Im PCR-*Select*-Subtraktions-Kit müssen $0,5-2 \mu\text{g}$ mRNA zur cDNA-Synthese eingesetzt werden. Allerdings enthält Gesamt-RNA lediglich ca. 2 % mRNA. Folglich mussten die RNA-Proben kaudaler Chondrozyten von ca. 800 Hühnersterna vereinigt werden, so dass durch Verwendung eines mRNA -Isolierungskits mit einer theoretischen Ausbeute von $6 \mu\text{g}$ mRNA gerechnet werden konnte. Bei Durchführung des Oligotex-mRNA-Isolierungskits (2.3.7) konnten keine ausreichenden Mengen an mRNA gewonnen bzw. die Konzentration mit den üblichen Methoden nicht bestimmt werden (OD-Messungen, 2.3.12). Aus diesem Grund wurde die cDNA-Synthese anschließend mit dem PCR-cDNA-Synthese-SMART-Kit (2.3.9.2) durchgeführt. Bei dieser Methode wird die cDNA-Synthese durch eine PCR-Amplifikation des cDNA-Zweitstranges erreicht, so dass selbst aus geringen RNA-Mengen ausreichende Mengen an cDNA generiert werden konnten.

Weiterhin ist die cDNA mit Volllänge-Konstrukten angereichert und kann in Genexpressionsstudien, wie z.B. im suppressiven Subtraktions-Kit (2.3.22) als auch in *Virtual Northern Blots* (2.3.25) eingesetzt werden. Zur Produktion von cDNA mit dieser Methode

wurden lediglich je 1 µg Gesamt-RNA aus kranialen und kaudalen Chondrozyten verwendet. Das Prinzip der Methode ist schematisch in Abb. 3.2 dargestellt.

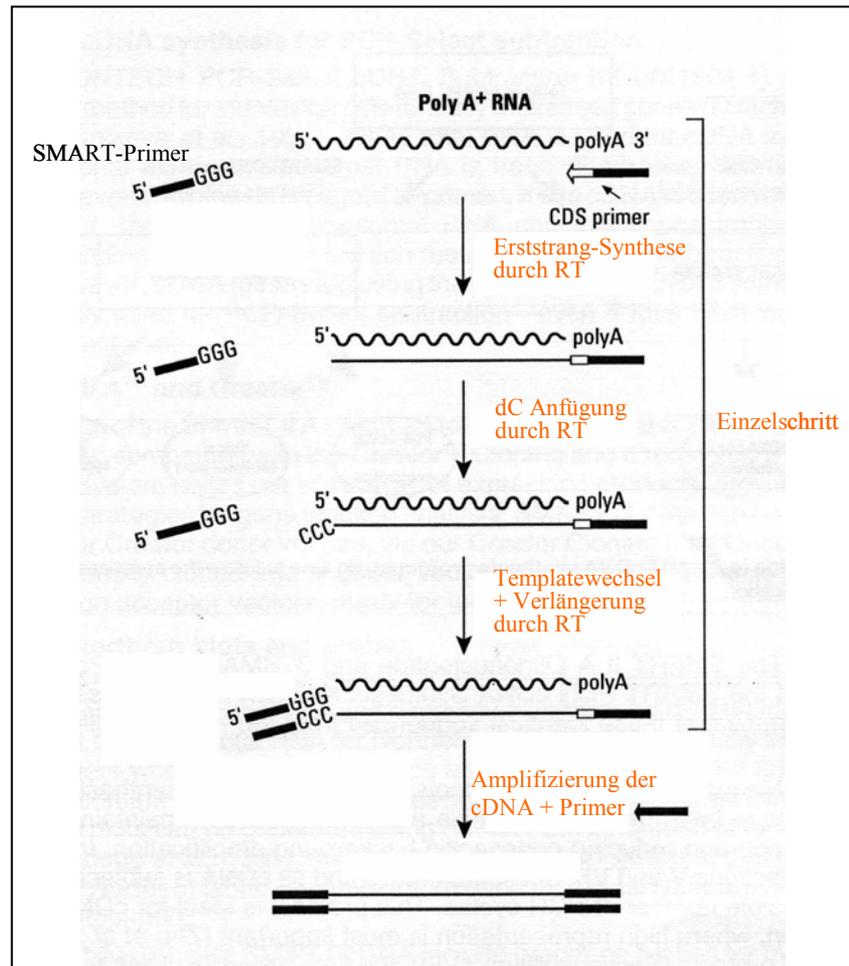


Abb. 3.2: Schema der SMART-cDNA-Synthese. Ein modifizierter oligo(dT)-Primer (CDS-Primer) lagert sich an den mRNA-Erststrang an, wohingegen der SMART-Primer als kurzes Template am 5'-Ende der mRNA dient. Wenn die Reverse Transkriptase das 5'-Ende der mRNA erreicht, werden durch die Transferase-Aktivität des Enzyms zusätzliche Deoxycytidine an das 3'-Ende der cDNA angehängt. Der SMART-Primer besitzt an seinem 3'-Ende eine oligo (dG) Sequenz und kann sich an die Deoxycytidin-Sequenz anlagern, wodurch ein verlängertes Template entsteht. Die Reverse Transkriptase wechselt das Template und vollendet die Replikation bis an das Ende des SMART-Primers (Chenchik et al., 1996). Die resultierende Volllänge sscDNA enthält das komplette 5'-Ende der mRNA und eine Sequenz, die komplementär zum SMART-Oligonukleotid ist, welche somit als Primer-Sequenz in der folgenden Zweitstrang-Amplifikation dient. Modifiziert nach dem Handbuch zum SMART-PCR-cDNA-Synthese-Kit (Clontech).

3.1.2 Analyse der Adapterligation

Nach Restriktionsverdau mit *RsaI* (2.3.22.2) wurden die *tester* cDNA-Populationen (*forward* und *reverse* Reaktion) mit zwei unterschiedlichen Adaptern ligiert. Die 5'-Enden der Adapter waren nicht phosphoryliert, so dass jeweils nur ein Strang jedes Adapters sich mit dem 5'-Ende der jeweiligen cDNA verbinden konnte. Beide Adapter wiesen Bereiche identischer Sequenzen auf, damit die Basenpaarung des PCR-Primers 1 in den folgenden PCR-

Reaktionen nach Auffüllung der unterbrochenen Enden durch eine *Taq* Polymerase möglich war. Jede *tester* cDNA wurde in zwei Einheiten aufgeteilt, wobei die eine Hälfte mit dem Adapter 1 und die andere mit dem Adapter 2R ligiert wurde. Vor der Durchführung der Ligasereaktion wurden zusätzlich Aliquots der unterschiedlichen Ansätze (Adapter 1 und 2R) jeder *tester* Reaktion miteinander vermischt, so dass ein Teil der cDNA mit beiden Adaptoren ligiert wurde. Alle Proben durchliefen anschließend die Ligationsreaktion. Die letzteren wurden im weiteren Verlauf dieser Methode nicht voneinander subtrahiert, um bei der Subtraktionsanalyse als Negativkontrolle zu dienen.

Die Überprüfung der erfolgreichen Ligation erfolgte durch eine PCR, bei der neben spezifischen GAPDH-Primern (Tabelle 2.8) der Primer 1 aus dem *Select*-Kit eingesetzt wurde, welcher mit beiden Adaptoren Basenpaarungen eingeht. Damit war sichergestellt, dass nur PCR-Produkte entstanden, wenn nach der Ligation an den 5'-Enden der cDNA die Adapter vorhanden waren. Dazu wurden aus der Huhn-GAPDH-Sequenz abgeleitete Primer (chGAPDH3', chGAPDH5') verwendet, da das Subtraktions-Kit nur für humane Proben ausgelegt ist. Die PCR-Produkte der Ligationsanalyse sind in Abb. 3.3 dargestellt.

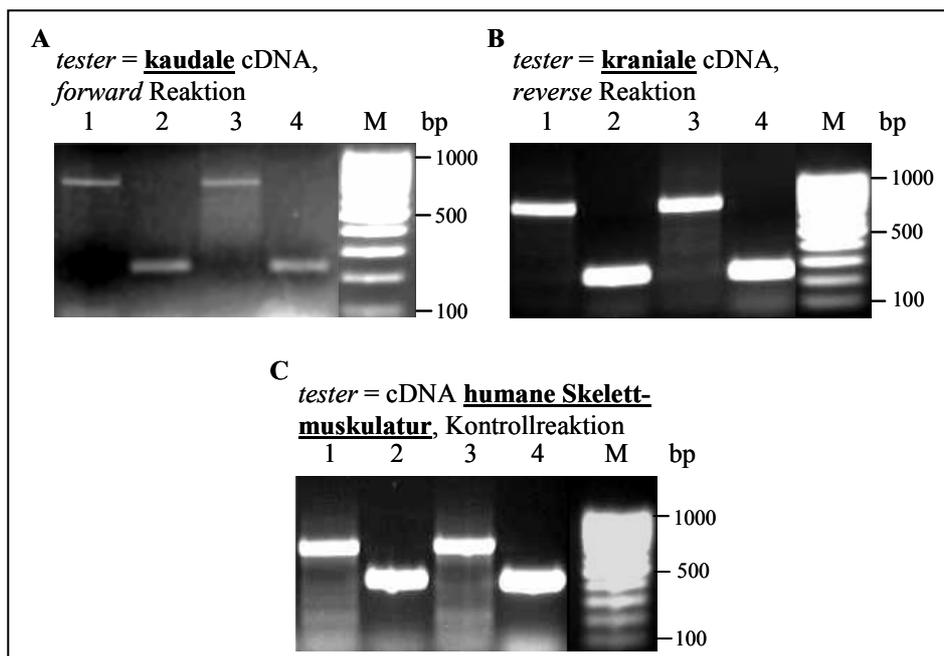


Abb. 3.3: PCR-Analyse der Ligationseffizienz **A:** Als Template diente cDNA kaudaler Chondrozyten, die mit dem Adapter 1 (Bahn 1+2) bzw. mit dem Adapter 2R (Bahn 3+4) ligiert war. **Bahn 1+2:** Als Primer in der PCR 1 wurden der chGAPDH 3'-Primer und der Primer 1 sowie in PCR 2 die chGAPDH Primer 3' und 5' eingesetzt. **Bahn 3+4:** Die Primer wurden analog zur Bahn 1+2 eingesetzt. **B:** Als Template diente cDNA kranialer Chondrozyten, die analog zu A mit dem Adapter 1 bzw. Adapter 2R ligiert war. **Bahn 1-4:** Die Verwendung der Primer erfolgte wie unter A. **C:** Als Template diente cDNA aus humaner Skelettmuskulatur, die analog zu A mit dem Adapter 1 oder Adapter 2R ligiert war. **Bahn 1-4:** Die Verwendung der Primer erfolgte wie unter A, wobei humane GAPDH-Primer eingesetzt wurden. 2%iges Agarosegel. M: Gene Ruler 100 bp DNA-Größenmarker.

In den Abbildungen A, B und C ist in den Bahnen 1 und 3 erkennbar, dass PCR-Produkte mit einer Größe von 800-900 bp (A, B: erwartet: 892 bp) bzw. 700-800 bp (C: erwartet 753 bp) entstanden sind, so dass von einer erfolgreichen Adapterligation bei allen drei cDNAs ausgegangen werden konnte. In diesen PCRs wurden ein spezifischer GAPDH-Primer und der Primer 1 eingesetzt, der an komplementäre Sequenzen in den Adaptern 1 und 2R bindet. Die Intensität dieser Banden sollte vergleichbar sein mit der Intensität der GAPDH-spezifischen Banden (Bahn 2 und 4, Handbuch des PCR-*Select*-cDNA-Subtraktions-Kit). Dies konnte bei diesen Ansätzen bestätigt werden. Somit wurde von einer ausreichenden Effizienz der Ligation ausgegangen. Weiterhin dienen die Bahnen 2 und 4 in jeder Abbildung als Kontrolle der cDNA-Synthese. Die PCR-Produkte, bei denen *tester* cDNA aus kaudalen Chondrozyten als Template eingesetzt wurden (A), sind wesentlich schwächer als die der anderen Ansätze. Da aber das Intensitätsverhältnis der Banden den Erwartungen entspricht (s.o.), wurde mit der subtraktiven Hybridisierung fortgefahren. Anhand der Kontrollreaktion in C ist ersichtlich, dass die Ligase und die Adapter des *Select*-Kits funktionsfähig waren.

3.1.3 Analyse der PCR-Amplifikationen und Kontrolle der Subtraktion

Durch die PCR-Amplifikationsschritte während der subtraktiven Hybridisierungsmethode wurden die differentiell exprimierten cDNAs selektiv amplifiziert. Zuerst mussten die fehlenden Stränge der Adapter durch eine kurze Inkubation des PCR-Ansatzes bei 75 °C aufgefüllt werden, damit die Bindungsstelle für den Primer 1 entstehen konnte. Bei der folgenden ersten PCR wurden nur doppelsträngige cDNAs, die beide Adapter an den 3'- und 5'-Enden besaßen, exponentiell amplifiziert. Die zweite, so genannte *nested* PCR wurde zur Reduktion des Hintergrundes und zur weiteren Anreicherung von unterschiedlich exprimierten Sequenzen durchgeführt.

Um die erfolgreiche Subtraktion zu demonstrieren, wurde einer *tester* Kontrollreaktion mit cDNA aus humaner Skelettmuskulatur 0,2% (w/w) *Hae III*-geschnittene Φ X174-cDNA zugefügt. Nach der Subtraktion dieser *tester* Probe (Skelettmuskulatur) gegen eine *driver* Probe (Skelettmuskulatur), der keine Φ X174-DNA beigemischt wurde, sollten die kräftigsten Banden den Kontrollfragmenten der Φ X174-DNA entsprechen.

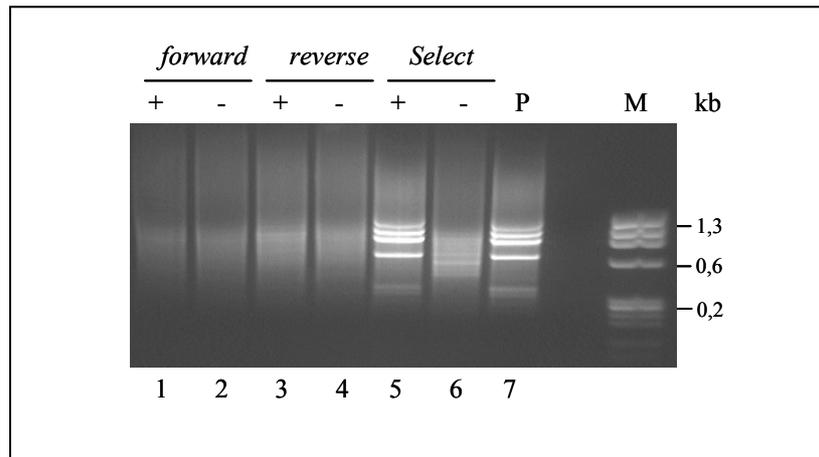


Abb. 3.4: Analyse der PCR-Amplifikationen. Aufgetragen sind die Produkte der *nested* PCR. **Bahn 1-4:** subtrahierte (+) bzw. nicht subtrahierte (-) cDNAs der *forward* bzw. *reverse* Reaktionen. **Bahn 5-8:** subtrahierte bzw. nicht subtrahierte Kontrollreaktionen des PCR-*Select*-Subtraktions-Kits. **P:** Positivkontrolle aus dem *Select*-Kit, die erfolgreich subtrahierte Φ X174 DNA/*Hae III*-cDNA enthielt. **M:** Φ X174 DNA/*Hae III* Größenmarker. 2%iges Agarosegel.

Bei der als Positivkontrolle eingesetzten Probe sollte laut Herstellerangaben nach den PCR-Amplifikationen das typische Bandenmuster der mit *Hae III* verdauten Φ X174-DNA erscheinen, was in Abb. 3.4 erkennbar ist. Die subtrahierte Kontrollreaktion aus dem PCR-*Select*-Subtraktions-Kit zeigte das gleiche Bandenmuster, was nur erfolgen konnte, wenn die Subtraktion erfolgreich war. Die PCR-Produkte der *forward* und *reverse* Reaktionen erschienen in einem Schmierbereich von ca. 0,2 bis mindestens 1,3 kb, ohne distinkte Banden aufzuweisen. Die Subtraktion mit dem Kontrollansatz war erfolgreich, und die subtraktive Hybridisierung der cDNA aus Chondrozyten wurde entsprechend durchgeführt, so dass auch hier von einer positiven Subtraktion ausgegangen wurde.

3.1.4 PCR-Analyse der Subtraktionseffizienz

Die Effizienz der Subtraktion wurde durch den Vergleich von bekannter cDNA vor und nach der Subtraktion bestimmt. In einer PCR wurden Huhn-spezifische GAPDH-Primer (Tab. 2.8) eingesetzt und jeweils nach 18, 23, 28 und 33 Zyklen Proben entnommen und analysiert. So zeigte sich nach Subtraktion eine deutliche Konzentrationsabnahme der cDNA dieses *Housekeeping*-Gens. In Abb. 3.5 ist die PCR-Analyse der Subtraktionseffizienz dargestellt.

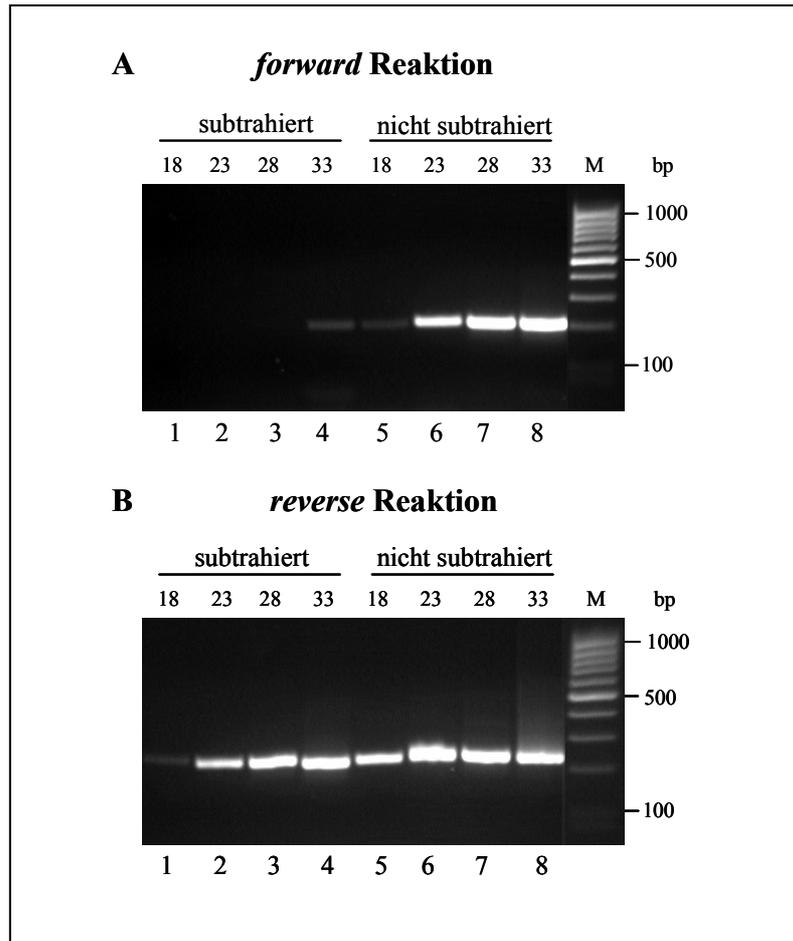


Abb. 3.5: PCR Analyse der GAPDH-Expression nach subtraktiver Hybridisierung. Es wurden als Template subtrahierte (**Bahn 1-4**) und nicht subtrahierte Produkte (**Bahn 5-8**) der *nested* PCR (3.1.3) eingesetzt; als Primer dienten die chGAPDH-Primer (Tab. 2.8). **A:** In der *forward* Reaktion wurde cDNA kranialer Chondrozyten (= *driver*) von cDNA kaudaler Chondrozyten (= *tester*) subtrahiert. **B:** In der *reverse* Reaktion wurde cDNA kaudaler Chondrozyten (= *driver*) von cDNA kranialer Chondrozyten (= *tester*) subtrahiert. Aliquots der PCR-Reaktionen wurden nach den angegebenen Zyklen entnommen und analysiert. M: Gene Ruler 100 bp DNA Größenmarker. 2%iges Agarosegel.

Abbildung 3.5 A zeigt die erfolgreiche Subtraktion der *forward* Reaktion, bei der cDNA kranialer Chondrozyten von cDNA kaudaler Chondrozyten subtrahiert wurde. Die GAPDH-spezifische Bande konnte in der nicht-subtrahierten Probe bereits ab dem Zyklus 18 detektiert werden. In der subtrahierten Probe hingegen lag das spezifische GAPDH-PCR-Produkt in nachweisbarer Menge erst ab dem dreiunddreißigsten Zyklus vor. Das bedeutet, dass die GAPDH-cDNA durch die *forward* Reaktion der subtraktiven Hybridisierung nahezu vollständig entfernt wurde.

Das Ergebnis der Subtraktion der *reverse* Reaktion ist in Abb. 3.5 B dargestellt. Sowohl bei der nicht-subtrahierten als auch bei der subtrahierten cDNA sind bei allen Amplifikationsrunden GAPDH-spezifische Banden zu erkennen. Bei der nicht subtrahierten cDNA entspricht dies den Erwartungen, jedoch sollte bei der subtrahierten Probe das RT-

PCR-Produkt erst in späteren Amplifikationszyklen erscheinen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde bei der Durchführung von *Virtual Northern* Blots deutlich, dass GAPDH in den kranialen Chondrozyten stärker als in den kaudalen Zellen exprimiert wird, so dass bei der *reverse* Reaktion weniger GAPDH-Transkripte aus dem cDNA-Gesamtpool eliminiert wurden. Es ist jedoch erkennbar, dass die Banden der subtrahierten Reaktion insgesamt schwächer ausfallen, d.h. dass insgesamt weniger GAPDH-cDNA vorhanden war. Da das Hauptaugenmerk dieser Arbeit den in kaudalen Chondrozyten hochregulierten Genen galt, war es wichtig, dass die *forward* Reaktion optimal verlaufen war. Die cDNA der *reverse* Reaktion wurde beim differentiellen Screenen eingesetzt und diente lediglich als Kontrolle zum späteren Abgleich des Hintergrundes durch falsch positive Klone (3.1.5).

3.1.5 Analyse der subtraktiven Bibliothek durch differentielles *Screening*

Obwohl die PCR-*Select*-Methode eine Technik darstellt, mit der erfolgreich differentiell exprimierte Sequenzen von spezifischen Zellen angereichert werden können, beinhaltet die subtrahierte cDNA trotzdem Sequenzen, die in beiden der miteinander verglichenen Zellpopulationen vorkommen. Aus diesem Grunde wurde bei der hier durchgeführten SSH mit kaudalen und kranialen Chondrozyten eine differentielle Analyse der subtraktiven Bibliothek angeschlossen.

Die *forward* subtrahierte cDNA wurde zur Erstellung einer subtraktiven Bibliothek in den T/A-Vektor des TOPO T/A-*Cloning*-Kits ligiert (2.3.23.2). Es wurde nur mit dieser cDNA eine Bibliothek angefertigt, da dieser cDNA-Pool Genprodukte repräsentierte, die in kaudalen Chondrozyten verstärkt und in kranialen schwächer oder nicht exprimiert wurden. Beim anschließenden differentiellen Screenen wurde die subtraktive Bibliothek sowohl mit der *forward* als auch mit der *reverse* subtrahierten cDNA hybridisiert, um die Anzahl falsch positiver Klone zu minimieren.

Dazu musste zuerst die *nested* PCR wiederholt werden, wobei der Elongationsschritt der PCR bei 72 °C durchgeführt und eine zusätzliche Inkubation von 5 min bei 72 °C angeschlossen wurde, die für die anschließende TOPO T/A-Klonierung notwendig war. So konnten mit 10 ng subtrahierter cDNA 300 Bakterienklone erzeugt werden.

In drei Durchmusterungen wurden insgesamt 288 zufällige Klone (jeweils 96 in den *Screenings* A, B, und C) mittels Bakterienkolonie-PCR untersucht (2.3.23.3.1). Die PCR-

Produkte wurden auf Agarosegelen analysiert, so dass bei der *Array*-Erstellung die Qualität und Quantität der PCR-Amplikons überprüft werden konnte (Abb. 3.6).

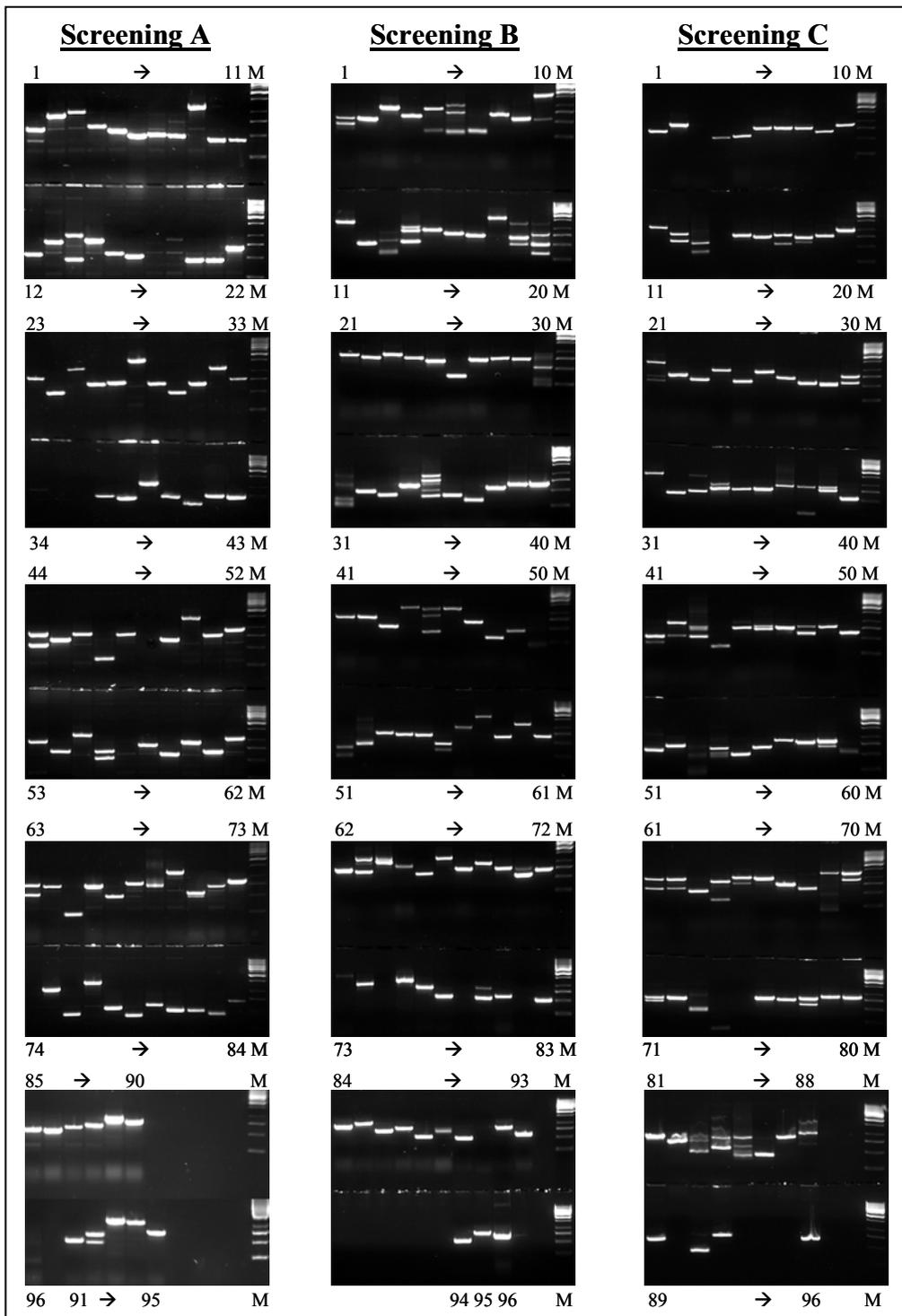


Abb. 3.6: Produkte der Bakterienkolonie-PCR der Screenings A, B und C. Durch Bakterienkolonie-PCR wurde die Qualität und Quantität der cDNA-Inserts von 288 (dreimal 96 Klone) Bakterienklonen überprüft. Zur Amplifizierung wurden die *nested* Primer (Tab. 2.7) in der PCR eingesetzt. Anschließend wurden jeweils 5 µl der PCR-Produkte auf 2%igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. M: 1 kb DNA-Größenmarker.

In Abb. 3.6 sind die Produkte der Bakterienkolonie-PCR der *Screenings* A, B und C dargestellt. Es ist zu erkennen, dass Produkte zwischen 0,2 und 1,4 kb entstanden sind, wobei überwiegend Fragmente mit 0,6-0,75 kb vorkamen. Hieran lässt sich erkennen, dass der *RsaI*-Verdau der *tester* und *driver* cDNA erfolgreich verlaufen war, da das Restriktionsenzym *RsaI* Fragmente generiert, die eine durchschnittliche Größe von ca. 600 bp besitzen (Diatchenko et al., 1996). Lediglich in 14 von insgesamt 288 Bakterienklonen konnte kein Produkt amplifiziert werden, was einer guten Transformationseffizienz von 95 % entspricht. Teilweise waren mehrere Banden in den Gelspuren erkennbar, was darauf schließen lässt, dass entweder ein Klongemisch in dem entsprechendem Ansatz vorlag, oder aber die Sequenz der *nested* Primer innerhalb des cDNA-Inserts der entsprechenden Klone ebenfalls vorlag.

Diese Klone wurden in den folgenden Schritten der differentiellen Analyse auf Nylonmembranen transferiert, welche anschließend mittels radioaktiver Hybridisierung analysiert wurden. Es waren zwei verschiedenen Wege zur Erstellung von cDNA-Arrays möglich: die Durchführung von cDNA-Dot Blots oder von Kolonie-Dot Blots.

3.1.5.1 Vergleich von cDNA-Dot Blots und Kolonie-Dot Blots mit Klonen des Screenings A der subtraktiven Bibliothek

Zur Erstellung der Kolonie-Arrays wurde je 1 µl der Bakterienkulturen auf Nylonmembranen aufgebracht, welche auf LB-Amp-Agarplatten auflagen und bei 37 °C über Nacht inkubiert wurden. Auf diese Weise wurden vier identische Blots angefertigt, so dass die Hybridisierung sowohl mit den radioaktiv markierten *forward* und *reverse* subtrahierten cDNAs (2.3.23.5) als auch mit nicht subtrahierten cDNAs aus kaudalen und kranialen Chondrozyten möglich war.

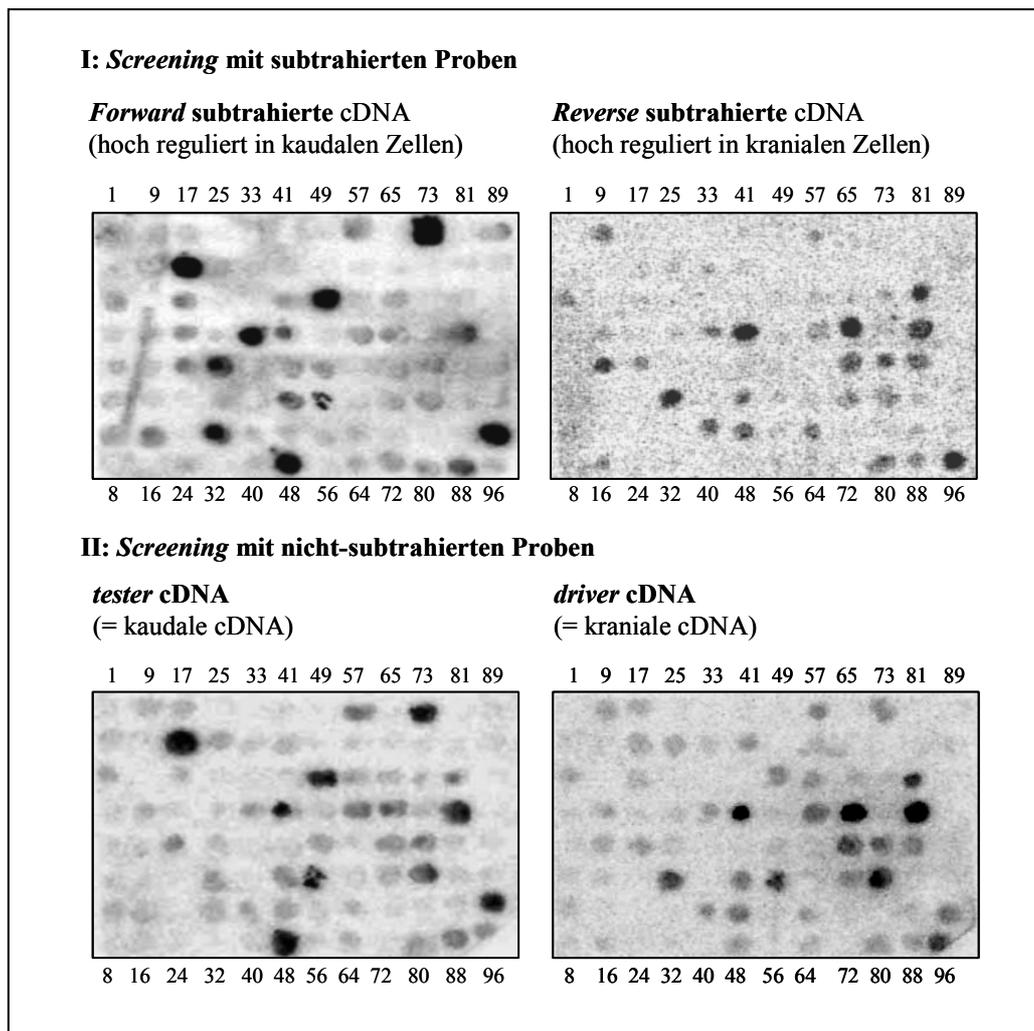


Abb. 3.7: Vergleich der Kolonie-Dot Blots von Klonen der subtraktiven Bibliothek, Screening A. Je 1 µl Kulturmedium jeder Bakteriensuspension wurde auf Nylonmembranen aufgetragen, so dass vier identische Kolonie-Dot Blots entstanden. **I:** Kolonie-Dot Blots, hybridisiert mit den [³²P]-dCTP markierten *forward* und *reverse* subtrahierten cDNA-Proben. **II:** Kolonie-Blots, hybridisiert mit [³²P]-dCTP markierten nicht subtrahierten cDNA-Proben, erstellt aus *tester* und *driver* RNA. Es wurden gleiche cpm-Mengen der radioaktiv markierten Proben eingesetzt.

In Abb. 3.7 sind die Kolonie-Dot Blots des *Screenings A* der subtraktiven Bibliothek dargestellt. Dot Blots, die mit der radioaktiv markierten *forward* subtrahierten cDNA und der *tester* cDNA (= cDNA kaudaler Chondrozyten) hybridisiert wurden, zeigten eine identische Signalverteilung. Auch die mit der *reverse* subtrahierten cDNA und mit der *driver* cDNA (= cDNA kranialer Chondrozyten) hybridisierten Kolonie-Dot Blots zeigten das gleiche Hybridisierungsmuster. Bakterienklone, die Signale auf dem mit der *forward* cDNA hybridisierten Blot ergaben, enthielten cDNA-Inserts, die spezifisch in kaudalen Chondrozyten verstärkt exprimierte Gene repräsentierten. Dies stimmt damit überein, dass diese Klone ebenfalls auf dem mit unsubtrahierter kaudaler *tester* DNA hybridisierten Blot ein gleich intensives Signal ergaben.

Weiterhin lieferten Bakterienklone, die in kaudalen Chondrozyten verstärkt vorkommende Sequenzen enthielten, nur mit der *forward* subtrahierten bzw. *tester* cDNA, aber nicht mit der *reverse* subtrahierten bzw. *driver* cDNA, ein verstärktes positives Signal.

Durch die Hybridisierung der Klone der subtraktiven Bibliothek mit der *tester* spezifischen cDNA-Probe können hochregulierte Sequenzen in kaudalen Chondrozyten identifiziert werden. Es werden hierbei jedoch nur relativ häufig vorkommende cDNAs erfasst (Wang und Brown, 1991). Durch die zusätzliche Analyse der Bibliothek mit den subtrahierten Proben kann die Sensitivität des differentiellen Screenings erhöht werden, da so auch gering exprimierte Klone erfasst werden, die während der SSH angereichert wurden.

Da die Bakterienkulturen auf den Kolonie-Dot Blots unterschiedlich stark bzw. einige nicht angewachsen waren, wurden entsprechende cDNA-Dot Blots erstellt, um eine bessere Vergleichbarkeit der Hybridisierungssignale zu gewährleisten.

Zur Erstellung dieser cDNA-Arrays wurden die Produkte der Bakterienkolonie-PCR (Abb. 3.6) mit NaOH denaturiert und von diesen Lösungen je 2 µl auf Nylonmembranen aufgetragen. Es wurden erneut vier identische Dot Blots erzeugt.

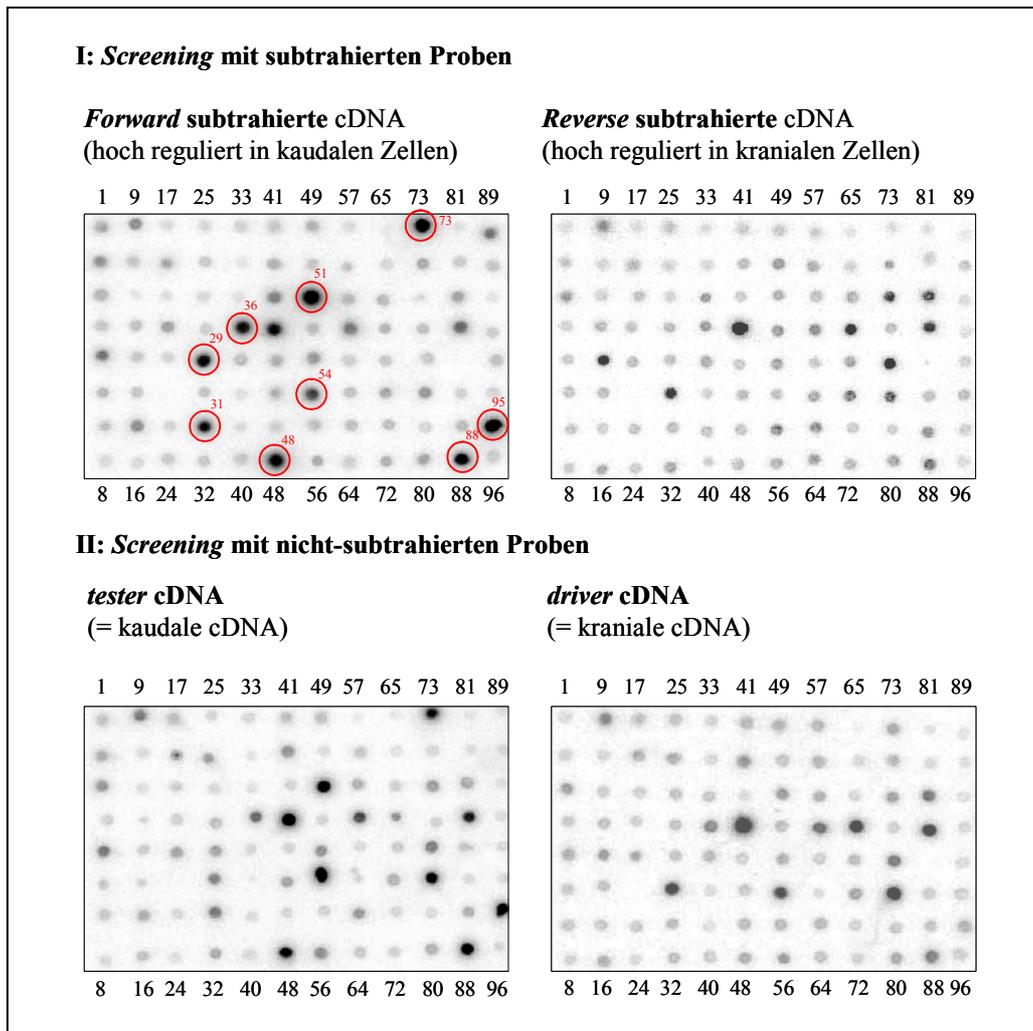


Abb. 3.8: Vergleich der cDNA-Dot Blots von Klonen der subtraktiven Bibliothek, Screening A. Die cDNA-Inserts in den Klonen der subtraktiven Bibliothek wurden durch Bakterienkolonie-PCR amplifiziert und je 2 µl auf vier identische Nylonmembranen aufgetragen. In **I** sind die cDNA-Dot Blots mit den [³²P]-dCTP markierten *forward* und *reverse* subtrahierten cDNAs hybridisiert worden. In **II** ist die Hybridisierung mit [³²P]-dCTP markierten unsubtrahierten Proben aus kaudalen (= *tester*) und kranialen (= *driver*) Chondrozyten dargestellt. Es wurden gleiche cpm-Mengen der radioaktiv markierten Proben eingesetzt.

Beim Vergleich der Dot Blots ergaben die Klone 29, 31, 36, 48, 51, 54, 73, 88 und 95 mit der markierten *forward* subtrahierten Probe ein deutliches positives Signal, so dass sie der weiteren Analyse durch Sequenzierung unterzogen wurden. Bei der Auswertung der Dot Blots war es wichtig zu beachten, dass die verschiedenen Klone mit den markierten Proben unterschiedlich stark hybridisieren konnten. So wurde bei den Bakterienklonen 48, 51, 73, 88 und 95 sowohl ein positives Signal mit der *forward* subtrahierten als auch mit der *tester* spezifischen cDNA-Probe detektiert. Die cDNA-Inserts dieser Klone entsprachen folglich in kaudalen Chondrozyten verstärkt exprimierten Genen. Die Bakterien der Klone 29 und 31 besaßen Plasmide, die in kaudalen Chondrozyten gering transkribierten Genprodukten entsprachen, weil sie nur mit der *forward* subtrahierten cDNA hybridisierten und so während der SSH angereichert worden waren. Dadurch ergaben sie keine Signale mit der *tester* cDNA.

Die Klone 36 und 54 zeigten außer bei der *reverse* subtrahierten Probe auch bei den anderen Hybridisierungsproben jeweils ein positives Signal, welches allerdings bei der *forward* subtrahierten Probe am deutlichsten ausgeprägt war. Die Expression solcher Gene ist in kaudalen und kranialen Chondrozyten unterschiedlich stark.

Die cDNA-Dot Blots der Abb. 3.8 wurden mit den Kolonie-Dot Blots der Abb. 3.7 abgeglichen, wobei sich bei der Signalverteilung dasselbe Ergebnis zeigte. Zur besseren Übersicht sind die Interpretationen der Ergebnisse der differentiellen Analyse zusätzlich tabellarisch dargestellt.

Tab. 3.2: Übersicht über die Ergebnisse des Screenings A

	<i>forw.</i> subtr. Probe	<i>rev.</i> subtr. Probe	<i>tester</i> spezif. Probe	<i>driver</i> spezif. Probe	Befund	Klone
1.	+	-	+	-	nur in kaudalen Chondrozyten exprimierte Klone	48, 51, 73, 88, 95
2.	+	-	-	-	in kaudalen Chondrozyten differentiell exprimierte Klone, die gering transkribierte Sequenzen repräsentieren	29, 31
3.	++	+	+	+/-	Klone, die unterschiedlich stark in den Zellpopulationen exprimiert werden, aber in kaudalen Zellen hochreguliert sind	/
4.	+	-	+	+	a) evtl. differentiell exprimierte Klone, mögliches Ergebnis von Spleißformen b) unterschiedlich starke Expression	36, 54

Aufgrund der Problematik des unterschiedlichen Koloniewachstums auf den Kolonie-Dot Blots und der einfacheren Anwendung und höheren Sensitivität von cDNA-Dot Blots wurden für die folgenden *Screenings* B und C ausschließlich cDNA-Dot Blots durchgeführt.

3.1.5.2 Vergleich der cDNA-Dot Blots des Screenings B der subtraktiven Bibliothek

Die Anfertigung der cDNA-Dot Blots der Klone des *Screenings B* wurde analog zu 3.1.5.1 durchgeführt.

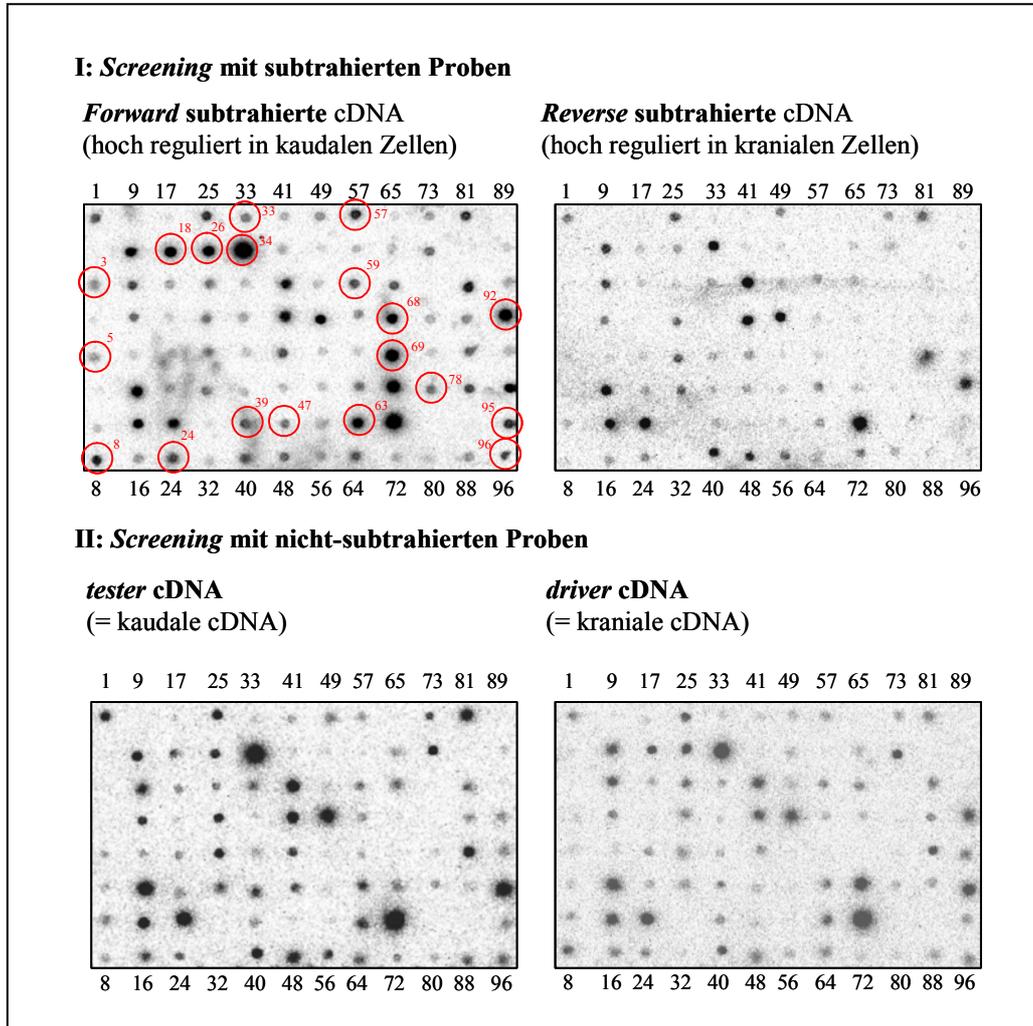


Abb. 3.9: Vergleich der cDNA-Dot Blots von Klonen der subtraktiven Bibliothek, Screening B. Die cDNA-Inserts in den Klonen der subtraktiven Bibliothek wurden durch Bakterienkolonie-PCR amplifiziert und je 2 µl auf vier identische Nylonmembranen aufgetragen. **I:** cDNA-Dot Blots, die mit den [³²P]-dCTP markierten *forward* und *reverse* subtrahierten cDNAs hybridisiert wurden. **II:** Dot Blots, die mit [³²P]-dCTP markierten unsubtrahierten Proben aus kaudalen (= *tester*) und kranialen (= *driver*) Chondrozyten hybridisiert wurden. Es wurden gleiche cpm-Mengen der radioaktiv markierten Proben eingesetzt.

Die Auswertung der cDNA-Arrays des *Screening B* erwies sich als schwierig, da die Hybridisierungen der Klone mit der *reverse* subtrahierten, der *tester* und der *driver* spezifischen Probe relativ ähnliche Muster positiver Signale ergaben, so dass besonders auf die Intensitäten der Signale geachtet wurde. Die Übersicht über die Auswahl der interessierenden Klone ist in Tab. 3.3 dargestellt.

Tab. 3.3: Übersicht über die Ergebnisse des Screenings B

	<i>forw.</i> subtr. Probe	<i>rev.</i> subtr. Probe	<i>tester</i> spezif. Probe	<i>driver</i> spezif. Probe	Befund	Klone
1.	+	-	+	-	nur in kaudalen Chondrozyten exprimierte Klone	5, 95, 96
2.	+	-	-	-	in kaudalen Chondrozyten differentiell exprimierte Klone, die gering transkribierte Sequenzen repräsentieren	3, 33, 39, 47, 57, 59, 68, 69, 78
3.	++	+	+	+/-	Klone, die unterschiedlich stark in den Zellpopulationen exprimiert werden, aber in kaudalen Zellen hochreguliert sind	24, 26, 34
4.	+	-	+	+	a) evtl. differentiell exprimierte Klone, mögliches Ergebnis von Spleißformen b) unterschiedlich starke Expression	8, 18, 63, 92

Es wurden insgesamt 19 Bakterienklone zur weiteren Analyse durch Sequenzierung ausgewählt, von denen 15 Klone aufgrund der positiven Signale in den Dot Blots mit hoher Wahrscheinlichkeit differentiell exprimiert waren (Klone der Reihen 1, 2 und 3). Die restlichen vier Klone stellen hinsichtlich der differentiellen Expression in kaudalen Chondrozyten Grenzfälle dar, deren unterschiedliches Vorhandensein weiter verifiziert werden muss.

3.1.5.3 Vergleich der cDNA-Dot Blots des Screenings C der subtraktiven Bibliothek

In gleicher Weise wie in 3.1.5.1 - 3.1.5.2 beschrieben wurden die cDNA-Dot Blots des Screenings C analysiert.

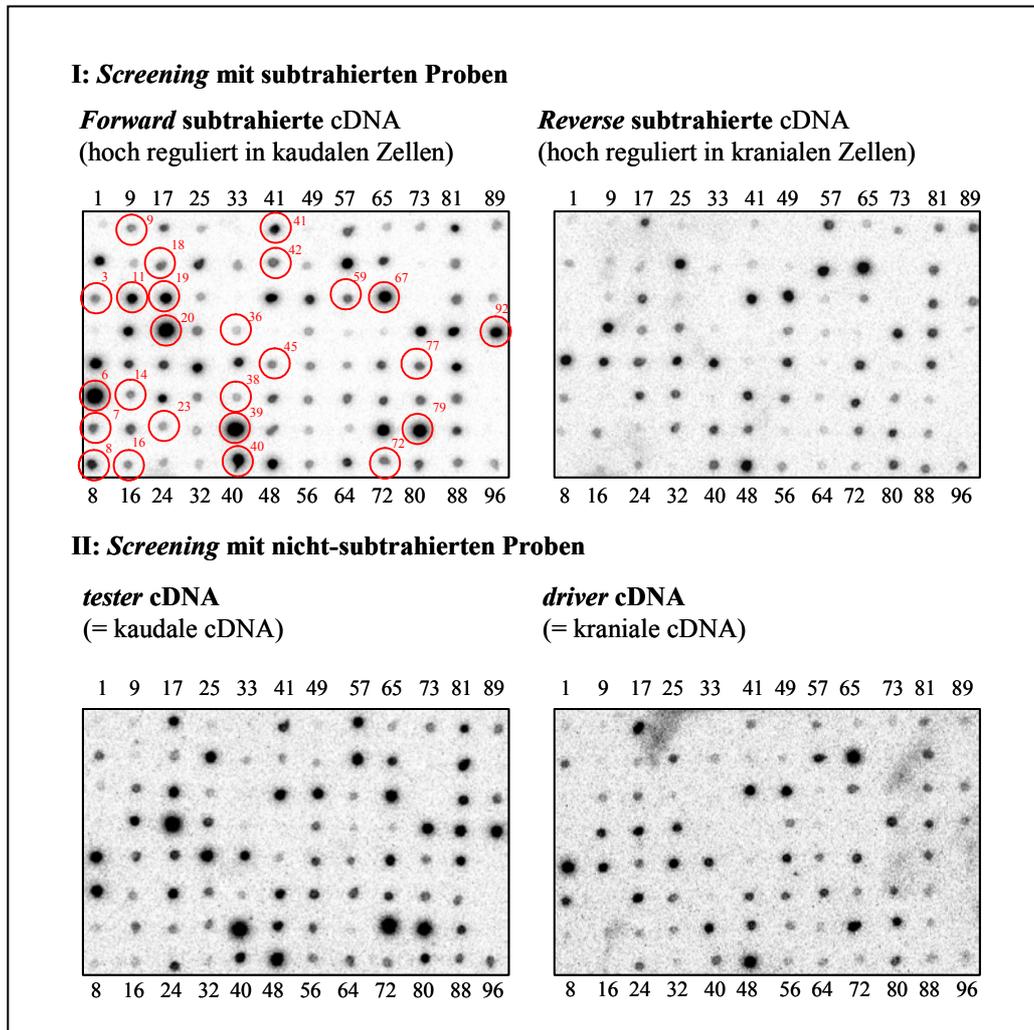


Abb. 3.10: Vergleich der cDNA-Dot Blots von Klonen der subtraktiven Bibliothek, Screening C. Die cDNA-Inserts in den Klonen der subtraktiven Bibliothek wurden durch Bakterienkolonie-PCR amplifiziert und je 2 µl auf vier identische Nylonmembranen aufgetragen. **I:** cDNA-Dot Blots, die mit den [³²P]-dCTP markierten *forward* und *reverse* subtrahierten cDNAs hybridisiert wurden. **II:** Dot Blots, die mit [³²P]-dCTP markierten unsubtrahierten Proben aus kaudalen (= *tester*) und kranialen (= *driver*) Chondrozyten hybridisiert wurden. Es wurden gleiche cpm-Mengen der radioaktiv markierten Proben eingesetzt.

Die einer weiteren Analyse durch Sequenzierung unterzogenen Klone sowie die Interpretation der Ergebnisse des Screenings C sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

Tab. 3.4: Übersicht über die Ergebnisse des Screenings C

	<i>forw.</i> subtr. Probe	<i>rev.</i> subtr. Probe	<i>tester</i> spezif. Probe	<i>driver</i> spezif. Probe	Befund	Klone
1.	+	-	+	-	nur in kaudalen Chondrozyten exprimierte Klone	11, 14, 16, 41, 42, 77, 92
2.	+	-	-	-	in kaudalen Chondrozyten differentiell exprimierte Klone, die gering transkribierte Sequenzen repräsentieren	3, 7, 8, 9, 36, 45, 59, 72
3.	++	+	+	+/-	Klone, die unterschiedlich stark in den Zellpopulationen exprimiert werden, aber in kaudalen Zellen hochreguliert sind	6, 19, 20, 23, 39, 40, 67, 79,
4.	+	-	+	+	a) evtl. differentiell exprimierte Klone, mögliches Ergebnis von Spleißformen b) unterschiedlich starke Expression	18, 38

Es wurden 25 Klone mit positiven Signalen bei der Hybridisierung mit der *forward* subtrahierten cDNA ausgewählt und sequenziert.

Zusammenfassend konnten also 53 von 288 cDNA-Klonen nach dem differentiellen *Screening* als positiv identifiziert werden, d.h. ihre entsprechenden Gene waren in kaudalen Chondrozyten hochreguliert gegenüber denen kranialer Zellen. Dies entsprach einem Anteil an positiven Klonen von 18,4 %.

3.1.6 Sequenzerggebnisse der differentiell exprimierten Klone

Ausgehend von den Einzelausstrichen der verschiedenen Bakterienkulturen wurden von den als positiv bewerteten, d.h. in kaudalen Chondrozyten hochregulierte Sequenzen enthaltende Kolonien, LB-Amp-Minikulturen angeimpft und Plasmidpräparationen durchgeführt. Anschließend wurden die cDNA-Inserts der Plasmide sequenziert (Sequenzen siehe Anhang) und die Ergebnisse mit Hilfe des Programms BLAST (Altschul et al., 1990) mit Datenbankeinträgen verglichen.

Zur Analyse wurden die Programme *blastn*, *tblastx* und *blastx* genutzt. *Blastx* und *tblastx* haben den Vorteil, dass BLAST in diesen Fällen die Nukleotidsequenzen in die möglichen sechs Leseraster übersetzt und diese dann mit Proteinsequenzeinträgen vergleicht, so dass eine erhöhte Sensitivität gegeben ist. *Blastx* kann dazu verwendet werden, Proteine zu finden,

die zu dem Protein, welches durch eine gegebene Nukleotidsequenz kodiert wird, homolog sind. Es translatiert die Sequenz und gleicht diese gegen bekannte Proteinsequenzen ab. Tblastx übersetzt ebenso die Nukleotidsequenzen, vergleicht diese aber mit Datenbankeinträgen, die ebenfalls in alle sechs Leseraster translatiert wurden. Dadurch ist die Identifizierung neuer Gene möglich. Blastn wurde eingesetzt, weil es die zu analysierende Sequenz mit vorhandenen Nukleotideinträgen vergleicht. Durch diese Suche kann ermittelt werden, ob die Sequenz bereits in Datenbankeinträgen vorhanden ist und so Informationen über die Sequenz gewonnen werden können (Online-Seiten der Suchmaschine BLAST der NCBI *User Services*, Internetseite siehe 2.3.29).

Eine erste Sequenzanalyse der Klone erfolgte im Jahr 2002 und es ergaben sich die in Tabelle 3.5 dargestellten Ergebnisse. Es wurden überwiegend Homologien zu humanen, Maus- oder Ratten-spezifischen Sequenzen gefunden. Das Genom des Huhnes wurde 2004 vollständig sequenziert und die Sequenzen in die Datenbank des NCBI eingestellt, so dass eine weitere Sequenzanalyse durchgeführt wurde. Es fanden sich jetzt vermehrt Übereinstimmungen mit Huhn-spezifischen Sequenzen, die in Tabelle 3.6 zusammengefasst sind.

Tab.3.5: Ergebnisse der BLAST-Analyse von 2002

Klon(e)	Beschreibung	Spezies	Identität	blastx	tblastx	blastn
B57	• Rho-assoziierte <i>coiled coil forming</i> Kinase 2 ROCK2	<i>Gallus gallus</i>	99 %	X	/	/
C23	• Lysosomen-assoziiertes Membranglykoprotein LAMP-2c	<i>Gallus gallus</i>	97 %	/	X	/
A54	• EST	<i>Gallus gallus</i>	97 %	/	X	/
A48, A51, A73, A88, A95, B8, B34, B92, C3, C6, C14, C36, C92	• <i>Nuclear factor I/A</i> • <i>Nuclear factor I/A-1</i> • <i>Nuclear factor I/A-2</i>	<i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i> , <i>Rattus norvegicus</i>	tblastx: 60 – 90 % blastn: 90 – 94 %	/	X	X
B78	• Transkriptionsfaktor Dp-1	<i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i>	tblastx: 80 % blastn: 93 %	/	X	X
C41	• Zinktransporter ZTL1	<i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i>	90 – 93 %	/	X	/
B59	• Serin-Threonin Proteinkinase • nicht definierte DNA-Sequenzen	<i>Homo sapiens</i>	89 %	/	/	X
A29, A31, A36, B18, C16, C18, C19, C72,	• nicht definierte cDNA- + DNA-Sequenzen	<i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i>	50 – 92 %	/	X	X
B3, B5, B24, B47, B63, B68, B69, B96, C7, C8, C9, C11, C38, C42, C45, C59, C77, C79	• keine Datenbankeinträge	/	/	X	X	X

blastx: nucleotide query - protein Datenbank; **tblastx:** nucleotide query - translated nucleotide Datenbank;
blastn: nucleotide query - nucleotide Datenbank

Insgesamt konnten nur 45 Klonsequenzen der ursprünglichen 53 Klone ausgewertet werden, da die Klone B26, B33, B39, B95, C20, C39, C40 und C67 – auch nach Wiederholung der Plasmidpräparationen - nicht zu sequenzieren waren.

Mit blastx konnte lediglich der Klon B57 mit einer hohen Identität von 99% identifiziert werden, so dass von einer Homologie dieses Klones zur Rho-assoziierten *coiled coil forming* Kinase 2 ausgegangen wurde. Die meisten Einträge fanden sich durch Nutzung von tblastx, welche teilweise durch blastn bestätigt werden konnten. Beim Klon C23 z.B. ist eine Sequenz

von 684 bp Länge mit den Datenbankeinträgen verglichen worden, und es zeigte sich, dass mit Hilfe von tblastx eine Identität von 97 % mit LAMP-2c (*Gallus gallus*) auf der Aminosäureebene gefunden werden konnte, wobei 190 von 195 AS identisch waren. Die 190 identischen AS entsprachen 570 Nucleotiden, womit fast die ganze Länge der verglichenen Sequenz hohe Homologie mit LAMP-2c zeigte. Außer zu einem weiteren EST-Klon (A54) wurden zum damaligen Zeitpunkt keine weiteren Einträge detektiert, die sich auf die Sequenzen des Huhns bezogen.

Weiterhin fanden sich Datenbankeinträge, die Homologien zu humanen oder murinen Proteinen zeigten, wie z.B. bei den Klonen B78 und C41, die Ähnlichkeiten zum Transkriptionsfaktor DP-1 bzw. zum Zinktransporter ZTL-1 aufweisen. Eventuell kodieren diese Sequenzen für Proteine, die eine ähnliche Funktion im Huhn besitzen.

Insgesamt 26 der analysierten Klone stellten neue Genprodukte dar, da sie lediglich Homologien zu nicht näher definierten humanen oder murinen cDNA-Klonen bzw. DNA-Abschnitten zeigten oder aber es ließen sich keine Datenbankeinträge finden.

Auffallend war, dass 13 Klone der drei *Screenings* Homologien zum Nuklear Faktor NF-I/A und seinen Isoformen vom Menschen, der Maus oder der Ratte zeigten. Das vermehrte Auftreten dieser Datenbankeinträge wurde als Indiz dafür gewertet, dass dieser Transkriptionsfaktor bei der Blockierung der Hypertrophie kranialer Chondrozyten durch kaudale Chondrozyten eine Rolle spielen könnte. Deshalb wurden Huhn-spezifische NF-I/A-Isoformen in Chondrozyten identifiziert, die differentielle Expression des Faktors NF-I/A-1 in den Zellen nachgewiesen und die Volllänge-Sequenz kloniert. Die Ergebnisse dazu sind im Abschnitt 3.2 dargestellt.

Wie bereits erwähnt wurden die Sequenzen im März 2004, d.h. nach vollständiger Sequenzierung des Huhn-Genoms, durch das Programm BLAST nochmals mit Datenbankeinträgen verglichen, und es ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tab.3.6: Ergebnisse der BLAST-Analyse vom März 2004

Klon	Beschreibung	Spezies	Identität	blastx	tblastx	blastn
B57	• Rho-assoziierte <i>coiled coil forming</i> Kinase 2 ROCK2	<i>Gallus gallus</i>	99 %	X	/	/
C23	• Lysosomen-assoziiertes Membranglykoprotein LAMP-2c	<i>Gallus gallus</i>	blastx: 97 % blastn: 99%	/	X	X
A54	• ChEST1031h2	<i>Gallus gallus</i>	100%	/	X	X
A48, A51, A73, A95 B8, B34, B92 C3, C6, C9, C14, C36, C92	• Klon ChEST987n15 • Klon ChEST355d10	<i>Gallus gallus</i>	tblastx. 81 – 98 % blastn: 90 – 95 %	/	X	X
B5	• Klon ChEST276h23	<i>Gallus gallus</i>	96 %	/	/	X
B59	• Klon ChEST595a22	<i>Gallus gallus</i>	96 %	/	/	X
C79	• Klon ChEST224o7	<i>Gallus gallus</i>	99%	/	/	X
A88	• Klon RP-902P15	<i>Homo sapiens</i>	78 %	X	/	/
B78	• Transkriptionsfaktor DP-1	<i>Homo sapiens</i>	80 %	/	X	/
A29, A31, A36 C16, C18, C42	• nicht definierte cDNA- + DNA-Sequenzen	<i>Homo sapiens,</i> <i>Mus musculus,</i> <i>Gallus gallus</i>	50 – 96 %	/	X	X
B3, B18, B24, B47, B63, B68, B69, B96 C7, C8, C11, C19, C38, C41, C45, C59, C72, C77	• keine Datenbankeinträge	/	/	X	X	X

blastx: nucleotide query - protein Datenbank; **tblastx:** nucleotide query - translated nucleotide Datenbank;

blastn: nucleotide query - nucleotide Datenbank

Die 2002 gefundenen Homologien der Klone B57, B78, C23 und A54 konnten durch erneute BLAST-Analyse im März 2004 bestätigt werden, wobei A54 näher klassifiziert werden konnte. Weiter fiel auf, dass für fast alle Klone, die bei der ersten Analyse 2002 Ähnlichkeiten zum humanen, murinen oder Ratten-spezifischen Nuklear Faktor NF-I/A zeigten, nun höhere Homologien zu zwei Huhn-spezifischen EST-Klonen gefunden wurden. Ein *Alignment* der Nukleotidsequenzen des humanen oder murinen NF-I/A mit den EST-Klonen zeigte keine größeren Homologien, sondern nur jeweils wenige Nukleotide lange Übereinstimmungen. Demzufolge kodieren die hier gefundenen Sequenzen für neue Proteine bzw. für Teile von Proteinen, die bei der Repression der Hypertrophie kranialer Chondrozyten durch kaudale Chondrozyten beteiligt sind.

Bei drei Klonen (B5, B59, C79) konnten Homologien auf Nukleotidebene (blastn) zu Huhn-spezifischen EST-Klonen gefunden werden.

Weiterhin konnten 24 Klone selbst nach der vollständigen Sequenzierung des Hühnergenoms nicht näher spezifiziert werden. Ein Sequenzvergleich lieferte keine übereinstimmenden Datenbankeinträge, und es zeigten sich auch keine Ähnlichkeiten mit näher deklarierten humanen, murinen oder Huhn-spezifischen cDNA- bzw. DNA-Sequenzen.

3.1.7 Vergleich der Expression ausgewählter Klone in kaudalen und kranialen Chondrozyten

Zur Verifizierung der Ergebnisse des differentiellen *Screenings* der subtraktiven Bibliothek wurden von einigen Klonen *Virtual Northern Blots* bzw. *Northern Blots* durchgeführt. Damit sollte die differentielle Expression dieser Klonsequenzen in kaudalen und kranialen Hühnerchondrozyten überprüft werden.

3.1.7.1 Überprüfung der Ergebnisse des differentiellen Screenings durch *Virtual Northern Blots*

Aus der subtraktiven Bibliothek wurden einzelne Klone ausgewählt, um durch *Virtual Northern* Blot-Analyse die unterschiedliche Genexpression in kranialen und kaudalen Chondrozyten zu bestätigen. Dazu wurde die durch SMART-Amplifikation generierte cDNA eingesetzt (3.1.1). Für eine erste Analyse wurden die Klone B8, B57, C23 und C41 ausgewählt. Der Klon B8 gehörte zu einer Gruppe von Sequenzen, die bei der BLAST-Analyse von 2002 Homologien zum Nuklear Faktor NF-I/A zeigten und im März 2004 der Huhn-spezifischen Sequenz ChEST355d10 zugewiesen werden konnte. Nach dem differentiellen *Screening* (3.1.5.2) wurde dieser Klon als möglicherweise differentiell exprimiert bzw. als unterschiedlich stark exprimiert in kranialen und kaudalen Zellen eingestuft. Klon B57 zeigte bei beiden Sequenzauswertungen eine Homologie zur Rho-assoziierten *coiled coil forming* Kinase ROCK 2 und Klon C23 wies hohe Identitäten zum Lysosomen-assoziierten Membranglykoprotein LAMP-2c auf; beide Klone wurden nach dem *Screening* der Dot Blots als deutlich hochreguliert in kaudalen Chondrozyten klassifiziert (Tab. 3.3 und Tab. 3.4). Der Klon C41 stimmte bei der BLAST-Analyse von 2002 mit der Sequenzen des humanen Zinktransporter ZTL-1 überein und war ebenfalls in den Dot Blots unterschiedlich stark hochreguliert (Tab. 3.4). In Abb. 3.11 sind die *Virtual Northern Blots* und ihre densitometrischen Auswertungen dargestellt.

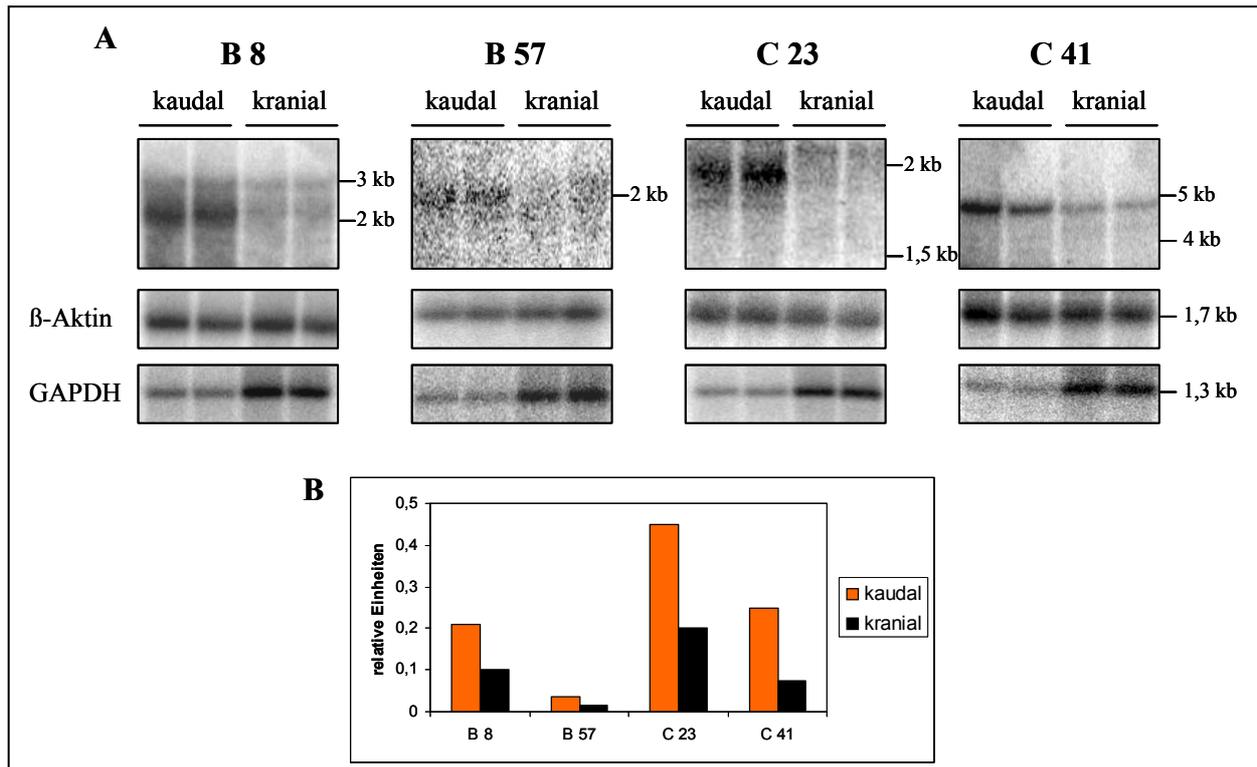


Abb. 3.11: Vergleich der Genexpression von Klonen der subtraktiven Bibliothek durch *Virtual Northern Blots*. **A:** Es wurden pro Blot je 7 μ g cDNA aus kaudalen bzw. kranialen Chondrozyten durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, geblottet, denaturiert und mit den [32 P]-dCTP markierten Sequenzen der Klone B8, B57, C23 und C41 hybridisiert (2.3.27). Die Blots wurden anschließend gestrippt und mit den spezifischen Sonden für β -Aktin bzw. GAPDH erneut hybridisiert. **B:** Densitometrische Auswertung der auf β -Aktin normierten Banden-Intensitäten.

Bei allen vier überprüften Klonen der subtraktiven Bibliothek konnte eine verstärkte Expression in kaudalen Chondrozyten mittels *Virtual Northern Blot*-Analyse bestätigt werden. Die entsprechenden Klonsequenzen waren in kaudalen Zellen zwei- bis dreifach hochreguliert. Bei der densitometrischen Auswertung wurden die Werte des *Housekeeping*-Gens β -Aktin als Grundlage herangezogen, da es in kaudalen und kranialen Chondrozyten gleichermaßen exprimiert wurde. Die GAPDH-Sonde konnte zur Auswertung nicht genutzt werden, da durch die Hybridisierung festgestellt wurde, dass GAPDH in Chondrozyten des kranialen und kaudalen Bereiches des Hühnersternums offensichtlich unterschiedlich stark exprimiert wird.

3.1.7.2 Überprüfung der Ergebnisse des differentiellen Screenens durch Northern Blots

Für die Durchführung von *Northern Blots* wurde Gesamt-RNA aus kranialen und kaudalen Chondrozyten isoliert (2.3.6). Da jeweils 15–30 µg RNA elektrophoretisch aufgetrennt wurden, mussten verschiedene Chargen isolierter Chondrozyten aufgearbeitet werden. Die Hybridisierungen mit den verschiedenen Klonsequenzen wurden dreimal wiederholt.

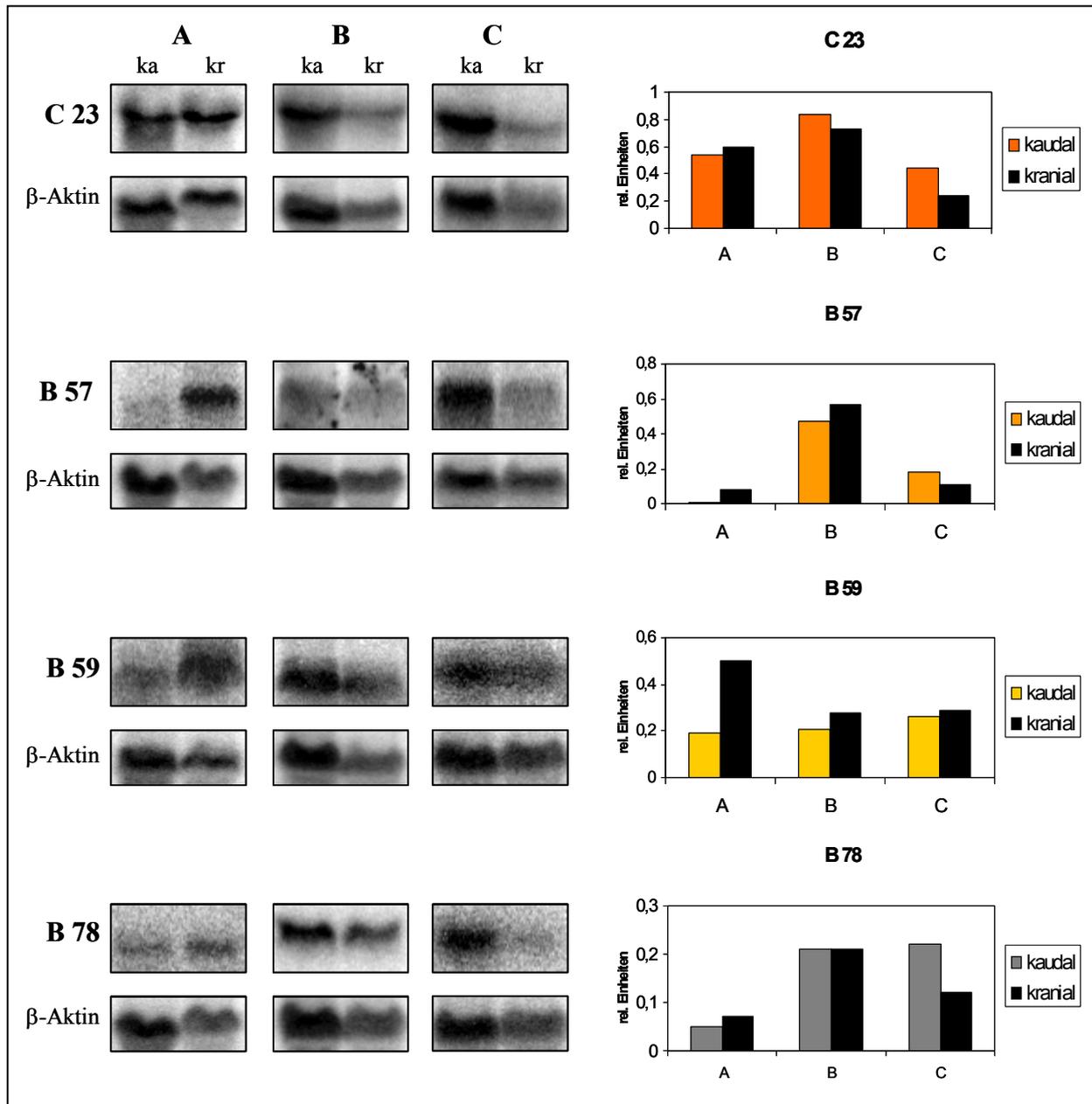


Abb. 3.12: Vergleich der Expression von Klonen der subtraktiven Bibliothek durch Northern Blots. Es wurden pro Blot 15-30 µg RNA kaudaler bzw. kranialer Chondrozyten durch Elektrophorese aufgetrennt, geblottet und mit den [³²P] dCTP markierten Sequenzen der Klone C23, B57, B78 und B59 hybridisiert (2.3.27). Die Blots wurden anschließend gestrippt und mit der spezifischen Sonde für β-Aktin erneut hybridisiert, n=3. Die *Northern Blots* wurden freundlicherweise von Dr. Rita Dreier durchgeführt.

Mittels *Northern* Blotting wurde die Expression der Sequenzen der Klone C23, B57, B78 und C59 in kaudalen und kranialen Chondrozyten überprüft. Die Sequenz des Klones C23 wies bei den BLAST-Analysen hohe Identitäten zu LAMP-2c auf und Klon B57 zeigte Homologien zu ROCK 2. Beide Sequenzen wurden auch durch *Virtual Northern* Blotting analysiert. Weiterhin wurde der Klon B78 ausgewählt; anhand der BLAST-Analysen wurden hier Identitäten zum Transkriptionsfaktor DP-1 gefunden. B59 zeigte nach der Sequenzanalyse von 2002 Identitäten zu einer nicht näher deklarierten Serin-Threonin-Proteinkinase. 2004 konnte diese Sequenz dem EST-Klon ChEST595a22 zugewiesen werden. Alle hier analysierten Klone wurden nach dem differentiellen *Screening* als verstärkt exprimiert in kaudalen Chondrozyten klassifiziert.

Die densitometrische Auswertung der Banden-Intensitäten des Klones C23 bestätigte bei zwei unabhängigen Hybridisierungen die Hochregulation in kaudalen Chondrozyten. In einem dritten Experiment allerdings war die Sequenz in kranialen Zellen stärker exprimiert. Da bei den *Virtual Northern* Blots ebenfalls eine hochregulierte Expression in kaudalen Zellen gefunden wurde, ist es wahrscheinlich, dass LAMP-2c tatsächlich ein in kaudalen Zellen hochreguliertes Gen repräsentiert. Beim Klon B57 ergab sich das umgekehrte Bild: Bei zwei Hybridisierungen wurde eine verstärkte Expression in kranialen Zellen detektiert, in einem Falle wurde die Hochregulation der Klonsequenz in kaudalen Chondrozyten gefunden. Die erhöhte Expression von ROCK 2 (Klon B57), die im *Virtual Northern* Blot gefunden wurde, konnte somit durch *Northern* Blot-Analyse nicht bestätigt werden. Beim Klon B59 wurde durch die densitometrische Auswertung deutlich, dass diese Sequenz nicht in kaudalen Chondrozyten hochreguliert war, sondern in kranialen Zellen stärker exprimiert wurde. Klon B78 zeigte in den *Northern* Blot-Ergebnissen ein uneinheitliches Bild: einmal wurde eine verstärkte Expression in kaudalen Zellen gefunden, ein anderes mal in kranialen Zellen und beim dritten mal konnte gezeigt werden, dass es keine Expressionsunterschiede in den Zellpopulationen gab.

3.2 Funktion des Nuklear Faktors NF-I/A bei der Hypertrophie embryonaler Hühnerchondrozyten

Bei der BLAST-Analyse von 2002 zeigten 13 Klone, die nach der Durchführung der cDNA-*Arrays* als hochreguliert in kaudalen Chondrozyten einzustufen waren, Sequenzhomologie zum Nuklear Faktor NF-I/A aus Mensch, Maus oder Ratte (Tab. 3.5). Dies wurde als Hinweis dafür gewertet, dass NF-I/A eine Bedeutung während der Spätdifferenzierung embryonaler Hühnerchondrozyten besitzen könnte. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde NF-I/A in kranialen Chondrozyten überexprimiert und sein Einfluss auf die Hypertrophierung der Zellen analysiert.

3.2.1 Identifikation der Isoformen des NF-I/A und Bestätigung der differentiellen Expression von NF-I/A-1 in Hühnerchondrozyten

Von der mRNA des Huhn-spezifischen NF-I/A Gens sind sechs verschiedene Spleißvarianten bekannt (Kruse und Sippel, 1994a), denen unterschiedliche Funktionen in der Regulation der Genexpression zugeschrieben werden. Da nicht bekannt war, welche Spleißvarianten in Chondrozyten exprimiert sind, wurden Primer kreiert (2.3.5.4), die spezifisch für die unterschiedlichen Isoformen waren. Zur Analyse wurden RT-PCRs durchgeführt, in die entweder cDNA kranialer oder cDNA kaudaler Chondrozyten eingesetzt wurde.

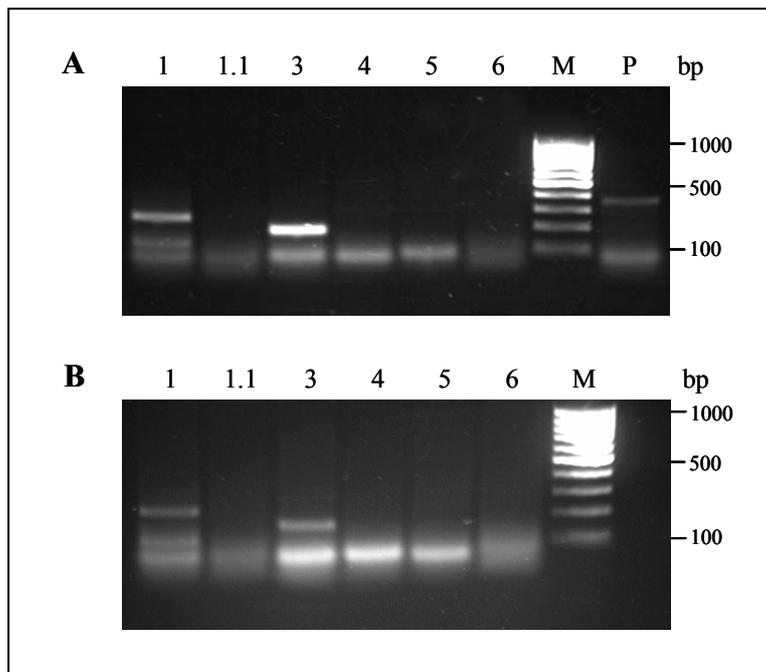


Abb. 3.13: NF-I/A-Spleißvarianten in Chondrozyten. Die RT-PCR wurde in **A** mit cDNA kranialer Chondrozyten und in **B** mit cDNA kaudaler Chondrozyten und den entsprechenden Primern, die jeweils für die Spleißvarianten NF-I/A-1, -1.1, -3, -4, -5 und -6 spezifisch waren, durchgeführt. Es wurden gleiche Mengen an cDNA eingesetzt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte auf einem 1,8%igem Agarosegel. **P**: interne PCR-Kontrolle mit spezifischen β -Aktin-Primern. **M**: Gene Ruler 100 bp DNA-Größenmarker.

Mit den spezifischen Primern für NF-I/A-1, -1.1, -3, -4, -5 und -6 wurden die beiden Spleißvarianten NF-I/A-1 und -3 in kranialen (3.13 A) und kaudalen (3.13 B) Chondrozyten des Huhns nachgewiesen. Die übrigen Varianten sind in Hühnerchondrozyten nicht präsent. Bei der BLAST-Analyse von 2002 (Tab. 3.5) wurden ebenfalls Identitäten zum humanen oder murinen NF-I/A-1 gefunden, so dass für weitere Arbeiten diese Spleißvariante des Transkriptionsfaktors ausgewählt wurde.

Dafür musste zuerst die differentielle Expression von NF-I/A-1 in kaudalen und kranialen Chondrozyten nachgewiesen werden.

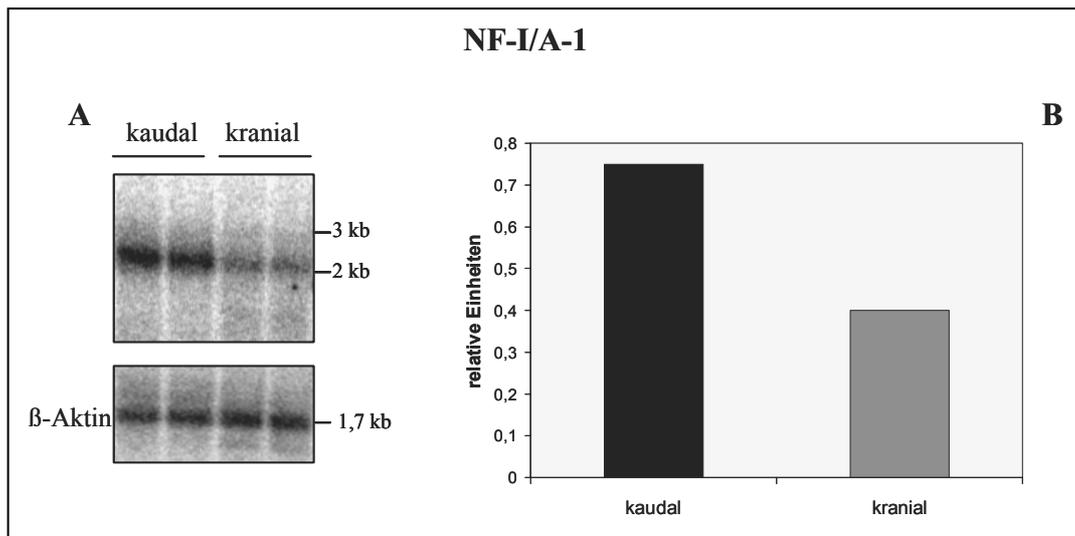


Abb. 3.14: Differentielle Expression des Transkriptionsfaktors NF-I/A-1 in kaudalen und kranialen Chondrozyten. Exemplarische Darstellung eines *Virtual Northern* Blots. **A:** Es wurden pro Bahn je 7 µg cDNA aus kaudalen bzw. kranialen Chondrozyten durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, geblottet, denaturiert und mit der [³²P]-dCTP markierten spezifischen NF-I/A-1-Sonde (2.5.3.4) hybridisiert. Der Blot wurde anschließend gestriipt und mit der spezifischen Sonde für β-Aktin erneut hybridisiert. **B:** Densitometrische Auswertung der auf β-Aktin normierten Banden-Intensitäten. Die Hybridisierung wurde dankenswerterweise von Sandra Kroppen durchgeführt.

Es konnte deutlich eine verstärkte Expression des NF-I/A-1 in kaudalen Chondrozyten mittels *Virtual Northern* Blot-Analyse nachgewiesen werden.

Zur Überexpression des NF-I/A-1 in Hühnerchondrozyten musste zunächst die vollständige Sequenz des Faktors amplifiziert werden.

3.2.2. Amplifikation der vollständigen NF-I/A-1-Sequenz

Zur Amplifikation der Volllänge-sequenz des NF-I/A-1 aus Huhn wurden spezifische Klonierungsprimer konstruiert, die Restriktionsschnittstellen für anschließende Ligationen mit Vektoren sowie jeweils vier zusätzliche Basen zur Gewährleistung der Restriktionseffizienz enthielten.

Sense-Primer: NFforw_lang			
Überhang	<i>SacI</i>	Start	kodierende Sequenz NF-I/A-1
5'	<u>T GAA</u>	GAG CTC	ATG TAT TCT CCG CTC TGT CTC ACG CAG 3'
Tm + Überhang: 72,8 °C		Tm ohne Überhang: 71,4 °C	
Antisense-Primer: NFrev_lang			
Überhang	<i>Sall</i>		kodierende Sequenz NF-I/A-1
5'	<u>T AAT</u>	GTC GAC	TCC CAG GTA CCA GGA CTG AGT CTG TTG 3'
Tm + Überhang: 72,8 °C		Tm ohne Überhang: 71,4 °C	

Abb. 3.15: Primersequenzen zur Herstellung des NF-I/A-1-Volllängeklons.

Die Bereiche der kodierenden Sequenz des NF-I/A-1 wurden weit umfassend gewählt, weil mit kürzeren Konstrukten im Vorfeld kein PCR-Produkt generiert werden konnte. Ein Stopcodon wurde nicht eingefügt, da die Konstruktion von Fusionsproteinen geplant war und deshalb Stopcodons in den Expressionsvektoren an entsprechender Stelle vorhanden waren. Die PCR wurde mit der REDTaq Polymerase nach dem unter 2.3.13 angegebenen Programm durchgeführt, und es ergaben sich folgende PCR-Produkte:

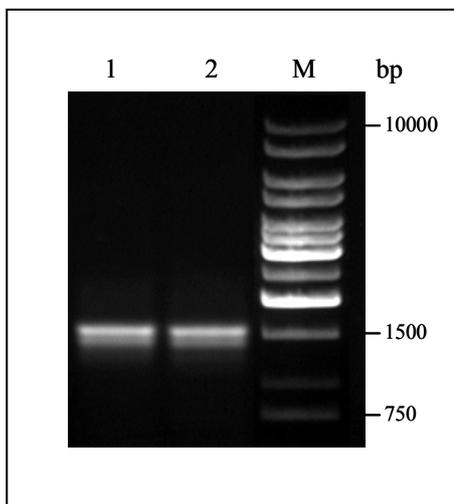


Abb. 3.16: PCR zur Konstruktion des Volllängeklons von NF-I/A-1.

Die RT-PCR wurde mit cDNA aus Leber und den oben angegebenen Primern durchgeführt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte auf einem 1,2%igem Agarosegel. **1, 2:** Doppelansatz. **M:** 1 kb DNA Größenmarker.

Es konnten zwei cDNA-Banden bei 1500 bp detektiert werden, die mittels Gelextraktion (2.3.14) getrennt voneinander gereinigt wurden. Bei der oberen Bande handelte es sich um die NF-I/A-1-Sequenz, die eine berechnete Größe von 1589 bp besaß, inklusive der Basenpaare, die durch die Primer eingefügt worden sind. Die untere Bande stellte die Spleißvariante NF-I/A-1.1 inklusive der zusätzlichen Primernukleotide dar (Größe: 1550 bp). Im Gegensatz zu

Chondrozyten wird NF-I/A-1.1 in der Leber exprimiert, was durch folgende Isoformen-PCR gezeigt werden konnte.

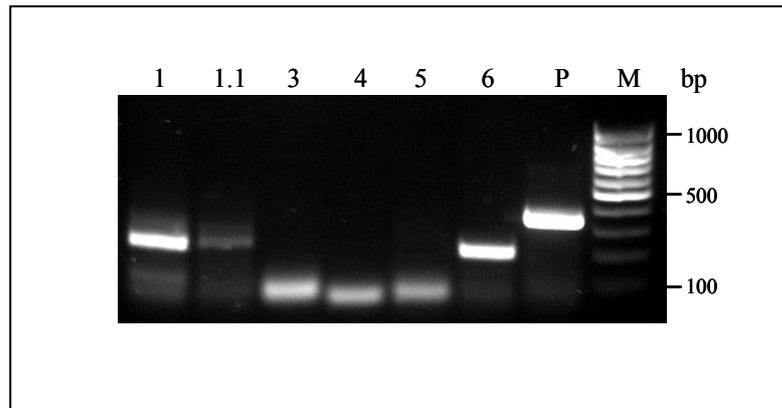


Abb. 3.17: NF-I/A-Spleißvarianten in der Leber. Die RT-PCR wurde mit cDNA aus Hühnerleber und den entsprechenden Primern, die jeweils für die Spleißvarianten NF-I/A-1, 1.1, 3, 4, 5 und 6 spezifisch waren (2.3.5.5), durchgeführt. Es wurden gleiche Mengen an cDNA eingesetzt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1,8%igem Agarosegel. **P:** interne PCR-Kontrolle mit spezifischen β -Aktin-Primern. **M:** 100 bp Größenstandard.

Die isolierten DNA-Fragmente wurden in den T/A TOPO-Vektor (2.3.16) kloniert, und es wurden zehn positive Kolonien durch Mini-Übernachtskulturen (2.3.3) herangezogen und durch Plasmidpräparationen (2.3.10.1) aufgereinigt. Da die Gefahr bestand, dass die beiden Banden bei der Gelextraktion nicht vollständig voneinander getrennt wurden, wurde eine PCR mit Primern, die für die Spleißvariante des NF-I/A-1 spezifisch waren, durchgeführt. Dadurch konnte analysiert werden, welche Plasmide tatsächlich die cDNA des NF-I/A-1 trugen.

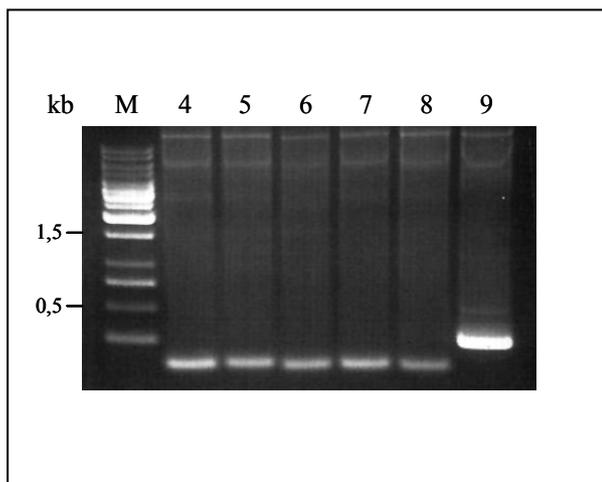


Abb. 3.18: PCR der Plasmidpräparationen mit NF-I/A-1-Primern.

Die PCR wurde mit je 2 μ l Plasmidpräparation und den NF-I/A-1 Primern (2.3.55) durchgeführt. Exemplarisch sind die PCR-Produkte der Plasmidpräparationen 4 - 9 dargestellt. Die Auftrennung erfolgte in einem 1,2%igen Agarosegel. **M:** 100 bp Größenstandard.

In der Plasmidpräparation 9 konnte eine spezifische PCR-Bande (242 bp) detektiert werden. Die übrigen Präparationen zeigten in dieser Höhe kein PCR-Produkt. Das cDNA-Insert von Plasmid 9 wurde sequenziert und mit der Sequenz des Huhn-spezifischen NF-I/A-1

verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass bis auf zwei Punktmutationen die kodierende Sequenz des NF-I/A-1 vorlag. Die beiden Mutationen betrafen die Positionen 355 und 971 der Nukleotidsequenz. An diesen Stellen war das Nukleotid Thymidin₃₅₅ gegen Cytidin und zum anderen das Guanosin₉₇₁ gegen Adenosin ausgetauscht. Aus diesem Grund wurde vor der Klonierung in Expressionsvektoren das *QuickChange-Site-Directed-Mutagenese* Kit (2.3.21) angewendet. Die Mutagenese wurde für jede Punktmutation einzeln durchgeführt und die Sequenz überprüft, so dass schließlich die richtige, kodierende Nukleotidabfolge (*Accession-Nr.* X51486) des Huhn-spezifischen NF-I/A-1 im pCR[®]II-TOPO-Vektor vorhanden war.

3.2.3. Klonierung der Vollängesequenz des NF-I/A-1 in Expressionsvektoren

Zuerst wurde die Sequenz des NF-I/A-1 in den Expressionsvektor phrGFP-C umkloniert, da dieser Vektor aufgrund der kodierenden Sequenz für das Protein hrGFP den Vorteil besitzt, dass eine erfolgreiche Transfektion von Zellen direkt durch Fluoreszenz-Mikroskopie sichtbar ist. Es stellte sich allerdings nach Transfektionen von Chondrozyten mit dem Konstrukt phrGFPC-NFIA1 heraus, dass keine fluoreszierenden Zellen erkennbar waren, obwohl die Kontrolltransfektion mit dem leeren Vektor phrGFP-C erfolgreich verlaufen war. Die Ergebnisse zur Transfektion primärer Hühnerchondrozyten sind unter dem Kapitel 3.2.4 dargestellt.

Daher wurde die kodierende Sequenz des NF-I/A-1 in den pCMV-Tag-4A-Vektor kloniert. Am C-terminalen Ende der *Multiple Cloning Site* dieses Vektors ist eine Sequenz für einen FLAG-Tag vorhanden, welcher nach erfolgter Expression durch einen Anti-FLAG M2-Antikörper als Epitop erkannt wird. Zur Konstruktion des Vektors wurden der pCMV-Tag-4A-Vektor und der pCR[®]II-TOPO-NFIA1 Vektor mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *Sall* sequentiell geschnitten, die entstandenen Fragmente aus dem Agarosegel extrahiert und die Sequenz des NF-I/A-1 mit dem pCMV-Tag-4A ligiert (2.3.18). Nach Transformation von XL10-Gold ultrakompetenten *E.coli* Zellen (2.3.20) wurden Kanamycin-resistente Klone selektioniert. Anschließend erfolgte eine Ligationsüberprüfung (2.3.19). Ein positiver Klon wurde in einer Midi-Übernachtskultur (2.3.3) vermehrt und das Plasmid mittels Plasmidpräparation (2.3.10.2) vor der Transfektion der Chondrozyten aufgereinigt und sequenziert. Die veröffentlichte Volllänge-Sequenz des NF-I/A-1 (*Accession-Nr.* X51486) war vorhanden.

3.2.4. Transfektion primärer Hühnerchondrozyten und Überexpression des Transkriptionsfaktors NF- κ B-1

Zur Validierung des ursprünglich für humane Zellen konzipierten amaxa-Systems für Hühnerchondrozyten unter Verwendung des leeren phrGFP-C Vektors und zur anschließenden Optimierung der Methode wurden primäre Chondrozyten mit dem Vektor phrGFP-C transfiziert. Es wurden unterschiedliche Parameter, wie Zellzahl ($0,5-1 \times 10^6$ Zellen), Plasmidmengen ($2,5-10 \mu\text{g}/\text{Ansatz}$) und verschiedene Elektroporationsprogramme getestet. Bei diesen Voruntersuchungen stellte sich heraus, dass die Transfektion von 1×10^6 Chondrozyten mit $5 \mu\text{g}$ des Plasmids unter Verwendung des Programms U-24 optimal verlief. Direkt nach der Transfektion wurden die Zellen entweder in DMEM/F12 mit 10% FKS als Monolayer (2.1.4) kultiviert bzw. in Agarose eingebettet (2.1.3). Abb. 3.18 zeigt repräsentativ eine erfolgreiche Transfektion von primären Hühnerchondrozyten.

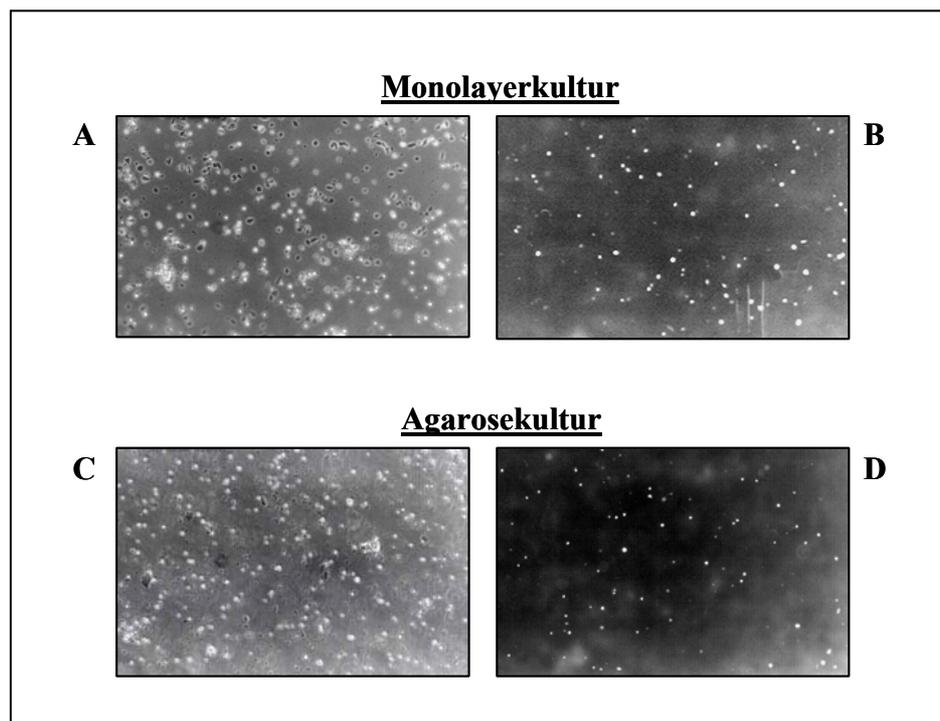


Abb. 3.19: GFP-Expression in mit dem Vektor phrGFP-C transfizierten Chondrozyten.

Kraniale Chondrozyten wurden direkt nach Isolierung mit dem phrGFP-C Vektor mittels Elektroporation transfiziert. **A, B:** Transfektion von 1×10^6 Zellen mit $5 \mu\text{g}$ Vektor, Kultivierung als Monolayer mit DMEM/F12/10% FKS. **C, D:** Transfektion der Zellen wie unter A+B mit direkt anschließender Agaroseeinbettung, serumfrei. Es wurde jeweils der gleiche Ausschnitt 24 h nach der Transfektion fotografiert. **A, C:** Hellfeldaufnahmen. **B, D:** Fluoreszenzaufnahmen. Vergrößerung 200fach.

Sowohl bei den Chondrozyten, die in Monolayer kultiviert wurden (A, B), als auch bei den in Agarose eingebetteten Zellen (C, D) ist 24 Stunden nach Transfektion eine deutliche GFP-spezifische Fluoreszenz zu detektieren. Durch Auszählung mehrerer Gesichtsfelder von Monolayerkulturen wurde eine Transfektionseffizienz von 34% bestimmt. Die Effizienz bei den Agarosekulturen wurde als ähnlich hoch eingeschätzt, sie ließ sich aber nicht durch Auszählen bestimmen, da die Zellen nicht genau in einer Ebene lagen und daher nicht alle fluoreszierenden Chondrozyten auszählen waren.

Wie unter 3.2.3 beschrieben, waren nach Transfektion der Zellen mit dem Konstrukt phrGFPC-NFIA1 keine fluoreszierenden Chondrozyten erkennbar, so dass die NF-I/A-1-Sequenz in den Vektor pCMV-FLAG-4A ligiert wurde und die folgenden Experimente mit diesem Konstrukt durchgeführt wurden. Hierbei zeigte sich, dass mit diesem Vektor nach Transfektion keine direkte Agaroseeinbettung der Zellen möglich war. Die Chondrozyten überlebten diesen Prozess nicht. Aus diesem Grunde wurden kraniale Chondrozyten nach der Transfektion zuerst 48 h in Monolayerkultur mit DMEM/F12 + 10% FKS gehalten und erst dann in das dreidimensionale serumfreie Agarosekultursystem überführt.

Eine positive Transfektion von kranialen Chondrozyten wurde zunächst durch Immunfluoreszenz überprüft. Dazu wurde ein Anti-FLAG M2 Antikörper eingesetzt, durch den der exprimierte C-terminale FLAG-Tag detektiert werden konnte, wenn die vorgeschaltete kodierende Sequenz des NF-I/A-1 translatiert wurde.

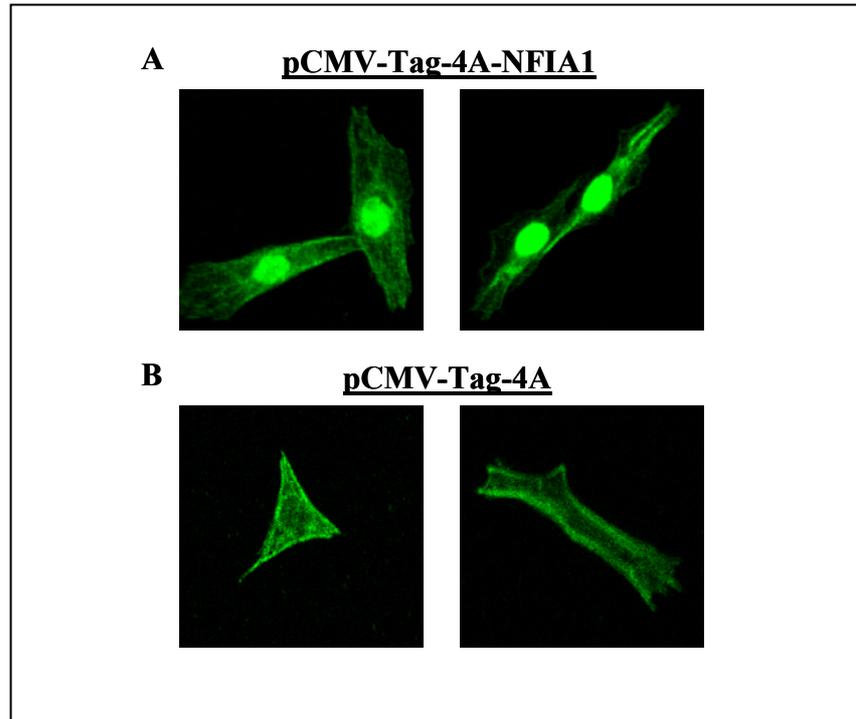


Abb. 3.20: Immunfluoreszenzen transfizierter kranialer Chondrozyten. Kraniale Chondrozyten wurden direkt nach Isolierung mittels Elektroporation mit den Plasmiden pCMV-Tag-4A-NFIA1 (A) bzw. pCMV-Tag-4A transfiziert (B). Die Detektion des exprimierten Flag-Tags erfolgte 48 h nach Transfektion. Als Primärantikörper diente der Anti-FLAG M2-Antikörper, und als Sekundärantikörper wurde ein Alexa Flour 488 *goat-anti-mouse*-IgG eingesetzt (2.1.6). Vergrößerung 1000fach.

In Abb.3.19 sind die Immunfluoreszenzen von Chondrozyten dargestellt, die zum einen mit dem Plasmid pCMV-Tag-4A-NFIA1 (A) bzw. pCMV-Tag-4A (B) durch Elektroporation transfiziert wurden. In A ist deutlich die in den Zellkernen lokalisierte Fluoreszenz zu erkennen, die durch die Expression des Fusionsproteins NF-I/A-1 mit Flag-Tag hervorgerufen wurde. Chondrozyten, die mit dem leeren Vektor (B) transfiziert wurden, zeigten – wie auch die Chondrozyten in A – eine starke Autofluoreszenz des Cytoplasmas, doch in den Zellkernen konnte keine Expression des Transkriptionsfaktors NF-I/A-1 nachgewiesen werden. Durch Auszählung mehrerer Gesichtsfelder wurde eine Transfektionseffizienz von 25 % bestimmt.

Zusätzlich wurde nach Transfektion der Zellen die Überexpression von NF-I/A-1 durch Western-Blotting mit anschließender Immunodetektion (2.2.3) überprüft. Hierfür wurden sowohl Kern- als auch Cytoplasmaextrakte der Chondrozyten hergestellt.

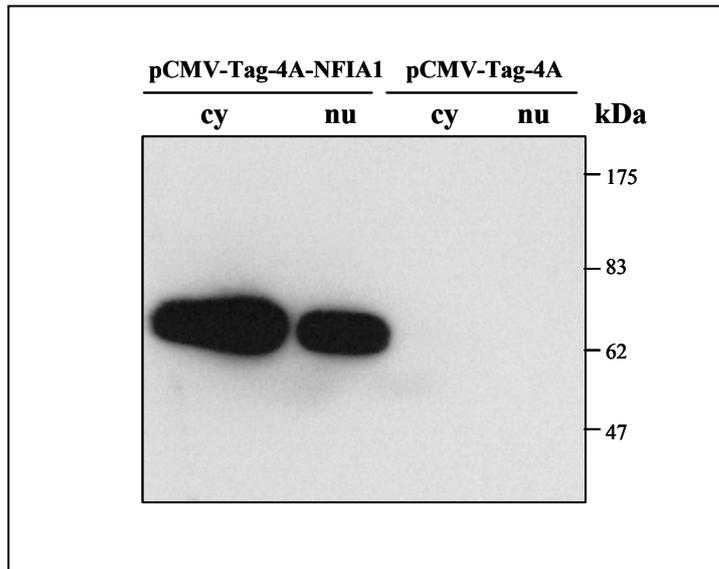


Abb. 3.21: Immunodetektion der NF-I/A-1-Expression in transfizierten kranialen Chondrozyten. Es wurden 48 h nach Transfektion von jeweils 4×10^6 Zellen Kern- und Cytoplasmaextrakte hergestellt (2.2.1). Als Primärantikörper diente der Anti-FLAG M2-Antikörper, und als Sekundärantikörper wurde ein *goat-anti-mouse-IgG* eingesetzt (2.2.3). **pCMV-Tag-4A-NFIA1:** mit pCMV-Tag-4A-NFIA1 transfizierte Chondrozyten. **pCMV-Tag-4A:** mit dem leeren Vektor pCMV-Tag-4A transfizierte Zellen. **cy:** cytoplasmatischer Proteinextrakt. **nu:** Kernextrakt.

Sowohl im Cytoplasma als auch im Kernextrakt der mit dem pCMV-Flag-4A-NFIA1 transfizierten Chondrozyten ist eine starke Expression des NF-I/A-1-Proteins mittels Immunodetektion zu erkennen. Bei mit leerem Kontroll-Vektor transfizierten Zellen wurde kein Signal beobachtet. Somit wurde durch Immunfluoreszenz-Analyse wie auch durch Western-Blot gezeigt, dass die Transfektion von sternalen Hühnerchondrozyten mit diesem Konstrukt erfolgreich war und dass diese Zellen den Transkriptionsfaktor NF-I/A-1 überexprimierten.

3.2.5 Einfluss von NF-I/A-1 auf die Hypertrophie kranialer Chondrozyten

Zur funktionellen Analyse des Transkriptionsfaktors NF-I/A-1 während der Spätdifferenzierung kranialer Chondrozyten wurden die Zellen mit dem pCMV-Tag-4A-NFIA1 Konstrukt transfiziert, 48 h als Monolayerkultur in DMEM/F12 mit 10% FKS kultiviert und anschließend in Agarose eingebettet. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Transfektion wurden bei jedem Ansatz Immunfluoresz-Aufnahmen der Monolayerkulturen angefertigt.

Die Stimulation kranialer Chondrozyten in Agarosekultur mit Insulin bzw. IGF-1 kann die Synthese der Hypertrophiemarker Kollagen X und ALP bewirken. Aus diesem Grunde wurden in den folgenden Experimenten transfizierte Chondrozyten für 14 Tage serumfrei in Agarose kultiviert, mit Insulin oder IGF-1 stimuliert und anschließend die Kollagen X- und ALP-Synthese im Medium analysiert. Weiterhin zeigen hypertrophe Chondrozyten eine starke Volumenzunahme als morphologisches Charakteristikum. In der folgenden Abbildung ist die morphologische Veränderung von transfizierten und nicht-transfizierten Chondrozyten während einer 14tägigen Kulturdauer dargestellt.

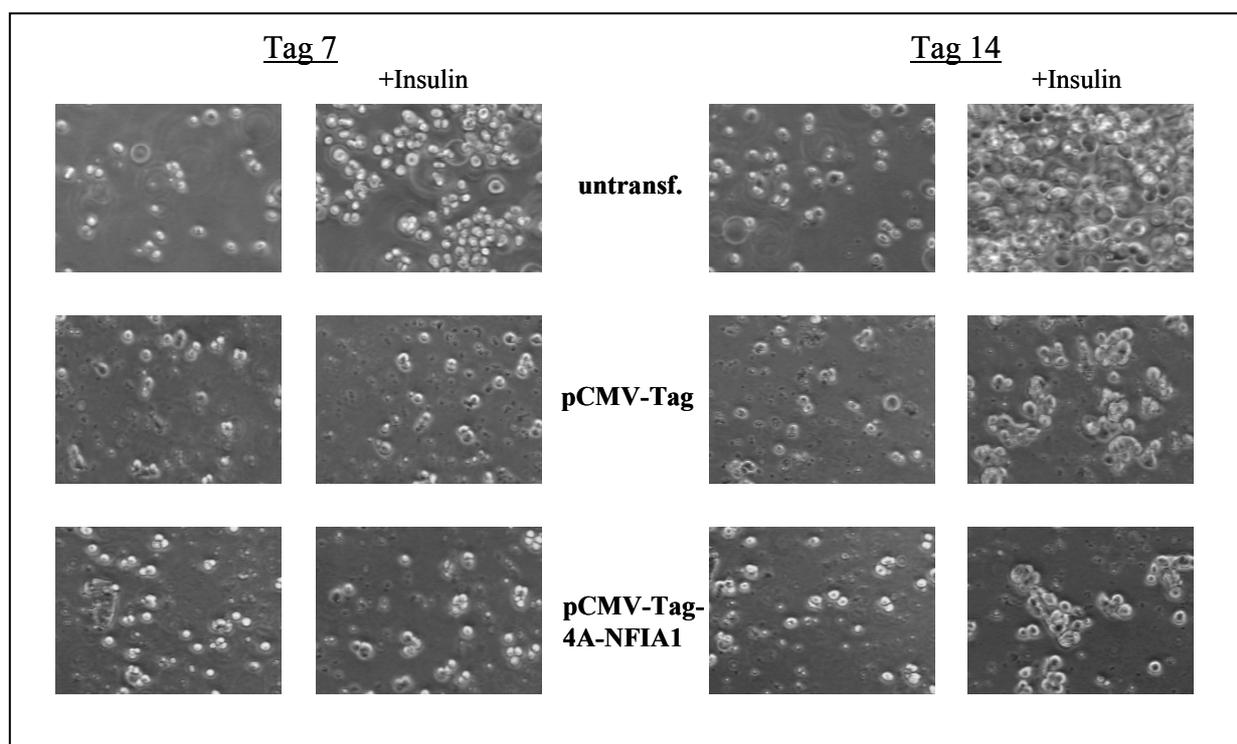


Abb. 3.22: Morphologische Veränderung transfizierter Chondrozyten während einer Kulturdauer von 14 Tagen. **pCMV-Tag:** mit leerem Vektor pCMV-Tag transfizierte Zellen. **pCMV-Tag-4A-NFIA1:** mit dem Konstrukt pCMV-Tag-4A-NFIA1 transfizierte Chondrozyten. **untransf.:** Chondrozyten, die ohne Transfektion nach Monolayerkultur in Agarose eingebettet wurden. **+ Insulin:** Zugabe von 100 ng/ml Insulin. Vergrößerung: 200fach.

Die nicht transfizierten Chondrozyten wurden zur Kontrolle ebenfalls im Monolayer mit DMEM/F12 + 10% FKS kultiviert und anschließend in Agarose eingebettet. Bei diesen Zellen war schon nach siebentägiger Kulturdauer und Insulinstimulierung eine Proliferation wie auch eine Volumenzunahme der Zellen erkennbar. Nach 14 Tagen Kulturdauer zeigten die stimulierten Zellen den charakteristischen Phänotyp hypertropher Chondrozyten. Die transfizierten Zellen proliferierten während der kompletten Kulturdauer nicht, doch auch hier war nach 14 Tagen eine leichte Volumenzunahme der Chondrozyten zu beobachten.

Im Folgenden wurden die Zellen in Agarosekultur mit Insulin stimuliert und nach 14 Tagen die Kollagene des Mediums extrahiert. Nach der Transfektion wurde eine hohe Mortalität der Chondrozyten (ca. 80%) beobachtet, so dass die Zellen nur in einer Dichte von $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ (pCMV-Tag-4A-NFIA1) bzw. $0,35 \times 10^6/\text{ml}$ (pCMV-Tag) Agarosesuspension eingebettet werden konnten. Nicht transfizierte Zellen wurden in einer Dichte von $2,1 \times 10^6/\text{ml}$ angesetzt.

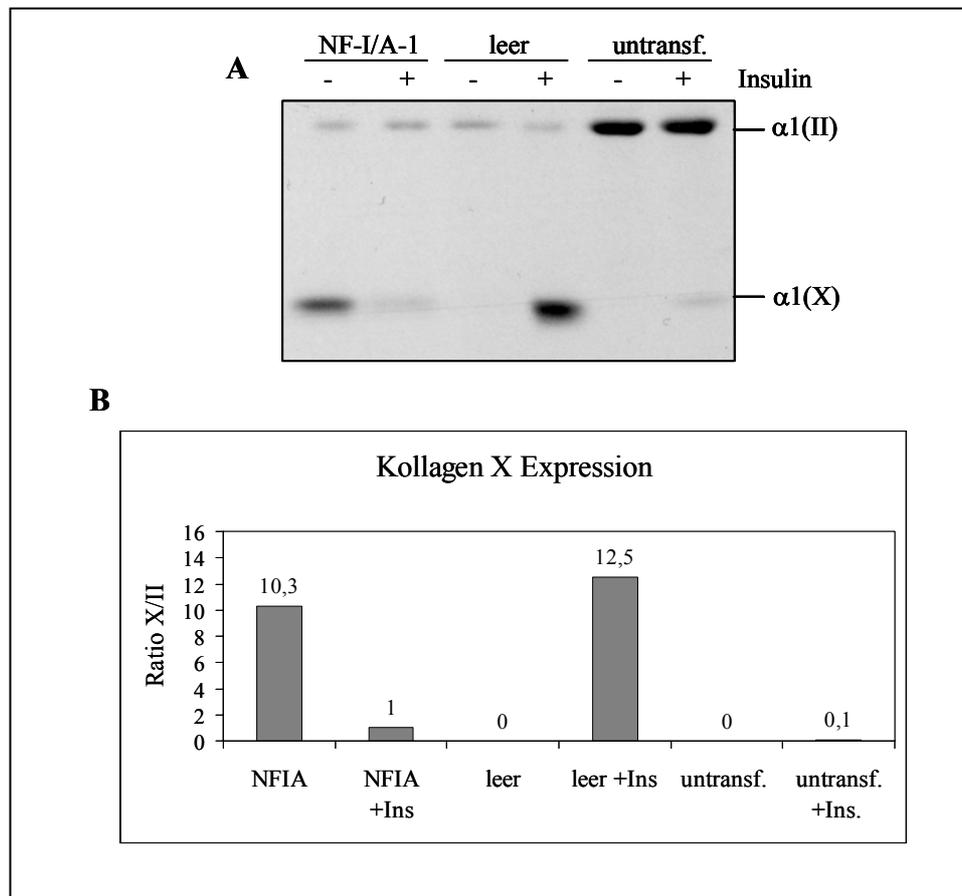


Abb. 3.23: Kollagen X-Expression transfizierter und nicht-transfizierter Chondrozyten nach Stimulation mit Insulin, I. **A:** Fluorogramm eines SDS-PAGE-Gels zum Nachweis pepsin-resistenter Kollagene. **B:** Auf Kollagen II bezogene Kollagen X-Produktion. Die Zellen wurden nach 14tägiger Kultivierung in Agarose mit $[^{14}\text{C}]$ -Prolin markiert und die Kollagene wurden aus den Kulturmedien isoliert (2.2.5). **NF-I/A-1:** mit pCMV-Tag-4A-NFIA1 transfiziert, **leer:** mit leerem Vektor pCMV-Tag-4A transfiziert, **untransf.:** nicht transfizierte Zellen, **Insulin/+Ins.:** 100 ng/ml Insulin.

Da unterschiedliche Zellzahlen eingesetzt werden mussten, wurde das Verhältnis von Kollagen X zu Kollagen II berechnet, damit ein Vergleich der verschiedenen Ansätze möglich war. NF-I/A-1 überexprimierende transfizierte Chondrozyten (NFIA+Insulin) zeigten nach Insulinstimulierung eine 12,5fache Verringerung der Kollagen X-Produktion gegenüber Chondrozyten, die mit dem leeren Vektor transfiziert worden waren (leer + Insulin). Allerdings zeigten unstimulierte Chondrozyten nach pCMV-Tag-4A-NFIA1-Transfektion (NFIA) eine starke Kollagen X-Synthese, wohingegen mit dem leeren Vektor transfizierte Zellen (leer) kein Kollagen X produzierten. Nicht transfizierte Chondrozyten exprimierten nach Insulinstimulierung Kollagen X, wenn auch in geringen Mengen. Ohne diese Insulin-Stimulierung war kein Kollagen X im Medium zu detektieren.

In einem weiteren Experiment wurde die Hypertrophie der Zellen durch Zusatz von IGF-1 stimuliert. Aufgrund der Erkenntnisse über die hohe Mortalität der Zellen nach Transfektion beim vorherigen Versuch, die auf eine hohe toxische Wirkung des Plasmids deuteten, wurden nun die Transfektionen mit 5 µg Plasmid pro Ansatz durchgeführt. Es war möglich, Agaroseplatten mit je $1,9 \times 10^6$ Zellen/ml (pCMV-Tag-4A-NFIA1) bzw. $1,4 \times 10^6$ Zellen/ml (pCMV-Tag) Agarosesuspension in Kultur zu nehmen. Die nicht-transfizierten Chondrozyten wurden in einer Dichte von $2,1 \times 10^6$ Zellen/ml ausgesät.

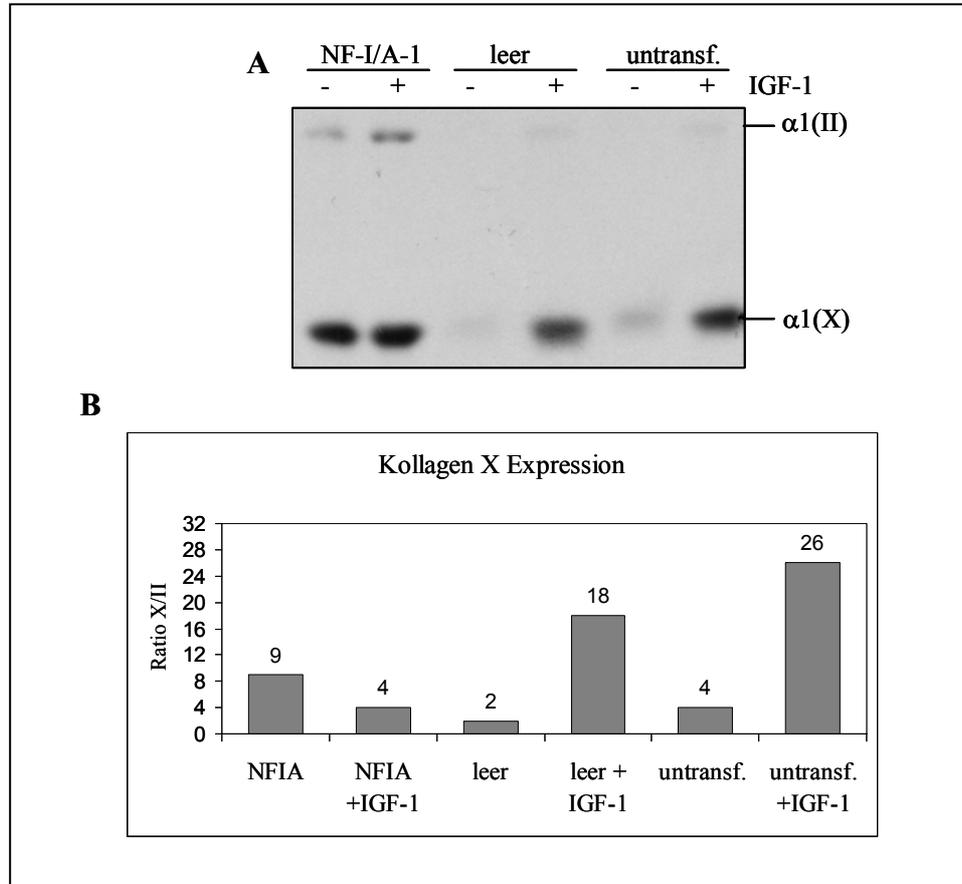


Abb. 3.24: Kollagen X-Expression transfizierter und nicht transfizierter Chondrozyten nach Stimulation mit IGF-1. **A:** Fluorogramm eines SDS-PAGE-Gels zum Nachweis pepsinresistenter Kollagene. **B:** Graphische Darstellung der Kollagen X-Expression. Die Zellen wurden nach 14tägiger Kultivierung in Agarose mit [¹⁴C]-Prolin markiert und die Kollagene wurden aus den Kulturmedien isoliert. **NF-I/A-1:** mit pCMV-Tag-4A-NFIA1 transfiziert. **leer:** mit leerem Vektor pCMV-Tag-4A transfiziert. **untransf.:** nicht transfizierte Zellen. **IGF-1:** 100 ng/ml IGF-1.

Auch hier wurde deutlich, dass nach Stimulation mit IGF-1 die Kollagen X-Synthese durch eine Überexpression von NF-I/A-1 um den Faktor 4,5 verringert wurde (Vergleich der Datenpunkte von NFIA+IGF-1 und leer+IGF-1). Wiederum produzierten unstimulierte Chondrozyten (NFIA) Kollagen X und die Synthese wurde, im Vergleich mit den mit leerem Vektor transfizierten Zellen (leer), durch den Effekt des Faktors NF-I/A-1 um den Faktor 4,5 verstärkt. Die nicht-transfizierten Zellen zeigten nach Stimulation mit IGF-1 eine 6,5fach erhöhte Kollagen X-Synthese im Vergleich zu nicht-stimulierten Zellen.

Im folgenden Versuch wurden die Zellen wiederum mit je 5 µg Plasmid/Ansatz transfiziert und in 24-Well-Kulturschalen als Agarosesuspension kultiviert. Dadurch, dass kleinere Kulturschalen eingesetzt wurden, war eine Angleichung der Zelldichte bei den Ansätzen möglich; die Chondrozyten wurden in einer Zelldichte von $1,8 \times 10^6$ /ml Agarosesuspension ausgesät. Nicht-transfizierte Zellen wurden bei diesem Experiment nicht mitgeführt.

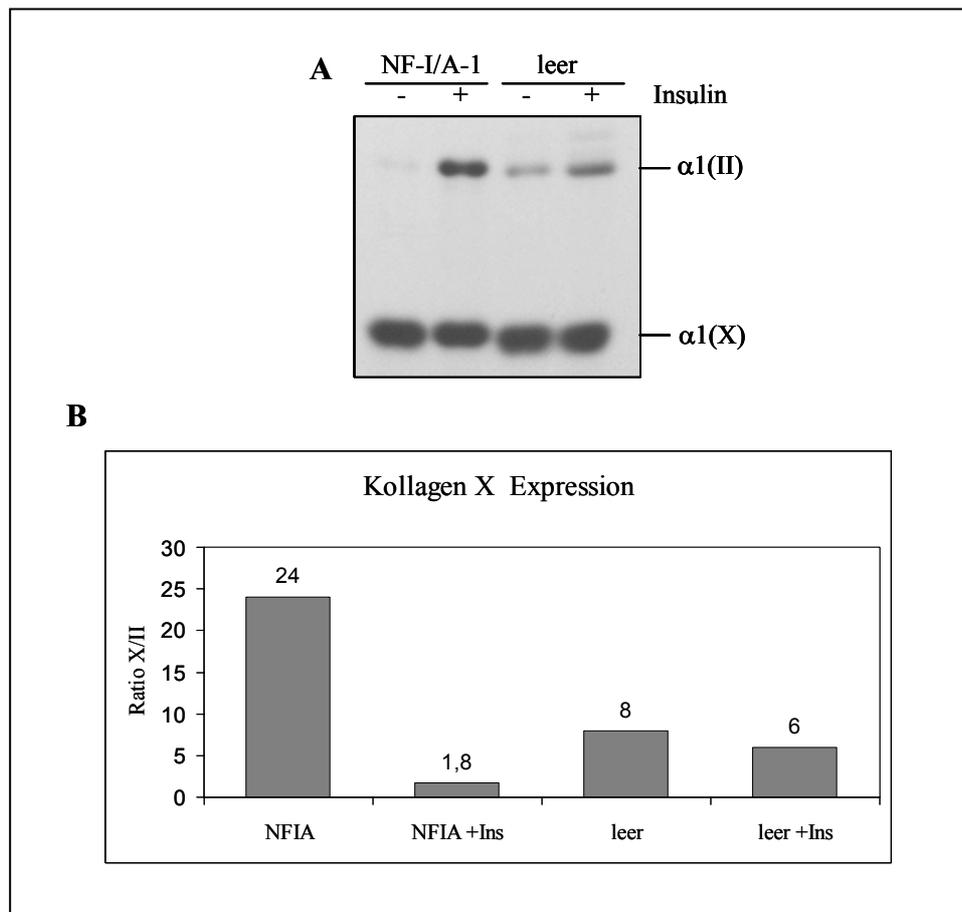


Abb. 3.25: Kollagen X-Expression transfizierter und nicht transfizierter Chondrozyten nach Stimulation mit Insulin, II. **A:** Fluorogramm eines SDS-PAGE-Gels zum Nachweis pepsinresistenter Kollagene. **B:** Graphische Darstellung der Kollagen X-Expression. Die Zellen wurden nach 14tägiger Kultivierung in Agarose mit [^{14}C]-Prolin markiert und die Kollagene aus den Kulturmedien isoliert. **NF-I/A-1:** mit pCMV-Tag-4A-NFIA1 transfiziert. **leer:** mit leerem Vektor pCMV-Tag-4A transfiziert. **Insulin/+Ins.:** 100 ng/ml Insulin.

Bei Chondrozyten, die NF-I/A-1 überexprimierten (NFIA+Ins), konnte nach Insulinstimulierung eine dreifache Verringerung der Kollagen X-Synthese beobachtet werden im Vergleich mit Zellen, die mit dem leeren Plasmid pCMV-Tag-4A transfiziert worden waren (leer + Ins.). Der umgekehrte Effekt war bei Chondrozyten zu erkennen, die nicht stimuliert wurden. Hier war die Kollagen X-Synthese der NF-I/A-1 überexprimierenden Zellen (NFIA) im Vergleich zu mit leerem Vektor transfizierten Zellen (leer) dreifach verstärkt. Weiterhin fiel auf, dass Chondrozyten, die mit dem leeren Plasmid transfiziert worden waren, mehr Kollagen X synthetisierten, wenn sie nicht mit Insulin stimuliert wurden (Vergleich leer mit leer + Ins.). Da die Zellen vor der serumfreien Agarosekultur in Monolayer mit FKS kultiviert wurden, wäre es möglich, dass die Hypertrophie dieser Zellen durch das Serum ausgelöst wurde und diese Stimulation intensiver als die durch Insulin war.

Bei den hier gezeigten Experimenten wurde in den Kulturmedien aller Ansätze keine Aktivität der alkalischen Phosphatase nachgewiesen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B-1 in kaudalen Chondrozyten stärker exprimiert wird als in den kranialen Zellen. In serumfreien Agarose-Suspensionskulturen wurde die Hypertrophie der kranialen Zellen durch diesen Faktor inhibiert, wenn diese durch Insulin/IGF-I stimuliert wurde. Bei kranialen Zellen, die nicht stimuliert wurden, aber dennoch hypertroph wurden, zeigte sich der gegenteilige Effekt: NF- κ B-1 verursachte eine Verstärkung der Kollagen X-Synthese. Möglicherweise wurde die Spätdifferenzierung dieser Zellen durch die vorhergegangene Inkubation der Chondrozyten mit Serum in Monolayerkulturen herbeigeführt.

4. Diskussion

Während der enchondralen Ossifikation (z.B. bei Röhrenknochen) wird zuerst eine vorläufige Knorpelanlage gebildet, die in folgenden Schritten sukzessive durch Knochen und Knochenmark ersetzt wird. Dieser Prozess findet unter anderem in den epiphysären Wachstumsfugen statt, in der die Chondrozyten die verschiedenen Stadien der Spätdifferenzierung durchlaufen. Die der Epiphyse benachbarten Zellen der Ruhezone beginnen schnell zu proliferieren und bilden entlang der longitudinalen Achse des wachsenden Knochens eine säulenartige Anordnung aus. Nach einigen Teilungszyklen beenden sie die Proliferation, steigern ihre metabolische Aktivität, um schließlich das hypertrophe Differenzierungsstadium zu erreichen, dass unter anderem durch eine starke Volumenzunahme der Zellen charakterisiert ist. Die Matrix der hypertrophen Zellen wird vaskularisiert, ein Prozess, der von der Einwanderung von Chondroklasten/Osteoklasten und den Knochen-bildenden Osteoblasten begleitet ist. In neuerer Zeit wurde postuliert, dass die hypertrophen Zellen der Apoptose unterliegen (Suda et al., 1999; Silvestrini et al., 2000; Cheung et al., 2003).

Die morphologischen Umgestaltungen sind von Veränderungen im biochemischen Repertoire der Chondrozyten begleitet. Nicht-hypertrophe Chondrozyten sekretieren z.B. große Mengen an Kollagen II, wohingegen hypertrophe Chondrozyten mit der Synthese der Differenzierungsmarker Kollagen X und ALP beginnen. Die verschiedenen Prozesse der Spätdifferenzierung unterliegen einer strikten Kontrolle durch die Umgebung der Zellen, wie z.B. Zell-Matrix-Interaktionen als auch lösliche Wachstumsfaktoren und Hormone, die an spezifische Rezeptoren auf der Chondrozytenoberfläche binden (Cancedda et al., 1995). Die äußeren Signale werden durch verschiedene Signaltransduktionswege intrazellulär weitergeleitet und es folgt eine anschließende Regulation von Targetgenen auf Transkriptionsebene.

Die allgemeine Annahme ist, dass die Spätdifferenzierung bei jedem Chondrozyten vorprogrammiert ist. Der Beginn der Differenzierung sowie der Übergang zwischen den Differenzierungsphasen wird an verschiedenen Kontrollpunkten inhibiert oder verzögert. Eine Blockierung der Zellreifung kann vorübergehend erfolgen, z.B. während der enchondralen Ossifikation in der Wachstumsfuge. Die Blockade kann aber auch permanent aufrecht erhalten bleiben, z.B. in artikulären Knorpel (Burch und Lebovitz, 1982; Böhme et al., 1992; Böhme et al., 1995; Quarto et al., 1992; Vortkamp et al., 1996; Szüts et al., 1999 Hartmann und Tabin, 2000).

Im embryonalen Hühnersternum sind verschiedene Populationen differenzierter Chondrozyten vorhanden, die sich in ihrer Gestalt und ihrer Propagierbarkeit der Spätdifferenzierung unterscheiden, so dass sie sich zur Analyse der Regulation der enchondralen Ossifikation gut eignen. Die Zellen des kranialen Teils proliferieren, und einige erreichen noch *in ovo* das hypertrophe Differenzierungsstadium und beginnen mit der Sekretion von Kollagen X in die ECM. Es schließt sich die Verknöcherung des kranialen Bereiches an, die in den ersten Lebensmonaten des Huhns vollendet wird. Dahingegen behalten die kaudalen Chondrozyten bis zu zwei Monate nach dem Schlüpfen des Tieres den Phänotyp von Ruhechondrozyten bei und synthetisieren weiterhin die knorpelspezifischen Kollagene II, IX und XI.

In serumfreien Agarose-Suspensionskulturen unterdrücken kaudale Zellen ihre eigene Hypertrophie sowie diejenige der kranialen Chondrozyten. In den Agarose-Kokultur-Experimenten befinden sich die Zellen in getrennten Agaroseschichten, wodurch ein direkter Kontakt der Chondrozyten verhindert wird. Demnach ist es wahrscheinlich, dass die Inhibition der Hypertrophie kranialer Zellen durch kaudale Chondrozyten mit Hilfe löslicher parakriner Faktoren vermittelt wird (Böhme et al., 1995). Weiterhin wurden die Hypertrophie hemmenden Faktoren in den konditionierten Medien von IGF-I stimulierten kaudalen Chondrozyten detektiert (Böhme, 1993). Auch Zellen des artikulären Knorpels bewirken in Kokultur eine Hemmung der Hypertrophie kranialer Hühnerchondrozyten (D'Angelo und Pacifici, 1997). Regulierende Faktoren dieses negativen Kontrollmechanismus sind nicht vollständig bekannt. Es werden extrazelluläre Faktoren, Signalvermittelnde Proteine sowie Transkriptionsfaktoren hierbei beteiligt sein. Die entsprechenden Genprodukte der blockierenden Faktoren werden wahrscheinlich in kranialen Chondrozyten nicht oder nur vermindert exprimiert, so dass diese Zellen *in vivo* spontan den Prozess der Spätdifferenzierung durchlaufen, wobei exogene Faktoren diesen Vorgang beschleunigen können (Szüts et al., 1998; Böhme et al., 1992; Möllers, 1999). Unserer Arbeitshypothese zufolge besitzen kaudale und kraniale Chondrozyten vermutlich unterschiedliche Genexpressionsprofile, was ihr unterschiedliches Potential zur Hypertrophie erklären könnte.

4.1. Erstellung einer subtraktiven cDNA-Bank

Zum näheren Verständnis der Unterdrückung der Chondrozyten-Hypertrophie wurden differentiell exprimierte Genprodukte in kranialen und kaudalen Chondrozyten mittels einer suppressiven subtraktiven Hybridisierung (Diatchenko et al., 1996) identifiziert.

Bei diesem Verfahren wurde cDNA kaudaler Chondrozyten synthetisiert und mit einem Überschuss an cDNA kranialer Chondrozyten hybridisiert. Unter geeigneten Bedingungen hybridisieren selbst seltene, in beiden Zellpopulationen vorkommende cDNA-Moleküle (Diatchenko et al., 1996; Ji et al., 2002). Nach der Hybridisierung verbleiben nur cDNAs der kaudalen Zellpopulation als einzelsträngige Moleküle für die keine korrespondierenden Transkripte in den kranialen Chondrozyten existierten. Diese cDNAs repräsentieren in kaudalen Zellen hochregulierte Genprodukte. Durch zwei aufeinander folgende Hybridisierungen wird eine starke Anreicherung der spezifisch in kaudalen Chondrozyten exprimierten Transkripte erreicht. Der Vorteil gegenüber anderen differentiellen Genexpressionsmethoden, wie z.B. dem *Differential Display* (Liang und Pardee, 1992), liegt darin, dass stark synthetisierte Transkripte beider Zellpopulationen eliminiert werden und somit die Wahrscheinlichkeit erhöht ist, seltene Transkripte eines Zelltyps zu detektieren (Diatchenko et al., 1996). Andere subtraktive Hybridisierungsmethoden erfordern oftmals mehrere Hybridisierungsschritte und es werden nur in hohen Konzentrationen vorkommende, differentiell exprimierte Transkripte identifiziert (Xu et al., 2000; Duguid und Dinauer, 1990; Hara et al., 1991). Die Sensitivität der SSH ist gegenüber diesen Methoden erhöht, da ebenso differentielle Genprodukte isoliert werden, deren Konzentrationsunterschiede in beiden Zellpopulationen relativ gering sein können (Diatchenko et al., 1996; Li et al., 2002). Dies ist von besonderer Bedeutung bei einem Vergleich nah verwandter Zellpopulationen, wie z.B. bei den hier verwendeten kranialen und kaudalen Chondrozyten. Es besteht hierbei eher die Möglichkeit, dass differentiell exprimierte Gene mit einem relativ geringen Konzentrationsunterschied innerhalb der Zellpopulationen vorhanden sind.

4.1.1 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Am Tag 17 der embryonalen Entwicklung wurde Gesamt-RNA von Chondrozyten aus den kaudalen und kranialen Dritteln frisch präparierter Hühnersterna isoliert. Die heterogene Chondrozytenpopulation des kranialen Bereiches des Sternums besteht zu diesem Zeitpunkt aus unterschiedlich reifen Zellen (Iwamoto et al., 1993). Es sind überwiegend spät-proliferative Chondrozyten der Phase Ib, und nur wenige früh-proliferative Zellen der Phase Ia zu finden (Szüts et al., 1998). Die weniger reifen Chondrozyten befinden sich an der Peripherie, wohingegen in der mittleren Region die am weitesten differenzierten Zellen lokalisiert sind, die *in vitro* ohne zusätzliche Faktoren spontan Kollagen X synthetisieren können (D'Angelo und Pacifici, 1997; Szüts et al., 1998). Erfolgt eine Stimulation der Chondrozyten des gesamten kranialen Bereiches mit IGF-I, Insulin oder Thyroxin, so erreichen die meisten Chondrozyten dieser heterogenen Zellpopulation das hypertrophe Differenzierungsstadium und produzieren Kollagen X und ALP (Böhme et al., 1995). Dagegen sind im kaudalen Bereich des Sternums am Tag 17 *in ovo* Ruhe- und proliferative Chondrozyten zu finden, die in Kultur mit IGF-I bzw. Insulin nicht hypertrophieren, sondern ihre eigene und sogar die Hypertrophie der kranialen Zellen unterdrücken (Böhme et al., 1995). Hier ist Thyroxin der einzige bekannte Faktor, der in Kokultur mit Endothelzellproteasen stabil zur Hypertrophie der kaudalen Chondrozyten führt (Bittner et al., 1998; Babarina et al., 2001). Aufgrund dieser unterschiedlichen Fähigkeit der kaudalen und kranialen Zellen zur Spätdifferenzierung eignen sich die Zellpopulationen an diesem Zeitpunkt sehr gut, um durch einen Vergleich das differentielle Expressionsmuster dieser Zellen näher zu charakterisieren.

Zur Identifizierung unterschiedlich produzierter Transkripte in den beiden Chondrozytenpopulationen wurde zunächst die Gesamt-RNA der Zellen in cDNA umgeschrieben. Da mit üblichen Methoden nur sehr wenig RNA aus kaudalen Chondrozyten gewonnen werden konnte, wurde die cDNA-Synthese mit dem PCR-cDNA-Synthese SMART-Kit durchgeführt. Diese Methode besitzt den Vorteil, dass durch eine PCR-Amplifikation des cDNA-Zweitstranges aus geringen RNA-Mengen ausreichend cDNA hergestellt werden kann (Matz et al., 1999; Chenchik et al., 1998). Neben einem oligo(dT)-Primer wird ein weiteres Oligonukleotid eingesetzt, das die Template-mRNA am 5'-Ende verlängert und in einer folgenden *Long-Distance-PCR* als universelle Primerbindungstelle fungiert. Somit wurden nur einzelsträngige cDNAs, die die Sequenz des zusätzlichen Primers

am 5'-Ende besaßen, amplifiziert. Die cDNA war mit Volllänge-Konstrukten angereichert (Gubler und Hoffman, 1983) und ist somit für Genexpressionsstudien prädestiniert. In dem eine Überamplifikation der Transkripte bei der Durchführung dieser Methode der cDNA-Synthese verhindert wird, werden die relativen Häufigkeiten einzelner RNA-Spezies nicht verändert, und die amplifizierte cDNA beinhaltet repräsentativ sowohl verstärkt als auch gering exprimierte Transkripte (Endege et al., 1999). Die mit dieser Methode erfolgreich hergestellte cDNA aus kranialen und kaudalen Chondrozyten wurde in der Subtraktionshybridisierung eingesetzt und die SSH durchgeführt.

4.1.2 Analyse der Subtraktionseffizienz

Während der SSH wurden alle vom Hersteller empfohlenen Überprüfungsschritte (Kontrolle der Adapterligation: 3.1.2, Kontrolle der Subtraktion: 3.1.3) durchgeführt und als erfolgreich verlaufen bewertet. Die Analyse der Adapterligationen erfolgte durch eine PCR, bei der ein spezifischer Adapter-Primer (Primer 1) und GAPDH-Primer eingesetzt wurden. Es entstanden nur dann Transkripte, wenn die Adapterligation erfolgreich verlaufen war. Hierbei wurde deutlich, dass die GAPDH-spezifischen PCR-Produkte, bei denen *tester* cDNA aus kaudalen Chondrozyten als Template eingesetzt wurde, schwächer waren als die der anderen Ansätze, obwohl ursprünglich gleiche Mengen RNA aus kaudalen und kranialen Zellen eingesetzt wurden. Bei der Durchführung von *Virtual Northern* Blots wurde festgestellt, dass GAPDH, die zur Kontrolle der Adapterligation herangezogen wurde, in kranialen Chondrozyten stärker als in kaudalen Chondrozyten des Hühnersternums exprimiert wurde. Die detektierten schwächeren spezifischen GAPDH-Banden waren demnach kein Hinweis dafür, dass eventuell insgesamt weniger cDNA aus kaudaler mRNA generiert wurde. Hinsichtlich des weiteren Verlaufs der *forward* Reaktion der SSH, bei der cDNA kaudaler Chondrozyten mit einem Überschuss an kranialer cDNA hybridisiert wurde, war dieser Befund nicht von Bedeutung, da gemeinsame Transkripte beider Zellpopulation während der Hybridisierungsschritte eliminiert wurden.

Eine abschließende Kontrolle ergab, dass die Subtraktion der *forward* Reaktion, bei der cDNA kranialer Chondrozyten von cDNA kaudaler Chondrozyten subtrahiert wurde, erfolgreich verlaufen war. Die GAPDH-cDNA war durch die SSH nahezu vollständig entfernt worden. Auch die Subtraktion der *reverse* Reaktion, bei der cDNA kaudaler Chondrozyten von der cDNA kranialer Zellen subtrahiert wurde, verlief positiv, obwohl bei dem Vergleich

der nicht-subtrahierten mit der subtrahierten Probe bei allen Amplifikationsrunden spezifische GAPDH-Banden detektiert wurden. Es war jedoch ersichtlich, dass die Banden der subtrahierten Probe insgesamt deutlich schwächer ausfielen. Dies bedeutet, dass, bedingt durch die geringere GAPDH-Expression in kaudalen Chondrozyten, bei dieser Hybridisierung weniger GAPDH-Transkripte aus dem cDNA-Gesamtpool eliminiert worden sind. Da das Hauptaugenmerk dieser Arbeit den in kaudalen Chondrozyten hochregulierten Genen galt, wurde keine weitere Überprüfung der Subtraktionseffizienz mit einem anderen *Housekeeping*-Gen durchgeführt, da die *forward* Reaktion optimal verlaufen war. Mit der subtrahierten cDNA der *reverse* Reaktion wurde daher keine cDNA-Bibliothek angelegt, sondern sie diente beim differentiellen *Screening* der subtraktiven kaudalen Bibliothek zum Abgleich des Hintergrundes durch falsch positive Klone.

4.1.3 Analyse der subtraktiven Bibliothek durch differentielles Screenings

Bei der PCR-*Select* Methode besteht die Gefahr, dass falsch positive Sequenzen isoliert werden, die in den zu vergleichenden Zellpopulationen nicht differentiell exprimiert sind (Diatchenko et al., 1996; Gurskaya et al., 1996). Aus diesem Grunde wurde der SSH eine differentielle Analyse der subtraktiven Bibliothek angeschlossen. Die durch die SSH erhaltene cDNA wurde in Plasmidvektoren ligiert, in Bakterien kloniert und durch Bakterienkolonie-PCR analysiert. Es ergab sich eine gute Transformationseffizienz von 95 %. Anfänglich wurden Kolonie-Dot Blots hergestellt, da aber die Bakterienkolonien auf den Membranen unterschiedlich stark bzw. gar nicht anwuchsen, wurden nur noch cDNA-Dot Blots angefertigt. Damit war die bessere Vergleichbarkeit der Hybridisierungssignale gewährleistet. Insgesamt konnten auf diese Art und Weise 53 von 288 Klonen als positiv identifiziert werden, d.h. diese Klone beinhalteten Gensequenzen, die in kaudalen Chondrozyten hochreguliert waren. Dies entsprach einem Anteil von 18,4 % an positiven Klonen. Bei den hier verglichenen kaudalen und kranialen Chondrozyten handelt es sich um sehr nah verwandte Zellpopulationen, so dass die Wahrscheinlichkeit hoch ist, dass die Konzentrationsunterschiede von differentiell exprimierten Genen eher gering sind. Die Effizienz einer SSH ist erheblich von dem Konzentrationsverhältnis der Zielgene zwischen den verglichenen Zellpopulationen abhängig, d.h. je größer dieser Unterschied ist, desto eher werden die verschieden stark exprimierten Gensequenzen durch die SSH identifiziert (Li et al., 2002). Somit sind die hier erreichten 18 % als eine gute Ausbeute an positiven Klonen zu

bewerten. Ein ähnliches Ergebnis erzielten unter anderem Stubbs et al. (1999), die mit Hilfe der SSH eine Androgen-sensitive Prostatakrebszelllinie mit einer nicht Androgen-sensitiven Prostatakrebszelllinie verglichen, wobei beide Zelllinien aus einem gemeinsamen Vorläuferklon generiert wurden. Von anfänglich 140 isolierten Klonen waren nach der Kontrolle durch differentielles *Screening* mittels Dot Blots 15 % positiv. Die Durchführung einer SSH, bei der Zellen des Uterusgewebes vor und nach den Geburtswehen subtrahiert wurden, führten nach der Dot Blot Analyse zu einer Identifizierung von lediglich 7,5 % an positiven Klonen (Chan et al., 2002). Insgesamt kann der Prozentsatz von tatsächlich differentiell exprimierten Klonen innerhalb einer subtraktiven Bibliothek bei verschiedenen Durchführungen erheblich variieren. Es sind Ergebnisse von 95 % (Diatchenko et al., 1996), von 40 - 60 % (Gurskaya et al., 1996; von Stein et al., 1997) bis hinunter zu weniger als 7,5 % (Chan et al., 2002; Diatchenko et al., 1999) publiziert worden.

4.1.4 Sequenzergebnisse der differentiell exprimierten Klone

Von den als in kaudalen Chondrozyten hochreguliert identifizierten 53 Klonen konnten 45 Klone sequenziert werden, und die Ergebnisse sind mit den Einträgen der Suchmaschine BLAST des NCBI (Altschul et al., 1990) verglichen worden. Eine erste Sequenzanalyse erfolgte nach Fertigstellung der subtraktiven Bibliothek im Jahr 2002. Im März 2004 war das Genom des Huhns vollständig sequenziert, so dass eine erneute Analyse erfolgte. Es ergaben sich hierbei nun mehr Datenbankeinträge mit Huhn-spezifischen Sequenzen. Bei beiden Analysen wurden als Huhn-spezifische Klone Homologien zur Rho-assoziierten Kinase 2 und zum Lysosomen-assoziierten Memranglykoprotein LAMP-2c gefunden. Außer zu einem einzelnen EST-Klon wurden 2002 keine weiteren homologen Sequenzen im bis dahin bekannten Genom des Huhns gefunden. Vielmehr lieferte die Datenbankanalyse zahlreiche Homologien zu humanen, Maus- oder Ratten-spezifischen Sequenzen. Zum Beispiel wiesen zwei weitere Klone Ähnlichkeiten zum humanen und murinen Transkriptionsfaktor DP-1 bzw. zum Zinktransporter ZTL-1 auf. Die Homologie zu DP-1 konnte bei der zweiten Analyse bestätigt werden. Auffallend war, dass 2002 13 Klone Homologien zum Nuklear Faktor NF-I/A von Mensch, Maus oder Ratte aufwiesen. Eine Identität mit einem Huhn-spezifischen NF-I/A wurde jedoch nicht gefunden.

Es ist bekannt, dass im Huhn vier verschiedene NF-I-Gene vorhanden sind, und dass von jedem Gen verschiedene Isoformen existieren, die auch innerhalb verschiedener Spezies hohe

Homologien zeigen (Rupp et al., 1990; Santoro et al., 1988; Kruse und Sippel, 1994a; Osada et al., 1997). Die Sequenzen dieser 13 Klone kodieren eventuell für Proteine bzw. Proteindomänen, die eine ähnliche Funktion wie die NF-I-Faktoren besitzen. Es könnte sich um neue Mitglieder der Familie der NF-I-Transkriptionsfaktoren handeln. Kürzlich wurde eine weitere Isoform von NF-I/A (NF-I/A-*short*) in der olfaktorischen Mucosa der Ratte identifiziert (Ling et al., 2004).

Bei der Analyse im Jahr 2004 wurden bei fast allen dieser Klone höhere Homologien mit zwei Huhn-spezifischen EST-Sequenzen gefunden. Ein Sequenzvergleich der EST-Klone mit Sequenzen des humanen, murinen oder Huhn-spezifischen NF-I/A ergab jedoch keine ausgeprägten Homologien, sondern nur Identitäten einiger Nukleotide zueinander. Hierbei fiel auf, dass der EST-Klon ChEST355d10 allerdings zum C-terminalen Bereich der NF-I/A-Proteine diese Identitäten zeigte. Der C-terminale Bereich von NF-I-Faktoren variiert innerhalb der verschiedenen Isoformen erheblich und fungiert als Transkriptions- und Regulationsdomäne, wohingegen die N-terminale Region hoch konserviert ist und für die DNA-Bindung der Transkriptionsfaktoren verantwortlich ist (Gronostajski, 2000). Demzufolge kodieren diese EST-Sequenzen für ein neues Protein, das bei der Repression der Hypertrophie kranialer Chondrozyten durch kaudale Chondrozyten beteiligt ist und das eine ähnliche Funktion wie der Transkriptionsfaktor NF-I/A zeigen könnte. Drei weitere Klone konnten 2004 Huhn-spezifischen EST-Sequenzen zugewiesen werden. Weiterhin konnten allerdings auch nach der vollständigen Sequenzierung des Hühnergenoms 25 Klone nicht näher spezifiziert werden. Hierbei handelt es sich somit um neue Transkripte.

4.1.5 Expression ausgewählter cDNA-Klone in kaudalen und kranialen Chondrozyten

Die Überprüfung der differentiellen Expression von ausgewählten Klonen der subtraktiven Bibliothek erfolgte durch *Virtual Northern Blots* bzw. *Northern Blots*. Alle analysierten Klone waren nach dem differentiellen *Screening* als in kaudalen Chondrozyten verstärkt exprimiert klassifiziert worden. *Virtual Northern Blots* wurden an Stelle von mRNA mit der SMART-PCR amplifizierten cDNA durchgeführt, wobei im Allgemeinen die Ergebnisse mit *Northern Blots* vergleichbar sind. Die SMART-cDNA spiegelt das Verhältnis und das Vorkommen der mRNA-Spezies einer Probe repräsentativ wider (Chenchik et al., 1998;

Endege et al., 1999). Es zeigte sich, dass die den cDNA-Klonen B8, B57, C23 und C41 entsprechenden Gene zwei- bis dreifach verstärkt in kaudalen Chondrozyten exprimiert wurden. Weiterhin zeigte der cDNA-Klon C23, welcher hohe Identitäten mit dem Gen LAMP-2c aufwies, bei beiden durchgeführten Hybridisierungsmethoden eine Hochregulation in kaudalen Chondrozyten, auch wenn in einem von vier Experimenten die Sequenz in kranialen Zellen stärker exprimiert war. Nichtsdestotrotz ist es wahrscheinlich, dass LAMP-2c ein in kaudalen Chondrozyten hochreguliertes Gen darstellt. Die im *Virtual Northern* Blot detektierte erhöhte Expression in kaudalen Chondrozyten von ROCK 2 (Klon B57) konnte durch *Northern* Blots nicht bestätigt werden. Klon B59, dessen Sequenz nach Datenbankvergleich dem EST-Klon ChEST595a22 zugewiesen wurde, erwies sich als verstärkt exprimiert in kranialen Chondrozyten. Klon B78, der Identitäten zum Transkriptionsfaktor DP-1 zeigte, ist in den hier verglichenen Chondrozytenpopulationen nicht differentiell exprimiert; je nach eingesetzter RNA-Charge variierte das Expressionsmuster in kaudalen und kranialen Chondrozyten. Demnach konnte bei nur einem der analysierten sechs Klone die Hochregulation in kaudalen Chondrozyten bestätigt werden. Die Genexpression vom ChEST355d10 und vom Klon C41 wurden nicht durch *Northern* Blots überprüft. Die in *Virtual Northern* Blots festgestellte Hochregulation in kaudalen Chondrozyten muss demnach noch verifiziert werden.

Wenn in der SSH positive Klone in *Northern* Blots keinen Unterschied bei der Genexpression eines Klons zeigen, wie z.B. beim Klon B78 (DP-1), so wäre es möglich, dass die Transkripte in beiden Proben unterschiedliche Größen besitzen und daher verschiedene Spleißvarianten eines Gens darstellen (Diatchenko et al., 1996). Eine weitere Erklärung dafür, dass im *Northern* Blot differentielle Genexpressionen nicht bestätigt werden konnten, bieten verschiedene Spleißformen von Proteinen einer Multigen-Familie, wodurch das Signal einer Bande durch die verschiedenen Transkripte hervorgerufen und die Expression einzelner Isoformen maskiert wird (Diatchenko et al., 1996).

Für die *Virtual Northern* Blots wurde dieselbe SMART-cDNA verwendet, die ursprünglich zur Generierung der subtraktiven Bibliothek diente, wohingegen die *Northern* Blots mit Gesamt-RNA aus verschiedenen Chargen isolierter Chondrozyten durchgeführt wurden. Die Analyse der Expressionen der einzelnen Klonsequenzen zeigte deutlich die Variabilität der Genexpression von Primärzellen, wie z.B. bei den hier analysierten Chondrozyten, deren Expressionsmuster von vielen verschiedenen Wachstumsfaktoren und Hormonen abhängig ist

(Cancedda et al., 1995; Hering, 1999). Die Chondrozyten wurden direkt aus den präparierten Hühnersterna isoliert, und die Variabilität der Genexpression zwischen den einzelnen Experimenten kann eventuell durch die anfängliche Heterogenität der kranialen Zellpopulation im Hühnersternum erklärt werden (D'Angelo und Pacifici, 1997; Szüts et al., 1998). Zu jedem Isolationszeitpunkt wird ein unterschiedliches Verhältnis von spät-proliferativen und früh-proliferativen Zellen vorhanden gewesen sein, die sich in ihrem Expressionsmuster unterschieden (Szüts et al., 1998). Schwankungen im Verhalten der Zellen in Abhängigkeit der unterschiedlichen Sternpräparationen konnten auch in früheren Arbeiten häufiger beobachtet werden (Szüts et al., 1998; Möllers, 1999).

Weiterhin wurde bei den Hybridisierungen der *Virtual Northern* Blots eine unterschiedlich starke Expression des *Housekeeping*-Gens GAPDH in den Chondrozyten des kranialen und kaudalen Bereiches des Hühnersternums ersichtlich, so dass die GAPDH-Signale nicht zur Normalisierung der Expression anderer Gene bei der densitometrischen Auswertung herangezogen werden konnten. Stattdessen wurde eine β -Aktin-Sonde eingesetzt, da gezeigt werden konnte, dass β -Aktin in beiden Zellpopulationen gleichermaßen exprimiert wird. Eine Variabilität der GAPDH-Expression wurde auch bei anderen Primärzellen, wie z.B. Leber- und Hautzellen, sowie bei Lymphozyten beobachtet (Goldsworthy et al., 1993; Wu und Rees, 2000; Bas et al., 2004).

Die Überprüfung der Ergebnisse des differentiellen *Screenings* zeigt die Notwendigkeit einer Analyse der unterschiedlichen Genexpression mittels *Northern* bzw. *Virtual Northern* Blotting. Um eine Aussage über die Effektivität der hier durchgeführte SSH machen zu können, müssten allerdings alle 45 nach differentiellem Screenen und Sequenzierung detektierten Klonsequenzen mittels *Northern* Blots verifiziert werden; im Laufe dieser Arbeit wurden nur die ersten sechs Klone analysiert.

Die Hochregulation des Membranglykoproteins LAMP-2c ließ sich in kaudalen Chondrozyten bestätigen, es erfolgte in der vorliegenden Arbeit jedoch keine funktionelle Validierung dieses Proteins. Lysosomen-assoziierte Membranproteine (LAMPs) stellen die Hauptkomponente der Lysosomen-Membran dar, und es sind zwei strukturell ähnliche Klassen, LAMP-1 und -2, bei Vögeln und Säugetieren detektiert worden. LAMP-Proteine sind aus einer glykosylierten luminalen Domäne, aus einer Transmembrandomäne und aus einer kurzen cytosolischen Domäne zusammengesetzt (Fukuda, 1991). Multiple mRNAs sind für die Klasse der LAMP-2 Proteine identifiziert worden, die unterschiedliche

Transmembran- und cytosolische Domänen besitzen (Hatem et al., 1995; Konecki et al., 1995; Gough et al., 1995). LAMP-2c ist innerhalb der Lysosomen stark akkumuliert und seine Hauptaufgabe besteht darin, dass es die Lysosomenmembran und deren Proteine vor Degradationen bewahrt und so die normale lysosomale Funktion aufrechterhält. Weiterhin werden LAMPs ebenfalls in Endosomen und an der Plasmamembran gefunden (Ho und Springer, 1983; Febbraio und Silverstein, 1990), wobei den LAMP-1, -2a und 2b Proteinen eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion zugeschrieben wird (Sawada et al., 1994; Inohara und Raz, 1994). Bei der in dieser Arbeit identifizierten Isoform LAMP-2c handelt es sich wahrscheinlich nicht um ein Glykoprotein, dem Wechselwirkungen mit der ECM zugeschrieben werden, sondern es übt seine Funktion bei den Degradations- und Recyclingaufgaben der Lysosomen aus, wie z.B. bei dem *Turnover* von zellulären Proteinen oder bei der Regulation der Präsentation von Rezeptoren an der Zelloberfläche. Eine Funktion während der Chondrozytendifferenzierung oder bei anderen Zelltypen des Bindegewebes ist bis dato nicht beschrieben worden. Zur Verifizierung der Rolle von LAMP-2c bei der Chondrozytenspätendifferenzierung könnte dieses Glykoprotein in den kranialen Chondrozyten überexprimiert werden. Eine anschließende Analyse der Kollagen X-Synthese in serumfreier Agarose-Suspensionskultur würde über die Wirkung von LAMP-2c Aufschluss geben.

ROCK2, ein Protein, das nach dem differentiellen Screenen als in kaudalen Chondrozyten hochreguliert identifiziert wurde, ist eine Serin/Threonin-Kinase, die unter anderem bei der Organisation von Cytoskelett-Proteinen, der Zelladhäsion und bei der Muskelkontraktion involviert ist (Amano et al., 2000). Kürzlich wurde von Wang et al. (2004) gezeigt, dass RhoA und ROCK 1/2 in primären Chondrozyten und der chondrogenen Zelllinie ATDC5 exprimiert werden (Wang et al., 2004). Die Überexpression von RhoA/ROCK1/2 führte in den Experimenten dieser Gruppe zu einer Verstärkung der Proliferation und Inhibierung der Hypertrophie von Chondrozyten, was durch die Detektion der Expression der Markergene ALP und Kollagen X in RT-PCRs, sowie durch Bestimmung der Zellzahl analysiert wurde. In dieser Arbeit konnte durch *Northern Blots* nicht bestätigt werden, dass ROCK2 in kaudalen und kranialen Chondrozyten differentiell exprimiert ist, obwohl es nach dem differentiellen *Screening* so erschien. Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte keine weitere Analyse der Funktion von ROCK2 bei der Repression der Hypertrophie kranialer Zellen durch kaudale Chondrozyten.

4.2 Funktion des Transkriptionsfaktors NF-I/A-1 bei der Hypertrophie embryonaler Hühnerchondrozyten

Das vermehrte Auftreten von Datenbankeinträgen, die Homologien zum Nuklear Faktor I/A aus Mensch, Maus und Ratte zeigten, wurde als Hinweis gewertet, dass dieser Transkriptionsfaktor möglicherweise bei der Blockade der Hypertrophie kranialer Chondrozyten durch kaudale Chondrozyten eine Rolle besitzt. Die Nuklear Faktor-Familie der DNA-bindenden Proteine reguliert neben der viralen DNA-Replikation ebenso die Genexpression in eukaryotischen Organismen. Es sind vier verschiedene Mitglieder der Familie bekannt (NF-I/A, -I/B, -I/C und -I/X), die sich durch ihre transkriptionsregulierenden Eigenschaften unterscheiden; sie inhibieren oder aktivieren die Genexpression durch differente Mechanismen (Gronostajski, 2000). Hierbei spielt zum einen die Aktivierung durch direkte Interaktionen mit basalen Transkriptionsfaktoren eine Rolle (Kim und Roeder, 1994; Xiao et al., 1994) bzw. es wird berichtet, dass einzelne NF-I-Proteine die Bindung repressiver Histone verhindern können (Ristiniemi und Oikarinen, 1989; Gao et al., 1998). Ebenso ist es möglich, dass NF-I-Faktoren mit verschiedenen Koaktivatoren während der Transkriptionsregulation interagieren (Tanese et al., 1991; Dusserre und Mermoud, 1992). NF-I-Proteine vermitteln die Expression verschiedener Gene, die durch eine Vielzahl an Signaltransduktionswegen reguliert werden, wie z.B. durch Insulin (Cooke und Lane, 1999a), durch cAMP (Chu et al., 1991) oder auch durch Steroidhormone (Garlatti et al., 1996). Die Expression der NF-I-Faktoren wird durch das Differenzierungsstadium der Zellen beeinflusst, und es ist schwierig zu analysieren, ob die Effekte von Hormonen oder Wachstumsfaktoren auf die NF-I-Proteine direkt oder indirekt vermittelt werden (Goyal et al., 1990; Kulkarni und Gronostajski, 1996).

NF-I/A zeigt bei der Regulation der Transkription seiner Zielgene überwiegend reprimierende Eigenschaften (Gronostajski, 2000). Der C-terminale Bereich von NF-I-Proteinen fungiert als Transkriptions-Regulationsdomäne, und bei NF-I/A wurde hier ein Repressionsbereich detektiert (Osada et al., 1997). Weiterhin ist bekannt, dass NF-I-Transkriptionsfaktoren Bindungsstellen in den Promotoren von Chondrozyten-spezifischen Genen besitzen und deren Transkription unterdrücken können, z.B. bei Aggrekan (Pirok et al., 1997). Obwohl funktionelle NF-I-Bindungsstellen weit verbreitet in den Promotoren vieler verschiedener Gene detektiert wurden, ist das Vorkommen einiger DNA-Bindungssequenzen der Isoformen zellspezifisch (Szabo et al., 1995; Rajas et al., 1998; Cooke und Lane, 1999a). Von den verschiedenen Genen der NF-I-Familie im Huhn existieren vielfältige, durch alternatives

Spleißen entstandene Isoformen, die zellspezifische Wirkungen besitzen und sowohl positiv als auch negativ regulierend die Transkription beeinflussen (Kruse und Sippel, 1994). Da verschiedene Isoformen von Transkriptionsfaktoren unterschiedliche Funktionen während der Genexpression erfüllen können, wurde zuerst analysiert, welche der sechs bekannten Spleißvarianten des NF-I/A in Chondrozyten exprimiert werden. Es zeigte sich, dass sowohl in kranialen als auch in kaudalen Chondrozyten die beiden Isoformen NF-I/A-1 und NF-I/A-3 synthetisiert werden. Anschließend konnte durch *Virtual Northern Blotting* nachgewiesen werden, dass NF-I/A-1 in kaudalen Chondrozyten verstärkt exprimiert wird. Daraufhin wurde die mRNA von NF-I/A-1 in voller Länge revers transkribiert, amplifiziert und in kranialen Hühnerchondrozyten überexprimiert.

4.2.1. Transfektion primärer Hühnerchondrozyten und Überexpression des Transkriptionsfaktors NF-I/A-1

Zur Transfektion der primären Hühnerchondrozyten wurde eine physikalische Methode der Nucleofektion etabliert. Bei primären humanen Chondrozyten konnte eine effektive Transfektion mittels dieser Methode gezeigt werden (Hamm et al., 2002). Zur Überexpression spezifischer Proteine und ihrer Funktionsanalyse werden häufig chondrogene Zelllinien, wie z.B. ATDC5-Zellen, verwendet (Murakami et al., 2000; Newman et al., 2001), die allerdings den Nachteil besitzen, dass sie keinen stabilen Chondrozytenphänotyp aufweisen. Auch virale Infektionsmethoden sowie Lipofektion sind mittlerweile für primäre Chondrozyten etabliert (Dinser et al., 2001; Hirschmann et al., 2002; Stove et al., 2002). Die Nucleofektor-Methode basiert auf einer Elektroporation der Zellen, bei der durch die Permeabilisierung nicht nur der Zellmembran sondern auch der Kernmembran die DNA- oder auch RNA-Moleküle direkt in den Kern eingeschleust werden. Dadurch ist der Transfer der Nukleinsäuren in den Kern von der Zellteilung unabhängig, was besonders für die Transfektion von Primärzellen von Bedeutung ist, die sich eher langsam teilen oder auch gänzlich ohne mitotische Aktivität sein können (Hamm et al., 2002; Gresch et al., 2004). Frisch isolierte Chondrozyten besitzen eine sehr geringe Zellteilungsrate, die Proliferation wird erst durch geeignete Kulturbedingungen initiiert (Böhme et al., 1992; Hirschmann et al., 2002). Weiterhin sind fremde DNA-Moleküle vor Degradation innerhalb der Zelle geschützt, da sie nicht im Cytoplasma lokalisiert sind.

Zur Transfektion der kranialen Chondrozyten des Hühnersternums wurden anfänglich GFP-Konstrukte erstellt, da zum einen erfolgreiche Transfektionen von Chondrozyten mit GFP-Expressionsplasmiden bereits beschrieben waren (Dinser et al., 2001; Hirschmann et al., 2002; Hamm et al., 2002), und zum anderen, weil eine GFP-Fluoreszenz in vitalen Zellen durch eine direkte mikroskopische Betrachtung, insbesondere in Agarose-Suspensionskulturen, leichter zu beobachten ist. Mit dem ursprünglich für humane Chondrozyten konzipierten amaxa-System wurde, zusammen mit dem leeren GFP-Vektor, eine gute Transfektionseffizienz von 34 % erreicht. Direkt nach der Transfektion der Zellen war eine serumfreie Agaroseeinbettung der Zellen möglich. Nach Transfektion der Chondrozyten mit dem daraufhin hergestelltem Konstrukt phrGFPC-NFIA1 waren allerdings keine fluoreszierenden Zellen zu detektieren, obwohl die Kontrolltransfektion mit dem leeren Vektor phrGFP-C erfolgreich verlief. Vermutlich war das Fusionsprotein, bestehend aus dem GFP-Protein und dem Transkriptionfaktor NF-I/A-1, zu groß, um die Zellkernmembran der Chondrozyten zu passieren und wurde im Cytoplasma abgebaut. Deshalb wurde ein neuer Expressionsvektor mit einem FLAG-Tag konstruiert. Hierbei war das Fusionsprotein NF-I/A-1 + Flag-tag nur 1 kDa größer als der Faktor NF-I/A-1 allein. Auch hier wurde eine gute Transfektionseffizienz von 25 % erreicht, allerdings war eine direkte serumfreie Agaroseeinbettung der transfizierten Chondrozyten nicht möglich. Es wurde eine hohe Mortalität der Zellen beobachtet. Aus diesem Grunde wurden die kranialen Chondrozyten nach der Transfektion mit diesem Konstrukt zuerst in Monolayer mit Serum kultiviert und nach 48 Stunden in das serumfreie Agarosekultursystem überführt.

4.2.2 Einfluss von NF-I/A-1 auf die Hypertrophie kranialer Chondrozyten

In serumfreier Agarose-Suspensionskultur sind Chondrozyten unter Zugabe antioxidativ wirkender Reagenzien wie Pyruvat und Cystein bei geeigneter Zelldichte ($> 1 \times 10^6/\text{ml}$) über einen längeren Zeitraum kultivierbar und zeigen den knorpelspezifischen Phänotyp (Tschan et al., 1990). Die Stimulation kranialer Chondrozyten in diesem Kultursystem mit Insulin bzw. IGF-I bewirkt die Synthese der Hypertrophiemarker Kollagen X und ALP (Böhme et al., 1995; Szüts et al., 1998). Weiterhin zeigen hypertrophe Chondrozyten eine starke Volumenzunahme als morphologisches Charakteristikum (Tschan et al., 1993). Aus diesen Gründen wurden zur Analyse des Einflusses von NF-I/A-1 auf die Hypertrophie kranialer Chondrozyten die transfizierten, NF-I/A-1 überexprimierenden Zellen in serumfreien

Agarose-Suspensionskulturen kultiviert und die Hypertrophie der Zellen mit Insulin/IGF-I stimuliert. Sowohl bei den mit leerem Vektor transfizierten Zellen als auch bei den NF-I/A-1 überexprimierenden Chondrozyten war nach 14 Tagen Kulturdauer eine leichte Volumenzunahme, aber keine Proliferation der Zellen zu verzeichnen. Die transfizierten kranialen Chondrozyten zeigten auf morphologischer Ebene den hypertrophen Phänotyp. Da auch die mit leerem Vektor transfizierten Zellen nicht proliferierten, muss dieser Befund allein auf die Transfektion der Zellen zurückgeführt werden. Es handelt sich somit nicht um einen Effekt des NF-I/A-1. Chondrozyten, die ohne Plasmidzugabe elektroporiert wurden, proliferierten nach Insulinstimulierung und zeigten morphologisch die typische Volumenzunahme hypertropher Chondrozyten. Demnach wurde die nicht vorhandene Proliferation der transfizierten Zellen durch die Plasmidaufnahme in den Zellkern hervorgerufen.

4.2.2.1 Repression der Hypertrophie kranialer Chondrozyten durch NF-I/A-1

Die durch Insulin/IGF-I induzierte Kollagen X-Synthese der transfizierten kranialen Chondrozyten wurde durch die Überexpression des Transkriptionsfaktors NF-I/A-1 reduziert. Demnach kann NF-I/A-1 die Hypertrophie kranialer Chondrozyten unterdrücken, wenn diese durch Insulin oder IGF-I hervorgerufen wurde.

Als Transkriptionsfaktor könnte NF-I/A-1 direkt an den Promotor von Kollagen X binden und dort als Repressor fungieren. *In situ* Hybridisierungen und nukleäre *Run-off* Studien zeigen, dass die spezifische Kollagen X-Expression durch hypertrophe Chondrozyten eher auf der Transkriptions-, als auf der Translationsebene kontrolliert wird (Linsenmayer et al., 1991; LuValle et al., 1992). Im distalen Bereich des humanen Kollagen X-Promotors existieren negativ regulierende additive Elemente, durch die in Ruhechondrozyten und in nicht chondrogenen Zelllinien die Kollagen X-Synthese inhibiert wird. Dahingegen ist eine Chondrozyten-spezifische *Enhancer*-Region im proximalen Bereich lokalisiert. Diese ist in hypertrophen Chondrozyten aktiviert (Beier et al., 1997). Diese Region des humanen COL10A1-Gens besitzt zusätzlich ein PTH/PTHrP-*Response*-Element, das mehrere Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor AP-1 aufweist (Riemer et al., 2002). Vergleichbare Studien mit dem Huhn-spezifischen Col10a1-Promotor bestätigen das Vorhandensein und die Funktion von negativen und positiven regulatorischen Elementen

(Dourado und LuValle, 1998; Long et al., 1998; Beier et al., 1997). In keiner der den Promotor von Kollagen X analysierenden Studien wurden bis dato Hinweise auf Interaktionen mit den Transkriptionfaktoren der NF-I-Familie untersucht.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass NF-I/A-1 die Transkription von Faktoren unterbindet, die die Kollagen X-Synthese stimulieren (z.B. Insulin, BMPs, Runx2) und ebenso wäre eine Stimulation von Faktoren denkbar, die wiederum die Kollagen X-Produktion der Chondrozyten inhibieren (z.B. PTHrP, TGF- β , Sox9).

Viele *Silencer*-Regionen sind bei der Regulation mehrerer knorpelspezifischer Gene, wie z.B. bei Aggrekan, Matrilin-1, Kollagen II und XI, involviert (Szabo et al., 1995; Tanaka et al., 2002). An diese Regionen binden Transkriptionsrepressoren, wie z.B. NF-I-Proteine bei Matrilin-1 (Szabo et al., 1995) und Aggrekan (Pirok et al., 1997). Ein weiteres Beispiel für eine negative Regulation der Genexpression durch Transkriptionsfaktoren der NF-I-Familie ist während der Osteogenese zu beobachten, bei der die Expression von Runx2 auf diese Weise gesteuert wird (Zambotti et al., 2002). Runx2, ein Mitglied der Familie der *runt*-Transkriptionsfaktoren, ist notwendig für die Osteoblastendifferenzierung und reguliert direkt die Expression von Osteoblasten-spezifischen Markergenen wie Kollagen I, Osteopontin oder Osteokalzin (Kagoshima et al., 1993; Ducy et al., 1997; Kern et al., 2001). Der Promotor des murinen Transkriptionsfaktors Runx2 besitzt einen Sequenzbereich, der die Osteoblastenspezifische Transkription des Runx2-Gens bewirkt. Runx2 wird ebenfalls von prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten exprimiert, wo er zusammen mit den BMP-aktivierten Smads 1 und -5 die Kollagen X-Synthese induziert (Leboy et al., 2001). Es ist auch eine direkte Bindung von Runx2 an den Kollagen X-Promotor möglich, wodurch die Transkription des Kollagen X-Gens erfolgt (Zheng et al., 2003; Drissi et al., 2003). Im Osteoblasten spezifisch regulierten Bereich des Runx2-Promotors wurden Bindungssequenzen für die Transkriptionsfaktoren NF-I und AP-1 detektiert. Hierbei fungiert der Faktor NF-I/A in nicht-osteoblastischen Zellen als Repressor des Runx2-Gens. NF-I/A wird in Osteoblasten nicht synthetisiert, und die Transkription des Runx2-Gens wird dort durch AP-1 induziert (Zambotti et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Isoform NF-I/A-1 in Chondrozyten exprimiert wird. Es ist möglich, dass durch die Überexpression von NF-I/A-1 in kranialen Chondrozyten die Kollagen X-Synthese dadurch vermindert wird, dass dieser Faktor auch hier die Expression von Runx2 unterdrückt. Demnach würde NF-I/A-1 die Hypertrophie der kranialen Chondrozyten negativ regulieren.

Inaktivierung der spezifischen Runx2-Funktion in Chondrozyten führt zu einer Inhibierung der Chondrozytenreifung und Retardation der enchondralen Ossifikation (Enomoto-Iwamoto et al., 2001). Die diesem Vorgang unterliegenden Mechanismen sind bis dato noch nicht vollständig geklärt, und es wäre denkbar, dass NF-I/A-1 in diesem System eine Rolle spielt.

Die Aktivität des Runx2-Promotors ist von der konkurrierenden Wirkung der Transkriptionsfaktoren NF-I/A und AP-1 abhängig (Zambotti et al., 2002). Ein ähnlicher Mechanismus kann bei kranialen und kaudalen Hühnerchondrozyten vermutet werden. Demnach würde in kaudalen Chondrozyten NF-I/A verstärkt exprimiert werden und auf diese Weise die Hypertrophie unterdrücken. Wenn außerdem die NF-I/A-Synthese in kranialen Chondrozyten verringert ist und gleichzeitig AP-1 verstärkt gebildet wird, so erfolgt dort der Transkriptionsstart vom Runx2-Promotor. Die Zellen würden folglich mit der Produktion von Runx2 und vom Hypertrophiemarker Kollagen X beginnen.

Eine weitere die Genexpression inhibierende NF-I-Bindungsstelle wurde im Promotor von Matrilin-1 detektiert (Szabo et al., 1995). Matrilin-1 ist ein Knorpel-spezifisches nicht-kollagenes Protein, welches ausschließlich von spät-proliferativen Chondrozyten synthetisiert wird (Hauser und Paulsson, 1994; Chen et al., 1995). In Kulturen von primären Chondrozyten ist es an der Bildung Kollagen-abhängiger und -unabhängiger filamentöser Netzwerke beteiligt. Matrilin-1 assoziiert an Kollagen II-Fibrillen (Winterbottom et al., 1992). Die nicht von Kollagenen abhängigen Netzwerke sind im perizellulären Kompartiment der Chondrozyten lokalisiert, so dass Matrilin-1 auch in der Matrix von reifen und hypertrophen Chondrozyten lokalisiert ist (Chen et al., 1995). Es stellt daher eine initiale Komponente der ECM dar, bevor die Akkumulation von Kollagen X in die ECM durch Stimulierung der Kollagen X-Expression erfolgt. Dem Protein wird eine Rolle während des *ECM-Turnovers* zugewiesen. Bei Matrilin-1 *Knock-out*-Mäusen wird eine anormale Kollagen II-Fibrillenbildung und Matrixkomposition in der perizellulären Zone der spät-proliferativen und hypertrophen Chondrozyten detektiert, wohingegen die allgemeine Anordnung der Chondrozyten in der Wachstumsfuge normal erscheint und auch die Proteine Aggrekan und Kollagen X die normalen Strukturen ausbilden (Huang et al., 1999). Demnach ist kein regulatorisches Zusammenspiel von Matrilin-1 und Kollagen-X zu erkennen. Die Repression der Kollagen X-Synthese durch NF-I/A-1 in kranialen Chondrozyten kann zu diesem Zeitpunkt nicht durch einen Zusammenhang mit Matrilin-1 erklärt werden.

In Adipozyten wurde gezeigt, dass NF-I die Repression des Glukose-Transporters-4 (GLUT4) durch Insulin vermittelt. Durch die Insulinbehandlung werden NF-I-Faktoren, die nicht näher spezifiziert wurden, phosphoryliert und binden am Insulin-*Response-Element* des GLUT4-Gens, wo sie die Inhibierung der Transkription bewirken (Cooke und Lane, 1999b). Es handelt sich hierbei um eine Insulin vermittelte Repression von Zielgenen, die durch NF-I unterstützt wird. Ein direkter Zusammenhang zwischen von Insulin vermittelten Signaltransduktionswegen und einer dadurch bedingten Aktivierung oder Repression von Zielgenen durch NF-I-Faktoren in Chondrozyten ist nicht bekannt. Eventuell kann die durch Insulin ausgelöste Hypertrophie der kranialen Chondrozyten durch eine Inhibierung von Faktoren erfolgen, die die Hypertrophie negativ kontrollieren. Eine potentielle Rolle von NF-I-Faktoren in diesem Zusammenhang, basierend auf den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen, wäre dann jedoch die Aktivierung von Faktoren, die die Hypertrophie negativ regulieren. Ein Beispiel für eine antagonistische Wirkung von Insulin und NF-I wurde bei der Repression der 5-Aminolävulinat-Synthase (ALAS) detektiert, die bei der Häm-Biosynthese involviert ist. Hier erfolgt die Aktivierung des Gens - neben anderen kooperierenden Transkriptionsfaktoren - durch NF-I, und die Inhibierung durch Insulin, welches die DNA-Bindung von NF-I verhindert (Scassa et al., 2004). Demnach können NF-I-Proteine die Transkription von Zielgenen sowohl aktivieren als auch verhindern, wobei die jeweilige Wirkung zelltyp- und promotorspezifisch ist (Gronostajski, 2000).

Kaudale sternale Chondrozyten können ihre eigene Hypertrophie und die von kranialen Chondrozyten durch Produktion von noch unbekanntem löslichen Faktoren inhibieren (Böhme et al., 1995). Im Laufe dieser Arbeit sind mehrere EST-Klone identifiziert worden, die bei der Repression der Hypertrophie kranialer Chondrozyten eine Rolle spielen könnten. Die Proteine, für die diese Klonsequenzen kodieren, sind noch nicht isoliert und analysiert worden. NF-I/A-1 könnte die Regulation und Genexpression noch unbekannter Faktoren beeinflussen und auf diese Art und Weise die durch Insulin induzierte Hypertrophie indirekt hemmen.

4.2.2.2 Stimulation der Kollagen X-Synthese durch NF-I/A-1

Zur Analyse der Wirkung von NF-I/A-1 auf die Hypertrophie kranialer Chondrozyten, wurden den Faktor überexprimierende und mit leerem Vektor transfizierte Zellen in Agarose-Suspensionen kultiviert, aber nicht durch Insulin/IGF-1 stimuliert. Überraschenderweise synthetisierten auch nicht stimulierte kraniale Chondrozyten Kollagen X, und dessen Synthese wurde durch die Überexpression von NF-I/A-1 verstärkt. Chondrozyten des kranialen Bereiches des Sternums stellen eine inhomogene Population da, die sich aus Zellen unterschiedlicher Reifungsgrade zusammensetzt (Iwamoto et al., 1993). In der mittleren Region des kranialen Bereiches sind die am weitesten differenzierten Chondrozyten lokalisiert, wohingegen sich am Rand dieses Bereiches noch weniger reife Zellen befinden. *In vitro* beginnen die mittleren differenzierten Chondrozyten auch ohne zusätzliche Stimulierung spontan mit der Kollagen X-Synthese (D'Angelo und Pacifici, 1997). Die Hypertrophie von Chondrozyten aus dem gesamten kranialen Bereich bleibt ohne Zusatz stimulierender Faktoren jedoch normalerweise aus. In Abwesenheit von exogenen Wachstumsfaktoren vollzieht lediglich eine kleine Zahl der heterogenen Chondrozytenpopulation des kranialen Teils den Wechsel von spät-proliferierenden zu prähypertrophen Zellen, was durch die Expression von Ihh und Osteopontin, aber nicht von Kollagen X gezeigt wurde (Möllers, 1999). Eventuell hemmen die weniger reifen kranialen Zellen die Hypertrophie differenzierterer Zellen, vergleichbar zu Kokulturen kaudaler und kranialer Chondrozyten. Es wäre möglich, dass die Transfektion der Chondrozyten zu einer Zellselektion geführt hat, indem die Vitalität der schon weiter differenzierten Zellen durch diese Behandlung nicht beeinflusst wurde, wohingegen die weniger reifen Chondrozyten nicht überlebten. Demnach konnte die so verbliebene Zellpopulation die Blockade der Hypertrophie spontan überwinden und Kollagen X auch ohne zusätzliche Stimulation synthetisieren.

Die Synthese von Kollagen X der nicht stimulierten Chondrozyten könnte möglicherweise auch durch die vorherige Inkubation der in Monolayer kultivierten Zellen mit FKS hervorgerufen worden sein. Eventuell wurde die Hypertrophie durch die Wirkung von Thyroxin oder anderen Bestandteilen des Serums ausgelöst, und dieser Stimulus war ausreichend dafür, dass Kollagen X auch während der anschließenden serumfreien Agarose-Suspensionskultur weiter produziert wurde. Bei einem Vergleich der stimulierenden Effekte von Thyroxin, Insulin oder IGF-I auf die Hypertrophie von Chondrozyten wird deutlich, dass Thyroxin ein stärkerer Hypertrophie-fördernder Faktor zu sein scheint, als Insulin oder IGF-I

(Böhme, 1993; Bittner, 1997; Möllers, 1999; Babarina, 2001). Bei kranialen Chondrozyten führt es zur stärkeren Kollagen X-Synthese im Vergleich zu Insulin/IGF-I. Bei kaudalen Chondrozyten ist Thyroxin der einzige Faktor, der in Kokultur mit Endothelzellen oder durch gleichzeitige Behandlung der Zellen mit Proteasen (Chymotrypsin, Papain, Plasmin) zur Hypertrophie der Chondrozyten führt (Bittner, 1997; Babarina, 2001). Kürzlich wurde gezeigt, dass Thyroxin die Expression von Sox9, einem die Hypertrophie unterdrückenden Transkriptionsfaktor, vermindert und unter anderem dadurch die Hypertrophie beschleunigt (Okubo und Reddi, 2003).

Eine eventuell durch Thyroxin hervorgerufene Hypertrophie der Zellen wurde nicht nur durch NF-I/A-1 nicht gehemmt, sondern durch diesen Faktor sogar verstärkt. Kraniale Chondrozyten die nicht mit Insulin kultiviert worden waren, aber den Faktor NF-I/A-1 überexprimierten, zeigten eine gesteigerte Kollagen X-Synthese im Vergleich zu den Zellen, die nur mit dem leeren Vektor transfiziert worden waren. Demnach besitzt NF-I/A-1 in Chondrozyten nicht nur eine reprimierende, sondern ebenfalls eine aktivierende Wirkung. Folglich muss zwischen der durch Insulin hervorgerufenen Hypertrophie und der durch Thyroxin/FKS induzierten Hypertrophie von kranialen Chondrozyten ein Unterschied bestehen. Diese These wird dadurch unterstützt, dass nur Thyroxin in Kokultur mit Endothelzellen die Kollagen X-Synthese von kaudalen Chondrozyten bewirkt (Bittner, 1997). Mit Insulin wird in diesem Kultursystem nur selten eine Hypertrophie der kaudalen Zellen beobachtet, wobei die Kollagen X-Synthese immer geringer ausfiel als mit Thyroxin.

Durch die Insulinstimulierung müssen vermittelnde Faktoren aktiviert werden, die zur Hypertrophie führen und durch NF-I/A-1 negativ beeinflussbar sind. Bei der spontanen oder durch Thyroxin induzierten Hypertrophie wird die Aktivierung anderer Faktoren zur Kollagen X-Synthese der Chondrozyten führen, die durch NF-I/A-1 weiter verstärkt werden könnte. Bis dato konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen durch Thyroxin aktivierten Signaltransduktionswegen bzw. Zielgenen und den Faktoren der NF-I-Familie in Chondrozyten gezeigt werden.

Wenn die Induktion der Hypertrophie durch Thyroxin und Insulin auf unterschiedliche Art und Weise verläuft, so sind Faktoren, die durch Thyroxin und NF-I/A-1 stimuliert werden, durch Insulin nicht beeinflussbar. Durch die Analyse der Transkriptionsregulation der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) in der Leber wurde gezeigt, dass Proteine der NF-I-Familie Bindungsstellen in dem PEPCK-Promotor besitzen. Die basale Transkription

der PEPCK wird durch NF-I/A und -I/B stimuliert, wohingegen NF-I/C und -I/X inhibitorische Effekte vermitteln (Crawford et al., 1998). Durch die Überexpression von NF-I/A wird eine verstärkte PEPCK-Expression erreicht, ebenso wie durch eine Stimulierung mit Thyroxin. Wurden NF-I/A überexprimierende Leberzellen zusätzlich mit Thyroxin behandelt, so zeigte sich ein additiver Anstieg der PEPCK-Expression (Leahy et al., 1999). Obwohl Insulin eine hemmende Wirkung auf die PEPCK ausübt, sind die NF-I-Bindungsstellen im Promotor in Anwesenheit von Insulin besetzt, und es erfolgt eine basale Transkription, so dass der Insulin-Effekt in diesem Beispiel nicht bzw. nicht nur durch NF-I-Proteine vermittelt wird.

Weiterhin wäre es denkbar, dass durch Insulin ein bislang unbekannter Faktor stimuliert wird, der die Hypertrophie der kranialen Zellen vermittelt, aber durch NF-I/A-1 gehemmt werden kann. Wenn nun durch Thyroxin-Behandlung die Hypertrophie ausgelöst wird, so kann diese nicht durch NF-I/A-1 inhibiert werden. Es müssen dabei sogar Faktoren involviert sein, die durch NF-I/A-1 stimuliert werden.

NF-I-Proteine vermitteln unter anderem ihre Effekte, indem eine differentielle Expression der verschiedenen NF-I-Gene (NF-I/A, -I/B, -I/C und -I/X) als Antwort auf unterschiedliche Stimuli erfolgt (Leahy et al., 1999). Neben Homodimeren, bilden die Genprodukte der vier NF-I-Gene untereinander ebenfalls Heterodimere aus und können dadurch auf vielfältige Art und Weise die Transkription vieler verschiedener Gene positiv und negativ regulieren (Goyal et al., 1990; Kruse und Sippel, 1994; Gronostajski, 2000). Es wäre möglich, dass durch die Stimulation der kranialen Chondrozyten mit Insulin die Expression von NF-I/B, -I/C und -I/X so reguliert wird, dass einige dieser Faktoren mit NF-I/A-1 Heterodimere bilden und somit Hypertrophie-hemmende Faktoren stimulieren bzw. Hypertrophie-fördernde Faktoren inhibieren. Bei einer fehlenden Insulinstimulierung oder unter Einwirkung von Thyroxin würden anders zusammengesetzte Heterodimere die Hypertrophie der kranialen Chondrozyten stimulieren.

In den Kulturmedien aller Ansätze konnte keine Aktivität der ALP nachgewiesen werden, obwohl die Synthese von Kollagen X stattfand. Normalerweise treten diese beiden Hypertrophiemarker in Kulturen sternaler Chondrozyten gleichzeitig auf. Ähnliches wurde bei der Kultivierung humaner kostaler Chondrozyten beobachtet, die ebenfalls Kollagen X, aber keine ALP synthetisieren (Bahrami et al., 2001). Die ALP-Synthese beginnt bei kostalen

Chondrozyten erst beim Erreichen der Geschlechtsreife des Organismus, gefolgt von einer langsamen Ossifikation des Knorpels. Es wurde daraus geschlossen, dass voneinander unabhängige Mechanismen die Kontrolle der Kollagen X- und ALP-Expression beeinflussen, was durch das Ergebnis dieser Arbeit unterstützt wird.

4.3 Regulation der Chondrozytendifferenzierung durch verschiedene Transkriptionsfaktoren

Die Chondrozytendifferenzierung wird durch eine Vielzahl von positiven und negativen Faktoren reguliert, wie z.B. durch BMP, TGF- β , FGF, Ihh, Wnts und PTHrP. Auf der Ebene der Transkriptionsregulation sind positive Transkriptionsfaktoren wie Sox9, Sox5, Sox6 und Runx2/Cbfa1 kritisch für die Induktion der Chondrozytendifferenzierung (de Crombrughe et al., 2001; Lefebvre et al., 2001; Stricker et al., 2002). Negative Faktoren wie z.B. die Retinoinsäure-Rezeptoren spielen ebenfalls eine Rolle, indem sie die Chondrozytendifferenzierung verzögern (Underhill et al., 2001; De Luca et al., 2000). Ein perfides Zusammenspiel zwischen den positiven und negativen Regulatoren ist für die Direktion und den Verlauf der Chondrogenese notwendig.

Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors Runx2 wurde im Zusammenhang mit der Analyse der Funktion von NF- κ B-1 in dieser Arbeit diskutiert. Hier soll nur nochmals erwähnt werden, dass eine Runx2-Überexpression sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Hypertrophie von Chondrozyten induziert (Enomoto et al., 2000; Takeda et al., 2001) und dieser Faktor somit als positiver Regulator der Chondrozytenspätdifferenzierung gilt. Runx2 wurde in prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten detektiert, wo es als Kofaktor für die BMP-aktivierten Smad1 und -5 fungiert (Leboy et al., 2001), die Mitglieder einer weiteren während der Chondrozytenreifung involvierten Gruppe von Transkriptionsfaktoren darstellen. Die derzeit bekannten acht Smad-Proteine werden aufgrund ihrer Funktion in drei Gruppen eingeteilt: Die Rezeptor-regulierten Smads (R-Smads), die ko-aktivierenden Smads (Co-Smad) und die inhibitorischen Smads (I-Smads). Die R-Smads werden durch den Typ I Serin/Threonin-Kinase-Rezeptor, welcher durch die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie aktiviert wird (Massague, 1998), phosphoryliert. Die Smads 2 und -3 sind im TGF- β /Aktivin-Signaltransduktionsweg involviert (Nakao et al., 1997; Whitman, 1998) und es konnte gezeigt

werden, dass ein Smad 3 vermittelter TGF- β -Signalweg artikuläre Chondrozyten im „Ruhezustand“ hält, in dem die Chondrozytendifferenzierung gehemmt wird (Yang et al., 2001). Dahingegen spielen die Smads 1, -5 und -8 bei der BMP-vermittelten Chondrozytenreifung eine Rolle. Überexpression dieser Smad-Proteine in Gegenwart des Co-Smads 4 in Mäusechondrozyten induzieren die Hypertrophie dieser Zellen (Valcourt et al., 2002). Weiterhin steigert eine erhöhte Synthese von Smad 1 oder -5 in prähypertrophen Hühnerchondrozyten die BMP-stimulierte Aktivität des Kollagen X-Promotors (Leboy et al., 2001). Sowohl eine Smad- als auch die Runx2-Bindungsstelle im Kollagen X-Promotor sind hierfür notwendig (Li et al., 2003; Drissi et al., 2003). Die verschiedenen phosphorylierten R-Smads bilden mit Smad 4, dem alleinigen Co-Smad, einen heteromeren Komplex, welcher im Zellkern direkt oder indirekt die Transkription der Zielgene reguliert (Whitman, 1998). Smad 4 wird in allen Zonen der Wachstumsfuge exprimiert, und Überexpressionen dieses Faktors zeigen keine Wirkungen auf die Aktivität des Kollagen X-Promotors, was bedeutet, dass dieser Kofaktor keine limitierende Rolle während der Differenzierung spielt (Leboy et al., 2001). Die I-Smads 6 und -7 unterscheiden sich auf struktureller Ebene von den anderen Smads und stellen deren Antagonisten dar (ten Dijke et al., 2000), indem sie die Phosphorylierung der R-Smads verhindern. In der chondrogenen Zelllinie ATDC5 können Smad 6 und -7 die Chondrogenese inhibieren (Fujii et al., 1999).

Smad- und NF- κ B-Transkriptionsfaktoren zeigen beide denselben generellen molekularen Strukturaufbau, welcher als Domäne 1-*linker*-Domäne 2-Struktur bezeichnet wird, wobei die Domäne 1 bei beiden Faktoren als DNA-Bindungsdomäne fungiert und hoch konserviert ist. Kürzlich wurde durch eine Homologie-Suche mit der BLAST-Datenbank und durch AS-Sequenzvergleich gezeigt, dass zwischen den DNA-Bindungsdomänen der Smads und der NF- κ B-Faktoren signifikante strukturelle Ähnlichkeiten vorhanden sind (Stefancsik und Sarkar, 2003). In beiden AS-Sequenzen der DNA-Bindungsdomänen dieser Faktoren waren große Ähnlichkeiten und Kolinearitäten vorhanden. Im Gegensatz dazu wiesen die C-terminalen Transkriptionsdomänen beider Proteinfamilien keinerlei Ähnlichkeiten auf. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte die DNA-Bindung der Mitglieder dieser Proteinfamilien durch ähnliche dreidimensionale Strukturen vermittelt werden. Es wurde postuliert, dass Smads und NF- κ B-Faktoren einer gemeinsamen Superfamilie von Transkriptionsfaktoren angehören (Stefancsik und Sarkar, 2003). Es bleibt zu analysieren, ob eventuell durch die Kenntnis der gemeinsamen Struktur der DNA-Bindungsdomänen mögliche und ähnliche Funktionen beider Gruppen von Transkriptionsfaktoren abgeleitet werden können.

Vor kurzer Zeit wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor AP-2 α ebenfalls bei der Chondrozytendifferenzierung involviert ist und diese negativ reguliert (Huang et al., 2004). AP-2 wurde ursprünglich als ein Transkriptions-Aktivator für den SV40-Promotor entdeckt (Mitchell et al., 1987). Durch AP-2 α werden verschiedene zelluläre Prozesse, wie die Proliferation, die Differenzierung als auch die Apoptose moduliert (Hilger-Eversheim et al., 2000). AP-2 α *Knock-out*-Mäuse zeigen, neben anderen Defekten, Skelettanomalitäten und dadurch verursachte verkürzte Gliedmaßen (Schorle et al., 1996; Zhang et al., 1996). Weiterhin wurde AP-2 α in der Wachstumsfuge und im artikulären Knorpel lokalisiert (Davies et al., 2002). In hohen Konzentrationen inhibiert AP-2 α die Transkription von CD-RAP (*cartilage-derived retinoic acid responsive protein*). Es kann aber in niedrigen Dosen den Promotor dieses Gens auch stimulieren (Xie et al., 1998). Durch Überexpression von AP-2 α wird die Knorpelbildung, die Proteoglykansynthese und die Expression von knorpelspezifischen Markergenen (Kollagen II und X, Aggrekan) unterdrückt, indem selektiv die Expression von Sox5 und -6 inhibiert, die Expression von Sox9 hingegen nicht verändert wird (Huang et al., 2004). Sox-Proteine gehören zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die unter anderem die Skelettogenese beeinflussen (Pevny und Lovell-Badge, 1997). Vier Mitglieder dieser Familie, Sox9, -8, -6 und L-Sox5 sind bei der Chondrogenese und enchondralen Ossifikation involviert (Wright et al., 1995; Bell et al., 2000; Schepers et al., 2000; Sock et al., 2001). Sox9 ist für die prächondrogene Zellkondensation, für die Chondrozytendifferenzierung und für die Aktivierung von Sox5, Sox6 und von Knorpelmatrixproteinen verantwortlich. Weiterhin regulieren Sox9, L-Sox5 und Sox6 in Kooperation die Expression der Kollagen II- und Aggrekan-Gene (Lefebvre et al., 1998; Ng et al., 1997; Sekiya et al., 2000; de Crombrughe et al., 2000). Die Reduktion der Sox5 und -6 Expression durch eine Überexpression von AP-2 α führt demnach direkt zur Inhibierung der Kollagen II- und Aggrekan-Synthese (de Crombrughe et al., 2000). Die weiterhin hohe Expression von Sox9 blockiert wahrscheinlich den Übergang der Chondrozyten von einem frühen zu einem späteren Differenzierungsstadium und bewirkt dadurch indirekt die reduzierte Synthese des Hypertrophiemarkers Kollagen X. Demnach wurde mit AP-2 α ein weiterer die Hypertrophie von Chondrozyten negativ beeinflussender Transkriptionsfaktor identifiziert, der unter anderem in Kooperation mit den Sox-Proteinen die Chondrozytendifferenzierung kontrolliert. Mit dem in dieser Arbeit analysierten Nuklear Faktor NF- κ B-1 wurde ein weiterer Hypertrophie-hemmender Transkriptionsfaktor charakterisiert, sofern die Hypertrophie durch Insulin/IGF-I hervorgerufen wurde. Eine

eventuelle Kooperation mit anderen, die Chondrogenese beeinflussenden Transkriptionsfaktoren, insbesondere der Sox-Familie, bleibt zu analysieren.

Einen weiteren ubiquitär verbreiteten Transkriptionsfaktor, der ebenfalls in Chondrozyten exprimiert wird und für die normale Chondrozytendifferenzierung notwendig ist, stellt c-Maf dar (Sakai et al., 1997; MacLean et al., 2003). In c-Maf *Knock-out*-Mäusen ist die Länge der embryonalen Knochen um 10 % reduziert und die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten ist negativ beeinflusst. Anfänglich erscheint die terminale Differenzierung der Chondrozyten verzögert, es folgt jedoch in der weiteren embryonalen Entwicklung eine Expansion der hypertrophen Zone in der Wachstumsfuge. Vor der vaskulären Invasion wird der Zeitpunkt der Spätdifferenzierung durch c-Maf moduliert, wohingegen das Vorhandensein bzw. die Apoptose der hypertrophen Chondrozyten demnach ebenfalls beeinflusst wird. Lc-Maf, eine verlängerte Spleißvariante von c-Maf, interagiert direkt mit Sox9 und die Koexpression von Sox9 und Lc-Maf verursacht die synergistische Aktivierung des Targetgens Kollagen II (Huang et al., 2002).

Auch dem Transkriptionsfaktor NFκappa-B wird unter anderem eine Rolle bei der Chondrozytendifferenzierung zugewiesen (Sitcheran et al., 2003) und er inhibiert ebenfalls die Sox9-Expression (Murakami et al., 2000). Allerdings wurden bei Analysen des Sox9-Promotors keine NFκappa-B Bindungsstellen detektiert, so dass die Regulation der Sox9-Expression durch diesen Transkriptionsfaktor auf anderen posttranslationellen Signalwegen erfolgen muss oder aber indirekt erfolgt (Sitcheran et al., 2003).

Durch die Identifizierung von NF-I/A-1 als ein in kaudalen Chondrozyten hochregulierter Transkriptionsfaktor und der funktionellen Analyse desselbigen in Kulturen von embryonalen Hühnerchondrozyten konnte demnach ein weiterer Transkriptionsfaktor, der während der Chondrozytendifferenzierung eine Rolle spielt, identifiziert werden. Es wurde gezeigt, dass der Faktor hierbei die durch Insulin/IGF-I induzierte Hypertrophie reprimiert, wohingegen er ebenfalls unter anderen Bedingungen eine stimulierende Wirkung auf die Kollagen X-Expression ausüben kann. NF-I/A-1 stellt einen promotor- und zellspezifischen Regulator dar, welcher die Differenzierung verschiedener Zellpopulationen und auch die Expression seiner Targetgene sowohl negativ als auch positiv reguliert. Chondrozytenspezifische Targetgene, die durch NF-I/A-1 moduliert werden, bzw. Interaktionen mit den bekannten während der Chondrozytendifferenzierung eine Rolle spielenden Transkriptionsfaktoren müssen in weiterführenden Untersuchungen analysiert werden.

4.4 Ausblick

In dieser Arbeit wurde zur Analyse der differentiellen Genexpression von kaudalen und kranialen sternalen Hühnerchondrozyten die Methode der SSH durchgeführt. Es wurden 53 Sequenzen identifiziert, die in kaudalen Chondrozyten hochreguliert sind. Von sechs Klonen wurde die Hochregulation in den kaudalen Zellen durch *Virtual Northern Blots* bzw. *Northern Blots* kontrolliert. Die Überprüfung der verbliebenen 47 Klone sollte in zukünftigen Arbeiten erfolgen, zumal darunter einige EST-Sequenzen vorhanden sind, die für noch unbekannte Genprodukte kodieren. Somit könnte nach Isolierung der Volllänge-Sequenzen und einer folgenden Überexpression analysiert werden, ob und in welcher Art und Weise diese neuen Faktoren die negative Regulation der Chondrozytenspätdifferenzierung beeinflussen. In diesem Zusammenhang sind jene 13 Klone, die nach der vollständigen Sequenzierung des Huhngenoms bei der Datenbankanalyse hohe Homologien zu einem EST-Klon zeigten, von besonderem Interesse.

Weiterhin muss die Wirkung des Lysosomen-assoziierten Glykoproteins LAMP-2c auf die Hypertrophie der Chondrozyten näher analysiert werden, da seine Hochregulation in kaudalen Zellen indiziert, aber nicht weiter untersucht werden konnte. LAMP-2c-Konstrukte könnten mit der etablierten Elektroporationsmethode in Chondrozyten transfiziert werden, so dass das Protein in den Zellen überexprimiert wird. Hierfür sollte allerdings auch die Transfektion mit einem GFP-Vektor getestet werden, da mit einem derartigen Plasmid höhere Transfektionseffizienzen erzielt wurden (3.2.4). Eine anschließende Analyse der Kollagen X-Synthese in serumfreier Agarose-Suspensionskultur würde über die Wirkung der Überexpression Aufschluss geben.

Allgemein kann die Wirkung sowohl neu identifizierter Faktoren als auch von LAMP-2c auf die Hypertrophie der Chondrozyten auch mit Hilfe der RNA-Interferenz-Methode untersucht werden. Publikationen anderer Gruppen zeigen, dass sich für diese Art von Experimenten die in dieser Arbeit verwendete Elektroporationsmethode gut eignet. Eventuell würden durch das Ausschalten der Faktoren die kaudalen Chondrozyten spontan hypertrophieren und somit die negative Blockade überwinden.

Weiterhin muss der Transkriptionsfaktor NF-I/A-1 und seine Hypertrophie-hemmende Wirkung auf Insulin-stimulierte Chondrozyten näher charakterisiert werden. *In situ*-Analysen am embryonalen Hühnersternum können zur Bestätigung der erhöhten Expression des Faktors in kaudalen Chondrozyten durchgeführt werden. *In situ* Untersuchungen an der Wachstumsfuge - auch anderer Spezies - würden Aufschluss über die Lokalisation von NF-I/A-1 geben. Faktoren, die im gleichen Bereich wirken oder exprimiert werden, könnten an einer gemeinsamen Kontrolle der Chondrozytenreifung beteiligt sein. Durch quantitative PCR-Analysen kann die Wirkung von NF-I/A-1 auf andere regulative Faktoren der Spätdifferenzierung geprüft werden. Daran anschließen können sich direkte Promotoranalysen von involvierten Faktoren zur Identifizierung von NF-I/A-1 DNA-Bindungsstellen. Auch eine mögliche direkte Bindung von NF-I/A-1 an den Kollagen X-Promotor kann mit Hilfe von Gel-Shift-Assays überprüft werden.

Neben NF-I/A-1 wurde ebenfalls die Isoform NF-I/A-3 in kaudalen und kranialen Chondrozyten detektiert. Ob diese Spleißvariante die Hypertrophie der Zellen beeinflusst, bleibt zu analysieren.

5. Zusammenfassung

Die Spätdifferenzierung von Chondrozyten stellt einen präzise regulierten Prozess dar, der durch autokrine oder parakrine Faktoren, intrazelluläre Komponenten der Signaltransduktion, durch die Zusammensetzung der ECM und durch eine spezifische Transkriptionsregulation kontrolliert wird. In den kaudalen und kranialen Bereichen des embryonalen Hühnersternums sind verschiedene Populationen differenzierter Chondrozyten vorhanden, die sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Befähigung zur Hypertrophie besonders gut zur Analyse der Regulation der enchondralen Ossifikation eignen.

In serumfreien Agarose-Suspensionskulturen hemmen kaudale Chondrozyten ihre eigene Hypertrophie sowie diejenige der kranialen Zellen, wenn diese durch IGF-I oder Insulin hervorgerufen wurde. An diesem negativen Kontrollmechanismus können lösliche Faktoren, deren Zellrezeptoren und/oder intrazelluläre Signalvermittler, sowie Transkriptionsfaktoren beteiligt sein, die entsprechend in kaudalen Chondrozyten verstärkt exprimiert werden. Zur Analyse der Blockade der Hypertrophie durch kaudale Zellen wurde eine subtraktive cDNA-Bank erfolgreich erstellt, die in kaudalen Zellen hochregulierte Gene repräsentiert. Es wurden insgesamt 53 Nukleotidsequenzen identifiziert, deren Genprodukte in diesem Prozess eine Rolle spielen könnten. 13 dieser Klone zeigten Homologien zum Transkriptionsfaktor NF-I/A und seinen Isoformen aus Mensch, Maus und Ratte, so dass die Wirkung dieses Faktors auf die Hypertrophie der Chondrozyten untersucht wurde. Sowohl in kranialen als auch in kaudalen Chondrozyten wurde das Vorkommen der Isoformen NF-I/A-1 und -3 nachgewiesen, und es konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor NF-I/A-1 in kaudalen Chondrozyten stärker exprimiert wird als in den kranialen Zellen. Durch Etablierung einer Elektroporationsmethode für primäre Hühnerchondrozyten wurde NF-I/A-1 in kranialen Zellen überexprimiert. Dadurch wurde in serumfreien Agarose-Suspensionskulturen die Hypertrophie dieser Zellen unterdrückt, wenn sie durch Insulin oder IGF-I induziert worden war. Eventuell ist dieser Effekt durch die Inhibierung des Runx2-Promotors erklärbar. In nicht Osteoblasten ähnlichen Zellen wird die Transkription des Runx2-Gens durch NF-I/A negativ reguliert. Bei kranialen Chondrozyten, die nicht stimuliert wurden, aber dennoch hypertrophierten, zeigte sich der gegenteilige Effekt: NF-I/A-1 bewirkte eine Verstärkung der Kollagen X-Synthese. Die hier beobachtete Hypertrophie der Zellen wird möglicherweise durch eine vorhergegangene Inkubation der Zellen mit Serum in Monolayerkulturen verursacht. Da Transkriptionsfaktoren der NF-I-Familie promotorspezifische Wirkungen

besitzen, die sowohl aktivierend als auch inhibierend sein können, muss die Hypertrophiehemmende Wirkung des NF-I/A-1 direkt mit der durch Insulin vermittelten Signalkaskade gekoppelt sein.

Weiterhin wurden durch die Datenbankanalyse der Klonsequenzen der subtraktiven Bibliothek sechs verschiedene, Huhn-spezifische EST-Sequenzen sowie 25 nicht näher klassifizierte Gene identifiziert. Sie kodieren für noch unbekannte Proteine, die bei der Blockierung der Hypertrophie kranialer Chondrozyten durch die kaudalen Zellen eine Rolle spielen könnten und weiter analysiert werden müssen.

6. Literatur

1. Abad,V., Meyers,J.L., Weise,M., Gafni,R.I., Barnes,K.M., Nilsson,O., Bacher,J.D., und Baron,J. (2002). The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology* *143*, 1851-1857.
2. Adams,J.C. und Watt,F.M. (1993). Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* *117*, 1183-1198.
3. Adams,S.L., Pallante,K.M., Niu,Z., Cohen,A.J., Lu,J., und Leboy,P.S. (2003). Stimulation of type-X collagen gene transcription by retinoids occurs in part through the BMP signaling pathway. *J. Bone Joint Surg. Am.* *85-A Suppl 3*, 29-33.
4. Aigner,T., Hambach,L., Soder,S., Schlotzer-Schrehardt,U., und Poschl,E. (2002). The C5 domain of Col6A3 is cleaved off from the Col6 fibrils immediately after secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *290*, 743-748.
5. Aigner,T., Loos,S., Müller,S., Sandell,L.J., Perris,R., Unni,K.K., und Kirchner,T. (2000). Cell differentiation and matrix gene expression in mesenchymal chondrosarcomas. *Am. J. Pathol.* *156*, 1335.
6. Akiyama,H., Chaboissier,M.C., Martin,J.F., Schedl,A., und de Crombrughe,B. (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* *16*, 2813-2828.
7. Alevizopoulos,A., Dusserre,Y., Tsai-Pflugfelder,M., von der,W.T., Wahli,W., und Mermod,N. (1995). A proline-rich TGF-beta-responsive transcriptional activator interacts with histone H3. *Genes Dev.* *9*, 3051-3066.
8. Alini,M., Kofsky,Y., Wu,W., Pidoux,I., und Poole,A.R. (1996). In serum-free culture thyroid hormones can induce full expression of chondrocyte hypertrophy leading to matrix calcification. *J. Bone Miner. Res.* *11*, 105-113.
9. Allain,T.J. und McGregor,A.M. (1993). Thyroid hormones and bone. *J. Endocrinol.* *139*, 9-18.
10. Altschul,S.F., Gish,W., Miller,W., Myers,E.W., und Lipman,D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* *215*, 403-410.
11. Alvarez,J., Balbin,M., Santos,F., Fernandez,M., Ferrando,S., und Lopez,J.M. (2000). Different bone growth rates are associated with changes in the expression pattern of types II and X collagens and collagenase 3 in proximal growth plates of the rat tibia. *J. Bone Miner. Res.* *15*, 82-94.
12. Alvarez,J., Sohn,P., Zeng,X., Doetschman,T., Robbins,D.J., und Serra,R. (2002). TGFbeta2 mediates the effects of hedgehog on hypertrophic differentiation and PTHrP expression. *Development* *129*, 1913-1924.
13. Amano,M., Fukata,Y., und Kaibuchi,K. (2000). Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp. Cell Res.* *261*, 44-51.
14. Amizuka,N., Warshawsky,H., Henderson,J.E., Goltzman,D., und Karaplis,A.C. (1994). Parathyroid hormone-related peptide-depleted mice show abnormal epiphyseal cartilage development and altered endochondral bone formation. *J. Cell Biol.* *126*, 1611-1623.
15. Anderson,H.C. (2003). Matrix vesicles and calcification. *Curr. Rheumatol. Rep.* *5*, 222-226.
16. Annunen,S., Paassilta,P., Lohiniva,J., Perala,M., Pihlajamaa,T., Karppinen,J., Tervonen,O., Kroger,H., Lahde,S., Vanharanta,H., Ryhanen,L., Goring,H.H., Ott,J., Prockop,D.J., und Ala-Kokko,L. (1999). An allele of COL9A2 associated with intervertebral disc disease. *Science* *285*, 409-412.

17. Apt,D., Liu,Y., und Bernard,H.U. (1994). Cloning and functional analysis of spliced isoforms of human nuclear factor I-X: interference with transcriptional activation by NFI/CTF in a cell-type specific manner. *Nucleic Acids Res.* *22*, 3825-3833.
18. Aszodi,A., Hunziker,E.B., Brakebusch,C., und Fassler,R. (2003). Beta1 integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis. *Genes Dev.* *17*, 2465-2479.
19. Audhya,T.K., Segen,B.J., und Gibson,K.D. (1976). Stimulation of proteoglycan synthesis in chick embryo sternum by serum and L-3,5,3'-triiodothyronine. *J. Biol. Chem.* *251*, 3763-3767.
20. Aumailley,M. und Gayraud,B. (1998). Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J. Mol. Med.* *76*, 253-265.
21. Ausubel,F.M., Brent,R., Kingston,R.Z., Moore,D.D., Seidman,J.G., Smith,J.A., und Struhl,K. (1990). *Current protocols in molecular biology*. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.
22. Babarina, A. V. Parakrine und autokrine Signale in der Regulation der Chondrozytenspätendifferenzierung in vitro. 2001. Dissertation Westfälische Wilhelms-Universität.
23. Babarina,A.V., Mollers,U., Bittner,K., Vischer,P., und Bruckner,P. (2001). Role of the subchondral vascular system in endochondral ossification: endothelial cell-derived proteinases derepress late cartilage differentiation in vitro. *Matrix Biol.* *20*, 205-213.
24. Bachurski,C.J., Kelly,S.E., Glasser,S.W., und Currier,T.A. (1997). Nuclear factor I family members regulate the transcription of surfactant protein-C. *J. Biol. Chem.* *272*, 32759-32766.
25. Bahrami,S., Plate,U., Dreier,R., DuChesne,A., Willital,G.H., und Bruckner,P. (2001). Endochondral ossification of costal cartilage is arrested after chondrocytes have reached hypertrophic stage of late differentiation. *Matrix Biol.* *19*, 715.
26. Ballock,R.T. und Reddi,A.H. (1994). Thyroxine is the serum factor that regulates morphogenesis of columnar cartilage from isolated chondrocytes in chemically defined medium. *J. Cell Biol.* *126*, 1311-1318.
27. Bas,A., Forsber,G., Hammarstrom,S., und Hammarstrom,M.L. (2004). Utility of the Housekeeping Genes 18S rRNA, beta-actin and GAPDH for Normalization in Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Human T Lymphocytes. *Scand J Immunol.* *59*, 566-573.
28. Bateman,J.F., Lamande,S.R., und Ramshaw,J.A.M. (1996). Collagen superfamily, In: *Extracellular Matrix.*, W.D.Camper, ed. (Melbourne: Harwod Academic Press), pp. 22-67.
29. Bates,G.P., Schor,S.L., und Grant,M.E. (1987). A comparison of the effects of different substrata on chondrocyte morphology and the synthesis of collagen types IX and X. *In Vitro Cell Dev. Biol.* *23*, 374-380.
30. Bedford,F.K., Julius,D., und Ingraham,H.A. (1998). Neuronal expression of the 5HT3 serotonin receptor gene requires nuclear factor I complexes. *J. Neurosci.* *18*, 6186-6194.
31. Behonick,D.J. und Werb,Z. (2003). A bit of give and take: the relationship between the extracellular matrix and the developing chondrocyte. *Mech. Dev.* *120*, 1327-1336.
32. Behrens,J., von Kries,J.P., Kuhl,M., Bruhn,L., Wedlich,D., Grosschedl,R., und Birchmeier,W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* *382*, 638-642.
33. Beier,F., Vornehm,S., Poschl,E., von der,M.K., und Lammi,M.J. (1997). Localization of silencer and enhancer elements in the human type X collagen gene. *J. Cell Biochem.* *66*, 210-218.
34. Bell,K.M., Western,P.S., und Sinclair,A.H. (2000). SOX8 expression during chick embryogenesis. *Mech. Dev.* *94*, 257-260.

35. Bellus,G.A., McIntosh,I., Smith,E.A., Aylsworth,A.S., Kaitila,I., Horton,W.A., Greenhaw,G.A., Hecht,J.T., und Francomano,C.A. (1995). A recurrent mutation in the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor 3 causes hypochondroplasia. *Nat. Genet.* *10*, 357-359.
36. Benya,P.D. und Shaffer,J.D. (1982). Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* *30*, 215-224.
37. Bessey,A.O., O.H.Lowry, und M.J.Brock (1946). A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* *164*, 321-329.
38. Bi,W., Deng,J.M., Zhang,Z., Behringer,R.R., und de Crombrughe,B. (1999). Sox9 is required for cartilage formation. *Nat. Genet.* *22*, 85-89.
39. Bi,W., Huang,W., Whitworth,D.J., Deng,J.M., Zhang,Z., Behringer,R.R., und de Crombrughe,B. (2001). Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *98*, 6698-6703.
40. Binette,F., McQuaid,D.P., Haudenschild,D.R., Yaeger,P.C., McPherson,J.M., und Tubo,R. (1998). Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro. *J. Orthop. Res.* *16*, 207-216.
41. Birnboim,H.C. und Doly,J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* *7*, 1513-1523.
42. Bishop,P.N., Crossman,M.V., McLeod,D., und Ayad,S. (1994). Extraction and characterization of the tissue forms of collagen II and IX from bovine vitreous. *Biochem. J.* *299*, 497-505.
43. Bitgood,M.J. und McMahon,A.P. (1995). Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev. Biol.* *172*, 126-138.
44. Bittner, K. Untersuchungen zur parakrinen Interaktionen zwischen Endothelzellen und Chondrozyten bei der Chondrozytendifferenzierung in vitro. 1997. Dissertation Universität Witten/Herdecke.
45. Blaschke,U.K., Eikenberry,E.F., Hulmes,D.J., Galla,H.J., und Bruckner,P. (2000). Collagen XI nucleates self-assembly and limits lateral growth of cartilage fibrils. *J. Biol. Chem.* *275*, 10370-10378.
46. Böhme, K. Regulation der Differenzierung von Chondrozyten in vitro. 1993. Dissertation Eidgenössische Technische Hochschule Zürich.
47. Böhme,K., Conscience-Egli,M., Tschan,T., Winterhalter,K.H., und Bruckner,P. (1992). Induction of proliferation or hypertrophy of chondrocytes in serum-free culture: the role of insulin-like growth factor-I, insulin, or thyroxine. *J. Cell Biol.* *116*, 1035-1042.
48. Böhme,K., Winterhalter,K.H., und Bruckner,P. (1995). Terminal differentiation of chondrocytes in culture is a spontaneous process and is arrested by transforming growth factor-beta 2 and basic fibroblast growth factor in synergy. *Exp. Cell Res.* *216*, 191-198.
49. Bonnemann,C.G., Cox,G.F., Shapiro,F., Wu,J.J., Feener,C.A., Thompson,T.G., Anthony,D.C., Eyre,D.R., Darras,B.T., und Kunkel,L.M. (2000). A mutation in the alpha 3 chain of type IX collagen causes autosomal dominant multiple epiphyseal dysplasia with mild myopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 1212-1217.
50. Bord,S., Horner,A., Hembry,R.M., und Compston,J.E. (1998). Stromelysin-1 (MMP-3) and stromelysin-2 (MMP-10) expression in developing human bone: potential roles in skeletal development. *Bone* *23*, 7-12.
51. Bouvard,D., Brakebusch,C., Gustafsson,E., Aszodi,A., Bengtsson,T., Berna,A., und Fässler,R. (2001). Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Circ. Res.* *89*, 211-223.

52. Boyan,B.D., Sylvia,V.L., Dean,D.D., Del Toro,F., und Schwartz,Z. (2002). Differential regulation of growth plate chondrocytes by 1 α ,25-(OH)₂D₃ and 24R,25-(OH)₂D₃ involves cell-maturation-specific membrane-receptor-activated phospholipid metabolism. *Crit Rev. Oral Biol. Med.* 13, 143-154.
53. Boyan,B.D., Sylvia,V.L., Dean,D.D., und Schwartz,Z. (2001). 24,25-(OH)₂D₃ regulates cartilage and bone via autocrine and endocrine mechanisms. *Steroids* 66, 363-374.
54. Boyan,B.D., Sylvia,V.L., McKinney,N., und Schwartz,Z. (2003). Membrane actions of vitamin D metabolites 1 α ,25(OH)₂D₃ and 24R,25(OH)₂D₃ are retained in growth plate cartilage cells from vitamin D receptor knockout mice. *J. Cell Biochem.* 90, 1207-1223.
55. Brakebusch,C., Bouvard,D., Stanchi,F., Sakai,T., und Fassler,R. (2002). Integrins in invasive growth. *J. Clin. Invest* 109, 999-1006.
56. Broadus,A.E. und Stewart,A.F. (1994). Parathyroid hormone-related protein. In: *The Parathyroids*, J.P.Bilezikian, M.A.Levine, and R.Marcus, eds. (New York: Raven Press, Inc.), pp. 259-294.
57. Bruckner,P., Horler,I., Mendler,M., Houze,Y., Winterhalter,K.H., Eich-Bender,S.G., und Spycher,M.A. (1989). Induction and prevention of chondrocyte hypertrophy in culture. *J. Cell Biol.* 109, 2537-2545.
58. Bruckner,P. und van der Rest,R.M. (1994). Structure and function of cartilage collagens. *Microsc. Res. Tech.* 28, 378-384.
59. Buckwalter,J.A. und Mankin,H.J. (1998). Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr. Course Lect.* 47, 477-486.
60. Bullock,W.O., Fernandez,J.M., und Short,J.M. (1987). XL1-blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with β -galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376.
61. Burch,W.M. und Lebovitz,H.E. (1982). Triiodothyronine stimulates maturation of porcine growth-plate cartilage in vitro. *J. Clin. Invest* 70, 496-504.
62. Camper,L., Hellman,U., und Lundgren-Akerlund,E. (1998). Isolation, cloning, and sequence analysis of the integrin subunit α 10, a β 1-associated collagen binding integrin expressed on chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 20383-20389.
63. Cancedda,R., Descalzi,C.F., und Castagnola,P. (1995). Chondrocyte differentiation. *Int. Rev. Cytol.* 159, 265-358.
64. Candelieri,G.A., Jurutka,P.W., Haussler,M.R., und St Arnaud,R. (1996). A composite element binding the vitamin D receptor, retinoid X receptor α , and a member of the CTF/NF-1 family of transcription factors mediates the vitamin D responsiveness of the c-fos promoter. *Mol. Cell Biol.* 16, 584-592.
65. Capdevila,J. und Johnson,R.L. (1998). Endogenous and ectopic expression of noggin suggests a conserved mechanism for regulation of BMP function during limb and somite patterning. *Dev. Biol.* 197, 205-217.
66. Cardinaux,J.R., Chapel,S., und Wahli,W. (1994). Complex organization of CTF/NF-I, C/EBP, and HNF3 binding sites within the promoter of the liver-specific vitellogenin gene. *J. Biol. Chem.* 269, 32956.
67. Carrascosa,A., Ferrandez,M.A., Audi,L., und Ballabriga,A. (1992). Effects of triiodothyronine (T₃) and identification of specific nuclear T₃-binding sites in cultured human fetal epiphyseal chondrocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 75, 140-144.
68. Carrington,J.L., Chen,P., Yanagishita,M., und Reddi,A.H. (1991). Osteogenin (bone morphogenetic protein-3) stimulates cartilage formation by chick limb bud cells in vitro. *Dev. Biol.* 146, 406-415.

69. Chan,E.C., Fraser,S., Yin,S., Yeo,G., Kwek,K., Fairclough,R.J., und Smith,R. (2002). Human myometrial genes are differentially expressed in labor: a suppression subtractive hybridization study. *J. Clin. Endocrinol. Metab* *87*, 2435-2441.
70. Chaudhry,A.Z., Vitullo,A.D., und Gronostajski,R.M. (1998). Nuclear factor I (NFI) isoforms differentially activate simple versus complex NFI-responsive promoters. *J. Biol. Chem.* *273*, 18538-18546.
71. Chaudhry,A.Z., Vitullo,A.D., und Gronostajski,R.M. (1999). Nuclear factor I-mediated repression of the mouse mammary tumor virus promoter is abrogated by the coactivators p300/CBP and SRC-1. *J. Biol. Chem.* *274*, 7072-7081.
72. Chen,P., Carrington,J.L., Hammonds,R.G., und Reddi,A.H. (1991). Stimulation of chondrogenesis in limb bud mesoderm cells by recombinant human bone morphogenetic protein 2B (BMP-2B) and modulation by transforming growth factor beta 1 and beta 2. *Exp. Cell Res.* *195*, 509-515.
73. Chen,Q., Johnson D.M., Haudenschild,D.R., Tondrav,M.M., und Goetinck,P.F. (1995). Cartilage matrix protein forms a type II collagen-independent filamentous network: analysis in primary cell cultures with a retrovirus expression system. *Mol. Biol. Cell* *6*, 1743-1753.
74. Chenchik,A., Diachenko,L., Moqadam,F., Tarabykin,V., Lukyanov,S., und Siebert,P.D. (1996). Full-length cDNA cloning and determination of mRNA 5' and 3' ends by amplification of adaptor-ligated cDNA. *Biotechniques* *21*, 526-534.
75. Chenchik,A., Zhu,Y.Y., Diatchenko,L., Li,R., und Hill,J.a.S.P.D. (1998). Generation and use of high-quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR. *BioTechniques Books*, MA, 305-319.
76. Cheung,J.O., Grant,M.E., Jones,C.J., Hoyland,J.A., Freemont,A.J., und Hillarby,M.C. (2003). Apoptosis of terminal hypertrophic chondrocytes in an in vitro model of endochondral ossification. *J. Pathol.* *201*, 496-503.
77. Chimal-Monroy,J., Rodriguez-Leon,J., Montero,J.A., Ganan,Y., Macias,D., Merino,R., und Hurle,J.M. (2003). Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev. Biol.* *257*, 292-301.
78. Chu,H.M., Fischer,W.H., Osborne,T.F., und Comb,M.J. (1991). NF-I proteins from brain interact with the proenkephalin cAMP inducible enhancer. *Nucleic Acids Res.* *19*, 2728.
79. Chu,M.L., Mann,K., Deutzmann,R., Pribula-Conway,D., Hsu-Chen,C.C., Bernard,M.P., und Timpl,R. (1987). Characterization of three constituent chains of collagen type VI by peptide sequences and cDNA clones. *Eur. J. Biochem.* *168*, 309-317.
80. Chung,U.I. (2004). Essential role of hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development. *Endocr. J.* *51*, 19-24.
81. Chung,U.I., Lanske,B., Lee,K., Li,E., und Kronenberg,H. (1998). The parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor coordinates endochondral bone development by directly controlling chondrocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 13030-13035.
82. Chung,U.I., Schipani,E., McMahon,A.P., und Kronenberg,H.M. (2001). Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. *J. Clin. Invest* *107*, 295-304.
83. Church,V., Nohno,T., Linker,C., Marcelle,C., und Francis-West,P. (2002). Wnt regulation of chondrocyte differentiation. *J. Cell Sci.* *115*, 4809-4818.
84. Colvin,J.S., Bohne,B.A., Harding,G.W., McEwen,D.G., und Ornitz,D.M. (1996). Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat. Genet.* *12*, 390-397.
85. Compston,J.E. (1993). Thyroid hormone therapy and the skeleton. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* *39*, 519-520.

86. Cooke,D.W. und Lane,M.D. (1999a). The transcription factor nuclear factor I mediates repression of the GLUT4 promoter by insulin. *J. Biol. Chem.* *274*, 12917-12924.
87. Cooke,D.W. und Lane,M.D. (1999b). Transcription factor NF1 mediates repression of the GLUT4 promoter by cyclic-AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *260*, 600-604.
88. Crawford,D.R., Leahy,P., Hu,C.Y., Chaudhry,A., Gronostajski,R., Grossman,G., Woods,J., Hakimi,P., Roesler,W.J., und Hanson,R.W. (1998). Nuclear factor I regulates expression of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). *J. Biol. Chem.* *273*, 13387-13390.
89. Crowe,R., Zikherman,J., und Niswander,L. (1999). Delta-1 negatively regulates the transition from prehypertrophic to hypertrophic chondrocytes during cartilage formation. *Development* *126*, 987-998.
90. D'Angelo,M. und Pacifici,M. (1997). Articular chondrocytes produce factors that inhibit maturation of sternal chondrocytes in serum-free agarose cultures: a TGF-beta independent process. *J. Bone Miner. Res.* *12*, 1368-1377.
91. D'Angelo,M., Sarment,D.P., Billings,P.C., und Pacifici,M. (2001). Activation of transforming growth factor beta in chondrocytes undergoing endochondral ossification. *J. Bone Miner. Res.* *16*, 2339-2347.
92. Davies,S.R., Sakano,S., Zhu,Y., und Sandell,L.J. (2002). Distribution of the transcription factors Sox9, AP-2, and [delta]EF1 in adult murine articular and meniscal cartilage and growth plate. *J. Histochem. Cytochem.* *50*, 1059-1065.
93. de Crombrughe,B., Lefebvre,V., Behringer,R.R., Bi,W., Murakami,S., und Huang,W. (2000). Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biol.* *19*, 389-394.
94. de Crombrughe,B., Lefebvre,V., und Nakashima,K. (2001). Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *13*, 721-727.
95. De Luca,F., Barnes,K.M., Uyeda,J.A., De Levi,S., Abad,V., Palese,T., Mericq,V., und Baron,J. (2001). Regulation of growth plate chondrogenesis by bone morphogenetic protein-2. *Endocrinology* *142*, 430-436.
96. De Luca,F., Uyeda,J.A., Mericq,V., Mancilla,E.E., Yanovski,J.A., Barnes,K.M., Zile,M.H., und Baron,J. (2000). Retinoic acid is a potent regulator of growth plate chondrogenesis. *Endocrinology* *141*, 346-353.
97. Dean,D.D., Boyan,B.D., Schwart,Z., Muniz,O.E., Carreno,M.R., Maeda,S., und Howell,D.S. (2001). Effect of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and 24R,25-dihydroxyvitamin D3 on metalloproteinase activity and cell maturation in growth plate cartilage in vivo. *Endocrine.* *14*, 311-323.
98. Dean,D.D., Schwartz,Z., Muniz,O.E., Gomez,R., Swain,L.D., Howell,D.S., und Boyan,B.D. (1992). Matrix vesicles are enriched in metalloproteinases that degrade proteoglycans. *Calcif. Tissue Int.* *50*, 342-349.
99. DeChiara,T.M., Robertson,E.J., und Efstratiadis,A. (1991). Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* *64*, 849-859.
100. Dekker,J., van Oosterhout,J.A., und van der Vliet,P.C. (1996). Two regions within the DNA binding domain of nuclear factor I interact with DNA and stimulate adenovirus DNA replication independently. *Mol. Cell Biol.* *16*, 4073-4080.
101. Deng,C., Wynshaw-Boris,A., Zhou,F., Kuo,A., und Leder,P. (1996). Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* *84*, 911-921.
102. Denker,A.E., Nicoll,S.B., und Tuan,R.S. (1994). Formation of cartilage-like spheroids by micromass cultures of murine C3H10T1/2 cells upon treatment with TGF-beta1. *Differentiation* *59*, 34.

103. Diatchenko,L., Lau,Y.F., Campbell,A.P., Chenchik,A., Moqadam,F., Huang,B., Lukyanov,S., Lukyanov,K., Gurskaya,N., Sverdlov,E.D., und Siebert,P.D. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 6025-6030.
104. Diatchenko,L., Lukyanov,S., Lau,Y.F., und Siebert,P.D. (1999). Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol.* *303*, 349-380.
105. Dietz,U.H., Ziegelmeier,G., Bittner,K., Bruckner,P., und Balling,R. (1999). Spatio-temporal distribution of chondromodulin-I mRNA in the chicken embryo: expression during cartilage development and formation of the heart and eye. *Dev. Dyn.* *216*, 233-243.
106. Dinser,R., Kreppel,F., Zaucke,F., Blank,C., Paulsson,M., Kochanek,S., und Maurer,P. (2001). Comparison of long-term transgene expression after non-viral and adenoviral gene transfer into primary articular chondrocytes. *Histochem. Cell Biol.* *116*, 69-77.
107. Dourado,G. und LuValle,P. (1998). Proximal DNA elements mediate repressor activity conferred by the distal portion of the chicken collagen X promoter. *J. Cell Biochem.* *70*, 507-516.
108. Drissi,M.H., Li,X., Sheu,T.J., Zuscik,M.J., Schwarz,E.M., Puzas,J.E., Rosier,R.N., und O'Keefe,R.J. (2003). Runx2/Cbfa1 stimulation by retinoic acid is potentiated by BMP2 signaling through interaction with Smad1 on the collagen X promoter in chondrocytes. *J. Cell Biochem.* *90*, 1287-1298.
109. Ducy,P. und Karsenty,G. (1998). Genetic control of cell differentiation in the skeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* *10*, 614-619.
110. Ducy,P., Zhang,R., Geoffroy,V., Ridall,A.L., und Karsenty,G. (1997). Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* *89*, 747-754.
111. Duguid,J.R. und Dinauer,M.C. (1990). Library subtraction of in vitro cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. *Nucleic Acids Res.* *18*, 2789-2792.
112. Durr,J., Goodman,S., Potocnik,A., von der,M.H., und von der,M.K. (1993). Localization of beta 1-integrins in human cartilage and their role in chondrocyte adhesion to collagen and fibronectin. *Exp. Cell Res.* *207*, 235-244.
113. Dusserre,Y. und Mermoud,N. (1992). Purified cofactors and histone H1 mediate transcriptional regulation by CTF/NF-I. *Mol. Cell Biol.* *12*, 5228-5237.
114. Elder,G.A., Liang,Z., Lee,N., Friedrich,V.L., Jr., und Lazzarini,R.A. (1992). Novel DNA binding proteins participate in the regulation of human neurofilament H gene expression. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *15*, 85-98.
115. Endege,W.O., Steinmann,K.E., Boardman,L.A., Thibodeau,S.N., und Schlegel,R. (1999). Representative cDNA libraries and their utility in gene expression profiling. *Biotechniques* *26*, 542-8, 550.
116. Enomoto,H., Enomoto-Iwamoto,M., Iwamoto,M., Nomura,S., Himeno,M., Kitamura,Y., Kishimoto,T., und Komori,T. (2000). Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J. Biol. Chem.* *275*, 8695-8702.
117. Enomoto,H., Furuichi,T., Zanma,A., Yamana,K., Yoshida,C., Sumitani,S., Yamamoto,H., Enomoto-Iwamoto,M., Iwamoto,M., und Komori,T. (2004). Runx2 deficiency in chondrocytes causes adipogenic changes in vitro. *J. Cell Sci.* *117*, 417-425.
118. Enomoto,M., Leboy,P.S., Menko,A.S., und Boettiger,D. (1993). Beta 1 integrins mediate chondrocyte interaction with type I collagen, type II collagen, and fibronectin. *Exp. Cell Res.* *205*, 276-285.
119. Enomoto-Iwamoto,M., Enomoto,H., Komori,T., und Iwamoto,M. (2001). Participation of Cbfa1 in regulation of chondrocyte maturation. *Osteoarthritis. Cartilage.* *9 Suppl A*, S76-S84.

120. Enomoto-Iwamoto,M., Iwamoto,M., Nakashima,K., Mukudai,Y., Boettiger,D., Pacifici,M., Kurisu,K., und Suzuki,F. (1997). Involvement of alpha5beta1 integrin in matrix interactions and proliferation of chondrocytes. *J. Bone Miner. Res.* *12*, 1124-1132.
121. Eyre,D.R., Wu,J.J., und Apone,S. (1987). A growing family of collagens in articular cartilage: identification of 5 genetically distinct types. *J. Rheumatol.* *14 Spec No*, 25-27.
122. Eyre,D.R., Wu,J.J., Fernandes,R.J., Pietka,T.A., und Weis,M.A. (2002). Recent developments in cartilage research: matrix biology of the collagen II/IX/XI heterofibril network. *Biochem. Soc. Trans.* *30*, 893-899.
123. Farjanel,J., Schürmann,G., und Bruckner,P. (2001). Contacts with fibrils containing collagen I, but not collagens II, IX, and XI, can destabilize the cartilage phenotype of chondrocytes. *Osteoarthritis. Cartilage.* *9 Suppl A*, 55-63.
124. Fassler,R., Schnegelsberg,P.N., Dausman,J., Shinya,T., Muragaki,Y., McCarthy,M.T., Olsen,B.R., und Jaenisch,R. (1994). Mice lacking alpha 1 (IX) collagen develop noninflammatory degenerative joint disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 5070-5074.
125. Febbraio,M. und Silverstein,R.L. (1990). Identification and characterization of LAMP-1 as an activation-dependent platelet surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.* *265*, 18537.
126. Forrest,D., Erway,L.C., Ng,L., Altschuler,R., und Curran,T. (1996a). Thyroid hormone receptor beta is essential for development of auditory function. *Nat. Genet.* *13*, 354-357.
127. Forrest,D., Hanebuth,E., Smeyne,R.J., Everds,N., Stewart,C.L., Wehner,J.M., und Curran,T. (1996b). Recessive resistance to thyroid hormone in mice lacking thyroid hormone receptor beta: evidence for tissue-specific modulation of receptor function. *EMBO J.* *15*, 3006-3015.
128. Fraichard,A., Chassande,O., Plateroti,M., Roux,J.P., Trouillas,J., Dehay,C., Legrand,C., Gauthier,K., Kedinger,M., Malaval,L., Rousset,B., und Samarut,J. (1997). The T3R alpha gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. *EMBO J.* *16*, 4412-4420.
129. Franzen,P., ten Dijke,P., Ichijo,H., Yamashita,H., Schulz,P., Heldin,C.H., und Miyazono,K. (1993). Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor. *Cell* *75*, 681-692.
130. Fujii,M., Takeda,K., Imamura,T., Aoki,H., Sampath,T.K., Enomoto,S., Kawabata,M., Kato,M., Ichijo,H., und Miyazono,K. (1999). Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation. *Mol. Biol. Cell* *10*, 3801-3813.
131. Fukuda,M. (1991). Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J. Biol. Chem.* *266*, 21327-21330.
132. Galotto,M., Campanile,G., Robino,G., Cancedda,F.D., Bianco,P., und Cancedda,R. (1994). Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation to osteoblast-like cells and participate in the initial bone formation in developing chick embryo. *J. Bone Miner. Res.* *9*, 1249.
133. Gannon,J.M., Walker,G., Fischer,M., Carpenter,R., Thompson,R.C., Jr., und Oegema,T.R., Jr. (1991). Localization of type X collagen in canine growth plate and adult canine articular cartilage. *J. Orthop. Res.* *9*, 485-494.
134. Gao,B., Jaffe,H., und Kunos,G. (1998). Histone H1 isoforms purified from rat liver bind nonspecifically to the nuclear factor 1 recognition sequence and serve as generalized transcriptional repressors. *Mol. Cell Biochem.* *178*, 187-196.
135. Garlatti,M., Aggerbeck,M., Bouguet,J., und Barouki,R. (1996). Contribution of a nuclear factor 1 binding site to the glucocorticoid regulation of the cytosolic aspartate aminotransferase gene promoter. *J. Biol. Chem.* *271*, 32629-32634.

136. Gauthier,K., Chassande,O., Plateroti,M., Roux,J.P., Legrand,C., Pain,B., Rousset,B., Weiss,R., Trouillas,J., und Samarut,J. (1999). Different functions for the thyroid hormone receptors TRalpha and TRbeta in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *EMBO J.* *18*, 623-631.
137. Gelse,K., Poschl,E., und Aigner,T. (2003). Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *55*, 1531-1546.
138. Gerber,H.P., Vu,T.H., Ryan,A.M., Kowalski,J., Werb,Z., und Ferrara,N. (1999). VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat. Med.* *5*, 623-628.
139. Gibson,G.J. und Flint,M.H. (1985). Type X collagen synthesis by chick sternal cartilage and its relationship to endochondral development. *J. Cell Biol.* *101*, 277-284.
140. Gibson,G.J., Schor,S.L., und Grant,M.E. (1982). Effects of matrix macromolecules on chondrocyte gene expression: synthesis of a low molecular weight collagen species by cells cultured within collagen gels. *J. Cell Biol.* *93*, 767-774.
141. Goldsworthy,S.M., Goldsworthy,T.L., Sprankle,C.S., und Butterworth,B.E. (1993). Variation in expression of genes used for normalization of Northern blots after induction of cell proliferation. *Cell Prolif.* *26*, 511-518.
142. Gonzalez,A.M., Buscaglia,M., Ong,M., und Baird,A. (1990). Distribution of basic fibroblast growth factor in the 18-day rat fetus: localization in the basement membranes of diverse tissues. *J. Cell Biol.* *110*, 753-765.
143. Gough,N.R., Hatem,C.L., und Fambrough,D.M. (1995). The family of LAMP-2 proteins arises by alternative splicing from a single gene: characterization of the avian LAMP-2 gene and identification of mammalian homologs of LAMP-2b and LAMP-2c. *DNA Cell Biol.* *14*, 863-867.
144. Gounari,F., De Francesco,R., Schmitt,J., van,d, V, Cortese,R., und Stunnenberg,H. (1990). Amino-terminal domain of NF1 binds to DNA as a dimer and activates adenovirus DNA replication. *EMBO J.* *9*, 559-566.
145. Goyal,N., Knox,J., und Gronostajski,R.M. (1990). Analysis of multiple forms of nuclear factor I in human and murine cell lines. *Mol. Cell Biol.* *10*, 1041-1048.
146. Grade,M.J., Kanwar,Y.S., und Stern,P.H. (1994). Insulin and thyroid hormone stimulate matrix metabolism in primary cultures of articular chondrocytes from young rabbits in independently and in combination. *Connect. Tissue Res.* *31*, 44.
147. Gresch,O., Engel,F.B., Nestic,D., Tran,T.T., England,H.M., Hickman,E.S., Korner,I., Gan,L., Chen,S., Castro-Obregon,S., Hammermann,R., Wolf,J., Muller-Hartmann,H., Nix,M., Siebenkotten,G., Kraus,G., und Lun,K. (2004). New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods* *33*, 151-163.
148. Grimsrud,C.D., Romano,P.R., D'Souza,M., Puzas,J.E., Reynolds,P.R., Rosier,R.N., und O'Keefe,R.J. (1999). BMP-6 is an autocrine stimulator of chondrocyte differentiation. *J. Bone Miner. Res.* *14*, 475-482.
149. Grimsrud,C.D., Rosier,R.N., Puzas,J.E., Reynolds,P.R., Reynolds,S.D., Hicks,D.G., und O'Keefe,R.J. (1998). Bone morphogenetic protein-7 in growth-plate chondrocytes: regulation by retinoic acid is dependent on the stage of chondrocyte maturation. *J. Orthop. Res.* *16*, 247-255.
150. Gronostajski,R.M. (2000). Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. *Gene* *249*, 31-45.
151. Gubler,U. und Hoffman,B.J. (1983). A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* *25*, 263-269.

152. Gurskaya,N.G., Diatchenko,L., Chenchik,A., Siebert,P.D., Khaspekov,G.L., Lukyanov,K.A., Vagner,L.L., Ermolaeva,O.D., Lukyanov,S.A., und Sverdlov,E.D. (1996). Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal. Biochem.* *240*, 90-97.
153. Haaijman,A., Karperien,M., Lanske,B., Hendriks,J., Lowik,C.W., Bronckers,A.L., und Burger,E.H. (1999). Inhibition of terminal chondrocyte differentiation by bone morphogenetic protein 7 (OP-1) in vitro depend on the periarticular region but is independent of parathyroid hormone-related peptide. *Bone* *25*, 404.
154. Hagg,R., Hedbom,E., Mollers,U., Aszodi,A., Fassler,R., und Bruckner,P. (1997). Absence of the alpha1(IX) chain leads to a functional knock-out of the entire collagen IX protein in mice. *J. Biol. Chem.* *272*, 20650-20654.
155. Hamm,A., Krott,N., Breibach,I., Blindt,R., und Bosserhoff,A.K. (2002). Efficient transfection method for primary cells. *Tissue Eng* *8*, 235-245.
156. Hammerschmidt,M., Brook,A., und McMahon,A.P. (1997). The world according to hedgehog. *Trends Genet.* *13*, 14-21.
157. Hara,E., Kato,T., Nakada,S., Sekiya,S., und Oda,K. (1991). Subtractive cDNA cloning using oligo(dT)30-latex and PCR: isolation of cDNA clones specific to undifferentiated human embryonal carcinoma cells. *Nucleic Acids Res.* *19*, 7097-7104.
158. Hartmann,C. und Tabin,C.J. (2000). Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb. *Development* *127*, 3141-3159.
159. Hartmann,C. und Tabin,C.J. (2001). Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. *Cell* *104*, 341-351.
160. Hatem,C.L., Gough,N.R., und Fambrough,D.M. (1995). Multiple mRNAs encode the avian lysosomal membrane protein LAMP-2, resulting in alternative transmembrane and cytoplasmic domains. *J. Cell Sci.* *108 (Pt 5)*, 2093-2100.
161. Hatori,M., Klatte,K.J., Teixeira,C.C., und Shapiro,I.M. (1995). End labeling studies of fragmented DNA in the avian growth plate: evidence of apoptosis in terminally differentiated chondrocytes. *J. Bone Miner. Res.* *10*, 1960-1968.
162. Hauser,N. und Paulsson,M. (1994). Native cartilage matrix protein (CMP). A compact trimer of subunits assembled via a coiled-coil alpha-helix. *J. Biol. Chem.* *269*, 25747-25753.
163. Hausler,G., Helmreich,M., Marlovits,S., und Egerbacher,M. (2002). Integrins and extracellular matrix proteins in the human childhood and adolescent growth plate. *Calcif. Tissue Int.* *71*, 212-218.
164. Hay,E.D. (1981). Extracellular matrix. *J. Cell Biol.* *91*, 205s-223s.
165. Healy,C., Uwanogho,D., und Sharpe,P.T. (1999). Regulation and role of Sox9 in cartilage formation. *Dev. Dyn.* *215*, 69-78.
166. Heldin,C.H., Miyazono,K., und ten Dijke,P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* *390*, 465-471.
167. Hering,T.M. (1999). Regulation of chondrocyte gene expression. *Front Biosci.* *4*, D743-D761.
168. Hilger-Eversheim,K., Moser,M., Schorle,H., und Buettner,R. (2000). Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene* *260*, 1-12.

169. Hiraki, Y., Inoue, H., Shigeno, C., Sanma, Y., Bentz, H., Rosen, D.M., Asada, A., und Suzuki, F. (1991). Bone morphogenetic proteins (BMP-2 and BMP-3) promote growth and expression of the differentiated phenotype of rabbit chondrocytes and osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro. *J. Bone Miner. Res.* *6*, 1373-1385.
170. Hirsch, M.S., Lunsford, L.E., Trinkaus-Randall, V., und Svoboda, K.K. (1997). Chondrocyte survival and differentiation in situ are integrin mediated. *Dev. Dyn.* *210*, 249-263.
171. Hirschmann, F., Verhoeyen, E., Wirth, D., Bauwens, S., Hauser, H., und Rudert, M. (2002). Vital marking of articular chondrocytes by retroviral infection using green fluorescence protein. *Osteoarthritis. Cartilage.* *10*, 109-118.
172. Ho, M.K. und Springer, T.A. (1983). Tissue distribution, structural characterization, and biosynthesis of Mac-3, a macrophage surface glycoprotein exhibiting molecular weight heterogeneity. *J. Biol. Chem.* *258*, 642.
173. Hoang, B.H., Thomas, J.T., Abdul-Karim, F.W., Correia, K.M., Conlon, R.A., Luyten, F.P., und Ballock, R.T. (1998). Expression pattern of two Frizzled-related genes, Frzb-1 and Sfrp-1, during mouse embryogenesis suggests a role for modulating action of Wnt family members. *Dev. Dyn.* *212*, 364-372.
174. Holmbeck, K., Bianco, P., Caterina, J., Yamada, S., Kromer, M., Kuznetsov, S.A., Mankani, M., Robey, P.G., Poole, A.R., Pidoux, I., Ward, J.M., und Birkedal-Hansen, H. (1999). MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* *99*, 81-92.
175. Horton, W.A. (1993). Morphology of Connective Tissue: Cartilage. In: *Connective Tissue and its Heritable Disorders*. Wiley-Liss, 73-84.
176. Horton, W.E., Yamada, Y., und Hassell, J.R. (1987). Retinoic acid rapidly reduces cartilage matrix synthesis by altering gene transcription in chondrocytes. *Dev. Biol.* *123*, 508-516.
177. Howlett, C.R. (1979). The fine structure of the proximal growth plate of the avian tibia. *J. Anat.* *128*, 377-399.
178. Huang, W., Chung, U.I., Kronenberg, H.M., und de Crombrugge, B. (2001). The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signaling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *98*, 160-165.
179. Huang, W., Lu, N., Eberspaecher, H., und de Crombrugge, B. (2002). A new long form of c-Maf cooperates with Sox9 to activate the type II collagen gene. *J. Biol. Chem.* *277*, 50668-50675.
180. Huang, X., Birk, D.E., und Goetinck, P.F. (1999). Mice lacking matrilin-1 (cartilage matrix protein) have alterations in type II collagen fibrillogenesis and fibril organization. *Dev. Dyn.* *216*, 434-441.
181. Huang, Z., Xu, H., und Sandell, L. (2004). Negative regulation of chondrocyte differentiation by transcription factor AP-2alpha. *J. Bone Miner. Res.* *19*, 245-255.
182. Hunziker, E.B. (1994). Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microsc. Res. Tech.* *28*, 505-519.
183. Hwang, S.G., Ryu, J.H., Kim, I.C., Jho, E.H., Jung, H.C., Kim, K., Kim, S.J., und Chun, J.S. (2004). Wnt-7a Causes Loss of Differentiated Phenotype and Inhibits Apoptosis of Articular Chondrocytes via Different Mechanisms. *J. Biol. Chem.* *279*, 26597-26604.
184. Hynes, R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* *69*, 11-25.
185. Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* *110*, 673-687.
186. Inada, M., Yasui, T., Nomura, S., Miyake, S., Deguchi, K., Himeno, M., Sato, M., Yamagiwa, H., Kimura, T., Yasui, N., Ochi, T., Endo, N., Kitamura, Y., Kishimoto, T., und Komori, T. (1999). Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Dev. Dyn.* *214*, 279-290.

187. Inohara,H. und Raz,A. (1994). Identification of human melanoma cellular and secreted ligands for galectin-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *201*, 1375.
188. Inoue,K., Ozaki,S., Shiga,T., Ito,K., Masuda,T., Okado,N., Iseda,T., Kawaguchi,S., Ogawa,M., Bae,S.C., Yamashita,N., Itohara,S., Kudo,N., und Ito,Y. (2002). Runx3 controls the axonal projection of proprioceptive dorsal root ganglion neurons. *Nat. Neurosci.* *5*, 946-954.
189. Iwamoto,M., Golden,E.B., Adams,S.L., Noji,S., und Pacifici,M. (1993). Responsiveness to retinoic acid changes during chondrocyte maturation. *Exp. Cell Res.* *205*, 213-224.
190. Iwamoto,M., Kitagaki,J., Tamamura,Y., Gentili,C., Koyama,E., Enomoto,H., Komori,T., Pacifici,M., und Enomoto-Iwamoto,M. (2003). Runx2 expression and action in chondrocytes are regulated by retinoid signaling and parathyroid hormone-related peptide (PTHrP). *Osteoarthritis. Cartilage.* *11*, 6-15.
191. Iwamoto,M., Yagami,K., Shapiro,I.M., Leboy,P.S., Adams,S.L., und Pacifici,M. (1994). Retinoic acid is a major regulator of chondrocyte maturation and matrix mineralization. *Microsc. Res. Tech.* *28*, 483-491.
192. Jacenko,O., LuValle,P.A., und Olsen,B.R. (1993). Spondylometaphyseal dysplasia in mice carrying a dominant negative mutation in a matrix protein specific for cartilage-to-bone transition. *Nature* *365*, 56-61.
193. Ji,W., Wright,M.B., Cai,L., Flament,A., und Lindpaintner,K. (2002). Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes. *BMC. Genomics* *3*, 12.
194. Jikko,A., Aoba,T., Marakami,H., Takano,Y., Iwamoto,M., und Kato,Y. (1993). Characterization of the mineralisation process of cultures of rabbit growth plate chondrocytes. *Dev. Biol.* *56*, 372-380.
195. Jikko,A., Kato,Y., Hiranuma,H., und Fuchihata,H. (1999). Inhibition of chondrocyte terminal differentiation and matrix calcification by soluble factors released by articular chondrocytes. *Calcif. Tissue Int.* *65*, 276-279.
196. Jingushi,S., Scully,S.P., Joyce,M.E., Sugioka,Y., und Bolander,M.E. (1995). Transforming growth factor-beta 1 and fibroblast growth factors in rat growth plate. *J. Orthop. Res.* *13*, 761-768.
197. Jobert,A.S., Zhang,P., Couvineau,A., Bonaventure,J., Roume,J., Le Merrer,M., und Silve,C. (1998). Absence of functional receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Blomstrand chondrodysplasia. *J. Clin. Invest* *102*, 34-40.
198. Jones,K.A., Kadonaga,J.T., Rosenfeld,P.J., Kelly,T.J., und Tjian,R. (1987). A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. *Cell* *48*, 79-89.
199. Kagoshima,H., Shigesada,K., Satake,M., Ito,Y., Miyoshi,H., Ohki,M., Pepling,M., und Gergen,P. (1993). The Runt domain identifies a new family of heteromeric transcriptional regulators. *Trends Genet.* *9*, 338-341.
200. Kanzaki,T., Olofsson,A., Moren,A., Wernstedt,C., Hellman,U., Miyazono,K., Claesson-Welsh,L., und Heldin,C.H. (1990). TGF-beta 1 binding protein: a component of the large latent complex of TGF-beta 1 with multiple repeat sequences. *Cell* *61*, 1051-1061.
201. Karp,S.J., Schipani,E., St Jacques,B., Hunzelman,J., Kronenberg,H., und McMahon,A.P. (2000). Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent pathways. *Development* *127*, 543-548.
202. Karperien,M., van Dijk,T.B., Hoeijmakers,T., Cremers,F., Abou-Samra,A.B., Boonstra,J., de Laat,S.W., und Defize,L.H. (1994). Expression pattern of parathyroid hormone/parathyroid hormone related peptide receptor mRNA in mouse postimplantation embryos indicates involvement in multiple developmental processes. *Mech. Dev.* *47*, 29-42.
203. Kato,Y. und Gospodarowicz,D. (1984). Growth requirements of low-density rabbit costal chondrocyte cultures maintained in serum-free medium. *J. Cell Physiol* *120*, 354-363.

204. Kato,Y. und Iwamoto,M. (1990). Fibroblast growth factor is an inhibitor of chondrocyte terminal differentiation. *J. Biol. Chem.* *265*, 5903-5909.
205. Kato,Y., Shimazu,A., Iwamoto,M., Nakashima,K., Koike,T., Suzuki,F., Nishii,Y., und Sato,K. (1990). Role of 1,25-hydroxycholecalciferol in growth-plate cartilage: inhibition of terminal differentiation of chondrocytes in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *87*, 6526.
206. Kawakami,Y., Wada,N., Nishimatsu,S.I., Ishikawa,T., Noji,S., und Nohno,T. (1999). Involvement of Wnt-5a in chondrogenic pattern formation in the chick limb bud. *Dev. Growth Differ.* *41*, 29-40.
207. Keene,D.R., Engvall,E., und Glanville,R.W. (1988). Ultrastructure of type VI collagen in human skin and cartilage suggests an anchoring function for this filamentous network. *J. Cell Biol.* *107*, 1995-2006.
208. Kern,B., Shen,J., Starbuck,M., und Karsenty,G. (2001). Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. *J. Biol. Chem.* *276*, 7101-7107.
209. Kim,I.S., Otto,F., Zabel,B., und Mundlos,S. (1999). Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech. Dev.* *80*, 159-170.
210. Kim,T.K. und Roeder,R.G. (1994). Proline-rich activator CTF1 targets the TFIIB assembly step during transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 4170-4174.
211. Kingsley,D.M. (1994). What do BMPs do in mammals? Clues from the mouse short-ear mutation. *Trends Genet.* *10*, 16-21.
212. Kingsley,D.M., Bland,A.E., Grubber,J.M., Marker,P.C., Russell,L.B., Copeland,N.G., und Jenkins,N.A. (1992). The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF beta superfamily. *Cell* *71*, 399-410.
213. Kirsch,T., Harrison,G., Golub,E.E., und Nah,H.D. (2000). The roles of annexins and types II and X collagen in matrix vesicle-mediated mineralization of growth plate cartilage. *J. Biol. Chem.* *275*, 35577-35583.
214. Kobayashi,T., Chung,U.I., Schipani,E., Starbuck,M., Karsenty,G., Katagiri,T., Goad,D.L., Lanske,B., und Kronenberg,H.M. (2002). PTHrP and Indian hedgehog control differentiation of growth plate chondrocytes at multiple steps. *Development* *129*, 2977-2986.
215. Koch,M., Foley,J.E., Hahn,R., Zhou,P., Burgeson,R.E., Gerecke,D.R., und Gordon,M.K. (2001). alpha 1(Xx) collagen, a new member of the collagen subfamily, fibril-associated collagens with interrupted triple helices. *J. Biol. Chem.* *276*, 23120-23126.
216. Komori,T. (2000). A fundamental transcription factor for bone and cartilage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *276*, 813-816.
217. Komori,T. (2002). Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development. *J. Cell Biochem.* *87*, 1-8.
218. Komori,T., Yagi,H., Nomura,S., Yamaguchi,A., Sasaki,K., Deguchi,K., Shimizu,Y., Bronson,R.T., Gao,Y.H., Inada,M., Sato,M., Okamoto,R., Kitamura,Y., Yoshiki,S., und Kishimoto,T. (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* *89*, 755-764.
219. Konecki,D.S., Foetisch,K., Zimmer,K.P., Schlotter,M., und Lichter-Konecki,U. (1995). An alternatively spliced form of the human lysosome-associated membrane protein-2 gene is expressed in a tissue-specific manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *215*, 757-767.
220. Koyama,E., Golden,E.B., Kirsch,T., Adams,S.L., Chandraratna,R.A., Michaille,J.J., und Pacheco,H.O. (1999). Retinoid signaling is required for chondrocyte maturation and endochondral bone formation during limb skeletogenesis. *Dev. Biol.* *208*, 391.

221. Krstic,R.V. (1988). Die Gewebe des Menschen und der Säugetiere. (Berlin, Heidelberg: Springer Verlag).
222. Kruse,U. und Sippel,A.E. (1994a). The genes for transcription factor nuclear factor I give rise to corresponding splice variants between vertebrate species. *J. Mol. Biol.* 238, 860-865.
223. Kruse,U. und Sippel,A.E. (1994b). Transcription factor nuclear factor I proteins form stable homo- and heterodimers. *FEBS Lett.* 348, 46-50.
224. Kühn,K. (1986). The collagen family - variations in the molecular and supermolecular structure. *Rheumatology.* (Oxford) 10, 69.
225. Kulkarni,S. und Gronostajski,R.M. (1996). Altered expression of the developmentally regulated NFI gene family during phorbol ester-induced differentiation of human leukemic cells. *Cell Growth Differ.* 7, 501-510.
226. Kundu,M., Javed,A., Jeon,J.P., Horner,A., Shum,L., Eckhaus,M., Muenke,M., Lian,J.B., Yang,Y., Nuckolls,G.H., Stein,G.S., und Liu,P.P. (2002). Cbfbeta interacts with Runx2 and has a critical role in bone development. *Nat. Genet.* 32, 639-644.
227. Kwan,K.M., Pang,M.K., Zhou,S., Cowan,S.K., Kong,R.Y., Pfordte,T., Olsen,B.R., Sillence,D.O., Tam,P.P., und Cheah,K.S. (1997). Abnormal compartmentalization of cartilage matrix components in mice lacking collagen X: implications for function. *J. Cell Biol.* 136, 459-471.
228. Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
229. Lai,C.H. und Chu,M.L. (1996). Tissue distribution and developmental expression of type XVI collagen in the mouse. *Tissue Cell* 28, 155-164.
230. Lanske,B., Karaplis,A.C., Lee,K., Luz,A., Vortkamp,A., Pirro,A., Karperien,M., Defize,L.H., Ho,C., Mulligan,R.C., Abou-Samra,A.B., Juppner,H., Segre,G.V., und Kronenberg,H.M. (1996). PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* 273, 663-666.
231. Leahy,P., Crawford,D.R., Grossman,G., Gronostajski,R.M., und Hanson,R.W. (1999). CREB binding protein coordinates the function of multiple transcription factors including nuclear factor I to regulate phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription. *J. Biol. Chem.* 274, 8813-8822.
232. Leboy,P., Grasso-Knight,G., D'Angelo,M., Volk,S.W., Lian,J.V., Drissi,H., Stein,G.S., und Adams,S.L. (2001). Smad-Runx interactions during chondrocyte maturation. *J. Bone Joint Surg. Am.* 83-A Suppl 1, S15-S22.
233. Leboy,P.S., Grasso-Knight,G., D'Angelo,M., und Adams,S.L. (2002). BMP-regulated chondrocyte hypertrophy. In: *The growth plate.*, I.M.Shapiro, B.Boyan, und H.Clarke Anderson, eds. (Amsterdam: IOS Press), 223-234.
234. Lefebvre,V., Behringer,R.R., und de Crombrughe,B. (2001). L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthritis. Cartilage.* 9 Suppl A, S69-S75.
235. Lefebvre,V., Li,P., und de Crombrughe,B. (1998). A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J.* 17, 5718-5733.
236. Levanon,D., Brenner,O., Negreanu,V., Bettoun,D., Woolf,E., Eilam,R., Lotem,J., Gat,U., Otto,F., Speck,N., und Groner,Y. (2001). Spatial and temporal expression pattern of Runx3 (Aml2) and Runx1 (Aml1) indicates non-redundant functions during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* 109, 413-417.
237. Lewinson,D. und Silbermann,M. (1992). Chondroclasts and endothelial cells collaborate in the process of cartilage resorption. *Anat. Rec.* 233, 504-514.

238. Li,Q.L., Ito,K., Sakakura,C., Fukamachi,H., Inoue,K., Chi,X.Z., Lee,K.Y., Nomura,S., Lee,C.W., Han,S.B., Kim,H.M., Kim,W.J., Yamamoto,H., Yamashita,N., Yano,T., Ikeda,T., Itohara,S., Inazawa,J., Abe,T., Hagiwara,A., Yamagishi,H., Ooe,A., Kaneda,A., Sugimura,T., Ushijima,T., Bae,S.C., und Ito,Y. (2002). Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* *109*, 113-124.
239. Li,X., Schwarz,E.M., Zuscik,M.J., Rosier,R.N., Ionescu,A.M., Puzas,J.E., Drissi,H., Sheu,T.J., und O'Keefe,R.J. (2003). Retinoic acid stimulates chondrocyte differentiation and enhances bone morphogenetic protein effects through induction of Smad1 and Smad5. *Endocrinology* *144*, 2514-2523.
240. Li,Y., Lacerda,D.A., Warman,M.L., Beier,D.R., Yoshioka,H., Ninomiya,Y., Oxford,J.T., Morris,N.P., Andrikopoulos,K., Ramirez,F., und . (1995). A fibrillar collagen gene, Col11a1, is essential for skeletal morphogenesis. *Cell* *80*, 423-430.
241. Liang,P. und Pardee,A.B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* *257*, 967-971.
242. Lichtler,A., Stover,M.L., Angilly,J., Kream,B., und Rowe,D.W. (1989). Isolation and characterization of the rat alpha 1(I) collagen promoter. Regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D. *J. Biol. Chem.* *264*, 3072-3077.
243. Ling,G., Hauer,C.R., Gronostajski,R.M., Pentecost,B., und Ding,X. (2004). Transcriptional regulation of rat CYP2A3 by nuclear factor 1: identification of a novel NF-A isoform, and evidence for tissue-selective interaction of NFI with the CYP2A3 promoter in vivo. *J. Biol. Chem.* *4*.
244. Linsenmayer,T.F., Chen,Q.A., Gibney,E., Gordon,M.K., Marchant,J.K., Mayne,R., und Schmid,T.M. (1991). Collagen types IX and X in the developing chick tibiotarsus: analyses of mRNAs and proteins. *Development* *111*, 191-196.
245. Liu,J.P., Baker,J., Perkins,A.S., Robertson,E.J., und Efstratiadis,A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* *75*, 59-72.
246. Loeser,R.F. (1993). Integrin-mediated attachment of articular chondrocytes to extracellular matrix proteins. *Arthritis Rheum.* *36*, 1103-1110.
247. Loeser,R.F. (1994). Modulation of integrin-mediated attachment of chondrocytes to extracellular matrix proteins by cations, retinoic acid, and transforming growth factor beta. *Exp. Cell Res.* *211*, 17-23.
248. Long,F., Sonenshein,G.E., und Linsenmayer,T.F. (1998). Multiple transcriptional elements in the avian type X collagen gene. Identification of Sp1 family proteins as regulators for high level expression in hypertrophic chondrocytes. *J. Biol. Chem.* *273*, 6542-6549.
249. LuValle,P., Daniels,K., Hay,E.D., und Olsen,B.R. (1992). Type X collagen is transcriptionally activated and specifically localized during sternal cartilage maturation. *Matrix* *12*, 404-413.
250. Luyten,F.P., Yu,Y.M., Yanagishita,M., Vukicevic,S., Hammonds,R.G., und Reddi,A.H. (1992). Natural bovine osteogenin and recombinant human bone morphogenetic protein-2B are equipotent in the maintenance of proteoglycans in bovine articular cartilage explant cultures. *J. Biol. Chem.* *267*, 3691-3695.
251. Lyons,K.M., Pelton,R.W., und Hogan,B.L. (1990). Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A). *Development* *109*, 833-844.
252. Macias,D., Ganan,Y., Sampath,T.K., Piedra,M.E., Ros,M.A., und Hurle,J.M. (1997). Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development* *124*, 1109-1117.

253. MacLean,H.E., Kim,J.I., Glimcher,M.J., Wang,J., Kronenberg,H.M., und Glimcher,L.H. (2003). Absence of transcription factor c-maf causes abnormal terminal differentiation of hypertrophic chondrocytes during endochondral bone development. *Dev. Biol.* 262, 51-63.
254. Maeda,S., Dean,D.D., Sylvia,V.L., Boyan,B.D., und Schwartz,Z. (2001). Metalloproteinase activity in growth plate chondrocyte cultures is regulated by 1,25-(OH)(2)D(3) and 24,25-(OH)(2)D(3) and mediated through protein kinase C. *Matrix Biol.* 20, 87-97.
255. Makihira,S., Yan,W., Murakami,H., Furukawa,M., Kawai,T., Nikawa,H., Yoshida,E., Hamada,T., Okada,Y., und Kato,Y. (2003). Thyroid hormone enhances aggrecanase-2/ADAM-TS5 expression and proteoglycan degradation in growth plate cartilage. *Endocrinology* 144, 2480-2488.
256. Mangelsdorf,D.J. (1994). Vitamin A receptors. *Nutr. Rev.* 52, 32-44.
257. Massague,J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 753-791.
258. Massague,J. (2000). How cells read TGF-beta signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 169-178.
259. Matyas,J.R., Sandell,L.J., und Adams,M.E. (1997). Gene expression of type II collagens in chondrocytes in experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis. Cartilage.* 5, 105.
260. Matz,M., Shagin,D., Bogdanova,E., Britanova,O., Lukyanov,S., Diatchenko,L., und Chenchik,A. (1999). Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. *Nucleic Acids Res.* 27, 1558-1560.
261. Mayne,R. (1989). Cartilage collagens - what is their function, and are they involved in articular disease? *Arthritis Rheum.* 32, 241-246.
262. Mayne,R., Vail,M.S., Mayne,P.M., und Miller,E.J. (1976). Changes in type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 73, 1674-1678.
263. McCormick,D., van der,R.M., Goodship,J., Lozano,G., Ninomiya,Y., und Olsen,B.R. (1987). Structure of the glycosaminoglycan domain in the type IX collagen-proteoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 4044-4048.
264. McMahon,J.A., Takada,S., Zimmerman,L.B., Fan,C.M., Harland,R.M., und McMahon,A.P. (1998). Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev.* 12, 1438-1452.
265. Mandler,M., Eich-Bender,S.G., Vaughan,L., Winterhalter,K.H., und Bruckner,P. (1989). Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI. *J. Cell Biol.* 108, 191-197.
266. Mermod,N., O'Neill,E.A., Kelly,T.J., und Tjian,R. (1989). The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-I is distinct from the replication and DNA binding domain. *Cell* 58, 741-753.
267. Merriman,H.L., van Wijnen,A.J., Hiebert,S., Bidwell,J.P., Fey,E., Lian,J., Stein,J., und Stein,G.S. (1995). The tissue-specific nuclear matrix protein, NMP-2, is a member of the AML/CBF/PEBP2/runt domain transcription factor family: interactions with the osteocalcin gene promoter. *Biochemistry* 34, 13125-13132.
268. Minina,E., Kreschel,C., Naski,M.C., Ornitz,D.M., und Vortkamp,A. (2002). Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev. Cell* 3, 439-449.
269. Minina,E., Wenzel,H.M., Kreschel,C., Karp,S., Gaffield,W., McMahon,A.P., und Vortkamp,A. (2001). BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* 128, 4523-4534.
270. Mitchell,P.J., Wang,C., und Tjian,R. (1987). Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen. *Cell* 50, 847-861.

271. Möllers, U. Die Regulation der Chondrozytendifferenzierung *in vitro*: Rolle des nukleären Hormonrezeptors PPAR γ . 1999. Dissertation Westfälische Wilhelms-Universität.
272. Muragaki, Y., Nishimura, I., Henney, A., Ninomiya, Y., und Olsen, B.R. (1990). The alpha 1 (IX) collagen gene gives rise to two different transcripts in both mouse embryonic and human fetal RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 87, 2400-2404.
273. Murakami, S., Balmes, G., McKinney, S., Zhang, Z., Givol, D., und de Crombrugge, 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.
274. Murakami, S., Kan, M., McKeehan, W.L., und de Crombrugge, B. (2000). Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97, 1113-1118.
275. Muratoglu, S., Bachrati, C., Malpeli, M., Szabo, P., Neri, M., Dozin, B., Deak, F., Cancedda, R., und Kiss, I. (1995). Expression of the cartilage matrix protein gene at different chondrocyte developmental stages. Eur. J. Cell Biol. 68, 411-418.
276. Myllyharju, J. und Kivirikko, K.I. (2001). Collagens and collagen-related diseases. Ann. Med. 33, 7-21.
277. Nagata, K., Guggenheimer, R.A., Enomoto, T., Lichy, J.H., und Hurwitz, J. (1982). Adenovirus DNA replication *in vitro*: identification of a host factor that stimulates synthesis of the preterminal protein-dCMP complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 79, 6438-6442.
278. Nakao, A., Imamura, T., Souchelnytskyi, S., Kawabata, M., Ishisaki, A., Oeda, E., Tamaki, K., Hanai, J., Heldin, C.H., Miyazono, K., und ten Dijke, P. (1997). TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. EMBO J. 16, 5353-5362.
279. Naski, M.C., Colvin, J.S., Coffin, J.D., und Ornitz, D.M. (1998). Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3. Development 125, 4977-4988.
280. Nehls, M.C., Rippe, R.A., Veloz, L., und Brenner, D.A. (1991). Transcription factors nuclear factor I and Sp1 interact with the murine collagen alpha 1 (I) promoter. Mol. Cell Biol. 11, 4065-4073.
281. Newman, B., Gigout, L.I., Sudre, L., Grant, M.E., und Wallis, G.A. (2001). Coordinated expression of matrix Gla protein is required during endochondral ossification for chondrocyte survival. J. Cell Biol. 154, 659-666.
282. Ng, L.J., Wheatley, S., Muscat, G.E., Conway-Campbell, J., Bowles, J., Wright, E., Bell, D.M., Tam, P.P., Cheah, K.S., und Koopman, P. (1997). SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. Dev. Biol. 183, 108-121.
283. Nishihara, A., Fujii, M., Sampath, T.K., Miyazono, K., und Reddi, A.H. (2003). Bone morphogenetic protein signaling in articular chondrocyte differentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 301, 617-622.
284. Niyibizi, C. und Eyre, D.R. (1989). Identification of the cartilage alpha 1(XI) chain in type V collagen from bovine bone. FEBS Lett. 242, 314-318.
285. Norman, A.W. und Hurwitz, S. (1993). The role of the vitamin D endocrine system in avian bone biology. J. Nutr. 123, 310-316.
286. Novak, A., Goyal, N., und Gronostajski, R.M. (1992). Four conserved cysteine residues are required for the DNA binding activity of nuclear factor I. J. Biol. Chem. 267, 12986-12990.
287. Ohlsson, C., Nilsson, A., Isaksson, O., Bentham, J., und Lindahl, A. (1992). Effects of tri-iodothyronine and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on alkaline phosphatase activity, [3H]thymidine incorporation and IGF-I receptor mRNA in cultured rat epiphyseal chondrocytes. J. Endocrinol. 135, 115-123.

288. Okada,H., Watanabe,T., Niki,M., Takano,H., Chiba,N., Yanai,N., Tani,K., Hibino,H., Asano,S., Mucenski,M.L., Ito,Y., Noda,T., und Satake,M. (1998). AML1(-/-) embryos do not express certain hematopoiesis-related gene transcripts including those of the PU.1 gene. *Oncogene* 17, 2287-2293.
289. Okubo,Y. und Reddi,A.H. (2003). Thyroxine downregulates Sox9 and promotes chondrocyte hypertrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306, 186-190.
290. Okuda,T., van Deursen,J., Hiebert,S.W., Grosveld,G., und Downing,J.R. (1996). AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84, 321-330.
291. Olney,R.C. und Mougey,E.B. (1999). Expression of the components of the insulin-like growth factor axis across the growth-plate. *Mol. Cell Endocrinol.* 156, 63-71.
292. Olsen,B.R. (1996). Role of cartilage collagens in formation of the skeleton. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 785, 130.
293. Ornitz,D.M. und Marie,P.J. (2002). FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev.* 16, 1465.
294. Ortega,N., Behonick,D., Stickens,D., und Werb,Z. (2003). How proteases regulate bone morphogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 995, 109-116.
295. Ortega,N., Behonick,D.J., und Werb,Z. (2004). Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol.* 14, 86-93.
296. Osada,S., Ikeda,T., Xu,M., Nishihara,T., und Imagawa,M. (1997). Identification of the transcriptional repression domain of nuclear factor 1-A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238, 744-747.
297. Osada,S., Matsubara,T., Daimon,S., Terazu,Y., Xu,M., Nishihara,T., und Imagawa,M. (1999). Expression, DNA-binding specificity and transcriptional regulation of nuclear factor 1 family proteins from rat. *Biochem. J.* 342 (Pt 1), 189-198.
298. Oshima,O., Leboy,P.S., McDonald,S.A., Tuan,R.S., und Shapiro,I.M. (1989). Developmental expression of genes in chick growth cartilage detected by in situ hybridization. *Calcif. Tissue Int.* 45, 182-192.
299. Otto,F., Thornell,A.P., Crompton,T., Denzel,A., Gilmour,K.C., Rosewell,I.R., Stamp,G.W., Beddington,R.S., Mundlos,S., Olsen,B.R., Selby,P.B., und Owen,M.J. (1997). Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89, 765-771.
300. Pace,J.M., Corrado,M., Missero,C., und Byers,P.H. (2003). Identification, characterization and expression analysis of a new fibrillar collagen gene, COL27A1. *Matrix Biol.* 22, 3-14.
301. Pacifici,M., Cossu,G., Molinaro,M., und Tato,F. (1980). Vitamin A inhibits chondrogenesis but not myogenesis. *Exp. Cell Res.* 129, 469-474.
302. Pacifici,M., Golden,E.B., Iwamoto,M., und Adams,S.L. (1991). Retinoic acid treatment induces type X collagen gene expression in cultured chick chondrocytes. *Exp. Cell Res.* 195, 38-46.
303. Pan,T.C., Zhang,R.Z., Sudano,D.G., Marie,S.K., Bonnemann,C.G., und Chu,M.L. (2003). New molecular mechanism for Ullrich congenital muscular dystrophy: a heterozygous in-frame deletion in the COL6A1 gene causes a severe phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 355-369.
304. Pateder,D.B., Rosier,R.N., Schwarz,E.M., Reynolds,P.R., Puzas,J.E., D'Souza,M., und O'Keefe,R.J. (2000). PTHrP expression in chondrocytes, regulation by TGF-beta, and interactions between epiphyseal and growth plate chondrocytes. *Exp. Cell Res.* 256, 555-562.
305. Pathi,S., Rutenberg,J.B., Johnson,R.L., und Vortkamp,A. (1999). Interaction of Ihh and BMP/Noggin signaling during cartilage differentiation. *Dev. Biol.* 209, 239-253.

306. Pendas,A.M., Balbin,M., Llano,E., Jimenez,M.G., und Lopez-Otin,C. (1997). Structural analysis and promoter characterization of the human collagenase-3 gene (MMP13). *Genomics* 40, 222-233.
307. Pevny,L.H. und Lovell-Badge,R. (1997). Sox genes find their feet. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 338-344.
308. Pirok,E.W., III, Li,H., Mensch,J.R., Jr., Henry,J., und Schwartz,N.B. (1997). Structural and functional analysis of the chick chondroitin sulfate proteoglycan (aggrecan) promoter and enhancer region. *J. Biol. Chem.* 272, 11566-11574.
309. Poole,A.R. (1991). The growth plate: cellular physiology, cartilage assembly and mineralization. In: *Cartilage: Molecular Aspects.*, B.K.Hall and S.A.Newman, eds. (Boca Raton: CRC Press), 179-211.
310. Poole,C.A. (1997). Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J. Anat.* 191, 1-13.
311. Poole,C.A., Flint,M.H., und Beaumont,B.W. (1984). Morphological and functional interrelationships of articular cartilage matrices. *J. Anat.* 138 (Pt 1), 113-138.
312. Powers,C.J., McLeskey,S.W., und Wellstein,A. (2000). Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr. Relat Cancer* 7, 165-197.
313. Prockop,D.J. und Kivirikko,K.I. (1995). Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 403-434.
314. Quarto,R., Campanile,G., Cancedda,R., und Dozin,B. (1992). Thyroid hormone, insulin, and glucocorticoids are sufficient to support chondrocyte differentiation to hypertrophy: a serum-free analysis. *J. Cell Biol.* 119, 989-995.
315. Quarto,R., Dozin,B., Bonaldo,P., Cancedda,R., und Colombatti,A. (1993). Type VI collagen expression is upregulated in the early events of chondrocyte differentiation. *Development* 117, 245-251.
316. Rajas,F., Delhase,M., De La,H.M., Verdood,P., Castrillo,J.L., und Hooghe-Peters,E.L. (1998). Nuclear factor 1 regulates the distal silencer of the human PIT1/GHF1 gene. *Biochem. J.* 333 (Pt 1), 77-84.
317. Ratcliff,A., Fryer,P.R., und Hardingham,T.E. (1984). The distribution of aggregating proteoglycans in articular cartilage: Comparison of quantitative immunoelectron microscopy with radioimmunoassay and biochemical analysis. *J. Histochem. Cytochem.* 32, 193-201.
318. Reddi,A.H. (1992). Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 850-855.
319. Reginato,A.M., Lash,J.W., und Jimenez,S.A. (1986). Biosynthetic expression of type X collagen in embryonic chick sternum cartilage during development. *J. Biol. Chem.* 261, 2897-2904.
320. Rehm,H. (1997). *Der Experimentator: Proteinbiochemie.* (Stuttgart; Jena; Lübeck; Ulm: G. Fischer-Verlag).
321. Reinecke,M., Schmid,A.C., Heyberger-Meyer,B., Hunziker,E.B., und Zapf,J. (2000). Effect of growth hormone and insulin-like growth factor I (IGF-I) on the expression of IGF-I messenger ribonucleic acid and peptide in rat tibial growth plate and articular chondrocytes in vivo. *Endocrinology* 141, 2847-2853.
322. Riemer,S., Gebhard,S., Beier,F., Poschl,E., und von der,M.K. (2002). Role of c-fos in the regulation of type X collagen gene expression by PTH and PTHrP: localization of a PTH/PTHrP-responsive region in the human COL10A1 enhancer. *J. Cell Biochem.* 86, 688-699.
323. Ristiniemi,J. und Oikarinen,J. (1989). Histone H1 binds to the putative nuclear factor I recognition sequence in the mouse alpha 2(I) collagen promoter. *J. Biol. Chem.* 264, 2164-2174.
324. Ritvaniemi,P., Korkko,J., Bonaventure,J., Vikkula,M., Hyland,J., Paassilta,P., Kaitila,I., Kaariainen,H., Sokolov,B.P., Hakala,M. (1995). Identification of COL2A1 gene mutations in patients with chondrodysplasias and familial osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 38, 999-1004.

325. Roach,H.I., Erenpreisa,J., und Aigner,T. (1995). Osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes involves asymmetric cell divisions and apoptosis. *J. Cell Biol.* *131*, 483-494.
326. Roach,H.I. und Shearer,J.R. (1989). Cartilage resorption and endochondral bone formation during the development of long bones in chick embryos. *Bone Miner.* *6*, 289-309.
327. Robson,H., Siebler,T., Stevens,D.A., Shalet,S.M., und Williams,G.R. (2000). Thyroid hormone acts directly on growth plate chondrocytes to promote hypertrophic differentiation and inhibit clonal expansion and cell proliferation. *Endocrinology* *141*, 3887-3897.
328. Romer,A.S. und Parsons,T.S. (1991). *Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere.* (Hamburg, Berlin: Verlag Paul Parey).
329. Rosenthal,A.K. und Henry,L.A. (1999). Thyroid hormones induce features of the hypertrophic phenotype and stimulate correlates of CPPD crystal formation in articular chondrocytes. *J. Rheumatol.* *26*, 401.
330. Roughley,P.J. (2001). Articular cartilage and changes in arthritis: noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of cartilage. *Arthritis Res.* *3*, 342-347.
331. Roulet,E., Armentero,M.T., Krey,G., Corthesy,B., Dreyer,C., Mermod,N., und Wahli,W. (1995). Regulation of the DNA-binding and transcriptional activities of *Xenopus laevis* NFI-X by a novel C-terminal domain. *Mol. Cell Biol.* *15*, 5552-5562.
332. Rousseau,F., Saugier,P., Le Merrer,M., Munnich,A., Delezoide,A.L., Maroteaux,P., Bonaventure,J., Narcy,F., und Sanak,M. (1995). Stop codon FGFR3 mutations in thanatophoric dwarfism type 1. *Nat. Genet.* *10*, 11-12.
333. Rupp,R.A., Kruse,U., Multhaup,G., Gobel,U., Beyreuther,K., und Sippel,A.E. (1990). Chicken NFI/TGGCA proteins are encoded by at least three independent genes: NFI-A, NFI-B and NFI-C with homologues in mammalian genomes. *Nucleic Acids Res.* *18*, 2607-2616.
334. Sakai,M., Imaki,J., Yoshida,K., Ogata,A., Matsushima-Hibaya,Y., Kuboki,Y., Nishizawa,M., und Nishi,S. (1997). Rat maf related genes: specific expression in chondrocytes, lens and spinal cord. *Oncogene* *14*, 745-750.
335. Saksela,O., Moscatelli,D., Sommer,A., und Rifkin,D.B. (1988). Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J. Cell Biol.* *107*, 743-751.
336. Salter,D.M., Hughes,D.E., Simpson,R., und Gardner,D.L. (1992). Integrin expression by human articular chondrocytes. *Br. J. Rheumatol.* *31*, 231-234.
337. Sambrook,J., Fritsch,E.F., Maniatis, und T. (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
338. Sandell,L.J., Morris,N., Robbins,J.R., und Goldring,M.B. (1991). Alternatively spliced type II procollagen mRNAs define distinct populations of cells during vertebral development: differential expression of the amino-propeptide. *J. Cell Biol.* *114*, 1307-1319.
339. Sanger,F., Air,G.M., Barrell,B.G., Brown,N.L., Coulson,A.R., Fiddes,C.A., Hutchison,C.A., Slocombe,P.M., und Smith,M. (1977). Nucliotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* *265*, 687-695.
340. Santoro,C., Mermod,N., Andrews,P.C., und Tjian,R. (1988). A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs. *Nature* *334*, 218-224.
341. Sawada,R., Tsubo,S., und Fukada,M. (1994). Defferential E-selectin-dependent adhesion efficiency in sublimes of a human colon cancer exhibiting distinct metastatic potentials. *J. Biol. Chem.* *269*, 1431.

342. Scassa,M.E., Guberman,A.S., Ceruti,J.M., und Canepa,E.T. (2004). Hepatic nuclear factor 3 and nuclear factor 1 regulate 5-aminolevulinic synthase gene expression and are involved in insulin repression. *J. Biol. Chem.* *279*, 28082-28092.
343. Schäfer,A.J., Foster,J.W., Kwok,C., Weller,P.A., Guioli,S., und Goodfellow,P.N. (1996). Campomelic dysplasia with XY sex reversal: diverse phenotypes resulting from mutations in a single gene. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *785*, 137-149.
344. Schepers,G.E., Bullejos,M., Hosking,B.M., und Koopman,P. (2000). Cloning and characterisation of the Sry-related transcription factor gene Sox8. *Nucleic Acids Res.* *28*, 1473-1480.
345. Schipani,E., Lanske,B., Hunzelman,J., Luz,A., Kovacs,C.S., Lee,K., Pirro,A., Kronenberg,H.M., und Juppner,H. (1997). Targeted expression of constitutively active receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide delays endochondral bone formation and rescues mice that lack parathyroid hormone-related peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 13689-13694.
346. Schmid,T.M. und Linsenmayer,T.F. (1987). Type X collagen. In: Structure and function of collagen types., R.Mayne and R.E.Burgeson, eds. (Orlando, Florida: Academic Press), 223-259.
347. Schmid,T.M. und Linsenmayer,T.F. (1990). Immunoelectron microscopy of type X collagen: supramolecular forms within embryonic chick cartilage. *Dev. Biol.* *138*, 53-62.
348. Schorle,H., Meier,P., Buchert,M., Jaenisch,R., und Mitchell,P.J. (1996). Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature* *381*, 235-238.
349. Seegmiller,R., Fraser,F.C., und Sheldon,H. (1971). A new chondrodystrophic mutant in mice. Electron microscopy of normal and abnormal chondrogenesis. *J. Cell Biol.* *48*, 580-593.
350. Sekiya,I., Tsuji,K., Koopman,P., Watanabe,H., Yamada,Y., Shinomiya,K., Nifuji,A., und Noda,M. (2000). SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J. Biol. Chem.* *275*, 10738-10744.
351. Sen,M., Chamorro,M., Reifert,J., Corr,M., und Carson,D.A. (2001). Blockade of Wnt-5A/frizzled 5 signaling inhibits rheumatoid synoviocyte activation. *Arthritis Rheum.* *44*, 772-781.
352. Serra,R., Johnson,M., Filvaroff,E.H., LaBorde,J., Sheehan,R., Derynck,R., und Moses,H.L. (1997). Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *J. Cell Biol.* *139*, 552.
353. Serra,R., Karaplis,A., und Sohn,P. (1999). Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)-dependent and -independent effects of transforming growth factor beta (TGF-beta) on endochondral bone formation. *J. Cell Biol.* *145*, 783-794.
354. Shaw,L.M. und Olsen,B.R. (1991). FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices. *Trends Biochem. Sci.* *16*, 191-194.
355. Shuman,S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.* *269*, 32678-32684.
356. Silvestrini,G., Ballanti,P., Patacchioli,F.R., Mocetti,P., Di Grezia,R., Wedard,B.M., Angelucci,L., und Bonucci,E. (2000). Evaluation of apoptosis and the glucocorticoid receptor in the cartilage growth plate and metaphyseal bone cells of rats after high-dose treatment with corticosterone. *Bone* *26*, 33-42.
357. Sitcheran,R., Cogswell,P.C., und Baldwin,A.S., Jr. (2003). NF-kappaB mediates inhibition of mesenchymal cell differentiation through a posttranscriptional gene silencing mechanism. *Genes Dev.* *17*, 2368-2373.
358. Smink,J.J., Koster,J.G., Gresnigt,M.G., Rooman,R., Koedam,J.A., und Buul-Offers,S.C. (2002). IGF and IGF-binding protein expression in the growth plate of normal, dexamethasone-treated and human IGF-II transgenic mice. *J. Endocrinol.* *175*, 143-153.

359. Smits,P., Dy,P., Mitra,S., und Lefebvre,V. (2004). Sox5 and Sox6 are needed to develop and maintain source, columnar, and hypertrophic chondrocytes in the cartilage growth plate. *J. Cell Biol.* *164*, 747-758.
360. Smits,P., Li,P., Mandel,J., Zhang,Z., Deng,J.M., Behringer,R.R., de Crombrugge,B., und Lefebvre,V. (2001). The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev. Cell* *1*, 277-290.
361. Sock,E., Schmidt,K., Hermanns-Borgmeyer,I., Bosl,M.R., und Wegner,M. (2001). Idiopathic weight reduction in mice deficient in the high-mobility-group transcription factor Sox8. *Mol. Cell Biol.* *21*, 6951-6959.
362. Solloway,M.J., Dudley,A.T., Bikoff,E.K., Lyons,K.M., Hogan,B.L., und Robertson,E.J. (1998). Mice lacking Bmp6 function. *Dev. Genet.* *22*, 321-339.
363. Sovantaus,M., Ihanamaki,M., Perals,M., Metsaranta,M., Sandberg-Lall,M., und Vuorio,E. (1998). Expression of type II and IX collagen isoforms during normal and pathological cartilage and eye development. *Histochem. Cell Biol.* *110*, 159.
364. St Jacques,B., Hammerschmidt,M., und McMahon,A.P. (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* *13*, 2072-2086.
365. Stefancsik,R. und Sarkar,S. (2003). Relationship between the DNA binding domains of SMAD and NFI/CTF transcription factors defines a new superfamily of genes. *DNA Seq.* *14*, 233-239.
366. Stevenson,S., Hunziker,E.B., Herrmann,W., und Schenk,R.K. (1990). Is longitudinal bone growth influenced by diurnal variation in the mitotic activity of chondrocytes of the growth plate? *J. Orthop. Res.* *8*, 132-135.
367. Stove,J., Fiedler,J., Huch,K., Gunther,K.P., Puhl,W., und Brenner,R. (2002). Lipofection of rabbit chondrocytes and long lasting expression of a lacZ reporter system in alginate beads. *Osteoarthritis. Cartilage.* *10*, 212-217.
368. Stricker,S., Fundele,R., Vortkamp,A., und Mundlos,S. (2002). Role of Runx genes in chondrocyte differentiation. *Dev. Biol.* *245*, 95-108.
369. Stubbs,A.P., Abel,P.D., Golding,M., Bhangal,G., Wang,Q., Waxman,J., Stamp,G.W., und Lalani,E.N. (1999). Differentially expressed genes in hormone refractory prostate cancer: association with chromosomal regions involved with genetic aberrations. *Am. J. Pathol.* *154*, 1335-1343.
370. Suda,N., Shibata,S., Yamazaki,K., Kuroda,T., Senior,P.V., Beck,F., und Hammond,V.E. (1999). Parathyroid hormone-related protein regulates proliferation of condylar hypertrophic chondrocytes. *J. Bone Miner. Res.* *14*, 1838-1847.
371. Swiderski,R.E. und Solursh,M. (1992). Localization of type II collagen, long form alpha 1(IX) collagen, and short form alpha 1(IX) collagen transcripts in the developing chick notochord and axial skeleton. *Dev. Dyn.* *194*, 118-127.
372. Sylvia,V.L., Schwartz,Z., Schuman,L., Morgan,R.T., Mackey,S., Gomez,R., und Boyan,B.D. (1993). Maturation-dependent regulation of protein kinase C activity by vitamin D3 metabolites in chondrocyte cultures. *J. Cell Physiol* *157*, 278.
373. Szabo,P., Moitra,J., Rencendorj,A., Rakhely,G., Rauch,T., und Kiss,I. (1995). Identification of a nuclear factor-I family protein-binding site in the silencer region of the cartilage matrix protein gene. *J. Biol. Chem.* *270*, 10212-10221.
374. Szüts,V., Möllers,U., Bittner,K., Schürmann,G., Muratoglu,S., Deak,F., Kiss,I., und Bruckner,P. (1998). Terminal differentiation of chondrocytes is arrested at distinct stages identified by their expression repertoire of marker genes. *Matrix Biol.* *17*, 435-448.

375. Takeda,S., Bonnamy,J.P., Owen,M.J., Ducy,P., und Karsenty,G. (2001). Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev.* 15, 467-481.
376. Tanaka,K., Tsumaki,N., Kozak,C.A., Matsumo,Y., Nakatani,F., Iwamoto,Y., und et al. (2002). A Kruppel-associated box-zinc finger protein, NTS, represses cell-type-specific promoter activity of the alpha-2(XI) collagen gene. *Mol. Cell Biol.* 22, 4267.
377. Tanese,N., Pugh,B.F., und Tjian,R. (1991). Coactivators for a proline-rich activator purified from the multisubunit human TFIID complex. *Genes Dev.* 5, 2212-2224.
378. Tavormina,P.L., Shiang,R., Thompson,L.M., Zhu,Y.Z., Wilkin,D.J., Lachman,R.S., Wilcox,W.R., Rimoin,D.L., Cohn,D.H., und Wasmuth,J.J. (1995). Thanatophoric dysplasia (types I und II) caused by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3. *Nat. Genet.* 9, 321-328.
379. Temenoff,J.S. und Mikos,A.G. (2000). Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 21, 431-440.
380. ten Dijke,P., Miyazono,K., und Heldin,C.H. (2000). Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling. *Trends Biochem. Sci.* 25, 64-70.
381. Torres,E.S., Andrade,C.V., Fonseca,E.C., Mello,M.A., und Duarte,M.E. (2003). Insulin impairs the maturation of chondrocytes in vitro. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36, 1185-1192.
382. Tschan,T., Böhme,K., Conscience-Egli,M., Zenke,G., Winterhalter,K.H., und Bruckner,P. (1993). Autocrine or paracrine transforming growth factor-beta modulates the phenotype of chick embryo sternal chondrocytes in serum-free agarose culture. *J. Biol. Chem.* 268, 5156-5161.
383. Tschan,T., Hoerler,I., Houze,Y., Winterhalter,K.H., Richter,C., und Bruckner,P. (1990). Resting chondrocytes in culture survive without growth factors, but are sensitive to toxic oxygen metabolites. *J. Cell Biol.* 111, 260.
384. Tuckermann,J.P., Pittois,K., Partridge,N.C., Merregaert,J., und Angel,P. (2000). Collagenase-3 (MMP-13) and integral membrane protein 2a (Itm2a) are marker genes of chondrogenic/osteoblastic cells in bone formation: sequential temporal, and spatial expression of Itm2a, alkaline phosphatase, MMP-13, and osteocalcin in the mouse. *J. Bone Miner. Res.* 15, 1257-1265.
385. Underhill,T.M., Sampaio,A.V., und Weston,A.D. (2001). Retinoid signalling and skeletal development. *Novartis. Found. Symp.* 232, 171-185.
386. Valcourt,U., Gouttenoire,J., Moustakas,A., Herbage,D., und Mallein-Gerin,F. (2002). Functions of transforming growth factor-beta family type I receptors and Smad proteins in the hypertrophic maturation and osteoblastic differentiation of chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 277, 33545-33558.
387. van der Eerden,B.C., Karperien,M., Gevers,E.F., Lowik,C.W., und Wit,J.M. (2000). Expression of Indian hedgehog, parathyroid hormone-related protein, and their receptors in the postnatal growth plate of the rat: evidence for a locally acting growth restraining feedback loop after birth. *J. Bone Miner. Res.* 15, 1055.
388. van der Eerden,B.C., Karperien,M., und Wit,J.M. (2003). Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocr. Rev.* 24, 782-801.
389. van der Rest,M. und Mayne,R. (1988). Type IX collagen proteoglycan from cartilage is covalently cross-linked to type II collagen. *J. Biol. Chem.* 263, 1615-1618.
390. van der Rest,M. und Garrone,R. (1991). Collagen family of proteins. *FASEB J.* 5, 2814-2823.
391. Vikkula,M., Mariman,E.C., Lui,V.C., Zhidkova,G.E., Tiller,G.E., Goldring,M.B., van Beersum,S.E., Waal Malefijt,M.C., van den Hoogen,F.H., und Ropers,H.H. (1995). Autosomal dominant and recessive osteochondrodysplasias associated with the COL11A2 locus. *Cell* 80, 437.

392. von der Mark,H., Aumailley,M., Wick,G., Fleischmajer,R., und Timpl,R. (1984). Immunochemistry, genuine size and tissue localization of collagen VI. *Eur. J. Biochem.* 142, 493-502.
393. von der Mark,K., Schober,S., und Goodman,S.L. (1999). Integrins in cell migration. *Methods Mol. Biol.* 129, 219-230.
394. von Stein,O.D., Thies,W.G., und Hofmann,M. (1997). A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res.* 25, 2598-2602.
395. Vortkamp,A., Lee,K., Lanske,B., Segre,G.V., Kronenberg,H.M., und Tabin,C.J. (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 273, 613-622.
396. Vortkamp,A., Pathi,S., Peretti,G.M., Caruso,E.M., Zaleske,D.J., und Tabin,C.J. (1998). Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. *Mech. Dev.* 71, 65-76.
397. Vu,T.H., Shipley,J.M., Bergers,G., Berger,J.E., Helms,J.A., Hanahan,D., Shapiro,S.D., Senior,R.M., und Werb,Z. (1998). MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93, 411-422.
398. Wagner,T., Wirth,J., Meyer,J., Zabel,B., Held,M., Zimmer,J., Pasantes,J., Bricarelli,F.D., Keutel,J., Hustert,E., und . (1994). Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79, 1111-1120.
399. Walker,G.D., Fischer,M., Gannon,J., Thompson,R.C., Jr., und Oegema,T.R., Jr. (1995). Expression of type-X collagen in osteoarthritis. *J. Orthop. Res.* 13, 4-12.
400. Wallis,G.A. (1996). Bone growth: coordinating chondrocyte differentiation. *Curr. Biol.* 6, 1577-1580.
401. Wang,G., Woods,A., Sabari,S., Pagnotta,L., Stanton,L.A., und Beier,F. (2004). RhoA/ROCK signaling suppresses hypertrophic chondrocyte differentiation. *J. Biol. Chem.*
402. Wang,J., Zhou,J., und Bondy,C.A. (1999). Igf1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy. *FASEB J.* 13, 1985-1990.
403. Wang,Q., Stacy,T., Binder,M., Marin-Padilla,M., Sharpe,A.H., und Speck,N.A. (1996). Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 3444-3449.
404. Wang,W. und Kirsch,T. (2002). Retinoic acid stimulates annexin-mediated growth plate chondrocyte mineralization. *J. Cell Biol.* 157, 1061-1069.
405. Wang,W., Xu,J., und Kirsch,T. (2003). Annexin-mediated Ca²⁺ influx regulates growth plate chondrocyte maturation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 3762-3769.
406. Wang,Z. und Brown,D.D. (1991). A gene expression screen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 11505-11509.
407. Waring,P. und Beaver,J. (1996). Cyclosporin A rescues thymocytes from apoptosis induced by very low concentrations of thapsigargin: effects on mitochondrial function. *Exp. Cell Res.* 227, 264-276.
408. Warman,M.L., Abbott,M., Apte,S.S., Hefferon,T., McIntosh,I., Cohn,D.H., Hecht,J.T., Olsen,B.R., und Francomano,C.A. (1993). A type X collagen mutation causes Schmid metaphyseal chondrodysplasia. *Nat. Genet.* 5, 79-82.
409. Weil,D., Mattei,M.G., Passage,E., N'Guyen,V.C., Pribula-Conway,D., Mann,K., Deutzmann,R., Timpl,R., und Chu,M.L. (1988). Cloning and chromosomal localization of human genes encoding the three chains of type VI collagen. *Am. J. Hum. Genet.* 42, 435-445.

410. Weir,E.C., Philbrick,W.M., Amling,M., Neff,L.A., Baron,R., und Broadus,A.E. (1996). Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 10240-10245.
411. Weisser,J., Riemer,S., Schmidl,M., Suva,L.J., Poschl,E., Brauer,R., und von der,M.K. (2002). Four distinct chondrocyte populations in the fetal bovine growth plate: highest expression levels of PTH/PTHrP receptor, Indian hedgehog, and MMP-13 in hypertrophic chondrocytes and their suppression by PTH (1-34) and PTHrP (1-40). *Exp. Cell Res.* *279*, 1-13.
412. Werb,Z. (1997). ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* *91*, 439-442.
413. White,C., Gardiner,E., und Eisman,J. (1998). Tissue specific and vitamin D responsive gene expression in bone. *Mol. Biol. Rep.* *25*, 45-61.
414. Whitman,M. (1998). Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily. *Genes Dev.* *12*, 2445-2462.
415. Williams,C.J. und Jimenez,S.A. (1995). Heritable diseases of cartilage caused by mutations in collagen genes. *J. Rheumatol. Suppl* *157*, 403.
416. Winnier,G., Blessing,M., Labosky,P.A., und Hogan,B.L. (1995). Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev.* *9*, 2105-2116.
417. Winterbottom,N., Tondrari,M.M., Harrington,T.L., Klier,F.G., Vertel,B.M., und Goetinck,P.F. (1992). Cartilage matrix protein is a component of the collagen fibril of cartilage. *Dev. Dyn.* *193*, 266-276.
418. Wirth,C.J. und Rudert,M. (1996). Techniques of cartilage growth enhancement: a review of the literature. *Arthroscopy* *12*, 300-308.
419. Wodarz,A. und Nusse,R. (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *14*, 59-88.
420. WOLBACH,S.B. und HEGSTED,D.M. (1952). Hypervitaminosis A and the skeleton of growing chicks. *AMA. Arch. Pathol.* *54*, 30-38.
421. Woods,K.A., Camacho-Hubner,C., Savage,M.O., und Clark,A.J. (1996). Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N. Engl. J. Med.* *335*, 1363-1367.
422. Woods,V.L., Jr., Schreck,P.J., Gesink,D.S., Pacheco,H.O., Amiel,D., Akeson,W.H., und Lotz,M. (1994). Integrin expression by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* *37*, 537-544.
423. Wozney,J.M. (1992). The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* *32*, 160-167.
424. Wright,E., Hargrave,M.R., Christiansen,J., Cooper,L., Kun,J., Evans,T., Gangadharan,U., Greenfield,A., und Koopman,P. (1995). The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat. Genet.* *9*, 15-20.
425. Wu,C.W., Tchetina,E.V., Mwale,F., Hasty,K., Pidoux,I., Reiner,A., Chen,J., Van Wart,H.E., und Poole,A.R. (2002). Proteolysis involving matrix metalloproteinase 13 (collagenase-3) is required for chondrocyte differentiation that is associated with matrix mineralization. *J. Bone Miner. Res.* *17*, 639-651.
426. Wu,J.J., Woods,P.E., und Eyre,D.R. (1992). Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding. *J. Biol. Chem.* *267*, 23007-23014.
427. Wu,Y.Y. und Rees,J.L. (2000). Variation in epidermal housekeeping gene expression in different pathological states. *Acta Derm Venerol.* *80*, 2-3.

428. Xiao,H., Lis,J.T., Xiao,H., Greenblatt,J., und Friesen,J.D. (1994). The upstream activator CTF/NF1 and RNA polymerase II share a common element involved in transcriptional activation. *Nucleic Acids Res.* *22*, 1966-1973.
429. Xiao,Z.S., Hjelmelund,A.B., und Quarles,L.D. (2004). Selective deficiency of the "bone-related" Runx2-II unexpectedly preserves osteoblast-mediated skeletogenesis. *J. Biol. Chem.* *279*, 20307-20313.
430. Xie,W.F., Kondo,S., und Sandell,L.J. (1998). Regulation of the mouse cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein gene by the transcription factor AP-2. *J. Biol. Chem.* *273*, 5026-5032.
431. Xu,J., Stolk,J.A., Zhang,X., Silva,S.J., Houghton,R.L., Matsumura,M., Vedvick,T.S., Leslie,K.B., Badaro,R., und Reed,S.G. (2000). Identification of differentially expressed genes in human prostate cancer using subtraction and microarray. *Cancer Res.* *60*, 1677-1682.
432. Yagishita,N., Yamamoto,Y., Yoshizawa,T., Sekine,K., Uematsu,Y., Murayama,H., Nagai,Y., Krezel,W., Chambon,P., Matsumoto,T., und Kato,S. (2001). Aberrant growth plate development in VDR/RXR gamma double null mutant mice. *Endocrinology* *142*, 5332-5341.
433. Yang,X., Chen,L., Xu,X., Li,C., Huang,C., und Deng,C.X. (2001). TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *J. Cell Biol.* *153*, 35-46.
434. Yi,S.E., Daluiski,A., Pederson,R., Rosen,V., und Lyons,K.M. (2000). The type I BMP receptor BMPRII is required for chondrogenesis in the mouse limb. *Development* *127*, 621-630.
435. Yoshida,C.A., Furuichi,T., Fujita,T., Fukuyama,R., Kanatani,N., Kobayashi,S., Satake,M., Takada,K., und Komori,T. (2002). Core-binding factor beta interacts with Runx2 and is required for skeletal development. *Nat. Genet.* *32*, 633-638.
436. Yoshida,C.A., Yamamoto,H., Fujita,T., Furuichi,T., Ito,K., Inoue,K., Yamana,K., Zanma,A., Takada,K., Ito,Y., und Komori,T. (2004). Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev.* *18*, 952-963.
437. Zambotti,A., Makhluh,H., Shen,J., und Ducy,P. (2002). Characterization of an osteoblast-specific enhancer element in the CBFA1 gene. *J. Biol. Chem.* *277*, 41497-41506.
438. Zhang,H. und Bradley,A. (1996). Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* *122*, 2977-2986.
439. Zhang,J., Hagopian-Donaldson,S., Serbedzija,G., Elsemore,J., Plehn-Dujowich,D., McMahon,A.P., Flavell,R.A., und Williams,T. (1996). Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. *Nature* *381*, 238-241.
440. Zhang,P., Jobert,A.S., Couvineau,A., und Silve,C. (1998). A homozygous inactivating mutation in the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor causing Blomstrand chondrodysplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab* *83*, 3365-3368.
441. Zheng,Q., Zhou,G., Morello,R., Chen,Y., Garcia-Rojas,X., und Lee,B. (2003). Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo. *J. Cell Biol.* *162*, 833-842.
442. Zou,H., Wieser,R., Massague,J., und Niswander,L. (1997). Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev.* *11*, 2191-2203.

7. Anhang

7.1 Sequenzen der potentiell hochregulierten Gene in kaudalen Chondrozyten

7.1.1 Sequenzen des ersten Screenings A

A29:

GAATTCGCCCCTTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGTACTAAATGTATCTAAAGAAACACACAGCCCTACAAAAGTTG
 TTCTCAGAGAAATATCATTGAGATGGGGCACCTCTTCCAGTTTGCTAAAAGTTCTATATGATATAAGCACAAAT
 TAACAGCTTGATGAAGACATAACCTAATGCAGCTCATGAGAAGCCTATGCCTGGGACTTGAGGAACCCCTCACAT
 TCTACACTGTTGTAGAGATTTTTATTTTTATTTTTTTTTGAAGAAAAATGTTATCTGAAACATATTTTACAAACTG
 AACTTCAANNAGAAGACTGTGAAATTGAACAGGGCACTGCTTAATTTTTGTTTTGAGATTTTTTTGGNAAAACATT
 TTGCCTGGGTTTTTNGTTTTCTTTCTTCAATTTTGNATTAACCTTTTTNNTNAAGNCCCATGCCAACTTNAATGGCC
 CCTTNAATGNAAGAAATGNCNNAAGGCCCTACCTTCTTAAAAAAANTTCTTTTTTGNNTNAAAAGAAACNTT
 TTGCCNCATNAGNCCCCTNNTGGNCCNANNTTNAAAAACCTNNTNTNACAAAATCCCNNTATNCAANACNNGGG
 TTTNNNTGGAACNANCTNNACCGGGTTTCTNNTTNTTAGAACCCCTNNTTNTTTNTTGGGNNTGGNNNGCCA
 AAAAATTTGAANGGTTTTTTNGNTTCCCNNTTNGGGGCNCCNCCNANNCNNTNNGG

A31:

GAATTCGCCCCTTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGTACAGCCAATTTACTGGTAATACCTTGTCTCATAGCAAGGTT
 CTGACAAAATGTTTGTCTAGGCTTTTTTTCCCTTCACTGTGAAGCACTGAAAGCTGCTATTTTTTTTAGTGCACA
 TATGTCTTAATAAAGTAATGCCAGCTAAGTGCTATAGGGAAGGCAAAGGATGCTTGGCTAGAGGATGTGATACC
 ATATACTAACAATCACACAATACAATAGAGCAAAATGACTACTCAACCCTTTATCAGACACATATGAAAATCCA
 AAACATTTTATTTTTTTTTTCTTAAATAGAGAATAACCCAGTAAACAATTTTCAGAACTTGAAAAGTTTAAAAA
 AACGTGCATTATAAAAAATGGGCATTATNATACCTTTTTATTGAATGNGGATTGATTGCAGTNTGCNTAATAAAAA
 TGGGTGTGGGATCTGAANAAAAAGGGAAGTTTTTTTTTTCTTTTTTTAAGCTTGCNTTGTAAAAAGAACNCGTTG
 TAAAAAAAATTTGCTTGANGAAGGGTCANCTTNAANGCTTANAGTTTTNACTGGTTTTNTTAAAAANCCCTTT
 CTGGTTTGCTTTAAANACAAAAGNCCTNNAANNTTTTTTAANNAGCTCCCTTTNTTTGNTNGGGGAAAA
 AANNNTTCCATNCCNNGNNAANNCCTAAGGGAATTTGAATNTNTANCAGGGGGCNTTNNNNNTTTAAGG
 CCTTCCNNTNNGNTTTT

A36:

GAATTCGCCCCTTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGTACTGTAATGCATCCTACAAGAGAAGTTTCGTTACACAAGGA
 TTGTGCACGCACCTACTTTTTAATTAATAATGTAACCTTCAGGATTTATGGCTACAGTATGGGGAAAAATGCCAA
 AAGTTTTAAAATGGATCAACCCTGGTGTGTAGCTAGCAAGCAATAACTAGACTACTTGTACTACAGTTGTACTA
 AATGTATCTAAAGAAACGCACAGCCCTACAAAAGTTGTTCTCAGAGAAATATCATTGAGATGGGGCACCTCTTCC
 CAGTTTGCTAAAAGTTCTATATGATATAAGCACAAATTAACAGCTTGATGAAGACATAACCTAATGCAGCTCATG
 AGAAGCCTATGCCTGGGACTTGAGGAACCCCTCACATTCTACACTGTTGTAGAGATTTTTATTTTTATTTTTTTT
 GGAGAAAAATGTTATCTGAAACATATTTACAACCTGAACTCAACAGAGACTGTGAAATTGAACAGGCACTGCTCAT
 TTGTTTTGAGATTTTTTGGAAACATTTTGTGGTTTTTGTCTTTCTCATTTTGCATCAACTTTTATCAGTCCAT
 GCACTTCAATGCCCTCAATGAAGAATGCATAATAAGCCTACTTCTTAAAAAACTTCTTTCTGATATAGAGATGCA
 TTTGCNCATCAGTCCCTGTAGACAGTTTTCAAACATTCTGAAAATCAGTATACAANACTGGTTTAGG

A48:

GAATTCGCCCTTAGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACCAGTTCAGGGACACGAAGGTGTTTTAATTTCTGGACCGTTC
TCTATTATTCCCAAAGGTGTTTGAGAAGTATAAAGCCCTATATTGCCGGAAACACGTAAAATTTGTCAGAATTGG
CATAATCCATTATAGTGACTTTTAGCTTATAAAATTAACAGATATTATGATTTAATTTTAGTTATGTGCTTTGAT
AACAGAAAATGATTAATTAGCATTAAATGTAGTTAACATATTGTGGTAAAAAGCACCATTAGATTTGCTTTTTTTT
TTTTTTTTAATTTTCCTTCAGTTTTAAAGGGATACAAGTTCAACAATAAAAAACATAAAAAAGCAAAAANATAGCTN
CCTTTTTCTCGCAAGGCTGTTTTTACCCCAATAATTTAAAGGNCCCGGGGGGAANGACTTGGAAAAACAAAA
ATAGAATTTTTAACAATCTTTTTTNTTANAAGANNTTTAACCTNTCCAANGAAATGCCCTTACTCAATTTCA
AAATCCAATGNTTTGGANTGAATCCCCGGNANTTTNTTGAAAAAAAACNANTTNCCCATTTTGGGGGAATTTT
TGGGGAATTGNNGAAAATTTNAAAANGTTTTTTTTTNAANGGAANNNNCNTTAAANCNTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTAAAAAAAANNTCANGGTTTAAAACCCCCCANTANGGGAAAAAATTTGNNACN

A51:

GAATTCGCCCTTAGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACCAGTTCAGGGACACGAAGGTGTTTTAATTTCTGGACCGTTC
TCTATTATTCCCAAAGGTGTTTGAGAAGTATAAAGCCCTATATTGCCGGAAACACGTAAAATTTGTCAGAATTGG
CATAATCCATTATAGTGACTTTTAGCTTATAAAATTAACAGATATTATGATTTAATTTTAGTTATGTGCTTTGAT
AACAGAAAATGATTAATTAGCATTAAATGTAGTTAACATATTGTGGTAAAAAGCACCATTAGATTTGCTTTTTTTT
TTTTTTTTAATTTTCCTTCAGTTTTAAAGGGATACAAGTTCAACAATAAAAAACATAAAAAAGCAAAAANATAGCTN
CCTTTTTCTCGCAAGGCTGTTTTTACCCCAATAATTTAAAGGNCCCGGGGGGAANGACTTGGAAAAACAAAA
ATAGAATTTTTAACAATCTTTTTTNTTANAAGANNTTTAACCTNTCCAANGAAATGCCCTTACTCAATTTCA
AAATCCAATGNTTTGGANTGAATCCCCGGNANTTTNTTGAAAAAAAACNANTTNCCCATTTTGGGGGAATTTT
TGGGGAATTGNNGAAAATTTNAAAANGTTTTTTTTTNAANGGAANNNNCNTTAAANCNTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTAAAAAAAANNTCANGGTTTAAAACCCCCCANTANGGGAAAAAATTTGNNACN

A54:

GAATTCGCCCTTAGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACTCTGTAACCTGTGTGCATGCAGTATTGCTACAAATCATACTT
TTGAAACTTAAATGAATGAAAGCTTTTTGATGTTTTTTTTTGTCTGACTATCAAGTGGCAGTTCTCAGACACTAAT
GTGTCTCTGGATGTAGCTTGAAGTCCACTAGTATGCTAGTATGATTTGTCAGCCTTGAAATACCTATTGAATAT
GAAAAGTACTGCTAAAATAAACTGTCTTCGCTCCCTTTAGACTCATTATGTTAACATTCTACTTCGGAACCTAAGA
TTGTATTGTGTTGAACCTGATCTTTACTGGAAGTGAATCTCTTCAAGCTAGAGTTCTAGTCTTAATGAAGGCT
TTGCTAAACCACAGTTGCCAATTCACTTAAATTTGGGAATAGAAGTCACTCCTAAAAACTCCCTTTATAACTAAA
TTGATTTTTGTAACATGCAACATTAGAAGTGCCTTGTACAACACAGTCCCTTTCCATGCTTCTCTCCAGAAAGT
GCTGCGTATTAACAGAAAATATTGCAGGCAAACCACAGTCTATTCAATCTGCAGCATTTGGAACAGTGTCTAGG
AAAGAAAAAGCAATGTATNCATACCACCCACAGACTTAAGTAAAGAGAACAAGGTCTGCCCGCGGCCGNTC
NAAGGNCNATTCTGAGATATCATCCACTGGCGGCCGTCGACATGCNTTANAGGCCATTCGCCTAAGNNGCGATAC
ATCCTGCCGCTTANACGCGGCTGGAACCTGCGTNCCTAAC

A73:

GAATTCGCCCTTAGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACTTTTTTTTTTTTTTTGGTTTTTTTTTTTACAGTCGGCACTT
AGATACGTAACACGAACCATAAGAGCATTGTCAACTATTATTTTCCACTCAATTGCAGAGCGATTTAAAACATCG
AACTACTACTATTCACTTTAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGTTTTGAAATGCTNGCACTTACATTGAAAAAA
AAAAAACATTTTTCAACAATTTTCAACAATTACACAAAAATTCACGCANAGATGGGGAAGTTGGTCTGTTTTGA
CAGAACTGACAGGAATCAATCAAAACAATCGAATTTTGAATTGAGTAAAGNCCAATTTTCATTGGATAGCTAAAT
ATCTTTGTAAGAATAGAGATTGTTGAAAATTTCTTTTTTTGTTTTTCCAAAGNNCTTTCCCCCGGGACCTNTA
AATNTTGGGGNAAAAANANCCCTGCAANAAAAAAGGGGAGCNTTTTTTCNGNTTTTANGGTTTTTTNTTGGGA
NAACTTGGATCCCTTTAAAAGTGGAGGGGAAAANTTAAAAAAAACAAANTCTTANGGGGGNCTTTTCCCC
NANTTTGGTAAACNCCCTNAAAGNCNATTAACNCTTTTTNTGGNNANAGNCCCAACTNTAACTAAACNNAN
TTTTNGGACTTTTTNAANGCAAAAANGNCCNTTNNGGNTTNNCCCN

A88:

GAATTCGCCCTTAGCGTGGTTCGCGGCCGAGGTACAAAAGACAAACACCTAAAAACACTGCGTCAAGTGCAGCACC
AACTTTGGTCAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAATGAAAAGAAAAATTAATAATCGCTAAGCTTTTCTACATGATATAAGCA
GGTATTGCATATTTTCATATATCTGGAAAAAAAAAANCAAANCTGAAAAAAAAAACAAAAACAAACGAANGGAA
GACTCCAAATAAAATGTAATAATGCAGCANCATCCAAAAATACTGATAATCTAGCATCTACAGATCTCANAATAGC
ACTGCCACTGACCATAACAGGACAATAAACACTACTCCTATCTGCGGAACAACCTAACATCTATTTAATTTCTAGAT
GTTGAAACCGACAATGGCTGACATAAAAAGTACATTTACAAAAAGTGTCTCCAAATGCTTGACTAGGGAAAAACC
CCTTTCAATATAGGAACATGTGCAACAATTCCACAAATAATCGCTATCCAGGGCANGGCGCATTGATATGGAATT
TTTTTTGTTTGTGTTTGTTCGTGCAAATTAAGAAAAACAAAACAATACATTGTTTCAGGGAAAAAGATGAGGAGCAA
GTGTCTTCCCAAGAATTTTCAGTTACTTGATTGTATAGGACAGAAGTAAAAACCTTCTGAAGGGTCGAACAACATA
GTTNAAGGCAGGGCCTGCCGCGTCTGCCCGCGGCCGTNCAAAGGCAATTTTGAAATTTTCATNCTGCGGCGTT
GGCTNTTTAAGGGCAATTCCTTGNNGN

A95:

GAATTCGCCCTTTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGTACAGTTCAGGGACACGAAGGTGTTTTAATTTCTGGACCGT
TCTCTATTATCCCAAAGGTGTTTGAGAACTGATAAACCTATATTGCCGGAAACACGTAAAAATTTGTCAGAAAT
GGCATAATCCATTATAGTGACTTTTAGCTTATAAAATTAACAGATATTATGATTTAATTTTAGTTATGTGCTTTG
ATAACAGAAAATGATTAATTAGCATTTAATGTAGTTAACATATTGTGGTAAAAGCACCATTAGATTNGGNTTTTT
TTTTTTTTTTTTAATTTTCCTTCAGTTTTAAAGGGATACAAGTTCNAACAATTA AAAACCATAAAAAAGCAAAAAAT
AGCTTCCCTTTTTCTTTGCAAGGCTGTTTTTTACCCCAANATTTAAAGTCCCNGGGTGGAAAGGACTTGGAAAAACA
AAAATTNGAAATTTNAAACAATTTTTTTTTNTTACCAAAAAGANTTTNACCTTCCCAAGGAAAAATGCCCTTT
TNCTCAATTTAAAAATNCANTNGGTTTGGNATTNNATCCNGGNAAGTTTNNGNNAAAAAAAAAACNACNTTCCNT
TTTTNGNGGNAATTTTNGGNAATTTNNGAAAAATTGNNNAANGTTTTTTTTTTTTAATNGANGGNNNNATNA
AACNTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAN

7.1.2 Sequenzen des Screenings B

B3:

GAATTCGCCCTTGAAGCGGCCGCCCGGGCAGGTACAAACTACAGATTTTCGTGCAGTCTCATCCTCTAATTAGCAT
TATTCAACTAGTAAAAATTTCTTTTGAGATTAGTCCTTCACCTCATTTCAGGAGGTATTTTCAGGAAGTGCCTG
GACTAGGAATTTTACAAGATCAAGCCAATACATTTCTTTCTCCAAGTGGAGCAGAAATAGTGTAATAAAATGACTGA
CTTGAAGTATTTTCAGCATTCTGGTCTTAGACAGAAAAACAAACAAGATAATGATGAAAAAAAAAAAAAAAAATAGTG
GAAGCCCAATTAATTATCTTGCTCCTTTCAAATACTGCTGATTAAGGTTGTCTTTAACTACTTGGTAAACTGC
TACTCCAAGCAAAGTTTAAACAAAGCATTAAAAATCATTCTTCTGGAAGCACAGTTGTTGTAACCTAACCCAGTA
TCAGTGACTTCTTTAGGACCAGAGAAAGCTAAAATGTTATCAATCTCTTACTCGGGATTTGTATGTCTACATATA
ACCTGTTAACACTTGCTGCCGCCTCCAGCTTGGTCTCTGTTATCATCTGTTAATTACTTTCCAGGTCACTTTTT
ATCATATTTGNAATGACATGATTATCCTTTGCTCCATCTACCATATCCATCTCTCCATTGGATCTGCATGTGT
ATCATTGAAC

B5:

GAATTCGCCCTTAGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACTTGTTCTGATTAGTTTCTCTCAGTCTCTGAATAGCAACTTT
 AAGATATTTGAAGGAGGGCAAAAAAGACTGAGCTCTAGAAACATCCTGTAGTAGTTTTGACTGTGACTTGCCAAG
 GAGATACTCTGTTGCCTTTATGTTAAGCTAAGGGCATAAAATGCCAAAATTAATAATTTCTTACTGTAGTTAAACCT
 GTAATGTAAATATAAAAAGGATTATTAATAATGGCATTCTTGCATAAAATAGCATCAAGTCAATAGACCATAGTGG
 CCTGGTTGCTTTTGTAAAGCAGAATAGTGTGAATTTTTTCTTCTCATTCTGCAGTCAGATCTGGCTAATCAGT
 GCTTAATTTTTTTGTGCTTTAAGCATTACAGATTTCTGAGTAACCAACCTGTTCTTATATAATTTTAAATTCATT
 TGTGCCTTGATTTACATTTTAAAGGTAATTACCAAATTATTATTAACCAGATCTGACTGTATATGTATATAAAAC
 AGTGTAATAACCATTTGTAAATTAGGTGTGAATTGGACTGACATCANAAGAAAATACCGNGTTTTTTATATGGGG
 TTAACTCCCTACTTANGGAGGTCNCCTNNGNVCATAATCCTTTNNGNTAAAANTATNTAAANTGNTNNTCNCACA
 ACANAAGTAAAATCTTTTTNT

B8:

GAATTCGCCCTTAGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACCCAGTTCAGGGACACGAAGGTGTTTTAATTTCTGGACCGTTC
 TCTATTATTTCCCAAAGGTGTTTGAAGACTGATAAACCCCTATATTGTCGGAAACACGTAAAATTTGTCAGAATTGG
 CATAATCCATTATAGTGACNTTTTAGCTTTATAAAAATTAACAGATATTATGATTTAATTTTAGTTATGTGCTTTG
 ATAACAGAAAATGATTAATTAGCATTTAATGTAGTTAACATATTGTGGTAAAAGCACCATTAGATTTGTTTTTTTT
 TTTTTTTTTAATTTTCTTTCAGTTTTAAAGGGATACAAGTTCGACAATAAAAAACATAAAAAAGCAAAAATAGCTC
 CCCTTTTTCTTGCAAGGCTGTTTTTACCCCAATAATTTANAGTCCCGGGGTGGAAGGACTTGGAAAAACAAAAT
 AGAATTTTCAACAATCTCTATCTTACAAAGATATTTAGCTATCCAATGAAATTGCATTTACTCAATTCAAAAT
 CGATTGTTTTGATTGATTCCCTGTGAGTTTCTGTCAAAACAGACCAACTTCCCATTCTGCGTGAATTTTTGTGA
 ATTTGTTGAAAATTTGTTGAAAATGTTTTTTTTTAATGNAGNGCAGCATTNAACTTTTTTNTTTTTTTTTTTTTTAA
 GGAAAGAGAGTTTCATGTTAAATCCTNTCAATGAGGGAAAAAGTGNATGCNTAGGTCGGTCCN

B18:

GAATTCGCCCTTAGCGGCCGCCCGGGCAGGTACTTTTTTTTCTATTTTTTCTTTTCTTTTTTTTTTTAATTTTAGGT
 TCATAATTTTTTATTGGATTTGTATTTCTTAATCCATATGCTCTAGGATTTGAACCTTTCACAGTTGTTAGTGAAT
 TTGAGGACAAGCGCCTGAAAGGCTCCAGTAGGACTTGCATCACNTTAGCTTGCTTTGTGTTTTAGTTTTTTGCTAT
 GTTTTATTGTTTAAAATTTAAAAAGGAAGCATAGAATCACTTGATATATAATNGAATATTTAATGGCTCTCTGAA
 ATAATTTCTAAATCAACTAAGGCAAAAAGGAACATACTGTTTATCGTTATTTTTAATAAGTGAGATTTTAGTAGAGC
 ACTTTATTATAATGCTGTATATCTCACTGAATATTTTACTTTCGTTGTTGTTGTTTAGGGCTATTTTCATACTGG
 TTGTTTTATTGTCAGCCTGCATATTTACCTCTGGAATCTTTTGGCGTGTCAATGTGTGCGTATTTAGGCATACT
 TGCCTTGGTATGCACGTGAGTACCTCGGCCGCGACACGCTAAGGGCGAATCTGCAGATATCCATCACACTGGC
 GGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCATTCGCTATAGTGAGTCGATTACATTCACTGGCCGCTTACACGC
 GGACTGGGAAACCCGGCGTACCACTATCGCTTGCACACTCCCCTTCNNGCTGCGAAAACAAAGCCCNCGACNCT
 TCCACGTGCCACTGATGAAGGCC

B24:

GAATTCGCCCTTAGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCAAGTTGCTTTATTTAAAA
 CAGAAAANAATAGAAGTATGAGGTGTCATCCACAGANCCGANAAAGGAGGTATGAANATCTGCTTGAATTTATTT
 CTCCTTTANAAGGTTATAGAAATGAGAANAAGNGGAATGGAAAAGCTAGTGACTCATATTTGGTCAGCTCAGTG
 CCCACCAGCACTTAAGCAGCTNTTTTTANAANAATATTTTTGCTTTTGGACTCACAAAAGTAAACAGTATTCAGT
 ATTTTAAAANACATCCTTTGATTTCTTTCCCTTCCCTCACCTTTTAATACTAAAATCTACTGGTAATGGGTTNGG
 AATGAATAAACTCATTTAGTCAAAAANGGCATGGCTTCAACACTATAAAATTTTTAGTAAGGCTCTGGCATCAATGC
 ACTATTGTGATTCTGATTTAATTTTCATGGGCAAGAAATGAAAAATTAGTCTTTTTATTATTTATAAGCTTTTTTC
 AATCCAGCTCTGAGTGCAAAAAGATTTAAGATTTCTTACTGAAAATGGGGCTTTAAAGCTTTTNTAGAAAAGACA
 TTTTCTGTGTGAGTGGCAAGTANATTGGTTCTTAGTTATCGAAACNCTTTTACAGTGTCTTAGAAGACCTGNCCG
 GCCGGCCCTCAAAGGGCAATTTGCAAATTCCTCANCTGGCGGCCG

B34:

GAATTCGCCCTTTTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGTACCGAGTTCAGGGACACGAAGGTGTTTTAATTTCTGGACCGT
TCTCTATTATTCCCAAAGGTGTTTTGAGAAGTATAAACCCCTATATTGCCGGAAACACGTAAAAATTTGTCAGAATT
GGCATAATCCATTATAGTGACTTTTAGCTTATAAAAATTAACAGATATTATGATTTAATTTTAGTTATGTGCTTTG
ATAACAGAAAATGATTAATTAGCATTAAATGTAGTTAACATATTGTGGTAAAAAGCACCATTAGATTTGTTTTTTT
TTTTTTTTTAATTTTCTTCAGTTTTAAAGGGATACAAGTTCAACAATAAAAAACATAAAAAAGCAAAAATAGCTC
CCTTTTTCTTGCAAGGCTGTTTTTACCCCAATAATTTANAGTCCCGGGGTGGAAGGACTTGGAAAAACAAAAT
AGAATTTTCAACANTCTCTATCTTACAAAGATATTTAGCTATCCAATGAAATTGCACTTACTCAATTCAAAAT
CGATTGTTTTGATTGATTCTGTGCTAGTTTCTGTCAAAAACAGACCAACTTCCCATTTCTGCGTGAATTTTTGTGT
AATTGTTGAAATGGTGAAGATGTTTTTTTTTTAATGTAGTGCAGATTTNAACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TAAGGAAAGAAAAGTCNATGTTTAAATCCTCTG

B47:

GAATTCGCCCTTTTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGTACATCAGTGGTAAGACTTTACAGTCAATTGACTTGCAAACAC
AGGCATTTAATTTTTAATTGTCTGTGTATTTAGTAATTATCCTCTGTTCTGAGAAGGAAATAACTGTGATTATTT
GTAGTAATTAAGAAGCTCTGTGTATCACACCAAATAAATTAATTTCTTTTTAAGATAACAAGCTATTTATGTTTC
CTATTGATCTGCAATAAAACTGAACTTGCACTACTAAATAAAGTAAGGTTAAAAAGATAACAGTGATCAATTTAA
ATTTATTAACAGGACCAGCTGTAACACGACATATCTACTCTTTATGCCACGCATACAATTTTCACTAGCATATA
TTGGTGTCACTAAAAGTTCAACATAAATTTGGAAACAGGGATTATAATTAAGGAAATGACTTCATCTTTACTAT
TTCATGTTTTGTGCGACTGTGATCGTGTGATCACCCAGGAACAAAGCCATTGCACTATTAATATATCCATTAAGAA
ATGAAGTTTTGAGAGAGATAAACATGCTGAAAAATAAATTTTCAATTAAGAGATAACTCCCTTTCCCTGAAAA
GTGATCTAAATCTTTACTGNGTCTTGCAAAATCTTAGTCATTAATACTAGACTGNCTATACTCTCTGATGAT
TTCTTGTACCTCGNCGCACACNCTAAGGCNANTCTGANATTCATNCCTGCGGCGTCACNTCNTAAGGCCATCNC
CTTGGNGCGNCTACTACTGCCNGTTNACGCGA

B57:

GAATTCGCCCTTTTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGTACTGTTCTTCAGCAATGGAACGTGCAAGTTGTTCTGAATCT
GCTTTTTGTCAAAGTGATTTCTAGCTGTGCTGCCAAGGAATCTCTCTCGTCCTGTAACCTCTGTATCTTTGCTGC
ATCTCTTTACAAAGTTTTGGTCTTTTCCACATTCTTTAAGTTCTCGAACTGGGTCTTATACAGAGTCGAG
AAATACTGTTGAGCTTCAAGTTGGTCTTGAAGCTCTTTCAATTTGTCATCTGCACTCTTGACGTTCTTTGCGGAGT
TCATTGTTTTGTTTCTCCAGGCTTAATTTGATTTCTGAAAGATGATTATTTCTCTGTTTTAGCTGCTTCTCTGAC
ATTTTTAAGGTGTTGACCTGTTGTGTTTGCATCTTGAGGTCGTTTTGAGTGAGACAACGCTTTTGTGTTTTCTGT
TCTATTTTTAAAGTCAAGTTTTTAAACATCTTCATTTAGTTTATCCTTTTGCTAAGGAGTTTCAATTTATTTCTGC
TGTGATTGTTGAGATCACAATCCAACATGGAGCGCTGCTTTTCAAGCTTCAACAACCGATTTTCTACTTTTTGC
TTCAAAGCTCTCTCTTCCAANGTTTTCTTCTATTTCTTCTGCTTCAAATTTGCTCCTCTATAGATCATAA
ATCTAATTTTTGNCTGCCAATCGNCTTTGGAN

B59:

GAATTCGCCCTTTAGCGTGGTTCGCGGCCGAGGTACATGGTATTGAGCTGCTGTTCTGCCACTCTAAGTATAAAAA
GTCCACCTTTTAGTCTGAAAAAAAATTACTTAGCCACATGGAAGTACCAGTGTGAGCTCTGGAATTTCTGCTGA
ATTAACCTTTGAAAGGGCTTACTNNGCAGAGGTAGATCACTTGTCTGTAATATATAATGGGCAAACAGTGTTA
ATCTGGGATGGGCAATCACTTGAATCACTCTTATTCTTTTCAAGATGTTTTTCAACCAAGCTTTTACTTCTAATATAA
ATAAATCTCTGACTGGGCCATAAATTTGCAACTGCCAAGCTGACTGTGTTATATTAAGGCAGCATTACCCAAA
AATTAGGCACCTGTTAAATACAGCCTGCTAACCTCAGGTCTCATGTGAGTGTGTTTTGCTTTACTCAGACTATTATT
TTGGACCTGTTTATGCAATCAAGGTCTTGCCTTCAAGTTTACAATTTATGTTAATAAGGAATACAAGAAATCAAACT
GCTGGTTTTCATAGCTTCTGGATCTAGTGTCCCTTTTACCTTCAAGGCTGAACACATTTATAACGTCAGATGT
TATAGTCTTGAAGTAGATGTCNATCTATTATGTTTCAAGCCTGCCCGGGCGGCCGNTCNAAGGGCNATTTCTGANA
TATCATACTACTGGCGGCCGNTCGACATGCNTTANAGGGCCATTGCCTANAGNGAGCGNTACATTTACTGCCGCGT
TACACGTGGACTGNAACCTG

B63:

GAATTCGCCCTTAGCGTGGCGCGGCCGAGGTACACATTTTCTCCAAGCGCTGTTTCTCCAGATCCCAAGGTCAA
 CATCTGCCTTCTCGTGTTATCATTTTTACTGTTTTGTTTTCTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTCTCANAACCTT
 CTAGGTGAACCAAGCATGTGCCAGAAAGAAAGCAGATCTAAGTGTGCTTAACATGAAAGTGATAGTTAATGCTCA
 GTTTTACAAAGAAGGCTAAATTTATTAATAAGTGCAGTTCGAAACCTTGGTTAGGTCCCANAATATAAGTTTTAAG
 CATCATCAGTGACAGTGTGAAATTAATCGTCAATATATTTTTGAAGTGTGTAATAATCCAGTGAAAAAAAAAAGAAT
 GGAGTATGTTCAATCAAATCAGCACAAAACGTAAATATTGTGATTGCACATTTGGCCTTACTAGGAATTAATGT
 GCATTTCTAATTTTTCTAATAAGTCAATTCAGTATGTTATTGCAATTTTCAAGTATTATTTCTTTGATTATAGATT
 CGAAGGCGTTGTTGATCTTCAGTTTCACAGCAGGGAACACATTCAAAGATTCTNTTTTTGCATTCAGGAATAGCAA
 TATNTTTGCAAGAAATCCAGAAGATGAAATGCTCTGTTGAATCCTAAACATAAG

B68:

GAATTCGCCCTTTTCGAGCGGCCGCCGGCAGGTACAACACTAGGAACATCATACTGGGTAAATTCTCAGTAAATCAAAGCAA
 ATCAGTTCCTTTTAGAAGATACATTACAAAGTTTGTAAAAAGGGAGACAGAAGATCAACTTTAGTTTTCAAACCTT
 GTGTTTGTCTTTTTAAGAGAAAATGCTTTGCTTTATTGCTTTTCCACCCTCCCTAATGCTCCCCAGTAATTTGGTCATG
 ACTAGGATTTCTTAAGTATGCTCTTGATGCTTCAAGGAGTTGCAACTCTGCTACCGAAGGCAGCAGACCTATAAGAAA
 AGACTGAATATTGGTGTGCTTCACTCCAGAGATTACTGAGGAGAGTTACAAGATGCTTTGAGAGTTTTGTGTATGAAAAAG
 GAATACACTTCTACTGATTTCCATGGACCTAGGACCAGTGATGGCGATCTACGCCTAGAAGAGCTGTAGAGGTGAAAAAGAGT
 AAAGCAAGGGTGATGAAGATTTCAAAAAGTTCTCTGAGACTGGGTGCAGAATGTTAATGCTGGAGACTTTTAAAAGAAATGA
 TGACAGGGTAGATCCTGCCTTGGGGAAAGAGGGTGATGGTGGATCATATGTATTAATGTAACGGCNTTTGCTACCCTGTATA
 CANATAAGACAGCATGCTCTTGCTTTGGCTTTTTGTTTTAACTAATTTACACCATCAACACAGTGTAAAG

B69:

GAATTCGCCCTTTTCGAGCGGCCGCCGGCAGGTACCTCAGAACTTAATTGACATTGATAATACCATTTAAGTGA
 CAAAATTTCTCAGTTATGTTGCGCTCTTTTTGAGCATGAAGCATTATGTTTACATTTATTGTTTTTCTTTGCTTTA
 TTAATTTGAGACTTGTGCTGCATCCTCCAGCATCTTCAGCCATACTTTTACAGCAGGCGCTGGCCATTTACGCTA
 CAGGCGTTTTTCTGTTTTGCAAACACCTTTTTGTGTCTACTATCTCTTACATTTTTGTTATTAACCTCTGTAG
 CAGGACAGCATGTCTTAGTAATCATTCTTCTGTAGCTTCTCTGATTTCTTCTATTTGAACATTCAGCTTCTCTC
 TTTTCTTTCTAAACCCTGGAGTGCCCCGTTTTGTCTACATTCCTTCCATCAGAGTAGGCCTTCTTAATTTGCACCAG
 GTTCCAGCTGGATGTGATTAACCTCAAGTTGTGCTTACACTGATGGATGTGTTAGTATCCAGTGGGATATCAAGA
 GTCTTTATTTACAGTACCTTTTACATTGACAAAATTTATTTAATTTCTTTTTTCACTTTGCCACCTGCCTTTGTCTG
 CGCTTANGATACTGAAGATTACACCAACAATGATCANTTATACACCNAATNACACTGCTNCACTNTTGATAAGT
 CCTTAGCANGGCTNGGTTTTCTGCTTTTTTTATTACANCTTTGAAAANCGGAANGGTTNTNCCNANGN

B78:

GAATTCGCCCTTAGCGTGGTTCGCGGCCGAGGTACATGCTTTTATATGATAGACTTATAAGTATGTAACAACCTAT
 ATAATAAAAAGTTTTCCAAAGTCTGCCTGTAAGAAATCAGGCAAAATTTTACCATAAGCAATAAATCATTCCAAACC
 TTCAAGACATTTTATATAGCNTGCACCAGCTGGCAGTAAACATTTGCCAAAAAGTTGTAATTTCTTATGTCCCGA
 CATAAGTGGCAAGTATATAAACTCGATGGAATCATAATGTTAGATATAATTTAAGGGAAAAATAGTTCACAACA
 ACATTTCTGGAATTTAACATGTATAAAAGTAGGACGTATCTTTCTGTTTGGTCTTTGGACTGCATGGTTAA
 CAAAAACACACTACTACATTAGCTCACTATCCCTCGAAAAGTGGTATAACCAAAAATACACTCCAAATAAATTC
 CATTAGTGTATTCAATTTTCCACAGAAGGACAGCATTTTATTTCTCAATGATGTGTCTACATTTTCTTTAGCAA
 CTCAGCAAGAACATTTGGGGGCAAAATCCATTTTCTTCAAGTAAAAAAGGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAGTNC
 TGCCCGGGCGGCCGNTCGAAAGGGCNAATCTGCANATTTTATCACAACACTGGCGGCCGNTNAGCATGCTNTANAG
 GCCATTCGCCTATAGGAGTCGATACATTCCTGGCCGCGTTACACG

B92:

GAATTCGCCCTTAAGCGGCCGCCCGGGCAGGTACTTTTTTTTTTTTTTTTGGTTTTTTTTTTTTTACAGTCGGGCACT
 TAGATACGTAACACGAACCATAAGAGCATTGTCAACTATTATTTTCCACTCAATTGCAGAGCGATTTAAACATC
 GAACTACTACTATTCACTTAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGTTTGAATGCTGCACTTACATTGAAAAAAA
 AAAACATTTTTCAACAATTTTCAACAATTACACAAAAATTCNCGCANAAATGGGGAAAGTTGGTCTGTTTTGACAG
 AAAGTACAGGAATCAATCAAAACAATCGAATTTTGAATTGAGTAAAGNGCAATTCATTGGATAGCTAAATATC
 TTTGTAAGATAGANATTGTTGAAAATTCTATTTTTGTTTTCCAAGTCTTCCACCCGGGACTCTAAATTATTGG
 GGTAAAAAACAGCCTTGCAAGAAAAAGGGGAGCTATTTTTGCTTTTTATGTTTTTATTGTTGAACTTGTATCCC
 TTTAAACTGAAGGAAAATTAATAAAAAAAAAAACAATCTAATGGTGCTTTTACCACAATATGTTAACTCNTTAAA
 TGCTAATAATCATTTTTCTGTATCAAAGCCATACTAAAATAAATCNTACATCTGTAATTTATAAGCAAAGTNCNT
 ATGGATNTGCCATTTGACAATTTCCGGGTTCCGA

B96:

GAATTCGCCCTTTTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGTACTTGAAAGAAGTTCTTATTCCAGTATATGCCCCATGTTTT
 TTTTTTATTTAGCTACAAATAGAAAATTTGCACATCTTGGCTATGTATCTTTTTATTATTATTTTAGGAAGTAGC
 NTGAAGGGACGTGGACATAGCTTGTGAAAGTTGATGCTCGAGGAGAATGTGATGGTGAAATGTATGTGAGAAAAC
 TGCCGCTAAGGTGTTGATTGTAACAACAATACAAAACAGAAAAAGGAACAGAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAA
 GAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAGAGAAAAAGAAAAAGGAGTGGATGCTCCATTTTTATTGAG
 CTGCTATGGATAAATTTCCAGCATGGTTTTGAAAAAATTAACATTGCTTTTTCTGTATCTTTGTCATTGTGTTTT
 GCTGCTATTTTGTGGATCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTATACAATGTCATATATTGCCATGTTATAGGTT
 TTAATTTTCTCATANAAAATTATATTATTGACATCATTTTTTTTTTTGAAATTTTTTATGNGATCAGTTTTACTTAA
 TGGATTACTGCTCTATCCAAAAGGTTCCCTGTTTACAAACCTATACTTAGTAACCATGTTAACAAGTTAATGTC
 GACCTNGCCGACCCCTAAGGCAATNTGNAATTCATAACTGCGCCGTCACTTNTTTAAGGCCATC

7.1.3 Sequenzen des Screenings C**C3:**

GAATTCGCCCTTAGCGTGGTTCGCGGCCGAGGTACGATCAGCATTTCGTTTCTGTATTGTTTTCTTGCAGTCCAGA
 AAATGTACAGTTTCAGGGACACGAAGGTGTTTTAATTTCTGGACCGTTCTCTATTATTTCCCAAAGGTGTTTGA
 ACTGATAAACCCCTATATTGCCGGAAACACGTAAAATTTGTCAGAATTGGCATAATCCATTATAGTACTTTTAGC
 TTATAAAATTAACAGATATTATGATTTAATTTTAGTCATGTGCTTTGATAACAGAAAATGATTAATTTAGCATT
 TAATGTAAGTTAACATATTGTGGTAAAAGCACCATTAGATTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTAATTTTCCCTTCAGTTTT
 AAAGGGATACAAGTTCAACAATAAAAAACATAAAAAGCAAAAATAGCTCCCTTTTTCTTGAAGGCTGTTTTTT
 ACCCCAATAATTTAGAGTCCCGGGGTGGAAGGACTTGGAAAACAAAAATAGAATTTTCAACAATCTCTATCTTAC
 AAAGATATTTAGCTATCCAATGAAATTGCACTTTACTCAATTCAAAATTCGATTGTTTTGATTGATTCCCTGTCAG
 TTTCTGTCAAACAGACCCTTCCCATTTCTGCGTGAATTTTGTGAATGGTGAATTTGAAAAAGGTTTTTTTNA
 TGAAGGCACATTNACTTTTTNTTTTTTTTTTTAAGNAAAGANANTCANGTTAATCCTTNATTTNNGAAAAAANT
 NCATCTTTGGTGGTGNATTANGCNCNAAAAAACAAAAANCTGCNACCCTGGGATTTAAT

C6:

GAATTCGCCCTTTCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGTACCAGTTCAGGGACACGAAGGTGTTTAAATTTCTGGACCGT
TCTCTATTATTCCCAAAGGTGTTTGAGAAGTATAAACCCCTATATTGCCGGAAACACGTAAAAATTTGTCAGAATT
GGCATAATCCATTATAGTGACTTTTTAGCTTTATAAAAATTAACAGATATTATGATTTAATTTTAGTTATGTGCTT
TGATAACAGAAAATGATTAATTAGCATTAAATGTAGTTAACATATTGTGGTAAAAAGCACCATTAGATTTGTTTTT
TTTTTTTTTTTTTAAATTTTCTTTCAGTTTTAAAGGGATACAAGTTCAACAATAAAAAACATAAAAAAGCAAAAAA
GCTCCCCTTTTTCTTGCAAGGCTGTTTTTACCCCAATAATTTANAGTCCCGGGGTGGAAGGACTTGAAAAACA
AAATAGAATTTTCAACAATCTCTATCTTACAAAGATATTTAGCTATCCAATGAAATGCACTTTACTCAATTCAA
AATTCGATTGTTTTGATTGATTCTGTGCTGTTCTGTCAAAACAGACCACTTCCCCATTTCTGCGTGAATTTTTT
GTGAATTGTTGAAATTTGTGAAAATGTTTTTTTTTAAATGAAGTGCACATTTAAACTTTTTTTNTTTTTTTTTTTA
AGGAATAGANAGTCNAGTTTTAAATCCTNTCATTGAGGAAAAAAGTGCATNTTTTGGTCGGGTCCATNAAGGCC
CTGAAAAAAAACCAAAAAAAAAGCCTGGCNACCCAGGNAATTGAATCTTNTCTGNGCCTG

C7:

GAATTCGCCCTTAGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACATTAAGGATCTGATCCTAGGGATTTGTGTATTACATCGTA
ATATCCGAAATGTTTCAAGAGGTTGAAGGACAGGTTCAACAATCTGGCTTCTCTGTTTCGTGTAATCTAATTACAC
AAGTCAGTTCTGCTTTTGAGAACGCACATGGGTCTCCACACATATATTTAAGTTACCTCACAGAGTAAGTGCATG
TTATTATTTCATATTTATCAAAAATAGTTCATGTTATCTCCAAAACATATATTTCAAAAAGAGATCCTGGAATAAGGAA
ACTAATTCTATCCTTCTGATAGACTTACCAAGCAAAATTAATACTATTTCTAACAATTTGGTTACTGTCAAAACA
ACTTCACTTCTGTGAAGTTTCTGGCCAAATGCATCCCAATCCTTCAACACAGGGAAAAAAGATTAAATATAG
CTTCATATTTAAAAAAGAACCATGACTTTATTCCCATCTATAGTAAATAAAGAATTCGAACAACATATGTGCAA
GTGCAGAAATACATTGAAAGCTCACACTAATATATGTCTGTGCATGCTTTTAGTTGCTGTTTCCCATGTTTTGCA
TAGGTCTGGNAGCTTACTGCTGTCAATCTGTACAGGTTTTTATTTTGAACAGTTCGCATAAAAAAGCTATGCAA
CCACTCCAGCACAAATGCNNATTGNTTTAACTTGAAACTGANATCCCTCTCTGNTTTCAGTTAAACTTGTAAAT
TAAACTTNTGACTGCCGCGCNTNAGGCATNTNAN

C8:

GAATTCGCCCTTAGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACATTAAGGATCTGATCCTAGGGATTTGTGTATTACATCGTA
ATATCCGAAATGTTTCAAGAGGTTGAAGGACAGGTTCAACAATCTGGCTTCTCTGTTTCGTGTAATCTAATTACAC
AAGTCAGTTCTGCTTTTGAGAACGCACATGGGTCTCCACACATATATTTAAGTTACCTCACAGAGTAAGTAGCAT
GTTATTATTTCATATTTATCAAAAATAGTTCATGTTATCTCCAAAACATATATTTCAAAAAGAGATCCTGGAATAAGGA
AACTAATTCTATCCTTCTGATAGACTTACCAAGCAAAATTAATACTATTTCTAACAATTTGGTTACTGTCAAAACA
AACTTCACTTCTGTGAAGTTTCTGGCCAAATGCATCCCAATCCTTCAACACAGGGAAAAAAGATTAAATATA
GCTTCATATTTAAAAAAGAACCATGACTTTATTCCCATCTATAGTAAATAAAGAATTCGAACAACATATGTGCAA
AGTGCAGAAATACATTGAAAGCTCACACTAATATATGTCTGTGCATGCTTTTAGTTGCTGNTTCCCATGTTTTGA
TAGGTCTGGNAGCTTACTGCTGTCAATCTGTCCAGGTATTTATTTGAAACAGTTCGCATAAAAAAGCTATGCAA
CCACTCCAGCAGAAATGCCAATGCTTTAACTTNAATGAAANCCTNTCTGCTCTCAATGTTAAACTTGTAAATTA
AACTTCTGACTGCCGCGCCCTAN

C9:

GAATTCGCCCTTCCGCCCAGGCTACTAATAGACATGGGAACAGTCAGTTACAGAAGTAGGGACAAACAAGTA
TCAGGAAGCCAAGGGAGACTGTAGTCCCTAAATAAGCAATTATTTTAAAGGAACATGATTGTTTTGCATTTCTCA
TAGCTTTGCTTAATAAGGAGAGTATTGCTTTAGATAATAAATACATTAGAAAAGACCACAAAAAGGGCTTTCCAA
GAAGTAATTGAGATTTGAAAGGGATAGGCTGTTGTAAGAAAAAATAAGAGTAAGGTAAGATGAAAAGGGACAAA
AGAAAGCAGAAATGCTACCTGCTTGTGTCAGCAAGCTTTTATAGTTGTGAAAATAACCTTTCAGTGTATAACAAAGG
AGGAGAAAGAAATTTAAATACCACCATCATTATAGTATCTGAAAATAAAAAACAAAAAACCTCAGACCAGAGCC
AGAAAATTCACATAGAACAAGGACAACAGAATCTTACATATGCTCTGCAGAAAGAGCCAAAAATTAACACAATT
TGGTTTTATTTGCAGTTTGCATTCAGAGAGTTCAAACCTTAAATTTTGTATCCAGGGGATTTGTGCTGCAT
TCAAATATTTTGNNTAATTAGAGATTGAGAACAATTTTAAATTAGCTATCTGCCGTTAATATTTGGAACCTTGAG
TTCTTTGTGCTCTCGNCGCAACCCCTAGGCNATTCTACATCNCNGGGGTCAGGACCCCGGGCTTCACTCGT
NNNAANTTTNTATCTTGACCGCAAGGCTGGAA

C11:

GAATTCGCCCTTTCGAGCGGCCGCCCGGGCAG**GTAC**TTGCATATAGCCAAGTACAGAAAGAAACACACAAAAACAG
TGCCAGAACAGTAAACAAACAAGAAAAGGCTTAAAAATCACTTGGTTTTTGGAGACCTATTCACAATAGATATC
AATGTAGGTGACTTTCTTGCCTATTCATTACATTTGTAAATGTATACATTATACAAAAACATATCAGTAGTCCCT
TCCCATTAGCTAAGTGTTAAAAAAGTTTGTGTTGTTTTTTCCCTCTGCTCTATCTCACTTCGTTCTTGTGCT
AGTGAATATGATGTGAAAAGAGAGGTGTTTCAAATGTTTGCCAAAGTAGCTCAGTCTGTTTTCCACAACCACTC
AGTCATGGATTGCAAAGAGAGGATTCTCTAAGAGGATTCTGAGTTTTTTAATTAATACTTAAATATTGTAAAAG
AAAAAGGAAAAAATCTGCTTCTATCTGCCAAGTAAAAATCATCTCTTCTTTTGTGTTGATGACATGAATTATG
TCTGTAGCATCAGGGCAAGACAGTGAAGAAATTTCAAGTTATGCTAAGGGCTTACTAAGCTTCTGAACTGTAATC
TACCCAGCATGCCATAATTGCAAGAGCTAT**GTAC**TCAGTAGTTAAATTATCTAANTTACCCTAATTGGCTCCTA
CTTAAGAGNACGTTACCTATACACTCAATCTGCCAAGTAAAAACNCTTTAGTCCATCGCNCTGAATTAATGNAGG
CAATGNTCAANAANGNGTAACTTGTANNNGN

C14:

GAATTCGCCCTT**AGCGTGGTCGCGGCCGAGGTAC**TTTTTTTTTTTTTTGGTTTTTTTTTTTTTACAGTCGGCACTT
AGATACGTAACACGAACCATAAGAGCATTGTCAACTATTATTTTCCACTCAATTGCAGAGCGATTTAAACATCG
AACTACTACTATTCATTTAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGTTTTGAAATGCTGCACTTACATTGAAAAA
AAACATTTTTCAACAATTTTCAACAATTACACAAAAATTCACGCANAAATGGGGAGTTGGTCTGTTTTGACAGA
AACTGACAGGAATCAATCAAAACAATCGAATTTTGAATTGAGTAAAGTGCAATTTTCAATGGATAGCTAAATATCT
TTGTAAGATAGAGATTGTTGAAAATTTCTATTTTTGTTTTCCAAGTCTTCCACCCCGGGACTCTAAATTAATGGG
GTAAAAACAGCCCTGCAAGAAAAAGGGAGCTATTTTTGCTTTTTATGTTTTTATGNTGAACTTGTATCCCT
TTAAACTGAAGGAAAATTAATAAAAAAACAATCTAATGGNGCTTTTACCACAATATGTTAACTCNTT
AAATGCTATTAATCATTCTGTATCAAAGCNCTAACTAAATTAATCATAAATCTGTAATTTATAAGCTAAAGT
CCTNTATGGATTTTGCATTCTGACAATTTTACGGTTTTCCGGNATATAGGGTTNNGTTTNAACCTTTGGAANA
NAAG

C16:

GAATTCGCCCTTTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGTACACGGGTTTTTATTACATAGCCTTAGGATACAATCACTGA
ACAGCACCAATTAAACTCTAATCCTGAATGAGTTCTGTTTTGCATTTCTGGTTCAAATATAATTTAATCAAACCTT
 ATAGTTAGAACTATAGTTAGAACTCACCTAAATAGACCCACACCCTGCCTTTTTCTTCATAGCAAGGTAAAAAT
 AGTGCAGCATCCAAGGCATCATTGTTCTCTGGAATGAAGCTTTTGCAACCTGTAGTAAGCAAAACCTACTATAA
 CTACTGAAAATATAAAGCTTGCTTTTAGCTTAACAACATATGTTCTCTGCTGGGAGGATGCTCTGGGTGACTGCA
 TTATTTATATAAAGCAACAGTAATTTCTTTCTGAATGACTTGACAGAAATTAATTTACTGACAGGGGACAACAGCT
 CATTACACTGCTAATGTTCTATGGTTTCAGAAAAAACAGCACTACTGCACATATTACTACCCTTCCCCAGCAAG
 ATATTACAACCTGCACAAATAAAAAATATTTTTCTGAAAATTGTACATTAGGTAAAGTTCCTCTCATGATCAATATT
 TACAATTTGCAAGCTATACAAGNTTTCTTAGTGACCATTCTGGGGGTCTCTGTGAAGACTANAGATGAATCGATA
 NATTTGGTACACAAANTAGTTTGTNTGATTAGAACTTAGTTTGTCCNACTNTAAGGACTGCGNACCCAGGCATTGA
 ATCTACTGNGCGTACTNTTTAGGCATCCTANAGCNTCA

C18:

GAATTCGCCCTTAGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACCTGGATACACAGGATGCTTTCATTTGTAGCTTTCGGTTGCA
 TTTGCTAGTTTACAAGGGCTTGCTCAGAATGACTTTAAATATCCTTACAGATCTCCATTACGACTTTCATCATTA
 TAATCACTACTTAAATTCACATTTGAAGTACCAGTAGGATTTTTTTTTTTAATAAGACAAGAAAAACAAACAGAAG
 ACAGACAACATTGCAATTCCTCAGGTCTCAGGTATGACGCTGTTTCATAACCATCCACTAAAGAAATATCTTTC
 CTTTCCAGAAGCACCATTCTTTCCGACAAGGAAGCAGCACCAGAGACAGTTTGTATAATTTAGCCACAAAAGTA
 AAATGATGTGTTTTACAGCATTTCAAACTGCCAGTTATAGTGGTTAACGATTAGCATATGGAATGAGAATCAGA
 AACTTATGTATAAAAAGGCGAGTTAGTAAAAAACCTACAGATATATTAATAAAGCTAGCAGCAAAACACTGCT
 CCATTACATGGAACCTCGTGAAGATGATTGATTTGATGGTCATCTGAAAAAGAAGCTGATCTGTTATAAACTCTG
 ATTATAACTGTTATATACTGTTATAAAAAGGCAAGACATGTTTGATCATAGTAAGTCTGATCAAGTGTAGAA
 GGAAAGAAGTAAGCACGATTCAGTTAACACTAATCCTATTTAAACAGAGGTACCTGCCGGCGGCCCTCGAAAGG
 GCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCAATTCGCCATATGAGT
 CGTATTACAATTCACT

C19:

GAATTCGCCCTTAGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAGCGATGTTTAGCTACACTGAAG
 CAAATCCTACGAGAAAGCCAATACTTTCTAGAAAAATGATGGATATGTTTTCACTGTGGATCAGTAGTTTAAATTA
 ATGAACTCCGCTGCGGATTTTATAATGAATTTGTTGTATTTTCAAGTTGGTAATAAAGTCTGTGAATAGTTAACAGG
 TCAGCCTTGTTGTTCCCTAATCACAGAAGACGTGAATTCACATGAAGAACGTGGTCCTTTTTTAACAAAATGCATC
 ATTCTTCCGAAATCTGTCTTTTTCATAACACACTTTTTTATAATGCATTAAGTTTCTTATCTAAATATTTGGAGAG
 AATATGACTTTTATCAGAGAGGAATTCAATATCTTGTCTACTGGACTGTAAAAATATATGTATGAAATAAAAATAGTT
 CCATTGGTCTACTAGTGTATTAAGTGTATCTGAAGTTGTTATCCTGTTTTGGCAAAAAAAAAAAGAGAAAAAGA
 AAAGAAAGAAAAAGGTAACCTACAGGCGGTTGTTTCTAATGATCAGAGATCTATTTTAGGAGTCAACTGAAGGT
 TAGTTGTGA

C23:

GAATTCGCCCTTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGTACATACTTTTAACTATGGGTTTCAGCCATTCCTTGTGAAAGA
 AAATAAATTTCTCAATAGCCCAGGAGTGTTCGCTGGATGATGACACCATTCTAATCCAATTTAGTTGGTGTCTGC
 ACTTGCTGGCTTGATTGTCATTATAGTGATTGCTTACATAATTGGCAGAAGGAAAAGCTATGCTGGATATCAAAC
 TTTGTGAATCAAATGTAATCACTGTTCTGATTTTACCCTTAATGAAGCAAGTGCAAGTTCCGAAGTCCAAAAAA
 GCCCCAAAACCTTACAATAAATACTAGCCACAGCTAGTTGGAGTTGGGAAGCAAGGGGAGAAATGTTTATCTCAGA
 TGAAGCAGAACTACGTTTTTGTGTTTTCCAGCTCCAAGAAGATGCCGTGAGTCTCGTAGCTGTTCTGAAGATGGCA
 GATGTCGCTATTGCATAAATGACTAGGCTAAGGATTTTTATTTTGAACAAAACCTTGAATGTTTAGGATTTATTT
 TTCTTCTTATAAATTTGAGCCTGAAATAGAGCACATTTTAACTGATGTGCATTTGGGCAAAATCCAGAAATTCAT
 AGGATTTGTACTCGGCCGCGACACGCTAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGC
 ATGCATCTAGAGGGC

C36:

GAATTCGCCCTT**TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGTAC**TTAATT
TTAAAGGGATACAAGTTCAACAATAAAAAACATAAAAAAGCAAAAATAGCTCCCTTTTTCTTGCAAGGGTGTTTT
TTACCCCAATAATTTAAAGTCCCGGGGGGAAGGACTTGGAAAACAAAAATAGAATTTTCAACAATCTCTATCTT
ACAAAGATATTTAGCTATCCAATGAAATTGCACTTTACTCAATTCAAAAATTCGATTGTTTTGATTGATTCCTGGC
AGTTTCT

C38:

GAATTCGCCCTT**AGCGTGGTCGCGGCCGAGGTAC**TAAATGAATGCCAATTGCTGTCTGCGTAAAAATAAAGACTTA
CCTGGCATATAGCTTCCCTCATGAAGCTGTAGCAGATATCATAGAGGTAATGCCTTTAGCTTAAACAGAAAAAGGA
AACAATGAGATCTGCTTTTCTTTGTCTTTATTTTCTCAATGAAAGGAAGAATGCTGAAATTTCCCTCAATGTGAA
ATGTGGAAAAAGCCACAAAGAAATGTCATTTATTGTTGTAAAATCCATAATTCTCTTGACTTTCTGCAAAATTA
CTTGTTATAAATAACAATGTCGAGAGTTAACAATATAAATTCACAAACCAAAGAGTAACCGTAAGTGCTAAATTA
ATGTAATAAATTCTAATTCTCTGAATATAGAGCAAATGAAGTTATTGCTTTGGAATACTTCATGTTTATTGATTG
TCATTATAAGCCTGTCTCTAATTAACCTATTCTTCCCTGAAACAATTCTTATTAATTAATTTGTGCCTATATTTAAT
AACTAGCCAATTAATATATTTTTCCATAAAGTGGTCTTCAAAAACAATTTGGCATAGTCAGCAATTTACTCTCTAA
CTACAACATCTTTTTTATTTTTTAAATAAATAAGACAGCAGTTACTGGTAGCTGGACTAAGTGATTTCCAAAGA
AACTGTCCTCCATATTTTTTTCATGTATTGTTAATAAGAGTAAGGAAACTGACTGCTTCAGTGACCCTAATGCTGT
AAAGTTGTGGGTGTTTTTTTTTCTT

C41:

GAATTCGCCCTT**AGCGTGGTCGCGGCCGAGGTAC**CTACATGGAAAGTAAAACTTTATGCTACAATATTCTCATAA
GACTACAATTTCTATCAATAAAAAATATAAATACTTTGCGATATAGTTCAATCAACTTAATCTACTCTCCCTACTCC
GTTAGTAGTGAACACTTGTGGTAAGCAAGAAGGATACGATGTTCTGCTATTTTAGCCATGAGGTCATCATTTATCA
AAAAGCAGAAGGCAGATGACAGCGATGATGAAAAATGCAGCACCTCTTGTCTGGAGAAAAAAGAATAATAAATG
CATTACAACATCTTGAACAGTTTGATTTAAAAAATTCAGGAGATTCTCTCCACCACCATGCAAGTATACT
TTAGTTCAATACGC

C42:

GAATTCGCCCTT**TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGTAC**ACGAGAAGGAAAGCAACTGTGTTTGAATTTCTCAGATAC
AATCTTGCTCTGACAGCAGCACTCTATGCAAGCTGAAACAAATTTATTAGAAAAAGACATCTTATGTCATCACAA
TCGTCTTCCCTTAAATTGCTCGCTATGAACTACTCAGTGTTCATAAATTCAGTTATTTAAAATTTTCAAGTCTTC
TCACTGATACAGTCAGCACTTTTACCACAGTGGGAAGCATTCTACAGCTGTTAAGCAAATACCTATCAAATCTGT
CATTTTTAAATAGCAGCCCAACTTTCCAGAAAACATAGTTTCAAATTTTCCAAAAAACAGAAAAAATCCACACG
TTCAGGACAGTAAAAAATAAATAAATTTTAAAGAAATATAACAATAACTGAAATATGAAATTTGATTTACCAAACG
ATTTCAAGACTGCAATTAACCTTCTATTCTGAAAGCCACAAGAACTTTAGTCTTATCTAGTAAAAAGTAAAAGC
TCTTTAGATTAGATATGAAGCTTTTATAT**GTACTTCGGCCGCGACCACGCT**AAGGG**GAATTC**TGCAGATATCCA
TCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGT
GCCGTGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCAACTTAATCGCTGCAGCACATCCCCTTTC
GCCAGCTGGCGTATAGCGAAAGGCCGACCGATCGCCCTCCACAGTTGCGCACCTGAATGGCGATGGACGCGCC
GTACGGCGCATTAGCGCGCGGGTGT

C45:

GAATTCGCCCTTT**TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGTAC**CAGGGTTCCAAGTTGAAGCATGCAGTTCAAAAAAGCAC
 CATTACTTCTCATTTTTGCTCTTTACATAGCTTTATCGTGCTCAGAAAAGCAGAATATCACACAGCTCAGGCTGA
 AAGGCCAATGTGCTTACTCTGTCTGAACTACATAAAATAGGTTAAAAATAGTGATTGATGTTGAAACACCTACTTGC
 TTTTTTCCAGTTTAACTTTCTGAAACACAAAGCCATATTTTATAGCACACAATTCATATTACAAGAACGTGTAAA
 ACTACCATGCCAAACTTCTTTACTATGTTTCAAGTTTTTATATATTACTTATAACTTTTATTTTACTCCATTTA
 TAAGTAGTATGGAAAAACAAATATATAAAAAGAAGGTTGTATCATTATTTAAAGTGAATAATGAAAAAGAGCTT
 ACTGGTTTTCCAAAGTTTACTCCACAGAAGCTGATTTAATGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAGATAACGTATTACTTAC
 TGTTAAATACCAGTCATAAAGGTGGAAAGTGCAAAAACCTATTTTAGCAGCTAGAGGGTGGGAAGCACATTTTGT
 ACAGTATCAGTAGTTTCTCTTATTAAACTACGATTAATTTTCTAGGCTAACAAAAGAGCGGGAAATAAGAAGG
 TAAAAATGAATCAGACATTCTCCAGTTGACTTTTTCAGAATACTAGCAAAAAGGATTAGAGAGAATTTACCTGAGT
 TGATCCAACAGGGATACCTGCATACTGTGGAA**GTAC**CTCGGCGCGACACG

C59:

GAATTCGCCCTTT**AGCGTGGTCGCGGCCGAGGTAC**AATAGGTGACTGACGTTTCCACATTGCTCTTCCAAGTTGAC
 TACACAAACACTGTGTTGTGCAACAGAATTTACATCTAAGCAATGCTGGGTAACCTGAGTGCATTTTCATGA
 TCCAAAATGGCTTCTGCTACTTTGGATAAGCGAGATACGTTTCTGAGGATGTGTATGAACTAAGAGACCCAA
 GCCATTAAGGTCCTTAATTAGTAAAATCAAAACAGTGAAGCATTGACACTGAAATGAGTGCAGTTTCATCTCTT
 TCACAGAAAATTTCTCTTTTCTTTGTTAAAT**GTAC**CTACACCCATTTGTCAACT

C72:

GAATTCGCCCTTT**TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT**CGGGGCAG**GTAC**CATTGTAAACTGGCTAAACAACACAACCTC
 TGTACCCTTCTCTTTAAGGTGACACAGAAGGCGTTCCAATACTCTAAACTTTCCCGAATCCAAAATCTGATCCA
 TGTCTAACTTGAAGTCACTGACATGAGAATATTGCTTACAAAGCAAATGCAGTTCAAAAATCTGTCAATTACTGTCA
 TATCTTCAAAGATAAGGTGAGGATTAGCGTCACAATGTGTGGGTTCCCTTGAGCATAAGTTTGGACATTGTCTTGA
 GTTTGTGCTGCTGTGTAATAGTGACGATGTAAGAGAGGGTGTATTAGCCATTTTCTAAGTTGCATCATTGCATTT
 CCATATCAGAATTTTCTCCTTCATAGTTTTCTTCAGTTTTGTTTAAAGAGATCACAGTATAGTTGCTCTTGCTTCT
 CAGACATGGCACATAATTCAATACGATCTTTTTTGGGAGGTAGTTGTTTAAAGACCTCATCTTTTACTCTTCTCA
 AGATGAATGGTTTTATTATCTGCTTTGCATGTGCAATCCTTTCTTTTCATACGTGCTTTGCTCTT

C77:

GAATTCGCCCTTT**AGCGTGGTCGCGGCCGAGGTAC**TCTAAGAAACCACTGTGAGAACCAGAAACCTTTTAACTTT
 GCTCAGAAAAACCTCAGCATCTTCTATGGTGAGATCCTATACTTTCTAGTGGACATAAGACCATCTCAAGAGATG
 CAAAACCAGCTTCAAATACATTTACATTTTGGATGCTTCCCTAAAATTTGCAAGAAAGGAATATAATTCATCAATA
 CAACTTGTTAACTACTGCTAATTTCCATTACTAATCAGCTAATGAGACACTGAAGCACTCCTCTGCACAAATTAC
 AGCCATTGTTTATAATGAACATAACCCCTTTTCCCTAACAGGATGTTTATCTAAAACAACCAATATCCGGATACAG
 TCACGAATTTGTTGTTTGTGGGAAGTGCTACATTTACCTGAAATGAAGTGTTCAACTTCAGCCAAACCACTGAC
 ATGAAATCTTCACTGGTGTAATACATTTTCGAGCATGAAGCATATGGAATGATTTTCTTAGGAAACCTTTGCT
 AAGAAGTAGCATGCATATTTTCTGTTATCTCTTTTATGTGTTTTTCTATGTAAATGACAAATGAAAAATAAT
 GGCAACAATTTATTCAGGGTGTCTTATTTTCAGCTGGGATGGAACCTGTTTTCTTTAGAGTGTCTGGTATGACTCT
 GTTTTTGGTTCTTTGAGAAAACGATGTTGATAACAAACCAGTGTAAACAGTTGCTTCTAACTGTGTT**GTAC****CTGC**
CCGGGCGGCCGCTCGAAAGGCGAATCTGCAGATATCCATCACCTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAG

C79:

GAATTCGCCCTT**AGCGTGGTCGCGGCCGAGGTAC**AGTGAACTTCTCAACCAGGACCGTAATACTGCATTTCTCAT
 GGAGAAAAATGCTAGTCATGCCACAAAACCGCACTGCTTTCCACTTCATCTGGGAGAAAGCTTTAGATGAGATTTA
 GCATGTAAGCATCAAAACAGAGGAAAGCTTGATCAGTTACATATGGAGAAAATTAGAGCTATTCCAGTTTTGTTTC
 TGCAGTTTTGTTATTAACAAAGTGACATTAACCACACAGTTTTCTCACAACTAAAAGTTATACATGGTTTTTCAGA
 CATCAACCGAATGGGAAAAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAGAAGGAAAAAGAACTCAACTGTTAAAAATTTGGTGTTA
 AAATAACCGAGTCTGGGAGAAGGAAAGCCAAACCACTGCTGTAGTTGGGGGCAACTGATAGCTTGCTTGTTACATA
 TAACTTCGAGACCTCCATGCCACAAAATGCCTTAAAAGTGCAGAACAAAACATCAGTAATAAATGAGAACAAC
 TCATTTTGTATATCCATCATCTAGCTTTAACTTAGTGCTCTGCATCTCTAATAGCTGCTTAACAAACAATGGAT
 TCCCCTCACAAAAAATAGCTACACAAGTAACAGTGTTTC

C92:

GAATTCGCCCTTAAGCGGCCGCCCGGGCAG**GTAC**TTTTTTTTTTTTTTTTGGTTTTTTTTTTTTTACAGTCGGCACT
 TAGATACGTAACACGAACCATAAGAGCATTGTCAACTATTATTTTCCACTCAATTGCAGAGCGATTTAAACATC
 GAACTACTACTATTCACTTAAAAAAGAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAGTTTTGAAATGCTGCACTTACATTGAAAAAA
 AAAACATTTTTCAACAATTTTCAACAATTACACAAAAATTCACGCAGAAATGGGGAAGTTGGTCTGTTTTGACAG
 AAAGTACAGGAATCAATCAAAACAATCGAATTTTGAATTGAGTAAAGTGAATTTTCATTGGATAGCTAAATATC
 TTTGTAAGATAGAGATTGTTGAAAATTCTATTTTTGTTTTCCAAGTCTTCCACCCCGGGACTCTAAATTTATGG
 GGTAAAAACAGCCTTGCAAGAAAAAGGGGAGCTATTTTTGCTTTTTATGTTTTTATTGTTGAACTTGTATCCC
 TTTAAAAGTGAAGGAAAATTAATAAAAAAAAAAACAATCTAATGGTGCTTTTACCACAATATGTTAACTACATTAA
 ATGCTAATTAATCATTTTCTGTTATCAAAGCACATAACTAAAATTAATCATAACATCTGTTAATTTTATAAGCT
 AAAAGTCACTATAATGGATTATGCCAATTCTGACAAATTTACGTGTTTCCGGCAATATAGGGTTATCATTCTC
 AACACCTTTGGGAATAATAGAGAACGGTCCAGAATTAACAACCTTCGTGTCTTGAAGT**GTAC**CTCGGCCGCGA
 CCCGCTAAGGCGAATCTGCAGATAT

Die Schnittstellen des Restriktionsenzym **EcoRI** sind fett und unterstrichen, die Schnittstellen von **RsaI** sind fett und doppelt unterstrichen, die Sequenz des **Nested Primer 1** ist blau und unterstrichen und die Sequenz des **Nested Primer 2R** ist rot und unterstrichen dargestellt.

7.2 Vektorkarten

7.2.1 Zwischenklonierungsvektor pCR[®]II-TOPO

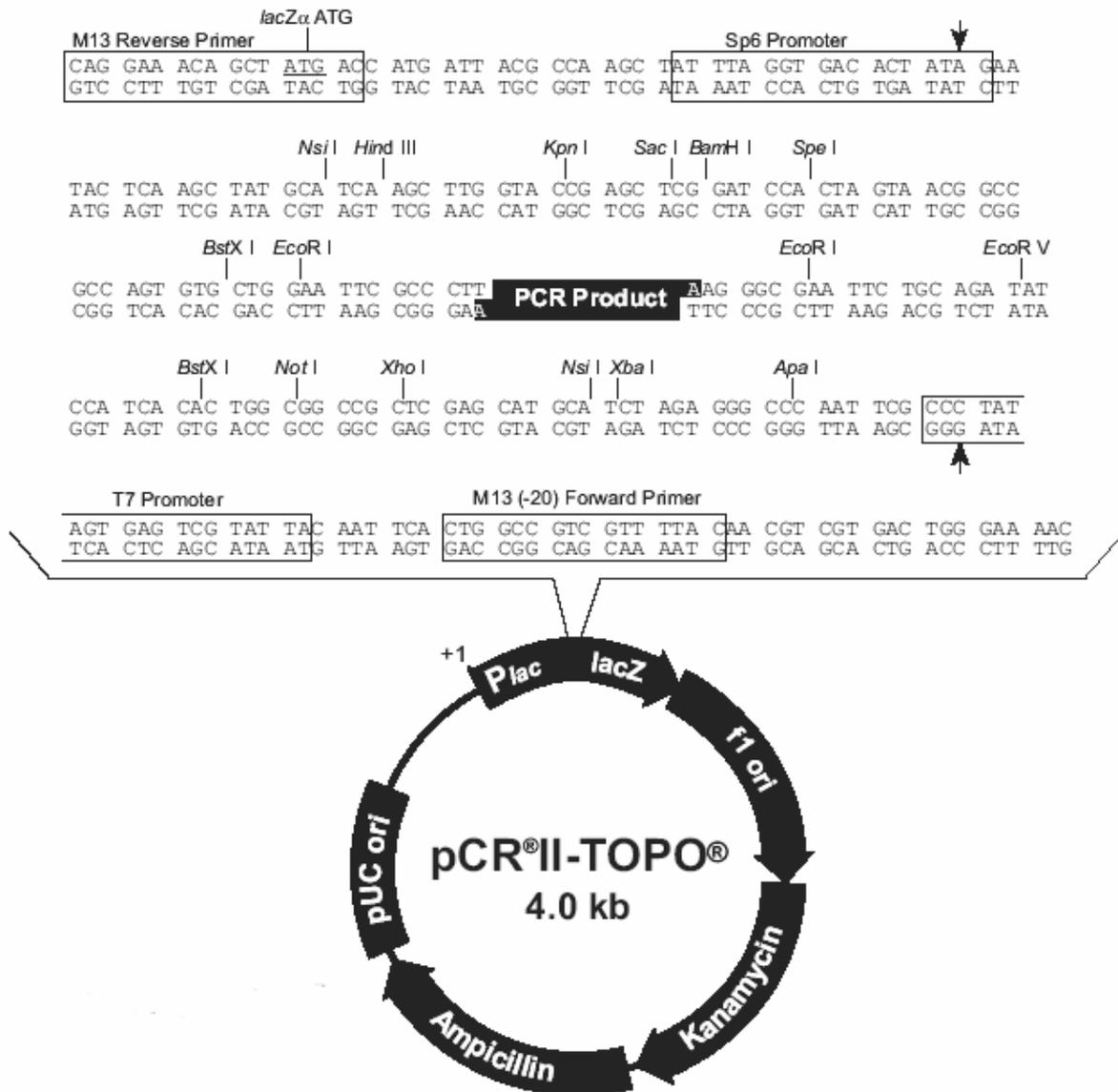


Abb. 7.1: Vektorkarte des Zwischenklonierungsvektors pCR II-TOPO. **lacZ α -Fragment:** Basenpaare 1-589; **M 13 reverse Primer-Bindungsstelle:** Basenpaare 205-221; **Sp6-Promotor:** Basenpaare 239-256; **Multiple Cloning Site:** Basenpaare 269-383; **T7-Promotor:** Basenpaare 406-425; **M 13 (-20) forward Primer-Bindungsstelle:** Basenpaare 433-448; **f1-Replikationsstart:** Basenpaare 590-1027; **Kanamycin-Resistenzgen:** Basenpaare 1361-2155; **Ampicillin-Resistenzgen:** Basenpaare 2173-3033; **pUC-Replikationsstart:** Basenpaare 3178-3851.

7.2.2 Expressionsvektor phrGFP-C

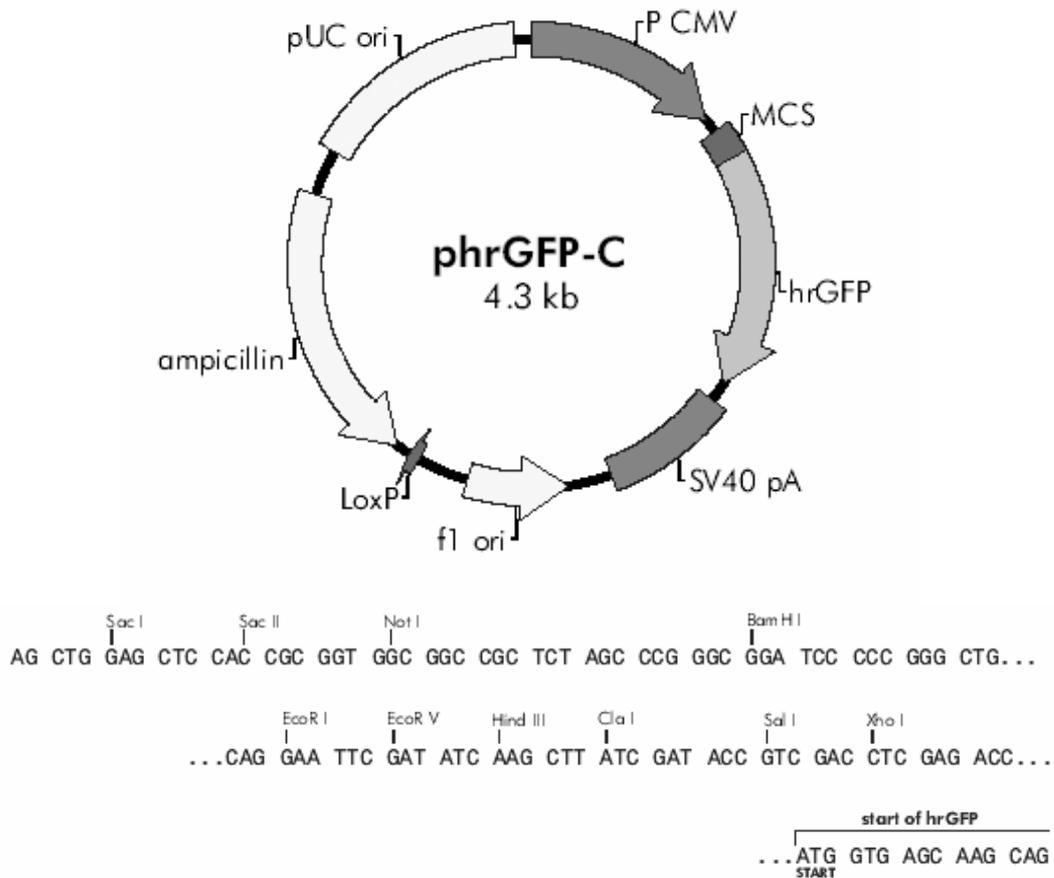


Abb. 7.2: Vektorkarte des Expressionsvektors phrGFP-C. Die Sequenz stellt den Bereich der *Multiple Cloning Site* des Vektors dar (Basenpaare 646-761). **CMV-Promotor:** Basenpaare 1-602; **hrGFP-Kodierungssequenz:** Basenpaare 747-1463; **SV40-polyA:** Basenpaare 1528-1911; **f1-Replikationsstart:** Basenpaare 2049-2355; **LoxP-Sequenz:** Basenpaare 2518-2551; **Ampicillin-Resistenzgen:** Basenpaare 2596-3453; **pUC-Replikationsstart:** 3600-4267.

7.2.3 Expressionsvektor pCMV-Tag-4A

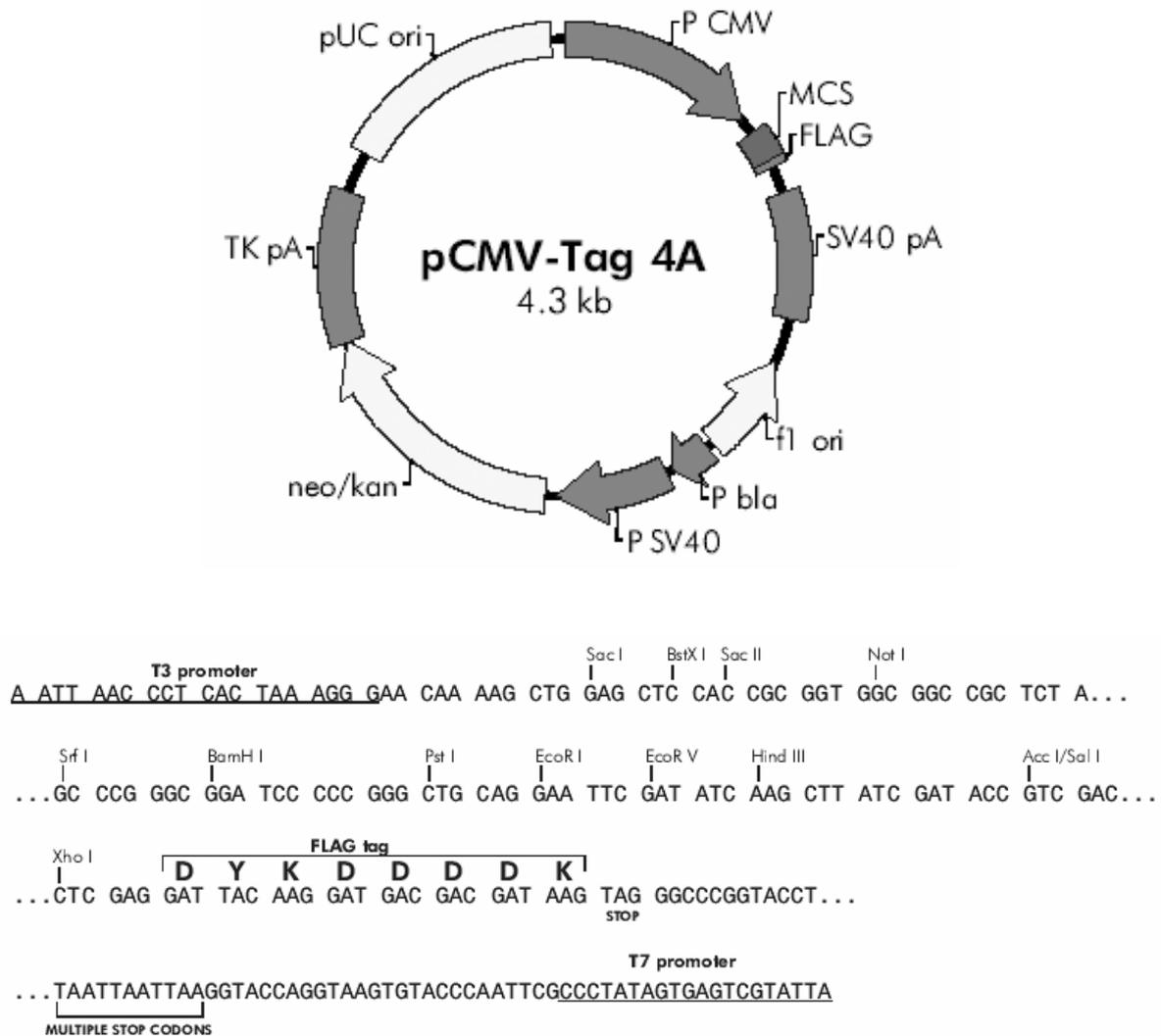


Abb. 7.3: Vektorkarte des Expressionsvektors pCMP-Tag-4A. Die Sequenz stellt den Bereich der *Multiple Cloning Site* des Vektors dar (Basenpaare 651-743). **CMV-Promotor:** Basenpaare 1-602; **Flag-tag:** Basenpaare 744-767; **SV40-polyA:** Basenpaare 852-1235; **f1-Replikationsstart:** Basenpaare 1373-1679; **bla-Promotor:** Basenpaare 1704-1828; **SV40-Promotor:** Basenpaare 1828-2186; **Neomycin/Kanamycin-Resistenzgen:** Basenpaare 2221-3012; **HSV-TK-polyA:** 3013-3471; **pUC-Replikationsstart:** 3600-4267.

7.3 Protein- und cDNA-Sequenz des NF-I/A-1 aus Huhn

1 gaatt
 6 ccggcctcttttctctctcccgcacacgcacacctccgcccgcagccccccgcagcagtc

 66 **atg**tattctccgctctgtctcacgcaggatgaatttcatcccttcatcgaagcacttctg
 1 M Y S P L C L T Q D E F H P F I E A L L

 126 cctcacgtccgagcgtttgcgtaacagctgggttaacctgcaagcccgaaagagaaaatac
 21 P H V R A F A Y T W F N L Q A R K R K Y

 186 ttcaaaaaacatgagaaaacgcacgtcaaaaagaggaagagagggccgtgaaggacgaactc
 41 F K K H E K R M S K E E E R A V K D E L

 246 ttaagtgaaaaacccgaggtaaagcagaaatgggctccagacttctggcaaagcttcg
 61 L S E K P E V K Q K W A S R L L A K L R

 306 aaagatatcaggcctgaatttcgggaggatthttgttctcacagtcacaggaaaaaagcct
 81 K D I R P E F R E D F V L T V T G K K P

 366 ccgtggtgctcctttccaatccagaccagaagggcaagatgagaagaattgactgcctt
 101 P C C V L S N P D Q K G K M R R I D C L

 426 cgccaggcagataaggtctggaggttgacctcgttatggtgattttatttaaaggtatt
 121 R Q A D K V W R L D L V M V I L F K G I

 486 ccgctcgaaagtactgatggcgagcgccttgtaaagtccccacagtgctctaaccggg
 141 P L E S T D G E R L V K S P Q C S N P G

 546 ctgtgctacagccccaccatataggagtttctgtaaggaactcgatttatatttgga
 161 L C V Q P H H I G V S V K E L D L Y L A

 606 tactttgtgcacgctgcagattcaagtcaatctgaaagtcccagccagccaagtgaagct
 181 Y F V H A A D S S Q S E S P S Q P S E A

 666 gatattaaggaccagccagaaaaatggacatthgggcttccaggacagtttgtcacatca
 201 D I K D Q P E N G H L G F Q D S F T S G

 726 ggtgthttcagtgtagccgagctagtaagagtctcacaacaccaatagctgcaggaaca
 221 V F S V T E L V R V S Q T P I A A G T G

 786 ggccctaatttctccctctcagatttgaaagttcttcgtactacagcatgagcccagga
 241 P N F S L S D L E S S S Y Y S M S P G A

 846 gcaatgaggaggtctttacctagcacatcctctaccagctctacaaaacgtatcaaatct
 261 M R R S L P S T S S T S S T K V R I K S

 906 gtggaggatgagatggacagctcctggtaggagccgttctatacaagccaagggcgctct
 281 V E D E M D S P G E E P F Y T S Q G R S

 966 ccaggaagtggcagccagtcagtggatggcatgaagtggaaccaggatatctaagaaac
 301 P G S G S Q S S G W H E V E P G Y L R N

 1026 cccgaacaccgaggagcactacatggaatgccatcgccaactgcattaaagaagtgcagag
 321 P E H R G A L H G M P S P T A L K K S E

 1086 aagtctggthttcagcagtcctcgccttcgcagacctcctcccttggaaacggctthtca
 341 K S G F S S P S P S Q T S S L G T A F T

1146 cagcaccatcgacctgtcattacaggaccagagcaagtccacatgcaacaccatcgact
 361 Q H H R P V I T G P R A S P H A T P S T
 1206 cttcattttccaacatcacccattatccaacagcctgggccatacttctcacaccagca
 381 L H F P T S P I I Q Q P G P Y F S H P A
 1266 atccgctatcatcctcaggagactctgaaagagtttgtccaacttgtctgccccgacgct
 401 I R Y H P Q E T L K E F V Q L V C P D A
 1326 ggtcagcaggctggacaggtggggttcctaaatcccaatggtagcagccaaggcaagggtg
 421 G Q Q A G Q V G F L N P N G S S Q G K V
 1386 cacaatccattccttccctaccccaatggtgccaccaccacctccgccaccaatggctagg
 441 H N P F L P T P M L P P P P P P P M A R
 1446 cctgtgcctctgccagtgccagacacaaaacctccaactacatcaacagaaggaggggcc
 461 P V P L P V P D T K P P T T S T E G G A
 1506 acctctcccacttctccaacctaactcgacaccagcacctcccccgcaaaccgattcgtc
 481 T S P T S P T Y S T P S T S P A N R F V
 1566 agtgttggaccacgggatccaagctttgtaaataatccctcaacagactcagtcctggtagc
 501 S V G P R D P S F V N I P Q Q T Q S W Y
 1626 ctggga~~taa~~agtgctccgcttcccaccacgcaccggacagaccacctgacccttcccac
 521 L G
 1686 ctctgtaacacggaagcagcagcatcgcagcgcagcgacttcacatcggcgggaaggggag
 1746 gcgagcagacaccgacagcaaactcgtacatggaaatggcaaacggttatggttgaatggc
 1806 aaaggccgtaactttttcgagatttttttttttttaacaacttaggactggtgtaatt
 1866 tctcctatgggtgctggaaatggttgggcttcataacttttgaagtgtttcattggttagtg
 1926 taagcgttaggtagactgagtagaactagcctctgctgctgcttaccactcgtggtg
 1986 taacacactttccatattggagcctaactgtttgacagtatcctcatcgatttttcccata
 2046 cagggtgtgagacttcttgagaaatcatgaaacacacttaactataactttttagtagc
 2106 tgaattc

Abb. 7.4: Darstellung der cDNA- (X51486) und Proteinsequenz (CAA35851.1) des NF-I/A-1 aus Huhn. cDNA-Sequenz: Basenpaare 1-2112; kodierende Sequenz: Basenpaare 66-1634; Aminosäuresequenz: 1-522. Das Startcodon (atg) und das Stopcodon (taa) sind fett und unterstrichen dargestellt.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, alle in Anspruch genommenen Quellen und Hilfsmittel in der Dissertation angegeben habe und die Dissertation nicht bereits anderweitig als Prüfungsarbeit vorgelegen hat.

.....

Astrid Auge

Danksagung

Ich danke

- Herrn Prof. Dr. Peter Bruckner für die Möglichkeit der Durchführung dieser Dissertation in seinem Arbeitskreis und dafür, dass er mich auf meinem Weg unterstützt hat.
- Herrn Prof. Dr. Walter Stöcker für die externe Betreuung und Vertretung vor dem Fachbereich Biologie
- allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG020, von denen ich viel lernen konnte und die dafür gesorgt haben, dass es auch immer ein wenig Kurzweil im Laboralltag gab
 - Rita, mit der ich die ganze Zeit das Büro teilen durfte und die mir sehr durch ihre Beratung und ihr Interesse an dieser Arbeit geholfen hat
 - Stefan, der mit vielen Tipps zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat
 - Sandra, die mein Thema weiterführen wird und mir am Ende der Arbeit geholfen hat
 - Alletta, Anne, Gerburg, Marianne und Heidi für die Hilfe und Unterstützung im Laboralltag
 - Bastian für viel Spaß und moralische Unterstützung im Labor
- allen anderen Doktoranden und PostDocs des Institutes dafür, dass die Kommunikation auch „Flur-übergreifend“ hervorragend funktionierte
- meinen „Biologenfreunden“, mit denen ich während des Studiums und der nachfolgenden Promotion schöne Zeiten in Münster erleben durfte
- Judith für viele Litfassabende und Tage am Meer, die wir manchesmal nötig hatten
- meinen Freunden aus „alten Zeiten“. Denn es ist wichtig, auch mit Nicht-Biologen das Leben zu teilen
- meinen Eltern und meiner Schwester Katrin. Mit so einem besonderen familiären Rückhalt ist wahrscheinlich alles zu schaffen!

Und ich danke Marco dafür, dass er damals mit seiner Arbeit am Institut angefangen hatte, denn so durften wir uns kennen lernen. Und das ist gut so!

