

Sandra Escher

Einfluss des Transkriptionsfaktors NFIA-1 auf die Chondrozytendifferenzierung im
embryonalen Hühnersternum

2010

Biologie

**Einfluss des Transkriptionsfaktors NFIA-1 auf die
Chondrozytendifferenzierung im embryonalen Hühnersternum**

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

vorgelegt von
Sandra Escher
aus Duisburg
2010

Dekan: Prof. Dr. Christian Klämbt

Erster Gutachter: Prof. Dr. Peter Bruckner

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Martin Bähler

Tag der mündlichen Prüfung: 21.01.2011

Tag der Promotion:

Zusammenfassung

Während der enchondralen Ossifikation durchlaufen die Chondrozyten regulierte Differenzierungsstadien. Die Regulation der Differenzierung erfolgt durch autokrine und parakrine Faktoren, extrazelluläre Faktoren der ECM, intrazelluläre Signalwege und durch Transkriptionsfaktoren. Zur Analyse der enchondralen Ossifikation hat sich das embryonale Hühnersternum als geeignetes Untersuchungsmodell erwiesen. Die Chondrozyten des kaudalen und kranialen Bereichs des Sternums besitzen unterschiedlich differenzierte Zellen, die sich in ihrer Eigenschaft zu hypertrophieren unterscheiden. In Kokulturen von kaudalen und kranialen Chondrozyten hemmen kaudale Zellen sowohl ihre eigene Hypertrophie als auch die der kranialen Zellen. Demnach müssten diesen Prozess regulierende Proteine in kaudalen Zellen erhöht exprimiert werden. Zur Analyse, welche Gene in kaudalen Chondrozyten erhöht transkribiert werden und somit einen Einfluss auf die Hemmung der Hypertrophie haben, wurde in früheren Studien die Methode der suppressiven subtraktiven Hybridisierung angewandt (Auge, 2004). Hierbei wurden 13 EST355d10-Klone identifiziert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese 13 Klone im 3'-Bereich der NFIA-1-mRNA liegen. Durch Northern Blots, semi-quantitative PCR und Real-Time PCR wurde nach einer differentiellen Expression des NFIA-1 in kaudalen Chondrozyten gesucht. Eine erhöhte Expression des NFIA-1 konnte in kaudalen Chondrozyten mittels semi-quantitativer und Real-Time PCR bestätigt werden. Durch eine Überexpression des NFIA-1 in kranialen Chondrozyten konnte eine hemmende Wirkung des NFIA-1 auf die Hypertrophie anhand der Kollagen X- und der Alkalischen Phosphatase-Synthese festgestellt werden. Eine Aktivierung durch ein *Silencing* von NFIA-1 in kaudalen Chondrozyten konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. Für eine Überexpression des NFIA-1 *in vitro*- und *in vivo*-wurde das RCASBP(A)-Virus verwendet. Nach Klonierung des NFIA-1 konnte in infizierten Chondrozyten eine Hemmung der Hypertrophie anhand einer Abnahme der Kollagen X-Expression beobachtet werden. Bei der *in vivo*-Infektion mit RCASBP(A)NFIA-1-StrepII Viren in die Bein- und Flügelanlagen von Hühnerembryonen zeigte sich eine hohe Streuung der Viren in den gesamten Anlagen, so dass hier kein Effekt des NFIA-1 auf die Hypertrophie und somit auch nicht auf die enchondrale Ossifikation festgestellt werden konnte. Als weiteres Modell

wurde die NFIA-defiziente Maus herangezogen. Es wurde aufgrund des fehlenden NFIA nach einer morphologischen Veränderung in den Tibien gesucht. In Tibien NFIA-defizienter Mäuse konnte im Vergleich zur WT Mäusen eine intrazelluläre Matrilin 1-Färbung nachgewiesen werden. Da NFI an die Silencerregion des Matrilin 1 bindet, kommt es möglicherweise zu einer erhöhten Expression des Matrilin 1 in NFIA-defizienten Mäusen und somit zu einer Akkumulation in den Zellen. Bei den Kollagen X-Färbungen konnte ermittelt werden, dass sich die Zellzahl in dem hypertrophen Bereich von WT und NFIA-defizienten Mäusen nicht unterschied. Allerdings war bei den NFIA-defizienten Mäusen die Fläche der hypertrophen Zone vergrößert. Knochen-Knorpel-Färbungen von NFIA-defizienten Mäusen wiesen im Vergleich mit WT-Tieren einen kürzeren Tibiaknochenbereich auf. Diese Tendenz war nur bei den älteren, neugeborenen Tieren zu erkennen und damit eventuell vom Entwicklungsstadium abhängig.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine Rolle des NFIA-1 in der enchondralen Ossifikation hin. Aufgrund der Identifikation einer NFI-Bindungsstelle in der Promotorregion des Runx2 ist es möglich, dass NFIA-1 als Repressor auf die Runx2-Synthese wirkt. Da Runx2 die Kollagen X-Synthese stimuliert, könnte diese durch eine erhöhte NFIA-1-Synthese, wie es in kaudalen Chondrozyten der Fall ist, gehemmt werden. Hierdurch käme es zu einer Inhibierung der Hypertrophie.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	10
1 Einleitung	1
1.1 Allgemeiner Aufbau des Knorpels.....	1
1.2 Extrazelluläre Matrix des hyalinen Knorpels	2
1.3 Kollagene des hyalinen Knorpels.....	2
1.3.1 Kollagen II.....	3
1.3.2 Kollagen IX.....	4
1.3.3 Kollagen XI.....	5
1.3.4 Kollagen VI.....	5
1.3.5 Kollagen X.....	6
1.4 Nicht-kollagene Matrixproteine.....	7
1.5 Die Wachstumsfuge.....	9
1.6 Aufbau und Entwicklung der Wachstumsfuge.....	10
1.6.1 Reservezone.....	11
1.6.2 Proliferationszone	11
1.6.3 Hypertrophe Zone	12
1.6.4 Invasionszone.....	12
1.7 Embryonales Hühnersternum	13
1.8 Chondrozytendifferenzierung.....	13
1.8.1 Einfluss der ECM	14
1.8.2 Einfluss parakriner Faktoren	15
1.8.3 Einfluss löslicher Faktoren	15
1.8.3.1 Insulin und <i>Insulin-like Growth Factor</i> , IGF.....	15

1.8.3.2	Thyroidhormone.....	16
1.8.3.3	<i>Indian Hedgehog</i> , <i>Ihh</i>	17
1.8.3.4	<i>Bone morphogenetic proteins</i> , <i>BMP</i>	17
1.8.3.5	<i>Parathyroid hormone-related peptide</i> , <i>PTHrP</i>	18
1.8.3.6	Vitamin D-Metabolite.....	19
1.8.3.7	<i>Transforming growth factor β</i> , <i>TGF β</i>	19
1.9	Regulation der Chondrozytendifferenzierung durch Transkriptionsfaktoren.....	20
1.9.1	Runx/Cbfa.....	20
1.9.2	Sox.....	21
1.10	Nuclear Factor I (NFI).....	21
1.11	Zielsetzung der Arbeit.....	23
2	Material und Methoden.....	25
2.1	Material.....	25
2.1.1	Allgemeine Materialien und Geräte.....	25
2.1.1.1	Allgemeine Reagenzien.....	25
2.1.1.2	Zellkultur-Reagenzien und Materialien.....	25
2.1.1.3	Verwendete Geräte.....	27
2.1.2	Vektoren.....	28
2.1.3	Verwendete Bakterienstämme.....	28
2.1.4	Antikörper.....	29
2.1.4.1	Primäre Antikörper.....	29
2.1.4.2	Sekundäre Antikörper für Western Blot, Immunfluoreszenz und Histochemie.....	29
2.2	Methoden.....	30
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	30
2.2.1.1	Herstellen elektrokompenter Bakterien.....	30
2.2.1.2	Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA.....	31
2.2.1.2.1	Transformation elektrokompenter Bakterien.....	31
2.2.1.2.2	Transformation Hitzeschock-kompenter Bakterien.....	31
2.2.1.3	Blau-Weiß-Screening.....	32
2.2.1.4	Bakterienkultivierung und Stammhaltung.....	32

2.2.1.5	Isolierung von Plasmid-DNA	33
2.2.1.5.1	Qiaprep Spin Miniprep	33
2.2.1.5.2	HiSpeed Plasmid Midiprep	33
2.2.1.6	Restriktion von DNA	33
2.2.1.7	Gelelektrophoretische Auftrennung und Gelextraktion von DNA	34
2.2.1.8	Isolierung genomischer DNA.....	35
2.2.1.8.1	Isolierung genomischer DNA aus Mäuseschwänzen	35
2.2.1.8.2	Isolierung genomischer DNA aus Chondrozyten.....	35
2.2.1.9	Konzentrierung von DNA und RNA	35
2.2.1.10	Photometrische Quantifizierung von DNA und RNA.....	36
2.2.1.11	Dephosphorylierung und anschließende Ligation von DNA-Fragmenten...36	
2.2.1.12	Ligationsüberprüfung und Orientierungsbestimmung des Inserts	37
2.2.1.13	Subklonierung in TOPO-Vektor	37
2.2.1.14	Bakterienkolonie-PCR	38
2.2.1.15	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalysen im Internet.....	38
2.2.1.16	Klonierung in RCASBP(A)-Vektor	39
2.2.1.17	RNA-Isolierung aus Zellen und Geweben mit TRIzol.....	39
2.2.1.17.1	RNA-Isolierung aus Gewebe	39
2.2.1.17.2	RNA-Isolierung aus Zellsuspensionen	40
2.2.1.18	RNA-Reinigung mittels DNase I-Verdau und Qiagen RNeasy Mini	40
2.2.1.19	mRNA-Isolierung.....	40
2.2.1.20	Denaturierende RNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	41
2.2.1.21	Northern Blotting	42
2.2.1.22	Hybridisierungstechniken	43
2.2.1.22.1	Radioaktive Markierung einer ssDNA-Sonde.....	43
2.2.1.22.2	Hybridisierung und Detektion von Northern Blots.....	43
2.2.1.22.3	<i>Stripping</i> von Northern Blots	44
2.2.1.23	Reverse Transkription	44
2.2.1.24	Polymerase-Kettenreaktion	45
2.2.1.25	PCR-Mutagenese zur Korrektur der NFIA-1StrepII-Sequenz	50
2.2.1.26	Genotypisierung von NFIA-1-KO Mäusen	50
2.2.2	Proteinchemische Methoden.....	52
2.2.2.1	Lyse von Zellen und Proteinisolierung aus Agarose mit TOTEX-Puffer	52
2.2.2.2	Isolierung nukleärer und zytoplasmatischer Proteine	53
2.2.2.3	Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford	54
2.2.2.4	TCA-Fällung.....	54

2.2.2.5	SDS-Gelelektrophorese	54
2.2.2.6	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	55
2.2.2.7	Western (Immuno-) Blotting	56
2.2.2.8	Gesamt-Proteinanfärbung von Nitrozellulosemembranen	57
2.2.2.9	<i>Stripping</i> von Nitrozellulosemembranen	57
2.2.2.10	Dot Blot	58
2.2.2.11	Kollagenpräparation aus Zellkulturmedium und Agarose.....	58
2.2.2.11.1	Isolierung aus Agarose	58
2.2.2.11.2	Isolierung aus Medium.....	59
2.2.2.12	Autoradiographie.....	59
2.2.2.13	Bestimmung der Alkalischen Phosphatase	59
2.2.3	Zellbiologische Methoden	60
2.2.3.1	Präparation von Sterna aus Hühnerembryos.....	60
2.2.3.2	Chondrozytenisolierung.....	61
2.2.3.3	Agarosekultur primärer Chondrozyten.....	61
2.2.3.4	Monolayerkultur von Chondrozyten.....	62
2.2.3.5	Transfektion von Chondrozyten.....	63
2.2.3.5.1	Transfektion mit Amaxa	63
2.2.3.5.2	Transfektion mit Fugene	64
2.2.3.6	Immunfluoreszenzen von Chondrozyten	65
2.2.3.7	Monolayerkultur von DF1 Zellen.....	66
2.2.3.8	Kokultivierung von Chondrozyten und DF1/CEF Zellen.....	66
2.2.3.9	Herstellung primärer CEF Zellen	67
2.2.3.10	Transfektion von DF1 Zellen mit RCASBP(A)NFIA-1StrepII	68
2.2.3.11	Aufkonzentrierung der Retroviren RCASBP(A)NFIA-1StrepII.....	70
2.2.3.12	Titration der Retroviren RCASBP(A)NFIA-1StrepII.....	70
2.2.3.13	Kryokonservierung von Zellen	71
2.2.4	Histochemische Färbungen	71
2.2.4.1	Immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten mit DAB.....	72
2.2.4.2	Kollagen X-Färbung von Gewebeschnitten mit DAB	73
2.2.4.3	Immunfluoreszenzen von Gewebeschnitten	74
2.2.4.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Mayer (Mayer, 1903).....	74
2.2.4.5	Knochen-Knorpel-Färbung des gesamten Skeletts	75
2.2.5	Embryologische Techniken	75
2.2.6	Tierhaltung und -zucht	76

3 Ergebnisse	77
3.1 Expressionsvergleich von NFIA-1/EST355d10 in kaudalen und kranialen Chondrozyten	78
3.1.1 Expressionsvergleich durch Northern Blotting	79
3.1.2 Expressionsvergleich durch semi-quantitative PCR.....	81
3.1.3 Expressionsvergleich durch Real-Time PCR	83
3.1.4 Expressionsvergleich durch Gene Array.....	83
3.2 Identifikation und Vorkommen der NFI-Isoformen in Chondrozyten.....	84
3.2.1 Identifikation des EST355d10 auf Chromosom 8 in unmittelbarer Nähe zu NFIA-1	85
3.2.2 Identifikation des EST355d10 auf der NFIA-1-mRNA.....	86
3.3 Überexpression von NFIA-1 in kranialen Chondrozyten mittels Elektroporation (nach Amaxa).....	87
3.3.1 Kollagensynthese transfizierter Chondrozyten.....	92
3.3.2 Alkalische Phosphatase-Synthese transfizierter Chondrozyten	95
3.3.3 Nachweis der Expression von NFIA-1 in transfizierten Chondrozyten..	96
3.4 <i>Silencing</i> des NFIA-1-Gens in kaudalen Chondrozyten	97
3.4.1 Kollagensynthese der NFIA-1-herunterregulierten Chondrozyten.....	99
3.4.2 Alkalische Phosphatase der NFIA-1-herunterregulierten Chondrozyten.....	101
3.4.3 <i>Silencing</i> -Effekt des NFIA-1 auf Matrilin 1, 3 und Kollagen VI	103
3.5 Überexpression von NFIA-1 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> mittels RCASBP(A) Virus-System.....	105
3.5.1 Klonierung der NFIA-1-, NFIA-1Flag- und NFIA-1StrepII-Sequenzen in den pCRII TOPO-Vektor	105
3.5.2 Klonierung der NFIA-1StrepII-Sequenz in den RCASBP(A)-Vektor und Funktionsanalyse	108

3.5.3	Kokultur von Chondrozyten mit RCASBP(A)NFIA-1StrepII-infizierten DF1 Zellen	110
3.5.4	Kultur von RCASBP(A)NFIA-1StrepII-infizierten Chondrozyten.....	112
3.5.5	Histologische Expressionsanalyse von RCASBP(A)NFIA-1StrepII in Bein- und Flügelanlagen	114
3.6	Lokalisation der Kollagene I und X sowie Matrilin 1 und ADAMTS 4 in Tibien von NFIA-KO Mäusen	117
3.7	Analyse der Knochen-Knorpel-Färbung von NFIA-KO, Heterozygoten und WT Mäusen.....	124
4	Diskussion	129
4.1	Erhöhte Expression von NFIA-1/EST355d10 in kaudalen Chondrozyten ..	130
4.2	NFIA und NFIB werden hauptsächlich in Chondrozyten exprimiert	131
4.3	EST355d10-Sequenz ist Bestandteil der NFIA-1-mRNA	132
4.4	Überexpression von NFIA-1 inhibiert die Hypertrophie kranialer Chondrozyten <i>in vitro</i>	133
4.5	NFIA-1- <i>Silencing</i> in kaudalen Chondrozyten hat keinen induzierenden Einfluss auf die Hypertrophie <i>in vitro</i>	137
4.6	Funktionalitätsanalyse des RCASBP(A)NFIA-1StrepII-Virus	140
4.6.1	Hemmung der Hypertrophie in mit RCASBP(A)NFIA-1StrepII-Viren infizierten Chondrozytenkulturen.....	140
4.6.2	Hohe Streuung der RCASBP(A)NFIA-1StrepII-Viren nach Infektion <i>in vivo</i>	142
4.7	Keine unterschiedliche Verteilung von Kollagen I, ADAMTS 4 und Kollagen II in NFIA-KO Mäusetibien gegenüber WT.....	143
4.7.1	Intrazelluläre Matrilin 1-Lokalisation in der proliferativen, prähypertrophen und hypertrophen Zone von NFIA-KO Mäusetibien .	144
4.7.2	Vergrößerung der hypertrophen Zone in NFIA-KO Mäusetibien.....	146
4.8	Verkürzter Tibiaknochenbereich bei neugeborenen NFIA-KO Mäusen	147
4.9	Ausblick	148

5 Anhang	151
5.1 Vektorkarten.....	151
5.1.1 Klonierungsvektor pCRII-TOPO.....	151
5.1.2 Klonierungsvektor pBluescript II SK(-).....	152
5.1.3 Expressionsvektor pCMV-Tag 4A.....	153
5.1.4 Expressionsvektor pmaxFP-Green-C.....	154
5.1.5 Expressionsvektor RCASBP(A).....	155
5.2 Fehlerhafte NFIA-1 ORF-Sequenz.....	156
6 Literaturverzeichnis	157
7 Danksagung	179

Abkürzungsverzeichnis

ADAMTS	<i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>
ALP	Alkalische Phosphatase
Amp	Ampicillin
AP1	<i>activator protein</i>
BLAST	<i>basic local alignment and search tool</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Cbfa	<i>Core binding factor</i>
cDNA	komplementäre DNA
CEF	<i>chick embryo fibroblast</i>
CMP	<i>cartilage matrix protein</i>
CMV	Cytomegalovirus
COMP	<i>cartilage oligomeric protein</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EMSA	<i>electrophoretic mobility assay</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FKS	Fötales Kälberserum
h	Stunde
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IHC	Immunhistochemie
Ihh	<i>Indian Hedgehog</i>
KO	<i>knockout</i>
LB	Luria Bertani
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOPS	3(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NC	nicht-kollagene Domäne
NF	<i>Nuclear factor</i>
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
Ptc	<i>patched</i>
PTH	<i>parathyroid hormone</i>
PTHrP	<i>parathyroid hormone-related peptide</i>
RCAS	<i>Replication-Competent Avian sarcoma-leukosis virus (ASLV) with Splice acceptor vector</i>
RACE-PCR	<i>rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction</i>

RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur/Reverse Transkriptase
Runx	Runt-related
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
Smad	<i>Sma and Mad related proteins</i>
Smo	<i>smoothened</i>
Sox	<i>sry-related HMG box</i>
SP	<i>specificity protein</i>
SSH	Suppressive subtraktive Hybridisierung
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBST	<i>tris-buffered saline + Tween 20</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Allgemeiner Aufbau des Knorpels

Knorpel gehört zu den Binde- und Stützgeweben des Körpers. Er findet sich an den Stellen, wo flexible, druckresistente Strukturen benötigt werden (Löffler und Petrides, 2003). Daher ist seine Hauptaufgabe, biomechanischen Widerstand gegenüber Dehn- und Kompressionskräften zu leisten. Er geht in der embryonalen Entwicklung aus dem Mesoderm hervor, wie auch andere Bindegewebstypen (Knochen, Cornea, Sehnen und Glaskörper des Auges). Der Knorpel ist ein spezialisiertes Gewebe, welches nur aus einem Zelltyp, den Chondrozyten, besteht. Umgeben sind die Chondrozyten von ihren eigenen Syntheseprodukten, die eine extrazelluläre Matrix (ECM) bilden. Die strukturelle und metabolische Einheit des Knorpels ist das Chondron, welches aus den Chondrozyten und der von ihnen produzierten ECM besteht. Da der Knorpel nicht vaskularisiert ist, müssen die Chondrozyten durch Diffusion mit den notwendigen Nährstoffen versorgt werden. Die ECM bestimmt je nach Art ihrer Zusammensetzung und Morphologie die Unterteilung des Knorpels in hyalinen, elastischen und Faserknorpel (Horton, 1993).

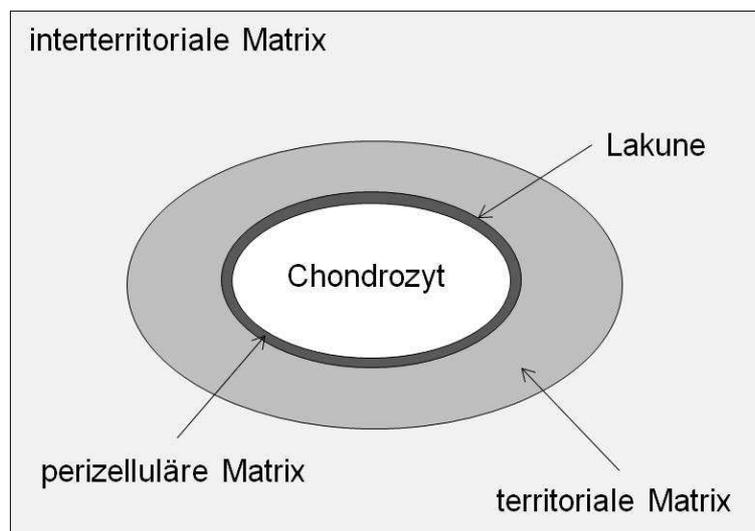


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines Chondrons

Nach Horton (Horton, 1993).

Hyaliner Knorpel ist der am häufigsten vorkommende Knorpeltyp. In der embryonalen Entwicklung bildet er die Vorstufe für die durch enchondrale Ossifikation entstehenden Knochen. Im adulten Organismus kommt er an Gelenkoberflächen, Rippenknorpelansätzen, dem Nasenseptum, dem Kehlkopf, der Trachea sowie den Bronchien vor. Als artikulärer Knorpel sorgt er für eine reibungslose Bewegung der Skeletteile und schützt den Knochen vor mechanischer Belastung.

Elastischer Knorpel ist ähnlich wie hyaliner Knorpel aufgebaut. Allerdings beinhaltet die ECM des elastischen Knorpels ein ausgeprägtes Elastinnetzwerk, so dass er sehr biegeelastisch ist. Er kommt im Kehlkopfdeckel, der Ohrmuschel und in der Ohrtrumpete vor.

Faserknorpel ist das Übergangsgewebe zwischen hyalinem Knorpel und dichtem Bindegewebe. Seine ECM besteht hauptsächlich aus Kollagenfasern, was seine hohe Festigkeit erklärt. Er kommt in den Zwischenwirbelscheiben, der Schambeinfuge, dem Kiefergelenk und in den Menisken vor.

1.2 Extrazelluläre Matrix des hyalinen Knorpels

Die Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix des hyalinen Knorpels bestehen aus den charakteristisch gebänderten Fibrillen (Periodizität 67 nm), die ein dreidimensionales Netzwerk bilden, sowie den Proteoglykanen (Heinegard und Oldberg, 1989). Die gebänderten Fibrillen setzen sich vorwiegend aus Kollagenen zusammen, die durch kovalente Quervernetzung verknüpft sind. Kollagen II, das mit Kollagen IX und XI zu heterotypischen Fibrillen assembliert, ist die quantitative Hauptkomponente des Knorpels (Mendler *et al.*, 1989; Bruckner und van der Rest, 1994). Die Hauptkomponenten der extrafibrillären Matrix wiederum sind Proteoglykane, die aufgrund ihrer stark negativ geladenen Seitenketten Wasser binden und somit für einen hohen Kompressionswiderstand des Knorpels sorgen.

1.3 Kollagene des hyalinen Knorpels

Bisher wurden 29 Kollagentypen beschrieben (Boot-Handford *et al.*, 2003; Veit *et al.*, 2006; Plumb *et al.*, 2007; Soderhall *et al.*, 2007; Gordon und Hahn, 2010), wobei die Kollagene XXVIII und XXIX Varianten des Kollagen VI sind (Veit *et al.*, 2006; Gara *et al.*, 2008; Fitzgerald *et al.*, 2008; Gordon und Hahn, 2010). Das gemeinsame

Strukturmerkmal der Kollagene ist ein stabförmiger, tripelhelikaler Abschnitt (kollagene Domäne: COL), der sich zwischen den verschiedenen Kollagentypen in der Länge und der Anzahl der Unterbrechungen durch nicht helikale Abschnitte (nichtkollagene Domäne: NC) unterscheidet. Im Bereich der tripelhelikalen Abschnitte weisen die α -Ketten eine sich wiederholende (Gly-X-Y)_n-Sequenz auf. Hierbei wird die Position X am häufigsten von der Aminosäure Prolin und die Position Y von der Aminosäure Hydroxyprolin eingenommen. Glycin in jeder dritten Position der Sequenz ist für die tripelhelikale und kompakte Faltung essentiell.

Aufgrund ihrer Eigenschaften und supramolekularen Organisation werden die verschiedenen Kollagentypen in unterschiedliche Gruppen eingeteilt: fibrilläre Kollagene (I-III, V, XI, XXIV und XXVII), Basalmembran-Kollagene (IV), Multiplexine (XV und XVIII), Fibrillen-assoziierte Kollagene (IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI und XXII), netzwerkbildende Kollagene (VIII und X), Transmembran-Kollagene (XIII, XVII, XXIII und XXV) und sonstige Kollagene (VI, VII und XXVI) (Gordon und Hahn, 2010).

Der hyaline Knorpel besteht hauptsächlich aus den fibrillären Kollagenen II (80 %) und XI (10 %) sowie dem Fibrillen-assoziierten Kollagen IX (10 %) (Vaughan *et al.*, 1988; Mendler *et al.*, 1989). Zusätzlich treten noch in geringeren Mengen die Kollagene I, III, V, X, XII, XIV, XVI, XXVII (Schmid und Linsenmayer, 1985; Eyre, 2002) im Knorpel auf, wobei diese Kollagene unterschiedlich stark exprimiert werden und teilweise in unterschiedlichen Differenzierungsstadien auftreten.

1.3.1 Kollagen II

Kollagen II ist das häufigste Kollagen des Knorpels und knorpelähnlicher Gewebe. Dort kommt es in quergestreiften Fibrillen vor (Mendler *et al.*, 1989) und mit den Kollagenen I, III, V und XI gehört es zu den fibrillenbildenden Kollagenen. Diese Kollagene werden als Prokollagene sezerniert. Die Pro- α -Ketten bestehen aus einer 1000 Aminosäuren-langen, kontinuierlichen, tripelhelikalen Domäne. An den Enden der Pro- α -Ketten befinden sich kurze nicht-tripelhelikale Peptide (Ganten und Ruckpaul, 2003). Bevor sich im extrazellulären Raum die Kollagenfibrillen bilden, werden die Propeptide durch spezifische N- und C-Propeptidasen abgespalten. Kollagen II ist ein Homotrimer, das sich aus $[\alpha 1(\text{II})]_3$ -Ketten zusammensetzt. Durch alternatives Spleißen kommen zwei Formen des Kollagen II vor, IIA und IIB. Die Kollagen IIA-Form enthält das Exon 2, welches eine cysteinreiche Domäne kodiert,

wohingegen der Kollagen IIB-Form diese fehlt.

Mutationen im COL2A1-Gen verursachen eine Reihe von Chondrodysplasien. Diese zeichnen sich durch Kleinwuchs mit kurzen Extremitäten oder skeletale Deformationen aus (Olsen, 1996). Bei Patienten mit früh einsetzender, familiärer Osteoarthritis konnten ebenso Mutationen in diesem Gen identifiziert werden (Ritvaniemi *et al.*, 1995).

1.3.2 Kollagen IX

Kollagen IX ist durch eine unterbrochene Tripelhelix charakterisiert und gehört zur Gruppe der *fibril-associated collagens with interrupted triple helices* (FACIT). Ursprünglich wurde Kollagen IX im Knorpel des Huhns identifiziert (van der Rest *et al.*, 1985; Vaughan *et al.*, 1988; Olsen, 1997). Hauptsächlich wird es im hyalinen Knorpel exprimiert. Es wurde aber auch im Auge, im Innenohr und in der Bandscheibe nachgewiesen (Richardson *et al.*, 1987; Liu *et al.*, 1993a; Wu und Eyre, 2003). Kollagen IX ist Bestandteil von Kollagen II-haltigen Fibrillen des hyalinen Knorpels. Dabei ist es zu 1 % Bestandteil von dickeren und zu 10 % Bestandteil von dünneren Kollagen II-haltigen Fibrillen (Hagg *et al.*, 1998).

Kollagen IX ist ein heterotrimeres Molekül, welches aus den $\alpha 1(\text{IX})$, $\alpha 2(\text{IX})$ und $\alpha 3(\text{IX})$ Ketten besteht. Jede Kette besitzt drei kollagene Domänen (COL1-3), welche von vier nicht-kollagenen Domänen (NC1-4) flankiert werden (Bruckner und van der Rest, 1994). Die Tripelhelix wird durch Disulfidbrücken in der NC1- und NC3-Domäne stabilisiert. Die N-terminale NC4-Domäne der $\alpha 1(\text{IX})$ -Kette ist mit ihren 243 Aminosäureresten gegenüber den NC1-3-Domänen (12-30 Aminosäurereste) relativ lang. Auf der NC3-Domäne der $\alpha 2(\text{IX})$ -Kette befindet sich eine Bindungsstelle für eine Chondroitinsulfat-Seitenkette, die allerdings gewebeabhängig vorkommt (Diab *et al.*, 1996). Aufgrund eines alternativen Promotors wird die NC4-Domäne der $\alpha 1(\text{IX})$ -Kette nicht unbedingt exprimiert. Diese verkürzte Kollagen IX-Form kommt in embryonalen Geweben wie dem Notochord, der Cornea und im Glaskörper vor (Brewton *et al.*, 1991; Swiderski und Solursh, 1992; Savontaus *et al.*, 1998).

Kollagen IX ist mit Kollagen II kovalent quervernetzt (Bruckner *et al.*, 1988). Dabei ist die COL2-Domäne des Kollagen IX über Lysyl- und Hydroxyllysylreste mit den N- und C-Telopeptiden von Kollagen II sowie die NC1-Domäne des Kollagen IX mit der Tripelhelix von Kollagen II verknüpft (Eyre *et al.*, 2004). Insgesamt gibt es innerhalb

des Kollagen IX bis zu sechs Positionen, an denen Quervernetzungen auftreten (Eyre, 2002). Es wird vermutet, dass durch das Kollagen IX eine kovalente Verknüpfung zwischen Fibrillen hergestellt werden kann und das so gefestigte Netzwerk Widerstand gegen den Schwelldruck der Proteoglykane leistet (Eyre, 2002).

Mutationen in den humanen Kollagen IX-Genen führen zu multipler epiphysärer Dysplasie, zu Osteoarthrose oder zu Schäden der Zwischenwirbelscheiben (Briggs *et al.*, 1994; Annunen *et al.*, 1999; Paassilta *et al.*, 1999; Bonnemann *et al.*, 2000; Czarny-Ratajczak *et al.*, 2001).

1.3.3 Kollagen XI

Kollagen XI liegt im Knorpel überwiegend als $\alpha 1(XI)$, $\alpha 2(XI)$, $\alpha 3(XI)$ Heterotrimer vor, wobei die $\alpha 1(XI)$ und $\alpha 2(XI)$ Kette starke Homologien zu der $\alpha 1(V)$ aufweisen (Greenspan *et al.*, 1991; Nah *et al.*, 1992). Die $\alpha 3(XI)$ ist von ihrer Primärsequenz mit der $\alpha 1(II)$ -Kette identisch (Eyre und Wu, 1987). Die $\alpha 1(XI)$ -Kette kann mit Kollagen V-Ketten Heterotrimere bilden, die im Glaskörper und Knochen gefunden werden (Bishop *et al.*, 1994). Kollagen XI und Kollagen V zeichnen sich im Gegensatz zu anderen fibrillären Kollagenen durch ein nicht oder nur partiell prozessiertes N-Propetid aus. Dieses N-Propetid verhindert bei der Fibrillogenese die Anlagerung weiterer Kollagenmoleküle, wodurch es die Dicke von Fibrillen reguliert (Birk *et al.*, 1990). Es wird vermutet, dass Kollagen XI den Kern der quergestreiften Fibrillen bildet und sich Kollagen II und IX anlagern (Bateman *et al.*, 1996).

Eine Mutation in der humanen $\alpha 2(XI)$ -Kette, bei der diese verkürzt ist, führt zum Stickler-Syndrom, welches sich in degenerativen Netzhautveränderungen, Hörverlust und Arthropathie der Beingelenke äußert. Die *cho/cho* Maus zeigt aufgrund einer Mutation in dem COL11A1-Gen einen Verlust der $\alpha 1(XI)$ -Kette. Dieses führt zu schweren Schäden in der Entwicklung von Knorpel und Knochen, so dass die Tiere bei der Geburt sterben (Li *et al.*, 1995). Im Knorpel dieser Mäuse werden statt dünner abnorm breite Kollagenfibrillen gefunden, was ebenfalls auf eine Funktion des Kollagen XI bei der Regulation des Fibrillendurchmessers hinweist.

1.3.4 Kollagen VI

Kollagen VI ist ein weiterer wichtiger Bestandteil des hyalinen Knorpels. Kollagen VI setzt sich aus den $\alpha 1(VI)$ -, $\alpha 2(VI)$ - und $\alpha 3(VI)$ -Ketten zusammen, die zu

Heterotrimeren assemblieren und typischerweise in Mikrofibrillen vorkommen. Alle Ketten weisen sehr kurze tripelhelikale Domänen sowie große nichthelikale N- und C-terminale NC-Domänen auf, wobei dieser Bereich bei der $\alpha 3(\text{VI})$ -Kette am größten ausfällt (Weil *et al.*, 1988). Antiparallel angeordnete Kollagen VI-Moleküldimere formen durch seitliche Anlagerung Tetramere. Nach Sekretion in die ECM verknüpfen sich diese Tetramere an den Ende zu einem mikrofibrillärem Netzwerk. Kürzlich wurden drei weitere α -Ketten ($\alpha 4(\text{VI})$, $\alpha 5(\text{VI})$ und $\alpha 6(\text{VI})$) gefunden, die strukturelle Ähnlichkeit mit der $\alpha 3(\text{VI})$ -Kette aufweisen (Gara *et al.*, 2008).

1.3.5 Kollagen X

Kollagen X ist ein Homotrimer aus drei $\alpha 1(\text{X})$ -Ketten. Zusammen mit Kollagen VIII gehört es zu den kurzen netzwerkbildenden Kollagenen. Kollagen X kommt typischerweise im hypertrophen Knorpel der Wachstumsfuge während der enchondralen Ossifikation vor, sowie in Frakturen während des Heilungsprozesses und im artikulären arthrotischen Knorpel (Grant *et al.*, 1987; Schmid und Linsenmayer, 1983; von der Mark *et al.*, 1992). Da es ausschließlich von hypertrophen Chondrozyten exprimiert wird, wird es als Markerprotein für das Stadium der Spätdifferenzierung der Chondrozyten angesehen (Löffler und Petrides, 2003). Die Kollagen X-Ketten bestehen aus einer zentralen, einer kleinen N-terminalen und einer großen C-terminalen tripelhelikalen Domäne und besitzen ein Molekulargewicht von 59 kDa (Schmid und Linsenmayer, 1987). Als Funktion des Kollagen X wird angenommen, dass es die Kalzifizierung des artikulären Knorpels unterstützt und/oder eine strukturelle Funktion besitzt (Gannon *et al.*, 1991; Walker *et al.*, 1995; Gress und Jacenko, 2000).

Mutationen im COL10A1-Gen, die zu einer Störung der Tripelhelix führen, verursachen eine metaphysäre Chondrodysplasie vom Schmid-Typ (SMCD). Hier zeigen die Patienten verkürzte Gliedmaßen und Skelettdeformationen (Warman *et al.*, 1993). Auch bei Kollagen X-defizienten Mäusen wurde eine metaphysäre Chondrodysplasie vom Schmid-Typ mit unterschiedlicher Ausprägung beobachtet (Jacenko *et al.*, 1993; Kwan *et al.*, 1997; Jacenko *et al.*, 2002).

1.4 Nicht-kollagene Matrixproteine

Neben den Kollagenen enthält der Knorpel eine Vielzahl von nicht-kollagenen Komponenten (s. Tab. 1.1). Überwiegend handelt es sich hierbei um Proteoglykane. Sie unterscheiden sich durch die verschiedenen Glykosaminoglykan (GAG)-Ketten, die am Proteinkern assoziiert sind. Bei den GAG-Ketten kann es sich um Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Keratansulfat und Heparansulfat handeln. Aggrecan ist das größte Proteoglykan im Knorpel und mit etwa 30 Keratansulfat- und ungefähr 100 Chondroitinsulfat-Seitenketten substituiert. Die Vielzahl der negativen Ladungen verursacht einen osmotisch bedingten Wassereinstrom, der ein wassergefülltes Kompartiment schafft und hierdurch für den Kompressionswiderstand des Knorpels sorgt. Im Knorpel bildet Aggrecan mit Hyaluronsäure riesige Aggregate. Ebenso kommen im Knorpel kleinere Proteoglykane wie Decorin, Biglykan und Fibromodulin vor, denen eine Rolle bei der Zellfunktion und der Stabilisierung der Kollagenmatrix zugeschrieben wird (Buckwalter und Mankin, 1998). Eine weitere Komponente im Knorpel sind die Glykoproteine, diese besitzen im Gegensatz zu den Proteoglykanen einen sehr großen Proteinanteil mit kurzen Kohlenhydratseitenketten, wobei das *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP) einer dieser Vertreter ist. COMP kann an Matrilin 1, 3 und 4 (Mann *et al.*, 2004) und an die Kollagene I, II und IX (Holden *et al.*, 2001; Thur *et al.*, 2001) binden. Es konnte gezeigt werden, dass COMP als Adapter zwischen Matrilin und Kollagen IX fungiert (Budde *et al.*, 2005). Glykoproteinen wird eine Funktion in der Stabilisierung der Matrix und bei Chondrozyten-Matrix-Interaktionen zugesprochen.

Tab. 1.1: Proteoglykane und nicht-kollagene Matrixproteine des Knorpels

Aggregat- bildende Proteoglykane	Aggrekan	Strukturgebende Proteine	COMP (Thrombospondin-5)
	Versikan		Thrombospondin-1 und -3
	Link Protein		CMP (Matrilin 1)
Leucin-reiche Proteoglykane	Biglykan (DS-PGI)		Matrilin 3
	Dekarin (DS-PGII)		CILP
	Epiphykan (DS-PGIII)		C-Typ Lektin
	Fibromodulin		Fibronektin
	Lumikan		PRELP
Andere Proteoglykane	Perlekan		Chondroadherin
	SZP/Lubrikin		Tenascin-C
Regulatorische Proteine	gp-39/YKL-40	Fibrillin	
	Matrix Gla-Protein/MGP	Elastin	
	Pleiotrophin	Andere Proteine	Chondrokalzin
	Chondromodulin-I/SCGP		PARP
	Chondromodulin-II		Lysozym
	CD-RAP		Phospholipase A2
	Wachstumsfaktoren		Proteinasen und Inhibitoren

CD-RAP: *cartilage-derived retinoic acid responsive protein*; CILP: *cartilage intermediate layer protein*; CMP: *cartilage matrix protein*; COMP: *cartilage oligomeric matrix protein*; DS-PG (I, II, III): *dermatan sulfate proteoglycan*; 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* (Roughley, 2001)

1.5 Die Wachstumsfuge

Die Osteogenese ist ein hochorganisierter Prozess, bei dem man zwischen intramembranöser und enchondraler Ossifikation unterscheidet (Olsen *et al.*, 2000; Kronenberg, 2003). Bei der intramembranösen Ossifikation differenzieren mesenchymale Zellen direkt zu Osteoblasten und bauen somit den Hauptteil des Gesichts- und Schädelknochen auf. Zudem trägt die intramembranöse Ossifikation zur appositionellen Bildung von periostalen Knochen um den Röhrenknochenschaft bei. Mittels enchondraler Ossifikation entstehen skelettale Komponente der Gliedmaßen (s. Abb. 1.2). Hierbei bilden die kondensierten mesenchymale Zellen zunächst die Knorpelanlagen, die in ihrer Form dem künftigen Knochen entsprechen (Chung, 2004). Nach der Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten beginnen diese mit der Sekretion knorpelspezifischer Proteine und bilden somit die ECM. In der Mitte der Knorpelanlage bildet sich das primäre Ossifikationszentrum aus. Die Chondrozyten beginnen zu hypertrophieren, was in einer veränderten Matrix resultiert. Es kommt zur Freisetzung von Hydroxylapatit-Kristallen aus Matrixvesikeln, welche zur Mineralisierung der Knorpelmatrix führen (Anderson, 2003). Blutgefäße wachsen in die bisher avaskuläre Knorpelmatrix, wodurch Osteoblasten und Osteoclasten in das primäre Ossifikationszentrum gelangen. Die hypertrophen Chondrozyten werden apoptotisch, das Knorpelgewebe wird abgebaut und schließlich durch Knochen ersetzt. Das knöcherne Zentrum breitet sich nun zentrifugal in beiden Richtungen der Längsachse aus. An den Enden der Knorpelanlagen, den Epiphysen, entstehen die sekundären Ossifikationszentren. Diese breiten sich ebenfalls zentrifugal aus, wobei die Gelenkflächen knorpelig bleiben. Zwischen diesen beiden sekundären Ossifikationszentren findet das Längswachstum des Knochens statt. Dies geschieht durch eine Abfolge von Proliferation, Hypertrophie, Mineralisierung, Knorpelabbau und Knochenbildung. Das Längenwachstum des Knochens endet erst bei Erreichen der Geschlechtsreife, wenn durch eine hohe Konzentration an Sexualhormonen alle Chondrozyten in der Wachstumsfuge zur Hypertrophie angeregt werden und somit der restliche Knorpel durch Knochen ersetzt wird.

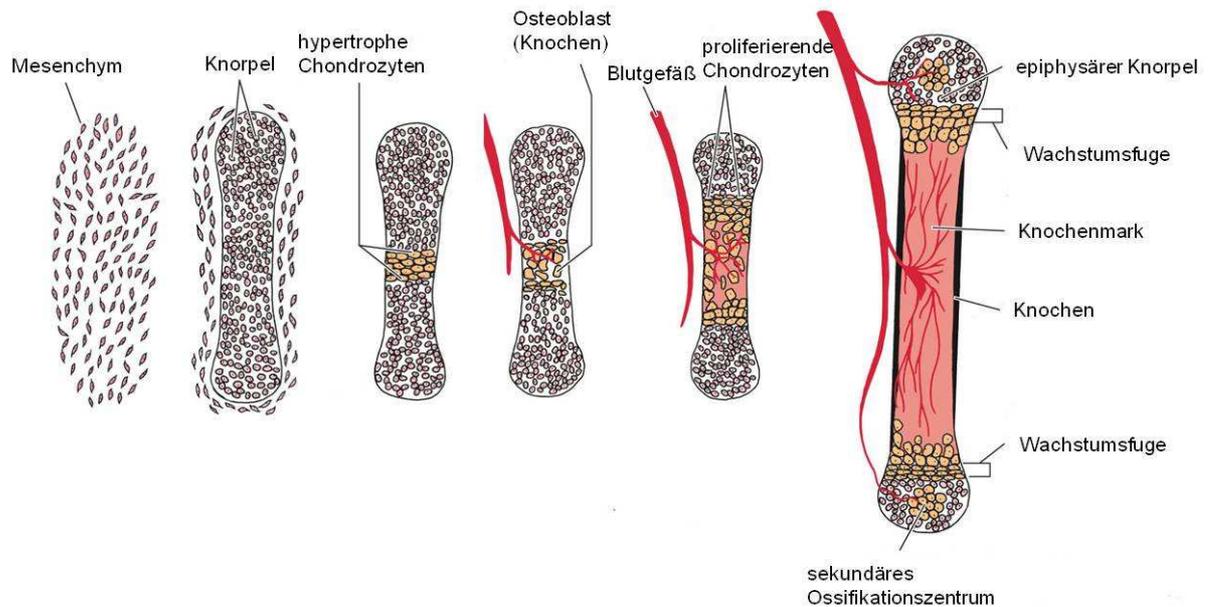


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Knochenbildung durch enchondrale Ossifikation

Mesenchymale Zellen kondensieren und bilden durch Differenzierung in Chondrozyten die knorpelige Anlage der Knochen. Die Knorpelanlage wird durch Proliferation, weitere Differenzierung der Zellen sowie Invasion von Blutgefäßen und Knorpelabbau in Knochen umgewandelt. Verändert übernommen aus Gilbert (Gilbert, 2006).

1.6 Aufbau und Entwicklung der Wachstumsfuge

In der Wachstumsfuge kommt es infolge der verschiedenen Differenzierungsstadien der Chondrozyten zu einer charakteristischen vertikalen Gliederung (s. Abb. 1.3), sowie zur Expression spezifischer Proteine innerhalb der einzelnen Zonen (Hunziker, 1994; Ballock und O'Keefe, 2003). Die Reservezone beinhaltet ruhende Chondrozyten und dient als Zellreservoir. Beim Eintritt in die Proliferationszone beginnen sich diese Zellen zu teilen, abzuflachen und sich in Säulen zu organisieren. Die nachfolgende hypertrophe Zone beinhaltet ausdifferenzierte Zellen mit einem erhöhten Zellvolumen, die letztlich apoptotisch werden. Nach dem Einwandern von Blutgefäßen in die Invasionszone wird durch Umbau und Ersetzen der Knorpelmatrix der trabekuläre Knochen gebildet.

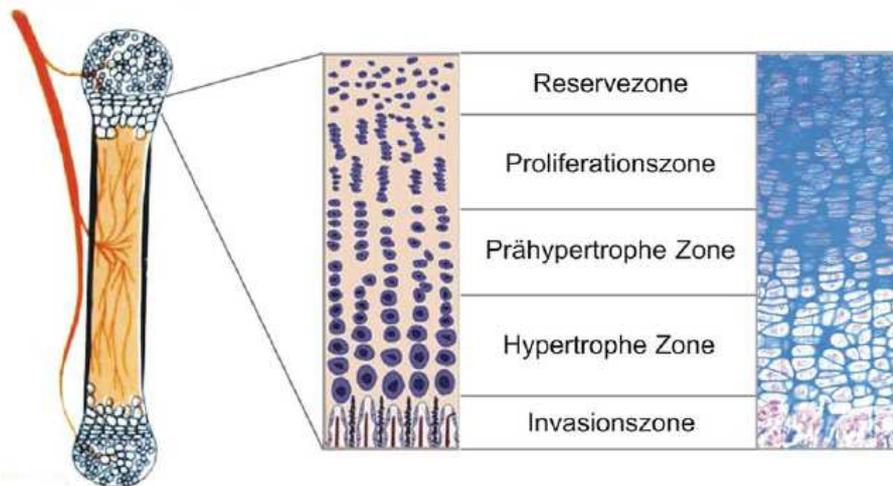


Abb. 1.3: Aufbau der Wachstumsfuge

Durch ihre horizontale Gliederung aufgrund der verschiedenen Differenzierungsstadien kann die Wachstumsfuge in unterschiedliche Zonen eingeteilt werden. Die ruhenden Chondrozyten (Reservezone) beginnen zu proliferieren, wobei sie sich säulenförmig anordnen (Proliferationszone). Diese Zellen reifen heran (Prähypertrophe Zone), bis sie schließlich hypertrophieren und sich ihr Volumen vergrößert (Hypertrophe Zone). Durch Eindringen von Blutgefäßen kommt es zur Mineralisierung des Gewebes und somit zur Bildung des Knochens (Invasionszone). Verändert übernommen aus Gilbert und Horton (Horton, 1993; Gilbert, 2006).

1.6.1 Reservezone

In dieser Zone liegen die Chondrozyten als kleine runde, meist vereinzelte Zellen vor, die mit einer für den hyalinen Knorpel typischen Matrix umgeben sind (Hunziker, 1994; Brochhausen *et al.*, 2009). Sie proliferieren kaum und sind metabolisch wenig aktiv. In dieser Zone kommen Stammzell-ähnliche Zellen vor, die neue proliferierende Chondrozyten erzeugen können (Abad *et al.*, 2002).

1.6.2 Proliferationszone

In der Proliferationszone findet die Zellteilung statt. Dabei ordnet sich die Mitosespindel senkrecht zur Längsachse des Knochens an (Stevenson *et al.*, 1990). Nun liegen die Tochterzellen nebeneinander in einer Lakune. Sie werden zunehmend diskoid, so dass eine Zelle über die andere gleiten kann (s. Abb. 1.4). Hiernach vergrößert sich der Abstand der beiden Tochterzellen zueinander. Es entsteht die charakteristische, säulenförmige Anordnung, die für das Längenwachstums des Knochens verantwortlich ist (Morales, 2007). Ab einem bestimmten Zeitpunkt verlieren die Chondrozyten ihre Fähigkeit zur Proliferation, und

das Zellvolumen nimmt zu. Dieses prähypertrophe Stadium stellt einen Übergang zur hypertrophen Zone dar.

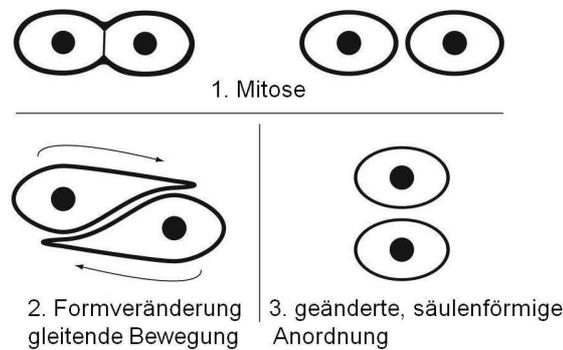


Abb. 1.4: Bewegung proliferierender Chondrozyten in der Wachstumsfuge

Nach der mitotischen Teilung liegen die Tochterzellen nebeneinander (1.). Nun gleitet eine Zelle über die andere (2.), so dass sich eine säulenförmige Ausrichtung ergibt (3.). Verändert übernommen aus Morales (Morales, 2007).

1.6.3 Hypertrophe Zone

Die prähypertrophen Chondrozyten durchlaufen eine terminale Differenzierung, woraus sich ausdifferenzierte, hypertrophe Chondrozyten entwickeln. Für die hypertrophen Chondrozyten sind eine Volumenzunahme und eine veränderte Expression der Matrixproteine charakteristisch. In dieser Zone werden Matrixvesikel von den Chondrozyten gebildet, die Kalziumphosphat, Hydroxylapatit, Phosphatasen und Matrixmetalloproteinasen sekretieren. Dies führt zur Mineralisierung und Umbau der ECM. Letztlich werden die hypertrophen Chondrozyten apoptotisch (Olsen *et al.*, 2000). Für hypertrophe Chondrozyten sind Kollagen X und Alkalische Phosphatase charakteristisch exprimierte Proteine (Alvarez *et al.*, 2000). Außerdem spielen hier Matrixmetalloproteinasen eine bedeutende Rolle und sind für den Matrixumbau verantwortlich.

1.6.4 Invasionszone

In der Invasionszone wird die mineralisierte Matrix vaskularisiert. Durch den Matrixumbau wird das Einwandern der Blutgefäße ermöglicht. Osteoblasten wandern entlang dieser Blutgefäße in die hypertrophe Zone, produzieren auf den kalzifizierten longitudinalen Septen die Knochenmatrix und bilden damit den trabekulären

Knochen. Die restliche Matrix wird von einwandernden Chondroklasten/Osteoklasten degradiert (Lewinson und Silbermann, 1992; Vu *et al.*, 1998).

1.7 Embryonales Hühnersternum

Ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Chondrozytendifferenzierung ist das embryonale Hühnersternum. Chondrozyten des Hühnersternums sind den Chondrozyten der unterschiedlichen Zonen einer Wachstumsfuge vergleichbar. Allerdings sind aus dem Sternum die einzelnen Zellpopulationen gleichen Differenzierungsgrades leichter zu isolieren. Zudem sind die Chondrozyten metabolisch aktiver als Gelenkchondrozyten von adulten Tieren, was den Nachweis von Proteinen vereinfacht.

Am 15.-16. Tag *in ovo* ist das Hühnersternum noch homogen aus hyalinem Knorpel aufgebaut. Die Chondrozyten liegen dicht beieinander und sind von einer amorphen ECM umgeben. Ab dem 17. Tag findet man im kranialen Bereich des Sternums rechts und links von der Mittelachse hypertrophe Chondrozyten. Im peripheren Bereich verbleiben die Chondrozyten proliferierend (D'Angelo und Pacifici, 1997). Die hypertrophen Chondrozyten beginnen mit der Kollagen X-Synthese. Ab dem 18. Tag beginnt die vaskuläre Invasion, die an Tag 19 weiter zunimmt. Zugleich erfolgen die Kalzifizierung der ECM sowie der Beginn der perichondralen Knochenbildung. An Tag 20 ist die Knorpelmatrix von Blutgefäßen durchdrungen und durch Knochen ersetzt (Gibson und Flint, 1985; Reginato *et al.*, 1986). Im kaudalen Bereich des Hühnersternums hingegen verbleiben die Chondrozyten im Reserve- oder proliferativen Stadium, so dass hier die Kollagene II, IX und XI exprimiert werden. Bis zu zwei Monate nach dem Schlüpfen des Huhns verbleiben die kaudalen Zellen im knorpeligen Zustand (Iwamoto *et al.*, 1993).

1.8 Chondrozytendifferenzierung

Die Chondrozyten durchlaufen in der enchondralen Ossifikation eine Reihe von Differenzierungsstadien. Charakteristisch für die einzelnen Differenzierungsstadien sind Veränderungen in der Zellmorphologie und in der Expression spezifischer Proteine. Aus diesem Grund wurde eine Einteilung in unterschiedliche Stadien vorgenommen (Cancedda *et al.*, 1995). Das Stadium I wird durch die proliferativen Chondrozyten repräsentiert, die Kollagen II, IX, XI, Aggrekan und Link-Protein

exprimieren. Dieses Stadium unterteilt sich weiter in die Phasen der früh-proliferativen (Ia) und der spät-proliferativen Chondrozyten (Ib). Die Phase Ia ist gekennzeichnet durch die Expression von Kollagen VI (Quarto *et al.*, 1993; Szüts *et al.*, 1998) und die Phase Ib durch die Aktivierung des Matrilin 1-Gens (Muratoglu *et al.*, 1995). Die Expression des *Indian Hedgehog* (Ihh) im prähypertrophen Chondrozyt reguliert den Übergang zum hypertrophen Chondrozyt (Vortkamp *et al.*, 1996; Szüts *et al.*, 1998). Dem Stadium II werden die hypertrophen Chondrozyten zugeordnet, die die charakteristischen Proteine Kollagen X und Alkalische Phosphatase synthetisieren. Im Anschluss an das Stadium II sterben die Chondrozyten durch Apoptose (Hatori *et al.*, 1995; Silvestrini *et al.*, 2000; Cheung *et al.*, 2003).

Eine Chondrozytenspätdifferenzierung findet sowohl beim Knochenwachstum in der Wachstumsfuge als auch bei der Heilung von Knochenfrakturen statt. Das Erreichen von Stadium II wird im permanenten Knorpel durch negative Regulation mittels spezifischer Faktoren inhibiert.

1.8.1 Einfluss der ECM

Die Induktion und Ausprägung der Hypertrophie hängt sehr stark von der ECM ab. Moleküle der ECM können einen Einfluss auf die Differenzierung der Chondrozyten haben. So produzieren sternale Chondrozyten in serumhaltigen Kollagen I-Gelkulturen mehr Kollagen X als im Monolayer. Enthalten die Gele Kollagen II, wird die Kollagen X-Synthese stimuliert (Gibson *et al.*, 1982; Bates *et al.*, 1987). Kultiviert man hingegen embryonale Chondrozyten in serumfreien Kollagen I-Gelkulturen, so verlieren sie ihren Phänotyp, sie dedifferenzieren (Farjanel *et al.*, 2001).

Unter anderem ist eine Kommunikation durch Integrine zwischen ECM und den Zellen gewährleistet. Integrine sind Transmembranrezeptoren mit einer α - und einer β -Untereinheit. Die Kombination der Untereinheiten bestimmt die Ligandenspezifität. Die extrazelluläre Domäne bindet ECM-Moleküle sowie Zellrezeptoren, wodurch die Assemblierung von Proteinen der ECM, die Adhäsion und Differenzierung der Chondrozyten reguliert wird (Bouvard *et al.*, 2001; Brakebusch *et al.*, 2002). Die zytoplasmatische Domäne innerhalb der Zelle interagiert mit dem Zytoskelett- und Signalproteinen (Hynes, 1992). Antikörper gegen Integrin-Untereinheiten sind in der Lage, sowohl das Wachstum als auch die Kollagen X-Synthese in serumfreien

Organkulturen embryonaler Hühnersterna zu hemmen (Hirsch *et al.*, 1997).

Bei der Chondrozytendifferenzierung und der Aktivierung der Angiogenese spielen Matrixmetalloproteinasen eine wichtige Rolle (Werb, 1997; Ortega *et al.*, 2003). Durch diese Proteolyse der ECM wird erst die Zellmigration sowie die Freisetzung von gespeicherten Wachstumsfaktoren ermöglicht.

Eine weitere Gruppe von Metalloproteinasen, die ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*), regulieren die Chondrozytendifferenzierung durch Kollagen-Prozessierung sowie die Hemmung der Angiogenese und Spaltung von Aggrekan, Versikan und Brevikan (Porter *et al.*, 2005).

1.8.2 Einfluss parakriner Faktoren

Viele Hormone und Wachstumsfaktoren haben einen Einfluss auf die Differenzierung der Chondrozyten. Bei dem parakrinen Weg handelt es sich um Faktoren, die von umliegenden Zellen sekretiert werden. Bei einem autokrinen Weg werden die Faktoren von der Zelle selbst exprimiert.

So zeigen die kaudalen Chondrozyten im embryonalen Hühnersternum eine inhibierende Wirkung auf ihre eigene wie auch auf die Hypertrophie kranialer Chondrozyten (Böhme *et al.*, 1995). Auch artikuläre Chondrozyten zeigen in Kokultur mit Chondrozyten der Wachstumsfuge oder des kranialen Hühnersternums eine inhibierende Wirkung auf das Stadium der Hypertrophie (D'Angelo und Pacifici, 1997; Jikko *et al.*, 1999). Epiphysäre Chondrozyten sind auch in der Lage, die Differenzierung von Chondrozyten aus der Wachstumsfuge zu hemmen (Haaijman *et al.*, 1999; Pateder *et al.*, 2000).

1.8.3 Einfluss löslicher Faktoren

1.8.3.1 Insulin und *Insulin-like Growth Factor*, IGF

Das Hormon Insulin steuert hauptsächlich den Glukosemetabolismus. IGF-Proteine sind Wachstumsfaktoren, die über den parakrinen/autokrinen Weg das Knorpelwachstum und die Differenzierung der Chondrozyten regulieren. Der Name IGF ist durch die strukturelle Ähnlichkeit zum Insulin und die analoge Wirkung begründet. IGF-1-mRNA konnte in proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten

nachgewiesen werden (Reinecke *et al.*, 2000; Smink *et al.*, 2002). Deletion des IGF-1-Gens führt bei Mäusen und Menschen zu Zwergwuchs (Liu *et al.*, 1993b; Woods *et al.*, 1996). Bei der IGF-1-defizienten Maus sind in der Wachstumsfuge die Chondrozyten kleiner, so dass trotz gleicher Zellzahl die hypertrophe Zone schmaler ausfällt (Wang *et al.*, 1999). In serumfreien Agarosekulturen stimulieren sowohl Insulin als auch IGF-1 Chondrozyten des Hühnersternums zur Proliferation, das Stadium der Hypertrophie wird dabei nicht erreicht (Böhme *et al.*, 1992). Es kommt allerdings zu einer Kollagen X- und Alkalischen Phosphatase-Synthese, wenn kraniale Chondrozyten hierzu verwendet werden (Böhme *et al.*, 1995; Szüts *et al.*, 1998). In serumfreien Pelletkulturen von Reservechondrozyten der Ratte konnte weder durch IGF-1 noch durch geringe Insulinkonzentration die Hypertrophie initiiert werden. Dies gelang erst durch Zugabe von hohen Insulinkonzentrationen, so dass Kollagen X und Alkalische Phosphatase nachgewiesen werden konnten (Ballock und Reddi, 1994).

1.8.3.2 Thyroidhormone

Diese Hormone spielen eine Rolle in der Skelettentwicklung, da sie wichtige Regulatoren des Knochen- und Mineralhaushaltes darstellen (Allain und McGregor, 1993; Compston, 1993). Die wichtigsten Vertreter sind Trijodthyronin (T3) und Thyroxin (T4), die in der Schilddrüse produziert und in die Blutbahn abgegeben werden. Die Signalvermittlung wird durch nukleäre Thyroidhormonrezeptoren erreicht. Diese Rezeptoren sind Liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren, die durch direkte Interaktion die Expression von Zielgenen erreichen. Diese Rezeptoren werden in Reserve- und proliferativen Chondrozyten exprimiert, aber nicht in hypertrophen Chondrozyten.

Es wird ein direkter Einfluss der Thyroidhormone auf die Chondrozyten beobachtet. So führt T4 bei Chondrozyten des 17 Tage alten Hühnersternums in Agarosekultur zur Kollagen X- und Alkalische Phosphatase-Synthese, wobei die Proliferation der Chondrozyten ausbleibt (Böhme *et al.*, 1992). Dieser Effekt wurde auch bei embryonalen Chondrozyten der Ratte, des Huhns und des Schweins bestätigt (Burch und Lebovitz, 1982; Ballock und Reddi, 1994; Rosenthal und Henry, 1999). T4 ist zudem in der Lage, die Expression des Sox9-Transkriptionsfaktors, der den Übergang der Chondrozyten vom proliferativen zum hypertrophen Stadium inhibiert, zu verringern (Okubo und Reddi, 2003). Auch T3 stimuliert *in vitro* sowohl humane

fötale epiphysäre Chondrozyten als auch epiphysäre Rattenchondrozyten zur Alkalischen Phosphatase-Synthese, wobei hier auch eine verminderte Zellproliferation bei den Rattenchondrozyten beobachtet wurde (Carrascosa *et al.*, 1992; Ohlsson *et al.*, 1992).

1.8.3.3 *Indian Hedgehog, Ihh*

Die Familie der Hedgehog-Proteine ist in der embryonalen Musterbildung und Gliedknospenentwicklung involviert (Hammerschmidt *et al.*, 1997). Durch die Bindung der Ihh an Ptc- (patched) Rezeptoren wird das Membranprotein Smo (smoothened) freigesetzt. Durch Konformationsänderung des Smo wird das Signal durch Aktivierung von Zielgenen weitergegeben.

Ihh wurde sowohl in den prähypertrophen als auch in hypertrophen Hühnerchondrozyten sowie in Rattenröhrenknochen gefunden (Bitgood und McMahon, 1995; Vortkamp *et al.*, 1996; van der Eerden *et al.*, 2000), insbesondere in der prähypertrophen Zone (Kronenberg, 2003). In Ihh-defizienten Mäusen bewirkt das Fehlen des Proteins eine reduzierte Chondrozytenproliferation, eine verstärkte Hypertrophie und eine fehlende Osteoblastenentwicklung (St-Jacques *et al.*, 1999). Eine erhöhte Ihh-Synthese hingegen bewirkt eine verzögerte Hypertrophie der Chondrozyten (Lanske *et al.*, 1996; Vortkamp *et al.*, 1996). Somit hat Ihh auf die Hypertrophie eine negativ regulierende Wirkung und eine stimulierende auf die Proliferation. Dabei ist die negativ regulierende Wirkung des Ihh auf die Hypertrophie von PTHrP abhängig, die Proliferation hingegen nicht (Karp *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2002).

1.8.3.4 *Bone morphogenetic proteins, BMP*

Bone morphogenetic proteins gehören, mit Ausnahme des BMP-1, zur TGF- β -Familie. Sie spielen eine Rolle bei der Chondrogenese und Osteogenese (Reddi, 1992; Wozney, 1992). BMP-2, -4 und -7 wurden während der Entwicklung der Knorpel-elemente im Perichondrium nachgewiesen. BMP-6 wurde ausschließlich in prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten, sowie BMP-7 in prähypertrophen Chondrozyten des Hühnersternums und in proliferativen Chondrozyten der Wachstumsfuge der Maus lokalisiert (Lyons *et al.*, 1990; Macias *et al.*, 1997; Grimsrud *et al.*, 1999; Haaijman *et al.*, 1999; Brochhausen *et al.*, 2009). Die BMP-

Signalübertragung erfolgt durch Zellrezeptoren, die Serin/Threonin-Kinase-Aktivität besitzen. Durch die Aktivierung der Rezeptoren werden über Smad-Transkriptionsfaktoren die Signale von der Membran zum Zellkern weitergeleitet. Durch Stimulation mit BMPs wird sowohl die Chondrogenese als auch die Chondrozytendifferenzierung stimuliert, dies wird durch Sox-Transkriptionsfaktoren vermittelt (Chimal-Monroy *et al.*, 2003). *In vitro* stimulieren BMP-3 und -4 die Knorpelbildung der Gliedmaßenknospen des Huhns (Carrington *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1991). BMPs beeinflussen die Proliferation der Chondrozyten positiv und die terminale Differenzierung negativ (Minina *et al.*, 2001; Minina *et al.*, 2002). BMP-5-Defizienz führt bei der sogenannten *short ear*-Maus zu fehlenden Knorpelkondensationen und zur Verkürzung der Skelettstrukturen (Kingsley *et al.*, 1992).

1.8.3.5 Parathyroid hormone-related peptide, PTHrP

Parathormon (PTH) wird in der Nebenschilddrüse produziert und spielt eine wichtige Rolle bei der Kalziumhomöostase. Das PTHrP hingegen wird in unterschiedlichen Geweben synthetisiert und besitzt parakrine Funktionen. In der Rezeptor-bindenden, N-terminalen Aminosäuresequenz des PTH und PTHrP sind 13 Aminosäuren fast identisch, was eine ähnliche Wirkung der beiden Proteine erklärt.

Die Regulation der Chondrozytendifferenzierung erfolgt gemeinsam durch Ihh und PTHrP in Form einer negativen Rückkopplung. Eine zunehmende Ihh-Synthese in prähypertrophen Chondrozyten induziert die Proliferation dieser Zellen und die PTHrP-Expression im periartikulären Perichondrium. Durch die Bindung des PTHrP an den PTH-Rezeptor kommt es zu einer Hemmung der Hypertrophie (Lanske *et al.*, 1996; Vortkamp *et al.*, 1996; Wallis, 1996; Chung *et al.*, 1998). In PTHrP-defizienten Mäusen wurde eine frühzeitige Chondrozytendifferenzierung identifiziert, was zu einer exzessiven Knochenbildung führt (Amizuka *et al.*, 1994; Lanske *et al.*, 1996). Bei Überexpressionen des PTHrPs konnte in Chondrozyten eine Verzögerung in der Differenzierung und eine fehlende Knochenbildung nachgewiesen werden, so dass das Skelett der Mäuse bei der Geburt noch vollständig knorpelig ist (Weir *et al.*, 1996). Es wird neuerdings angenommen, dass die Hypertrophie infolge eines vom PTHrP induzierten Abbaus des Runx2 und 3 in einer Cyclin D1-abhängigen Weise gehemmt wird (Zhang *et al.*, 2009).

1.8.3.6 Vitamin D-Metabolite

Vitamin D gehört zur Gruppe von Steroiden, die an der Regulation der extrazellulären Kalziumkonzentration beteiligt sind. Die Metabolite des Vitamin D₃ spielen bei der Chondrozytenspätendifferenzierung eine große Rolle. Sie entstehen durch UV-Bestrahlung aus dem in der Haut gelagerten Provitamin D₃. Ein Mangel an Vitamin D führt zu Rachitis. Im Tiermodell und bei genetisch bedingter Rachitis konnten starke Störungen der Knochenbildung und eine Vergrößerung der hypertrophen Zone in der Wachstumsfuge beobachtet werden (Norman und Hurwitz, 1993; Yagishita *et al.*, 2001). Vitamin D ist *in vitro* in der Lage, die Thyroid-induzierte Hypertrophie der Chondrozyten in der Wachstumsfuge zu hemmen (Ballock *et al.*, 2001). In der Wachstumsfuge wirkt das 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf die proliferierenden Chondrozyten und das 24,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf die Reservechondrozyten (Ballock *et al.*, 2001). Die Regulation des Vitamin D erfolgt über die nukleären Vitamin D-Rezeptoren (Boyan *et al.*, 2003). Hierbei wird nach Ligandenbindung von den Rezeptoren die Expression von Zielgenen durch Interaktionen mit deren Promotoren induziert. Vitamin D₃ hat zudem einen Einfluss auf die Membranfluidität, zur Veränderung des Kalziumflusses sowie auf die Aktivierung membrangebundener Enzyme, wie der Proteinkinase C (Sylvia *et al.*, 1996).

1.8.3.7 Transforming growth factor β , TGF β

Die TGF β -Familie umfaßt eine Reihe von Zytokinen, die auf unterschiedlichste Weise wirken. Sie werden als großes Promolekül synthetisiert, anschließend im Golgi-Apparat prozessiert, von der Zelle sekretiert und in der ECM gespeichert. Die Typ I und II Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren werden für die TGF β -Signalweiterleitung benötigt. Bei der Bindung des TGF β wird die Typ I- von der Typ II-Rezeptorkinase phosphoryliert und somit aktiviert. Dies führt weiterhin zur Phosphorylierung intrazellulärer Proteine, den Smads. Die Smads initiieren dann im Zellkern die Transkription der Zielgene. Die Isoformen TGF β 1-3 wurden in der Wachstumsfuge lokalisiert. Es konnte bei transgenen Mäusen mit einem zytoplasmatisch verkürzten TGF β -Typ II-Rezeptor ein unorganisierter Aufbau der Wachstumsfuge sowie eine Verbreiterung der hypertrophen Zone beobachtet werden. Bei diesen Mäusen zeigte sich auch im Gelenkknorpel eine frühe Form einer Osteoarthritis (Serra *et al.*, 1997). Die TGF β -Familie stimuliert, wenn auch die

einzelnen Isoformen unterschiedlich stark, die Differenzierung der mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten (Kulyk *et al.*, 1989; Chimal-Monroy *et al.*, 1996). Die Spätdifferenzierung der Chondrozyten wird durch sie hingegen inhibiert (Tschan *et al.*, 1993). Dabei unterdrückt TGF β 1 die Proliferation und die Hypertrophie der Chondrozyten sowie die Mineralisierung der Knochenanlagen (Serra *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2001). TGF β induziert die Genexpression des PTHrPs, welches ebenfalls ein negativ regulierender Faktor der Chondrozytendifferenzierung darstellt (Pateder *et al.*, 2000). TGF β war hingegen in Knochenexplantaten der PTHrP-defizienten Maus nicht in der Lage, die Hypertrophie zu hemmen, wohl aber die Zellproliferation und Matrixmineralisation, was auf einen zusätzlichen PTHrP-unabhängigen Wirkungsmechanismus des TGF β hindeutet (Serra *et al.*, 1999).

1.9 Regulation der Chondrozytendifferenzierung durch Transkriptionsfaktoren

1.9.1 Runx/Cbfa

Die Runx-Familie (*runx-related*) besteht aus drei Mitgliedern, dem Runx1/Cbfa2 (*core binding factor 2*), dem Runx2/Cbfa1 und dem Runx3/Cbfa3. Runx2 bindet an den Osteocalcin-Promotor und spielt bei der Knochenentwicklung eine wichtige Rolle (Merriman *et al.*, 1995; Ducy *et al.*, 1997). Runx2-defiziente Mäuse sterben direkt nach der Geburt aufgrund fehlender Osteoblasten- und Chondrozytendifferenzierung. Diese Mäuse besitzen weder intramembranöses noch enchondrales Knochengewebe (Komori *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 1997; Inada *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999). An Mäusen, die in der Isoform Runx2-II defizient sind, wurde herausgefunden, dass Runx2-I die intramembranöse und Runx2-II die enchondrale Ossifikation beeinflusst (Xiao *et al.*, 2004). Zudem wurde Runx2 in prähypertrophen sowie in hypertrophen Chondrozyten lokalisiert. Dort dient es als Kofaktor der BMP-aktivierten Smads 1 und 5 und stimuliert die Kollagen X-Synthese (Leboy *et al.*, 2001). Die Stimulierung der Kollagen X-Synthese durch das Runx2 erfolgt durch direkte Bindung am Kollagen X-Promotor, wodurch die Transkription induziert wird (Drissi *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2003). Bei einer Überexpression des Runx2 in Hühnerchondrozyten wird die Synthese der Alkalischen Phosphatase, des Kollagen X und des MMP-13 stimuliert (Inada *et al.*, 1999; Enomoto *et al.*, 2000; Enomoto-Iwamoto *et al.*, 2001). Runx2 bindet direkt an den Ihh-Promotor, stimuliert dessen Transkription und

beeinflusst somit die Differenzierung der Chondrozyten (Yoshida *et al.*, 2004). Runx3 spielt eine Rolle bei der Differenzierung von Epithelzellen bei Gastritis, ist in der neuronalen Entwicklung involviert und wird ebenfalls im Knorpel exprimiert (Levanon *et al.*, 2001; Inoue *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002; Stricker *et al.*, 2002). In Runx3-defizienten Mäusen konnte eine beeinträchtigte Chondrozytenspätdifferenzierung beobachtet werden. Allerdings ist die Regulation der Chondrozytendifferenzierung vom Verhältnis der Runx2 und 3 Transkriptionsfaktoren abhängig (Yoshida *et al.*, 2004).

1.9.2 Sox

Sox-Proteine besitzen mannigfaltige Aufgaben während der Entwicklung, wozu auch die Skelettbildung gehört (Pevny und Lovell-Badge, 1997). Sie gehören zur Superfamilie der HMG-box-Proteine (*Sry-type high mobility group*). Davon spielen Sox9, 8, 6 und L-Sox5 eine Rolle bei der Chondrogenese und bei der enchondralen Ossifikation (Wright *et al.*, 1995; Bell *et al.*, 2000; Schepers *et al.*, 2000; Sock *et al.*, 2001). Sox9 reguliert die prächondrogene Zellkondensation, die Chondrozytendifferenzierung, Knorpelmatrixproteine und die Aktivierung von Sox5 und 6. Sox9 ist notwendig, um den Übergang des proliferativen zum hypertrophen Stadium der Chondrozyten zu unterdrücken (Akiyama *et al.*, 2002). Haploinsuffizienz des Sox9-Gens führt zur Campomelischen Dysplasie, welche sich durch Abnormalitäten des Skeletts verdeutlicht (Wagner *et al.*, 1994; Schafer *et al.*, 1996; Bi *et al.*, 2001). L-Sox5- und Sox6-defiziente Mäuse zeigen verschieden Formen der Chondrodysplasien (Smits *et al.*, 2001). Gemeinsam sind Sox9, L-Sox5 und Sox6 an der Regulation der Expression des Kollagen II und Aggrecans beteiligt (Ng *et al.*, 1997; Lefebvre *et al.*, 1998; de Crombrughe *et al.*, 2000; Sekiya *et al.*, 2000). Sox8-defiziente Mäuse zeigen eine Reduktion der Skelettgröße (Sock *et al.*, 2001). Sox8, 9 und 10 vermitteln durch BMPs die Chondrogenese und sind gemeinsam für die Determination der Chondrozytendifferenzierung notwendig, wie in Knorpelanlagen des Huhns beobachtet wurde (Chimal-Monroy *et al.*, 2003).

1.10 Nuclear Factor I (NFI)

Die Transkriptionsfaktoren der Familie NFI wurden bei der Replikation von Adenoviren in HeLa-Zellen entdeckt (Nagata *et al.*, 1982; Nagata *et al.*, 1983). Später konnte der NFI-Familie eine weitere Funktion zugeordnet werden, die der

Regulation von Genexpressionen (Jones *et al.*, 1987). Von der Arbeitsgruppe Sippel wurden im Huhn vier verschiedene NFI-Gene (NFIA, B, C und X) identifiziert (Rupp *et al.*, 1990; Kruse *et al.*, 1991). Zudem wurden von den vier NFI-Genen verschiedene Isoformen identifiziert, die durch alternatives Spleißen entstehen (Santoro *et al.*, 1988; Kruse und Sippel, 1994a; Osada *et al.*, 1997; Osada *et al.*, 1999). Jede dieser Isoformen zeichnet sich durch spezifische Gen-, Zell- und Promotor-Einflüsse bei der Regulation der Transkription aus (Apt *et al.*, 1994; Roulet *et al.*, 1995; Chaudhry *et al.*, 1998; Chaudhry *et al.*, 1999). Die NFI-Proteine binden als Homo- oder Heterodimere mit einer für sie spezifischen Konsensussequenz, TTGGC(N)₅GCCAA, an doppelsträngige Ziel-DNA (Gronostajski *et al.*, 1985; Hennighausen *et al.*, 1985; Leegwater *et al.*, 1985; Nowock *et al.*, 1985). Allen NFI-Proteinen ist gemein, dass sie eine N-terminale DNA-Bindungs-/Dimerisierungs-Domäne besitzen, die auch für die Aktivierung der adenoviralen DNA-Replikation verantwortlich ist (Mermod *et al.*, 1989; Gounari *et al.*, 1990; Novak *et al.*, 1992; Dekker *et al.*, 1996). Deletionsanalysen zeigten, dass die N-terminale Domäne eine Länge von ~200 Aminosäuren besitzt und diese zu 90 % identisch ist bei Huhn, Maus und Mensch (Gronostajski, 2000). Innerhalb der N-terminalen Domäne befinden sich vier Cysteinreste, wobei drei der vier für die DNA-Bindungsaktivität notwendig sind (Bandyopadhyay und Gronostajski, 1994). Die C-terminale Domäne besitzt eine Transkriptions-Aktivierungs- und/oder Repressions-Regulationsfunktion. Durch alternatives Spleißen variiert die C-terminalen Domäne innerhalb der verschiedenen NFI-Isoformen (Gronostajski, 2000). Bei den Isoformen NFIB, C und X wurden in der C-terminalen Domäne Aktivierungs- und bei NFIA Repressionsbereiche lokalisiert (Mermod *et al.*, 1989; Osada *et al.*, 1997).

NFI-Proteine besitzen als ungewöhnliches Charakteristikum einen untranslatierten 5'- und/oder 3'-Bereich. Aus diesem Grund ergeben sich sehr lange Primärtranskripte (Länge der NFIA, B, C und X mRNAs: ~10.5, ~9.7, ~7.7 und 6 kb). Zudem finden sich in diesen Bereichen putative offene Leseraster (*open reading frames*, ORF), deren Funktion in der Regulation der Translation liegen könnte. Eine weitere mögliche Funktion der untranslatierten Regionen könnte in der Regulation der mRNA-Stabilität bestehen (Gronostajski, 2000). Bindungsstellen für NFI-Proteine wurden in fast jedem Organsystem und Gewebe identifiziert, beispielsweise im Gehirn (Elder *et al.*, 1992; Bedford *et al.*, 1998), Lunge (Bachurski *et al.*, 1997), Leber (Cereghini *et al.*, 1987; Gil *et al.*, 1988; Quinn *et al.*, 1988; Corthesy *et al.*,

1990; Jackson *et al.*, 1993; Cardinaux *et al.*, 1994), Niere (Leahy *et al.*, 1999), Muskel (Funk und Wright, 1992; Spitz *et al.*, 1997), Hypophyse (Courtois *et al.*, 1990) und Chondrozyten (Szabo *et al.*, 1995).

Aufgrund von nahe benachbarten Bindungsstellen wurde eine Konkurrenz zwischen NFI- und SP1-Proteinen beobachtet. Hierbei hemmt NFI die SP1-Aktivierung des $\alpha 1(I)$ Kollagenpromotors (Nehls *et al.*, 1991; Nehls *et al.*, 1992). NFI-Proteine haben auch einen Einfluss auf die Expression von Genen, die durch Faktoren von verschiedenen Signaltransduktionswegen reguliert werden. Dazu gehören die Faktoren Insulin (Cooke und Lane, 1999a), TGF- β (Rossi *et al.*, 1988; Riccio *et al.*, 1992; Alevizopoulos *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 1998), cAMP (Chu *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1992; Cooke und Lane, 1999b) und Vitamin D (Candelieri *et al.*, 1996). Weiterhin ist eine NFI-Bindungsstelle in der Silencerregion des Matrilin 1-Gens lokalisiert worden, welches in der Reifungszone der Wachstumsfuge transkribiert wird (Szabo *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996). In Osteoblasten konnten in der Promotorregion des Runx2 Bindungsstellen für NFI und AP1 identifiziert werden. Beide Transkriptionsfaktoren stehen in einem konkurrierenden Verhältnis, wobei NFI als Repressor und AP1 als Induktor fungiert (Zambotti *et al.*, 2002).

In NFIA-defizienten Mäusen wurden schwere Entwicklungsdefekte beobachtet (das Neves *et al.*, 1999). Dies wirkt sich bei 95 % der homozygoten, NFIA-defizienten Mäuse durch eine hohe Mortalität innerhalb der ersten zwei Wochen nach der Geburt aus. Den NFIA-defizienten Mäusen fehlt das *Corpus Callosum*, und sie zeigen ventrikuläre Dilatationen (das Neves *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2007). Bei den wenigen überlebenden Mäusen wurde ein ausgeprägter Hydrozephalus, sowie ein axialer Tremor, welcher auf neurologische Defekte hinweist, beobachtet.

1.11 Zielsetzung der Arbeit

Die Chondrozytendifferenzierung ist ein hoch organisierter Prozess, der sowohl durch autokrine sowie parakrine Faktoren reguliert wird. Hierbei stellt das embryonale Hühnersternum ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Chondrozytendifferenzierung während der enchondralen Ossifikation dar. Bereits am 17. Tag *in ovo* unterscheiden sich kraniale von kaudalen Chondrozyten bezüglich ihrer Differenzierung. *In vitro* sind Chondrozyten des kranialen Bereiches nach Stimulation in der Lage zu hypertrophieren und für dieses Stadium spezifische

Markerproteine zu exprimieren. In Kokultorexperimenten konnte beobachtet werden, dass kaudale Chondrozyten sowohl ihre eigene Hypertrophie als auch die der kranialen Chondrozyten hemmen. Diese Blockierung der Hypertrophie kranialer Chondrozyten kann durch extrazelluläre Faktoren, deren Zelloberflächenrezeptoren und/oder intrazelluläre Signalfaktoren, beeinflusst werden. Dementsprechend müssten die Hypertrophie-hemmenden Faktoren in kaudalen Chondrozyten erhöht transkribiert vorliegen. Zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene in kaudalen Chondrozyten wurde in früheren Studien die Methode der suppressiven subtraktiven Hybridisierung angewandt (Auge, 2004). Dabei wurden 13 EST355d10-Klone in kaudalen Chondrozyten erhöht exprimiert.

Die Ziele der Arbeit können wie folgt zusammengefasst werden:

1. Nachweis der Zugehörigkeit der EST355d10 zur NFIA-1-Sequenz und der differentiellen Expression des NFIA-1 in kaudalen Chondrozyten.

Anhand von Northern Blots, semi-quantitativer PCR und Real-Time PCR wurde nach einer differentiellen Expression des NFIA-1 gesucht.

2. Überexpression und *Silencing* des NFIA-1 *in vitro* mit der Amaxa-Elektroporationsmethode.

Dies erfolgte durch Überexpression in kranialen und *Silencing* in kaudalen Chondrozyten und Untersuchung des jeweiligen Einflusses auf die Chondrozytendifferenzierung.

3. Überexpression des NFIA-1 *in vitro* und *in vivo* mit Hilfe des RCASBP(A)-Virus.

Es wurden *in vitro* Infektionen von Chondrozytenkulturen und Kokulturen durchgeführt sowie deren Auswirkung auf die Chondrozytendifferenzierung untersucht. Ferner erfolgte eine *in vivo* Infektion in Bein- und Flügelanlagen von Hühnerembryonen und deren Untersuchung auf morphologische Veränderungen.

4. Untersuchung eines NFIA-defizienten Mausmodells.

Morphologische Veränderungen von NFIA-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT Tieren wurden im Bereich des Knochen-Knorpels analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Materialien und Geräte

2.1.1.1 Allgemeine Reagenzien

Allgemein gebräuchliche Reagenzien und Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D), Merck (Darmstadt, D), Roche (Mannheim, D), Roth (Karlsruhe, D) und MP Biomedicals (Eschwege, D) bezogen.

2.1.1.2 Zellkultur-Reagenzien und Materialien

Assistent (Sondheim, D)	Neubauer improved 0,100 mm Zählkammer
Biochrom (Berlin, D)	Trypanblau
Biomol (Hamburg, D)	Hepes Ampicillin
Biozym (Oldendorf, D)	Seakam Agarose
Dako (Hamburg, D)	Ziegenserum
Difco (Sparks, USA)	Bacto Agar Bacto Hefe-Extrakt Bacto Trypton-Extrakt
FMC Bioproducts (Philadelphia, USA)	Agarose HT/NT
Gibco Invitrogen (Karlsruhe, D)	DMEM (4,5 mg/ml Glukose) FKS Glukose Penicillin/Streptomycin, 100x
Invitrogen (Karlsruhe, D)	Trizol Reagenz
Lonza (Köln, D)	Chondrozyten Nukleofektor Kit
Lumac LSC (Groningen, NL)	Lumasafe Plus
Merck (Darmstadt, D)	L (+) Ascorbinsäure
Molecular Bioproducts (San Diego,	RNase away

USA)

MP Biomedicals (Eschwege, D)	¹⁴ C Prolin ³² P-dCTP IPTG Tris
NEB (Frankfurt, D)	dNTPs
Nunc (Langenselbold, D)	Kryoröhrchen, 1 ml Zellkulturflaschen 25-175 cm ² 35 x 10 mm Zellkulturschalen
PAA Laboratories (Cölbe, D)	Trypsin/EDTA
Roche (Mannheim, D)	Dosper liposomales Transfektionsreagenz Fugene 6 Transfektionsreagenz Kollagenase B aus <i>Clostridium histolyticum</i>
Roth (Karlsruhe, D)	Acryl/Bisacrylamid Diethanolamin DMSO
Sarstedt (Nümbrecht, D)	35 x 10 mm Zellkulturschalen
Serva (Heidelberg, D)	BSA Chymotrypsin Coomassie Blue R-250 Pepsin Triton X-100
Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)	3-Aminopropionitril Fumarat Salz IGF-1 Insulin L-Cysteine Natriumpyruvat Tyroxin
SouthernBiotech (Birmingham, USA)	Fluoromount G

2.1.1.3 Verwendete Geräte

Beckman (Krefeld, D)	Festwinkelrotor JA 10, JA 17, JA 20.1 Flüssigkeitsszintillationszähler LS 6500 Hochgeschwindigkeitszentrifuge J2- HS Kühlzentrifuge GS-15R Schwingrotor JS-24 Tischzentrifuge GS-15 Ultrazentrifuge Avanti J-25 Ultrazentrifuge Optima LE -80K
Biometra (Göttingen, D)	Hybridisierungssofen PCR-Gradient-Cycler
Bio Rad (München, D)	Geltrockner 583
Calimatic Knick (Berlin, D)	pH Meter 766
Eppendorf (Hamburg, D)	Heizschüttler Thermomixer 5436 Kühl-/Heizblock Thermostat plus Photometer Bio Photometer Tischzentrifuge 5415D
Eurofins MWG-Biotech (Ebersberg, D)	Rollhybridisierungssofen Hybaid Mini Oven MKII
GE Healthcare (München, D)	Phosphorimager Storm 860
Gerhardt (Königswinter, D)	Inkubatorschüttler Thermoshake
Heidolph (Schwabach, D)	Heizrührer MR 2002 Taumelschüttler Polymax 1040
Integra Biosciences (Fernwald, D)	Brutschrank Biosafe eco
Mettler Toledo AB204 (Giessen, D)	Analysewaage
Microm (Walldorf, D)	Rotationsmikrotom HM355
MJ Research PTC-200 (Massachusetts, USA)	PCR-Cycler
Nikon (Düsseldorf, D)	Konfokales Laser-Scan Mikroskop Eclipse E600
Olympus (Hamburg, D)	Mikroskop BX 60

Satorius LA 4200 S (Göttingen, D)	Waage
Savant (Holbrook, USA)	Speed Vac Plus SC 110A
Schott KL 750 (Mainz, D)	Kaltlichtquelle
Stratagene (La Jolla, USA)	Mikrozentrifuge ProFuge 10K UV Stratalinker
Thermo Dux Precision Line (Wertheim, D)	Lupe
UVP (Upland, USA)	2UV Transilluminator LM20E
Zeiss (Jena, D)	Inverses Mikroskop Axiovert 100 Mikroskop Primo Star

2.1.2 Vektoren

Name	Typ	Firma
pCR II-TOPO 4,0 kb	Klonierungsvektor	Invitrogen, Groningen, NL
pmaxFP-Green-C	Expressionsvektor	Lonza, Köln, D
pBlueskript SK- 3.0 kb	Klonierungsvektor	Stratagene, La Jolla, USA
pCMV-Tag 4A 4.3 kb	Expressionsvektor	
RCASBP (A) 11.6 kb	Expressionsvektor	Prof. Vortkamp, Essen, D

2.1.3 Verwendete Bakterienstämme

Name	Genotyp	Firma
<i>E. coli</i> TOP10F'	F'(lacI ^q , Tn10 (Tet ^R)) <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr</i> - <i>hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, Groningen, NL
<i>E. coli</i> XL-10Gold	Tetr Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR</i> - <i>mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1</i> <i>gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB</i> <i>lacI</i> ^q ΔM15 Tn10 (Tetr ^R) Amy Cam ^R]	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> XL1-Blue	SupE44 <i>hsdR17 recA endA1 gyrA46</i> <i>thi relA1 lac</i> F'[<i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> Δm15 Tn10(tet ^I)]	

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Primäre Antikörper

Spezifität	Typ	Wirt/Isotype	Verdünnung	Firma
ADAMTS-4 (Disintegrin-like Domain)	polyklonal	Kaninchen	1:500 IHC	Acris, Herford, D
Collagen I	polyklonal	Kaninchen	1:250 IHC	
AMV-3C2	monoklonal	Maus	1:5 IHC	DSHB, Iowa, USA
Huhn Myeloblastosis virus			1:200 WB	
X-AC9	monoklonal	Maus	1:50 IHC	
Huhn Collagen X				
Collagen II	monoklonal	Maus	1 :100 IHC	Millipore, Schwalbach, D
hrCollX	monoklonal	Maus	1:50 IHC	Quartett, Berlin, D
NFI	polyklonal	Kaninchen	1:200 WB 1:50 IHC	Santa Cruz, Heidelberg, D
Anti-Flag	polyklonal	Kaninchen	1:200 WB 1:100 IHC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Matrilin 1	polyklonal	Kaninchen	1:500 IHC	R. Wagener, Köln, D

2.1.4.2 Sekundäre Antikörper für Western Blot, Immunfluoreszenz und Histochemie

Spezifität	Typ	Verdünnung	Firma
Alexa 488 Ziege α Maus IgG	Peroxidase- konjugiert	1:500 IHC	Invitrogen, Karlsruhe, D
Ziege α Maus IgG	Peroxidase- konjugiert	1:200 IHC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ziege α Kaninchen IgG	Peroxidase- konjugiert	1:200 IHC	

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellen elektrokompetenter Bakterien

Eine 3 ml Vorkultur mit *E. coli* Top 10F' wurde über Nacht bei 37 °C im Bakterienschüttler bei 200 rpm inkubiert. Mit 1 ml der Vorkultur wurde die 400 ml Hauptkultur in Schikanekolben angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,6 angezogen. Alle weiteren Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Das Medium wurde bei 4800 rpm 8 min lang zentrifugiert. Anschließend wurden die Bakterienpellets mit 50 ml eiskaltem Aqua dest. resuspendiert. Der Waschschrift wurde insgesamt fünfmal wiederholt. Die nun erhaltenen Bakterienpellets wurden in 2 ml 10 % Glycerol vereinigt und zu 50 µl aliquotiert. Die Bakterien-Aliquots wurden dann bei -80 °C aufbewahrt. Vor- und Hauptkultur wurden in LB-Medium angesetzt.

LB-Medium

Bacto-Trypton (BD Difco, Sparks, USA)	10 g/l
Bacto Hefe (BD Difco)	5 g/l
NaCl	10 g/l
pH 7,5	

Um die Kompetenz der Bakterien zu testen, wurde ein 50 µl Aliquot mit 10 pg pUC18-Testvektor elektroporiert. Die transformierten Bakterien wurden dann auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag sollten bei kompetenten Bakterien 100 Kolonien zu zählen sein.

LB-Agarplatten

LB-Medium	s. o.
Bacto Agar (BD Difco)	15 g/l

Alle LB-Medien und Agarplatten wurden nach dem Ansetzen autoklaviert.

2.2.1.2 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

2.2.1.2.1 Transformation elektrokompeter Bakterien

Bei der Elektroporation handelt es sich um eine physikalische Methode, um Plasmid-DNA in Bakterien einzubringen, d.h. die Bakterien zu transformieren (Calvin und Hanawalt, 1988; Dower *et al.*, 1988). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Generierung eines elektrischen Pulses, welcher die Porenbildung in der Bakterienmembran bewirkt. Durch die so entstandenen Poren kann dann die DNA passieren.

Hierzu wurden 10 ng DNA aus einer zuvor aufgereinigten und eluierten Ligation mit 50 µl elektrokompeteren *E. coli* in einer Elektroporationsküvette (0,2 cm Elektrodenabstand) auf Eis vermischt. Die Elektroporation wurde bei 200 Ohm, 25 µF und 1,5 kVolt durchgeführt. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen der transformierten Bakterien auf Agarplatten mit Antibiotikum ausgestrichen. Die Platten wurden 16 h bei 37 °C inkubiert bis einzelne Kolonien sichtbar wurden.

SOC-Medium

Bacto Trypton	2 % (w/v)
Bacto Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM

Nach dem Autoklavieren der LB-Agarlösung wurden vor dem Gießen entsprechende Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugeführt: Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 25 µg/ml

2.2.1.2.2 Transformation Hitzeschock-kompeter Bakterien

Bei dieser Art der Transformation wird durch einen kurzen Hitzeschock die Bakterienmembran permeabilisiert, durch die dann die Plasmid-DNA eindringen kann.

50 µl Hitzeschock-kompetenter Bakterien wird mit 10 ng Plasmid-DNA vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend setzt man die Bakterien für 30 s einem Hitzeschock von 42 °C aus. Nach weiteren 5 min auf Eis werden 250 µl SOC Medium zugegeben. Zur Selektion wurden unterschiedliche Konzentrationen von Bakterien auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden auch hier 16 h bei 37 °C inkubiert bis einzelne Kolonien sichtbar wurden.

2.2.1.3 Blau-Weiß-Screening

Ein Blau-Weiß-Screening ist möglich, wenn das transformierte Bakterienplasmid ein lacZ-Gen trägt. Eingesetzte Bakterien produzieren eine inaktive β-Galactosidase, die durch α-Komplementation aktiviert wird. Das für die Komplementation notwendige Protein wird vom lacZ-Gen codiert. War die Ligation erfolgreich und es kam zu einer Insertion von DNA in die *multiple cloning site*, so wird die Sequenz des lacZ-Gens unterbrochen und das Protein wird nicht gebildet. Somit wird keine β-Galactosidase in den Bakterien synthetisiert. Gibt man den Agaroseplatten nun X-Gal hinzu, was ein Substrat für die β-Galactosidase ist, so zeigen weiße Kolonien ein Plasmid mit Insert an. Bei replegiertem Plasmid allerdings kann die β-Galactosidase synthetisiert werden und das Substrat abbauen, was wiederum zu blaugefärbten Kolonien führt.

Zur Induktion der Expression durch den lac-Promotor wurde den Agaroseplatten noch IPTG zugeführt. Ferner erfolgte die Zugabe von X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid) 0,4 % (w/v) und IPTG (Isopropyl-1-thio-β-D-galaktosid) 160 µM pro Agaroseplatte.

2.2.1.4 Bakterienkultivierung und Stammhaltung

Die Bakterien wurden in flüssigem LB-Medium mit einem Antibiotikum als Selektionsmarker kultiviert (Sambrook, 1989). Auf einem Schüttelinkubator wurden die Bakterien für 8 h bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 kultiviert.

Zur Kultivierung von positiv gescreenten Klonen wurden 3 - 5 ml Mini- oder 100 - 250 ml Midiansätze mit einer Kolonie inokuliert. Die Miniansätze wurden für 6 h und die Midiansätze für 16 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt (s. 2.2.1.5).

Zur längerfristigen Aufbewahrung der Bakterienstämme wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde 828 µl einer exponentiell wachsenden Hauptkultur mit 172 µl

87 % (v/v) Glycerollösung vermischt und in einem Kryoröhrchen (Cryo-Tube, Nunc, Wiesbaden) bei -80 °C gelagert.

Für eine kurzzeitige Aufbewahrung von 2 - 4 Wochen wurden die Bakterien auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen und nach ausreichendem Wachstum bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA

2.2.1.5.1 Qiaprep Spin Miniprep

Zur weiteren Charakterisierung der zuvor positiv gescreenten Klone wurde eine Plasmid-Minipräparation durchgeführt. Hierbei wird die Plasmid-DNA durch alkalische Lyse isoliert. Danach erfolgt eine Bindung der Plasmid-DNA unter geringer Salzkonzentration an eine Anionen-Austauscher Säule. Anschließend wird durch einen Puffer mit hoher Salzkonzentration eluiert.

Die weiteren Schritte wurden mit Hilfe des „Qiagen Plasmid Purification“ Kit (Qiagen, Hilden, D) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl sterilem dH₂O eluiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.1.5.2 HiSpeed Plasmid Midiprep

Um größere Mengen DNA von 200 µg/µl mit höherer Reinheit für Sequenzierungen zu erhalten, wurde eine Plasmid-Midi-Präparation mit Hilfe des „Qiagen HiSpeed Plasmid Midi“ Kit (Qiagen, Hilden, D) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

Bei High Copy-Plasmiden wurde ein Kulturvolumen von 50 ml und bei Low Copy-Plasmiden von 150 ml mit entsprechendem Antibiotikum eingesetzt. Alle weiteren Schritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde in 500 µl sterilem dH₂O eluiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.1.6 Restriktion von DNA

Zur Vorbereitung der DNA für die Ligation wurde diese durch Restriktionsendonukleasen des Typs II sequenzspezifisch gespalten. Diese Enzyme spalten die DNA an spezifischen palindromen Sequenzen. Die hierfür verwendeten Enzyme wurden käuflich erworben (NEB, Schwalbach, D). Die Restriktion fand in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer für 1 h bei Raumtemperatur oder bei 37 °C

statt. Das Reaktionsvolumen wurde so gewählt, dass eine Glycerinendkonzentration von 10 % nicht überschritten wurde. 1 - 5 µg DNA wurden mit 1 - 2 U Enzym in einem Reaktionsvolumen von 10 µl eingesetzt.

2.2.1.7 Gelelektrophoretische Auftrennung und Gelextraktion von DNA

Durch eine horizontale Agarosegelelektrophorese wurde die DNA, aus Plasmidpräparationen, PCR-Produkten oder Restriktion stammend, nach ihrer Größe aufgetrennt. Um die jeweiligen Größen der DNA gut voneinander trennen zu können, wurden 1 - 2 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80 - 120 V für 30 - 60 min durchgeführt. Für Fragmentlängenbestimmungen oder zur Konzentrationsabschätzungen wurde ein DNA-Größenstandard bekannter Konzentration (GeneRuler 100 bp oder GeneRuler 1 kb, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D) mit aufgetragen. Durch Zugabe von Ethidiumbromid (1 µg/ml) konnten die DNA-Banden unter UV-Licht durch ein UV-Transilluminator-System 2UV (Eurofins MWG, Ebersberg, D) bei einer Wellenlänge von 302 nm visualisiert werden. Anschließend wurde die aus dem Gel geschnittene DNA mittels „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden, D) aufgereinigt.

6 x Ladepuffer

Tris HCl	10 mM (pH 7,6)
Bromphenolblau	0,03 %
Xylencyanolblau	0,03 %
Glycerol	60 %
EDTA	60 mM

50 x TAE Puffer

Tris Acetat	2 M
EDTA	50 mM
pH 8,5	

Agarosegel in 1-fach TAE Puffer

Seakem Agarose	1 - 2 % (w/v)
Ethidiumbromid	1 µg/ml

2.2.1.8 Isolierung genomischer DNA

2.2.1.8.1 Isolierung genomischer DNA aus Mäuseschwänzen

Um für nachfolgende Versuche NFIA-KO Mäuse zu erhalten, mussten zuvor heterozygote Brutpaare identifiziert werden. Zur Identifikation wurden den Mäusen die Schwanzspitzen gekappt und in einer nachfolgenden Genotypisierung eingesetzt. Hierfür wurden die Schwanzspitzen in 300 µl PBNP Puffer für 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln gewaschen. Um die DNA aus den Mäuseschwänzen zu isolieren, wurde nun 8 µl Proteinase K (Stock: 10 mg/ml in H₂O; Roche, Mannheim, D) zugegeben. Die Mäuseschwänze wurden über Nacht bei 56 °C unter Schütteln inkubiert.

Gewebereste wurden dann 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Nun wurde 0,5 µl unverdünnte DNA in einer PCR zur Genotypisierung eingesetzt (s. 2.2.1.26).

PBNP Puffer

Kaliumchlorid	50 mM
Tris HCl pH 8,3	10 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2,5 mM
Gelatine	0,1 mg/ml
Nonidet P40	0,45 %
Tween 20	0,45 %

2.2.1.8.2 Isolierung genomischer DNA aus Chondrozyten

Um genomische DNA aus Chondrozyten zu isolieren, wurde das *High Pure PCR Template Preparation Kit* von Roche verwendet. Hier wurde nach Angaben des Herstellers verfahren, indem das Protokoll für die Isolierung aus kultivierten Zellen angewandt wurde. Die genomische DNA wurde für den Nachweis, ob der EST355d10 in unmittelbarer Nähe zur NFIA-1-Sequenz (s. 3.2.1) liegt, und in einer entsprechenden PCR mit den spezifischen Primern (s. 2.2.1.24) eingesetzt.

2.2.1.9 Konzentrierung von DNA und RNA

Um eine Lösung mit DNA oder RNA zu konzentrieren, wurde diese mit 0,1

Volumenanteil (VT) 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 VT Ethanol bei -20 °C für 16 h gefällt. Die DNA/RNA wurde zentrifugiert (14.000 rpm, 20 min, 4 °C) und das erhaltene Pellet mit 70 %igem (v/v), kaltem Ethanol gewaschen. Erneut wurde die DNA/RNA zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet getrocknet. Nun wurde das Pellet in einem gewünschten Volumen mit einem geeigneten Puffer aufgelöst.

2.2.1.10 Photometrische Quantifizierung von DNA und RNA

Zur Photometrischen Quantifizierung und Qualitätsmessung von DNA bzw. RNA wurde diese jeweils in H₂O bzw. DEPC-H₂O 1 : 30 verdünnt. Die Proben wurden nun in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gegen die Verdünnungslösung gemessen.

Hierbei entspricht eine OD₂₆₀ von 1 einem Wert von 40 µg/ml RNA bzw. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Bei reinen RNA bzw. DNA Lösungen liegt das OD_{260/280} Verhältnis bei 2 bzw. 1,8 (Sambrook, 1989).

2.2.1.11 Dephosphorylierung und anschließende Ligation von DNA-Fragmenten

Um die Religation des zuvor geschnittenen Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatenden mit einer alkalischen Phosphatase (NEB) dephosphoryliert. Somit stehen die 5'-Phosphate nicht mehr der Ligase als Substrat zur Verfügung. Dazu wurde 25 - 50 ng des linearisierten Vektors für 30 min bei 37 °C mit 1 U alkalischer Phosphatase (CIP *calf intestine phosphatase*; Roche, Mannheim, D) in dem zugehörigen 1 x CIP Puffer inkubiert. Abschließend wurde die DNA mittels „*PCR Purification Kit*“ (Qiagen, Hilden, D) nach Herstellerangaben gereinigt.

Die durch PCR und Restriktion hergestellten DNA-Fragmente wurden mit dem linearisierten und dephosphorylierten Vektor durch die T4-DNA-Ligase kovalent verknüpft. Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 (Weiss *et al.*, 1968) ist in der Lage, sowohl glatte als auch kohäsive Enden zu ligieren. Hierbei wurde ein molares Vektor/Insert-Verhältnis von 1 : 3 oder 1 : 5 gewählt. Zudem wurde 1 U T4-DNA-Ligase (NEB, Schwalbach, D) mit dazugehörigem Puffer verwendet. Die Ligation erfolgte bei 16 °C für 16 h. Anschließend wurde die Ligation überprüft und in einen *E. coli*-Stamm (s. 2.1.3) transformiert.

2.2.1.12 Ligationsüberprüfung und Orientierungsbestimmung des Inserts

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Ligation wurden zwei unterschiedliche Methoden gewählt. Zum einen konnte die Überprüfung der Ligation vor oder zum anderen nach der Transformation in *E. coli* erfolgen.

Bei einer Überprüfung vor der Transformation wurde die Ligation in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Hierbei wurden Primer gewählt, die in der Vektorsequenz 5' vorwärts und 3' hinter der *multiple cloning site* liegen, so dass bei erfolgter Ligation ein um das DNA-Fragment größeres PCR-Produkt entsteht. In der Regel waren es entweder M13 vorwärts und rückwärts oder T7 vorwärts und T3 rückwärts Primer (s. 5.1). Hierbei ist außerdem zu erkennen, ob nicht nur ein Insert im Vektor vorhanden ist, sondern auch, ob vielleicht zwei oder mehrere Inserts in diesem Vektor ligiert vorliegen.

Bei einer Überprüfung der Ligation nach Transformation in *E. coli* wurde erst eine Plasmidpräparation durchgeführt (s. 2.2.1.5). Nun wurden die Plasmide mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten (s. 2.2.1.6). Hierzu wurden zwei Restriktionsenzyme gewählt, die eine gut unterscheidbare Größe vom linearisierten Vektor und Insert ergeben. Die Auftrennung des Vektors und Insert erfolgte dann durch eine Agarosegelelektrophorese (s. 2.2.1.7).

Erfolgte eine Klonierung des Inserts durch zwei gleiche Schnittstellen, war zusätzlich eine Orientierungsbestimmung notwendig. Hierzu wurden anstatt der zwei Vektor-Primer wie bei der Ligationsüberprüfung (s. oben) ein vorwärts Primer aus dem Insert und ein rückwärts Primer aus dem Vektor oder umgekehrt gewählt.

2.2.1.13 Subklonierung in TOPO-Vektor

Die Methode diente der effizienten Klonierung von PCR-Produkten, die mit Hilfe der *Taq*-Polymerase erzeugt wurden. Die *Taq*-Polymerase ist mit ihrer terminalen Transferase-Aktivität in der Lage, einzelne Desoxyadenylatreste an das 3'-Ende von PCR-Produkten zu hängen. Der verwendete pCR II-Klonierungsvektor besitzt hierzu analog überhängende Desoxythymidylatreste. Eine an den Vektor gebundene DNA-Topoisomerase I katalysiert die Ausbildung kovalenter Bindungen. Hierzu ist eine Reaktionsdauer von 5 min bei Raumtemperatur ausreichend (Shuman, 1994).

Die PCR-Produkte wurden vor der Klonierung zuerst mittels Agarosegelelektrophorese getrennt und extrahiert (s. 2.2.1.7). Bei der Klonierung wurde nach Angaben des Herstellers für das TOPO-TA Kloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe, D) verfahren. Es wurde der Vektor pCR II-TOPO 4,0 kb (s. 5.1.1) verwendet, der über eine Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz zur Selektion verfügt und zusätzlich noch über ein LacZ-Gen, mit welchem ein Blau-Weiß-Screening (s. 2.2.1.3) möglich ist. Die Transformation des Plasmids erfolgte in *E. coli* TOP 10F' (s. 2.1.3).

2.2.1.14 Bakterienkolonie-PCR

Zum schnellen Screening nach positiven Klonen bei der RCASBP(A)-Klonierung wurden mit einem sterilen Zahnstocher Transformanden von der Plattenkultur in einen PCR-Ansatz (s. 2.2.1.24) überführt. Als Primer wurden ebenfalls die bereits bei der PCR für die zu generierenden Inserts eingesetzten Primer verwendet. Um gleichzeitig auch noch die Orientierung zu ermitteln, wurden ein Vorwärts-Primer aus dem Insert und ein Rückwärts-Primer aus dem Vektor oder umgekehrt gewählt (s. 2.2.1.24). Das PCR-Produkt wurde mittels DNA-Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und auf das Vorhandensein der Insertsequenz hin untersucht. Zur eventuellen Weiterverwendung wurden von den Transformanden auch Einzelausstriche auf Agaroseplatten erstellt, welche nach Inkubation bei 37 °C über Nacht bei 4 °C gelagert wurden (s. 2.2.1.4).

2.2.1.15 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalysen im Internet

Die Sequenzierung von doppelsträngiger DNA erfolgte nach der Didesoxykettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1992). Hierzu wurden 1 - 2 µg DNA getrocknet und zur Firma Eurofins MWG (Ebersberg, D) geschickt.

Die erhaltenen Sequenzen wurden im Internet auf der Seite von PubMed mit dem Programm BLAST (Altschul *et al.*, 1990) mit vorhandenen Sequenzen verglichen. Hierzu wurde die Option „*nucleotide blast*“ verwendet (Link <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.2.1.16 Klonierung in RCASBP(A)-Vektor

Bei der Klonierung in den RCASBP(A)-Vektor wurde die *Clal*-Schnittstelle verwendet. Hierfür wurden mittels spezifischer Primer in einer PCR (s. 2.2.1.24) am 5'- und 3'-Ende der NFIA-1-Sequenz *Clal*-Schnittstellen generiert. Um das exogene NFIA-1 vom endogenen unterscheiden zu können, wurde zusätzlich auch noch eine StreptII-Tag-Sequenz angehängt. Diese kann mit Antikörpern detektiert werden. Nach Subklonierung in den TOPO-Vektor (s. 2.2.1.13), Sequenzierung der DNA-Sequenz (s. 2.2.1.15) und Korrektur der Sequenz (s. 2.2.1.25) wurde die NFIA-1-StreptII-Sequenz in den zuvor dephosphorylierten RCASBP(A)-Vektor (s. 2.2.1.11) ligiert. Anschließend wurde die Ligation in *E. coli* XL1 Blue-Bakterien transformiert (s. 2.1.3). Dieser Bakterienstamm erlaubt ein Blau-Weiß-Screening (s. 2.2.1.3) sowie die Aufnahme von großen Plasmiden, was notwendig ist, da der RCASBP(A)-Vektor schon eine Größe von 11.628 bp hat. Durch das Blau-Weiß-Screening positiv identifizierte Kolonien wurden einer Bakterienkolonien-PCR (s. 2.2.1.14) unterzogen. Konnte hierbei auch die richtige Orientierung nachgewiesen werden, wurde diese Bakterienkolonie vermehrt, die Plasmide isoliert (s. 2.2.1.5) und zur DNA-Sequenzierung (s. 2.2.1.15) verschickt. Hiernach konnten die RCASBP(A)NFIA-1-StreptII-Plasmide zur Infektion von DF1 Zellen (s. 2.2.3.10) benutzt werden.

2.2.1.17 RNA-Isolierung aus Zellen und Geweben mit TRIzol

Für die Gesamt-RNA-Isolierung aus Knorpelzellen und aus Leber wurde die TRIzol (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, D) Methode gewählt und nach Herstellerangaben isoliert.

2.2.1.17.1 RNA-Isolierung aus Gewebe

Das präparierte Lebergewebe wurde mit 1 ml TRIzol pro 50 - 100 mg Gewebe versetzt und mit einem Ultra-Turrax (T8, IKA, Staufen, D) homogenisiert. Die Zelltrümmer wurden für 10 min bei 12.000 g bei 4 °C abzentrifugiert. Zur Phasenseparation wurde 0,2 VT Chloroform zugegeben, vermischt und bei Raumtemperatur für 2 - 3 min inkubiert. Hiernach wurde für 15 min bei 12.000 g bei 4 °C zentrifugiert und die dann sichtbare Epiphase abgenommen. Die sich in der Epiphase befindende RNA-Präzipitation wurde mit 0,5 VT Isopropanol versetzt und 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Erneut wurde für 15 min bei 12.000 g und 4 °C

zentrifugiert, der Überstand abgenommen und danach das RNA-Pellet mit 1 VT 75 %igem (v/v) Ethanol gewaschen. Abschließend wurde die RNA für 5 min bei 7.500 g bei 4 °C zentrifugiert, das Pellet an der Luft kurz trocknen gelassen und in 50 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

DEPC-H₂O

doppelt entionisiertes Wasser wird mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, über Nacht inkubiert und zweimal autoklaviert

2.2.1.17.2 RNA-Isolierung aus Zellsuspensionen

Bei Suspensionszellen wurden 5 - 10 x 10⁶ Zellen mit 1 ml TRIzol versetzt und durch Auf- und Abpipettieren mittels einer 20 Gauge Kanüle lysiert. Hiernach wurden die Proben für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zur Phasenseparation 0,2 VT Chloroform zugegeben und wie unter 2.2.1.17.1 weiter verfahren.

2.2.1.18 RNA-Reinigung mittels DNase I-Verdau und Qiagen RNeasy Mini

Eventuelle Verunreinigungen durch genomische DNA in den zuvor isolierten RNA-Proben wurden mit dem Ambion DNA-free Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, D) behandelt. Hierbei wurden 10 µg RNA mit 3 U DNase I-, 0,1 VT DNase I-Puffer in einem Endvolumen von 30 µl für 30 min bei 37 °C verdaut. Die DNase I wurde dann durch 0,1 VT Inaktivierungsreagenz deaktiviert und bei 10.000 g für 1 min zentrifugiert.

Hiernach wurde die RNA mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit nach Herstellerangaben (Qiagen, Hilden, D) gereinigt. Abweichend wurde bei der Elution mit zweimal 25 µl DEPC-H₂O eluiert.

2.2.1.19 mRNA-Isolierung

Im Spin Column-Verfahren wurden die polyadenylierten mRNA-Moleküle durch Hybridisierung der 3'-Poly A-Überhänge an die dT-Oligomeren der Polystyrol Latex-Partikel isoliert.

Die mRNA-Isolierung erfolgte mit dem Oligotex mRNA Kit (Qiagen, Hilden, D) nach Angaben des Herstellers. Hierbei wurde wie für das Spin-Column-Protokoll angegeben verfahren und ein Mini-Prep-Volumen mit maximalem Einsatz von 250 µg totaler RNA gewählt. Eluiert wurde in einem Volumen von zweimal 50 µl OEB-Puffer.

2.2.1.20 Denaturierende RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Zur Qualitätsüberprüfung der RNA und zur Vorbereitung eines Northern Blots wurde die RNA mittels einer denaturierenden RNA-Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierfür werden 5 µg RNA für eine Qualitätsüberprüfung und 20 µg RNA oder 1 µg mRNA zur Vorbereitung eines Northern Blots (s. 2.2.1.21) eingesetzt. Bei beiden Anwendungen wurde die RNA auf ein Volumen von 5 µl mittels eines Savant SpeedVac Concentrators (Thermo Scientific, Erlangen, D) eingeeengt. Um eventuelle störende Sekundärstrukturen aufzulösen, wurde der RNA 10 µl Denaturierungspuffer zugeben, das Gemisch für 10 min bei 65 °C erhitzt und schließlich auf Eis abgekühlt. Den RNA-Proben wurde vor dem Auftragen auf ein denaturierendes 1 %iges RNA-Agarosegel noch 2 µl Probenpuffer und 1,5 µl Ethidiumbromid (0,5 mg/ml) zugegeben.

Zur Größenabschätzung wurde noch ein externer Größenstandard (0,24 - 9,5 kb RNA Ladder Gibco Invitrogen, Karlsruhe, D) mit aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung zur Qualitätsüberprüfung der RNA erfolgte in einem 6 cm Gel bei 100 Volt für 30 - 60 min und zur Vorbereitung für einen Northern Blot in einem 15 cm Gel bei 35 Volt für 16 h. Die RNA-Agarose-Gelelektrophorese wurde bei 4 °C in einem denaturierenden Laufpuffer durchgeführt.

10 x MOPS-Puffer, pH 7

MOPS	200 mM
Natriumacetat	50 mM
EDTA	10 mM
in DEPC-H ₂ O ansetzen	

RNA-Denaturierungspuffer

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

RNA-Agarosegel		Denaturierender Laufpuffer	
Seakem Agarose	1 % (w/v)	MOPS Puffer	1 x
MOPS Puffer	1x	Formaldehyd	0,2 M
Formaldehyd	2,2 M	in DEPC-H ₂ O ansetzen	

6 x RNA-Probenpuffer

Formaldehyd, 37 % (w/v)	500 µl
Glycerol, 87 % (v/v)	400µl
Bromphenolblau, 1 % (w/v)	50 µl
Xylencyanolblau, 1 % (w/v)	50 µl
in DEPC-H ₂ O ansetzen	

2.2.1.21 Northern Blotting

Northern Blot-Analysen wurden zur Detektion spezifischer Transkripte aus zuvor isolierter RNA oder mRNA durchgeführt. Gleiche Mengen RNA oder mRNA wurden auf einem denaturierenden RNA-Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch nach ihrer Größe getrennt (s. 2.2.1.20). Zunächst wurde das Agarosegel mittels eines UV-Transilluminators dokumentiert. Zur Entfernung von Ethidiumbromid und Formaldehyd wurde das Gel mit 10 x SSC-Puffer dreimal für je 20 min gewaschen.

Der Transfer der aufgetrennten RNA auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham Biosciences GE Healthcare, Freiburg, D) erfolgte durch einen inversen Wet-Blot (Sambrook, 1989). Durch Kapillarkräfte wurde die RNA durch den nach oben gesogenen Transferpuffer auf die Membran transportiert. Der Transfer erfolgt bei 4 °C für 16 h. Danach wurde die RNA auf der Membran durch eine UV-Quervernetzung (Stratalinker, Stratagene, La Jolla, CA, USA) fixiert. Bei -80 °C konnte die Membran bis zur Hybridisierung der Sonde (s. 2.2.1.22) unter RNase-freien Bedingungen gelagert werden.

SSC (20 x), pH 7,6

NaCl	3 M
Natriumcitrat	0,3 M
in DEPC-H ₂ O	

2.2.1.22 Hybridisierungstechniken

2.2.1.22.1 Radioaktive Markierung einer ssDNA-Sonde

Herstellung der Sonde erfolgte durch PCR der spezifischen Sequenz. Hiernach erfolgte eine Kontrolle der Sondengröße über eine Agarosegelelektrophorese. Danach wurden die DNA-Fragmente ausgeschnitten und einer QIAquick Gel Extraktion laut Herstellerangaben (Qiagen, Hilden, D) unterzogen. 25 ng DNA wurden in einem Volumen von 30 µl in einem Wasserbad aufgekocht, so dass die DNA denaturiert und dann durch Abschrecken auf Eis in dieser Form fixiert wurde. Die radioaktive Markierung der DNA erfolgte nun mit dem Prime-a-Gene Labeling System (Promega, Mannheim, D). Die nun einzelsträngige DNA wurde mit 20 µM dNTP-Mix (ohne dCTP), 100 U/ml Klenow-Fragment, 400 µg/ml BSA und 50 µg/Ci ³²P-dCTP in 1 x Labeling-Puffer für 30 min bei 37 °C inkubiert. Dabei lagern sich Hexanukleotide zufälliger Sequenz an die einzelsträngige DNA an, die dann vom Klenow-Fragment elongiert werden. Durch anschließende Reinigung mit dem PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, D) wurden die nicht eingebauten ³²P-dCTPs nach Herstellerangaben entfernt. Die gereinigte DNA wurde zweimal mit 50 µl Elutionspuffer eluiert. Hiervon wurden 2 µl zur Messung der spezifischen Aktivität in einem Szintillationszähler (LS 6500 Beckman, München, D) gemessen. Die spezifische Aktivität sollte bei 1 x 10⁸ cpm/µg liegen.

detektiertes Gen	Primersequenz	Sondengröße
β-Aktin (Huhn)	F: ggt atg tgc aag gcc ggt tt R: atg gct ggg gtg ttg aag gt	353 bp
NFIA (Huhn)	F: gac cca gag caa gtc cac at R: cga aaa agt tac ggc ctt tg	654 bp

2.2.1.22.2 Hybridisierung und Detektion von Northern Blots

Zunächst wurde die Northern Blot-Membran in einem Hybridisierungsröhrchen der Firma Biometra (Göttingen, D) mit 5 ml vortemperierter ExpressHyb-Lösung (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France) für 30 min bei 68 °C prähybridisiert. Vor der Zugabe der Sonde wurde diese für 10 min bei 95 °C denaturiert und für 2 min auf Eis abgeschreckt, so dass die DNA einzelsträngig vorlag. Die Sonde wurde dann der Prähybridisierungslösung zugegeben und mit der Membran für 1 - 4 h unter Rotation

bei 68 °C hybridisiert. Um unspezifisch gebundene Sonden zu lösen, wurden die Membranen 2 - 4-mal mit Waschlösung 1 bei Raumtemperatur, dann 2 - 4-mal mit Waschlösung 2 bei 50 °C inkubiert. Die noch feuchte Membran wurde in Folie eingeschweißt und für 2 - 16 h auf einem Phosphorimager Screen (Amersham Biosciences, Freiburg, D) exponiert.

Die densitometrische Auswertung der Phosphorimager-Screens erfolgte mit der Software ImageQuant Version 5.0 (Amersham Biosciences, Freiburg, D).

Waschlösung 1

SSC 2 x
SDS 0,05 %

Waschlösung 2

SSC 0,1 x
SDS 0,1 %

2.2.1.22.3 Stripping von Northern Blots

Um bereits verwendete Northern Blot-Membranen ein weiteres Mal zu benutzen, musste zunächst einmal die bereits gebundene Sonde entfernt werden. Dazu wurde die Northern Blot-Membran unter Schütteln bei 95 °C für 10 min in vorgewärmtem *Stripping*-Puffer erhitzt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis keine Radioaktivität mehr zu messen war.

Durch Auflegen eines Phosphorimager-Screens konnte die Effektivität des Strippens getestet werden.

Stripping-Puffer

SDS 0,5 %
in DEPC-H₂O

2.2.1.23 Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription von polyA-RNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde das StrataScript Kit (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet. Dieses Kit verfügt über eine RNA abhängige DNA-Polymerase, die ihren genetischen Ursprung von der Moloney Murinen Leukemia-Virus Reversen Transkriptase hat, bei welcher aber die RNase H-Aktivität entfernt wurde. Eine Punktmutation ist verantwortlich für die Deaktivierung der RNase H-Aktivität, aber auch für die Generierung größerer Mengen an Volllänge-cDNA-Transkripten.

Vor der Herstellung von cDNA wurde ein DNase I-Verdau der RNA nach Angaben des Herstellers (s. 2.2.1.18) durchgeführt. Bei der Reversen Transkription wurden nun bis zu 5 µg RNA, 300 pmol Oligo (dT)₁₅-Primer und 41,5 µl DEPC-H₂O eingesetzt und für 5 min bei 70 °C inkubiert. Damit sich die Primer nun an die polyA-Enden der mRNA anlagern konnten, wurde der Ansatz langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Nun wurden dem Ansatz 5 µl 10 x StrataScript-Puffer, 1,5 µl Prime RNase-Inhibitor (60 U) (Eppendorf, Hamburg, D), 1 µl dNTPs (je 25 mM) und 1 µl StrataScript-Enzym (50 U) zugegeben. Die Reverse Transkription fand bei 42 °C für 1 h statt. Anschließend wurde das Enzym durch 10 min Erhitzen auf 95 °C deaktiviert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

Sollte nach der Reversen Transkription sofort eine PCR erfolgen, wurde das OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, D) verwendet. Dieses Kit ermöglicht eine hocheffiziente, sensitive Reverse Transkription und PCR in einem Reaktionsgefäß mit 1 pg - 2 µg RNA. Der in diesem Kit enthaltene Enzymmix aus einer Reversen Transkriptase und einer HotStarTaq DNA-Polymerase ermöglicht Reverse Transkription und PCR-Amplifikation in einem Schritt. Während der Reversen Transkription liegt die Polymerase inaktiv vor. Nach diesem Schritt wurde der Reaktionsansatz auf 95 °C erhitzt, so dass die HotStarTaq DNA-Polymerase aktiviert und die Reverse Transkriptase inaktiviert wurde. Dieser Start bei einer hohen Temperatur ermöglicht es, nichtspezifische Amplifikationsprodukte wie z.B. Primerdimere zu eliminieren und den Hintergrundschmier zu reduzieren. Es wurde hierbei nach Angaben des Herstellers für das Qiagen OneStep RT-PCR Kit verfahren.

2.2.1.24 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion lassen sich Nukleinsäuresequenzen *in vitro* amplifizieren (Saiki *et al.*, 1988). Das Prinzip der PCR besteht in der zyklischen Wiederholung der einzelnen Reaktionsabschnitte, die in einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA-Matrize resultiert. Diese Technik erfordert eine bekannte Nukleotidsequenz am 5'- und am 3'-Ende der definierten DNA-Abschnitte.

Als DNA-Matrize dienten entweder cDNA (s. 2.2.1.14 und 2.2.1.23) oder genomische DNA (s. 2.2.1.8). Für routinemäßige PCR-Reaktionen wurde als Enzym die RedTaq-DNA-Polymerase (Sigma Aldrich, Taufkirchen, D) verwendet. Zur Sondenherstellung

für Northern Blotting (s. 2.2.1.21) oder für eine spätere Klonierung (s. 2.2.1.13 und 2.2.1.16) wurde als Enzym die *Pfu*Turbo-Hotstart-DNA-Polymerase mit dem dazugehörigen 10 x Cloned *Pfu*-DNA-Polymerase-Reaktionspuffer von Stratagene (La Jolla, USA) verwendet. Durch ihre 3' - 5' Exonukleaseaktivität besitzt dieses Enzym eine 6-fach geringere Fehlerrate als herkömmliche *Taq*-Polymerasen.

Ein Protokoll für einen PCR-Ansatz ist nachfolgend aufgeführt:

Pro Ansatz	µl	Endkonzentration
DNA Template	variabel	100 - 300 ng
10 x Red <i>Taq</i> PCR-Puffer	5 µl	1 x
oder		
10 x Cloned <i>Pfu</i> DNA-Polymerase Reaktionspuffer		1 x
dNTPs	2 µl	je 400 µM
5'-Primer	1 µl	100 nM
3'-Primer	1 µl	100 nM
Red <i>Taq</i> -Polymerase	1,25 µl	1 U
oder		
<i>Pfu</i> Turbo-Polymerase		2,5 U
H ₂ O	ad 50 µl	

Folgende PCR-Programmparameter wurden verwendet:

Schritt	Beschreibung	Temperatur	Zeit	
1.	Primäre Denaturierung	94 °C	0:45 min	
2.	Denaturierung	94 °C	0:30 min	25 - 32
3.	Annealing	T _m des Primers	0:30 min	Zyklen
4.	Elongation	72 °C	1:00 per kb	
5.	Finale Elongation	72 °C	7:00 min	

Die im Rahmen der Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in der folgenden Tabelle aufgeführt und wurden von der Firma Eurofins MWG (Ebersberg, D) synthetisiert. Die Sequenzen der Primer wurden mit Hilfe des Programms Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) ausgewählt.

Gen	Spezies	Primersequenz 5' → 3'	T _M °C	Amplikon bp	Verwendungszweck
β-Aktin	Huhn	chAktin_for 5'- GGTATGTGCAAGGCCG GTTT-3' chAktin_rev 5'- ATGGCTGGGGTGTGGA AGGT-3'	59,4	353 bp cDNA 1196 bp genom. DNA	Housekeeping-Gen- Primer als Abgleich für OneStep PCR und Northern Blot
NFIA-1	Huhn	chNF1neu_for 5'- CTTTTCTCTCTCCCGC ACAC-3' chNF1neu_rev 5'- CTGCAGCGTGCACAAA GTAT-3'	59,4 57,3	612 bp cDNA	Primer für Northern Blot-Sonde
NFIA-1 Isotyp spezifisch	Huhn	NFIA1_left 5'- GAACACCGCGGAGCA CTACAT-3' NFIA1_right 5'- CGGATTGCTGGGTGTG AGAA-3'	61,8 59,4	242 bp	NFIA-1 Isotyp- spezifische Primer für OneStep und RT-PCR
EST355d 10	Huhn	chEst_for 5'- GGGAAGTTGGTCTGTT TTGACA-3' chEst_rev 5'- CCAGCAAGTGCCCTCA CTTT-3'	58,4 59,4	630 bp cDNA	Primer für Northern Blot-Sonde und OneStep PCR
NFIA	Huhn	NF-1/A_left 5'- GACCCAGAGCAAGTCC ACAT-3' NF-1/A_right 5'- CGAAAAAGTTACGGCC TTTG-3'	59,4 55,3	654 bp cDNA	Primer für eine verbesserte Northern Blot-Sonde; bindend am 3'-Ende der Sequenz
EST355d 10	Huhn	chEST355d10_for 5'- CACTCAATTGCAGAGC GATTT-3' chEST355d10_rev 5'- CAGTTCAGGGACACGA AGGT-3'	55,9 59,4	700 bp cDNA	Primer für eine verbesserte Northern Blot-Sonde
NFIA	Huhn	NFI-A_for 5'- CATCCCTTCATCGAAG CACTTCT-3'	60,6	238 bp cDNA	NFIA Subgruppen- spezifischer Primer für OneStep PCR

		NFI-A_rev 5'- CAAATCCTCCCGAAA TTCAGGC-3'	60,6		
NFIB	Huhn	NFI-B_for 5'- ATTCATCTTCCTCGAG TCTCAG-3'	58,9	273 bp cDNA	NFIB Subgruppen- spezifischer Primer für OneStep PCR
		NFI-B_rev 5'- TCTTCATCCTTCGACAT TCGTTTC-3'	59,3		
NFIC	Huhn	NFI-C_for 5'- GAGTTCCACCCCTTCA TCG-3'	58,8	258 bp cDNA	NFIC Subgruppen- spezifischer Primer für OneStep PCR
		NFI-C_rev 5'- GGTGATGGAGAGCAC GAAG-3'	58,8		
NFIX	Huhn	NF-X_for 5'- CTACCTGGCCTTCTTT GTGC-3'	59,4	250 bp cDNA	NFIX Subgruppen- spezifischer Primer für OneStep PCR
		NFI-X_rev 5'- GACGGGGCTGATGTTG TAGT-3'	59,4		
NFIA	Huhn	NFI420_for 5'- GATGAGAAGAATTGAC TGCCTTCGCCAGGCAG -3'	70,8	Position 404 - 435 cDNA	Mutagenese-Primer
		NFI420_rev 5'- CTGCCTGGCGAAGGC AGTCAATTCTTCTCATC -3'	70,8		
NFIA	Huhn	NFI1036_for 5'- CCCCGAACACCGCGG AGCACTACATG-3'	71,1	Position 1063 - 1088 cDNA	Mutagenes- Primer
		NFI1036_rev 5'- CATGTAGTGCTCCGCG GTGTTCCGGGG-3'	71,1		
NFIA-1	Huhn	NFIA1-ORF_for 5'- CAGTATCGATGTATTCT CCGCTCTGTCTCA-3'	66,8		Generierung und Amplifizierung des NFIA-1-Gens +/- Flag und StrepII Tags + <i>Clal</i> <i>sites</i> und zur anschließenden
		NFIA1-ORF-rev 5'- ATCGATTTATCCCAGG TACCAGG-3'	60,6	1583 bp cDNA 1586 bp	

		Strep-NFIA1_rev 5'- GCGGGTGGCTCCATC CCAGGTACCAGGACT - 3'	75,0	cDNA 1606 bp cDNA	Klonierung in die pCRII-TOPO- und RCASBP(A)-Vektoren
		NFIA1- ORF+Strep_rev 5'- ATCGATTTATTTTTCGA ACTGCGGGT-3'	60,1	1599 bp cDNA	
		NFIA1-ORF+Flag_rev 5'- ATCGATTTACTTATCGT CGTCATCCT-3'	60,1		
RCAS- NFIA-1	RCASB P(A)	RCAS-Cla_for 5'- GCGTACCACTGTGGCA TCGAT-3'	61,8	Größen s. Primer zur Generierung	zur Ligationsüberprüfung
		RCAS-Cla_rev 5'- GGCCCGTACATCGCAT CGAT-3'	61,4	des NFIA-1 Gens +/- Flag und StrepII Tag + <i>Cla</i> sites	
RCAS- gag	RCASB P(A)	RCASgag_for 5'- ATTTTCGTCCGCGTGTA AAAC-3'	55,3	330 bp cDNA	Kontaminationsüber- prüfung mit bereits vorhandenen RCAS- Viren
		RCASgag_rev 5'- AGCTGGTTTCTCGATG CACT-3'	57,3		
Matrilin 1	Huhn	chMATN1_for 5'- TGTAAGAGGGCTTCA CGCT-3'	57,3	486 bp cDNA	Matrilin 1-spezifischer Primer für OneStep PCR
		chMATN1_rev 5'- AACTCCCACAGCAAAC ATCC-3'	57,3		
Matrilin3	Huhn	chMATN3_for 5'- CTGGCATTGAGATCTA CGCA-3'	57,3	466 bp cDNA	Matrilin 3-spezifischer Primer für OneStep PCR
		chMATN3_rev 5'- TAAGATCCACCGTTTC TCCG-3'	57,3		
Collagen VI alpha 1	Huhn	chCOL6A1_for 5'- TCACAGATGGACGCTC TGAC-3'	59,4	464 bp cDNA	Collagen 6 alpha 1- spezifischer Primer für OneStep PCR
		chCOL6A1_rev 5'-	59,4		

		GACCTTCTGCTGGTTT			
		CTGC-3'			
NFIA-1 +	Huhn	NFI-EST_left 5'-	59,8	230 bp	Primer für den
EST355d		CTCTGCTGCTGCTTAC		cDNA +	Nachweis, dass NFIA-
10		CAACT-3'		genom. DNA	1 und EST355d10 auf
		NFI-EST_right 5'-	55,9		cDNA und genom.
		AAATCGCTCTGCAATT			DNA zusammenliegen
		GAGTG-3'			

Das Ergebnis der PCR-Ansätze wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Zur späteren Klonierung (s. 2.2.1.13 und 2.2.1.16) wurden die PCR-Produkte noch herausgeschnitten und mittels Gelextraktion (s. 2.2.1.7) gereinigt.

2.2.1.25 PCR-Mutagenese zur Korrektur der NFIA-1 StreptII-Sequenz

Die Erzeugung einer oder mehrerer Mutationen in einem klonierten Gen kann mittels PCR-Mutagenese erreicht werden. Diese sequenzspezifische Mutagenese hat den Vorteil, dass mit Hilfe von Oligonukleotiden in genau definierten DNA-Abschnitten Punkt-, Deletions-, Insertions- und Substitutionsmutationen erzeugt werden können (Zoller und Smith, 1982).

Punktmutationen in der NFIA-1-Sequenz wurden mittels einem QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, USA) nach Herstellerangaben korrigiert. Die dazu benötigten speziellen Mutagenese-Primer (s. 2.2.1.24), welche die gewünschte Mutation tragen, wurden generiert und von MWG (Göttingen, D) synthetisiert. Die Primer wurden nun in einer PCR-Reaktion eingesetzt und durch eine *Pfu*Turbo-Polymerase verlängert, so dass ein an der gewünschten Stelle mutiertes Plasmid entstand. Der Ansatz wurde anschließend mit der Endonuklease *DpnI* behandelt und aufgrund der Spezifität für methylierte und hemimethylierte DNA wurde das fehlerhafte parentale Plasmid enzymatisch gespalten und somit entfernt. Danach wurde das mutierte Plasmid in XL1-Blue superkompetenten Bakterien transformiert (s. 2.2.1.2) und anhand eines Blau-Weiß-Screening (s. 2.2.1.3) später identifiziert.

2.2.1.26 Genotypisierung von NFIA-1-KO Mäusen

Um den Genotyp der NFIA-1-KO Mäuse festzustellen, wurde die zuvor aus Schwanzspitzen isolierte genomische DNA unter Verwendung von drei

unterschiedlichen Primern in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Der KD64 Vorwärts-Primer mit dem KD63 Rückwärts-Primer ermöglicht die Amplifikation der NFIA-1-WT entsprechenden Sequenz. Der KD15 Rückwärts-Primer hybridisiert innerhalb einer lacZ-Neomycinkassette, so dass mit diesem Primer ein Nachweis des KO-Genotyps erfolgt. Erhält man nach der Amplifikation zwei Banden, so handelt es sich um ein heterozygoten Tier. Zeigt sich allerdings nur eine Bande bei 670 bp oder eine bei 400 bp, so handelt es sich im ersten Fall um einen Wildtyp und im zweiten Fall um ein homozygoten NFIA-KO Tier.

Zur Genotypisierung wurden folgende Primer eingesetzt:

Gen	Spezies	Primersequenz 5' → 3'	T _M °C	Amplikon bp
	Maus	KD64_for 5'-CCAGAGGCGACTTGTCTC-3'	58,2	
NFIA-1	Maus	KD63_rev 5'-GGTTCAGCGGTCACAGAGG-3'	61,0	670 bp
Wildtyp				
NFIA-1	Maus	KD15_rev 5'-CGCTTCTGGTGCCGAAACC-3'	63,5	400 bp
<i>Knockout</i>				

Bei einer Genotypisierungs-PCR wurde 1 µl der genomischen DNA (s. 2.2.1.8) für einen 20 µl PCR-Ansatz eingesetzt.

Pro Ansatz	µl
DNA-Template	1
10 x Polymerase-Reaktionspuffer	2
dNTPs (je 10 mM)	2
5'-Primer (100 nM)	1
3'-Primer (100 nM)	1
<i>Taq</i> -Polymerase 1 U	0,2
H ₂ O	ad 20 µl

Die Genotypisierung wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

Schritt	Beschreibung	Temperatur	Zeit	
1.	Primäre Denaturierung	94 °C	1:00 min	
2.	Denaturierung	94 °C	0:30 min	32 Zyklen
3.	Annealing	62 °C	0:30 min	
4.	Elongation	72 °C	1:00 min	
5.	Finale Elongation	72 °C	7:00 min	

Das Ergebnis der PCR-Reaktion wurde mittels Agarosegelelektrophorese (s. 2.2.1.7) ermittelt.

2.2.2 Proteinchemische Methoden

Alle verwendeten Lösungen wurden mit einfach deionisiertem Wasser angesetzt. Zum Schutz der Proteine wurden Proteaseinhibitoren (Roche Complete Mix, Mini Tablets, Mannheim, D) zugegeben.

2.2.2.1 Lyse von Zellen und Proteinisolierung aus Agarose mit TOTEX-Puffer

Zur Gewinnung von Proteinextrakten aus Agarose-Chondrozytenkulturen wurde der TOTEX-Puffer eingesetzt. Aus einer 35 mm² Kulturschale, in der eine Agarose-Chondrozytenschicht gegossen wurde, wurde diese Schicht mit einem Spatel entfernt und in einem Falconröhrchen mit 1 ml TOTEX-Puffer über Nacht auf einem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Die Agarose wurde nun abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die im Überstand befindlichen Proteine wurden mittels TCA-Fällung (s. 2.2.2.4) konzentriert. Die nun aufkonzentrierten Proteine wurden bei -20 °C gelagert, direkt in einer SDS-Gelelektrophorese (s. 2.2.2.5) oder zur Isolierung von nukleären und zytoplasmatischen Proteinen (s. 2.2.2.2) eingesetzt.

TOTEX-Zellysepuffer, pH 7,9

Triton	0,1 % (v/v)
NaCl	350 mM
HEPES	20 mM
MgCl ₂	1 mM
EGTA	0,1 mM
EDTA	0,5 mM
Glyzerin	20 % (v/v)
NP40	1 % (v/v)
Proteaseinhibitor-Tabletten (s. 2.2.2)	frisch zugeben

2.2.2.2 Isolierung nukleärer und zytoplasmatischer Proteine

Die zuvor isolierten Proteine (s. 2.2.2.1) aus einer Agarose-Chondrozytenkultur wurden zur Trennung nukleärer und zytoplasmatischer Proteine mittels unterschiedlicher Salzkonzentrationen gefällt. Dazu wurden die gefällten Proteine in 50 µl Salzpuffer, mit niedriger Ionenstärke, aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde 2 min bei Raumtemperatur bei 5900 x g zentrifugiert und der Überstand mit den zytoplasmatischen Proteinen abgenommen. Das Pellet wurde einmal mit dem Niedrig-Salzpuffer gewaschen und erneut abzentrifugiert. Nun wurde das Pellet in 50 µl mit Hoch-Salzpuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach abschließender Zentrifugation bei 15700 x g für 5 min bei Raumtemperatur wurden die zytoplasmatischen Proteine im Überstand erhalten.

Niedrig-Salzpuffer

HEPES	20 mM
KCl	10 mM
EDTA	1 mM
NP40	0,2 % (v/v)
Glyzerin	10 % (v/v)
NaF	50 mM
PMSF	1 mM

Hoch-Salzpuffer

HEPES	20 mM
KCl	10 mM
NaCl	420 mM
EDTA	1 mM
Glyzerin	10 % (v/v)
NaF	50 mM
PMSF	1 mM

2.2.2.3 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bindung von Coomassie Brilliant Blau G 250 an Proteine und Polypeptide mit einem Molekulargewicht über 10 kDa wurde zur quantitativen Proteinbestimmung der Proben genutzt (Bradford, 1976). Bei der Bildung der Farbstoff-Protein-Komplexe verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 450 nm nach 595 nm. Die Extinktionsdifferenz zwischen den beiden Wellenlängen ist dabei proportional zur Proteinkonzentration. Die Proteinproben wurden dafür mit H₂O auf 500 µl aufgefüllt und dann mit 500 µl Coomassie Plus Bradford-Reagenz (Pierce, Rockford, USA) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde die Extinktion bei 595 nm bestimmt. Die Extinktionsdifferenz wurde berechnet und der Proteingehalt der Proben mit Hilfe einer BSA-Eichgeraden ermittelt.

2.2.2.4 TCA-Fällung

Um Proteine in einer Probe zu konzentrieren, wurden der Probe 225 µl/ml 60 %ige Trichloressigsäure (TCA) und 139 µl 1 % (v/v) Triton-100 zugegeben. Die Proteine wurden im Anschluss für 20 min auf Eis präzipitiert. Danach wurde 20 min bei 14.000 U/min bei 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Präzipitat wurde nun zweimal mit eiskaltem absoluten Ethanol gewaschen und danach jeweils 10 min bei 14.000 U/min bei 4 °C zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet noch mit Aceton gewaschen und erneut unter den zuvor beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Am Ende wurde das Pellet noch an der Luft getrocknet und in einem geeigneten Puffer resuspendiert.

2.2.2.5 SDS-Gelelektrophorese

Unter Verwendung der von Laemmli (Laemmli, 1970) entwickelten eindimensionalen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden Proteine unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Tris-Glycin-Puffersystem aufgrund ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die Proteinproben wurden dabei über ein diskontinuierliches Gradientengel mit einem Acrylamidgehalt von 4,5 - 15 % aufgetrennt. Alle Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit 6 x reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Die elektro-phoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei Raumtemperatur bei einer Stromstärke von 15 - 30 mA.

Zusätzlich lief ein Molekulargewichtsstandard Prestained Broad Range Standards von der Firma Bio-Rad (München, D) mit. Nach der Auftrennung wurden die Proteine entweder im Gel direkt durch Coomassie Blau (s. 2.2.2.6) angefärbt oder zur Immundetektion (s. 2.2.2.7) auf eine Blotmembran transferiert.

SDS-Trenngel

Trenngelpuffer	1 x
Acrylamid/Bisacrylamid (32 : 1)	4,5 % und 15 % (w/v)
TEMED	0,1 % (v/v)
Ammoniumperoxodisulfat	100 µg/ml

SDS-Sammelgel

Sammelgelpuffer	1 x
Acrylamid/Bisacrylamid (32 : 1)	4,5 % (w/v)
TEMED	0,33 % (v/v)
Ammoniumperoxodisulfat	75 µg/ml

Sammelgelpuffer (4 x)

Tris-HCl, pH 6,8	0,5 M
SDS	0,4 % (w/v)

Trenngelpuffer (4 x)

Tris-HCl, pH 8,8	1,5 M
SDS	0,4 % (w/v)

SDS-Probenpuffer 6 x

Tris-HCl, pH 6,8	0,2 M
Glycerol	50 %
SDS	4 %
DTT	0,2 M
Bromphenolblau	0,04 %

Laufpuffer pH 8,8

Tris-HCl	25 mM
SDS	0,1 % (w/v)
Glycin	0,2 M

2.2.2.6 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine erfolgte deren Fixierung im Gel mittels Entfärbelösung 1 für 30 min bei Raumtemperatur. Nun wurde das Gel mit der Coomassie-Färbelösung für 30 min gefärbt und anschließend zweimal mit der Entfärbelösung 1 für je 30 min, dann mit Entfärbelösung 2 für 1 h entfärbt. Nach 30 min Waschen in der Entwässerungslösung wurde das Gel an der Luft zwischen zwei Zellophanfolien getrocknet.

Entfärbelösung 1

Methanol	50 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

Entfärbelösung 2

Methanol	10 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

Coomassie-Färbelösung

Coomassie Brilliantblau R-250	0,1 % (w/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Isopropanol	25 % (v/v)

Entwässerungslösung

Ethanol	25 % (v/v)
Glycerol	2 % (v/v)

2.2.2.7 Western (Immuno-) Blotting

Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung (s. 2.2.2.5) der Proteine in einem SDS-Gel wurden diese mittels Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran (Whatman, Florham Park, NJ, USA) transferiert. Hierzu wurde das Nassblotverfahren angewendet, wobei das Gel in einem Sandwich-Aufbau zwischen zwei Schwämmen und zwei Whatman-Papieren auf die Membran gepresst wird. Der Transfer der Proteine erfolgte in einem mit Laufpuffer gefüllten Tank bei 4 °C für 3 h bei 30 Volt und 80 mA. Nach dem Transfer wurden die Proteine reversibel mit einem *MemCode Reversible Protein Stain Kit* (s. 2.2.2.8) auf der Membran angefärbt. Danach wurde die Membran kurz mit TBS gewaschen. Mit 5 % (w/v) Magermilchpulver (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D) in TBS-T bei Raumtemperatur für 2 h bis über Nacht wurden nun freie Bindungsstellen blockiert. Nach dem Blockieren der Membran wurde diese zweimal mit TBS-T gewaschen. Nun wurde der primäre Antikörper in 5 % Magermilchpulver in TBS-T verdünnt zugegeben (s. 2.1.4.1) und für 1 - 16 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper folgte die Inkubation mit einem geeigneten Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper in 5 % Milchpulver in TBS-T (s. 2.1.4.2). Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran erneut einem dreimaligem Waschschrift mit TBS-T unterzogen. Zur anschließenden Detektion wurde die Methode der ECL-Entwicklung verwendet. Diese beruht auf der Oxidation Luminol durch die an die Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase. Hierzu wurde die Membran für 5 min bei Raumtemperatur mit ECL (Amersham Biosciences GE Healthcare, Freiburg, D) inkubiert. Hierbei wurde laut Herstellerangaben verfahren. Die hierbei erzeugte Chemilumineszenz

wurde anhand eines Röntgenfilmes (Hyperfilm, Amersham Biosciences GE Healthcare, Freiburg, D) und anschließender photographischer Entwicklung (Curix 60, Agfa, Düsseldorf, D) detektiert.

TBS

Tris-HCl, pH 7,4 50 mM
NaCl 150 mM

TBS-T

TBS
Tween-20 0,05 % (v/v)

Transferpuffer

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

2.2.2.8 Gesamt-Proteinanfärbung von Nitrozellulosemembranen

Ein erfolgreicher Proteintransfer wurde vor der Immunfärbung durch eine reversible Färbung der Membran mit dem *MemCode Reversible Protein Stain Kit* (Pierce, Rockford, USA) ermittelt. Hierzu wurde die Membran zunächst mit Aqua dest. gewaschen und dann für 30 sec mit *MemCode Stain*-Lösung unter Schütteln inkubiert. Die Proteine waren danach als blaue Banden sichtbar und konnten fotokopiert oder eingescannt werden. Die Nachweisgrenze lag bei 25 ng. Vor dem Immunoblot wurde die Membran durch mehrmaliges Waschen mit der *MemCode Destain*-Lösung und Aqua dest. entfärbt.

2.2.2.9 Stripping von Nitrozellulosemembranen

Um die Membran erneut zu nutzen, wurden die gebundenen Antikörper durch *Stripping* entfernt. Hierfür wurde die Membran 30 min bei 37 °C unter Schütteln mit einem Strip-Puffer (Restore Western Blot Stripping Buffer, Pierce, Rockford, USA) inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen und konnte nun zur Hybridisierung eines neuen primären Antikörpers genutzt werden. Alternativ wurde die Membran auch mit frisch angesetztem 0,2 M NaOH für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Auch hier erfolgten vor der erneuten Hybridisierung erst einige Waschstschritte.

2.2.2.10 Dot Blot

Bei einem Dot Blot werden die Proteine zuvor nicht erst durch eine SDS-Gelelektrophorese nach Molekulargewicht separiert, sondern als Mischung direkt auf eine Membran getropft. Diese deutlich schnellere Methode erlaubt allerdings nur eine Aussage über das Vorhandensein oder das Fehlen eines bestimmten Proteins in einer Probe. Dazu wurde 1 µl Probe direkt auf eine Nitrozellulosemembran getropft und 5 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die weiteren Schritte wie Blockierung und Detektion erfolgten analog Western (Immuno-) Blotting (s. 2.2.2.7).

2.2.2.11 Kollagenpräparation aus Zellkulturmedium und Agarose

2.2.2.11.1 Isolierung aus Agarose

Vor einer Kollagenpräparation aus einer Chondrozytenagarosekultur wurden diese nach 14 Tagen in Kultur durch radioaktives ^{14}C Prolin über Nacht markiert. Das Medium und die obere Agaroseschicht mit den Zellen wurde in Zentrifugenröhrchen überführt. Pro Zentrifugenröhrchen wurden 1 mg/ml Pepsin in 0,2 M NaCl; 0,5 M CH_3COOH zugegeben. Bei 4 °C für 72 h wurden die Proteine unter Rühren verdaut, so dass nur noch die tripelhelikalen Bereiche der Kollagene intakt blieben. Zur Inaktivierung des Pepsins wurde die Lösung neutralisiert, indem pro Zentrifugenröhrchen 500 µl 1 M Tris zugegeben wurde. Die Lösung wurde mit 10 M NaOH auf pH 7 eingestellt. Durch Zugabe von 17,5 mg/ml NaCl wurden nun die Kollagene über Nacht bei 4 °C gefällt. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 15000 U/min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Um die Kollagene nun in den Proben zu fällen, wurden 200 mg/ml NaCl zugegeben und es wurde über Nacht bei 4 °C gemischt. Die Proben wurden nun bei 18.500 U/min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das erhaltene Pellet mit den Kollagenen in 300 µl 0,4 M NaCl in 0,1 M Tris-HCl aufgenommen. Zu jeder Probe wurde 900 µl 96 %iges Ethanol zugegeben und über Nacht bei -20 °C die Proteine gefällt. Die Proben wurden bei 14000 U/min für 30 min bei 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in 300 µl Aqua dest. aufgenommen. Den Proben wurden 900 µl 96 %iges Ethanol zugefügt und die Kollagene wurden über Nacht bei 4 °C gefällt. Ein erneutes Zentrifugieren bei 14.000 U/min für 30 min bei 4 °C pelletierte die Kollagene, die nun nach Absaugen des Überstandes und Trocknen in 70 µl Probenpuffer aufgenommen werden konnten. 2 µl der Probe

wurden dann mit 100 µl Aqua dest. und Lumasafe Plus (Perkin Elmer, Groningen, D) in einem Szintillationsgefäß vermischt und die Zählrate mit dem Flüssigszintillationsspektrometer (Beckman, Krefeld, D) bestimmt. Anhand der gemessenen Counts konnte dann gleich viel radioaktiv-markiertes Protein von jeder Probe auf ein Gradienten-SDS-Gel (s. 2.2.2.5) aufgetragen werden.

2.2.2.11.2 Isolierung aus Medium

Zu 1 ml Kulturmedium wurden 10 mg/ml Pepsin in 1 N HCl zugefügt. Für 2 h wurden die Proben bei Raumtemperatur auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde der pH Wert auf 7,0 neutralisiert, indem 70 µl 1 M Tris zugefügt und das Medium mit 1 M NaOH eingestellt wurde. Durch Zugabe von 4,5 M NaCl wurden die Kollagene aus dem Medium über Nacht bei 4 °C gefällt. Die Kollagene wurden durch Zentrifugation bei 14.000 U/min für 30 min bei 4 °C pelletiert. Das Kollagen-Pellet wurde nun in 100 µl Aqua dest. aufgenommen, mit 300 µl eiskaltem, 96 %igem Ethanol versetzt und für mindestens 2 h bei -20 °C gefällt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 14.000 U/min für 30 min bei 4 °C wurde das Pellet auf einem Heizblock bei 95 °C für 5 min getrocknet. Nun wurde das trockene Pellet in 70 µl Probenpuffer aufgenommen. 2 µl der Probe wurden mit 100 µl Aqua dest. und 2 µl Lumasafe versetzt und die Radioaktivität bestimmt (s. 2.2.2.11.1).

2.2.2.12 Autoradiographie

Bei diesem Verfahren wurden die SDS-Gele dreimal für 20 min in DMSO entwässert und 3 h in 20 % (w/v) Diphenyloxazol in DMSO geschwenkt. Dies führte dazu, dass das Diphenyloxazol durch die β -Zerfälle zur Fluoreszenz angeregt und somit die Schwärzung des Films erheblich verstärkt wurde. Abschließend wurden die SDS-Gele für 1 h gewässert und im Geltrockner (Bio-Rad, München, D) zwischen zwei Zellophanfolien getrocknet. Zur Detektion der Signale wurden Röntgenfilme bei -80 °C für 1 - 4 Wochen auf den Gelen exponiert.

2.2.2.13 Bestimmung der Alkalischen Phosphatase

Nach einer modifizierten Methode von Bessey (Bessey *et al.*, 1946) wurde die Aktivität der Alkalischen Phosphatase in den Kulturmedien bestimmt. Hierfür wurde 50 µl Kulturmedium mit 450 µl Reaktionslösung versetzt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Nun wurde die Reaktion mit 500 µl Stopplösung beendet und

photometrisch bei einer Extinktion von 405 nm bestimmt.

Reaktionslösung

p-Nitrophenylphosphat	0,2 % (w/v)
in Diethanolamin-HCl, pH 9,8	1 M

Stopplösung

NaOH	2 M
EDTA	0,2 mM

2.2.3 Zellbiologische Methoden

Falls nicht anders erwähnt wurde als Basismedium Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium mit 4,5 g/l Glukose (Biochrom, Berlin, D) verwendet. Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilbank Mikroflow Biological Safety Carbinet (Nunc, Wiesbaden, D) durchgeführt. Sämtliche nicht käuflich erworbenen Lösungen wurden vor ihrer Verwendung mit einfach deionisiertem Wasser angesetzt und autoklaviert.

2.2.3.1 Präparation von Sterna aus Hühnerembryos

17 Tage bebrütete Hühnereier wurden zuerst mit 75 %igem Ethanol desinfiziert, bevor die Embryos entnommen wurden. Mit sterilen Pinzetten wurde die Haut über der Brust entfernt und das Sternum frei präpariert. Das Sternum wurde nun mit einer Pinzette abgetrennt und in Krebs-Ringer-Puffer mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin gelegt. Nun erfolgte dreimaliges Waschen der gesamten isolierten Sterna, um diese von Geweberesten zu befreien. Die Sterna wurden nun mit einem Skalpell in ihre kranialen und kaudalen Bereiche zerschnitten.

Krebs-Ringer-Puffer, pH 7,4

Na ₂ HPO ₄	15,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,6 mM
NaCl	111,2 mM
KCl	5,4 mM
MgCl ₂	1,3 mM
NaHCO ₃	4 mM
Glukose	13 mM

2.2.3.2 Chondrozytenisolierung

Die kaudalen und kranialen Bereiche des Sternums (s. 2.2.3.1) wurden, um daraus Chondrozyten zu isolieren, in 1 mg/ml bakterieller Kollagenase B in DMEM über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ verdaut. Nun wurden die Zellen im Medium resuspendiert und durch Swinnex-Filter mit drei Lagen Nylonmembran mit einer Porengröße von 100 µm filtriert. Die Zellen wurden bei 600 g für 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dreimal mit serum- und calciumfreiem DMEM ohne Phenolrot gewaschen. Nun wurden die Chondrozyten in calciumhaltigem Chondrozytenmedium (mit Phenolrot) aufgenommen und es wurde die Zellzahl nach Anfärben mit Trypanblau mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Hierzu wurde eine Probe aus der zu zählenden Chondrozytensuspension entnommen und 1 : 1 mit 0,5 % (w/v) Trypanblau in 0,9 g/ml NaCl vermischt. Hierdurch waren die lebenden ungefärbten von den toten gefärbten Zellen gut zu unterscheiden.

Kollagenase-Lösung

DMEM	
Penicillin	100 µg/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Kollagenase B	1 mg/ml
Cystein	1 mM
steril filtriert	

Chondrozytenmedium

DMEM	
Penicillin	100 µg/ml
Streptomycin	100 µg/ml

2.2.3.3 Agarosekultur primärer Chondrozyten

Die Methode der Einbettung von Chondrozyten in Agarose von Benya und Shaffer (Benya und Shaffer, 1982) wurde modifiziert verwendet. Hierzu wurden pro Ansatz 35 mm Zellkulturschalen zunächst einmal mit 0,7 ml 1 %iger (w/v in Aqua dest.) Hochtemperatur (HT)-Agarose vorbereitet. Die Agarose wurde hierbei auf dem Boden der Zellkultur gleichmäßig verteilt und zum Verfestigen im Kühlschrank inkubiert. Nun wurden pro Ansatz 175 µl einer 2 %igen Niedertemperatur (NT)-Agarose (w/v in Aqua dest.) mit 175 µl zweifach DMEM und den Zusätzen β-Aminopropionitril, Natriumpyruvat und Cystein vermischt. Diesem Ansatz wurden noch 350 µl Chondrozytensuspension ($1,5 \times 10^6$ Zellen) (s. 2.2.3.2) zugegeben und auf eine auf 37 °C vorgewärmte, mit HT-Agarose beschichtete 35 mm Kulturschale pipettiert. Während einer Inkubationszeit von 15 - 30 min konnten die Zellen auf die HT-

Agaroseschicht absinken, so dass die Chondrozyten in einer Ebene lagen, was späteres Mikroskopieren erleichterte. Zum Verfestigen der NT-Agarose wurden die Kulturschalen für 15 min bei 4 °C abgekühlt. Nun konnten die Kulturschalen mit den Chondrozyten im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 98 % RH) unter serumfreien Bedingungen inkubiert werden. Am folgenden Tag erfolgte die Zugabe von Ascorbinsäure und eines Stimulans wie Insulin, T4, IGF-1 oder Chymotrypsin. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 - 3 Tage vorgenommen. Hierbei wurde 1 ml Medium mit den Zusätzen Cystein, Natriumpyruvat, Ascorbinsäure und β-Aminopropionitril und dem jeweiligen Stimulans zugegeben.

Nach 14 Tagen Kultivierung wurde den Kulturen ¹⁴C-Prolin (1 µCi/ml) zugegeben. Über Nacht wurden somit die Zellen radioaktiv metabolisch markiert und bis zur Isolierung der Kollagene (s. 2.2.2.11) bei -20 °C eingefroren.

Zusätze

Cystein	1 mM
Natriumpyruvat	1 mM
β-Aminopropionitril	60 µg/ml
Ascorbinsäure	25 µg/ml
steril filtriert	

2.2.3.4 Monolayerkultur von Chondrozyten

Vor der Transfektion der Chondrozyten (s. 2.2.3.5) wurden diese nach der Präparation aus dem Sternum und dem Kollagenase-Verdau für 3 Tage in Monolayer Vorkultur genommen. Hierbei wurden 7,5 x 10⁶ Zellen auf eine 10 cm Kulturschale ausgesät und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 98 % RH inkubiert. Hierzu wurde serumfreies Chondrozytenmedium verwendet.

Sollten transfizierte Chondrozyten zur Immunfluoreszenz verwendet werden, so wurden diese in 35 mm Kulturschalen auf einem Deckgläschen ausgesät. Hierzu wurde ebenfalls ein serumfreies Chondrozytenmedium verwendet. Die Chondrozyten wurden entweder mit Insulin, T4, IGF-1 oder Chymotrypsin stimuliert.

2.2.3.5 Transfektion von Chondrozyten

2.2.3.5.1 Transfektion mit Amaxa

Hierbei handelt es sich um eine Methode, die auf der Elektroporation mit zelltyp-spezifischen Lösungen beruht. Diese Methode erlaubt eine direkte Transfektion der DNA in den Nukleus. Hierfür wurde das Transfektionsprogramm Nummer X05 mit einer humanen Chondrozyten-Lösung verwendet. Diese Methode wurde sowohl zur Überexpression eines Gens in kranialen Chondrozyten mit Plasmid-DNA, als auch für ein *Silencing* eines Gens in kaudalen Chondrozyten mit RNAi-Oligonukleotiden verwendet.

Hierzu wurden die bereits für 3 Tage in Vorkultur ausgesäten Chondrozyten (s. 2.2.3.4) einmal mit PBS gewaschen und dann mit einer Pronase/Kollagenase-Lösung (je 1 mg/ml in DMEM, steril filtriert) zum Ablösen der Zellen inkubiert. Nach Ablösen der Zellen, was bis zu 3 h dauern konnte (ständige Sichtkontrolle), wurden die Zellen bei 600 g für 5 min abzentrifugiert. Nun wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und jeweils bei 600 g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (s. 2.2.3.2). Pro Transfektion wurden 1×10^6 kraniale bzw. kaudale Chondrozyten mit 2 µg Plasmid-DNA bzw. 0,5 µg (10 µl) RNAi-Oligonukleotide mit einem Amaxa-Gerät und dem Programm X05 transfiziert. Sowohl die RNAi als auch die Plasmid-DNA wurden in die Nucleofektor-Zell-Lösung pipettiert und zusammen in eine Küvette des Herstellers überführt. Nun wurden die Zellen mit dem Programm Nummer X05 transfiziert. Direkt nach der Transfektion wurden die Zellen in 500 µl vorgewärmtem DMEM mit 10 % FKS aufgenommen. Die Zellen wurden dann in dem FKS-haltigen Medium für 30 min bei 37 °C bei 5 % CO₂ inkubiert, danach wurden die Zellen zentrifugiert und das Medium durch FKS-freies Medium ersetzt. Nachdem sich die Zellen nun erholen konnten, wurden sie ein zweites Mal mit einer Neubauer Zählkammer gezählt. 1×10^6 Zellen wurden nun in einer 35 mm Kulturschale in Agarose eingebettet (s. 2.2.3.3) oder auf Deckgläschen für Immunfluoreszenzen (s. 2.2.3.6) ausgesät. Die Zellen wurden nun 14 Tage in Kultur gehalten, wobei alle 2 - 3 Tage ein Mediumwechsel stattfand. Es wurden bei den kranialen Zellen sowohl stimulierte Zellen als auch nicht-stimulierte Zellen parallel in Kultur gehalten. Kaudale Zellen wurden mit Chymotrypsin und T4 und kraniale Zellen mit T4 oder Insulin oder IGF-1 stimuliert. Bei RNAi-transfizierten

Zellen wurden zusätzlich noch Suspensionskulturen auf Agarose für 1 - 4 Tage mitgeführt, um mittels RNA-Isolierung und anschließender *One-Step* PCR (s. 2.2.1.23) den *Knockdown* zu überprüfen. Nach 14 Tagen in Kultur wurden die Zellen mit ^{14}C -Prolin (1 $\mu\text{Ci/ml}$) über Nacht markiert (s. 2.2.3.3) und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Kollagenpräparation (s. 2.2.2.11) gelagert.

RNAi-Oligonukleotide

X51486_stealth_995	GCAUGAAGUGGAACCAGGAUAUCUA	NFIA-1 spezifisch
X51486_stealth_1585	UGUUGAGGGGAUAUUUACAAAGCUUG	erkennt auch NFIA, NFIA-1, NFIA-5, NFIA-6

Stimulans		10 x PBS	
T4	25 ng/ml	NaCl	137 mM
Insulin	100 ng/ml	KCl	2,7 mM
IGF-1	100 ng/ml	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	4,3 mM
Chymotrypsin	100 $\mu\text{g/ml}$	KH_2PO_4	1,4 mM

2.2.3.5.2 Transfektion mit Fugene

Eine andere Methode zur Transfektion der Chondrozyten wurde mit Fugene 6, einem nicht-liposomalen Lipidtransfektionsreagenz, nach Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim, D) durchgeführt. Es wurden die Verhältnisse 3 : 1, 3 : 2 und 6 : 1 Fugene (μl) zu DNA (μg) verwendet. Zuvor wurde aber erst Fugene ad 100 μl Opti-MEM (Invitrogen, Karlsruhe, D) pipettiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde die Plasmid-DNA zugegeben und für bis zu 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde diese Mischung unter Schwenken einer 60 - 80 % konfluenten Monolayerkultur (s. 2.2.3.4) zugeträufelt. Am folgenden Tag wurde ein Mediumwechsel vorgenommen und das Transfektionsreagenz entfernt. Nach unterschiedlicher Kulturdauer wurde anhand von mitkultivierten Deckgläschen durch Immunfluoreszenzen (s. 2.2.3.6) die Transfektion überprüft.

2.2.3.6 Immunfluoreszenzen von Chondrozyten

Erfolgreiche Transfektionen primärer Chondrozyten mit dem Plasmid pCMV-Tag-4A-NFIA-1 konnten durch einen im 3'-terminalen Bereich der *multiple cloning site* codierten Flag-Tag nachgewiesen werden. Hierzu wurde als Primärantikörper ein Anti-Flag-Antikörper (s. 2.1.4.1) gewählt.

Transfizierte Chondrozyten (s. 2.2.3.5) wurden für 24 - 72 h in 35 mm Kulturschalen auf Deckgläschen kultiviert (s. 2.2.3.4). Nun wurden die Deckgläschen mit der bewachsenen Seite nach oben in eine neue 35 mm Kulturschale überführt. Dort wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS gewaschen und für 5 min in 3 % PFA in PBS fixiert. Danach erfolgte ein erneuter dreimaliger Waschschrift. Anschließend wurden die Zellen permeabilisiert, indem die Deckgläschen für 5 min in 0,5 % Triton X-100 (v/v) in PBS inkubiert wurden. Das Blockieren der Zellen erfolgte durch Inkubation für 15 min mit 1 %igem Ziegen Serum in PBS. Nun wurde der erste Antikörper bei 37 °C für 45 min auf den Zellen inkubiert. Dabei wurden die verdünnten Antikörper auf Parafilm pipettiert und die Deckgläschen mit der bewachsenen Seite nach unten in den Tropfen (Volumen des Tropfens 40 µl) gelegt. Nun erfolgte ein weiterer dreimaliger Waschschrift für je 15 min mit PBS. Bei der Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurde wie beim ersten Antikörper verfahren (37 °C, 45 min), nur dass hier zusätzlich die Inkubation in einer dunklen Kammer durchgeführt wurde. Je nach Antikörper wurden unterschiedliche Verdünnungen in 1 % Ziegen Serum eingesetzt (s. 2.1.4). Es folgte einer weiterer Waschschrift (3 x 15 min mit PBS) und gegebenenfalls wurde noch eine Kernfärbung mit Propidiumiodid (Verdünnung 1 : 5000 PI in 1 % PBS, 10 min bei Raumtemperatur) durchgeführt. Hiernach folgten erneute Waschschriffe (3 x 5 min mit PBS). Abschließend wurden die Deckgläschen mit der bewachsenen Seite nach unten in 20 µl Fluoromount G auf Objektträgern blasenfrei eingedeckelt. Bis zur Betrachtung der Zellen unter einem konfokalen Lasermikroskop (Eclipse E600, Nikon, Düsseldorf, D) wurden diese abgedunkelt bei 4 °C aufbewahrt.

3 % (w/v) Paraformaldehyd, pH 7,4
in PBS

1 % (v/v) Ziegen Serum
in PBS

2.2.3.7 Monolayerkultur von DF1 Zellen

Bei diesen primären, embryonalen Hühnerfibroblasten (American Tissue Culture Collection ATCC Nr. CRL-12203) handelt es sich um spontan immortalisierte Hühnerzellen, die aus 10 Tage alten *East Lansing Line* (ELL-0) Eiern stammen. Diese Zelllinie eignet sich zur Herstellung von RCASBP(A)-Viren (s. 2.2.3.10, 2.2.3.11).

Die DF1 Zellen wurden in beschichteten 80 cm² Zellkulturflaschen (Nunc, Wiesbaden, D) ausgesät und bei 39 °C, 5 % CO₂ und 98 % RH bis zu einer Kulturdichten von 80 % kultiviert. Dann wurde der konfluente Zellrasen kurz mit PBS gewaschen und zum Ablösen anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 2 min inkubiert. Mit 8 ml des DF1-Mediums wurden die Zellen vom Zellkulturflaschenboden ab gespült und dann für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 10 ml DF1-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in einer Verdünnung von 1 : 10 ausgesät. Eine solche Zellpassage erfolgte alle 3 - 4 Tage.

DF1-Medium	ml	%
FKS	50	10
Pen/Strep	5	1
ad 500 ml DMEM		

2.2.3.8 Kokultivierung von Chondrozyten und DF1/CEF Zellen

Bei einer Kokultivierung wurden die DF1 oder CEF Zellen zunächst einmal als Monolayerkultur wie in 2.2.3.7 bis zu einer Konfluenz von 60 % in 35 mm Kulturschalen herangezogen. Die Chondrozyten wurden wie unter 2.2.3.3 beschrieben in Agarose eingebettet. Die DF1/CEF Zellen wurden durch Zugabe von RCASBP(A)-Viren (3×10^8 Virus/ml) infiziert und für 24 h bei 39 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Mit einem sterilen Spatel wurde nun die Agaroseschicht mit den Chondrozyten aus einer 35 mm Kulturschale entnommen und auf die infizierten DF1/CEF Zellen umgebettet. Nun waren die RCASBP(A)-Viren in der Lage, die Chondrozyten in der Agaroseschicht zu infizieren. Hierbei wurden sowohl kraniale Chondrozyten, Chondrozyten in Kokultur mit DF1/CEF Zellen und Chondrozyten in Kokultur mit RCASBP(A)NFIA-1StepII-infizierten DF1/CEF Zellen mit und ohne

Stimulans kultiviert. Nach 14 Tagen Kultivierung wurden die Zellen mit ^{14}C -Prolin über Nacht radioaktiv metabolisch markiert. Bis zur Kollagenpräparation wurden die Kulturschalen (s. 2.2.2.11) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.3.9 Herstellung primärer CEF Zellen

CEF Zellen sind embryonale Fibroblasten des Huhns. Diese primären Zellen wurden aus 10 Tage alten Hühnerembryos hergestellt. Hierfür wurden zunächst die Embryos steril aus den Eiern (SPF-Eier: *specific pathogen free*) entnommen und nach Entfernen von Kopf, Beinen, Flügel und Eingeweide mit PBS gewaschen. Nun wurde das restliche Gewebe mit einer sterilen Pinzette zerkleinert. Durch Auf- und Abpipettieren mit einer 5 ml Pipette wurde das Gewebe weiter mechanisch zerlegt. Nun wurden noch 10 ml Trypsin/EDTA und einige Tropfen DNase I zugefügt und unter leichtem Rühren für 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Dann wurden weitere 10 ml Trypsin/EDTA zugegeben und ein weiteres Mal unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt. Nach der letzten Inkubation wurde das Zellhomogenisat in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und mit CEF-Medium auf 50 ml aufgefüllt. Das Zellhomogenisat wurde nun bei 800 rpm für 7 min zentrifugiert und das Pellet in 50 ml CEF-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nun in 15 cm Zellkulturschalen überführt und bei $39\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel und nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Bei der Passage der Zellen wurde eine 15 cm Zellkulturschale auf fünf neue Schalen aufgeteilt. Nach Erreichen einer 80 %igen Konfluenz wurden alle Zellen vereinigt und in Aliquots (1 Schale pro Aliquot) eingefroren. Beim Weiterführen einer Zellkulturschale wurde diese alle 2 - 3 Tage in einem Verhältnis von 1 : 2 passagiert.

CEF-Medium	%
Pen/Strep	1
FKS	10
HS	2
ad 500 ml DMEM	

2.2.3.10 Transfektion von DF1 Zellen mit RCASBP(A)NFIA-1StreptII-Vektor

Vor der Transfektion wurden DF1 Zellen auf 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Bei einer Kulturdichte von 60 % wurden die Zellen mit dem RCASBP(A)NFIA-1-Plasmid transfiziert. Für die Transfektion wurde das liposomale Transfektionsreagenz Dosper (Roche, Mannheim, D) gewählt. Dieses kationische Reagenz interagiert spontan mit der Plasmid-DNA, wodurch liposomale/polynukleotide Komplexe entstehen, die in der Lage sind, eukaryotische Zellen zu transfizieren. Für die Transfektion wurden 7 µg Plasmid-DNA eingesetzt und im HBS-Medium zu einem Endvolumen von 250 µl verdünnt. Separat wurden auch 20 µl Dosper in einem Endvolumen von 250 µl HBS-Medium verdünnt. Anschließend wurden beide Lösungen vereinigt, vermischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium auf der zu 60 % konfluenten Zellkulturschale wurde entfernt und 3 ml Eagle-Medium mit 2 % FKS zugeben. Hier wurde nun das Transfektionsgemisch tröpfchenweise zugegeben und durch langsames Schwenken vermischt. Nun wurden die Zellen mit dem Transfektionsgemisch für 5 h bei 39 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde das Medium mit dem Transfektionsgemisch entfernt und es wurden 5 ml EBM + H-Medium zugegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium verworfen, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und 8 ml frisches EBM + H-Medium zugeführt. Am vierten Tag wurden die Zellen von der 10 cm Zellkulturschale abgelöst und in eine 175 cm² Zellkulturflasche überführt. Am sechsten Tag wurden die Zellen nun von der 175 cm² Zellkulturflasche gelöst und in zwei neue 175 cm² Zellkulturflaschen aufgesplittet. Am achten Tag wurden die Zellen jeweils einer 175 cm² Zellkulturflasche auf drei neue 175 cm² Zellkulturflaschen gesplittet. Am elften Tag wurde ein Mediumwechsel vorgenommen und das Erntemedium EBM + H 1 : 10 verdünnt auf die Zellen gegeben. Am zwölften Tag wurde das Erntemedium mit den Viren abgenommen, in 50 ml Falconröhrchen gesammelt und bei -80 °C gelagert. Frisches Erntemedium wurde den Zellen zugegeben. Am dreizehnten und vierzehnten Tag wurde ebenso verfahren.

HBS, pH 7	mol/l	g
NaCl	1,37	8
KCl	0,00429	0,032
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,000758	0,0135
Dextrose/ D-Glucose	0,00555	0,1
HEPES	0,0192	0,5
ad 100 ml ddH ₂ O		
steril filtriert durch 0,22 µm Filter		

Aminosäure-Lösung B	mol/l	g
L-Methionin	0,010	1,5
L-Phenylalanin	0,019	3,15
L-Alanin	0,0056	0,5
Glycin	0,1132	8,5
L-Threonin	0,0357	4,25
L-Isoleucin	0,04	5,25
L-Prolin	0,01086	1,25
L-Valin	0,0354	4,15
L-Asparaginsäure	0,0113	1,5
L-Glutaminsäure	0,022	3,25

ad 1 l ddH₂O; bei 60 °C mischen; aliquotieren; lagern bei -20 °C

Biotin-Lösung A

Biotin 0,000409 mol/l 100 mg
ad 1 l ddH₂O; aliquotieren; lagern bei -20 °C

Hypoxanthin-Lösung, pH 7,3

Hypoxanthin 0,0184 mol/l 25 mg
steril filtrieren, lagern bei 4 °C

EBM + H-Medium	%	ml	Eagle-Medium	ml
Eagle Medium		450	DMEM	500
FKS (fötale Kälberserum)	6,4	32	Biotin-Lösung A	0,5
HS (Hühnerserum)	1,6	8	Aminosäure-Lösung B	10
HEPES	2	10	Hypoxantin-Lösung	6,25
Pen/Strep	1	5	Gesamtvolumen	516,75
Gesamtvolumen		505		

2.2.3.11 Aufkonzentrierung der Retroviren RCASBP(A)NFIA-1StrepII

Die geernteten RCASBP(A)-Viren wurden im Medium langsam bei 4 °C aufgetaut und mit Hilfe eines 500 ml Stericup-HV 0,45 µm (Millipore Schwalbach, D) filtriert. Nun wurden die Viren bei 100.000 g in einem Ausschwingrotor JS-24 Beckman (Krefeld, D) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und erneut Medium mit RCASBP(A)-Viren in eins der vier bereits verwendeten Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert. Dies wurde solange durchgeführt bis die Viren des gesamten Mediums abzentrifugiert waren. Am Ende wurde das Virenpellet in 10 µl frischen DMEM ohne Zusätze aufgenommen. Die 10 µl DMEM wurden in die anderen Zentrifugenröhrchen überführt und die Virenpellets darin resuspendiert und am Ende erhielt man ungefähr 200 µl eines Virusstocks in DMEM. Die Viren wurden nun in 10 µl Aliquots, bei -80 °C gelagert und nur einmalig zum Gebrauch aufgetaut.

2.2.3.12 Titration der Retroviren RCASBP(A)NFIA-1StrepII

Hierzu wurden DF1 Zellen in einer 10 cm-Zellkulturschale bis zur Konfluenz herangezogen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die DF1 Zellen durch Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA abgelöst und bei 1000 rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde nun in 6 ml EBM + H-Medium aufgenommen und in einer 12 well-Platte ausgesät. Dafür wurde 800 µl EBM + H-Medium vorgelegt und dann 50 µl der Zellsuspension zu pipettiert. Nach meist 24 h Inkubationszeit waren die Zellen 50 - 70 % konfluent und wurden mit RCASBP(A)NFIA-1StrepII-Viren in einer Verdünnungsreihe von 10^{-1} - 10^{-10} infiziert. Zusätzlich wurden auch Zellkulturplatten als Negativkontrolle mitgeführt und nicht mit Virus infiziert. Nach 48 h Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4 % PFA fixiert. Hiernach erfolgte ein dreimaliger Waschschrift mit PBS für jeweils 10 min. Die folgenden Schritte wurden mit den Lösungen aus dem *R.T.U. Vectastain Universal Elite ABC Kit* (Vector Laboratories, CA, USA) durchgeführt. Hierbei wurde die gesteigerte Sensitivität durch die sich bildenden Avidin/biotinylierte Enzym Komplexe ausgenutzt. Freie Bindungsstellen wurden nun mit PBS-T mit 2 % Pferdeserum für 30 min blockiert. Danach wurde der Primärantikörper (gegen virales gag-Protein, AMV-3C2 Überstand, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, USA) 1 : 5 mit Blockierungslösung (PBS-T mit 2 % Pferdeserum) verdünnt, den Zellen zugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für je 10 min wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper aus dem Kit (Pferd gegen

Maus HRP, 1 : 200 in PBS) für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen des Sekundärantikörpers wurden die Zellen nun mit dem ABC-Reagenz aus dem Kit für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach erfolgte ein dreimaliger Waschschrift für je 10 min. Die anschließende Farbreaktion wurde mit dem *DAB Substrate Kit For Peroxidase* (Vector Laboratories, CA, USA) durchgeführt. Hier wurde nach Herstellerangaben vorgefahren. Durch die Verwendung der Nickellösung konnten die infizierten Zellklone mittels einer Grau-Schwarz-Färbung identifiziert werden. Durch Auszählen dieser Zellklone und Multiplikation des Virus-Verdünnungsfaktors konnte der Titer bestimmt werden.

PBS-T

1 x PBS	(s. 2.2.3.5.1)
Tween	0,2 % (v/v)

2.2.3.13 Kryokonservierung von Zellen

Zur langfristigen Lagerung von Zellen wurden diese mit Trypsin/EDTA von einer 75 cm² Zellkulturflasche gelöst und dann in einem Falconröhrchen für 5 min bei 1000 rcf abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml 1 : 1 DMEM/DMSO und 20 % FKS aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Mit Hilfe eines mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälters (Nunc, Langensfeld, D) wurden die Kryoröhrchen langsam auf -80 °C eingefroren. Anschließend wurden die Kryoröhrchen bis zu erneuter Verwendung in einem Stickstofftank gelagert.

Bei einer Rekultivierung der Zellen wurden diese bei 37 °C zügig aufgetaut und in 6 ml DMEM mit 20 % FKS aufgenommen. Die Zellen wurden dann in einer 25 cm² Zellkulturflasche ausgesät. Nach 5 h Inkubation wurde das Medium erneuert, um Reste des DMSO zu entfernen.

2.2.4 Histochemische Färbungen

Histochemische Färbungen wurden sowohl an Knochenschnitten als auch am gesamten Skelett von WT und NFIA-KO Mäusen angewendet, sowie an RCASBP(A)NFIA-1StrepII infizierten Bein- und Flügelanlagen von Hühnerembryos.

Bei den histochemischen Routinefärbungen wurde die Architektur des Gewebes sichtbar gemacht, um dadurch pathologische Veränderungen beurteilen zu können.

Bei den immunhistochemischen Färbungen werden durch Antikörper bestimmte Proteine detektiert, um auf spezifischer Ebene auch hier pathologische Veränderungen beurteilen zu können.

2.2.4.1 Immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten mit DAB

Immunhistochemische Färbungen wurden zur Detektion bestimmter Proteine auf lichtmikroskopischer Ebene an Knochenschnitten der Extremitäten von WT, heterozygoten und NFIA-KO Mäusen durchgeführt.

Freipräparierte Knochen der Vorder- sowie Hinterextremitäten wurden mit 4 %igem Formaldehyd über Nacht bei 4 °C fixiert, dann in PBS 24 h gewaschen und für 1 - 2 Wochen in einer 10 %igen EDTA-Lösung dekalzifiziert. Das Gewebe wurde nun in einer aufsteigenden Ethanolreihe für je 2 - 6 h in 50 %igem, 70 %igem und zweimal in 96 %igem Ethanol entwässert. Für 2 - 6 h wurde das Gewebe nun zweimal in Isopropanol bei 4 °C inkubiert. Zunächst wurde das Gewebe zweimal 6 - 12 h in weichem Paraffin (Applichem, Darmstadt, D) bei 56 °C und dann zweimal in hartem Paraffin bei 60 °C für weitere 6 - 12 h inkubiert. Die Gewebestücke wurden in einen Paraffinblock eingebettet (Rotiplast, Roth, Karlsruhe, D) und konnten dann mit einem Rotationsmikrotom (HM 355, Microm, Walldorf, D) in 5 µm dünne Schnitte geschnitten werden.

Als erstes mussten die Gewebeschnitte entparaffiniert werden. Hierfür wurden sie für 30 min bei 50 °C und dann in Rothihistol (Roth, Karlsruhe, D) zweimal für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte in einer absteigenden Ethanolreihe für je 10 min inkubiert, zweimal in 96 %igem, dann in 70 %igem und 50 %igem Ethanol. Nun wurden die Schnitte noch in Aqua dest. für 10 min und für 5 min in PBS inkubiert. Um die zu detektierenden Antigene zu demaskieren, wurden diese durch enzymatische Verdauung vorbehandelt. Zur Vorbehandlung von Kollagenfärbungen wurden die Schnitte mit 0,05 % Protease XXIV (w/v in PBS) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D), für 10 min bei 37 °C vorbehandelt. Es folgten dreimalige Waschschrte mit PBS für je 5 min. Zusätzlich wurden die Schnitte noch mit 0,1 % Hyaluronidase (w/v in 0,1 M Natriumacetat pH 6) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D), für 90 min bei 37 °C verdaut. Es folgten dreimalige Waschschrte mit PBS für je 5 min. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurde das Gewebe mit 3 % H₂O₂ in Aqua dest. für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurde

für 5 min mit PBS gewaschen. Nun wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert. Hierzu wurde mit einer Blockierlösung (10 % Ziegenserum [v/v] und 5 % [w/v] BSA in PBS) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nun erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers (s. 2.1.4.1) in 10 % Blockierlösung in PBS für 1 h bei 37 °C. Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen für je 5 min mit PBS entfernt. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundäantikörper (s. 2.1.4.2) für 1 h bei 37 °C. Hieran schloss sich ein wiederholter dreimaliger Waschschrift mit PBS für je 5 min an. Anschließend wurde die Substratlösung DAB (*Substrate Staining Kit*, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) auf die Gewebeschnitte zu gegeben. Die einsetzende Farbreaktion erfolgte bei 10 bis maximal 30 min bei Raumtemperatur und wurde durch Waschen mit Aqua dest. gestoppt. Es erfolgte zusätzlich noch eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin (Vektor Laboratories, Burlingame, CA, USA). Hämatoxylin verursacht eine rotbraune Färbung der Zellkerne und wurde nur für maximal 1 min auf den Gewebeschnitten inkubiert. Hiernach wurden die Schnitte in PBS und Leitungswasser gewaschen und durch eine aufsteigende Ethanolreihe mit 50 %igem, 70 %igem und zweimal mit 96 %igem Ethanol für je 5 min entwässert. Nun wurden die Schnitte noch zweimal in Isopropanol und zweimal in Rothihistol für je 5 min inkubiert, bevor sie mit Entellan (Merck, Darmstadt, D) eingedeckelt wurden. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Gewebeschnitte bei 4 °C dunkel gelagert. Die Dokumentation erfolgte an einem BX60-Lichtmikroskop der Firma Olympus BX60 (Hamburg, D) und mittels der *Soft Imaging Software*.

2.2.4.2 Kollagen X-Färbung von Gewebeschnitten mit DAB

Bei der Kollagen X-Färbung wurde das DakoCytomation ARK Animal Research Kit (Hamburg, D) verwendet. Die Entparaffinierung und enzymatische Vorbehandlung der Gewebeschnitte wurden wie unter Punkt 2.2.4.1 beschrieben durchgeführt. Der Primäantikörper wurde durch das Biotinylierungsreagenz markiert. Hierzu wurde der Primäantikörper mit dem Biotinylierungsreagenz für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Blockierungslösung wurde hinzugefügt, wodurch nicht-gebundenes Biotinylierungsreagenz entfernt wurde. Nun wurden die Schnitte mit dem biotinylierten Primäantikörper für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten dreimalige Waschschriffe für je 15 min mit PBS. Danach wurden die Schnitte mit Streptavidin-Peroxidase-Konjugat behandelt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert werden. Anschließend wurde die DAB-Substratlösung in einer 1 : 10

Verdünnung auf die Schnitte gegeben und somit die Farbreaktion gestartet (s. 2.2.4.1). Nach einem Waschschrift mit PBS für 5 min folgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin, die durch Leitungswasser gestoppt wurde. Die Schnitte wurden am Ende noch durch eine aufsteigende Ethanolreihe entwässert und mit Entellan eingedeckelt.

2.2.4.3 Immunfluoreszenzen von Gewebeschnitten

Immunfluoreszenzen von Gewebeschnitten wurden wie zuvor schon die mit DAB gefärbten Schnitte bearbeitet (s. 2.2.4.1). Als erstes erfolgte das Entparaffinieren der Schnitte, die Inkubation durch eine absteigende Ethanolreihe und das Waschen mit Aqua dest. und PBS. Auch hier wurden die Schnitte mit Protease XXIV und Hyaluronidase enzymatisch vorbehandelt. Hiernach erfolgte direkt, ohne die Blockierung der endogenen Peroxidase mit H_2O_2 , die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Blockierlösung (10 % Ziegenserum [v/v] und 5 % [w/v] BSA in PBS) für 2 h bei 37 °C. Nach kurzem Waschen mit PBS wurde mit dem jeweiligen Primärantikörper für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS erfolgte die Inkubation des Sekundärantikörpers für 1 h bei Raumtemperatur. Hiernach wurden die Gewebeschnitte in Fluoromount G SouthernBiotech (Birmingham, USA) eingedeckelt und im Dunkeln bei 4 °C gelagert. Die Betrachtung und Auswertung erfolgte unter einem konfokalen Lasermikroskop (Eclipse E600, Nikon, Düsseldorf, D).

2.2.4.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Mayer (Mayer, 1903)

Bei dieser Routinefärbung wurde das Gewebe so dargestellt, dass die basophilen Zell- und Gewebeanteile durch das Hämatoxylin blauviolett und die azidophilen Bestandteile durch das Eosin rosarot erschienen. Nachdem die Schnitte entparaffiniert wurden (s. 2.2.4.1), wurden diese für 10 min in Mayers Hämatoxylin inkubiert und anschließend dreimal mit Leitungswasser für je 5 min gewaschen. Die Schnitte wurden nun in Eosin für 10 min gefärbt. Durch Abspülen mit Aqua dest. wurde überschüssiges Eosin entfernt. Nun wurden die Schnitte für jeweils 5 min durch eine aufsteigende Ethanolreihe mit 70 %igem und zweimal mit 96 %igem Ethanol gezogen. Anschließend wurden die Schnitte dreimal in Isopropanol und zweimal in Rothihistol für je 5 min inkubiert. Mit Entellan wurden die Schnitte abschließend eingedeckelt.

2.2.4.5 Knochen-Knorpel-Färbung des gesamten Skeletts

Bei dieser Methode wurde das gesamte Skelett von WT, NFIA-KO und heterozygoten Mäuseembryos gefärbt. Durch die Alzianblau- und Alizarinrot-Färbung wird Knorpelgewebe blau und Knochen rot angefärbt. Alle folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler durchgeführt. Als Erstes wurden die Embryos für mindestens eine Woche in 90 %igem Ethanol fixiert, wobei alle 2 - 3 Tage ein Ethanolwechsel stattfand. Vor der Färbung des Skeletts mussten Haut, Leber, Niere und Darm entfernt werden, um eine Hintergrundfärbung so gering wie möglich zu halten. Nun wurden die Embryos drei Tage bei Raumtemperatur in Alzianblau-Lösung (0,01 % (w/v) Alzianblau in 80 % (v/v) Ethanol unter Zusatz von 20 % (v/v) Essigsäure) gefärbt. Anschließend wurden die Embryos durch eine absteigende Ethanolreihe (zweimal 70 %iges, dann 40 %iges und 15 %iges Ethanol sowie Aqua dest.) für je 3 - 5 h rehydriert. Die Embryos wurden nun in frischer 1 %iger KOH-Lösung (dreimal für 3 h) inkubiert, wodurch sie transparent wurden. Nun erfolgte die Färbung mit Alizarinrot-Lösung (0,005 % (w/v) in 1 % (v/v) KOH) für 2 - 3 Tage. Anschließend wurden die Embryos dreimal in 1 % KOH-Lösung für je 3 - 5 h inkubiert. Nun erfolgte eine schrittweise Überführung (20 %, 50 %, 80 % Glycerin in 1 % KOH) der Skelette in eine 100 %ige Glycerinlösung für je 24 h. Die endgültige Lagerung erfolgte in 100 % Glycerin bei Raumtemperatur. Nach Fotografieren der Embryos wurden die Bilder mit dem Programm Image J <http://rsbweb.nih.gov/ij/> ausgewertet.

2.2.5 Embryologische Techniken

Als embryologische Technik wurde die Injektion von RCASBP(A)-Viren in Hühnerembryos angewandt. Für die Infektion von Hühnerembryos mit dem RCASBP(A)-Virus wurden spezifische pathogen-freie (SPF) Valo-Eier von Lohmann Tierzucht GMBH (Cuxhaven, D) bezogen. Vor der Infektion wurden die Eier 1,5 Tage (Stadium 10) bei 38 °C und 45 % Luftfeuchtigkeit bebrütet.

Das 1,5 Tage bebrütete Ei wurde zuvor mit Ethanol abgewischt. Das Ei wurde so ausgerichtet, dass es der Längsachse nach waagrecht lag und sich der Embryo somit nach oben hin absetzen konnte. Nun wurde mit einer Nadel (27, 18 Gauche) ein Loch in das stumpfe flache Ende, wo sich die Luftkammer befindet, gestochen, sowie eins oben in die Längsachse des Eies. Es wurden aus dem ersten Loch

Albumin abgenommen, um das Flüssigkeitsniveau innerhalb des Eies abzusenken und ein Ankleben des Embryos an der Schale zu verhindern. Auf das zweite Loch wurde breites Tesafilm geklebt, wodurch die Schale stabilisiert wurde. Ausgehend von dem zweiten Loch konnte nun ein Fenster in die Schale geschnitten werden, so dass der Embryo sichtbar wurde. Mit zwei feinen Nadeln (Fine Science Tools, Heidelberg, D) wurden vorsichtig die Vitellinmembran und das Amnion eingerissen und entfernt, so dass der gesamte Embryo freigelegt wurde. Mit Hilfe von Mikrokapillaren (Borosilicate Standard Wall with Filament, Clark Capillary Glass, OD 1.0 mm, ID 0.58 mm; Harvard Apparatus, March-Hugstetten, D) die an einem Mikroinjektionssystem angeschlossen waren, wurde das Virus durch Betätigen einer Fußpedale mit 20 psi Druckluft in den rechten Bein- und Flügelanlagen injiziert. Die linken Anlagen wurden nicht infiziert und dienten als Kontrolle. Der Haltedruck wurde auf 5 psi eingestellt, damit durch die Kapillarkräfte kein Albumin in die Mikrokapillare fließen konnte. Nach der Infektion wurden die Eier so ausgerichtet, dass ihre Längsachse waagrecht lag und bis Stadium 21 bebrütet. Schließlich wurden die Bein- und Flügelanlagen immunhistochemisch (s. 2.2.4.3) untersucht.

2.2.6 Tierhaltung und -zucht

Die NFIA-KO Mäuse wurden uns freundlicherweise von Frau Dr. Driller aus Freiburg zur Verfügung gestellt. Die Mäuse wurden in einem gemischten genetischen Hintergrund SV129/C57BL6 gehalten.

Die Tiere wurden in einem Tierstall unter SPF-Bedingungen gehalten und zur Erhaltung des Stammes regelmäßig verpaart. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR aus Schwanzspitzenbiopsien (s. 2.2.1.26).

3 Ergebnisse

In früheren Studien (Auge, 2004) wurde die Methode der suppressiven subtraktiven Hybridisierung angewandt. Mit dieser Methode wurde ermittelt, welche Genprodukte in kaudalen Chondrozyten verstärkt exprimiert werden. Dabei wurden dreizehn Klon-Sequenzen identifiziert, die jeweils eine hohe Homologie zum *Nuclear factor IA*, *Nuclear factor IA-1* und *Nuclear factor IA-2* der Spezies *Homo sapiens*, *Mus musculus* und *Rattus norvegicus* aufwiesen. Da zum Zeitpunkt einer im Jahre 2002 durchgeführten Blast-Analyse das Hühnergenom noch nicht vollständig sequenziert war, wurde eine Homologie zur Spezies Huhn angenommen (s. Abb. 3.1). Es wurde allerdings mittels Huhn-Isoform-spezifischer Primer das Vorhandensein der gesamten NFIA-Mitglieder (Spleißvarianten) festgestellt, sowie eine differentielle Expression des Faktors NFIA-1 in den Zellen nachgewiesen. Aus diesem Grund wurde in einer früheren Arbeit der Transkriptionsfaktor NFIA-1 weiter untersucht (Auge, 2004). Überraschenderweise zeigten die dreizehn Klone nach vollständiger Sequenzierung des Hühnergenoms bei einer erneuten Blast-Analyse im Jahre 2004 keine Homologie zum NFIA-1, sondern eine zum Huhn EST-Klon chEST355d10. In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass es doch einen Zusammenhang des NFIA-1 und des chEST355d10 gibt, da die chEST355d10-Sequenz auf der NFIA-1-mRNA lokalisiert ist (s. 3.2.2).

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des Transkriptionsfaktors NFIA-1 auf die Chondrozytendifferenzierung in Hühnerchondrozyten, Hühnerembryos und NFIA-KO Mäusen untersucht.

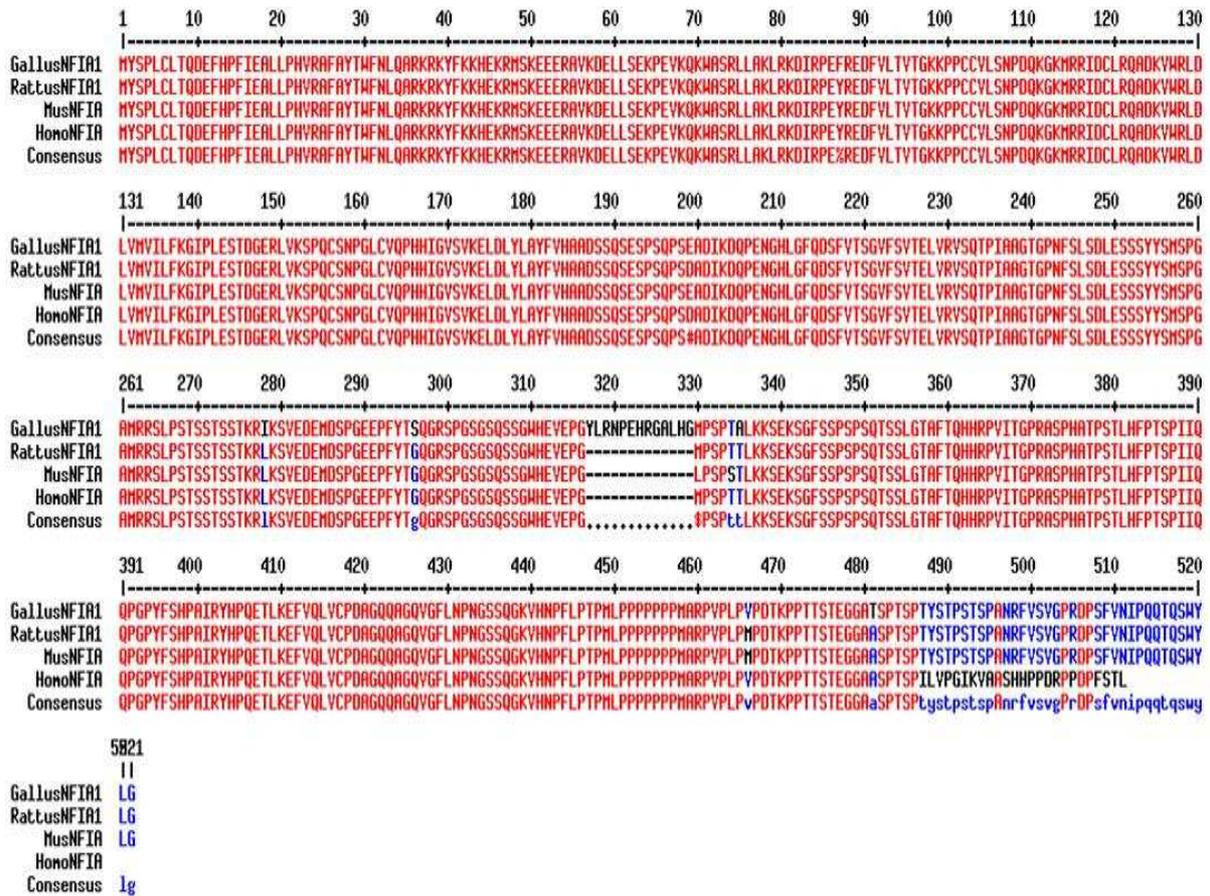


Abb. 3.1: Vergleich der NFIA-Sequenz verschiedener Spezies

Die NFIA-Sequenz von *Homo sapiens* und *Mus musculus* und die NFIA-1-Sequenz von *Rattus norvegicus* und *Gallus gallus* wurde miteinander verglichen. Rot: Sequenzen aller Spezies in diesem Bereich homolog. Blau: Homologie in diesem Bereich bei nicht allen, mindestens aber bei 2 Sequenzen. Schwarz: Sequenz dieser Spezies nicht homolog zu den anderen.

3.1 Expressionsvergleich von NFIA-1/EST355d10 in kaudalen und kranialen Chondrozyten

Um eine erhöhte Expression von NFIA-1 in kaudalen im Vergleich zu kranialen Chondrozyten des Hühnersternums nachzuweisen, wurden die Methoden des Northern Blottings und der semi-quantitativen PCR verwendet. Zusätzlich wurde von Herrn Dr. Echtermeyer eine Real-Time PCR ausgeführt. Zum Expressionsvergleich von kaudalen und kranialen Chondrozyten wurde durch Frau Wurbs außerdem ein Gene Array durchgeführt.

3.1.1 Expressionsvergleich durch Northern Blotting

In einer früheren Arbeit (Auge, 2004) wurden Virtual Northern Blots verwendet, um die Frage der differentiellen Expression von NFIA in kaudalen und kranialen Chondrozyten zu beantworten. Hier konnte nur eine Bande bei 2,1 kb detektiert werden. Allerdings wurden in der Literatur stets zwei Primärtranskripte bei 10,5 und 5 kb beschrieben (Chaudhry *et al.*, 1997), wobei deren Funktion bislang noch nicht identifiziert werden konnte. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit waren diese Primärtranskripte nachzuweisen. Zudem war auf RNA Basis die differentielle Expression zu überprüfen, ohne eine Amplifizierung wie beim Virtual Northern Blot durchführen zu müssen. Aus diesem Grund wurde die differentielle Expression von NFIA in kaudalen und kranialen Chondrozyten mittels Northern Blots mit Gesamt-RNA oder mRNA untersucht.

Die beim Northern Blotting verwendete Sonde, die anhand der NFIA/EST355d10-Sequenz generiert wurde, erkennt beide Primärtranskript (10,5 kb und 5 kb) (s. Abb. 3.2). Zur Auswertung der differentiellen Expression wurden die Signalbanden bei 10,5 kb verwendet. Die Signalbanden bei 5 kb waren aufgrund des hohen Hintergrunds für eine Auswertung nicht geeignet (s. Abb. 3.2). Aufgrund der Sondengröße von 600 bp bei Northern Blots ist diese nicht nur spezifisch gegen NFIA-1, sondern erkennt alle NFIA-Mitglieder.

Nach Auswertung der Signalbanden für NFIA/EST355d10 mit ImageQuant und anschließender Normierung mittels β -Aktin zeigte sich keine signifikant erhöhte Expression in kaudalen Chondrozyten im Vergleich zu kranialen. Es zeigte sich bei NFIA-1/EST355d10 nur eine 1,2- bis 1,3-fach erhöhte Expression in kaudalen gegenüber kranialen Chondrozyten (s. Abb. 3.3).

Mit dieser Methode war somit keine eindeutig differentielle Expression des NFIA/EST355d10 in kaudalen oder kranialen Chondrozyten zu ermitteln.

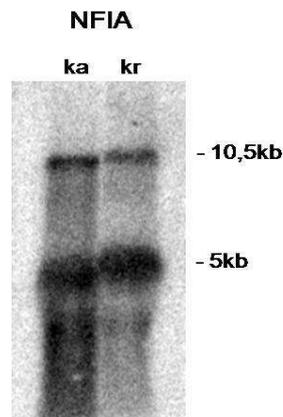
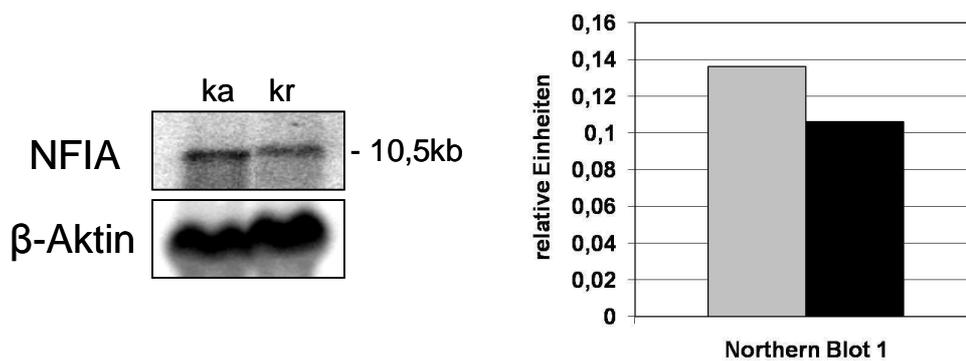


Abb. 3.2: Primärtranskripte des NFIA

Je 20 µg RNA wurden sowohl von kaudalen als auch von kranialen Chondrozyten auf einem denaturierenden RNA-Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit ³²P-dCTP markierten Sonden für NFIA hybridisiert. Bahn 1: ka = RNA aus kaudalen Chondrozyten. Bahn 2: kr = RNA aus kranialen Chondrozyten.

A



B

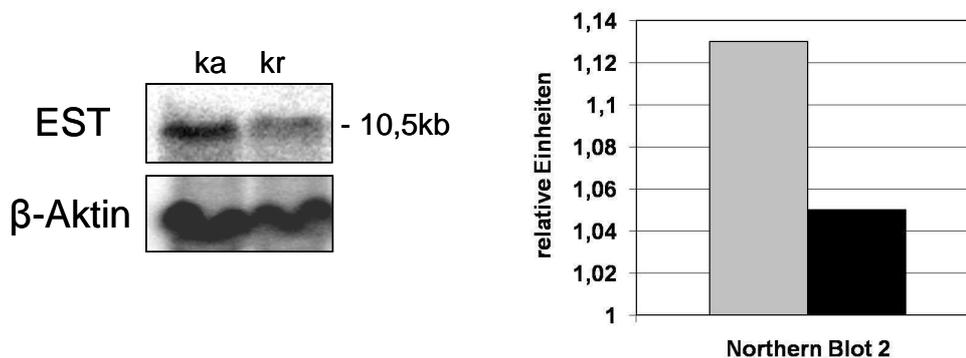


Abb. 3.3: Genexpressionsvergleich durch Northern Blot von NFIA und EST355d10 in kaudalen und kranialen Chondrozyten

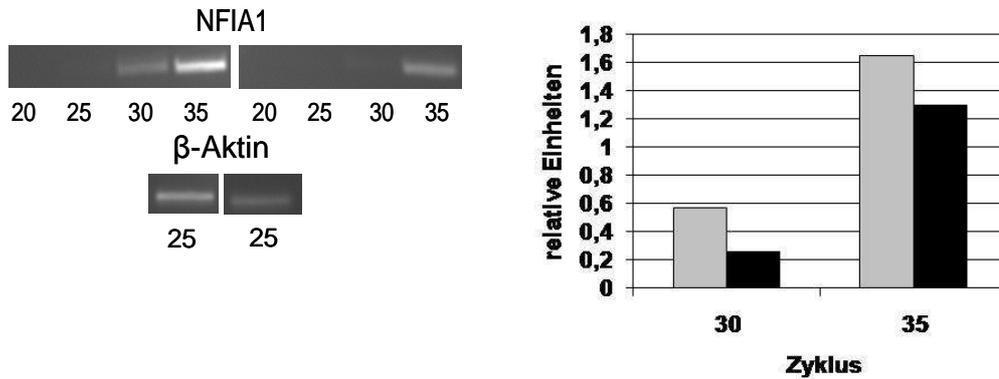
Je 20 µg RNA wurden sowohl von kaudalen als auch von kranialen Chondrozyten auf einem denaturierenden RNA-Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit ³²P-dCTP markierten Sonden für NFIA und EST355d10 hybridisiert. ka: RNA aus kaudalen Chondrozyten. kr: RNA aus kranialen Chondrozyten. Grau: kaudale RNA. Schwarz: kraniale RNA. Northern Blot-Signale wurden densitometrisch analysiert und auf das jeweilige β-Aktin-Niveau normiert.

3.1.2 Expressionsvergleich durch semi-quantitative PCR

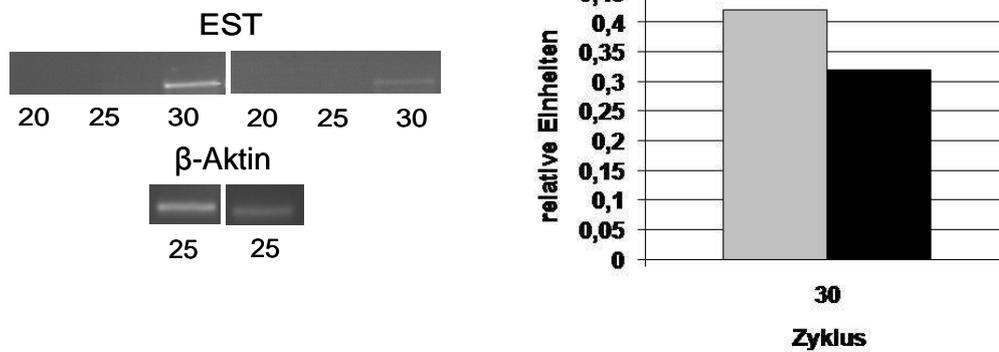
Da mittels Northern Blotting keine signifikant differentielle Expression von NFIA/EST355d10 in kaudalen gegenüber kranialen Chondrozyten zu ermitteln war, wurde als etwas sensitivere Methode die semi-quantitative PCR herangezogen. Mit dieser Methode ist es zudem möglich, spezifisch NFIA-1 nachzuweisen, was aufgrund der Sondenlänge für die Northern Blots nicht möglich war.

Im Gegensatz zum Northern Blotting (s. 3.1.1) konnte hier eine leicht erhöhte Expression in kaudalen Chondrozyten gezeigt werden. Dabei wurde nach 30 Zyklen eine 2,2-fache und nach 35 Zyklen eine 1,3-fache Erhöhung der Expression des NFIA-1 in kaudalen Chondrozyten beobachten (s. Abb. 3.4). Im unter B dargestellten Versuch konnte eine 1,3-fache Erhöhung der Expression von EST355d10 in kaudalen Zellen gezeigt werden. Eine 2,7-fache Erhöhung der EST355d10 Expression zeigte sich unter C. Generell war nach 35 Zyklen schon eine Sättigung der PCR-Banden zu beobachten. Aus diesem Grund wurden keine PCR-Reaktionen nach 35 Zyklen berücksichtigt. Die unter Versuch A ermittelten Ergebnisse nach 35 Zyklen dienen daher nur der Veranschaulichung. Hierbei ist zu erkennen, dass sich die Unterschiede in der Expression von kaudalen und kranialen Chondrozyten im Vergleich nach Zyklus 30 durch eine Sättigung annähern. Da mit dieser Methode die differentielle Expression von NFIA-1 in kaudalen gegenüber kranialen Chondrozyten im Mittelwert nur um 1,9-fach erhöht war, wurde noch eine weitere, sensitivere Methode, die Real-Time PCR, durchgeführt.

A



B



C

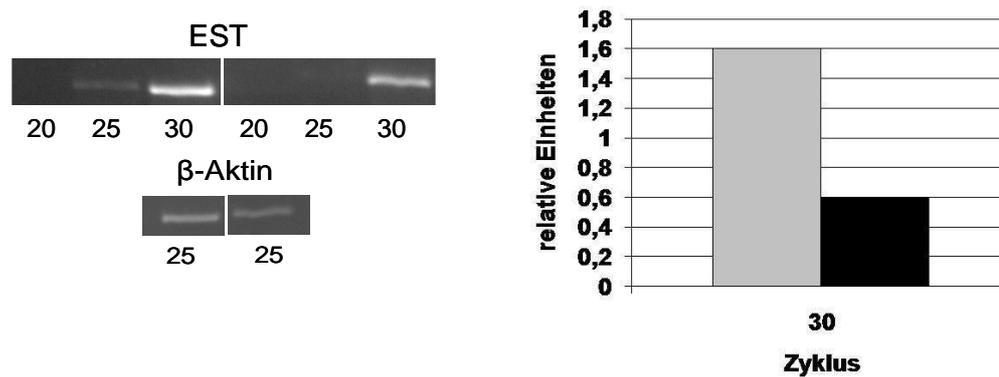


Abb. 3.4: Genexpressionsvergleich durch semi-quantitative PCR von NFIA-1/EST355d10 in kaudalen und kranialen Chondrozyten

Die *One-Step* PCRs wurden mit spezifischen Primern für NFIA-1/EST355d10 durchgeführt. Als interne Kontrolle wurde auch eine β -Aktin-PCR mitgeführt, die NFIA-1/EST355d10-Werte wurden daran normalisiert. Reaktionsgefäße wurden bei den angegebenen Zyklenzahlen entnommen und anhand eines 2%igen Agarosegels analysiert. Signale wurden mit ImageQuant ausgewertet. Grau: Template kaudale RNA. Schwarz: Template kraniale RNA.

3.1.3 Expressionsvergleich durch Real-Time PCR

Um eine erhöhte Expression von NFIA-1 in kaudalen gegenüber kranialen Chondrozyten quantitativ zu untersuchen, wurde eine Real-Time PCR in Kooperation mit Herrn Dr. Echtermeyer durchgeführt. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus kranialen und kaudalen Chondrozyten revers transkribiert. Die erhaltene cDNA wurde mit Hilfe von spezifischen Primern (s. 2.2.1.24) für NFIA-1 in einer Real-Time PCR quantifiziert. Anhand des internen Standards Hypoxanthin-Guaninphosphoribosyltransferase (HPRT) wurden die kaudalen und kranialen Werte normiert. Der kraniale Wert wurde auf 1 festgelegt. In Relation zur NFIA-1-Expression der kranialen Zellen lag die der kaudalen Zellen um 3,63 höher. Hiermit wurde erstmals eine erhöhte Expression des NFIA-1 in kaudalen gegenüber kranialen Chondrozyten bestätigt.

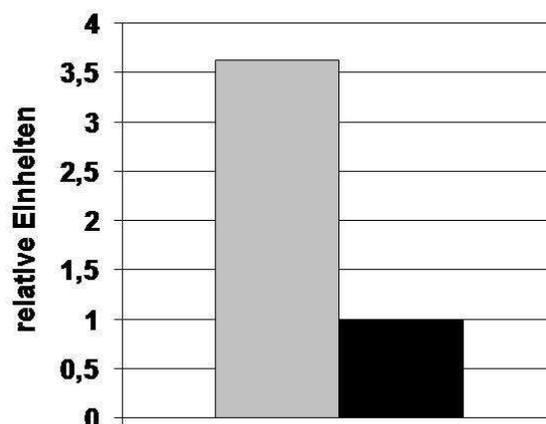


Abb. 3.5: Genexpressionsvergleich durch Real-Time PCR von NFIA-1 in kaudalen und kranialen Chondrozyten

Die Real-Time PCR wurde mit spezifischen Primern für NFIA-1 durchgeführt. Es wurden gleiche Mengen an RNA von kranialen und kaudalen Chondrozyten des Hühnersternums eingesetzt. Die kaudalen und kranialen Werte wurden mittels des internen Standards HPRT normalisiert. Grau: kaudale RNA. Schwarz: kraniale RNA.

3.1.4 Expressionsvergleich durch Gene Array

Anhand von Gene Array-Analysen (durchgeführt von Frau Wurbs) konnte zusätzlich bestätigt werden, dass die Expression von NFIA in kaudalen Chondrozyten des Hühnersternums 2,21-fach erhöht ist. Sie hatte in drei unabhängigen Versuchen die RNA von kranialen und kaudalen Zellen analysiert. Für NFIB konnte in kaudalen Zellen ebenfalls eine deutliche Erhöhung auf RNA-Ebene (3,29-fach) nachgewiesen

werden. Für NFIC und X war hingegen kein Unterschied auf RNA-Ebene zwischen kaudalen und kranialen Zellen zu messen.

Tab. 3.1: Gene Array-Ergebnisse zu NFIA

In drei unabhängigen Versuchen wurde ein Expressionsvergleich von kranialen und kaudalen Chondrozyten des Hühnersternums durch Hybridisierung isolierter RNA auf einen Gene Array durchgeführt (IZKF Münster).

NFIA	kaudal	kranial	kaudal > kranial
Versuch 1	402,9	209	2,21-fach
Versuch 2	349,8	155,6	
Versuch 3	485,1	194,9	

Tab. 3.2: Gene Array-Ergebnisse zu NFIB

In drei unabhängigen Versuchen wurde ein Expressionsvergleich von kranialen und kaudalen Chondrozyten des Hühnersternums durch Hybridisierung isolierter RNA auf einem Gene Array durchgeführt (IZKF Münster).

NFIB	kaudal	kranial	kaudal > kranial
Versuch 1	123,2	47,78	3,29-fach
Versuch 2	127,9	50,06	
Versuch 3	161,4	27,69	

3.2 Identifikation und Vorkommen der NFI-Isoformen in Chondrozyten

Bisher sind sechs verschiedenen Spleißvarianten des NFIA im Huhn beschrieben worden (Kruse und Sippel, 1994a). In kaudalen und kranialen Chondrozyten des Hühnersternums wurden die Spleißvarianten NFIA-1 und NFIA-3 nachgewiesen (Auge, 2004). Hier wurde mittels PCR durch spezifische Primer (s. 2.2.1.24) die NFIA-, B-, C- und X-Isoform in Chondrozyten identifiziert, wobei größere Mengen NFIA- und NFIB-cDNA nachgewiesen wurden.

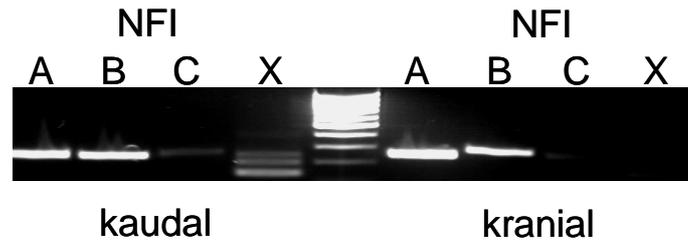


Abb. 3.6: Nachweis von NFI-A, B, C und X in Chondrozyten durch PCR

Bei den PCRs der NFI-Isoformen wurden gleiche Mengen an cDNA von kaudalen und kranialen Chondrozyten eingesetzt. Es wurden spezifische Primer, die alle Spleißvarianten einer Isoform amplifizieren, verwendet. Die PCR Produkte wurden in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt.

3.2.1 Identifikation des EST355d10 auf Chromosom 8 in unmittelbarer Nähe zu NFIA-1

Im Jahre 2002, als das *Gallus gallus*-Genom noch nicht vollständig sequenziert war, zeigten die dreizehn Klon-Sequenzen, die durch die Methode der suppressiven subtraktiven Hybridisierung identifiziert wurden, hohe Homologien zum *Nuclear factor IA*, *Nuclear factor IA-1* und *Nuclear factor IA-2* der Spezies *Homo sapiens*, *Mus musculus* und *Rattus norvegicus*. Als im Jahre 2004 das vollständige Genom des Huhns sequenziert war, zeigte eine erneute Blast search-Analyse aber keine Homologien zum NFIA-1 des Huhns, sondern zu einem EST355d10 (s. unter 3). In dieser Arbeit wurde die genomische Sequenz des NFIA-1 auf dem Chromosom 8 genauer betrachtet. Hier zeigte sich, dass die EST355d10-Sequenz 146 bp von dem 3'-Ende der NFIA-1-Sequenz entfernt lokalisiert ist. Eine Homologie zum NFIA anderer Spezies ist darauf zurück zu führen, dass die in den Datenbanken verfügbaren Sequenzen länger sind, da sie noch einen weiteren Open Reading Frame (ORF) umfassen. In diesem liegen die Homologien der dreizehn Klone wie im Beispiel der *Homo sapiens*-Sequenz zu sehen (s. Abb. 3.7).

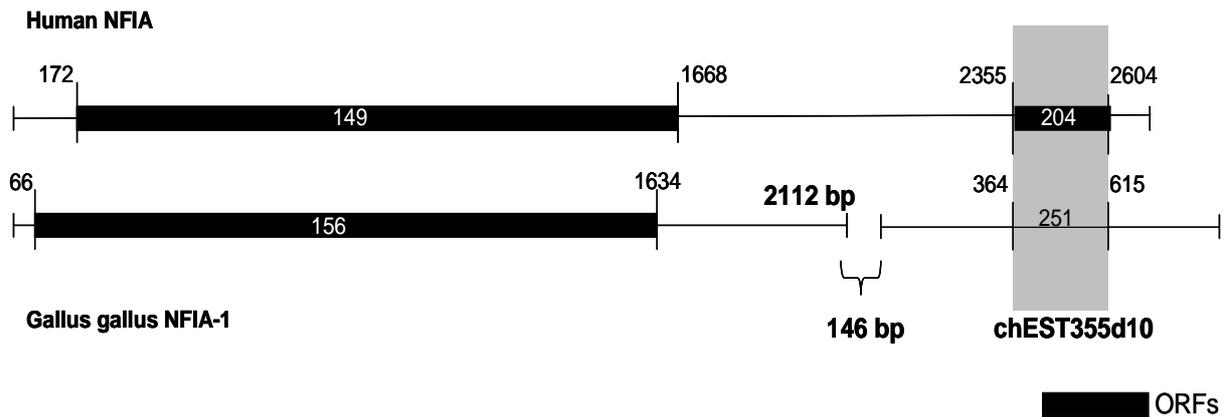


Abb. 3.7: EST355d10-Sequenz in unmittelbarer Nähe zu NFIA-1 auf Chromosom 8

Dargestellt sind die NFIA-Sequenz von *Homo sapiens* und die NFIA-1-Sequenz von *Gallus gallus*. Die schwarzen Balken markieren die ORFs in der Sequenz. Der senkrechte graue Balken zeigt die Lokalisation der 13 Klon-Sequenzen. Die NFIA-1-Sequenz von *Gallus gallus* endet bei 2112 bp, die *Homo sapiens*-Sequenz bei 2604 bp. Der *Gallus gallus*-Sequenz schließt sich die chEST355d10-Sequenz an. Auf dem Chromosom 8 des Huhns folgt am 3'-Ende der NFIA-1-Sequenz die EST355d10-Sequenz nach 146 bp.

3.2.2 Identifikation des EST355d10 auf der NFIA-1-mRNA

Bislang konnte anhand der Chromosom 8-Sequenz des Huhns gezeigt werden, dass EST355d10 und NFIA-1 in unmittelbarer Nachbarschaft liegen. Hier wurde überprüft, ob die EST355d10-Sequenz zusammen mit der NFIA-1-Sequenz transkribiert wird.

Dazu wurde die mRNA (s. 2.2.1.17.1, 2.2.1.19) und die genomische DNA aus Chondrozyten isoliert. Die isolierte mRNA wurde in cDNA revers transkribiert und in einer PCR eingesetzt. Die PCR-Primer wurden so gewählt, dass der 5'-Primer am Ende der NFIA-1-Sequenz und der 3'-Primer in der EST355d10-Sequenz hybridisiert. Das erhaltene PCR-Produkt bestätigte, dass NFIA-1 und EST355d10 auf derselben mRNA liegen. Als Positiv-Kontrolle wurde eine Reaktion mit genomischer DNA durchgeführt. Parallel hierzu wurden außerdem zwei β -Aktin-PCR-Reaktionen mitgeführt. Bei einer Verunreinigung der genomischen DNA mit RNA wäre aufgrund des fehlenden Introns in der RNA-Sequenz eine zweite Bande bei der β -Aktin-PCR sichtbar. Hiermit wurde nachgewiesen, dass die NFIA-1-mRNA-Sequenz in der Blast search-Datenbank für *Gallus gallus* nicht korrekt ist und auch die EST355d10-Sequenz umfasst.

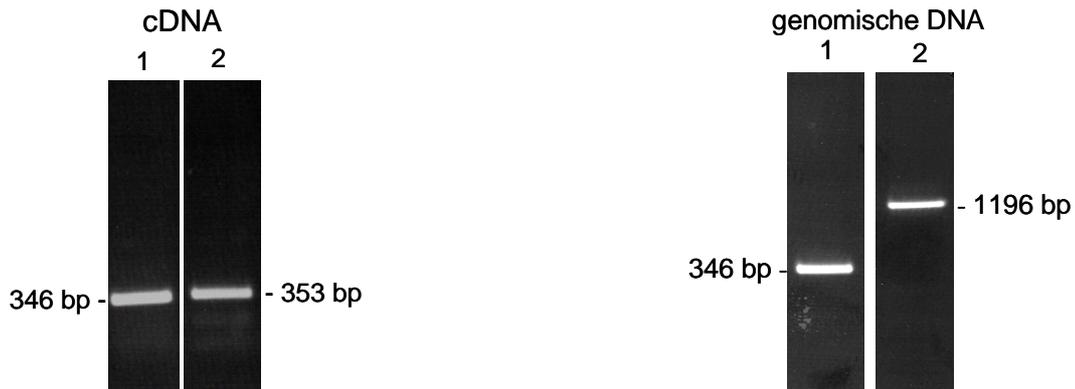


Abb. 3.8: Identifikation des EST355d10 auf der NFIA-1-mRNA

Es wurde ein 5'-Primer in der NFIA-1- und ein 3'-Primer in der EST355d10-Sequenz eingesetzt, hier jeweils in Spur 1 dargestellt. In Spur 2 wurden als Kontroll-PCR β -Aktin-Primer eingesetzt. Als Template wurden sowohl cDNA als auch genomische DNA eingesetzt, um sicherzustellen, dass kein Intron zwischen NFIA-1 und EST355d10 liegt.

3.3 Überexpression von NFIA-1 in kranialen Chondrozyten mittels Elektroporation (nach Amaxa)

In früheren Studien (Auge, 2004) wurde der ORF-Bereich der NFIA-1-Sequenz in einen pCMV-Tag-4A-Vektor (s. 2.1.2) kloniert, der am C-Terminus der *multiple cloning site* eine Sequenz für einen Flag-Tag besitzt. Eine erfolgreiche Expression des Vektors kann daher mit Anti-Flag-Antikörpern (s. 2.1.4) überprüft werden.

Dieser Vektor mit und ohne NFIA-1-Sequenz wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die Transfektion von primären kranialen Chondrozyten des Huhns mittels der Amaxa Methode (s. 2.2.3.5.1) eingesetzt. Hierdurch konnte in kranialen Chondrozyten eine Überexpression des NFIA-1-Gens mit Flag-Tag erreicht werden. Ferner konnten mögliche Effekte auf die Synthese des Kollagen X und der Alkalischen Phosphatase untersucht werden.

In früheren Studien (Auge, 2004) hatte es bereits Transfektionsversuche mit der Amaxa Methode gegeben. Aufgrund der extrem hohen Mortalitätsrate (70 - 80 %) konnte keine Aussage mehr über einen Expressionseffekt getroffen werden. Daher wurde hier eine Optimierung der Bedingungen vorgenommen. Hierzu wurden mit Hilfe des im Kit enthaltenen pmaxFP-Green-C-Vektors eine Vielzahl von Transfektionsprogrammen getestet (s. Abb. 3.9). Eine erfolgreiche Transfektion konnte durch das exprimierte GFP des Vektors unter einem Fluoreszenzmikroskop

detektiert werden, wobei das Programm X05 die höchste Transfektionseffizienz und die geringste Mortalitätsrate aufwies (s. Abb. 3.9 und Abb. 3.10). Aus diesem Grund wurde Programm X05 für alle Überexpression- und *Silencing*-Versuche von NFIA-1 verwendet.

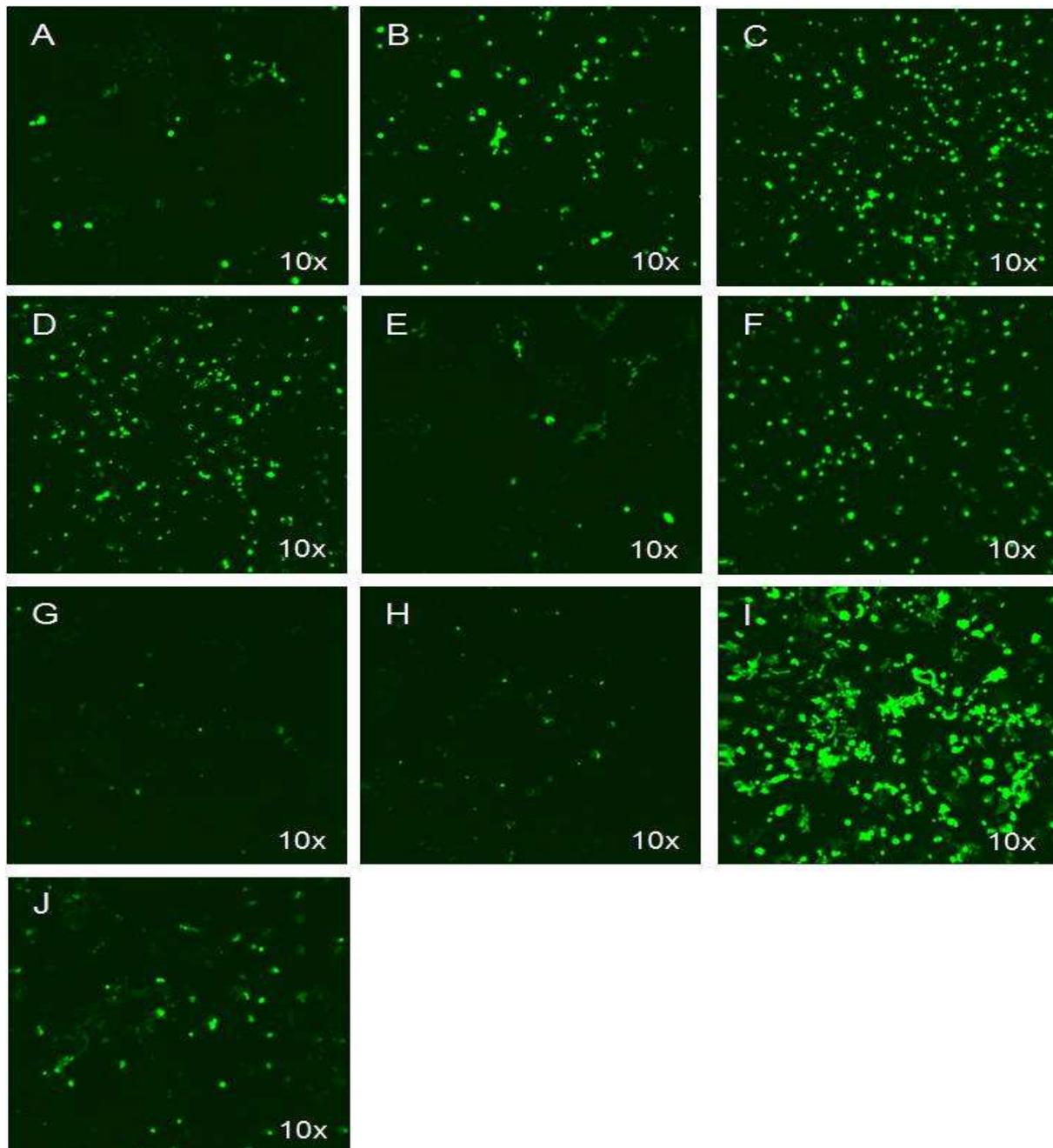


Abb. 3.9: Transfektion der Chondrozyten mit unterschiedlichen Amaxaprogrammen

Getestet wurden für primäre Chondrozyten in Frage kommende Programme. 24 h und 48 h nach Transfektion wurde das GFP des Vektors durch Fluoreszenzmikroskopie bei 10 x Vergrößerung detektiert und analysiert. **A:** Programm A33; **B:** Programm D29; **C:** Programm G04; **D:** Programm T16; **E:** Programm U24; **F:** Programm V01; **G:** Programm V13; **H:** Programm X01; **I:** Programm X05; **J:** Programm Y01.

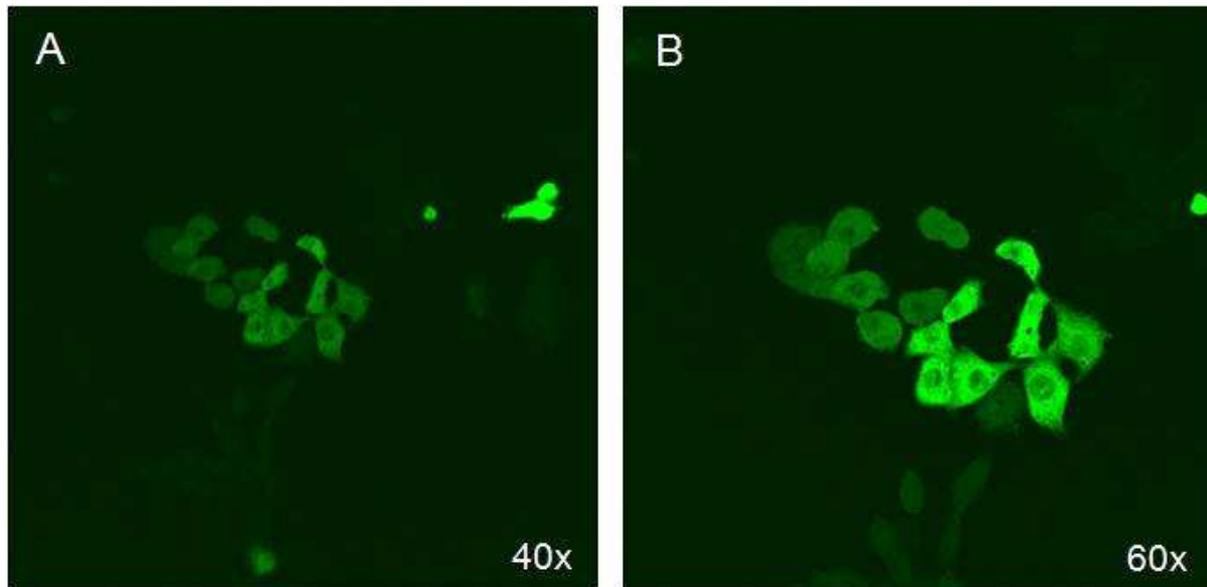


Abb. 3.10: Transfektion der Chondrozyten mit Programm X05

Die mit dem Programm X05 behandelten Chondrozyten wurden durch Fluoreszenzmikroskopie bei 40 x (Bild A) und 60 x (Bild B) Vergrößerung detektiert. Deutlich sichtbar ist das exprimierte GFP im Zytoplasma der Zellen.

Bevor das Transfektionsprogramm X05 für das Amaxa-Gerät zur Verfügung stand, wurde noch eine weitere Transfektionsmethode getestet, das nicht-liposomale Transfektionsreagenz Fugene 6. Hierbei zeigte sich eine höhere Vitalitätsrate der Zellen, aber auch eine sehr niedrige Transfektionsrate. Aus diesem Grund wurde letztendlich die Amaxa-Transfektionsmethode verwendet. Die primären Chondrozyten wurden sowohl mit dem pCMV-Tag-4A-NFIA-1-Vektor als auch mit dem pCMV-Tag-4A-Leervektor transfiziert (s. Abb. 3.11).

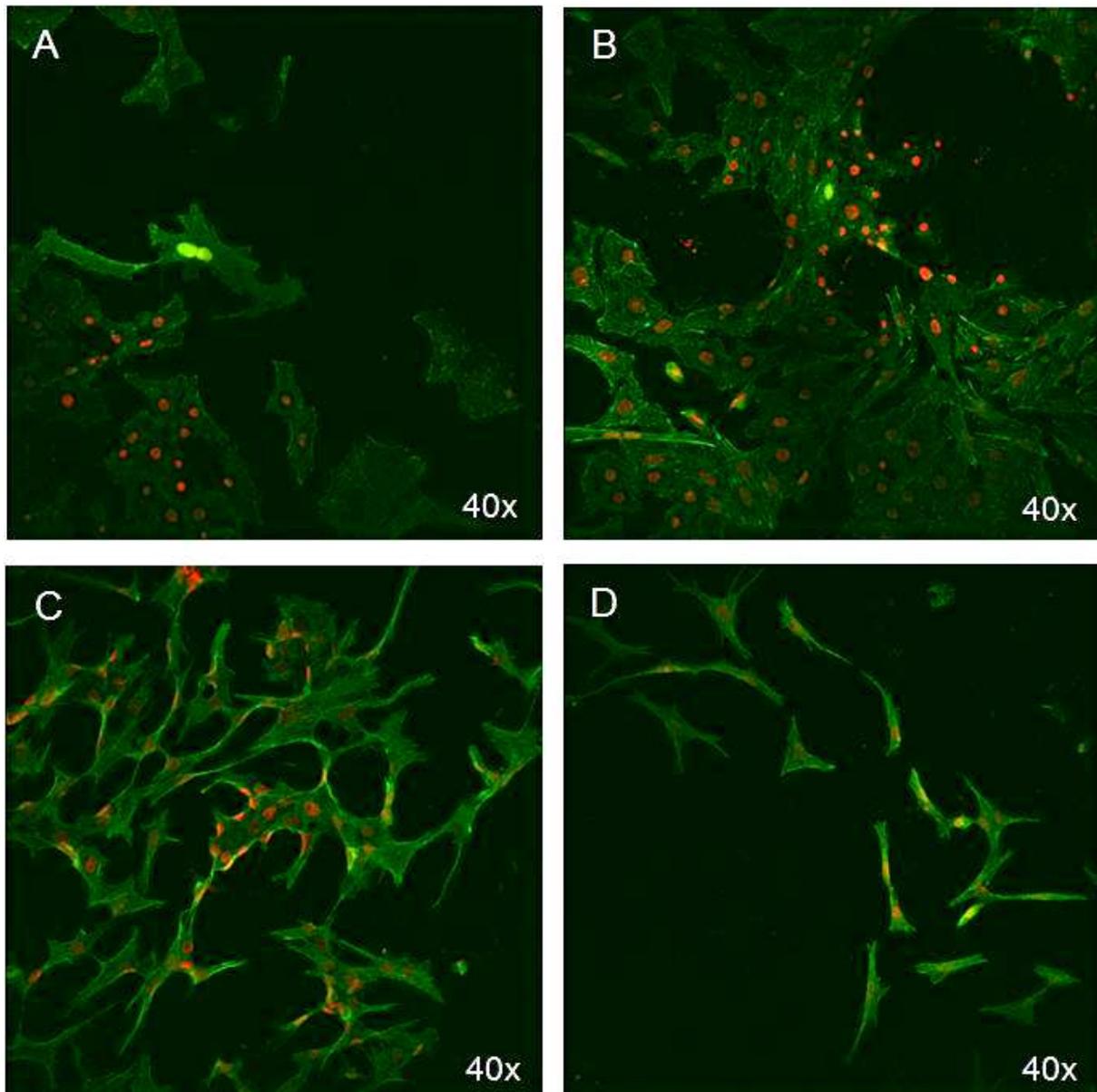


Abb. 3.11: Transfektion mit Fugene 6

Mit dem nicht-liposomalen Transfektionsreagenz Fugene 6 wurden sowohl pCMV-Tag-4A-NFIA-1-Vektor (A und B) als auch der Leervektor pCMV-Tag-4A (C und D) in primäre Chondrozyten transfiziert. Eine erfolgreiche Transfektion des NFIA-1 in den Zellkern ist als grün-gelbliche Fluoreszenz unter dem Mikroskop zu sehen. Zellkerne wurden mit Propidiumiodid angefärbt.

Nach Optimierung der Amaxa Methode wurden nun der pCMV-Tag-4A-NFIA-1-Vektor und der pCMV-Tag-4A-Leervektor in primäre kraniale Chondrozyten mit dem Programm X05 transfiziert. Als Kontrolle eines Effekts auf die Vitalität und auf die Entwicklung wurden auch Zellen nur einer entsprechenden elektrischen Spannung ausgesetzt und anschließend unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Als Charakteristikum von hypertrophen Chondrozyten läßt sich eine Volumenzunahme beobachten (Tschan *et al.*, 1993). Eine solche charakteristische Volumenzunahme

konnte nach 12 Tagen in Kultur gezeigt werden. In den IGF-1-stimulierten Chondrozytenkulturen war eine frühzeitige Hypertrophie zu sehen. Zwischen den transfizierten und den nicht-transfizierten Chondrozytenkulturen war kein Unterschied in der Vitalität oder der Hypertrophierate zu erkennen. Aufgrund dieser morphologischen Ergebnisse wurden die Chondrozyten für Analysen der Kollagen X- und Alkalischen Phosphatase-Synthese herangezogen.

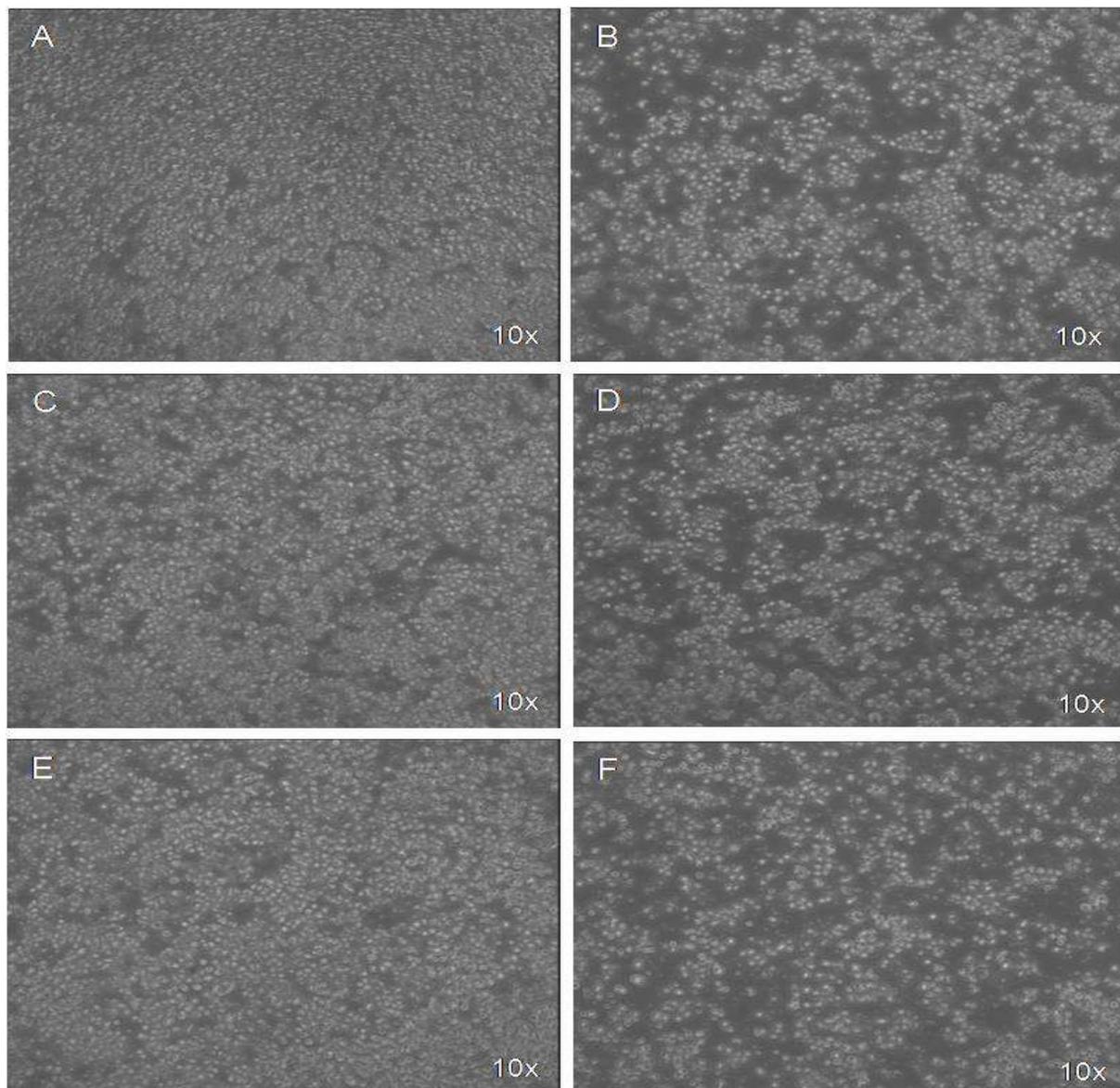


Abb. 3.12: Vitalitätsüberprüfung von kranialen Chondrozyten nach 7d

Chondrozyten wurden mit dem Plasmid pCMV-Tag-4A-NFIA-1 (Bild A: NFIA-1+ und Bild B: NFIA-1-) transfiziert sowie mit dem Leervektor pCMV-Tag-4A (Bild C: pCMV+ und Bild D: pCMV-). Zudem wurden Chondrozyten nicht transfiziert, sondern nur einer den Transfektionsbedingungen entsprechenden Spannung ausgesetzt (Bild E: Leer+ und Bild F: Leer-). +: IGF-1 stimulierte Zellen. -: unstimulierte Zellen.

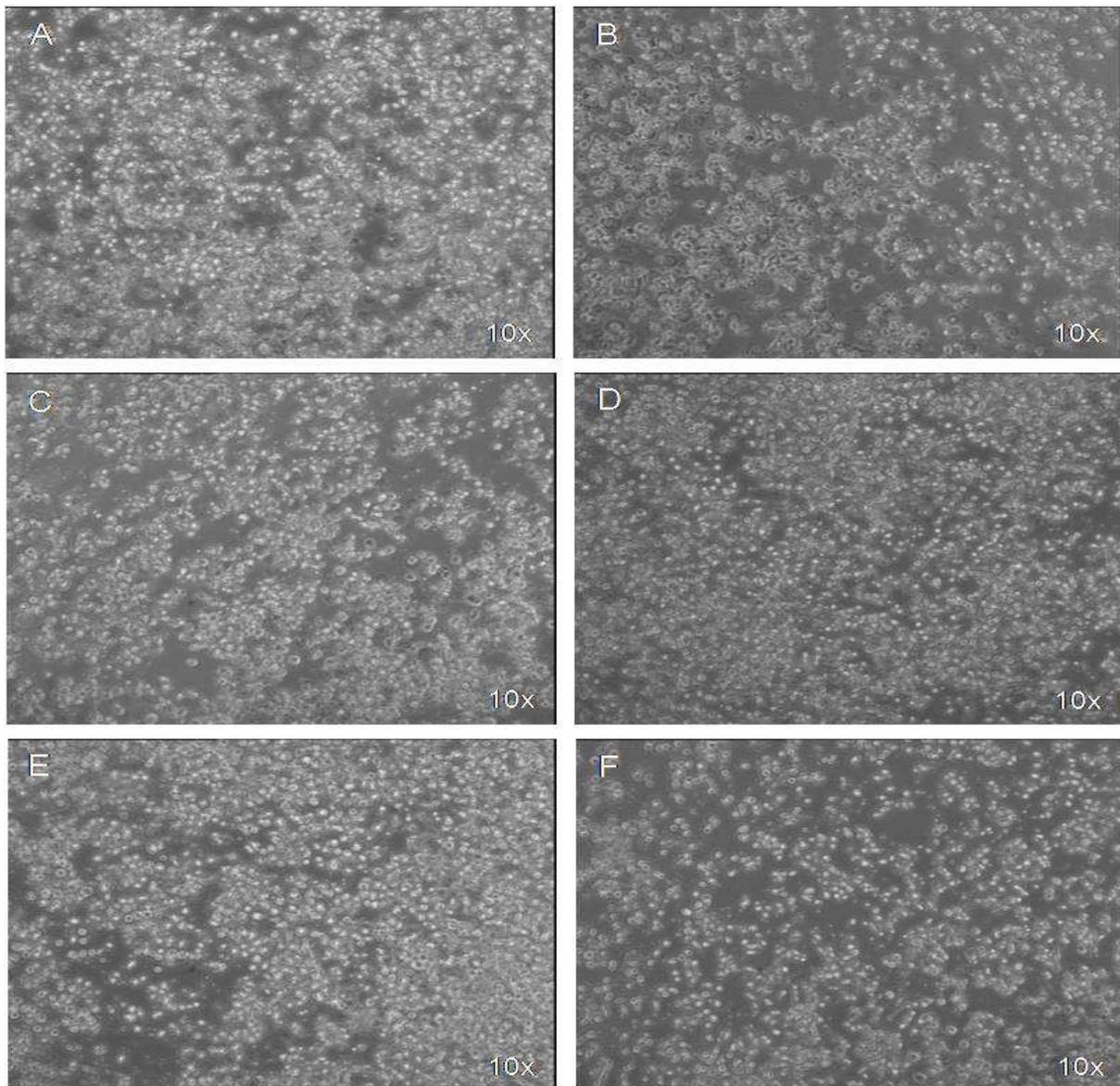


Abb. 3.13: Vitalitätsüberprüfung von kranialen Chondrozyten nach 12d

Chondrozyten wurden mit dem Plasmid pCMV-Tag-4A-NFIA-1 (Bild A: NFIA-1+ und Bild B: NFIA-1-) transfiziert sowie mit dem Leervektor pCMV-Tag-4A (Bild C: pCMV+ und Bild D: pCMV-). Zudem wurden Chondrozyten nicht transfiziert, sondern nur einer den Transfektionsbedingungen entsprechenden Spannung ausgesetzt (Bild E: Leer+ und Bild F: Leer-). +: IGF-1 stimulierte Zellen. -: unstimulierte Zellen.

3.3.1 Kollagensynthese transfizierter Chondrozyten

Da Kollagen X und Alkalische Phosphatase in hypertrophierenden Chondrozyten synthetisiert werden, gelten diese als Hypertrophiemarker. Einen Effekt von NFIA-1 auf die Chondrozytendifferenzierung wurde hier durch eine Kollagenpräparation analysiert. Hierzu wurde NFIA-1 in einigen Kulturen überexprimiert. Da in der Chondrozytendifferenzierung mit zunehmender Kollagen X-Synthese die Kollagen II-

Synthese abnimmt, wurde hier das Verhältnis von Kollagen X zu II ermittelt. Hierbei zeigt ein geringes Kollagen X/II Verhältnis eine niedrige Kollagen X- und eine hohe Kollagen II-Expression, was auf ein noch nicht erreichtes hypertrophes Differenzierungsstadium der Chondrozyten hinweist.

Um eine Kollagen X-Synthese nachweisen zu können, wurden die transfizierten und nicht-transfizierten Chondrozyten 14 Tage in Kultur gehalten und dann radioaktiv mit ^{14}C -Prolin (37 kBp/ml) (s. 2.2.3.3) über Nacht markiert. Anschließend wurden wie unter 2.2.2.11.1 beschrieben die Kollagene isoliert.

Sowohl in Versuch A als auch in Versuch B wurden Chondrozyten entweder mit dem pCMV-Tag-4A-NFIA-1-Vektor oder dem pCMV-Tag-4A-Leervektor transfiziert; alternativ wurden sie einer elektrischen Spannung ausgesetzt. Die so behandelten Kulturen wurden sowohl mit IGF-1 stimuliert als auch nicht stimuliert. Die untransfizierten Chondrozytenkulturen, die nur einer elektrischen Spannung ausgesetzt wurden, dienten als Kontrolle, um bei einem negativen Effekt der Elektroporation auf die Differenzierung der Chondrozyten einen Abgleich mit den transfizierten Kulturen vornehmen zu können.

Der unter A dargestellte Versuch unterscheidet sich von dem unter B dargestellten dadurch, dass in Versuch A das FKS-haltige Medium nicht durch FKS-freies ersetzt wurde (s. 2.2.3.5.1). Somit waren in Versuch A noch Reste des FKS in der Agarosekultur vorhanden. Ein Einfluss der FKS-Reste war anhand der Kollagen X-Expression auch in den nicht-stimulierten Ansätzen zu erkennen (s. Abb. 3.14, A). Um aber kontrollierten Einfluss auf die Differenzierung nehmen zu können, wurde fortan nur noch FKS-freies Medium verwendet und gezielt mit IGF-1 stimuliert. Aus diesem Grund ist in Versuch B nur bei den stimulierten Zellen eine Kollagen X-Expression zu sehen (s. Abb. 3.14, A), wobei bei A durchweg Kollagen X exprimiert wurde (s. Abb. 3.14, B). Nachdem die Signale gemessen wurden, wurde das Verhältnis von Kollagen X zu Kollagen II ermittelt.

Bei Versuch A war sowohl bei den IGF-1-stimulierten als auch nicht-stimulierten Kulturen das niedrigste Kollagen X/II-Verhältnis bei den NFIA-1-transfizierten Zellen zu ermitteln (2,63 und 11), gefolgt von den CMV-transfizierten Zellen (4,51 und 24,74) und den untransfizierten Zellen (6,97 und 16,91) (s. Abb. 3.14, a).

Die Auswertung bei Versuch B ergab bei den IGF-1-stimulierten Kulturen ebenfalls das niedrigste Kollagen X/II-Verhältnis bei den NFIA-1-transfizierten Zellen (37,5),

gefolgt von den CMV-transfizierten Zellen (93,7) und den untransfizierten Zellen (83,2). Bei den nicht-stimulierten Zellen gab es kaum messbare Kollagen X-Signale, so dass hier keine Unterschiede im Kollagen X/II-Verhältnis zu ermitteln waren (s. Abb. 3.14, b).

Trotz des FKS-Restes in Versuch A ist bei beiden Versuchen ein inhibierender Effekt der NFIA-1 Überexpression auf die Kollagen X-Expression zu sehen, was auf einen negativ regulierenden Effekt des NFIA-1 auf die Hypertrophie der Chondrozyten hinweist.

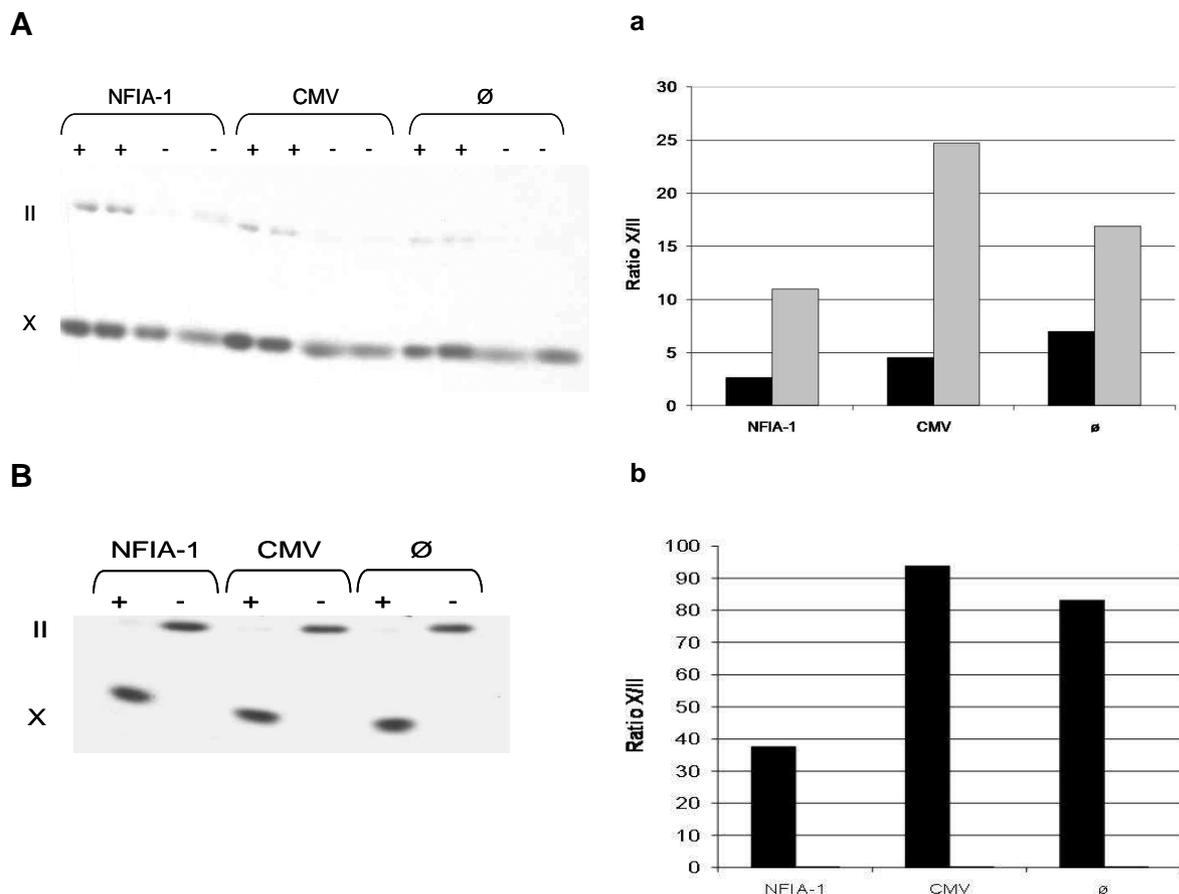


Abb. 3.14: Kollagen-Fluorographie von kultivierten Chondrozyten nach der Transfektion mit pCMV-Tag-4A-NFIA-1 bzw. pCMV-Tag-4A sowie ohne Transfektion

A (Versuch A) und **B** (Versuch B) zeigen jeweils auf der linken Seite ein Autoradiogramm eines SDS-Gradientengels mit den aus dem Versuch stammenden Kollagenproben. Die nebenstehenden Diagramme auf der rechten Seite unter **a** (Versuch A) und **b** (Versuch B) geben das ermittelte Verhältnis der Kollagen X- zur Kollagen II-Produktion an. Die Chondrozyten wurden mit (+) und ohne (-) IGF-1 behandelt. **NFI**: mit pCMV-Tag-4A-NFIA-1 transfiziert; **CMV**: pCMV-Tag-4A transfiziert; **Ø**: untransfiziert, nur einer elektrischen Spannung ausgesetzt. **Schwarz**: IGF-1+. **Grau**: IGF-1 -.

3.3.2 Alkalische Phosphatase-Synthese transfizierter Chondrozyten

Um Unterschiede in der Hypertrophie kultivierter kranialer Chondrozyten in Folge der Überexpression des NFIA-1-Gens festzustellen, wurde die Aktivität der Alkalischen Phosphatase in den Kulturmedien bestimmt. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase nimmt dabei mit steigender Zahl hypertropher Zellen zu.

In der nachfolgenden Abbildung sind unter A und B zwei Versuche dargestellt, die auch bereits unter Punkt 3.3.1 für die Kollagenpräparation herangezogen wurden. Da an mehreren Tagen Medium gesammelt und die Alkalische Phosphatase gemessen wurde, geben die Diagramme die errechneten Mittelwerte der unterschiedlich behandelten Zellen wieder.

In Versuch A (s. Abb. 3.15, A) wurde bei den IGF-1-stimulierten wie auch bei den nicht-stimulierten, NFIA-1-überexprimierenden Zellen die höchste Alkalische Phosphatase-Aktivität (793 und 944) gemessen, gefolgt von den CMV-infizierten Zellen (760 und 476) und von den untransfizierten Zellen (538 und 325).

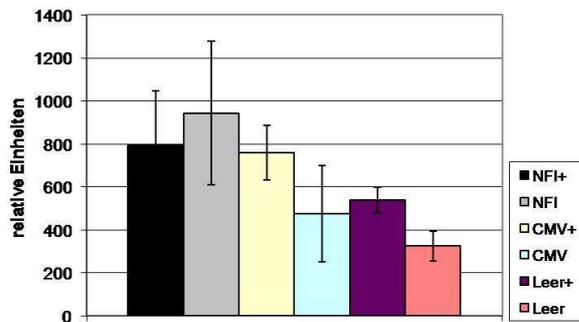
Bei Versuch B (s. Abb. 3.15, B) wurde bei den IGF-1-stimulierten Chondrozytenkulturen die niedrigste Alkalische Phosphatase-Aktivität bei den NFIA-1-überexprimierenden Zellen (32) gemessen, gefolgt von den CMV-infizierten (38) und von den untransfizierten Chondrozyten (51). Bei den nicht-stimulierten Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Alkalischen Phosphatase-Synthese.

In Versuch B ist ein inhibierender Effekt des NFIA-1 in den NFIA-1-überexprimierenden Chondrozytenkulturen zu sehen, aufgrund der hier am niedrigsten gemessenen Alkalischen Phosphatase-Aktivität. Dies weist auf einen negativ regulierenden Effekt des NFIA-1 auf die Hypertrophie der Chondrozyten hin.

Allerdings wird das in Versuch A gefundene Ergebnis durch Versuch B nicht bestätigt. Aufgrund der gegenteiligen Ergebnisse ist eine geringere Vitalität der CMV-transfizierten Zellen und der untransfizierten Zellen nicht auszuschließen. Bei dieser Methode wird lediglich die gleiche Menge an Medium für die Analyse verwendet. Es erfolgte aber kein Abgleich mit der eingesetzten Proteinmenge anhand der *Counts per minute* wie bei der Kollagenpräparation. Aus diesem Grund kann das Medium für die Messung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität auch tote Zellen beinhalten, die keine Alkalische Phosphatase mehr synthetisieren. Bei der Kollagen X-Expression

allerdings, wo ein Abgleich auf die Proteinmenge vorgenommen werden konnte, ist ein inhibierender Effekt des NFIA-1 in NFIA-1-überexprimierten Chondrozyten zu sehen (s. 3.3.1).

A



B

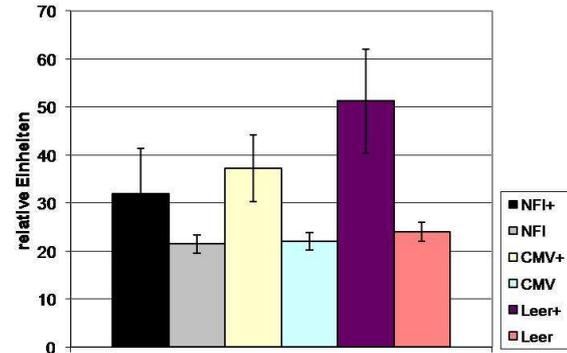


Abb. 3.15: Aktivitätsmessung der Alkalischen Phosphatase der NFIA-1- bzw. CMV-transfizierten Zellen sowie der untransfizierten Zellen

A und **B** zeigen jeweils ein Diagramm mit den Mittelwerten und der Standardabweichung der unterschiedlich behandelten Kulturen. Die Chondrozyten wurden mit (+) und ohne (-) IGF-1 behandelt. **NFI**: mit pCMV-Tag-4A-NFIA-1 transfiziert; **CMV**: pCMV-Tag-4A transfiziert; **ø**: untransfiziert, nur einer elektrischen Spannung ausgesetzt.

3.3.3 Nachweis der Expression von NFIA-1 in transfizierten Chondrozyten

Die erfolgreiche Transfektion und Expression des NFIA-1-Gens in kultivierten Chondrozyten wurde hier durch Immunfluoreszenz nachgewiesen. Neben den Transfektionen mit dem pCMV-Tag-4A-NFIA-1-Vektor wurden auch Transfektionen mit dem Leervektor pCMV-Tag-4A für Immunfluoreszenzen eingesetzt. Bei einer erfolgreichen Transfektion des Leervektors konnte der Flag-Tag des Vektors exprimiert werden. Bei einer erfolgreichen Transfektion des pCMV-Tag-4A-NFIA-1-Vektors wurde zusätzlich noch das NFIA-1-Gen mit dem Flag-Tag exprimiert. Mit Hilfe eines Primärantikörpers gegen den Flag-Tag konnte somit indirekt das NFIA-1-Gen detektiert werden. Eine Grünfärbung weist auf den Flag-Tag hin (s. Abb. 3.16).

Die Immunfluoreszenzen der NFIA-1-transfizierten Chondrozyten zeigten eine erfolgreiche Transfektion aufgrund der gelblich fluoreszierenden Zellkerne (s. Abb. 3.16, A-C), da der Wirkungsort des Transkriptionsfaktors im Zellkern liegt. Diese Gelbfärbung kommt durch die Überlagerung der Grünfärbung des Flag-Tags und der

Rotfärbung des Zellkerns durch Propidiumiodid zustande.

Die erfolgreiche Transfektion des pCMV-Tag-4A-Leervektors ist an der Grünfärbung im Zytoplasma zu erkennen (s. Abb. 3.16, D), dabei kommt es aber zu keiner Färbung im Zellkern.

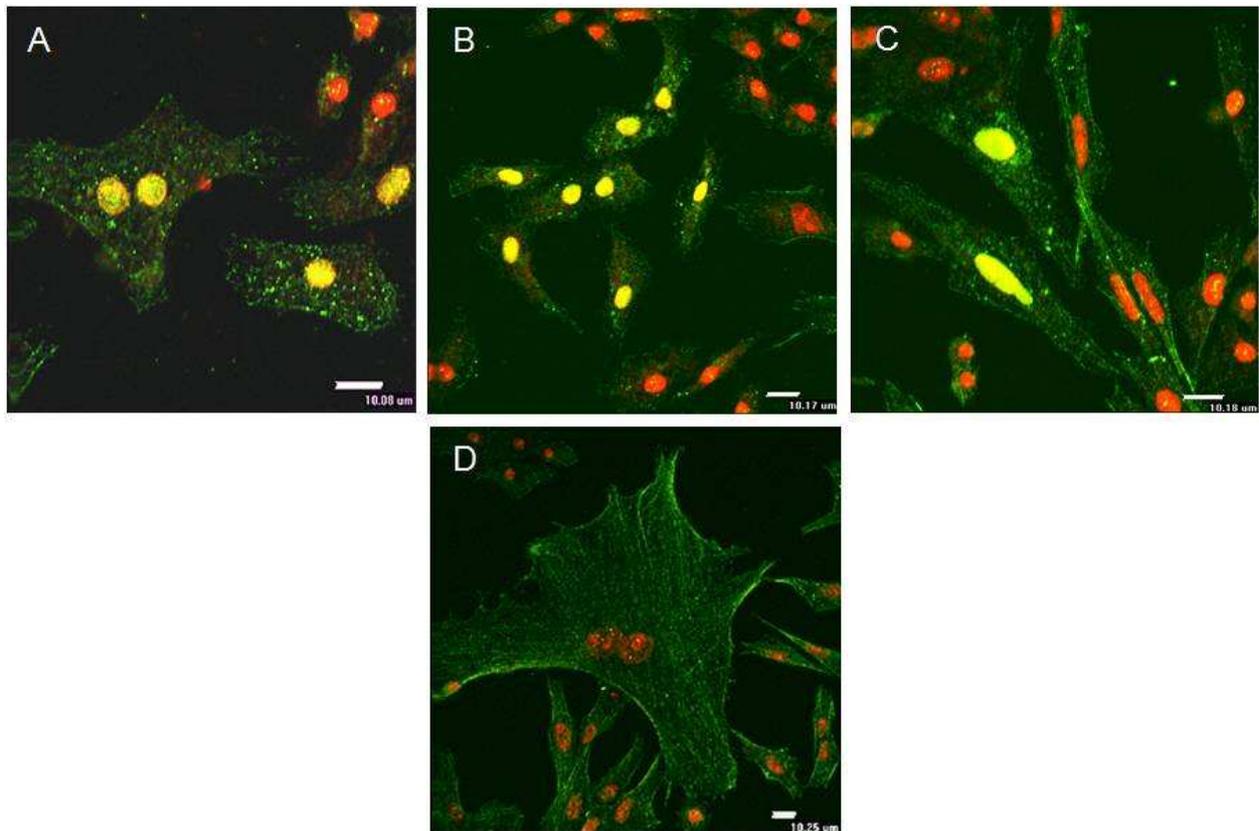


Abb. 3.16: Immunfluoreszenzen von NFIA-1- und CMV-transfizierten Zellen

Kraniale Chondrozyten wurden mit pCMV-Tag-4A-NFIA-1 (Bild A-C) oder dem Leervektor pCMV-Tag-4A (Bild D) transfiziert. 24 - 72 h nach der Transfektion wurde der exprimierte Flag-Tag detektiert. Als Primärantikörper wurde ein Anti-Flag und als Sekundärantikörper ein Alexa 488 IgG (s. 2.1.4) eingesetzt.

3.4 *Silencing* des NFIA-1-Gens in kaudalen Chondrozyten

Anhand einer Überexpression des NFIA-1-Gens mit Flag-Tag konnte in kranialen Chondrozyten ein blockierender Effekt auf die Kollagen X- und Alkalische Phosphatase-Synthese gezeigt werden, was (im Vorgriff auf die Diskussion) auf eine negativ regulierende Funktion des NFIA-1 auf die Chondrozytendifferenzierung hinweist (s. 3.3).

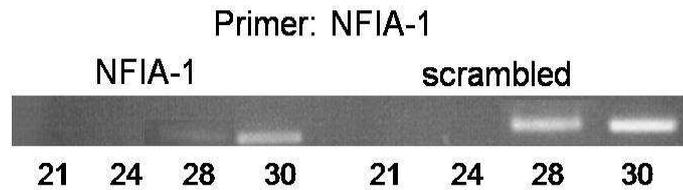
Im Gegensatz dazu wurde hier die erhöhte Expression des NFIA-1-Gens in kaudalen Zellen mittels der RNAi-Methode herunterreguliert. Wie bei der Überexpression des NFIA-1-Gens in kranialen Zellen wurde auch hier ein Effekt auf die Kollagen X- und Alkalischen Phosphatase-Synthese untersucht. Aufgrund der Kenntnis, dass NFIA an die Silencerregion des Matrilin 1 bindet (Szabo *et al.*, 1995), dass Matrilin 1 und 3 in knorpeligem Gewebe exprimiert werden (Budde *et al.*, 2005) und beide Matrilin als Adapter für Kollagen VI dienen, wurde zusätzlich durch semi-quantitative PCR noch der Einfluss des herunterregulierten NFIA-1-Gens auf die Matrilin 1-, 3- und Kollagen VI-Transkription kontrolliert.

Es wurden parallel Zellen in einer Suspensionskultur auf Agarose für 1 - 4 Tage mitgeführt, um mittels RNA-Isolierung und anschließender *One-Step* PCR (s. 2.2.1.23) den *Knockdown* des NFIA-1 zu überprüfen.

Bei den NFIA-1-transfizierten Chondrozyten ist nach 28 und 30 PCR-Zyklen im Vergleich zu den nonsense-transfizierten (scrambled) Chondrozyten ein *Knockdown* des Transkriptionsfaktors zu sehen (Abb. 3.17, A). Als Kontrolle der eingesetzten RNA-Konzentration wurde zusätzlich eine semi-quantitative PCR mit β -Aktin von den NFIA-1- und scrambled-transfizierten Zellen durchgeführt (s. Abb. 3.17, B). Das β -Aktin-Gen lag in NFIA-1- und scrambled-transfizierten Zellen auf dem gleichen Transkriptionsniveau.

Somit wurde ein *Knockdown* des NFIA-1 in NFIA-1-transfizierten kaudalen Chondrozyten nachgewiesen.

A



B

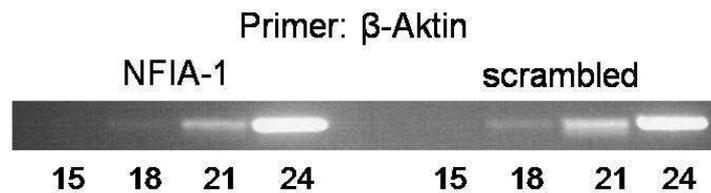


Abb. 3.17: Semi-quantitative PCR mit NFIA-1- oder β -Aktin-Primern von RNAi-transfizierten Zellen

Es wurden gleiche Mengen RNA eingesetzt. Die RNA von NFIA-1- und scrambled-transfizierten Zellen wurde mit NFIA-1- oder β -Aktin-Primern amplifiziert. Bei dem unter A dargestellten Versuch wurde während der Zyklen 21, 24, 28 und 30 jeweils ein Reaktionsgefäß entnommen, bei dem unter Versuch B dargestellten Versuch während der Zyklen 15, 18, 21 und 24.

3.4.1 Kollagensynthese der NFIA-1-herunterregulierten Chondrozyten

Aufgrund des erfolgreichen *Knockdowns* wurden die Auswirkungen auf die Kollagen X- und Alkalischen Phosphatase-Synthese analysiert. Analog zu den kranialen Chondrozyten, bei denen NFIA-1 überexprimiert wurde, wurde bei den NFIA-1-gesilenceten kaudalen Chondrozyten die Kollagensynthese untersucht.

Da die Kollagen X-Synthese als Marker für hypertrophierende Chondrozyten verwendet werden kann, wurde in zwei unabhängigen Versuchen das quantitative Kollagen X/II-Verhältniss in NFIA-1-gesilenceten Chondrozyten ermittelt. Bei den Transfektionen mit den NFIA-1-Oligonukleotiden wurden stets Doppelversuche durchgeführt.

Bei Versuch 1 ergab sich das niedrigste Kollagen X/II-Verhältnis für NFIA-1-gesilencete Zellen (2,74 und 3,4), gefolgt von den scrambled-transfizierten Zellen (4,76). Zusätzlich wurden Zellen nur einer elektrischen Spannung ausgesetzt und andere Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt, um einen negativen Effekt der Elektroporation und des Transfektionsreagenz auf die Chondrozytendifferenzierung abgleichen zu können. Hierbei ergab sich ein

niedrigeres Kollagen X/II-Verhältnis bei den untransfizierten Chondrozyten (4) im Vergleich zu den scrambled-gesilencten Zellen. Bei den mit Transfektionsreagenz behandelten Zellen (6,11) wurde das höchste Kollagen X/II-Verhältnis ermittelt (s. Abb. 3.19, A).

Auch in Versuch 2 zeigte sich das niedrigste Kollagen X/II-Verhältnis bei den NFIA-1-gesilencten Zellen (0,39 bzw. 0,57), gefolgt von den scrambled-transfizierten Zellen (0,65), den untransfizierten Zellen (0,9) und den mit Transfektionsreagenz behandelten Zellen (1,61) (s. Abb. 3.19, B).

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass infolge der fehlenden NFIA-1-Regulation in kaudalen Chondrozyten eine erhöhte Kollagen X-Synthese in den NFIA-1-gesilencten Zellen eintreten würde. Es konnte allerdings kein Einfluss des NFIA-1-Silencing auf die Kollagen X-Synthese nachgewiesen werden.

Da für diese unabhängigen Versuche verschiedene Präparationen von primären Chondrozyten verwendet wurden, können möglicherweise Schwankungen in der Genexpression die Unterschiede in der Kollagenexpression erklären (Abb. 3.18, V1 und V2).

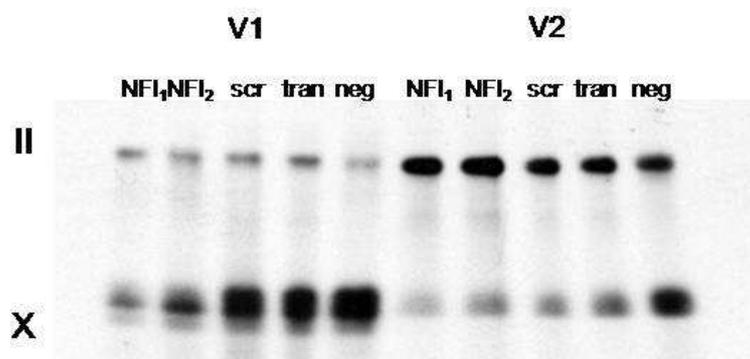


Abb. 3.18: Kollagen-Fluorographie NFIA-1-gesilencter kaudaler Chondrozyten sowie Negativkontrollen

Die Abbildung zeigt zwei unabhängige Experimente, jedoch mit analoger Vorgehensweise. Die Chondrozyten wurden mit Chymotrypsin und T4 behandelt. **NF1** und **NF2**: Doppelversuche, mit NFIA-1-Oligonukleotiden transfiziert; **scr**: mit scrambled-Oligonukleotiden transfiziert; **tran**: untransfiziert, nur einer elektrischen Spannung ausgesetzt; **neg**: nur Transfektionsreagenz.

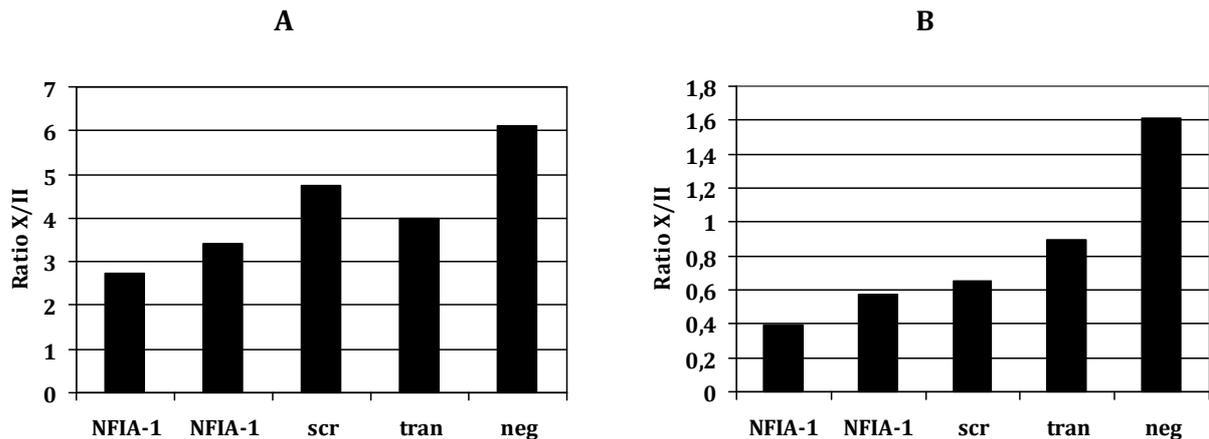


Abb. 3.19: Auswertung der Kollagen X/II-Verhältnisse

Die Diagramme **A** und **B** geben die KollagenX/II-Verhältnisse der aus Abb. 3.18 ermittelten Signalstärken an. **NFI**: Doppelversuche, mit NFIA-1-Oligonukleotiden transfiziert; **scr**: mit scrambled-Oligonukleotiden transfiziert; **tran**: untransfiziert, nur einer elektrischen Spannung ausgesetzt; **neg**: nur Transfektionsreagenz.

3.4.2 Alkalische Phosphatase der NFIA-1-herunterregulierten Chondrozyten

Um einen Effekt des gesilenceten NFIA-1-Gens auf die Hypertrophie der kaudalen Chondrozyten nachzuweisen, wurde analog zu den Überexpressionsversuchen von NFIA-1 in kranialen Chondrozyten die Aktivität der Alkalischen Phosphatase in Kulturmedien bestimmt. Hierzu wurden die Versuche 1 und 2, die bereits für die Kollagenpräparation herangezogen worden sind (s. 3.4.1), verwendet.

Bei Versuch 1 (s. Abb. 3.20) wurde an Tag 11, 13 und 15 die Aktivität der Alkalischen Phosphatase in den Medien bestimmt. Hierbei zeigten sich an allen gemessenen Tagen die niedrigsten Werte für die Aktivität der Alkalischen Phosphatase bei den NFIA-1-gesilenceten Chondrozyten (Tag 11: 0 und 6; Tag 13: 35 und 60; Tag 15: 73 und 109), gefolgt von den scrambled-transfizierten Chondrozyten (Tag 11: 11; Tag 13: 135; Tag 15: 348), den untransfizierten Zellen (Tag 11: 15; Tag 13: 136; Tag 15: 550) und den mit Transfektionsreagenz behandelten Zellen (Tag 11: 41; Tag 13: 202; Tag 15: 559).

Bei Versuch 2 (s. Abb. 3.21) wurde an Tag 11 und 13 die Aktivität der Alkalischen Phosphatase in den Medien gemessen. Hierbei war ebenfalls eine ansteigende Tendenz der Alkalischen Phosphatase-Aktivität von den NFIA-1-gesilenceten Chondrozyten bis zu den mit Transfektionsreagenz behandelten Zellen zu erkennen.

Bei den NFIA-1-gesilenceten Chondrozyten war an allen Messtagen die geringste Aktivität der Alkalischen Phosphatase zu messen (Tag 11: 6 und 0; Tag 13: 1 und 6), gefolgt von den scrambled-transfizierten Zellen (Tag 11: 7; Tag 13: 54), den untransfizierten Zellen (Tag 11: 11; Tag 13: 39) und den Transfektionsreagenz-behandelten Zellen (Tag 11: 22; Tag 13: 107).

In beiden Versuchen ist in den NFIA-1-gesilenceten Zellen somit die geringste Aktivität der Alkalischen Phosphatase zu messen. Dieses Ergebnis ist konform mit der Analyse der Kollagensynthese beider Versuche (s. 3.4.1). Der Erwartung nach sollte durch das *Knockdown* die Alkalische Phosphatase in NFIA-1-gesilenceten Chondrozyten verstärkt synthetisiert werden. Dies konnte nicht bestätigt werden. Somit konnte auch hier kein Einfluss durch einen *Knockdown* des NFIA-1 in kaudalen Chondrozyten auf die Hypertrophie der Chondrozyten nachgewiesen werden.

V1

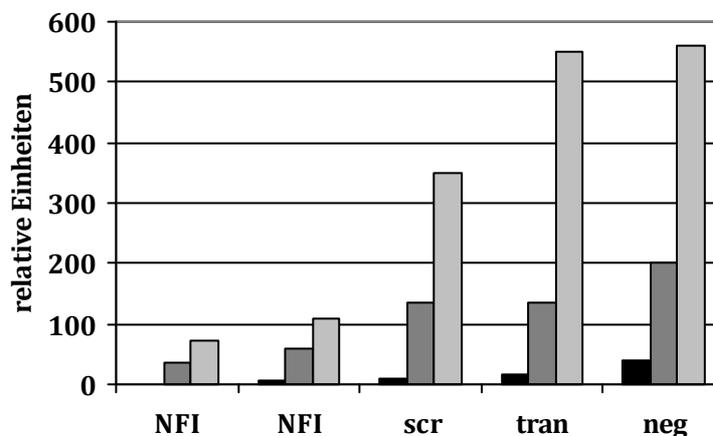


Abb. 3.20: Aktivitätsmessung der Alkalischen Phosphatase von NFIA-1-, scrambled-transfizierten Chondrozyten

In Diagramm V1 ist Versuch 1 dargestellt mit den an Tag 11 (schwarze Balken), 13 (graue Balken) und 15 (hellgraue Balken) ermittelten relativen Einheiten für die Aktivität der Alkalischen Phosphatase. Die Chondrozyten wurden mit Chymotrypsin und T4 behandelt. **NFI** und **NFI**: Doppelversuche, mit NFIA-1-transfiziert; **scr**: mit scrambled-transfiziert; **tran**: nur einer elektrischen Spannung ausgesetzt; **neg**: nur Transfektionsreagenz.

V2

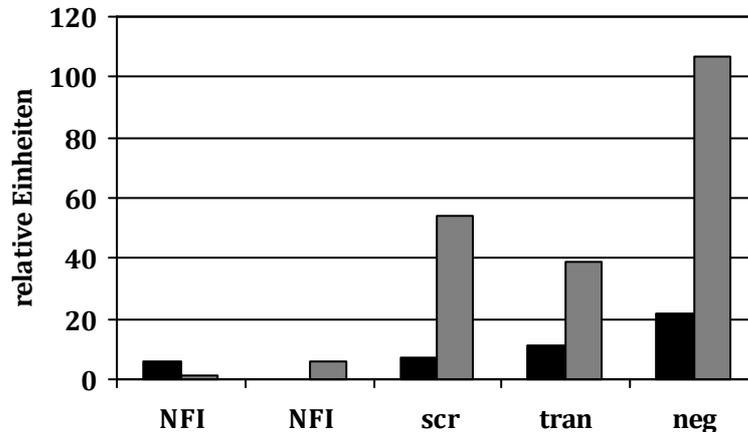


Abb. 3.21: Aktivitätsmessung der Alkalischen Phosphatase von NFIA-1-, scrambled-transfizierten Chondrozyten

In Diagramm V2 ist Versuch 2 dargestellt mit den an Tag 11 (schwarze Balken) und 13 (graue Balken) ermittelten relativen Einheiten für die Aktivität der Alkalischen Phosphatase. Die Chondrozyten wurden mit Chymotrypsin und T4 behandelt. **NFI** und **NFI**: Doppelversuche, mit NFIA-1-transfiziert; **scr**: mit scrambled-transfiziert; **tran**: nur einer elektrischen Spannung ausgesetzt; **neg**: nur Transfektionsreagenz.

3.4.3 Silencing-Effekt des NFIA-1 auf Matrilin 1, 3 und Kollagen VI

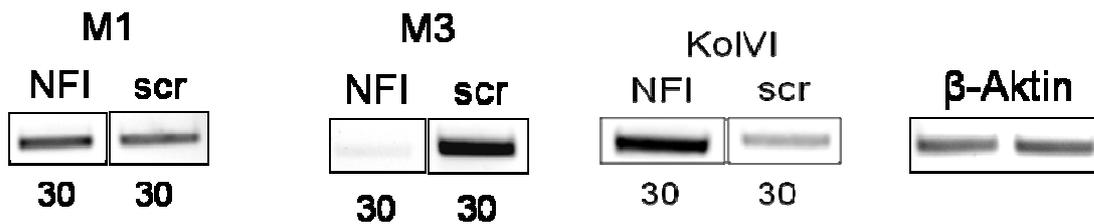
In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass NFI an die Silencerregion des Matrilin 1 bindet. Außerdem wurde beschrieben, dass Matrilin 1 und 3 im Knorpel exprimiert werden und als Adapter für Makromoleküle wie Kollagen VI fungieren (Budde *et al.*, 2005). Daher wurden die Transkriptionsniveaus von Matrilin 1, 3 und Kollagen VI nach Herunterregulierung durch NFIA-1-siRNA in Chondrozytenkulturen untersucht und mit demjenigen in scrambled-transfizierten Zellen verglichen. Die durch semi-quantitative PCR erhaltenen Signale für NFIA-1- und scrambled-transfizierten Chondrozyten wurden mittels des internen Standards β -Aktin normalisiert.

In scrambled-transfizierten Chondrozyten konnte im Vergleich zu Kulturansätzen mit gesilenceten NFIA-1-Chondrozyten keine nennenswert (1,1-fach) erhöhte Matrilin 1-Transkription gefunden werden. In einem zweiten unabhängigen Versuch 2 konnte hingegen eine deutlich höhere Matrilin 1-Transkription (10-fach) in scrambled-transfizierten Zellen gegenüber NFIA-1-gesilenceten Zellen gemessen werden. Für Matrilin 3 zeigte sich in NFIA-1-transfizierten Chondrozyten gegenüber scrambled-transfizierten in Versuch 1 eine hohe (7,8-fach) und in Versuch 2 eine geringfügig

höhere (1,6-fach) Transkription. Für Kollagen VI war in den NFIA-1-transfizierten Chondrozytenkulturen sowohl in Versuch 1 (2,9-fach) als auch Versuch 2 (2,4-fach) eine erhöhte Transkription festzustellen.

Da NFIA-1 an die Silencerregion des Matrilin 1 bindet, wäre bei einem *Silencing* des NFIA-1 eine verstärkte Matrilin 1-Transkription zu erwarten gewesen. Die Ergebnisse beider Versuche widersprachen einem NFIA-1-*Silencing*. Aufgrund der starken Schwankungen in der Matrilin 3-Transkription von Versuch 1 im Vergleich zu Versuch 2 wies dies nicht auf einen Effekt des NFIA-1-*Silencing* hin. Da bislang die Ergebnisse der Kollagen X- (s. 3.4.1) und der Alkalischen Phosphatase-Synthese (s. 3.4.2) gegen einen *Silencing*-Effekt des NFIA-1 sprachen, dürfte auch im Fall der Kollagen VI-Transkription ein solcher nicht gegeben sein.

V1



V2

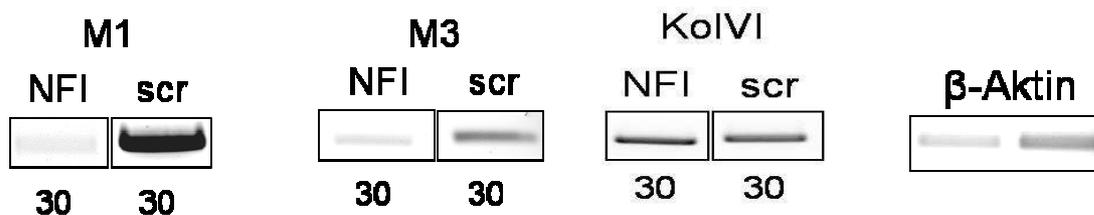


Abb. 3.22: Messung der Transkription von Matrilin 1-, 3- und Kollagen VI in RNAi-transfizierten Chondrozyten durch semi-quantitative PCR

Es wurden gleiche Mengen RNA in Versuch 1 (V1) und Versuch 2 (V2) eingesetzt. Es wurde die RNA von NFIA-1- und scrambled-transfizierte Zellen mit den jeweiligen Primern amplifiziert. Reaktionsgefäße wurden bei den angegebenen Zyklenzahlen entnommen. Als interne Kontrolle wurde eine semi-quantitative PCR mit β -Aktin-Primern mitgeführt. **M1**: Matrilin 1-Primer. **M3**: Matrilin 3-Primer. **KoI VI**: Kollagen VI-Primer.

3.5 Überexpression von NFIA-1 *in vitro* und *in vivo* mittels RCASBP(A) Virus-System

Das RCASBP(A)-Retrovirus dient als Werkzeug, um *in vitro* nicht-proliferierende Zellen wie Hühnerchondrozyten und später auch *in vivo* Hühnerembryos zu infizieren. Durch die Klonierung des NFIA-1 in den RCASBP(A)-Vektor erfolgt bei der Infektion mit dem RCASBP(A)NFIA-1 eine Überexpression des NFIA-1-Gens in Hühnerchondrozyten oder Hühnerembryos.

3.5.1 Klonierung der NFIA-1-, NFIA-1Flag- und NFIA-1StreptII-Sequenzen in den pCRII TOPO-Vektor

Um die NFIA-1-, NFIA-1Flag- und NFIA-1StreptII-Sequenzen in den RCASBP(A)-Vektor ligieren zu können, wurden mittels spezifischer Primer (s. 2.2.1.24) *Clal*-Schnittstellen am 5'- und 3'-Ende generiert (s. Abb. 3.23).

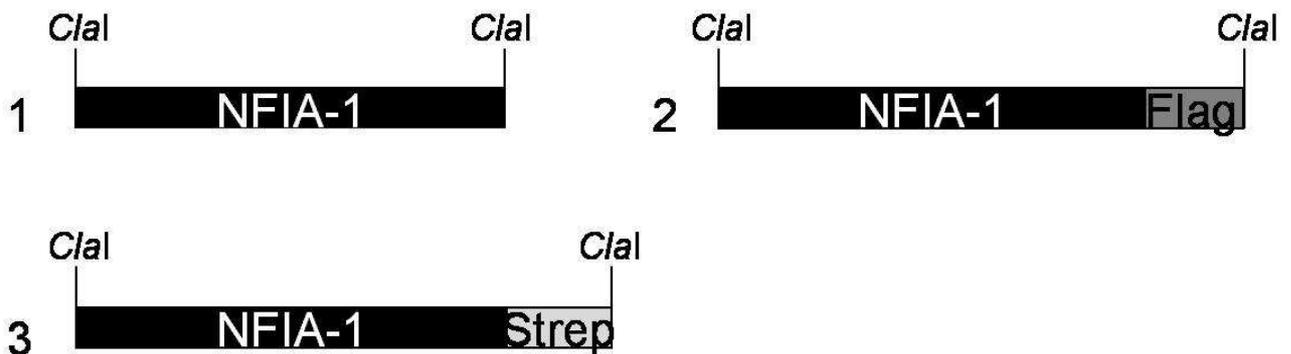


Abb. 3.23: Schematische Darstellung der zu generierenden Sequenzen

Mittels spezifischer Primer wurden die in Schema 1-3 dargestellten Sequenzen hergestellt. Bei allen drei Sequenzen wurde sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende eine *Clal* Schnittstelle zugefügt.

Die Generierung der NFIA-1Flag-Sequenz mit *Clal*-Schnittstellen konnte nicht erzielt werden (s. Abb. 3.24, B), so dass hier bei der Flag-Spur keine Bande zu erkennen ist. Grund hierfür könnte eine nicht optimal ausgewählte Annealingtemperatur sein, was zur Ausbildung von Sekundärstrukturen in Primer- und/oder Template-DNA-Sequenzen führen kann. Somit würde es zu keiner spezifischen Amplifizierung der Zielsequenz kommen. Aufgrund dessen wurde mit den beiden erhaltenen Sequenzen NFIA-1 und NFIA-1StreptII weitergearbeitet.

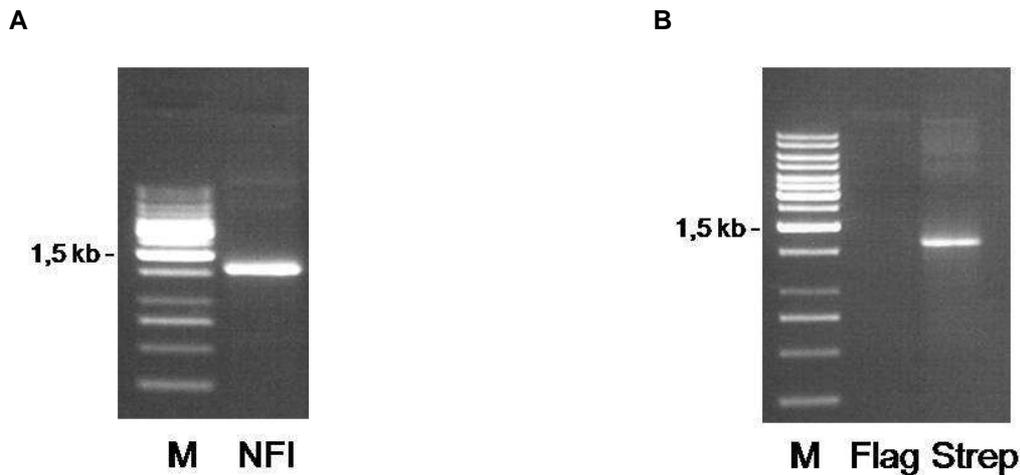


Abb. 3.24: Generierung der NFIA-1-, NFIA-1Flag- und NFIA-1StreptII-Sequenzen mit *Cla*I Schnittstellen

Die PCR wurde mit den jeweiligen spezifischen Primern durchgeführt. Als Template wurde aus einer früheren Arbeit (Auge, 2004) das Plasmid pCMV-Tag-4A-NFIA-1 verwendet. **M:** 1 kb Größenstandard. **NFI:** NFIA-1 Sequenz mit *Cla*I-Schnittstellen. **Flag:** NFIA-1 Flag Sequenz mit *Cla*I-Schnittstellen. **Strep:** NFIA-1 StreptII-Sequenz mit *Cla*I-Schnittstellen.

Die NFIA-1 und NFIA-1StreptII-Sequenzen wurden in den pCRII TOPO-Vektor subkloniert (s. 2.2.1.13). Bei der anschließenden Bakterienkolonie-PCR (s. 2.2.1.14) wurde nach positiven Klonen gescreent (s. Abb. 3.25).

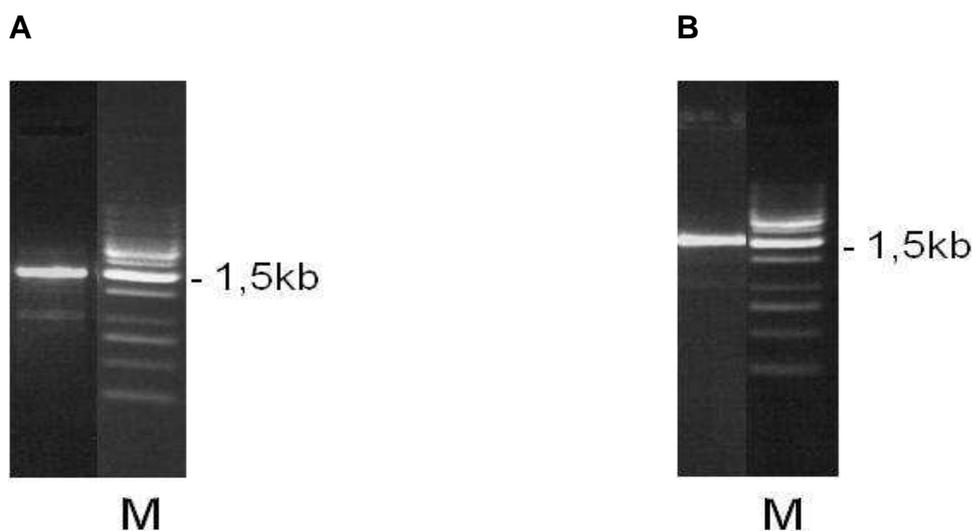


Abb. 3.25: Bakterienkolonie-PCR zur Überprüfung von positiven Klonen

Für die PCR wurden mit einem sterilen Zahnstocher Transformanten von einer Agaroseplatte gepickt und mit den zuvor verwendeten Primern zur Generierung der NFIA-1- und NFIA-1StreptII-Sequenzen nach positiven Klonen gescreent. **A:** NFIA-1-Bakterienkolonie-PCR. **B:** NFIA-StreptII-Bakterienkolonie-PCR. **M:** 1 kb Größenstandard.

Durch DNA-Sequenzierungen wurde festgestellt, dass alle Sequenzen von NFIA-1 und NFIA-1StrepII Fehler aufwiesen. Die Sequenz mit den wenigsten Fehlern (s. 5.2) wurde für eine PCR-Mutagenese (s. 2.2.1.25) verwendet. Die in dieser Sequenz enthaltenen Fehler verursachten bei 420 bp einen Aminosäureaustausch von Cystein zu Arginin und bei 1036 bp einen von Arginin zu Histidin.

Das mutierte Plasmid mit den wiederhergestellten Cystein- und Arginin-Codons wurde zur Generierung der NFIA-1- und NFIA-1StrepII-Sequenzen verwendet. Diese wurden dann erneut in den pCRII TOPO-Vektor subkloniert. Zur Überprüfung der Ligation (s. 2.2.1.12) wurde die Plasmid-DNA mit *EcoRI* geschnitten (s. Abb. 3.26). Hierbei handelt es sich bei der DNA-Bande bei 4kb um den pCRII TOPO Vektor und der Bande bei 1,5 kb um die NFIA-1- oder NFIA-1Strep-DNA.

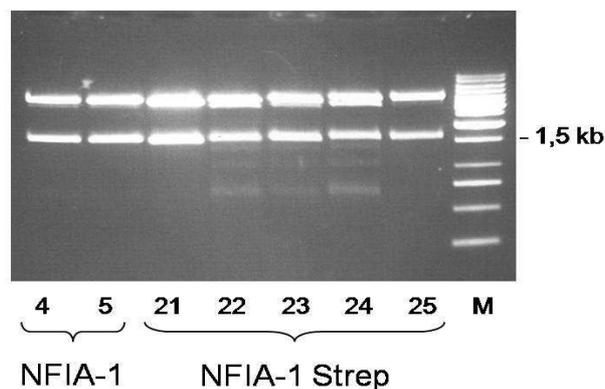


Abb. 3.26: Ligationsüberprüfung der mutierten NFIA-1- und NFIA-1StrepII-Sequenzen

Die NFIA-1- und die NFIA-1StrepII-Sequenz wurden mit *EcoRI*, welches die ligierte Sequenz flankiert (s. Abb. 5.1), herausgeschnitten. **M**: 1 kb Größenstandard. **4 und 5**: Nummern der positiven Klone mit der NFIA-1-Sequenz. **21, 22, 23, 24 und 25**: Nummern der positiven Klone mit der NFIA-1StrepII-Sequenz.

Es folgten weitere DNA-Sequenzierungen der positiven Transformanden. Dabei konnte eine fehlerfreie NFIA-1StrepII-Sequenz ermittelt werden, mit der fortan weitergearbeitet wurde.

3.5.2 Klonierung der NFIA-1StrepII-Sequenz in den RCASBP(A)-Vektor und Funktionsanalyse

Die fehlerfreie NFIA-1StrepII-Sequenz wurde mittels der generierten *Cla*I Schnittstellen aus dem pCRII TOPO-Vektor ausgeschnitten und in den ebenfalls mit *Cla*I linearisierten und dephosphorylierten RCASBP(A)-Vektor (s. 2.2.1.16) ligiert.

Aufgrund der beideseitigen *Cla*I-Schnittstellen war eine Orientierungsbestimmung der NFIA-1StrepII-Sequenz im RCASBP(A)-Vektor notwendig (s. Abb. 3.27). Zusätzlich wurde durch einen *Cla*I-Verdau die Größe von Insert und Vektor überprüft (s. Abb. 3.28). Hierbei liegt die Insertgröße bei 1606 bp und die Vektorgröße bei 11628 bp.

Abschließend wurde die Sequenz erneut durch eine DNA-Sequenzierung (s. 2.2.1.15) überprüft. Dabei wurde eine fehlerfreie RCASBP(A)NFIA-1StrepII-Sequenz ermittelt. Dieses Plasmid wurde zur Infektion von DF1 Zellen (s. 2.2.3.10) verwendet.

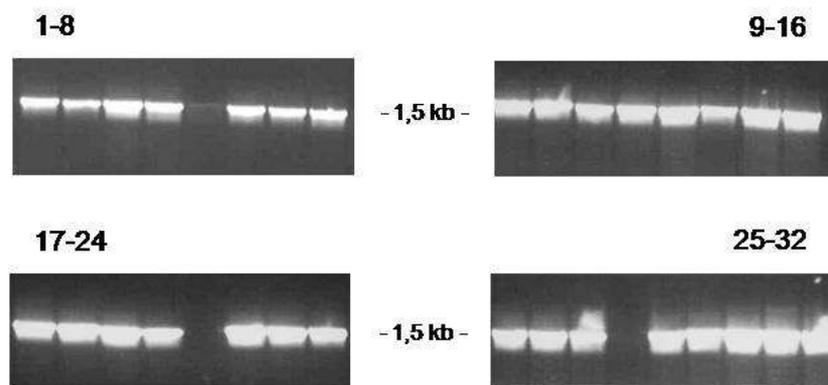


Abb. 3.27: Ligations- und Orientierungs-Überprüfung der NFIA-1StrepII-Sequenz im RCASBP(A)-Vektor

Für die PCR wurden mit einem sterilen Zahnstocher Transformanden von einer Agaroseplatte gepickt. Durch spezifische Auswahl der Primer (der 5'-Primer lag im Insert und der 3'-Primer im Vektor) wurde in der Bakterienkolonie-PCR direkt die korrekte Orientierung des Inserts überprüft. **1-8, 9-16, 17-24, 25-32:** Nummern der Klone.

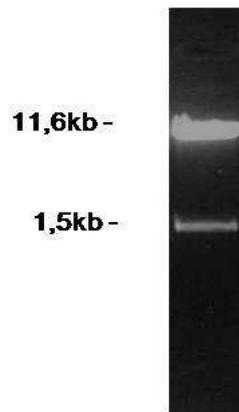


Abb. 3.28: Überprüfung der Insert- und Vektorgroße von RCASBP(A)NFIA-1StrepII

Anhand des *Clal* Enzyms wurde die NFIA-1StrepII-Sequenz aus dem Vektor herausgeschnitten.

Nun wurde eine Titration der RCASBP(A)NFIA-1StrepII-Viren durchgeführt (s. 2.2.3.12). Dazu wurden DF1 Zellen mit RCASBP(A)NFIA-1StrepII-Viren in einer Verdünnungsreihe von 10^{-1} - 10^{-10} infiziert (s. 2.2.3.12). Die Titration scheiterte jedoch daran, dass die nicht-infizierte Negativkontrolle ebenfalls eine Färbung aufwies. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die DF1 Zellen bereits mit einem Virus infiziert waren (s. Abb. 3.29). Translatiert dieser Virus auch das gag-Protein, so kommt es auch bei der Negativkontrolle zu einer Färbung. Die Negativkontrolle blieb auch im Fall der Verwendung anderer, frisch in Kultur genommener DF1 Zellen positiv.



Abb. 3.29: gag-Nachweis in DF1 Zellen mittels PCR

Mit spezifischen Primern wurde in der cDNA von DF1 Zellen gag-DNA nachgewiesen. Als Kontrolle der Methode wurde zusätzlich noch die β -Aktin-DNA mit amplifiziert. **gag**: kodiert Kapsidproteine.

Vor diesem Hintergrund wurde eine Funktionalitätsanalyse des RCASBP(A)NFIA-1StrepII-Virus durchgeführt. Hierzu wurden RCASBP(A)NFIA-1StrepII-infizierte DF1 Zellen und nicht-infizierte Zellen 7 Tage in Kultur genommen. Danach wurden nukleäre und zytoplasmatische Proteine extrahiert (s. 2.2.2.2).

In Bahn 1 (s. Abb. 3.30) wurden die zytoplasmatischen Proteine aus nicht-infizierten DF1 Zellen und in Bahn 2 die der infizierten Zellen aufgetragen. Die nukleären

Proteine aus nicht-transfizierten DF1 Zellen wurden in Bahn 3 und die aus infizierten Zellen in Bahn 4 aufgetragen. Es konnte nur bei den infizierten Zellen mit einem NFI-Antikörper in Bahn 2 und 4 das Protein NFI nachgewiesen werden. Aufgrund der Tatsache, dass NFI ein Transkriptionsfaktor ist, war das NFI-Signal in Bahn 4 bei den nukleären Proteinen weit stärker als in Bahn 2 bei den zytoplasmatischen Proteinen. Eine Verunreinigung der zytoplasmatischen Proteine bei der Extraktion wäre daher möglich.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist die Funktionalität des RCASBP(A)NFIA-1StrepII-Virus erwiesen.

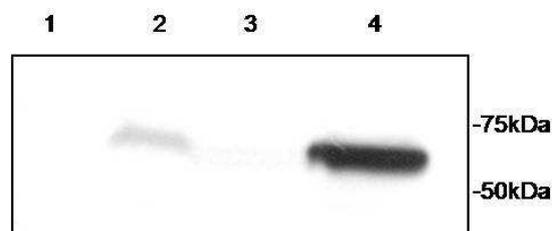


Abb. 3.30: Nachweis von NFI in RCASBP(A)NFIA-1StrepII-infizierten DF1 Zellen

Nukleäre und zytoplasmatische Proteine wurden aus RCASBP(A)NFIA-1StrepII-infizierten DF1 Zellen und nicht-infizierten Zellen extrahiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung (s. 2.2.2.5) der Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel wurde ein Western Blot (s. 2.2.2.7) mit dem Primärantikörper NFI durchgeführt. **1:** Zytoplasmaextrakt von nicht-infizierten Zellen. **2:** Zytoplasmaextrakt von RCASBP(A)NFIA-1StrepII-infizierten Zellen. **3:** Zellkernextrakt von nicht-infizierten Zellen. **4:** Zellkernextrakt von RCASBP(A)NFIA-1StrepII-infizierten Zellen. Die Funktionalitätsanalyse wurde von Frau Dr. Dreier durchgeführt.

3.5.3 Kokultur von Chondrozyten mit RCASBP(A)NFIA-1StrepII-infizierten DF1 Zellen

Da Chondrozyten in Kultur ohne entsprechenden Stimulus nur gering proliferieren, ist eine Infektion dieser Zellen mit dem RCASBP(A)-Virus zwar möglich, aber die Transfektionseffizienz niedrig. Aus diesem Grund wurden CEF Zellen mit RCASBP(A)NFIA-1StrepII-Viren infiziert. Durch die proliferierenden CEF Zellen konnten sich die Viren vermehren und durch eine Kokultur mit kranialen Chondrozyten diese dann infizieren (s. 2.2.3.8). Es wurden neben infizierten Zellen auch nicht-infizierte Zellen als Kontrolle mitkultiviert. Zudem wurden sowohl infizierte als auch nicht-infizierte Kulturen entweder mit IGF-1 oder T4 stimuliert oder ohne Stimulans behandelt. Nach 14 Tagen Kokultivierung wurde eine Analyse der Kollagensynthese der Kulturen durchgeführt (s. 2.2.2.11.1).

In Versuch A und B ist bei allen nicht-stimulierten Kulturen (s. Abb. 3.31, A und B, Ø) keine Kollagen X-Expression zu sehen; eine solche ist nur bei den IGF-1-stimulierten kranialen Chondrozyten (s. Abb. 3.31, A und B, IGF-1) zu erkennen, wobei die Kollagen II-Expression nicht mehr nachweisbar ist. Hingegen ist bei den mit IGF-1-stimulierten Chondrozyten in Kokultur mit CEF Zellen und Chondrozyten in Kokultur mit RCASBP(A)NFIA-1StrepII-infizierten CEF Zellen keine Kollagen X-Expression nachzuweisen. Da bei den T4-stimulierten Chondrozyten in Kokultur mit CEF Zellen und Chondrozyten in Kokultur mit RCASBP(A)NFIA-1StrepII-infizierten CEF Zellen in beiden Versuchen sowohl eine Kollagen II- als auch eine Kollagen X-Expression nachzuweisen ist, konnte hier das Kollagen X/II-Verhältnis ermittelt werden (s. Abb. 3.31, A und B, T4). Aufgrund einer erhöhten Mortalität der Zellen in beiden T4-stimulierten kranialen Chondrozytenkulturversuchen (s. Abb. 3.31, A und B, kr, T4) war hier kaum eine Kollagen-Expression zu erkennen, so dass keine Auswertung des Kollagen X/II-Verhältnisses möglich war.

In Versuch A und B waren die Kollagen X/II-Verhältnisse bei den nicht-infizierten (A: 2,9; B: 2,7) im Vergleich zu den infizierten Kokulturen (A: 0,86; B: 1,2) deutlich erhöht (Versuch A: 3,4-fach; Versuch B: 2,25-fach).

Die Überexpression des NFIA-1 mittels RCASBP(A)-Virus zeigt einen deutlich inhibierenden Effekt auf die Kollagen X-Expression, was sich in den niedrigen Kollagen X/II-Verhältnissen in infizierten Kokulturen niederschlägt.

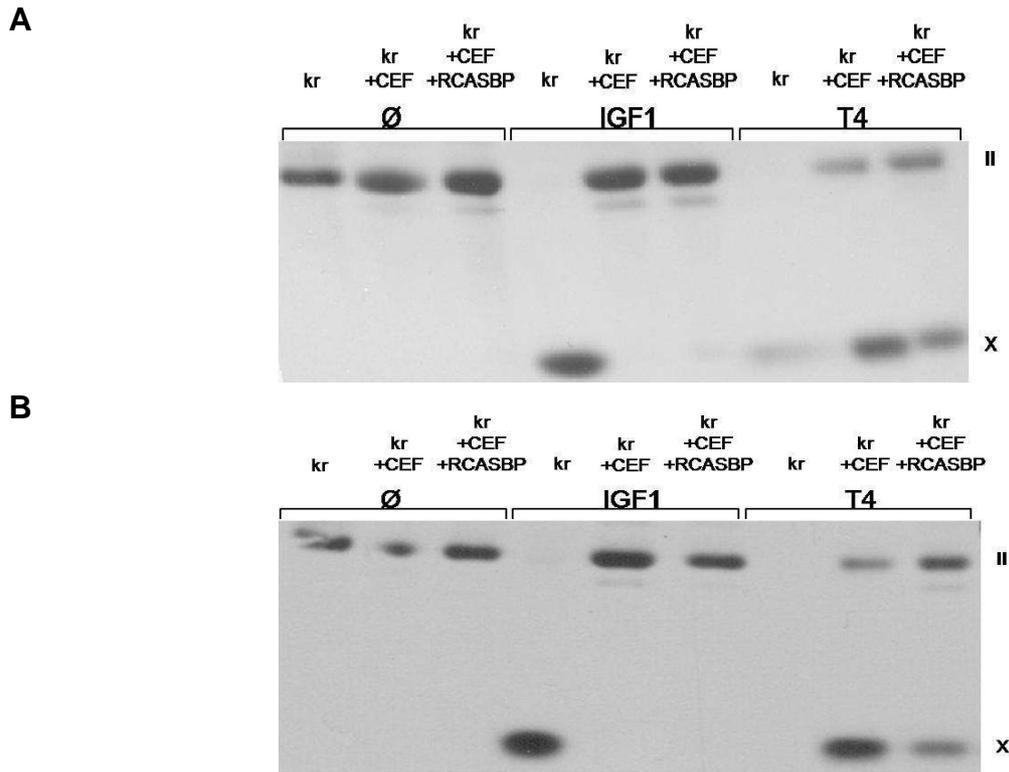


Abb. 3.31: Kollagenpräparation von RCASBP(A)NFIA-1StreptII-infizierten und nicht-infizierten Kokulturen

A und **B** zeigen jeweils ein Autoradiogramm eines SDS-Polyacrylamidgels mit den aus dem Kokulturversuch stammenden Kollagenproben. Die Kulturen wurden mit IGF-1 und T4 behandelt. **kr**: kraniale Chondrozyten. **kr + CEF**: nicht-infizierte Kokultur von kranialen Chondrozyten und CEF Zellen. **kr + CEF + RCASBP**: Kokultur von kranialen Chondrozyten und mit RCASBP(A)NFIA-1StreptII-infizierten CEF Zellen. **Ø**: nicht-stimulierte Kulturen. **IGF-1**: mit IGF-1-stimulierte Kulturen. **T4**: mit T4-stimulierte Kulturen.

3.5.4 Kultur von RCASBP(A)NFIA-1StreptII-infizierten Chondrozyten

Um den Einfluss von CEF Zellen auf die Kollagen X- und II-Expression von kranialen Chondrozyten auszuschließen, wurden nun kraniale Chondrozyten unmittelbar mit RCASBP(A)NFIA-1StreptII-Viren infiziert.

Es wurden sowohl Chondrozyten (präpariert aus *specific pathogen free*-Eiern) mit RCASBP(A)NFIA-1StreptII-Viren infiziert als auch nicht-infizierte Chondrozyten als Kontrolle in Kultur genommen. Bei den infizierten wie auch bei den nicht-infizierten Kulturen wurden wiederum jeweils Kulturen mit IGF-1 oder mit T4 stimuliert sowie Kontrollen ohne Stimulans mitgeführt.

Nach Auswertung des Autoradiogramms (nach unterschiedlicher Exposition des Röntgenfilms auf dem SDS-Gradientengel, um eine Sättigung der Kollagenproben zu

vermeiden) wurden sowohl bei den nicht-infizierten als auch bei den RCASBP(A)NFIA-1StrepII-infizierten Chondrozyten das niedrigste Kollagen X/II-Verhältnis (\emptyset : 3,95 und RCAS: 3,44) bei den nicht-stimulierten Zellen ermittelt, gefolgt von den IGF-1-stimulierten Zellen (\emptyset : 11 und RCAS: 4,1) und den T4-stimulierten Zellen (\emptyset : 17,9 und RCAS: 7,6) (s. Abb. 3.32, B).

Da die Werte für das Kollagen X/II-Verhältnis bei allen mit RCASBP(A)-NFIA-1StrepII-infizierten Chondrozyten im Vergleich mit den nicht-infizierten Chondrozyten stets geringer ausfielen, besitzt der überexprimierte NFIA-1 offensichtlich einen inhibierenden Effekt auf die Kollagen X-Synthese.

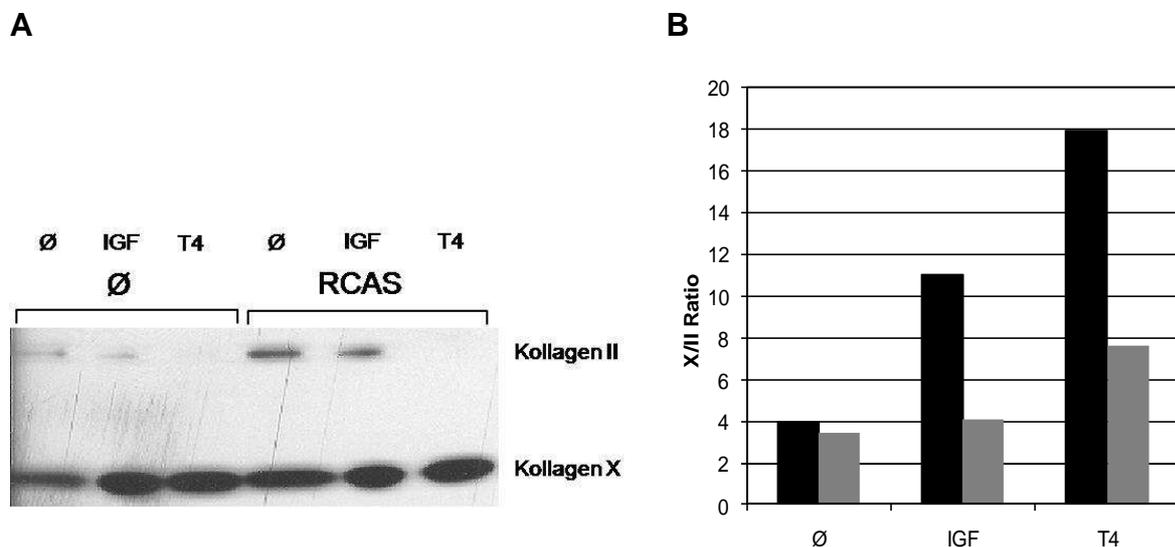


Abb. 3.32: Kollagenpräparation von RCASBP(A)NFIA-1StrepII-infizierten und nicht-infizierten Chondrozytenkulturen

A zeigt ein Autoradiogramm eines SDS-Gradientengels mit den Kollagenproben aus den RCASBP(A)NFIA-1StrepII-infizierten und nicht-infizierten Chondrozytenkulturen. **B** zeigt die aus Abbildung A ermittelten Kollagen X/II-Verhältnisse. \emptyset : nicht-infizierte Chondrozytenkulturen. **RCAS**: mit RCASBP(A)NFIA-1StrepII-infizierte Chondrozytenkulturen. \emptyset : nicht-stimulierte Kulturen. **IGF-1**: mit IGF-1-stimulierte Kulturen. **T4**: mit T4-stimulierte Kulturen. **Schwarze Balken**: nicht-infizierte Kulturen. **Graue Balken**: mit RCASBP(A)NFIA-1StrepII infizierte Kulturen.

Zur Überprüfung einer bereits vorliegenden Infektion mit Retroviren wurde von den nicht-infizierten und mit RCASBP(A)NFIA-1StrepII-infizierten Chondrozytenkulturen ein Western Blot (s. 2.2.2.7) durchgeführt.

Bei den nicht-infizierten, mit IGF-1 und T4 stimulierten Chondrozyten ist ein leichtes Signal für gag-Proteine zu erkennen (s. Abb. 3.33, \emptyset). Ein deutliches Signal ist bei den RCASBP(A)NFIA-1StrepII-infizierten, mit IGF-1 und T4 stimulierten Zellen zu

erkennen (s. Abb. 3.33, RCAS). Das Signal ist bei den infizierten Zellen deutlich höher als bei den nicht-infizierten. Sowohl bei den nicht-infizierten als auch bei den infizierten Zellen ohne Stimulans sind auf dem Western Blot keine Signale für gag-Proteine zu erkennen.

Diese Ergebnisse weisen auf eine bereits vorliegende Infektion mit einem Retrovirus hin, der sich allerdings hauptsächlich in stimulierten Zellen vermehren kann.

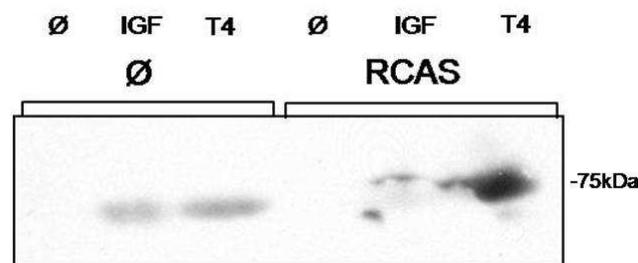


Abb. 3.33: Western Blot von RCASBP(A)NFIA-1StrepII-infizierten und nicht-infizierten Chondrozytenkulturen

Proteine wurden aus RCASBP(A)NFIA-1StrepII-infizierten und nicht-infizierten Chondrozyten extrahiert. Ein Western Blot (s. 2.2.2.7) wurde mit dem Primärantikörper AMV-3C2 durchgeführt. **Ø**: nicht-infizierte Chondrozytenkulturen. **RCAS**: mit RCASBP(A)NFIA-1StrepII-infizierte Chondrozytenkulturen. **Ø**: nicht-stimulierte Kulturen. **IGF-1**: mit IGF-1-stimulierte Kulturen. **T4**: mit T4-stimulierte Kulturen.

3.5.5 Histologische Expressionsanalyse von RCASBP(A)NFIA-1StrepII in Bein- und Flügelanlagen

NFIA-1 wurde *in vivo* überexprimiert, indem die RCASBP(A)NFIA-1StrepII-Viren zur Infektion in Hühnerembryos verwendet wurden (s. 2.2.5). Die Injektionen erfolgten in die rechten Bein- und Flügelanlagen. Die linken Bein- und Flügelanlagen dienten als nicht infizierte Kontrollen.

Die Infektion der Viren in die Hühnerembryos wurde durch Herrn Prof. Bruckner in Freiburg vorgenommen, ebenso die weitere Bebrütung der infizierten Embryos. Alle weiteren Schritte wurden in Münster durchgeführt. Aus den Bein- und Flügelanlagen wurden Paraffinschnitte hergestellt und histochemische Färbungen (s. 2.2.4) angefertigt. Zunächst wurde die DAB-Färbemethode mit Primärantikörpern gegen Kollagen X, gag und NFI getestet. Allerdings konnte mit dieser Methode keine Färbung erzielt werden. Aus diesem Grund wurden die Schnitte für Immunfluoreszenzmikroskopie (s. 2.2.4.3) angefärbt. Hierbei wurde auch der

Primärantikörper gegen NFI getestet. Allerdings war das Signal so stark, dass zwischen infizierten und nicht-infizierten Gliedmaßen kein Unterschied zu sehen war. Zudem detektiert der NFI-Antikörper nicht nur das infizierte NFIA-1, sondern auch das endogene NFIA-1. Auch die endogenen NFIB, C und X werden von diesem Antikörper detektiert. Aus diesem Grund wurde der Primärantikörper gegen gag-Proteine verwendet. Die hierbei detektierten Signale stammen von dem infizierten Virus und von keinem endogenen Protein.

Bei dem Tier Nummer 1 sind Signale in den nicht-infizierten linken (Abb. 3.34, A1 und 2) sowie in den infizierten rechten Beinanlagen (Abb. 3.34, B1 und 2) zu erkennen. In den Flügelanlagen ist hingegen hauptsächlich ein starkes Signal in den rechten Gliedmaßen zu sehen (Abb. 3.34, D1 und 2); in den linken Gliedmaßen sind dagegen kaum Anfärbungen vorhanden (Abb. 3.34, C1 und 2). Insgesamt sind die Signale bei diesem Tier nicht im Bereich der Knochenanlagen zu beobachten, sondern in den Blutzellen in den Gefäßen. Aufgrund der Negativkontrolle ist dieses Signal als spezifisch zu werten.

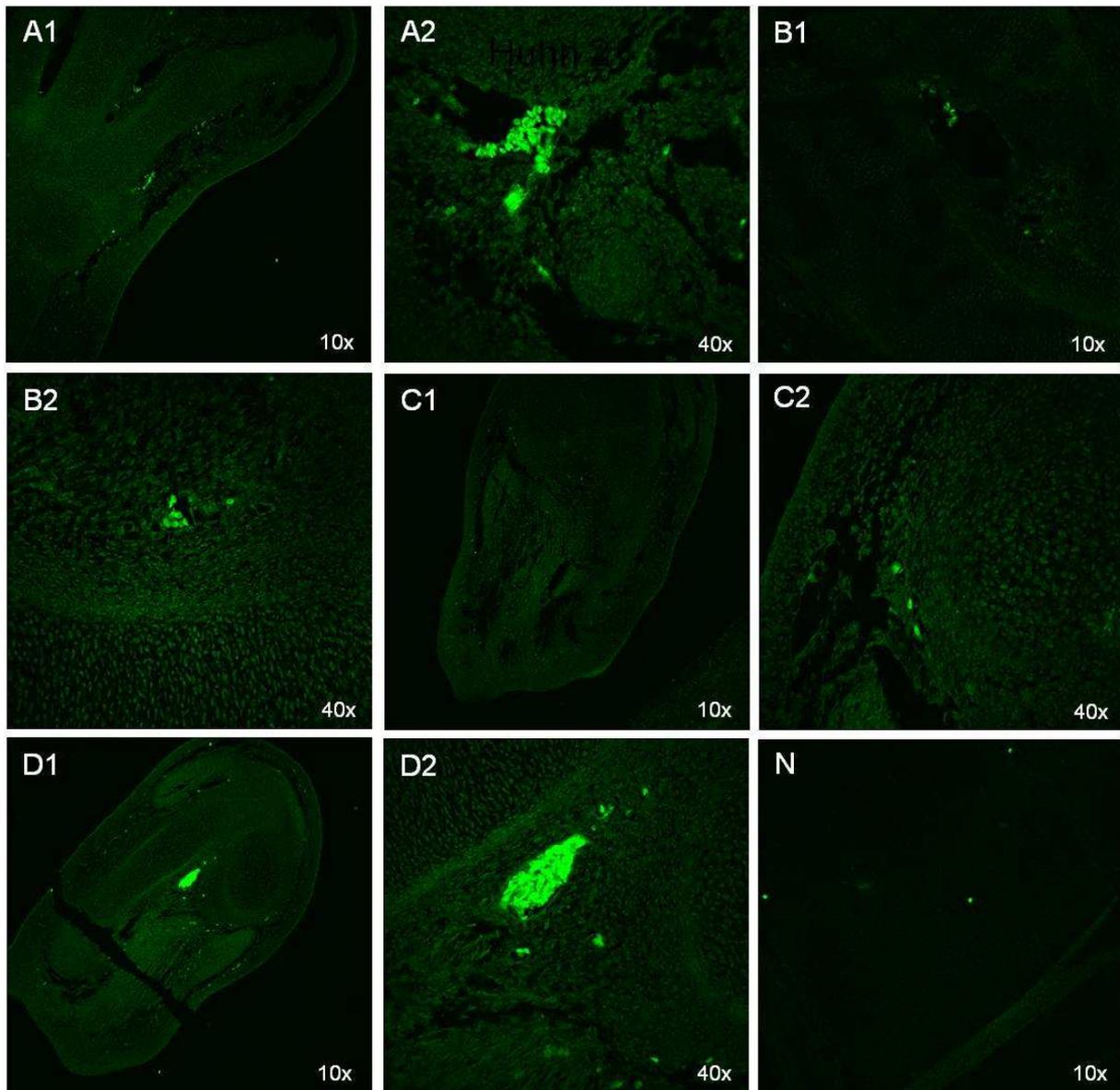


Abb. 3.34: Immunfluoreszenzen von RCASBP(A)NFIA-1StrepII-infizierten Bein- und Flügelanlagen

Die rechten Bein- und Flügelanlagen von Hühnerembryo Nummer 1 wurden mit RCASBP(A)NFIA-1StrepII-Viren infiziert. Die linken Bein- und Flügelanlagen wurden als Kontrolle nicht behandelt. Der Embryo wurde bis Stadium 21 bebrütet. Als Primärantikörper wurde der AMV-3C2 (s. 2.1.4.1) und als Sekundärantikörper ein Alexa 488 IgG (s. 2.1.4) eingesetzt. **A1 und 2:** nicht-infizierte linke Beinanlage. **B1 und 2:** infizierte rechte Beinanlage. **C1 und 2:** nicht-infizierte linke Flügelanlage. **D1 und 2:** infizierte rechte Flügelanlage. **N:** Negativkontrolle ohne Primärantikörper.

Bei dem Tier Nummer 2 sind Signale in den nicht-infizierten linken (Abb. 3.35, A1 und 2) und keine Signale in den rechten infizierten Beinanlagen (Abb. 3.35, B1 und 2) zu erkennen. Auch in den Flügelanlagen ist nur in den nicht-infizierten linken (Abb. 3.35, C1 und 2) und nicht in den rechten infizierten Gliedmaßen (Abb. 3.35, D1 und 2) ein Signal zu beobachten. Auch hier sind die Signale nicht im Knochenbereich zu sehen.

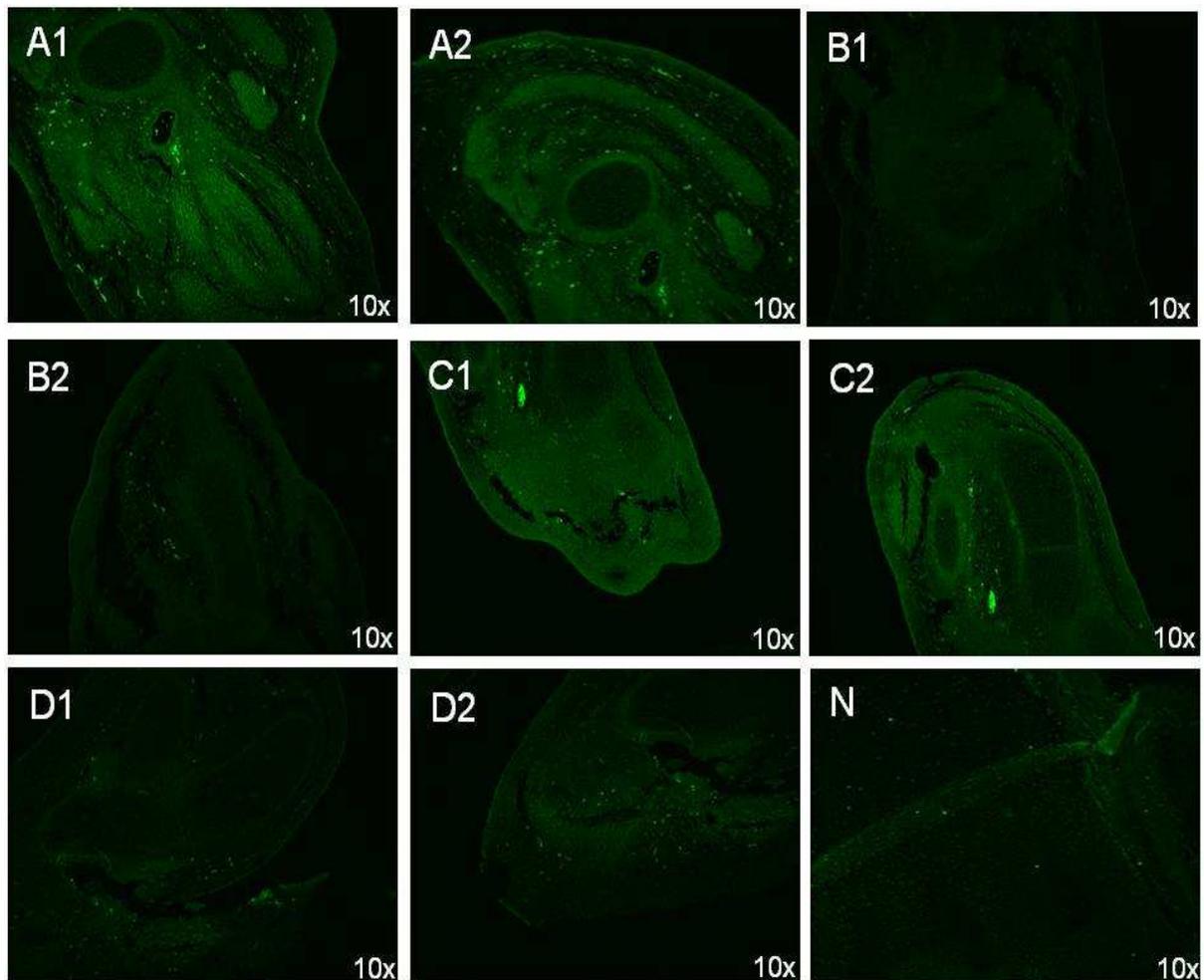


Abb. 3.35: Immunfluoreszenzen von RCASBP(A)NFIA-1StreptII-infizierten Bein- und Flügelanlagen

Die rechten Bein- und Flügelanlagen von Hühnerembryo Nummer 2 wurden mit RCASBP(A)NFIA-1StreptII-Viren infiziert. Die linken Bein- und Flügelanlagen wurden als Kontrolle nicht behandelt. Der Embryo wurde bis Stadium 21 bebrütet. Als Primärantikörper wurde der AMV-3C2 (s. 2.1.4.1) und als Sekundärantikörper ein Alexa 488 IgG (s. 2.1.4) eingesetzt. **A1 und 2:** nicht-infizierte linke Beinanlage. **B1 und 2:** infizierte rechte Beinanlage. **C1 und 2:** nicht-infizierte linke Flügelanlage. **D1 und 2:** infizierte rechte Flügelanlage. **N:** Negativkontrolle ohne Primärantikörper.

3.6 Lokalisation der Kollagene I und X sowie Matrilin 1 und ADAMTS 4 in Tibien von NFIA-KO Mäusen

In früheren Studien wurde eine NFI-Proteinbindestelle in der Silencerregion von Matrilin 1 identifiziert (Szabo *et al.*, 1995). Zudem konnte durch Gene Array-Analysen von Chondrozyten aus dem Hühnersternum eine (4,35-fach) höhere Transkription von Matrilin 1 in kranialen gegenüber kaudalen Chondrozyten festgestellt werden (Wurbs, 2010). Demnach wird angenommen, dass die Expression von Matrilin 1 auch *in vivo* durch NFIA-1 reguliert wird. Daher wurde hier die Verteilung von Matrilin 1 immunhistologisch an Tibien von NFIA-KO Mäusen im Vergleich zu heterozygoten

und WT Mäusen untersucht.

Für die histologische Expressionsanalyse wurden Paraffinschnitte von freipräparierten Knochen der Hinterextremitäten von neugeborenen WT, NFIA-KO und heterozygoten Mäusen angefertigt (s. 2.2.4.1). Sowohl bei den WT als auch bei den heterozygoten und den NFIA-KO Mäusen ist eine Matrilin 1-Färbung in der Ruhe-, proliferativen-, prähypertrophen- und hypertrophen-Zone zu erkennen. In NFIA-KO Mäusen konnte Matrilin 1 in der proliferativen, prähypertrophen und geringfügig in der hypertrophen Zone auch intrazellulär lokalisiert werden, wohingegen Matrilin 1 in WT Mäusen nicht intrazellulär vorkam. Bei heterozygoten Tieren waren diese Zelleinschlüsse ebenfalls nachweisbar. Die Intensität der Matrilin-1-Färbung dieser Einschlüsse war im Gegensatz zu NFIA-KO Mäusen jedoch schwächer (s. Abb. 3.36).

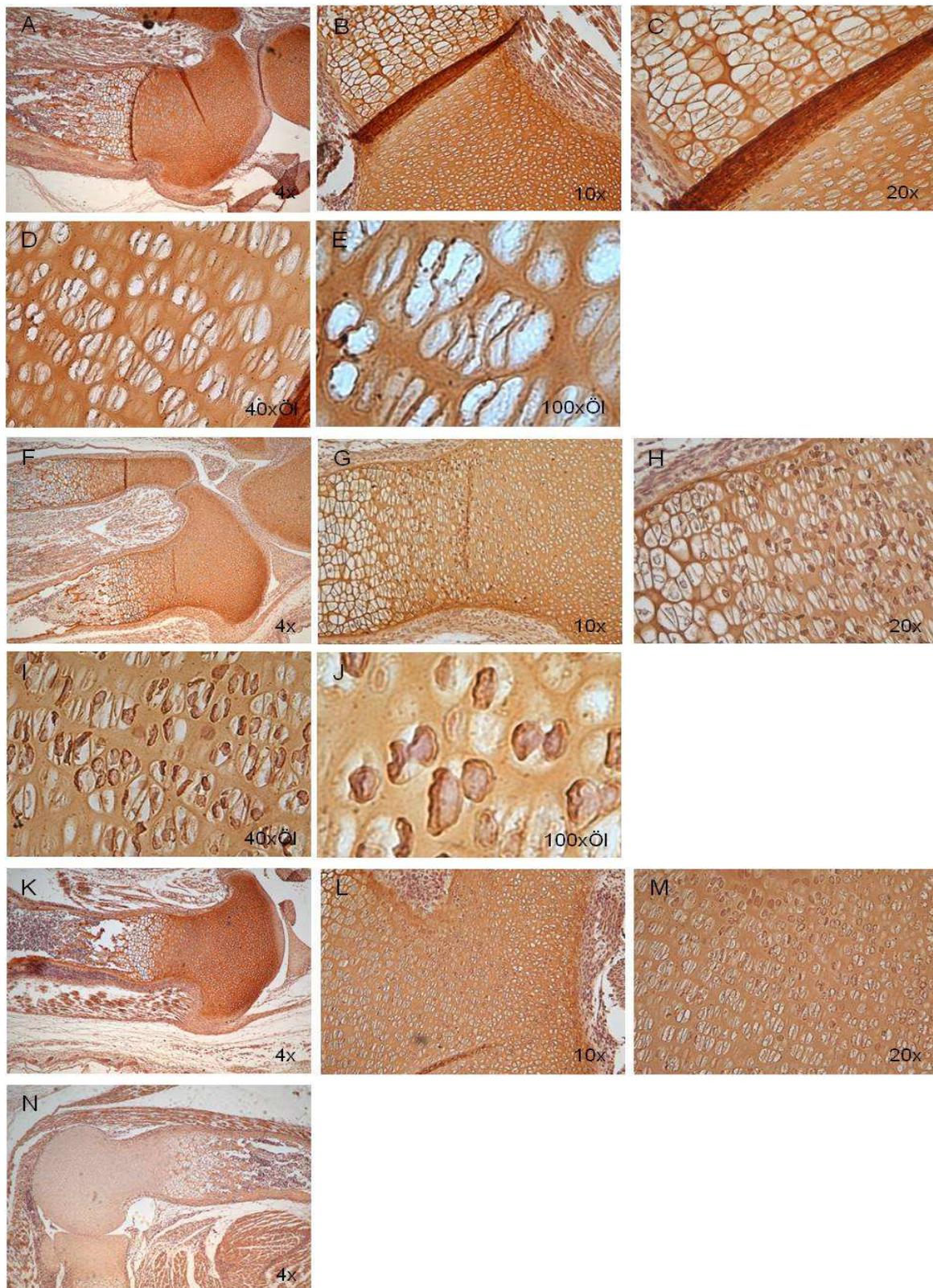


Abb. 3.36: Immunhistologische Lokalisation von Matrilin 1 in Tibien von WT, heterozygoten und NFIA-KO Mäusen

In den abgebildeten Paraffinschnitten ist die immunchemische Lokalisation von Matrilin-1 an der Braunfärbung zu erkennen (DAB-Färbung) **A-E:** WT Maus. **F-J:** NFIA-KO Maus. **K-M:** heterozygote Maus. **N:** Kontrolle ohne Primärantikörper

Wie in der Literatur beschrieben, stimuliert NFI die Transkription der $\alpha 2(I)$ -Kette (Nehls *et al.*, 1991). Daher wurde hier auch die Lokalisation von Kollagen I an Paraffinschnitten von Tibien aus NFIA-KO Mäusen vergleichend zu WT Mäusen untersucht. Dabei konnte kein Unterschied in der Verteilung des Kollagen I in Tibien aus NFIA-KO Mäusen und WT-Mäusen festgestellt werden (s. Abb. 3.37).

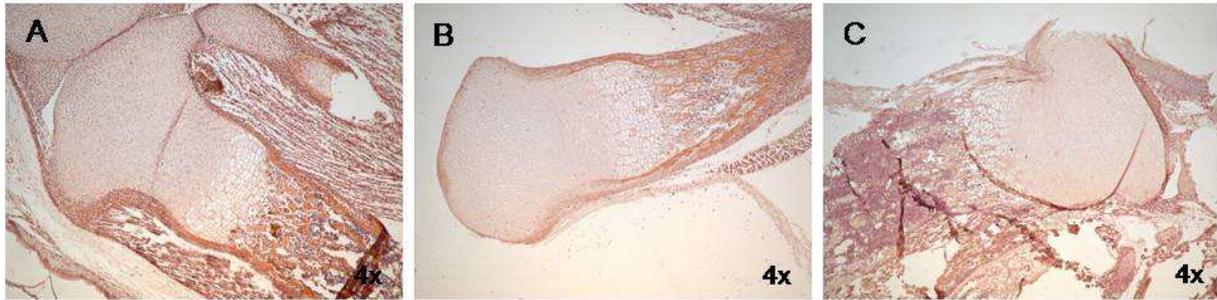


Abb. 3.37: Immunhistologische Lokalisation von Kollagen I in Tibien von WT und NFIA-KO Mäusen

In den abgebildeten Paraffinschnitten ist die immunchemische Lokalisation von Kollagen I an der Braunfärbung zu erkennen (DAB-Färbung). **A:** WT Maus. **B:** NFIA-KO Maus. **C:** Negativkontrolle

Aufgrund der negativ regulierenden Funktion von NFI auf den ADAMTS 4-Promoter in Chondrozyten (Mizui *et al.*, 2000) wurde auch hier nach einer Veränderung im Expressionsmuster in WT und NFIA-KO Mäusen geschaut. ADAMTS 4 konnte immunhistologisch nicht in Tibien von Mäusen nachgewiesen werden (s. Abb. 3.38).

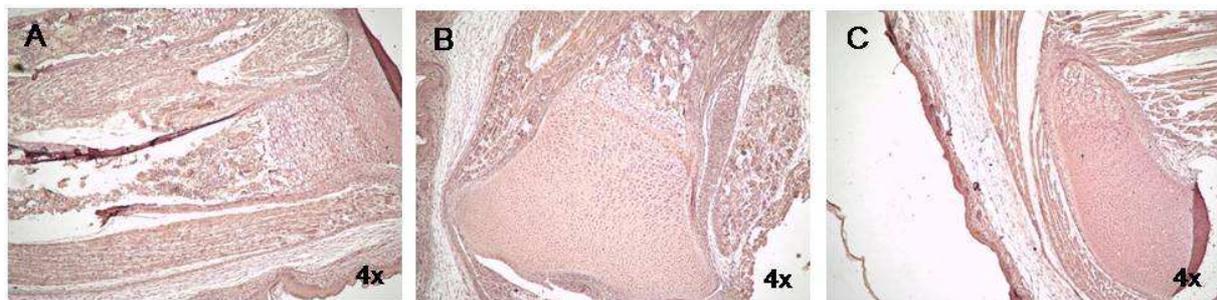


Abb. 3.38: Immunhistologische Lokalisation von ADAMTS 4 in Tibien von WT und NFIA-KO Mäusen

In den abgebildeten Paraffinschnitten ist die immunchemische Lokalisation von ADAMTS 4 an der Braunfärbung zu erkennen (DAB-Färbung). **A:** WT Maus. **B:** NFIA-KO Maus. **C:** Negativkontrolle

Aufgrund der Annahme, dass NFIA-1 die Hypertrophie kaudaler Chondrozyten inhibiert, was sich in der verminderten Expression von Kollagen X manifestiert, wurde

hier die Kollagen X-Expression in Paraffinschnitten von Tibien aus WT und NFIA-KO Mäusen untersucht. Kollagen X wurde ausschließlich im hypertrophen Bereich der Tibien gefunden. Genauere Betrachtungen der hypertrophen Zone in den WT und NFIA-KO Mäusen ergaben keine unregelmäßige Anordnung der Chondrozytenkolonnen.

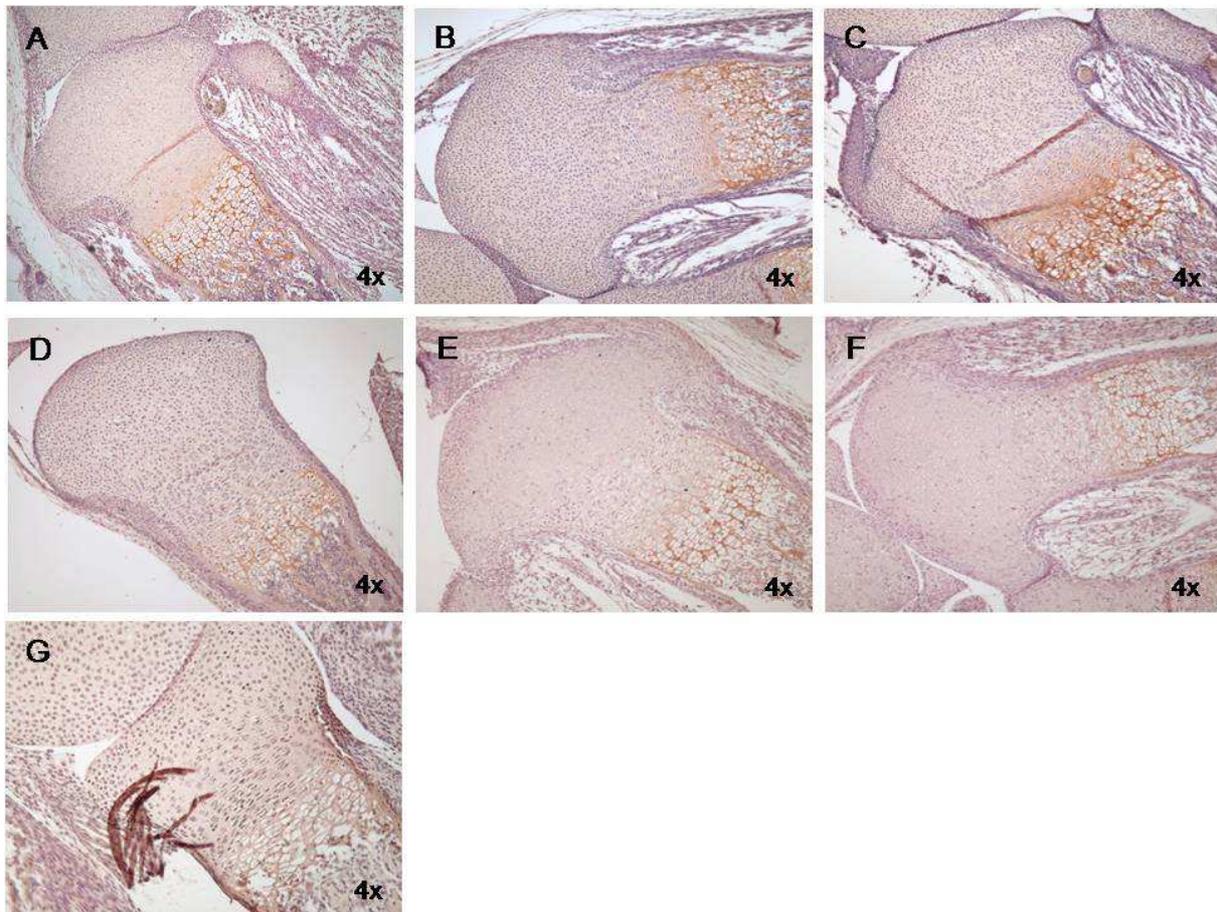


Abb. 3.39: Immunhistologische Lokalisation von Kollagen X in Tibien von WT und NFIA-KO Mäusen

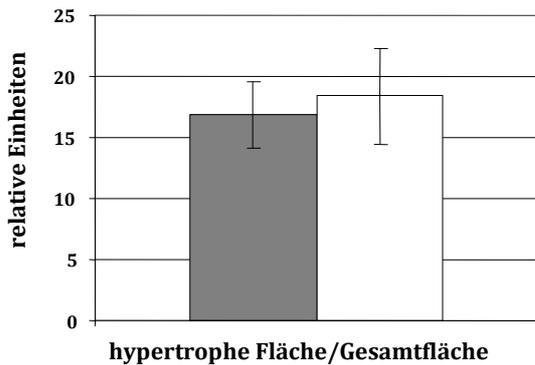
In den abgebildeten Paraffinschnitten ist die immunchemische Lokalisation von Kollagen X an der Braunfärbung zu erkennen (DAB-Färbung). **A-C:** WT Maus. **D-F:** NFIA-KO Maus. **G:** Negativkontrolle

Um unterschiedliche Ausmaße der hypertrophen Bereiche in WT und NFIA-KO Mäusen zu erkennen, wurden morphometrische Messungen vorgenommen. Hierbei konnten keine Unterschiede der NFIA-KO im Vergleich zu den WT Mäusen im Bereich der hypertrophen Zone zur Gesamtfläche (Epiphyse mit Wachstumsfuge ohne den bereits verknöcherten Bereich der Diaphyse) (s. Abb. 3.40, A), bei der Zellzahl der hypertrophen Zone (s. Abb. 3.40, C) und der Gesamtfläche (s. Abb. 3.40,

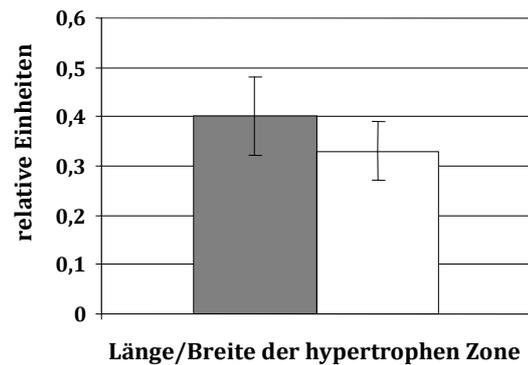
F) gemessen werden. Allerdings fällt das Verhältnis der Länge zur Breite im Bereich der hypertrophen Zone bei den NFIA-KO Mäusen geringfügig größer aus (s. Abb. 3.40, B). Das Verhältnis der Zellzahl zur Fläche der hypertrophen Zone fällt demnach in den NFIA-KO Mäusen geringer aus (s. Abb. 3.40, D).

Zusammenfassend nimmt bei gleichbleibender Zellzahl die Fläche der hypertrophen Zone bei NFIA-KO gegenüber WT Mäusen zu (s. Abb. 3.40, E).

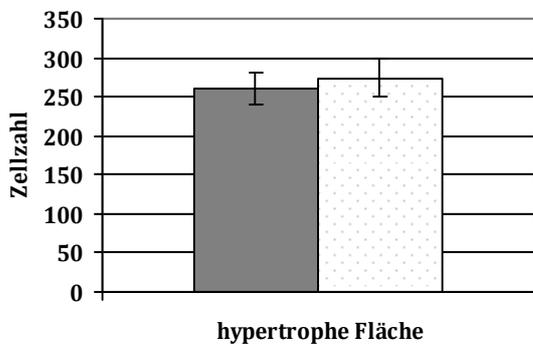
A



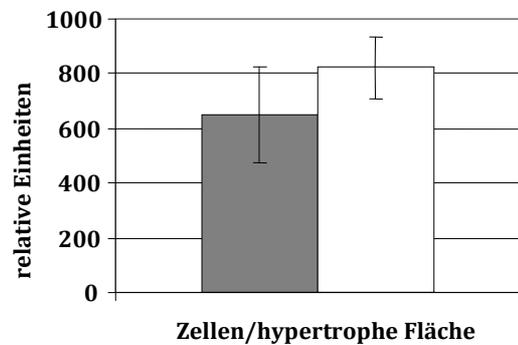
B



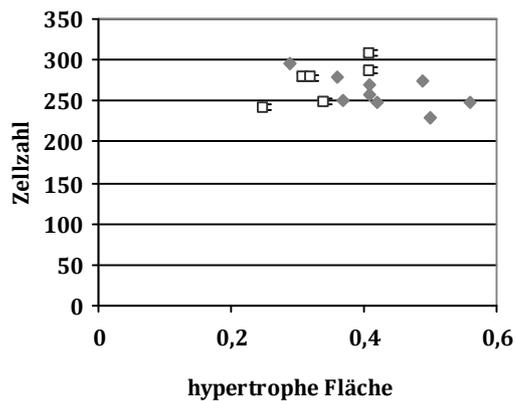
C



D



E



F

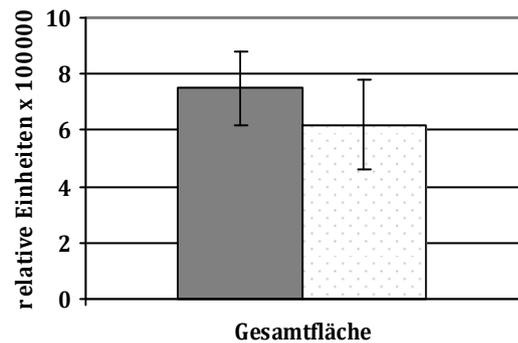


Abb. 3.40: Morphometrie der Kollagen X-angefärbten WT und NFIA-KO Mäusen

Es wurden zur Ausmessung Tibien-Schnitte von WT und NFIA-KO Mäusen verwendet, die mit einem Kollagen X-Primärantikörper (s. 2.1.4.1) und einem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat behandelt (s. 2.2.4.2) sowie mittels DAB-Substratlösung angefärbt wurden. **Dunkelgrau:** NFIA-KO Mäuse. **Hellgrau:** WT Mäuse. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder. n = 5 NFIA-KO Mäuse; 4 WT Mäuse

Hypertrophierende Chondrozyten zeigen einen Anstieg der Kollagen X-mRNA, simultan zu einer Abnahme der Kollagen II- und Kollagen IX-mRNA (Castagnola *et al.*, 1988). Aus diesem Grund wurden hier auch Kollagen II-Färbungen durchgeführt, die aber keine Unterschiede in der Verteilung in den Tibien von WT und NFIA-KO Mäusen zeigten.

3.7 Analyse der Knochen-Knorpel-Färbung von NFIA-KO, Heterozygoten und WT Mäusen

Für die Analyse der Knochen-Knorpel-Färbung wurde das gesamte Skelett von WT, NFIA-KO und heterozygoten Mäuseembryos gefärbt. Hierdurch ist eine Abgrenzung von Knochen zum Knorpel möglich. Somit können Unterschiede in der Abmessung der einzelnen Bereiche der Tibien von NFIA-KO gegenüber WT und heterozygoten Mäusen ermittelt werden.

Die angefärbten Skelette stammen aus zwei Würfen. Beim ersten Wurf handelt es sich um drei neugeborene NFIA-KO und zwei WT Mäuse, die direkt nach der Geburt von der Mutter entfernt wurden. Beim zweiten Wurf wurden die Mäuseembryos einer verstorbenen Maus heraus präpariert, so dass bei diesem Wurf die Entwicklung der Mäuse etwa zwei Tage vor Geburt gestoppt worden war. Dieser Wurf bestand aus sechs NFIA-KO Mäusen und einem WT Tier.

Durch die Skelett-Färbungen (s. Abb. 3.41) war zu erkennen, dass der Tibia-Knochenbereich bei den WT Mäusen geringfügig länger ist als bei den NFIA-KO Tieren (s. Abb. 3.42, A). Die Tibia-Gesamtlänge hingegen fällt bei den NFIA-KO Tieren etwas länger aus (s. Abb. 3.42, B), allerdings sind hier starke Schwankungen zu sehen. Betrachtet man aber nun das Verhältnis des Knochenbereiches zur Gesamtlänge der Tibia, so fallen diese bei den WT geringfügig größer aus als bei den NFIA-KO Tieren (s. Abb. 3.42, C).

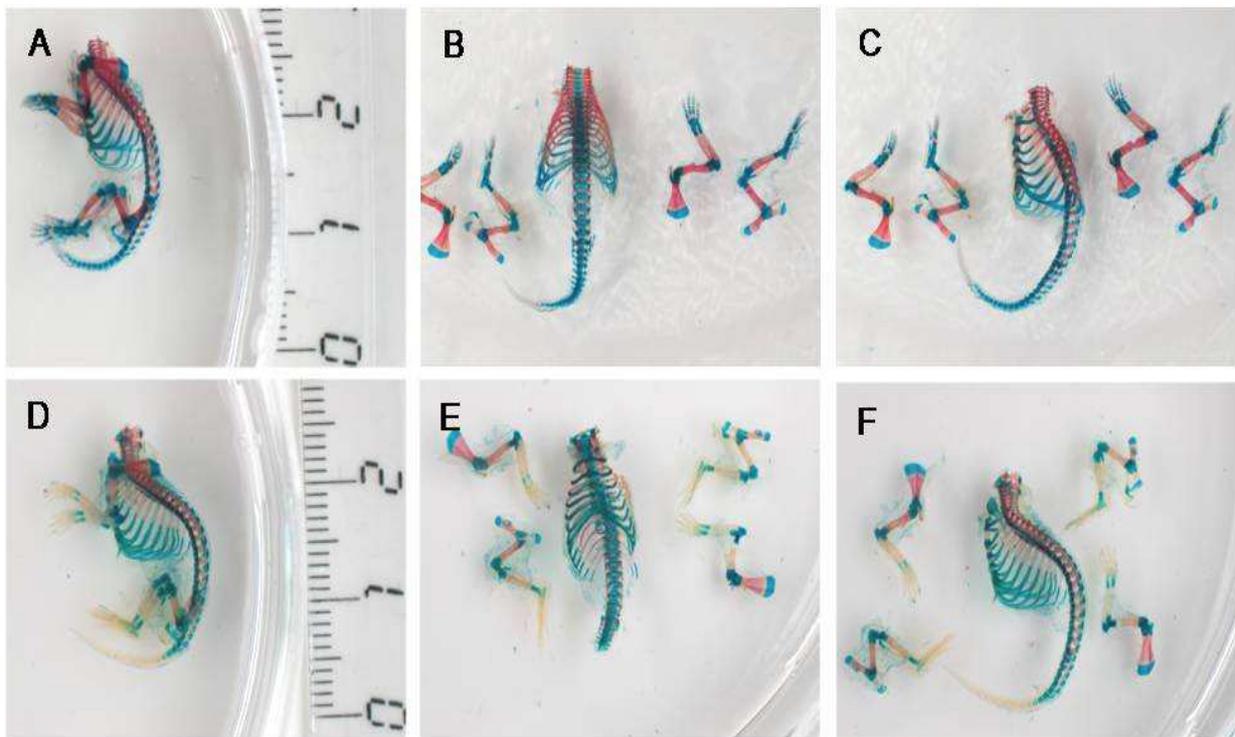
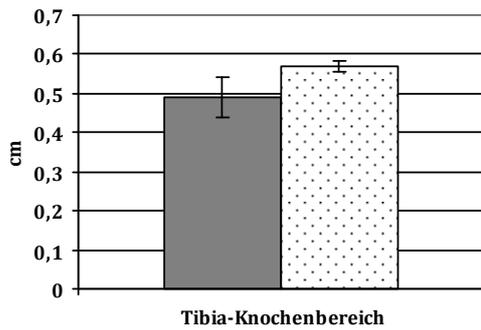


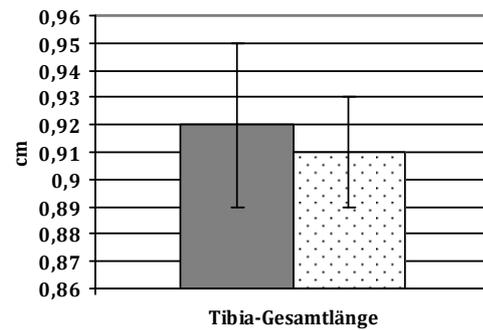
Abb. 3.41: Knochen-Knorpel-Färbung der zum Wurf 1 gehörenden Tiere

Das Knorpelgewebe der WT und NFIA-KO Skelette wurde mit Alcianblau und der Knochenanteil mit Alizarinrot angefärbt (s. 2.2.4.5). **A-C:** NFIA-KO Maus. **D-F:** WT Maus.

A



B



C

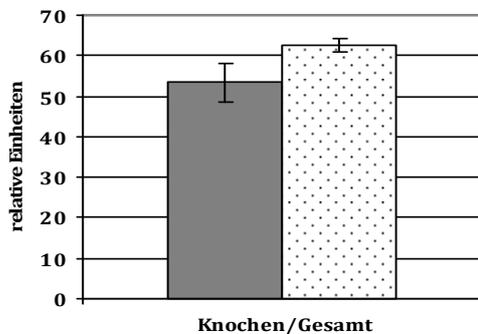


Abb. 3.42: Morphometrie der Knochen-Knorpel-Färbung der zum Wurf 1 gehörenden Tiere

Es wurden die Tibien von WT und NFIA-KO Mäusen vermessen. Hierzu wurden die Tibia-Knochenbereiche, Tibia-Gesamtlänge und das Verhältnis der beiden ermittelt. Durch Verwendung von Alzianblau und Alizarinrot Färbung wurde das Knorpelgewebe blau und der Knochen rot angefärbt (s. 2.2.4.5). **Dunkelgrau:** NFIA-KO Mäuse. **Hellgrau:** WT Mäuse.

Beim zweiten Wurf handelt es sich um vor der Geburt entnommenen Embryos. Auffällig bei diesem Wurf (s. Abb. 3.43) ist die Verknöcherung im Bereich des Schädels, die im Fall der WT Mäuse weitaus fortgeschrittener ist. Allerdings sind die Ausprägungen unter den NFIA-KO Mäusen auch sehr verschieden, so dass hier weiter nur eine Beobachtung beschrieben und keine Aussage getroffen wird. Anhand der Ausmessungen der Tibien ist allerdings zu sehen, dass der Tibia-Knochenbereich bei WT und KO Tieren gleich lang ist (s. Abb. 3.44, A). Auch die Tibia-Gesamtlänge fällt bei WT und KO Mäusen gleich aus (s. Abb. 3.44, B). Das Verhältnis vom Tibia-Knochenbereich zur Gesamtlänge ist ebenfalls gleich (s. Abb. 3.44, C).

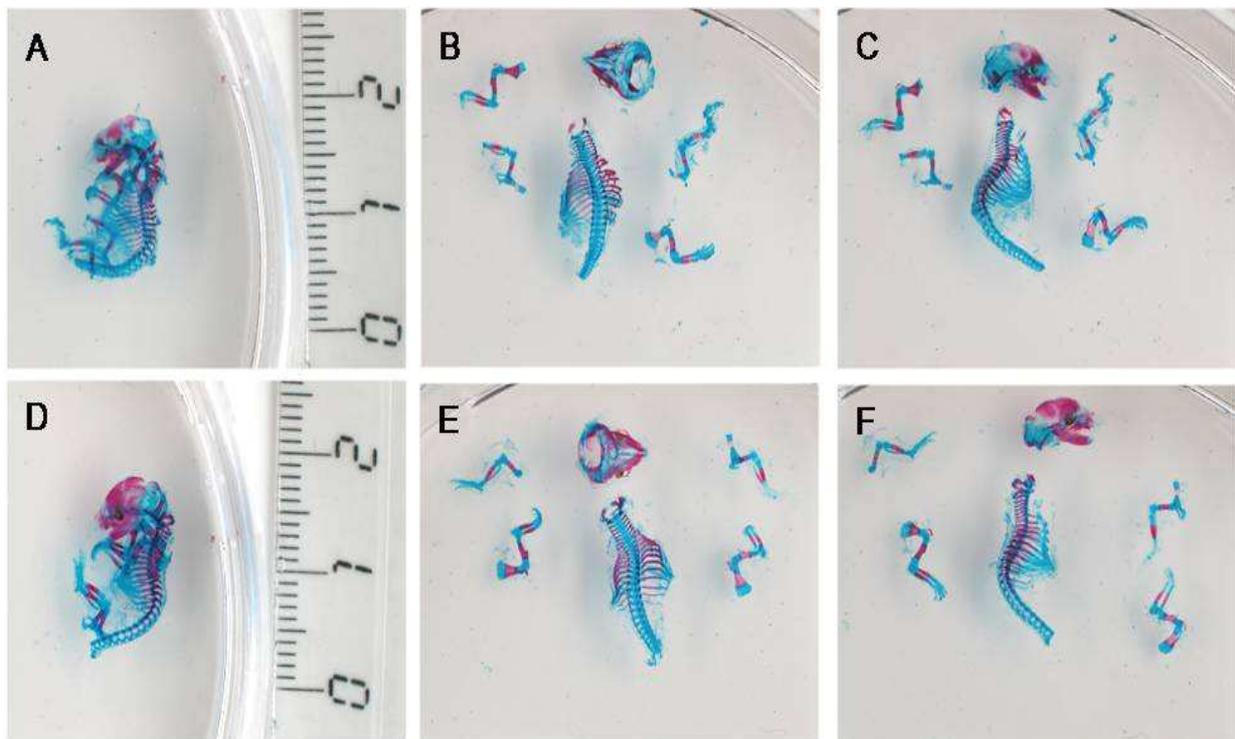
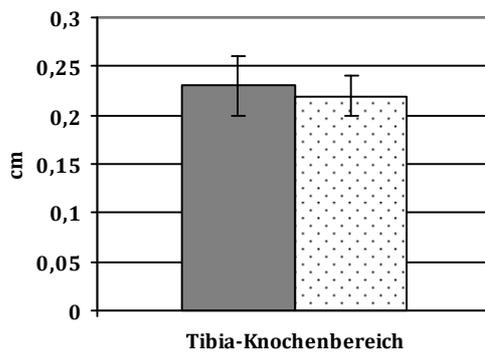


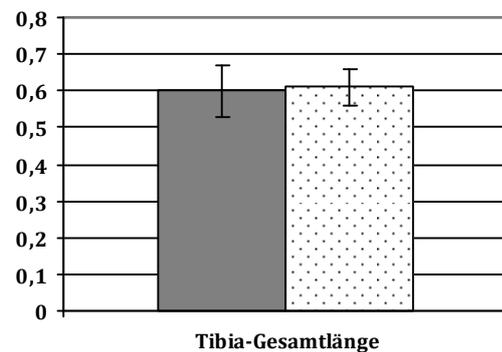
Abb. 3.43: Knochen-Knorpel-Färbung der zum Wurf 2 gehörenden Tiere

Das Knorpelgewebe der WT und NFIA-KO Skelette wurde mit Alcianblau und der Knochenanteil mit Alizarinrot angefärbt (s. 2.2.4.5). **A-C:** NFIA-KO Maus. **D-F:** WT Maus.

A



B



C

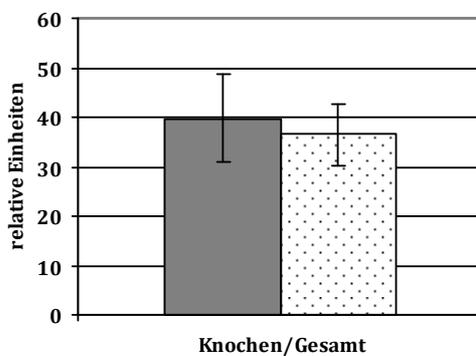


Abb. 3.44: Morphometrie der Knochen-Knorpel-Färbung der zum Wurf 2 gehörenden Tiere

Es wurden die Tibien von WT und NFIA-KO Mäusen vermessen. Hierzu wurden die Tibia-Knochenbereiche, Tibia-Gesamtlänge und das Verhältnis der beiden ermittelt. Durch Verwendung von Alzianblau und Alizarinrot Färbung wurde das Knorpelgewebe blau und der Knochen rot angefärbt (s. 2.2.4.5). **Dunkelgrau:** NFIA-KO Mäuse. **Hellgrau:** WT Mäuse.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein besseres Verständnis über die Hypertrophie von Chondrozyten zu gewinnen. Hierzu bietet das embryonale Hühnersternum die Möglichkeit, Chondrozyten in unterschiedlichen Differenzierungsstadien zu untersuchen. Zellen des kranialen Bereiches werden bereits im Ei hypertroph, wohingegen die kaudalen Zellen in ihrer Entwicklung blockiert sind (Lu Valle *et al.*, 1993). In Vorarbeiten konnte bereits anhand von Kokultorexperimenten gezeigt werden, dass kaudale Chondrozyten sowohl ihre eigene als auch die Differenzierung von mit IGF-1 oder Insulin zur Hypertrophie stimulierten, kranialen Chondrozyten inhibieren können (Böhme *et al.*, 1995). Um extrazelluläre Faktoren, Zellrezeptoren und zelluläre Signalvermittler zu identifizieren, die bei der Blockierung der Hypertrophie der kranialen Chondrozyten eine Rolle spielen, wurde eine subtraktive cDNA-Bank erstellt. Hierbei sollte ermittelt werden, welche Genprodukte in den kaudalen Zellen verstärkt exprimiert werden. Hierzu wurde in einer früheren Arbeit (Auge, 2004) die Methode der suppressiven subtraktiven Hybridisierung (Diatchenko *et al.*, 1996) gewählt. Dabei wurden dreizehn Klone gefunden, die eine hohe Homologie zum *Nuclear factor IA*, *Nuclear factor IA-1* und *Nuclear factor IA-2* der Spezies *Homo sapiens*, *Mus musculus* und *Rattus norvegicus* aufwiesen. Da NFI im Huhn bereits nachgewiesen wurde, es hohe Homologien zu anderen Spezies aufweist (Rupp *et al.*, 1990; Kruse *et al.*, 1991; Kruse und Sippel, 1994a; Gronostajski, 2000) und außerdem bereits in Chondrozyten Bindungsstellen für NFI-Proteine charakterisiert wurden (Szabo *et al.*, 1995), wurde die These aufgestellt, dass diese Transkriptionsfaktoren eine Rolle in der Blockierung der Hypertrophie spielen könnten. Da zum Zeitpunkt der im Jahre 2002 durchgeführten Blast-Analyse das Hühnergenom noch nicht vollständig sequenziert war, wurde eine Homologie zur Spezies Huhn angenommen (s. Abb. 3.1). Mittels Huhn-Isoform-spezifischer Primer wurde das Vorhandensein der gesamten NFIA-Mitglieder (Spleißvarianten) festgestellt, ferner wurde die differentielle Expression des Faktors NFIA-1 in den Zellen nachgewiesen. Bei einer erneuten Blast-Analyse 2004 zeigten die dreizehn Klone eine hohe Homologie zu einem Huhn EST-Klon chEST355d10. Zu einem späteren Zeitpunkt konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die chEST355d10-Sequenz tatsächlich zur NFIA-1-Sequenz gehört (s. 3.2.2).

4.1 Erhöhte Expression von NFIA-1/EST355d10 in kaudalen Chondrozyten

Um eine erhöhte Expression von NFIA-1/EST355d10 in kaudalen Chondrozyten nachzuweisen, wurden in einer vorangegangenen Arbeit (Auge, 2004) Virtual Northern Blots verwendet. Die isolierte RNA aus kaudalen und kranialen Chondrozyten wurde hierbei einer SMART-Amplifikation unterzogen. Die generierte cDNA wurde dann im Blot eingesetzt und es konnte ein Signal bei 2,1 kb nachgewiesen werden. In der Literatur wurden aber stets zwei Primärtranskripte bei 10,5 und 5 kb für NFIA beschrieben (Nebl *et al.*, 1994; Chaudhry *et al.*, 1997; Gronostajski, 2000). Als Grund für die Detektion nur eines Signals bei 2,1 kb auf den Virtual Northern Blots wurde eine selektive Amplifikation des SMART-Kits vermutet. Es wurde angenommen, dass die Primärtranskripte aufgrund ihrer Länge in der Lage sind Sekundärstrukturen auszubilden, so dass in der SMART-Amplifizierung nur die mRNA mit dem NFIA-ORF von 2,1 kb vervielfacht werden konnte. In der Literatur wird von langen 5' und/oder 3' nicht translatierten Bereichen gesprochen, die mutmaßliche ORFs tragen (Gronostajski, 2000). Es wird spekuliert, dass diesen Bereichen die Funktion von translationaler Regulation und der mRNA-Stabilität zukommt (Gronostajski, 2000). So führte die stabile Transfektion des aktivierten *H-ras* Gens in Mauszellen zu einer Herunterregulierung des NFI-C und NFI-X mRNA-Niveaus, ohne dass sich hierbei eine Veränderung der Transkription von NFI-C und NFI-X ergab. Allerdings war die Halbwertszeit beider mRNAs drastisch verkürzt (Nebl *et al.*, 1994). Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit auf RNA-Basis die differentielle Expression nachgewiesen werden, ohne eine Amplifizierung wie beim Virtual Northern Blot durchführen zu müssen.

Zur RNA-Extraktion aus kaudalen und kranialen Chondrozyten wurde nicht wie in der früheren Arbeit (Auge, 2004) mit einem RNeasy-Midi-Kit (Qiagen, Hilden, D) gearbeitet, sondern mit TRIzol (s. 2.2.1.17). Hierbei konnte eine 34-fach höhere Ausbeute der isolierten RNA erzielt werden. Diese Ausbeute war ausreichend, um ein Signal im Northern Blot zu erhalten (s. 3.1.1). Hierbei waren auch die in der Literatur beschriebenen Primärtranskripte des NFIA zu sehen (s. Abb. 3.2). Allerdings zeigte sich hier keine erhöhte Expression in kaudalen Chondrozyten im Vergleich zu kranialen (s. 3.1.1).

Als sensitivere Nachweismethoden für die differentielle Expression von NFIA-1 wurden die semi-quantitative PCR (s. Abb. 3.4) und die Real-Time PCR (s. Abb. 3.5) (durchgeführt von Herrn Dr. Echtermeyer) gewählt. Bei der semi-quantitativen PCR konnte nur eine leicht erhöhte Expression des NFIA-1 in kaudalen Chondrozyten nachgewiesen werden. Aus diesem Grund bot die Real-Time PCR als sensitivere Methode die Möglichkeit, auch in niedriger Kopienzahl transkribierte mRNA (wie etwa bei einem Transkriptionsfaktor) auf differentielle Expression hin zu untersuchen (Huggett *et al.*, 2005). Hierbei konnte eine deutlich höhere Expression des NFIA-1 in kaudalen Chondrozyten nachgewiesen werden (s. Abb. 3.5). Beide PCR-Methoden boten den Vorteil, dass durch spezifische Primer NFIA-1 nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der üblichen Sondenlänge von 600 bp beim Northern Blotting war hier nur ein Nachweis von NFIA möglich, da der spezifische Bereich in NFIA-1-Sequenz nur 39 bp beträgt. Zudem konnte auch durch die Gene-Array-Analysen eine erhöhte Expression des NFIA in kaudalen gegenüber kranialen Chondrozyten bestätigt werden (s. Tab. 3.1). Mit den Methoden der semi-quantitativen PCR, Real-Time PCR und des Gene Arrays konnten auf RNA-Basis eine differentielle Expression des NFIA-1 nachgewiesen werden.

4.2 NFIA und NFIB werden hauptsächlich in Chondrozyten exprimiert

Es ist bereits bekannt, dass im Huhn die Isoformen NFIA, B, C und X exprimiert werden und von diesen wiederum verschiedene Spleißvarianten existieren (Santoro *et al.*, 1988; Rupp *et al.*, 1990; Kruse und Sippel, 1994b; Osada *et al.*, 1996; Grunder *et al.*, 2003). In einer früheren Arbeit (Auge, 2004) wurde überdies nachgewiesen, dass in kaudalen und kranialen Chondrozyten des Huhns die Spleißvarianten NFIA-1 und NFIA-3 exprimiert werden. Hier wurde nun gezeigt, dass in kranialen und kaudalen Chondrozyten hauptsächlich die Isoformen NFIA und NFIB exprimiert werden (s. Abb. 3.6).

Im Hinblick auf die differentielle Expression des NFIA-1, die mittels Northern Blotting untersucht wurde, kann man aufgrund der Sondenlänge, die alle NFIA-Mitglieder erkennt, von einem Signal der NFIA-1- und der NFIA-3-Expression sprechen. Dies trifft auch auf die Gene Array-Analysen zu. Allerdings wurden mittels semi-quantitativer PCR und Real-Time PCR spezifisch nach einer differentiellen

Expression des NFIA-1 geschaut, welche in kaudalen Chondrozyten auch bestätigt wurde (s. 3.1.2 und 3.1.3). Zudem konnte hier gezeigt werden konnte, dass die EST355d10- und die NFIA-1-Sequenz auf derselben mRNA liegen (s. Abb. 3.8). Aus diesem Grund kann die unter Punkt 4.1 dargestellte erhöhte Expression in kaudalen Zellen dem NFIA-1 zugerechnet werden.

Allerdings konnte in den Gene Array-Analysen auch eine Erhöhung des NFIB (3,29-fach) in kaudalen Chondrozyten gezeigt werden (s. Tab. 3.2). Der in einigen Versuchen verwendete NFI-Antikörper unterscheidet nicht zwischen den NFI-Isoformen. Dies wiederum bedeutet, dass alle Experimente mit dem NFI-Antikörper (s. 2.1.4.1) nicht ausschließlich auf einen Effekt des NFIA-1 hindeuten müssen, was bei der Interpretation der mit diesem Antikörper erzielten Ergebnisse zu berücksichtigen ist. Ein spezifischer Antikörper für NFIA-1 ist kommerziell nicht erhältlich. Alle diesbezüglichen kommerziell verfügbaren Antikörper stellten sich nach Blast search-Analysen von deren Proteinsequenzen her als nicht NFIA-spezifisch heraus.

4.3 EST355d10-Sequenz ist Bestandteil der NFIA-1-mRNA

Aufgrund der Blast-Analysen im Jahr 2004, die nicht wie erwartet eine Homologie zum NFIA-1-Gen von *Gallus gallus* aufwiesen, sondern zum EST355d10, wurde der NFIA-1-Sequenzbereich auf Chromosom 8 genauer betrachtet (s. 3.2.1). Hier zeigte sich eine unmittelbare Nähe der NFIA-1- zur EST355d10-Sequenz, der Abstand betrug nur 146 bp. Es konnte anhand spezifisch ausgewählter Primer nachgewiesen werden, dass der *expressed sequence tag* EST355d10 auf der NFIA-1-mRNA liegt (s. Abb. 3.8).

Somit ist bestätigt, dass die NFIA-1-Sequenz für *Gallus gallus* in der Blast search-Datenbank unvollständig ist (seit 2004 bis heute), und es sich bei den 13 mittels der SSH-Methode identifizierten Klone um das Gen NFIA-1 des Huhns handelt. Auch ein Vergleich mit anderen Spezies zeigt, dass längere 3'-Sequenzbereiche bei der NFI Familie vertreten sind (s. 3.2.1) (Inoue *et al.*, 1990; Chaudhry *et al.*, 1997; Gronostajski, 2000), womit auch das Auftreten der Primärtranskripte beim NFIA im Northern Blot (s. Abb. 3.2) zu erklären ist.

4.4 Überexpression von NFIA-1 inhibiert die Hypertrophie kranialer Chondrozyten *in vitro*

Zunächst wurden optimale Bedingungen für eine Überexpression des NFIA-1 in kranialen Chondrozyten ermittelt. Hierzu wurden zwei Methoden getestet, zum einen die nicht-liposomale Transfektion mittels des Reagenz Fugene 6 und zum anderen die Elektroporationsmethode mittels Amaxa. Mit letzterer Methode konnte bereits eine effektive Transfektion in primären humanen Chondrozyten erzielt werden (Hamm *et al.*, 2002). Ergänzend wurden bei der Elektroporation mittels Amaxa mehrere Programme getestet. Als für Hühnerchondrozyten am besten geeignet erwies sich die Elektroporationsmethode von Amaxa mit dem Programm X05, bei welchem sich eine höhere Transfektionseffizienz und Vitalität der Zellen ergab (s. 3.3).

Unter Serum-freien Kulturbedingungen führt eine Stimulation von kranialen Chondrozyten mit Insulin, IGF-1 und T4 zur Synthese der Hypertrophiemarker Kollagen X und Alkalische Phosphatase (Böhme *et al.*, 1995; Szüts *et al.*, 1998). Um nun einen Effekt von NFIA-1 auf die Hypertrophie der Chondrozyten nachzuweisen, wurden vor diesem Hintergrund die Kollagen X- und Alkalische Phosphatase-Synthese in stimulierten sowie nicht-stimulierten kranialen Chondrozyten genauer betrachtet. Hierbei zeigte sich, dass das Verhältnis von Kollagen X zu Kollagen II in beiden Versuchen in den mit NFIA-1-transfizierten und stimulierten Chondrozyten am geringsten ausfiel (s. Abb. 3.14). Auch bei den nicht-stimulierten mit NFIA-1-transfizierten Chondrozyten ließ sich dieser Effekt beobachten, außer bei Versuch B, wo das Verhältnis X/II wegen der geringen Signalstärke von Kollagen X nicht mehr zu ermitteln war. Dies bestätigt die Vermutung, dass NFIA-1 einen blockierenden Effekt auf die Hypertrophie der Chondrozyten hat und daher auch erhöht in kaudalen Chondrozyten exprimiert wird. In dem unter A dargestellten Versuch wurde das FKS-haltige Medium, in das die Chondrozyten nach der Transfektion aufgenommen wurden, nicht entfernt, so dass in der Agarosekultur noch FKS-Reste vorhanden waren. Diese FKS-Reste sind in der Lage, auch bei nicht-stimulierten Chondrozyten, eine Kollagen X-Expression hervorzurufen (s. Abb. 3.14, A). Im Vergleich dazu ist in Versuch B (FKS-haltige Medium nach der Transfektion entfernt) bei den nicht-stimulierten Zellen keine Kollagen X-Expression zu sehen. Abweichend von einer früheren Arbeit (Auge, 2004) ist in keinem Experiment eine stimulierende Wirkung

des NFIA-1 auf die Kollagen X-Expression zu beobachten, so dass man definitiv von einem Transkriptionsfaktor mit negativer Regulationswirkung auf die Hypertrophie sprechen kann. Die in früheren Studien getroffene Annahme, dass NFIA-1 eine stimulierende Wirkung auf die Hypertrophie der kranialen Chondrozyten habe (Auge, 2004), kann mit dem noch in geringen Mengen im Medium dieser Kulturen vorhandenen FKS erklärt werden. Wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, besitzen FKS-Reste die Fähigkeit, die Hypertrophie in nicht-stimulierten Chondrozytenkulturen zu induzieren (s. Abb. 3.14).

Im Hinblick auf die Aktivität der Alkalische Phosphatase hat, wie zuvor schon beschrieben, der verbliebene FKS-Rest in Versuch A einen Einfluss auf die Hypertrophie der Zellen (s. 3.3.2). In Versuch A zeigt sich der FKS-Einfluss bei den NFIA-1-transfizierten Zellen durch eine höhere Aktivität der Alkalische Phosphatase (s. Abb. 3.15, A). Indes wären hier bei einem blockierenden Effekt des NFIA-1 auf die Hypertrophie geringere Alkalische Phosphatase-Werte zu erwarten. Allerdings wird bei der Aktivitätsmessung der Alkalischen Phosphatase lediglich die gleiche Menge an Medium verwendet; somit erfolgt kein Abgleich der eingesetzten Proteinmenge wie bei der Kollagenpräparation. Eine geringere Vitalität der mit CMV-transfizierten und untransfizierten Zellen hätte demnach eine Auswirkung auf eine geringere Alkalische Phosphatase-Synthese im Vergleich zu den NFIA-1-transfizierten Zellen. In Versuch B ist hingegen die Aktivität der Alkalischen Phosphatase bei den NFIA-1-transfizierten Zellen am geringsten, sowohl bei den stimulierten wie auch bei den nicht-stimulierten Zellen. Dies bestätigt die Annahme, dass NFIA-1 die Hypertrophie der Chondrozyten blockiert, da die Alkalische Phosphatase, ein Hypertrophiemarker, in diesen Zellen in geringeren Maßen synthetisiert wird. Außerdem scheint die Transfektion eines Leervektors auch eine Auswirkung auf die Hypertrophie der Zellen zu haben, da hier die Aktivität der Alkalische Phosphatase geringer ausfällt als bei den untransfizierten Zellen (Abb. 3.15, B).

Da für diese Versuche verschiedene Pools von isolierten primären Chondrozyten verwendet wurden, kann es zu Schwankungen in der Genexpression kommen. Zum Zeitpunkt der Präparation beinhaltet der kraniale Bereich eines Sternums unterschiedlich reife Zellen (Iwamoto *et al.*, 1993). Zudem bedingt eine Fülle von unterschiedlichen Hormonen und Wachstumsfaktoren das Expressionsmuster (Cancedda *et al.*, 1995). Außerdem kann das Verhältnis der spät-proliferativen zu den früh-proliferativen Zellen bei den Präparationen der Chondrozyten aus den

Sterna jedes Mal unterschiedlich ausfallen, was sich wiederum auch auf das Expressionsmuster auswirkt (D'Angelo und Pacifici, 1997; Szüts *et al.*, 1998). Vor diesem Hintergrund sind Schwankungen in den Hypertrophiemarkern Kollagen X und Alkalische Phosphatase zu erklären.

Durch Abnahme der Kollagen X-Synthese in NFIA-1-transfizierten, kranialen Chondrozyten konnte ein blockierender Effekt auf die Hypertrophie der Zellen gezeigt werden. Die Expression des Kollagen X findet spezifisch nur in hypertrophen Chondrozyten statt und wird in erster Linie auf Transkriptionsebene reguliert, was durch *in situ*-Hybridisierungs- und Nuklear-run-off-Experimenten gezeigt werden konnte (LuValle *et al.*, 1989; Linsenmayer *et al.*, 1991; Long *et al.*, 1998). Im distalen Bereich des humanen Kollagen X-Promotors wurden negativ regulierende additive Elemente identifiziert, die in Ruhechondrozyten die Kollagen X-Synthese inhibieren. Des Weiteren wurde eine Chondrozyten-spezifische Enhancerregion im proximalen Bereich lokalisiert, welche in hypertrophen Chondrozyten aktiviert ist (Beier *et al.*, 1997). In dieser Region des humanen COL10A1-Gen befindet sich ein zusätzliches PTH/PTHrP-Response-Element, welches mehrere Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor AP1 aufweist (Riemer *et al.*, 2002). Diese negativ und positiv regulierenden Elemente wurden auch im Huhn-spezifischen Kollagen X-Promotor gefunden (Beier *et al.*, 1997; Long *et al.*, 1998; Dourado and LuValle, 1998). Durch EMSA-Experimente konnten den SP-Transkriptionsfaktoren eine Rolle in der Gewebe-spezifischen Expression des Kollagen X zugewiesen werden (Long *et al.*, 1998). In weiteren Experimenten konnte verifiziert werden, dass dem SP1 eine inhibitorische und dem SP3 eine aktivierende Funktion auf die Kollagen X-Expression zukommt. Das Verhältnis der beiden SP-Transkriptionsfaktoren zueinander reguliert die Transkription des Kollagen X. So ist das SP3/SP1 Verhältnis in nicht-hypertrophierenden Chondrozyten niedrig, wohingegen das Verhältnis in hypertrophierenden Chondrozyten erhöht ist. Es konnte gezeigt werden, dass eine Zerstörung der SP1 und SP3 Interaktion mit Mithramycin die Reporteraktivität des Kollagen X-Promotors drastisch reduziert (Magee *et al.*, 2005). Dieser Effekt konnte in umgekehrter Weise bei der Expression des Kollagen $\alpha 1(\text{II})$ -Genes gezeigt werden. Hier inhibiert ein ansteigendes SP3/SP1-Verhältnis die Kollagen II-Expression (Chadjichristos *et al.*, 2002; Chadjichristos *et al.*, 2003). Es konnte außerdem noch zwischen SP1 und SP3 eine *Dlx*-Bindestelle identifiziert werden. Durch Überexpression von *Dlx5* in nicht-hypertrophierenden Chondrozyten konnte eine

direkte positive Regulation des Kollagen X-Promotors nachgewiesen werden (Magee *et al.*, 2005). Dies beschreibt zwar noch keine direkte Beteiligung der NFI-Transkriptionsfaktoren an der Kollagen X-Expression, allerdings konnte eine konservierte SP1-Bindestelle des U2-Enhancers vollständig durch NFI ausgetauscht werden (Janson *et al.*, 1989). Außerdem wurden sowohl auf der murinen als auch auf der humanen Kollagen $\alpha 1(I)$ -Promotorsequenz überlappende Tandem-NFI/SP1-Bindestellen identifiziert (Nehls *et al.*, 1991; Artlett *et al.*, 1998). Aus diesem Grund wäre eine direkte Bindung der NFI-Transkriptionsfaktoren innerhalb des Kollagen X-Promotors nicht ausgeschlossen, allerdings zu diesem Zeitpunkt noch nicht identifiziert worden.

Ebenfalls in prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten wird Runx2 exprimiert; dieser Transkriptionsfaktor bewirkt hier mit BMP-aktivierten Smads1 und 5 die Kollagen X-Synthese (Leboy *et al.*, 2001). Zunächst wurde eine Runx2-Bindestelle innerhalb des proximalen 4 kb umfassenden Kollagen $\alpha 1(X)$ -Promotors beschrieben. Allerdings konnte die Runx2-Bindestelle in späteren *in silico*-Analysen innerhalb der 90 bp Enhancerregion nicht identifiziert werden (Drissi *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2009). Daher wurde über ein weiteres cis-Element oder über multiple Transkriptionsfaktoren, die bei der Kollagen $\alpha 1(X)$ -Expression mitwirken könnten, spekuliert (Zheng *et al.*, 2009). Aus diesem Grund ist eine direkte negative Regulation des NFIA-1 auf die Kollagen X-Synthese weiterhin denkbar.

Zudem wurden in der Promotorregion des Runx2 Bindungsstellen für NFI und AP1 identifiziert. Beide Transkriptionsfaktoren stehen in einem konkurrierenden Verhältnis, wobei NFI als Repressor und AP1 als Induktor fungiert (Zambotti *et al.*, 2002). Da in einer früheren Arbeit der Transkriptionsfaktor NFIA-1 in kaudalen Chondrozyten als erhöht exprimiert identifiziert wurde (Auge, 2004), könnte NFIA-1 einen Effekt auf die Runx2-Synthese haben. Folglich würde eine erhöhte NFIA-1-Expression, wie in kaudalen Chondrozyten gezeigt, die Expression des Runx2 inhibieren und somit die Hypertrophie blockieren. In kranialen Zellen hingegen ist das NFIA-1-Niveau niedriger und AP1 kann mit einer höheren Wahrscheinlichkeit an den Runx2-Promotor binden. Dadurch erfolgt die Synthese des Runx2, welches wiederum an die Kollagen X-Promotorregion bindet und Kollagen X-Synthese induziert. Dies wäre eine Erklärung für die Abnahme der Kollagen X-Expression in kranialen Chondrozyten, in denen NFIA-1 überexprimiert wurde.

Wie bereits oben beschrieben, wurde in der Promotorregion des humanen COL10A1-Gens ein zusätzliches PTH/PTHrP-Response-Element identifiziert, welches mehrere Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor AP1 aufweist (Riemer *et al.*, 2002). Da zudem sowohl eine NFI- als auch eine AP1-Bindungsstelle in der Runx2-Promotorregion identifiziert wurde (Zambotti *et al.*, 2002) und beide Transkriptionsfaktoren in einem konkurrierenden Verhältnis zueinander stehen, wäre eine direkte Regulation des NFI auf die Kollagen X-Expression weiterhin denkbar. Somit könnte eine noch nicht identifizierte NFI-Bindungsstelle in der Promotorregion des COL10A1-Gens vorhanden sein.

Es kann jedoch ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, dass NFI auch durch die SP- und AP-Transkriptionsfaktoren reguliert wird, da auf der Promotorsequenz des NFIA-Gens (isoliert aus Rattenlebern) bereits putative SP1- und AP2-Bindestellen identifiziert wurden (Xu *et al.*, 1997). SP1 und AP2 könnten durch Bindung an die Promotorsequenz die NFI-Expression in kranialen Chondrozyten inhibieren, so dass AP1 an den Runx2-Promotor binden kann und die Expression des Runx2-Gens aktiviert. Runx2 induziert durch Bindung an den Kollagen X-Promotor dessen Expression.

4.5 NFIA-1-Silencing in kaudalen Chondrozyten hat keinen induzierenden Einfluss auf die Hypertrophie *in vitro*

Anhand einer semi-quantitativen PCR kann ein *Knockdown* des NFIA-1 bei den mit NFIA-1-gesilencten Chondrozyten verglichen mit den scrambled-transfizierten auf RNA-Ebene nachgewiesen werden (s. Abb. 3.17). Um einen möglichen Effekt auf die Hypertrophie zu untersuchen, wurde das Kollagen X/II-Verhältnis ermittelt. Hierbei zeigte sich allerdings, dass der *Knockdown* des NFIA-1 eher wie bei der Überexpression des Gens einen blockierenden Effekt auf die Kollagen X-Expression hat (s. Abb. 3.19). Allerdings wurde eine gegenteilige Wirkung erwartet. Auch bei der Alkalischen Phosphatase fielen gerade bei den mit NFIA-1-gesilencten Chondrozyten die Werte am niedrigsten aus (s. Abb. 3.20 und Abb. 3.21). Ein Grund könnte ein kompensatorischer Effekt des NFIB sein, so dass es zu keiner Auswirkung des NFIA-1-*Knockdowns* kommt. Anhand des Gene Arrays ist allerdings NFIB in kaudalen Chondrozyten 3,29-fach hochreguliert (s. 3.1.4). Hinzu kommt, dass die beiden verwendeten RNAi-Oligonukleotide zum einen NFIA-1, zum anderen aber auch

NFIA, NFIA-5 und NFIA-6 silencen (s. 2.2.3.5.1). Somit könnte das NFIA-3, welches in einer vorherigen Arbeit in Chondrozyten als transkribiert identifiziert wurde (Auge, 2004), eine kompensatorische Rolle spielen. Die Bindung des NFIA-3 an ein NFIA-1-Zielgen wäre möglich, da der N-terminale-DNA-bindende Bereich dieser Proteinfamilie hoch konserviert ist (Meisterernst *et al.*, 1989; Rupp *et al.*, 1990; Kruse *et al.*, 1991; Kruse und Sippel, 1994a; Gronostajski, 2000). Der C-terminale Bereich der NFI-Proteine hingegen besitzt eine aktivierende oder reprimierende Funktion auf die Transkription der betreffenden Gene (Gronostajski, 2000). Somit könnte es bei einem kompensatorischen Effekt durch NFIA-3 aufgrund des unterschiedlichen C-terminalen Bereiches statt zu einer Repression zu einer Aktivierung der Hypertrophie kommen. Bislang wurde die Aktivierung und Repression von Genen nicht einzelnen Splicevarianten zugeordnet. Ein gesamter *Knockdown* der NFIA- und zusätzlich der NFIB-Familiemitglieder wäre zur Aufklärung hilfreich.

Es wurde durch semi-quantitative PCR nach einem Effekt des NFIA-1-*Silencing* auf die Matrilin 1-, 3- und Kollagen VI-Transkription gesucht (s. 3.4.3). Es ist bekannt, dass NFI an die Silencerregion des Matrilin 1 bindet (Szabo *et al.*, 1995) und dass sowohl Matrilin 1 als auch Matrilin 3 in knorpeligem Gewebe exprimiert werden (Budde *et al.*, 2005). Zusätzlich fungieren beide als Adapter für Kollagen VI. Matrilin 1 assoziiert mit Kollagen II-haltigen Fibrillen (Winterbottom *et al.*, 1992) und Matrilin 3 interagiert mit Kollagen IX (Budde *et al.*, 2005), so dass diesen beiden Matrilinen eine Rolle als Regulator der Kollagen-Fibrillogenese und der Kollagen-Netzwerkorganisation zugeordnet wird. Dies deutet auf eine ähnliche biologische Funktion der beiden Matrilinen hin (Nicolae *et al.*, 2007). Matrilin 3 ist zudem in der Lage, mit Matrilin 1 Heterotrimere zu bilden (Wu und Eyre, 1998). Die Transkription des Matrilin 1-Gens findet in der Reifungszone (prähypertrophen Zone) der Wachstumsfuge statt, wohingegen das Matrilin 1-Protein sowohl in der Reifungszone als auch in der hypertrophen Zone präsent ist (Chen *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996). Während der Chondrozytenreifung in der hypertrophen Zone endet die Transkription des Matrilin 1-Gens, und die des Kollagen X beginnt. Somit scheint Kollagen X abhängig vom Matrilin 1-Protein zu sein, was bislang aber nicht bestätigt werden konnte. Aufgrund dessen wurde nach einem Effekt des NFIA-1-*Silencing* auf die Matrilin 1-, 3- und die Kollagen VI-Transkription gesucht.

Hinsichtlich der Matrilin 1-Transkription wurde nur eine Erhöhung in scrambled-transfizierten im Vergleich zu NFIA-1-gesilenceten Chondrozyten ermittelt (s. Abb.

3.22). Da bekannt ist, dass NFI an die Silencerregion des Matrilin 1 binden kann, wäre durch einen *Knockdown* des NFIA-1 eine vermehrte Transkription des Matrilin 1-Gens zu erwarten. Anhand dieser Ergebnisse kann kein Einfluss des NFIA-1-*Silencings* auf die Matrilin 1-Transkription identifiziert werden. Allerdings wird in der Literatur nicht verifiziert, welche Isoformen des NFI an die Matrilin 1-Silencerregion binden (Szabo *et al.*, 1995), so dass trotz eines NFIA-1-*Knockdowns* weiterhin NFIB und NFIA-3 binden könnten, und somit kein Effekt auf die Matrilin 1-Transkription sichtbar ist. Weiterhin wurde nach einem Effekt auf die Matrilin 3- und Kollagen VI-Transkription gesucht. Bei beiden Versuchen ergab sich in NFIA-1-gesilenceten Chondrozyten eine höhere Transkription als in den scrambled-transfizierten Zellen (s. Abb. 3.22). Um aber hier von einem Effekt des NFIA-1-*Knockdowns* sprechen zu können, müssten weitere Versuche durchgeführt werden, da mit nur zwei Versuchen keine verlässliche Aussage getroffen werden kann. Außerdem traten bei der erhöhten Matrilin 3-Transkription in NFIA-1-gesilenceten Chondrozyten im Vergleich beider Versuche recht hohe Schwankungen auf, was aber auf die in Punkt 4.3 beschriebene Tatsache zurückzuführen oder durch die Verwendung von verschiedenen Pools isolierter primärer Chondrozyten, die hinsichtlich ihrer Genexpression voneinander abweichen, zu erklären ist.

In diesen Versuchen wurde ein *Knockdown* des NFIA-1 durch semi-quantitative PCR nach 3 - 5 Tagen nachgewiesen (s. 2.2.3.5.1). Da aber die Chondrozyten 14 Tage in Kultur gehalten werden müssen, um eine Kollagen X- und Alkalische Phosphatase-Expression nachweisen zu können, kann sich der *Silencing*-Effekt in dieser Zeitspanne durch den Abbau der RNAi-Oligonukleotide schon aufgehoben haben (s. 2.2.2.11). Ein *Silencing* des spezifischen Zielgens, wie dem NFIA-1, kann zwar grundsätzlich erfolgen; aufgrund einer Degradation aller mRNA-Transkripte in der Zelle, die partielle Komplementarität zum eingesetzten RNAi-Oligonukleotid aufweisen können, kann es dabei allerdings auch zu einer Regulation anderer Gene kommen (Jackson *et al.*, 2003). Somit können phänotypische Veränderungen fälschlicherweise als Effekt des gesilenceten Gens gedeutet werden. Vor diesem Hintergrund ist es fraglich, ob diese Methode für eine 14-tägige Chondrozytenkultur überhaupt geeignet ist.

4.6 Funktionalitätsanalyse des RCASBP(A)NFIA-1StreptII-Virus

Mit der Virusinfektion sollte eine weitere Methode zur Überexpression von NFIA-1 etabliert werden, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* angewendet werden kann. Da die Chondrozyten in Kultur eher gering proliferieren und erst durch ein geeignetes Stimulans dazu gebracht werden können (Böhme *et al.*, 1992), wurde die Methode der Virusinfektion gewählt. In der Literatur wird die Infektionseffizienz mit Rous Sarcoma Viren bei Zellen mit geringen Zellteilungsraten als recht hoch beschrieben (Hatzioannou und Goff, 2001).

Mit RCASBP(A)NFIA-1StreptII-Virus infizierten und nicht-infizierten DF1 Zellen wurden sowohl die zytoplasmatischen als auch die nukleären Proteine extrahiert (s. 3.5.2). Da bei den nicht-infizierten Zellen keine Signale für NFI detektiert werden konnten, scheinen die endogenen NFI Proteine unterhalb der Nachweisgrenze des Western Blots zu liegen. Somit sind die Signale bei den infizierten DF1 Zellen auf das exogene RCASBP(A)NFIA-1StreptII-Virus zurückzuführen und zeigen das überexprimierte NFIA-1-Protein. Aufgrund des Wirkungsortes des Transkriptionsfaktors NFIA-1 ist das Signal am stärksten in der nukleären Extraktion zu detektieren (s. Abb. 3.30). Somit ist die Lokalisation des NFIA-1 im Kern nachgewiesen, was auch die Funktionalität nahelegt.

4.6.1 Hemmung der Hypertrophie in mit RCASBP(A)NFIA-1StreptII-Viren infizierten Chondrozytenkulturen

Bei den mit RCASBP(A)NFIA-1StreptII-Virus infizierten und nicht-infizierten Kokulturversuchen zeigte sich bei T4-stimulierten Zellen, dass die Infektion mit dem Virus einen inhibierenden Effekt auf die Kollagen X-Synthese aufweist (s. 3.5.3). Dies bestätigt die Hypothese, dass NFIA-1 einen inhibierenden Einfluss auf die Hypertrophie der Chondrozyten hat. Allerdings ist dieser Effekt nur bei T4-stimulierten Zellen zu beobachten (s. Abb. 3.31, A und B). Bei IGF-1-stimulierten Zellen zeigen nur die kranialen Chondrozyten eine Kollagen X-Synthese. Die nicht-infizierten wie die infizierten, mit IGF-1 stimulierten Kokulturen zeigen keine Kollagen X-Expression. Es muß daher angenommen werden, dass die CEF Zellen einen inhibierenden Einfluss auf die Kollagen X-Expression und somit auf die Hypertrophie der kranialen Chondrozyten ausüben. Nur bei den T4-stimulierten Kokulturen ist eine Kollagen X-Synthese zu sehen. Hier scheint der Stimulans nicht von den

sekretorischen Faktoren der CEF Zellen blockiert zu werden, so dass die kranialen Chondrozyten hypertrophieren können. Der inhibierende Effekt auf die Kollagen X-Synthese kann bei den T4-stimulierten Chondrozyten daher nur dem RCASBP(A)NFIA-1StrepII-Virus zugeschrieben werden.

Es wurde bereits beschrieben, dass T4 in der Chondrozytenentwicklung ein weitaus stärker Hypertrophie-induzierender Faktor ist als Insulin oder IGF-1 (Böhme *et al.*, 1992; Quarto *et al.*, 1992; Böhme *et al.*, 1995; Bittner *et al.*, 1998; Babarina *et al.*, 2001). Kraniale Chondrozyten zeigen ohne vorherige Proliferation eine starke Kollagen X-Expression im Gegensatz zu Insulin- und IGF-1-stimulierten Chondrozyten. In Kokulturen mit Endothelzellen kann T4 als einziger Faktor bei kaudalen Chondrozyten die Hypertrophie auslösen (Bittner *et al.*, 1998; Babarina *et al.*, 2001). T4 ist zudem in der Lage, die Expression von Sox9, einem Hypertrophie-hemmenden Transkriptionsfaktor, zu inhibieren und somit die Hypertrophie verstärkt zu aktivieren (Okubo und Reddi, 2003). Aus diesem Grund muss angenommen werden, dass nur T4 unbeeinflusst von den sekretorischen Faktoren der CEF Zellen in der Lage ist, bei kranialen Chondrozyten die Hypertrophie zu induzieren.

Um einen inhibierenden Effekt durch sekretorische Faktoren der CEF Zellen auf die Chondrozyten auszuschließen, wurden kraniale Chondrozyten direkt mit dem RCASBP(A)NFIA-1StrepII-Virus infiziert (s. 3.5.4). Hierbei zeigte sich bei allen mit RCASBP(A)NFIA-1StrepII-Viren infizierten Kulturen ein geringeres Kollagen X/II-Verhältnis (s. Abb. 3.32, A und B). Diese inhibierende Wirkung des RCASBP(A)NFIA-1StrepII-Virus auf die Kollagen X-Synthese unterstützt die Hypothese, dass NFIA-1 die Hypertrophie von Chondrozyten blockieren kann.

Zusätzlich wurde von infizierten und nicht-infizierten Kulturen ein Western Blot durchgeführt (s. 3.5.4). Hierbei zeigte sich, dass die Chondrozyten bereits mit einem nicht weiter charakterisierten Retrovirus infiziert waren (s. Abb. 3.33). Allerdings konnte anhand der unterschiedlichen Signalstärke aber auch gezeigt werden, dass sich die Viren in mit IGF-1 und T4 stimulierten Chondrozyten besser vermehren können. Des Weiteren weist der Western Blot auf eine gelungene Infektion mit dem RCASBP(A)NFIA-1-StrepII-Virus hin, so dass man von einem Effekt des NFIA-1 auf die Hypertrophie der Chondrozyten sprechen kann.

4.6.2 Hohe Streuung der RCASBP(A)NFIA-1-StrepII-Viren nach Infektion *in vivo*

Für eine *in vivo*-Überexpression des NFIA-1 wurden die Bein- und Flügelanlagen in Hühnerembryonen infiziert. Dadurch, dass die Virusinfektion nur in die rechten Gliedmaßen erfolgte, ist anhand der Immunfluoreszenzaufnahmen eine starke Streuung des Signals auch in den unbehandelten Gliedmaßen zu erkennen (s. 3.5.5). Zudem sind die Signale nicht wie beabsichtigt in den Knochenanlagen des Embryos zu finden, sondern zeigen auch hier eine starke Streuung in der gesamten Gliedmaße (s. Abb. 3.34 und Abb. 3.35). Aufgrund der Annahme, dass bei der Infektion Blutgefäße mit dem Virus getroffen wurden, läßt sich die Streuung der Signale auch in nicht-infizierten Flügel- und Beinanlagen erklären. Da die Detektion durch einen Antikörper erfolgte, welcher gegen das gag-Protein gerichtet ist, ist zumindest gezeigt worden, dass prinzipiell eine Infektion mit dem RCASBP(A)NFIA-1-StrepII-Virus möglich ist. Die präzise Infektion des Virus würde allerdings erhebliche weitere Übung an zahlreichen Versuchstieren erfordern.

Fraglich ist auch, ob es zu einem Effekt durch die RCASBP(A)NFIA-1-StrepII-Virus Infektion gekommen wäre. Das Virus wird zwar produziert und streut auch aufgrund der proliferierenden Zellen. Da es sich aber bei dem NFIA-1 um einen Transkriptionsfaktor handelt, der nicht sekretorisch von den Zellen abgegeben wird, wirkt dieser nicht auf weitere Zellen. Dadurch ist der Wirkungsort eher begrenzt und Effekte dieser Virusinfektion sind eventuell nicht mehr nachweisbar. In der Literatur wurde beschrieben, dass bei sekretorischen Signalmolekülen eine lückenhafte Infektion einer Region ausreichend sein kann und kleine infizierte Areale genügen, um die natürlich vorkommende Quelle des Proteins nachzuahmen. Bei einem die Interaktion von Zellen während der Entwicklung regulierenden Transkriptionsfaktor kann es allerdings notwendig sein, jede einzelne Zelle innerhalb einer großen sich entwickelnden Organanlage zu infizieren (Morgan und Fekete, 1996). Diese Schwierigkeiten bei der Infektion mit einem Transkriptionsfaktor wurden auch bei der Infektion von Runx2 in die Flügelanlagen von Hühnerembryos (Stricker *et al.*, 2002) von Prof. Vortkamp bestätigt (persönliche Mitteilung). Außerdem ist der Zeitraum, in dem man die Infektion in eine Zielregion vornimmt, vom Gen abhängig. Viele Gene haben diskrete entwicklungsabhängige Zeitfenster, innerhalb derer sie aktiv sind (Morgan und Fekete, 1996).

Hinsichtlich der hier aufgetretenen Streuung des Virus werden in der Literatur drei bis fünf Virusinjektionen in einem eng begrenzten Bereich als ausreichend beschrieben, um die gesamte Gliedmaße zu infizieren. Eine höhere Anzahl von Injektionen in den frühen Entwicklungsphasen führe zwar prozentual zu einem höheren Anteil an gesamt-infizierten Gliedmaßen, allerdings könne dabei der benachbarte Flügel mit infiziert werden (Morgan und Fekete, 1996). Da in den hier dargestellten Versuchen nur zwei Virusinjektionen durchgeführt wurden, ist dies nicht als Ursache für die aufgetretene Streuung zu betrachten. Die Ursache liegt eher in der präzisen Positionierung der Injektionen in die Gliedmaßen. Diese ist äußerst wichtig, um die Variabilität der Streuung innerhalb dieser Gliedmaßen zu reduzieren (Morgan und Fekete, 1996).

Um einen Effekt des RCASBP(A)NFIA-1StrepII-Virus auf die Hypertrophie von Chondrozyten der Knochenanlagen zu untersuchen, müsste die Kollagen X-Expression überprüft werden. Die Kollagen X-Expression beginnt aber erst ab Tag 16 des Embryos (Gibson und Flint, 1985; LuValle *et al.*, 1992; Lu Valle *et al.*, 1993) oder nach Hamburger-Hamilton-Einteilung ab Stadium 42 (Hamburger und Hamilton, 1992). Da die hier verwendeten infizierten Embryos nur bis Stadium 21 bebrütet wurden, war ein Nachweis der Kollagen X-Expression noch nicht möglich. Der Einsatz dieses Hypertrophiemarkers zu diesem Entwicklungszeitpunkt scheidet folglich aus.

4.7 Keine unterschiedliche Verteilung von Kollagen I, ADAMTS 4 und Kollagen II in NFIA-KO Mäusetibien gegenüber WT

Für histologische Untersuchungen des Einflusses von NFIA auf die Entwicklung der Tibia wurden hier NFIA-KO Mäuse von Frau Dr. Driller aus Freiburg verwendet.

NFI stimuliert die $\alpha 2(I)$ Kollagen-Transkription (Nehls *et al.*, 1991). Entsprechend wurde hier die Kollagen I-Expression in NFIA-KO und WT Mäusetibien untersucht (s. Abb. 3.37).

Zudem wurde nach einem Effekt auf die ADAMTS 4-Expression in WT und NFIA-KO Mäusen gesucht (s. Abb. 3.38). In der Literatur wurde eine negativ regulierende Funktion von NFI auf den ADAMTS 4-Promotor in Chondrozyten beschrieben (Mizui *et al.*, 2000).

Da angenommen wird, dass NFIA-1 einen inhibierenden Effekt auf die Hypertrophie hat, indem hypertrophierende Chondrozyten vermehrt Kollagen X exprimieren, während parallel die Kollagen II-Expression abnimmt, wurde außerdem nach einer veränderten Kollagen II-Verteilung in den WT und NFIA-KO Tibien gesucht.

Hinsichtlich der Kollagen I- und II-Expression konnte an Tibienschnitten kein Unterschied festgestellt werden, ebensowenig hinsichtlich morphologischer Veränderungen der Zellen von WT und NFIA-KO Mäusen. Bei ADAMTS 4 kam es unter Einsatz der DAB-Methode zu keiner Anfärbung. Eventuell sind die Expressionsunterschiede nur so gering, dass sie mit der DAB-Färbemethode nicht nachweisbar sind. Hier könnte eine sensitivere Immunfluoreszenzanfärbung vielleicht eher Aufschluss geben. Bei einer Immunfluoreszenzfärbung würde aufgrund längerer Inkubationszeiten mit der Substratlösung DAB auch eine Hintergrundfärbung entfallen, so dass unterschiedliche Verteilungsmuster der Kollagene I und II sowie ADAMTS 4 überhaupt erst sichtbar würden. Der ADAMTS 4-Nachweis könnte eventuell auf Kryoschnitten oder durch *in situ* Hybridisierungen erfolgen, falls der Antikörper für Kryoschnitte ungeeignet sein sollte.

4.7.1 Intrazelluläre Matrilin 1-Lokalisation in der proliferativen, prähypertrophen und hypertrophen Zone von NFIA-KO Mäusetibien

In anderen Studien wurde gezeigt, dass NFI an die Silencerregion von Matrilin 1 bindet (Szabo *et al.*, 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde Matrilin 1 intrazellulär in der proliferativen, in der prähypertrophen und zum Teil in der hypertrophen Zone in NFIA-KO Mäusetibien nachgewiesen, nicht aber in WT Mäusen (s. Abb. 3.36). Intrazelluläre Färbung des Matrilin 1 ist auch bei den Tibien von heterozygoten Mäusen zu erkennen. Die Intensität ist hier allerdings schwächer als bei den NFIA-KO Mäusen. Die geringere intrazelluläre Färbung des Matrilin 1 bei heterozygoten Mäusen im Vergleich zu NFIA-KO Tieren kann auf eine Haploinsuffizienz des NFIA-Gens hindeuten. Ein weiteres Indiz für eine NFI-Haploinsuffizienz ist die höhere Sterblichkeit von heterozygoten Mäusen nach der Geburt (das Neves *et al.*, 1999). Der Verlust dieser heterozygoten Nachkommen findet allerdings nur statt, wenn das NFIA⁻-Allel mütterlicherseits vererbt wird. Interessant wäre nun eine Identifizierung des Geschlechts bei den heterozygoten Mäusen und die Untersuchung, ob dies

einen Effekt auf die Ausprägung der hier gezeigten morphologischen Veränderungen hat. Hierdurch wären Schwankungen in der Intensität zu erklären. Untersuchungen am Menschen mit einer NFIA-Haploinsuffizienz zeigten, dass die Patienten mit einer variablen Penetranz einen Hydrozephalus und Rückenmark-Abnormalitäten aufweisen sowie ein fehlendes Corpus Callosum, was auf ein neuartiges ZNS-Fehlbildungssyndrom hinweist. Zusätzlich kann dies auch eine Ureter- und Nieren-Veränderungen beinhalten. Die betroffenen Patienten weisen eine Chiari Typ I-Fehlbildung auf (Lu *et al.*, 2007). Diese Erkrankung ist durch einen uni- oder bilateralen Tiefstand der Kleinhirntonsillen von mehr als 5 mm in das Foramen occipitale magnum mit oder ohne Kaudalverlagerung der Medulla oblongata gekennzeichnet. Durch Liquorzirkulationsstörungen können ein mäßiggradiger Hydrozephalus und in 20-40 % eine assoziierte Syringohydromyelie im Halsmark entstehen. Bei 20 % der Patienten treten knöcherne Fehlbildungen des kraniozervikalen Überganges auf (Milhorat *et al.*, 1999; Fernandez *et al.*, 2009). Frauen sind weit häufiger betroffen als Männer (3 : 1). Stammbaumanalysen von Patienten deuten auf eine genetische Ursache hin (Milhorat *et al.*, 1999).

Die hier beobachteten morphologischen Veränderungen könnten darauf hinweisen, dass es aufgrund der fehlenden Bindung des NFIA an die Silencerregion bei den NFIA-KO Tieren zu einer erhöhten Matrilin 1-Synthese kommt. Eventuell kann durch eine erhöhte Translation das Protein nicht schnell genug aus der Zelle geschleust werden, so dass es zu einer Akkumulation des Matrilin 1 in der Zelle kommt. Dass diese Zelleinschlüsse vermehrt in den proliferativen und prähypertrophen Zellen zu finden sind, entspricht dem Ergebnis des Gene Arrays, der ein erhöhtes RNA-Niveau des Matrilin 1 in kaudalen im Vergleich zu kranialen Chondrozyten des Hühnersternums (s. 3.1.4) zeigt. Die kaudalen Chondrozyten des Hühnersternums, die noch in der enchondralen Ossifikation arretiert sind und keine Kollagen X-Expression zeigen, sind mit der Entwicklungsstufe der proliferativen Chondrozyten der Mäusetibien vergleichbar, die ebenfalls noch keine Kollagen X-Expression aufweisen. In der Literatur wurde nachgewiesen, dass das Verhältnis der SP3/SP1-Transkriptionsfaktoren die gewebsspezifische Expression des Kollagen X reguliert, wobei ein hohes SP3/SP1-Verhältnis die Expression des Kollagen X aktiviert. Zudem wurde festgestellt, dass sowohl in den Ruhechondrozyten der Wachstumsfuge als auch in den nicht-hypertrophen Chondrozyten des Sternums ein niedriges SP3/SP1-Verhältnis vorliegt. Diese Ergebnis deutet daraufhin, dass in den Chondrozyten des

Sternums sowie in den Chondrozyten der Wachstumsfuge derselbe regulatorische Mechanismus die Kollagen X α 1-Expression kontrolliert (Magee *et al.*, 2005).

4.7.2 Vergrößerung der hypertrophen Zone in NFIA-KO Mäusetibien

Aufgrund der Tatsache, dass kaudale Chondrozyten des Hühnersternums NFIA-1 erhöht transkribieren und der Kenntnis, dass diese Zellen in der Lage sind, ihre eigene Hypertrophie und auch die der kranialen Chondrozyten zu blockieren, wurde nach dem Hypertrophiemarker Kollagen X auf den Tibien von WT und NFIA-KO Mäusen gesucht (s. 3.6). In Tibien von NFIA-KO Mäusen konnte dabei keine Veränderungen in den Zellanordnungen, Zellstrukturen oder Zelleinschlüsse beobachtet werden (s. Abb. 3.39). Allerdings schienen sich die hypertrophen Bereiche in ihren Ausmessungen von WT und NFIA-KO Mäusen zu unterscheiden. Die morphologischen Messungen ergaben, dass die Zellzahlen in dem hypertrophen Bereich von WT und NFIA-KO Mäusen gleich waren, sich aber bei den NFIA-KO Mäusen die Fläche der hypertrophen Zone vergrößerte (s. Abb. 3.40, E).

Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten eventuell in den NFIA-KO Mäusen aufgrund der fehlenden NFIA-Expression in ihrer enchondralen Entwicklung nicht so stark blockiert werden und somit schneller in ihrer enchondralen Entwicklung sind. Weiter könnte es in den NFIA-KO Mäusen nicht zur Produktion von sekretorischen Faktoren kommen, die wiederum einen negativ regulierenden Effekt auf die proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten hätten. Einer dieser Faktoren könnte Ihh sein, welches in Ihh-defizienten Mäusen eine reduzierte Chondrozytenproliferation und eine verstärkte Hypertrophie bewirkt (St-Jacques *et al.*, 1999). Ein weiterer potentieller Faktor wäre PTHrP, da in PTHrP-defizienten Mäusen das Fehlen dieses Proteins zu einer frühzeitigen Chondrozytendifferenzierung und somit zu einer exzessiven Knochenbildung führt (Lanske *et al.*, 1996). Wenn somit die prähypertrophen Zellen zügiger in der Entwicklung wären, eher die Hypertrophie erreichen und damit Kollagen X exprimieren würden, würde sich die hypertrophe Zone vergrößern. Dies würde mit einer Kollagen II-Expression korrelieren, die bei frühzeitiger Kollagen X-Expression abnehmen würde. Chondrozyten, die in das Stadium der Hypertrophie eintreten, zeigen einen Anstieg der Kollagen X-mRNA, simultan zu einer Abnahme der Kollagen II- und Kollagen IX-mRNA (Castagnola *et al.*, 1988). Somit wären Färbungen des Kollagens II zur Aufklärung der vergrößerten

hypertrophen Zone von NFIA-KO Mäusetibien aufschlußreich.

4.8 Verkürzter Tibiaknochenbereich bei neugeborenen NFIA-KO Mäusen

Wie in früheren Studien bereits gezeigt wurde, treten bei NFIA-KO Mäusen schwere Entwicklungsdefekte auf (das Neves *et al.*, 1999). So sterben 95 % der homozygoten NFIA-KO Mäuse innerhalb der ersten zwei Wochen nach der Geburt. Den neugeborenen NFIA-KO Mäusen fehlt das Corpus Callosum und sie zeigen ventrikuläre Dilatationen, welche auf einen frühen Hydrozephalus hinweisen (das Neves *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2007). Die wenigen überlebenden NFIA-KO Mäuse zeigen später eine schwere Hydrozephalus-Ausprägung sowie einen axialen Tremor, welcher auf neurologische Defekte hinweist. Zudem sind die Männchen steril und die Weibchen besitzen eine geringe Fertilität. Allerdings haben sie eine normale Lebensdauer.

Um die Ursache der pränatalen Sterblichkeit und der Kleinwüchsigkeit in den ersten zwei Lebenswochen bei den NFIA-KO Mäusen zu identifizieren, wurden bereits von der Arbeitsgruppe das Neves die Extremitäten histologisch untersucht. Hierbei wurden keine deutlichen morphologischen Defekte im Vergleich zur WT-Maus festgestellt, so dass auf die augenscheinlichen Defekte eingegangen wurde (das Neves *et al.*, 1999). Aus diesem Grund sollte die NFIA-KO Maus, die von Fr. Dr. Driller (Freiburg) zu Verfügung gestellt wurde, genauer untersucht werden.

Hat NFIA-1 einen inhibierenden Effekt auf die Hypertrophie der Chondrozyten, müsste sich dies in morphologischen Veränderungen des Skeletts von NFIA-KO Mäusen manifestieren, was auch die Kleinwüchsigkeit erklären würde. Aus diesem Grund wurde hier das gesamte Skelett von WT und NFIA-KO Mäuseembryos histologisch untersucht (s. 3.7). Hierbei wurden die Tibien von zwei unabhängigen Würfen vermessen. Beim ersten Wurf, der aus neugeborenen Mäusen bestand, fiel der Tibia-Knochenbereich bei den NFIA-KO Tieren im Vergleich zu den WT Tieren etwas kürzer aus (s. Abb. 3.41 und Abb. 3.42). Hingegen gab es bei dem zweiten Wurf, bei welchem die Embryos aus dem Muttertier herauspräpariert wurden, weder bei der Tibia-Gesamtlänge noch bei dem Tibia-Knochenbereich einen Unterschied (s. Abb. 3.43 und Abb. 3.44). Eventuell zeigen sich Unterschiede in diesem Bereich der Tibia von NFIA-KO und WT Tieren erst zu späteren Entwicklungsstadien und die

Tiere des zweiten Wurfs waren noch zu jung. Um hierzu Feststellungen zu treffen, müssten unterschiedliche Entwicklungsstadien untersucht werden.

Betrachtet man die Kollagen X-Färbungen (s. Abb. 3.39 und Abb. 3.40), so weisen diese bei den NFIA-KO Tieren eine vergrößerte hypertrophe Zone auf. Bei den Knochen-Knorpelfärbungen zeigen die NFIA-KO Tiere die Tendenz zu einer größeren Gesamtfläche, wobei der Tibiaknochenbereich des ersten Wurfs geringer ausfällt (s. Abb. 3.42). Es kann aufgrund der vergrößerten hypertrophen Zone bei den NFIA-KO Mäusen nicht ausgeschlossen werden, dass es infolge der fehlenden Blockade durch das NFIA zu einer frühzeitigen Hypertrophierung der Zellen kommt und somit auch zu einer rascheren Verknöcherung. Wenn Chondrozyten zu einem vorzeitigen Übergang von der proliferativen Phase zum hypertrophierenden Zustand stimuliert werden, wird das Längenwachstum des Knochens verlangsamt (Löffler und Petrides, 2003). Gegebenfalls fällt der Unterschied im Bereich der Tibien bei NFIA-KO und WT Mäusen in späteren Entwicklungsstadien deutlicher aus. Hierin könnte die Ursache dafür liegen, dass bei den Mäusen aus Wurf 2 keine Unterschiede an den Tibien zu sehen sind.

Auffällig beim zweiten Wurf war die unterschiedliche Verknöcherung des Schädels, die bei den WT Mäusen weitaus fortgeschrittener zu sein schien (s. Abb. 3.43). Allerdings scheint die unterschiedliche Verknöcherung des Schädels nicht mit der Ausprägung des Hydrozephalus in Verbindung zu stehen, da in NFIA-KO Tieren eine Syringomyelie des Rückenmarks diagnostiziert wurde (Lu *et al.*, 2007). Es wird angenommen, dass die Syringomyelie aufgrund von progressiver, mechanischer Überlastung und der Spaltung des Rückenmarks durch erhöhten zerebralen Druck der Rückenmarksflüssigkeit auftritt und dies zur Entwicklung eines Hydrozephalus führt (Lu *et al.*, 2007). Da diese Verknöcherung allerdings bei den NFIA-KO Mäusen sehr variabel ausgeprägt war, wären in diesem Bereich weitere Untersuchungen notwendig.

4.9 Ausblick

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollten Experimente mit dem NFI-Antikörper mit einem spezifischeren, allerdings noch zu generierenden, Antikörper wiederholt werden. Da der hier verwendete NFI-Antikörper neben NFIA auch die anderen Isoformen NFIB, C und X erkennt, weisen die Ergebnisse der Versuche mit

dem zurzeit einzigen verfügbaren Antikörper nicht eindeutig auf NFIA-1 hin.

Durch den Nachweis, dass die EST355d10-Sequenz auf der *Gallus gallus* NFIA-1-mRNA liegt, und diese Information nicht mit dem anhand des Programms Blast search ermittelten Datenbankeintrag übereinstimmt, wäre es interessant, die tatsächliche Länge des NFIA-1-Gens zu kennen. Durch eine RACE-PCR können 5'- und 3'-Enden ermittelt werden, was auch bei schwach exprimierten Genen möglich ist (Frohman *et al.*, 1988). Die ermittelte Sequenz könnte dann kloniert, sequenziert und bei NCBI in der Blast search-Datenbank eingetragen werden.

In den NFIA-1-*Silencing*-Versuchen wurde bei einem NFIA-1-*Knockdown* in kaudalen Chondrozyten eine Blockierung der Kollagen X- und der Alkalischen Phosphatase-Synthese beobachtet. Da ein kompensatorischer Effekt durch die in Chondrozyten vorkommenden NFIB oder auch NFIA-3 nicht auszuschließen ist, wäre ein kompletter *Knockdown* der NFIA- und der NFIB-Isoformen hilfreich. Durch den vollständigen NFIA- und NFIB-*Knockdown* könnte auch ein Effekt auf die Matrilin 1-Expression ermittelt und festgestellt werden, welche NFI-Isoform hierbei tatsächlich eine regulierende Rolle spielt.

Bei den histologischen Expressionsanalysen von Kollagen I und II in NFIA-KO und WT Mäusetibien zeigten sich keine Unterschiede in deren Verteilung oder morphologische Veränderungen der Zellen. Da nicht auszuschließen ist, dass die DAB-Anfärbung hierfür nicht sensitiv genug ist, könnte eine Immunfluoreszenzfärbung hilfreich sein. Auch bei der ADAMTS 4-Färbung mit DAB, wo es zu keiner Anfärbung kam, wäre die Immunfluoreszenz eine Möglichkeit zum Nachweis des Proteins.

Analysen der Matrilin 1-Expression in NFIA-KO und WT Mäusetibien zeigten bei den NFIA-KO Mäusen in der proliferativen, in der prähypertrophen und geringfügig in der hypertrophen Zone eine intrazelluläre Anfärbung. Da bei der Gene Array-Analyse der kaudalen und kranialen Chondrozyten des Hühnersternums nachgewiesen wurde, dass Matrilin 3 in kranialen, im Vergleich zu kaudalen, Chondrozyten um einen Faktor von 5,56 erhöht transkribiert vorliegt (s. 3.1.4), wäre es nun interessant, ob es bei einer Matrilin 3-Färbung ebenso zu diesen intrazellulären Färbungen des Proteins bei NFIA-KO Mäusen käme. Dies würde dafür sprechen, dass Matrilin 3 ebenfalls eine NFIA-Bindestelle in der Silencerregion besitzt, was bislang in der Literatur noch nicht beschrieben wurde. Ebenso könnte durch eine semi-quantitative

PCR der isolierten RNA aus WT und NFIA Mäusechondrozyten überprüft werden, ob Matrilin 1 erhöht in NFIA-KO Chondrozyten transkribiert wird.

Da in der Literatur (Nehls *et al.*, 1991) eine Stimulation der $\alpha 2(I)$ Kollagen-Transkription durch NFI beschrieben wird, ist es denkbar, dass hier eine transgene Maus, die NFIA überexprimiert, eher Aufschluss geben könnte. Aus diesem Grund könnte die Generierung einer NFIA-transgenen Maus in Betracht gezogen werden, die auch in den Expressionsanalysen von ADAMTS 4, Kollagen X, II, Matrilin 1 und 3 weitere Ergebnisse bringen könnte.

Bei der Knochen-Knorpel-Färbung des gesamten NFIA-KO und WT Mäuseskeletts sind weitere Untersuchungen notwendig, um eine eindeutige Aussage treffen zu können, insbesondere im Bereich der Verknöcherung des Schädelbereichs. Da sich die Ergebnisse der Tibialängen von Wurf 1 und 2 unterscheiden, sind Untersuchungen von unterschiedlichen Entwicklungsstadien zu erwägen. Zudem könnten eventuell Vergleiche zu NFIA-transgenen Mäusen, die NFIA überexprimieren, aufschlussreich sein.

5 Anhang

5.1 Vektorkarten

5.1.1 Klonierungsvektor pCRII-TOPO

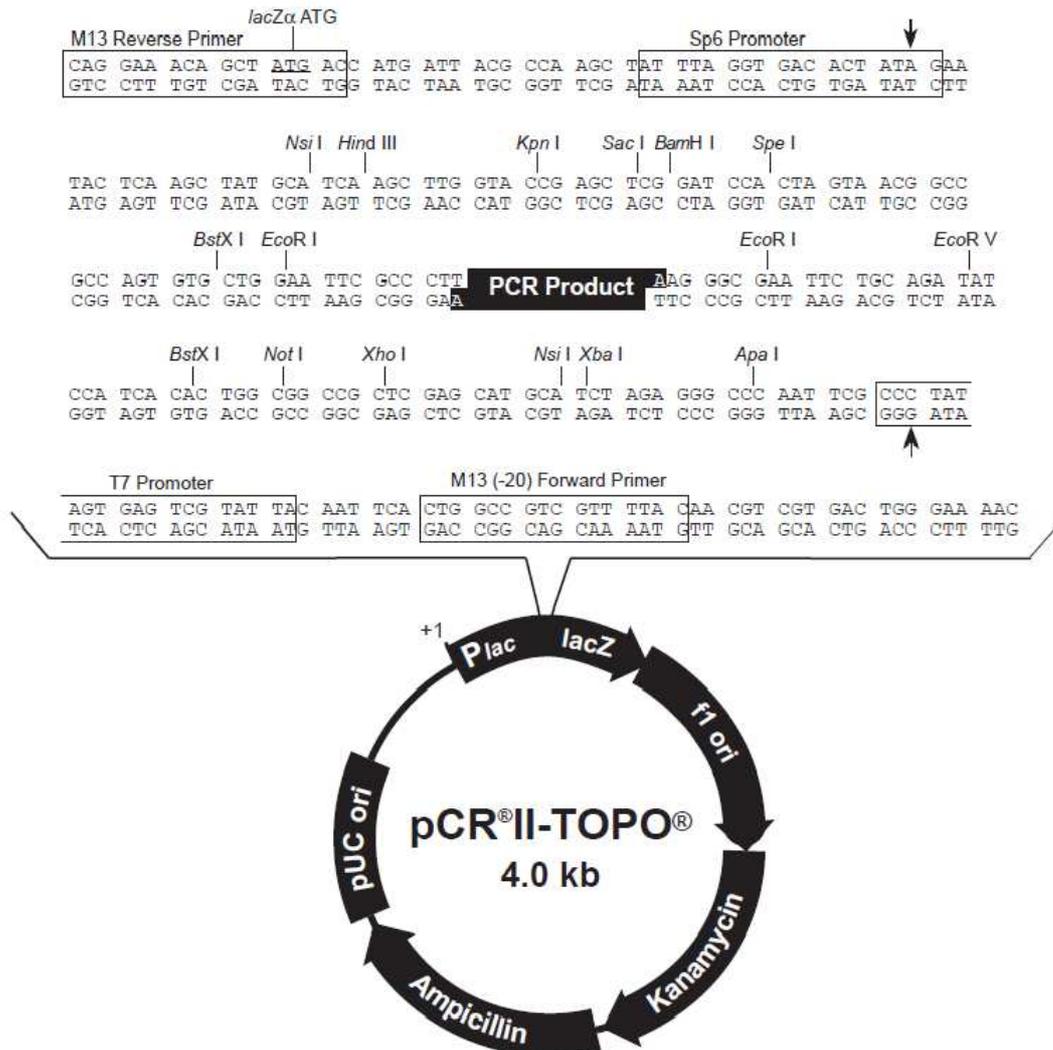
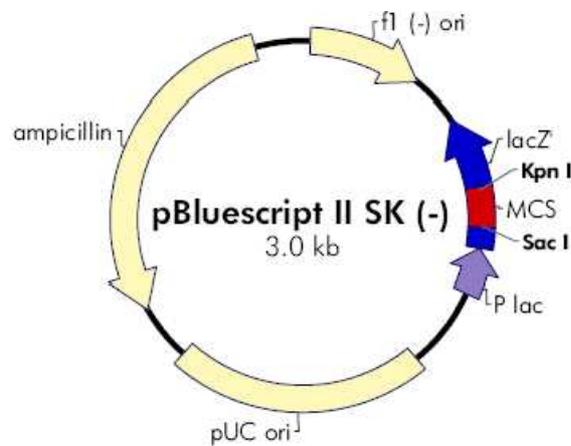


Abb. 5.1: Vektorkarte des Klonierungsvektors pCRII-TOPO.

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**.

5.1.2 Klonierungsvektor pBluescript II SK(-)



pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598–826)

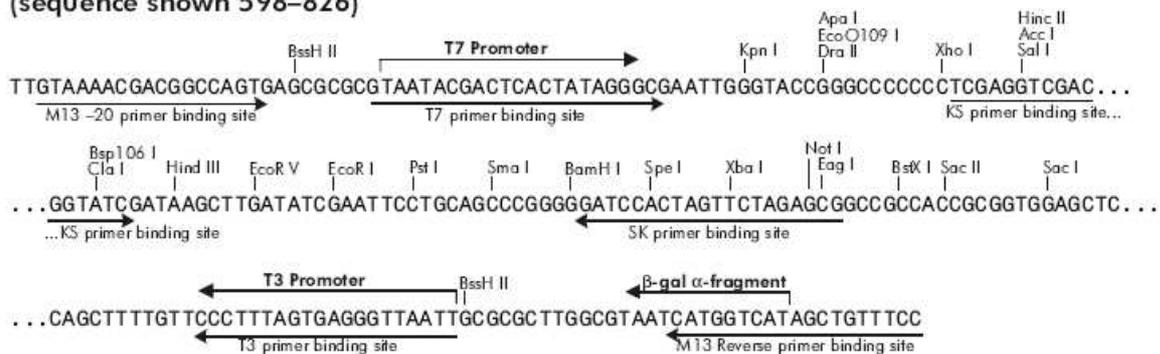


Abb. 5.2: Vektorkarte des Klonierungsvektors pBluescript II Sk(-).

Die Sequenz stellt den Bereich der *multiple cloning site* des Vektors dar (**Basenpaare 598-826**). f1 (-) Replikationsstart: **Basenpaare 21-327**. lacZ α -Fragment: **Basenpaare 460-816**. lac Promotor: **Basenpaare 817-938**. T7 Promotor: **Basenpaar 643**. T3 Promotor: **Basenpaar 774**. pUC Replikationsstart: **Basenpaare 1158-1825**. Ampicillin-Resistenzgen (*bla*) ORF: **Basenpaare 1976-2833**.

5.1.3 Expressionsvektor pCMV-Tag 4A

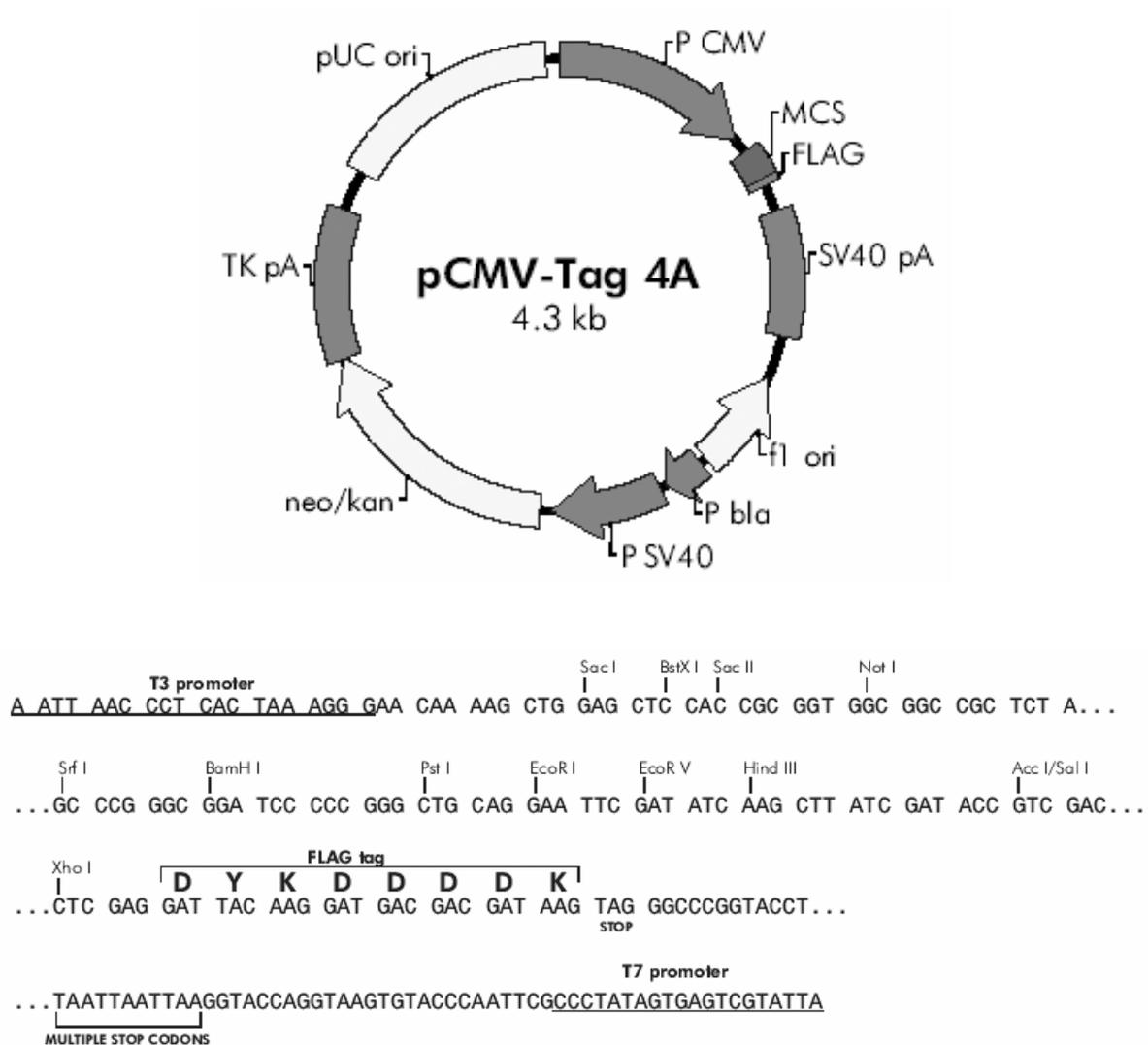


Abb. 5.3: Vektorkarte des Expressionsvektors pCMP-Tag-4A.

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**.

5.1.4 Expressionsvektor pmaxFP-Green-C

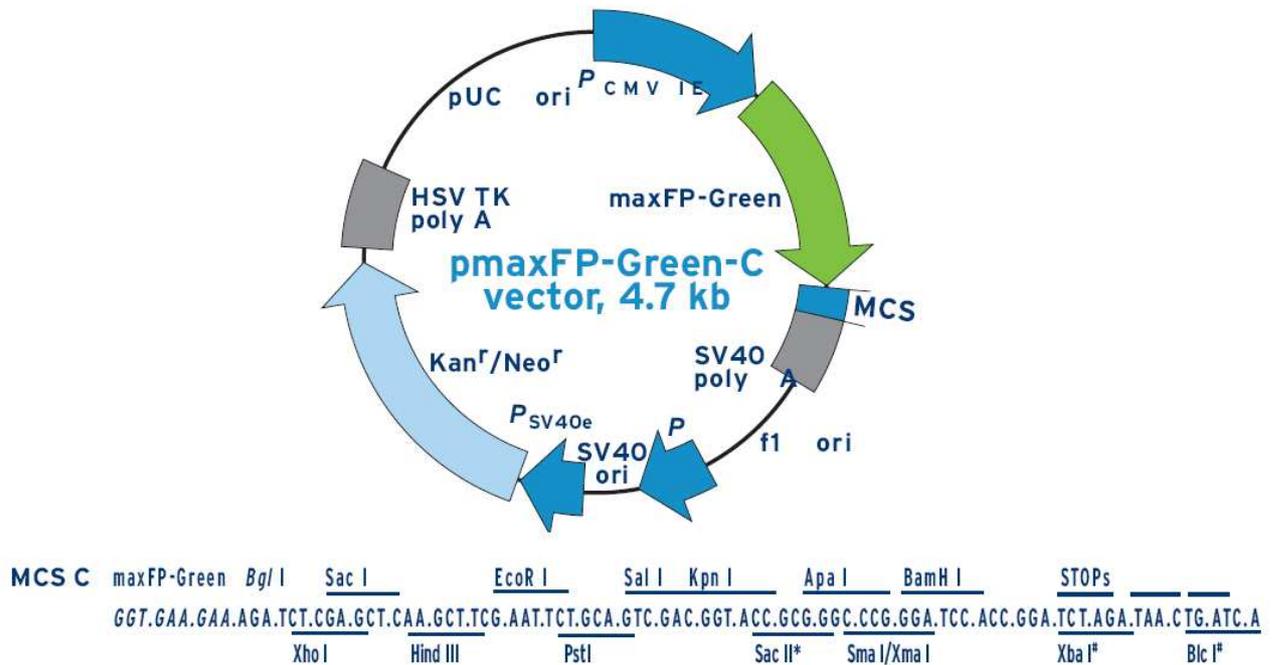


Abb. 5.4: Vektorkarte des Expressionsvektors pmaxFP-Green-C.

Die Sequenz stellt den Bereich der *multiple cloning site* des Vektors dar (**Basenpaare 1309-1394**). f1-Replikationsstart: **Basenpaare 1617-2072**. SV40 Replikationsstart: **Basenpaare 2413-2548**. pUC Replikationsstart: **Basenpaare 3976-4619**. HSV-TK-polyA: **Basenpaare 3627-3632 und 3640-3645**. SV40-polyA: **1520-1525 und 1549-1554**. Kanamycin/Neomycin-Resistenzgen: **Basenpaare 2597-3391**.

5.1.5 Expressionsvektor RCASBP(A)

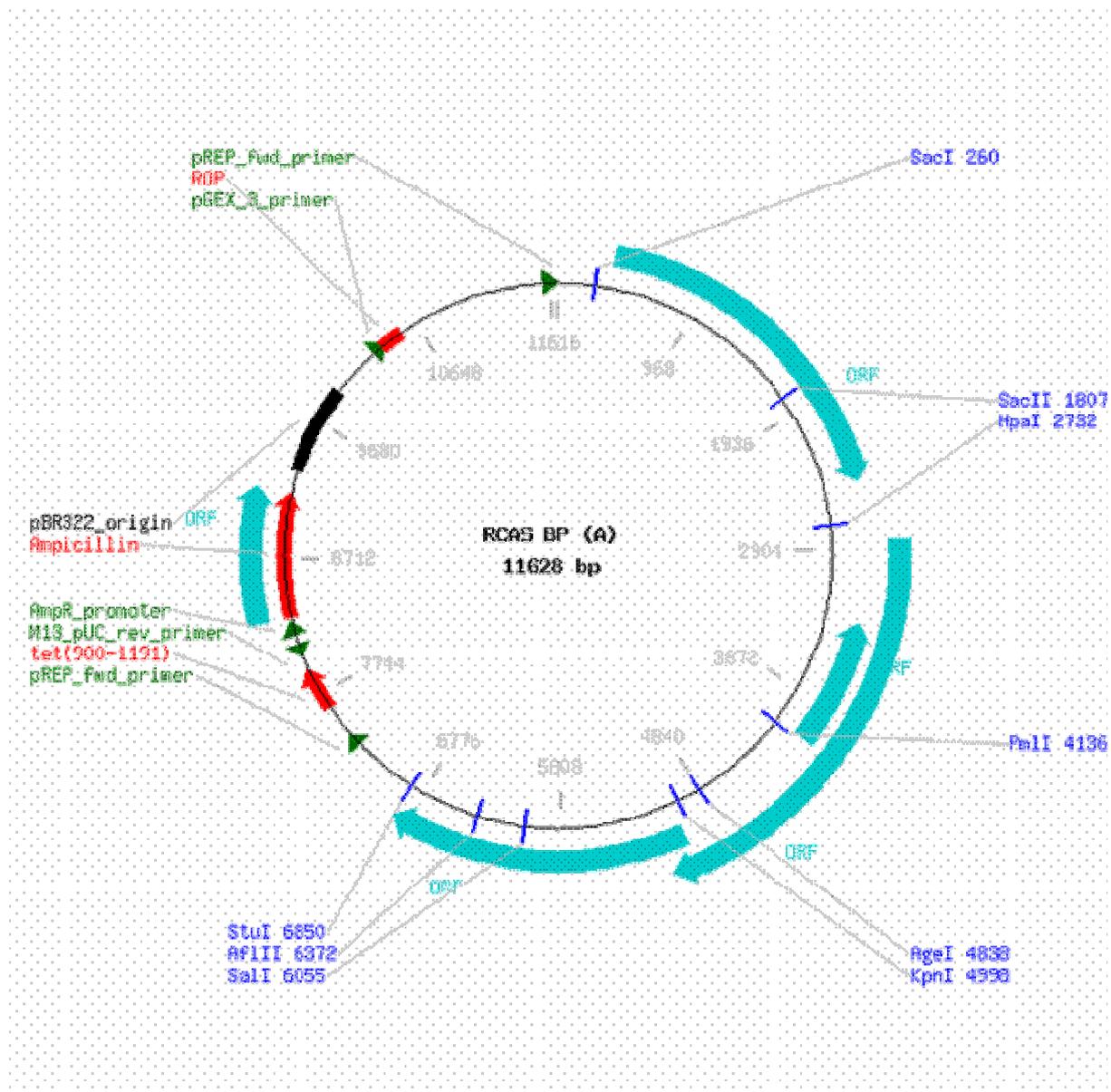


Abb. 5.5: Vektorkarte des Expressionsvektors RCAS BP(A).

ORF1: Basenpaare 5053-6882. **ORF2:** Basenpaare 4120-3329. **ORF3:** Basenpaare 2811-5185. **ORF4:** 372-2483. **ORF5:** Basenpaare 8317-9177. **pREP forward Primer-Bindungsstelle:** Basenpaare 7379-7397. **M13 pUC reverse Primer-Bindungsstelle:** Basenpaare 8040-8018. **Ampicillin-Promotor:** Basenpaare 8247-8275. **Ampicillin-Resistenzgen:** Basenpaare 8317-9177. **pBR322 Replikationsstart:** Basenpaare 9332-9951. **pGEX3 Primer-Bindungsstelle:** Basenpaare 10348-10370. **pREP forward Primer-Bindungsstelle:** Basenpaare 11613-3. **tet(900-1191):** Basenpaare 7654-7944. **ROP:** Basenpaare 10555-10364. **ClaI Schnittstelle:** 7030

5.2 Fehlerhafte NFIA-1 ORF-Sequenz

```

66 atgtattctccgctctgtctcacgcaggatgaatttcaccccttc
  M Y S P L C L T Q D E F H P F
111 atcgaagcacttctgcctcacgtccgagcgtttgcgtacacgtgg
  I E A L L P H V R A F A Y T W
156 ttcaacctgcaagcccgaagagaaaatacttcaaaaaacatgag
  P N L Q A R K R K Y F K K H E
201 aaacgcatgtcaaaagaggaagagagggccgtgaaggacgaactc
  K R M S K E E E R A V K D E L
246 ttaagtgaaaaaccgaggtaaagcagaaatggcgctccagactt
  L S E K P E V K Q K W A S R L
291 ctggcaaaagcttcggaagatatcaggcctgaatttcgggaggat
  L A K L R K D I R P E F R E D
336 ttgtttctcacagtcacaggaaaaaagcctccgtgttgctcctt
  F V L T V T G K K P P C C V L
381 tccaatccagaccagaagggaagatgagaagaattgaccgcctt
  S N P D Q K G K M R R I D R L
426 cgcaggcagataaggtctggaggttggacctggtatggtgatt
  R Q A D K V W R L D L V M V I
471 ttatttaaaggattccgctcgaaaagtactgatggcgagcgcctt
  L F K G I P L E S T D G E R L
516 gtaaagtccccacagtgtctaacccccgggctgtgcgtacagccc
  V K S P Q C S N P G L C V Q P
561 caccatagggagtttctgttaaggaactcgatttatatttgca
  H H I G V S V K E L D L Y L A
606 tactttgtgcacgctgcagattcaagtcaatctgaaagtcccagc
  Y F V H A A D S S Q S E S P S
651 cagccaagtgaagctgatattaaggaccagccagaaaatggacat
  Q P S E A D I K D Q P E N G H
696 ttgggcttccaggacagttttgtcacatcaggtgttttcagtggtg
  L G F Q D S F V T S G V P S V
741 accgagctagtaagagtctcacaacaccaatagctgcaggaaca
  T E L V R V S Q T P I A A G T
786 ggccttaatttctcctctcagatttgaaaagttcttcgtactac
  G P N F S L S D L E S S S Y Y
831 agcatgagcccaggagcaatgaggaggtctttacctagcacatcc
  S M S P G A M R R R S L P S T S
876 tctaccagctctacaaaacgtatcaaatctgtggaggatgagatg
  S T S S T K R I K S V E D E M
921 gacagtcctgggtgaggagccgttctatacaagccaagggcgctct
  D S P G E E P P Y T S Q G R S
966 ccaggaagtggcagccagtcagtgatggcatgaagtggaaacca
  P G S G S Q S S G W H E V E P
1011 ggatatctaagaaacccgaacaccacggagcactacatggaatg
  G Y L R N P E H H G A L H G M
1056 ccacgccaactgcattaagaagtcaagagaagtctggtttcagc
  P S P T A L K K S E K S G F S
1101 agtccctcgccttcgcagacctctccttggaaacggctttcaca
  S P S P S O T S S L G T A F T
1146 cagcaccatcgacctgtcattacaggaccagagcaagtccacat
  Q H H R P V I T G P R A S P H
1191 gcaacaccatcgactcttcattttccaacatcaccattatccaa
  A T P S T L H F P T S P I I Q
1236 cagcctgggccatacttctcacaccagcaatccgctatcatcct
  Q P G P Y P S H P A I R Y H P
1281 caggagactctgaagagtttgtccaactgtctgccccgacgct
  Q E T L K E F V Q L V C P D A
1326 ggtcagcaggctggacaggtggggttcctaaatccaatggtagc
  G Q Q A G Q V G F L N P N G S
1371 agccaaggcaaggtgcacaatccattccttccatccccaatggtt
  S Q G K V H N P P L P T P M L
1416 ccaccaccactccgccaccaatggctaggcctgtgcctctgcca
  P P P P P P M A R P V P L P
1461 gtgccagacacaaaacctccaactacatcaacagaaggagggccc
  V P D T K P P T T S T E G G A
1506 acctctcccacttctccaacctactcgaccccagcacctcccc
  T S P T S P T Y S T P S T S P
1551 gcaaacggattcgtcagtggtggaccacgggatccaagctttgta
  A N R F V S V G P R D P S F V
1596 aatatccctcaacagactcagtcctggtaacctgggataaa
1634 N I P Q Q T Q S W Y L G *

```

Abb. 5.6: PCR- Mutagenese der fehlerhaften NFIA-1-Sequenz

Mit spezifischen Oligonukleotiden wurden Punktmutationen an den Stellen 420 bp und 1036 bp erzeugt. Der Fehler an der Stelle 420 bp verursachte einen Aminosäureaustausch von Cystein zu Arginin und der bei 1036 bp einen von Arginin zu Histidin.

6 Literaturverzeichnis

Abad, V., Meyers, J. L., Weise, M., Gafni, R. I., Barnes, K. M., Nilsson, O., Bacher, J. D., Baron, J., (2002). The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology*. 143(5), 1851-1857.

Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Martin, J. F., Schedl, A., 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(21), 2813-2828.

Alevizopoulos, A., Dusserre, Y., Ruegg, U., Mermoud, N., (1997). Regulation of the transforming growth factor beta-responsive transcription factor CTF-1 by calcineurin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV. *J.Biol.Chem.* 19;272(38), 23597-23605.

Allain, T. J., McGregor, A. M., (1993). Thyroid hormones and bone. *J.Endocrinol.* 139(1), 9-18.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J., (1990). Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* 215, 403-410.

Alvarez, J., Balbin, M., Santos, F., Fernandez, M., Ferrando, S., 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(1), 82-94.

Amizuka, N., Warshawsky, H., Henderson, J. E., Goltzman, D., Karaplis, A. C., (1994). Parathyroid hormone-related peptide-depleted mice show abnormal epiphyseal cartilage development and altered endochondral bone formation. *J.Cell Biol.* 126(6), 1611-1623.

Anderson, H. C., (2003). Matrix vesicles and calcification. *Curr.Rheumatol.Rep.* 5(3), 222-226.

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., Ia-Kokko, L., (1999). An allele of COL9A2 associated with intervertebral disc disease. *Science*. 285(5426), 409-412.

Apt, D., Liu, Y., 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.

Artlett, C. M., Chen, S. J., Varga, J., Jimenez, S. A., (1998). Modulation of basal expression of the human alpha1(I) procollagen gene (COL1A1) by tandem NF-1/Sp1 promoter elements in normal human dermal fibroblasts. *Matrix Biol.* 17(6), 425-434.

Auge, A., (2004). Negative Regulation der Chondrozytenreifung: Differentielle Genexpression verschiedener Chondrozytenpopulationen des embryonalen Hühnersternums. Dissertation Universität Münster .

- Babarina, A. V., Möllers, U., Bittner, K., Vischer, P., 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.
- Bachurski, C. J., Kelly, S. E., Glasser, S. W., Currier, T. A., (1997). Nuclear factor I family members regulate the transcription of surfactant protein-C. *J.Biol.Chem.* 272(52), 32759-32766.
- Ballock, R. T., O'Keefe, R. J., (2003). Physiology and pathophysiology of the growth plate. *Birth Defects Res.C.Embryo.Today.* 69(2), 123-143.
- Ballock, R. T., 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(5), 1311-1318.
- Ballock, R. T., Zhou, X., Mink, L. M., Chen, D. H., Mita, B. C., (2001). Both retinoic acid and 1,25(OH)₂ vitamin D₃ inhibit thyroid hormone-induced terminal differentiation of growth plate chondrocytes. *J.Orthop.Res.* 19(1), 43-49.
- Bandyopadhyay, S., Gronostajski, R. M., (1994). Identification of a conserved oxidation-sensitive cysteine residue in the NFI family of DNA-binding proteins. *J.Biol.Chem.* 269(47), 29949-29955.
- Bateman, J. F., Lamander, S. R., Ramshaw, J. A. M., (1996). Collagen Superfamily. *Extracellular Matrix.* Melbourne: Harwod Academic Press, pp. 22-67.
- Bates, G. P., Schor, S. L., Grant, M. E., (1987). A comparison of the effects of different substrata on chondrocyte morphology and the synthesis of collagen types IX and X. *In Vitro Cell Dev.Biol.* 23(5), 374-380.
- Bedford, F. K., Julius, D., Ingraham, H. A., (1998). Neuronal expression of the 5HT₃ serotonin receptor gene requires nuclear factor 1 complexes. *J.Neurosci.* 18(16), 6186-6194.
- Beier, F., Vornehm, S., Poschl, E., von der, M. K., Lammi, M. J., (1997). Localization of silencer and enhancer elements in the human type X collagen gene. *J.Cell Biochem.* 66(2), 210-218.
- Bell, K. M., Western, P. S., Sinclair, A. H., (2000). SOX8 expression during chick embryogenesis. *Mech.Dev.* 94(1-2), 257-260.
- Benya, P. D., Shaffer, J. D., (1982). Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell.* 30, 215-224.
- Bessey, A. O., Lowry, O. H., Brock, M. J., (1946). A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J.Biol.Chem* 321-329.
- Bi, W., Huang, W., Whitworth, D. J., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R., de Crombrughe, B., (2001). Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 98(12), 6698-6703.

- Birk, D. E., Fitch, J. M., Babiarz, J. P., Doane, K. J., Linsenmayer, T. F., (1990). Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J.Cell Sci.* 95 (Pt 4), 649-657.
- Bishop, P. N., Crossman, M. V., McLeod, D., Ayad, S., (1994). Extraction and characterization of the tissue forms of collagen types II and IX from bovine vitreous. *Biochem.J.* 299 (Pt 2), 497-505.
- Bitgood, M. J., 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(1), 126-138.
- Bittner, K., Vischer, P., Bartholmes, P., Bruckner, P., (1998). Role of the subchondral vascular system in endochondral ossification: endothelial cells specifically derepress late differentiation in resting chondrocytes in vitro. *Exp.Cell Res.* 238, 491-497.
- Böhme, K., Conscience-Egli, M., Tschan, T., Winterhalter, K. H., 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.
- Böhme, K., Winterhalter, K. H., 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.
- 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., 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(3), 1212-1217.
- Boot-Handford, R. P., Tuckwell, D. S., Plumb, D. A., Rock, C. F., Poulosom, R., (2003). A novel and highly conserved collagen (pro(alpha)1(XXVII)) with a unique expression pattern and unusual molecular characteristics establishes a new clade within the vertebrate fibrillar collagen family. *J.Biol.Chem.* 278(33), 31067-31077.
- Bouvard, D., Brakebusch, C., Gustafsson, E., Aszodi, A., Bengtsson, T., Berna, A., Fassler, R., (2001). Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Circ.Res.* 89(3), 211-223.
- Boyan, B. D., Sylvia, V. L., McKinney, N., Schwartz, Z., (2003). Membrane actions of vitamin D metabolites 1alpha,25(OH)2D3 and 24R,25(OH)2D3 are retained in growth plate cartilage cells from vitamin D receptor knockout mice. *J.Cell Biochem.* 90(6), 1207-1223.
- Bradford, M. M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72:248-54., 248-254.
- Brakebusch, C., Bouvard, D., Stanchi, F., Sakai, T., Fassler, R., (2002). Integrins in invasive growth. *J.Clin.Invest.* 109(8), 999-1006.

- Brewton, R. G., Wright, D. W., Mayne, R., (1991). Structural and functional comparison of type IX collagen-proteoglycan from chicken cartilage and vitreous humor. *J.Biol.Chem.* 266(8), 4752-4757.
- Briggs, M. D., Choi, H., Warman, M. L., Loughlin, J. A., Wordsworth, P., Sykes, B. C., Irlen, C. M., Smith, M., Wynne-Davies, R., Lipson, M. H., ., (1994). Genetic mapping of a locus for multiple epiphyseal dysplasia (EDM2) to a region of chromosome 1 containing a type IX collagen gene. *Am.J.Hum.Genet.* 55(4), 678-684.
- Brochhausen, C., Lehmann, M., Halstenberg, S., Meurer, A., Klaus, G., Kirkpatrick, C. J., (2009). Signalling molecules and growth factors for tissue engineering of cartilage-what can we learn from the growth plate? *J.Tissue Eng Regen.Med.* 3(6), 416-429.
- Bruckner, P., Mendler, M., Steinmann, B., Huber, S., Winterhalter, K. H., (1988). The structure of human collagen type IX and its organization in fetal and infant cartilage fibrils. *J.Biol.Chem.* 263(32), 16911-16917.
- Bruckner, P., van der Rest, M., (1994). Structure and function of cartilage collagens. *Microsc.Res.Tech.* 28, 378-384.
- Buckwalter, J. A., Mankin, H. J., (1998). Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr.Course Lect.* 47, 477-486.
- Budde, B., Blumbach, K., Ylostalo, J., Zaucke, F., Ehlen, H. W., Wagener, R., la-Kokko, L., Paulsson, M., Bruckner, P., Grassel, S., (2005). Altered integration of matrilin-3 into cartilage extracellular matrix in the absence of collagen IX. *Mol.Cell Biol.* 25, 10465-10478.
- Burch, W. M., Lebovitz, H. E., (1982). Triiodothyronine stimulates maturation of porcine growth-plate cartilage in vitro. *J.Clin.Invest.* 70(3), 496-504.
- Calvin, N. M., Hanawalt, P. C., (1988). High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J.Bacteriol.* 170, 2796-2801.
- Cancedda, R., Descalzi, C. F., Castagnola, P., (1995). Chondrocyte differentiation. *Int.Rev.Cytol.* 159, 265-358.
- Candelieri, G. A., Jurutka, P. W., Haussler, M. R., St-Arnaud, R., (1996). A composite element binding the vitamin D receptor, retinoid X receptor alpha, 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.
- Cardinaux, J. R., Chapel, S., 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(52), 32947-32956.
- Carrascosa, A., Ferrandez, M. A., Audi, L., Ballabriga, A., (1992). Effects of triiodothyronine (T3) and identification of specific nuclear T3-binding sites in cultured human fetal epiphyseal chondrocytes. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 75(1), 140-144.
- Carrington, J. L., Chen, P., Yanagishita, M., Reddi, A. H., (1991). Osteogenin (bone morphogenetic protein-3) stimulates cartilage formation by chick limb bud cells in

vitro. *Dev.Biol.* 146(2), 406-415.

Castagnola, P., Dozin, B., Moro, G., Cancedda, R., (1988). Changes in the expression of collagen genes show two stages in chondrocyte differentiation in vitro. *J.Cell Biol.* 106(2), 461-467.

Cereghini, S., Raymondjean, M., Carranca, A. G., Herbomel, P., Yaniv, M., (1987). Factors involved in control of tissue-specific expression of albumin gene. *Cell.* 50(4), 627-638.

Chadjichristos, C., Ghayor, C., Herrouin, J. F., Ia-Kokko, L., Suske, G., Pujol, J. P., Galera, P., (2002). Down-regulation of human type II collagen gene expression by transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) in articular chondrocytes involves SP3/SP1 ratio. *J.Biol.Chem.* 277(46), 43903-43917.

Chadjichristos, C., Ghayor, C., Kypriotou, M., Martin, G., Renard, E., Ia-Kokko, L., Suske, G., de Crombrughe, B., Pujol, J. P., Galera, P., (2003). Sp1 and Sp3 transcription factors mediate interleukin-1 beta down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes. *J.Biol.Chem.* 278(41), 39762-39772.

Chaudhry, A. Z., Lyons, G. E., Gronostajski, R. M., (1997). Expression patterns of the four nuclear factor I genes during mouse embryogenesis indicate a potential role in development. *Dev.Dyn.* 208, 313-325.

Chaudhry, A. Z., Vitullo, A. D., Gronostajski, R. M., (1998). Nuclear factor I (NFI) isoforms differentially activate simple versus complex NFI-responsive promoters. *J.Biol.Chem.* 273(29), 18538-18546.

Chaudhry, A. Z., Vitullo, A. D., 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(11), 7072-7081.

Chen, P., Carrington, J. L., Hammonds, R. G., 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(2), 509-515.

Chen, Q., Johnson, D. M., Haudenschild, D. R., Goetinck, P. F., (1995). Progression and recapitulation of the chondrocyte differentiation program: cartilage matrix protein is a marker for cartilage maturation. *Dev.Biol.* 172(1), 293-306.

Chen, Q., Johnson, D. M., Haudenschild, D. R., Goetinck, P. F., (1996). Cartilage matrix protein: expression patterns in chicken, mouse, and human. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 785, 238-240.

Cheung, J. O., Grant, M. E., Jones, C. J., Hoyland, J. A., Freemont, A. J., Hillarby, M. C., (2003). Apoptosis of terminal hypertrophic chondrocytes in an in vitro model of endochondral ossification. *J.Pathol.* 201(3), 496-503.

Chimal-Monroy, J., Bravo-Ruiz, M. T., Diaz de León, L., (1996). Regulation of chondrocyte differentiation by transforming growth factors beta 1, beta 2, beta 3, and

beta 5. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 785, 241-244.

Chimal-Monroy, J., Rodriguez-Leon, J., Montero, J. A., Ganan, Y., Macias, D., Merino, R., Hurler, J. M., (2003). Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev.Biol.* 257(2), 292-301.

Chu, H. M., Fischer, W. H., Osborne, T. F., Comb, M. J., (1991). NF-1 proteins from brain interact with the proenkephalin cAMP inducible enhancer. *Nucleic Acids Res.* 19(10), 2721-2728.

Chung, U. I., (2004). Essential role of hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development. *Endocr.J.* 51(1), 19-24.

Chung, U. I., Lanske, B., Lee, K., Li, E., Kronenberg, H., (1998). The parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor coordinates endochondral bone development by directly controlling chondrocyte differentiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95(22), 13030-13035.

Compston, J. E., (1993). Thyroid hormone therapy and the skeleton. *Clin.Endocrinol.(Oxf).* 39(5), 519-520.

Cooke, D. W., Lane, M. D., (1999a). The transcription factor nuclear factor 1 mediates repression of the GLUT4 promoter by insulin. *J.Biol.Chem.* 274(18), 12917-12924.

Cooke, D. W., Lane, M. D., (1999b). Transcription factor NF1 mediates repression of the GLUT4 promoter by cyclic-AMP. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 260(3), 600-604.

Corthesy, B., Claret, F. X., Wahli, W., (1990). Estrogen receptor level determines sex-specific in vitro transcription from the *Xenopus* vitellogenin promoter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87(20), 7878-7882.

Courtois, S. J., Lafontaine, D. A., Lemaigre, F. P., Durviaux, S. M., Rousseau, G. G., (1990). Nuclear factor-1 and activator protein-2 bind in a mutually exclusive way to overlapping promoter sequences and trans-activate the human growth hormone gene. *Nucleic Acids Res.* 18(1), 57-64.

Czarny-Ratajczak, M., Lohiniva, J., Rogala, P., Kozlowski, K., Perala, M., Carter, L., Spector, T. D., Kolodziej, L., Seppanen, U., Glazar, R., Krolewski, J., Latos-Bielenska, A., Ia-Kokko, L., (2001). A mutation in COL9A1 causes multiple epiphyseal dysplasia: further evidence for locus heterogeneity. *Am.J.Hum.Genet.* 69(5), 969-980.

D'Angelo, M., 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(9), 1368-1377.

das Neves, L., Duchala, C. S., Tolentino-Silva, F., Haxhiu, M. A., Colmenares, C., Macklin, W. B., Campbell, C. E., Butz, K. G., Gronostajski, R. M., (1999). Disruption of the murine nuclear factor 1-A gene (*Nfia*) results in perinatal lethality, hydrocephalus, and agenesis of the corpus callosum. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96,

11946-11951.

de Crombrugge, B., Lefebvre, V., Behringer, R. R., Bi, W., Murakami, S., Huang, W., (2000). Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biol.* 19(5), 389-394.

Dekker, J., van Oosterhout, J. A., 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(8), 4073-4080.

Diab, M., Wu, J. J., Eyre, D. R., (1996). Collagen type IX from human cartilage: a structural profile of intermolecular cross-linking sites. *Biochem.J.* 314 (Pt 1), 327-332.

Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D., Siebert, P. D., (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 6025-6030.

Dourado, G., LuValle, P., (1998). Proximal DNA elements mediate repressor activity conferred by the distal portion of the chicken collagen X promoter. *J.Cell Biochem.* 70(4), 507-516.

Dower, W. J., Miller, J. F., Ragsdale, C. W., (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16, 6127-6145.

Drissi, M. H., Li, X., Sheu, T. J., Zuscik, M. J., Schwarz, E. M., Puzas, J. E., Rosier, R. N., 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(6), 1287-1298.

Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L., Karsenty, G., (1997). Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 89(5), 747-754.

Elder, G. A., Liang, Z., Snyder, S. E., Lazzarini, R. A., (1992). Multiple nuclear factors interact with the promoter of the human neurofilament M gene. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 15(1-2), 99-107.

Enomoto, H., Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M., Nomura, S., Himeno, M., Kitamura, Y., Kishimoto, T., Komori, T., (2000). Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J.Biol.Chem.* 275(12), 8695-8702.

Enomoto-Iwamoto, M., Enomoto, H., Komori, T., Iwamoto, M., (2001). Participation of Cbfa1 in regulation of chondrocyte maturation. *Osteoarthritis.Cartilage.* 9 Suppl A, S76-S84.

Eyre, D. R., Wu, J. J., (1987). Type XI or 1a2a3a collagen, in: *Structure and Function of CollagenTypes*. Orlando: Academic Press.

Eyre, D., (2002). Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res.* 4(1), 30-35.

- Eyre, D. R., Pietka, T., Weis, M. A., Wu, J. J., (2004). Covalent cross-linking of the NC1 domain of collagen type IX to collagen type II in cartilage. *J.Biol.Chem.* 279(4), 2568-2574.
- Farjanel, J., Schurmann, G., 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, S55-S63.
- Fernandez, A. A., Guerrero, A. I., Martinez, M. I., Vazquez, M. E., Fernandez, J. B., Octavio, E., Labrado, J. L., Silva, M. E., de Araoz, M. F., Garcia-Ramos, R., Ribes, M. G., Gomez, C., Valdivia, J. I., Valbuena, R. N., Ramon, J. R., (2009). Malformations of the craniocervical junction (Chiari type I and syringomyelia: classification, diagnosis and treatment). *BMC.Musculoskelet.Disord.* 10 Suppl 1, S1.
- Fitzgerald, J., Rich, C., Zhou, F. H., Hansen, U., (2008). Three novel collagen VI chains, alpha4(VI), alpha5(VI), and alpha6(VI). *J.Biol.Chem.* 283(29), 20170-20180.
- Frohman, M. A., Dush, M. K., Martin, G. R., (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 85(23), 8998-9002.
- Funk, W. D., Wright, W. E., (1992). Cyclic amplification and selection of targets for multicomponent complexes: myogenin interacts with factors recognizing binding sites for basic helix-loop-helix, nuclear factor 1, myocyte-specific enhancer-binding factor 2, and COMP1 factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89(20), 9484-9488.
- Gannon, J. M., Walker, G., Fischer, M., Carpenter, R., Thompson, R. C., Jr., Oegema, T. R., Jr., (1991). Localization of type X collagen in canine growth plate and adult canine articular cartilage. *J.Orthop.Res.* 9(4), 485-494.
- Ganten, D., Ruckpaul, K., (2003). *Molekularmedizinische Grundlagen von rheumatischen Erkrankungen.*
- Gara, S. K., Grumati, P., Urciuolo, A., Bonaldo, P., Kobbe, B., Koch, M., Paulsson, M., Wagener, R., (2008). Three novel collagen VI chains with high homology to the alpha3 chain. *J.Biol.Chem.* 283(16), 10658-10670.
- Gibson, G. J., Flint, M. H., (1985). Type X collagen synthesis by chick sternal cartilage and its relationship to endochondral development. *J.Cell Biol.* 101(1), 277-284.
- Gibson, G. J., Schor, S. L., Grant, M. E., (1982). Effects of matrix macromolecules on chondrocyte gene expression: synthesis of a low molecular weight collagen species by cells cultured within collagen gels. *J.Cell Biol.* 93(3), 767-774.
- Gil, G., Osborne, T. F., Goldstein, J. L., Brown, M. S., (1988). Purification of a protein doublet that binds to six TGG-containing sequences in the promoter for hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J.Biol.Chem.* 263(35), 19009-19019.
- Gilbert, S. F., (2006). *Developmental biology.* Palgrave Macmillan.
- Gordon, M. K., Hahn, R. A., (2010). Collagens. *Cell Tissue Res.* 339(1), 247-257.

- Gounari, F., de Francesco, R., Schmitt, J., van der Vliet, P. C., Cortese, R., Stunnenberg, H., (1990). Amino-terminal domain of NF1 binds to DNA as a dimer and activates adenovirus DNA replication. *EMBO J.* 9(2), 559-566.
- Grant, W. T., Wang, G. J., Balian, G., (1987). Type X collagen synthesis during endochondral ossification in fracture repair. *J.Biol.Chem.* 262(20), 9844-9849.
- Greenspan, D. S., Cheng, W., Hoffman, G. G., (1991). The pro-alpha 1(V) collagen chain. Complete primary structure, distribution of expression, and comparison with the pro-alpha 1(XI) collagen chain. *J.Biol.Chem.* 266(36), 24727-24733.
- Gress, C. J., Jacenko, O., (2000). Growth plate compressions and altered hematopoiesis in collagen X null mice. *J.Cell Biol.* 149(4), 983-993.
- Grimsrud, C. D., Romano, P. R., D'Souza, M., Puzas, J. E., Reynolds, P. R., Rosier, R. N., O'Keefe, R. J., (1999). BMP-6 is an autocrine stimulator of chondrocyte differentiation. *J.Bone Miner.Res.* 14(4), 475-482.
- Gronostajski, R. M., (2000). Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. *Gene* 249, 31-45.
- Gronostajski, R. M., Adhya, S., Nagata, K., Guggenheimer, R. A., Hurwitz, J., (1985). Site-specific DNA binding of nuclear factor I: analyses of cellular binding sites. *Mol.Cell Biol.* 5(5), 964-971.
- Grunder, A., Qian, F., Ebel, T. T., Mincheva, A., Lichter, P., Kruse, U., Sippel, A. E., (2003). Genomic organization, splice products and mouse chromosomal localization of genes for transcription factor Nuclear Factor One. *Gene* 304, 171-181.
- Haaijman, A., Karperien, M., Lanske, B., Hendriks, J., Lowik, C. W., Bronckers, A. L., Burger, E. H., (1999). Inhibition of terminal chondrocyte differentiation by bone morphogenetic protein 7 (OP-1) in vitro depends on the periarticular region but is independent of parathyroid hormone-related peptide. *Bone.* 25(4), 397-404.
- Hagg, R., Bruckner, P., Hedbom, E., (1998). Cartilage fibrils of mammals are biochemically heterogeneous: differential distribution of decorin and collagen IX. *J.Cell Biol.* 142(1), 285-294.
- Hamburger, V., Hamilton, H. L., (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev.Dyn.* 195, 231-272.
- Hamm, A., Krott, N., Breibach, I., Blindt, R., Bosserhoff, A. K., (2002). Efficient transfection method for primary cells. *Tissue Eng.* 8(2), 235-245.
- Hammerschmidt, M., Brook, A., McMahon, A. P., (1997). The world according to hedgehog. *Trends Genet.* 13(1), 14-21.
- Hatori, M., Klatte, K. J., Teixeira, C. C., 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(12), 1960-1968.
- Hatzioannou, T., Goff, S. P., (2001). Infection of nondividing cells by Rous sarcoma virus. *J.Virol.* 75, 9526-9531.

- Heinegard, D., Oldberg, A., (1989). Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J.* 3(9), 2042-2051.
- Hennighausen, L., Siebenlist, U., Danner, D., Leder, P., Rawlins, D., Rosenfeld, P., Kelly, T., Jr., (1985). High-affinity binding site for a specific nuclear protein in the human IgM gene. *Nature.* 314(6008), 289-292.
- Hirsch, M. S., Lunsford, L. E., Trinkaus-Randall, V., Svoboda, K. K., (1997). Chondrocyte survival and differentiation in situ are integrin mediated. *Dev.Dyn.* 210(3), 249-263.
- Holden, P., Meadows, R. S., Chapman, K. L., Grant, M. E., Kadler, K. E., Briggs, M. D., (2001). Cartilage oligomeric matrix protein interacts with type IX collagen, and disruptions to these interactions identify a pathogenetic mechanism in a bone dysplasia family. *J.Biol.Chem.* 276(8), 6046-6055.
- Horton, W. A., (1993). Morphology of Connective Tissue: Cartilage. In: *Connective Tissue and its Heritable Disorders (Ed.)*, Wiley-Liss, pp. 73-84.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A., (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 6, 279-284.
- Hunziker, E. B., (1994). Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microsc.Res.Tech.* 28(6), 505-519.
- Hynes, R. O., (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69(1), 11-25.
- 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., Komori, T., (1999). Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Dev.Dyn.* 214(4), 279-290.
- Inoue, K., Ozaki, S., Shiga, T., Ito, K., Masuda, T., Okado, N., Iseda, T., Kawaguchi, S., Ogawa, M., Bae, S. C., Yamashita, N., Ito, Y., (2002). Runx3 controls the axonal projection of proprioceptive dorsal root ganglion neurons. *Nat.Neurosci.* 5(10), 946-954.
- Inoue, T., Tamura, T., Furuichi, T., Mikoshiba, K., (1990). Isolation of complementary DNAs encoding a cerebellum-enriched nuclear factor I family that activates transcription from the mouse myelin basic protein promoter. *J.Biol.Chem.* 265, 19065-19070.
- Iwamoto, M., Golden, E. B., Adams, S. L., Noji, S., Pacifici, M., (1993). Responsiveness to retinoic acid changes during chondrocyte maturation. *Exp.Cell Res.* 205(2), 213-224.
- Jacenko, O., LuValle, P. A., Olsen, B. R., (1993). Spondylometaphyseal dysplasia in mice carrying a dominant negative mutation in a matrix protein specific for cartilage-to-bone transition. *Nature.* 365(6441), 56-61.
- Jacenko, O., Roberts, D. W., Campbell, M. R., McManus, P. M., Gress, C. J., Tao, Z., (2002). Linking hematopoiesis to endochondral skeletogenesis through analysis of

mice transgenic for collagen X. *Am.J.Pathol.* 160(6), 2019-2034.

Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., Linsley, P. S., (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat.Biotechnol.* 21, 635-637.

Jackson, D. A., Rowader, K. E., Stevens, K., Jiang, C., Milos, P., Zaret, K. S., (1993). Modulation of liver-specific transcription by interactions between hepatocyte nuclear factor 3 and nuclear factor 1 binding DNA in close apposition. *Mol.Cell Biol.* 13(4), 2401-2410.

Janson, L., Weller, P., Pettersson, U., (1989). Nuclear factor I can functionally replace transcription factor Sp1 in a U2 small nuclear RNA gene enhancer. *J.Mol.Biol.* 205(2), 387-396.

Jikko, A., Kato, Y., Hiranuma, H., Fuchihata, H., (1999). Inhibition of chondrocyte terminal differentiation and matrix calcification by soluble factors released by articular chondrocytes. *Calcif.Tissue Int.* 65(4), 276-279.

Jones, K. A., Kadonaga, J. T., Rosenfeld, P. J., Kelly, T. J., Tjian, R., (1987). A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. *Cell.* 48(1), 79-89.

Karp, S. J., Schipani, E., St-Jacques, B., Hunzelman, J., Kronenberg, H., McMahon, A. P., (2000). Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent pathways. *Development.* 127(3), 543-548.

Kim, I. S., Otto, F., Zabel, B., Mundlos, S., (1999). Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech.Dev.* 80(2), 159-170.

Kingsley, D. M., Bland, A. E., Grubber, J. M., Marker, P. C., Russell, L. B., Copeland, N. G., 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(3), 399-410.

Kobayashi, T., Chung, U. I., Schipani, E., Starbuck, M., Karsenty, G., Katagiri, T., Goad, D. L., Lanske, B., Kronenberg, H. M., (2002). PTHrP and Indian hedgehog control differentiation of growth plate chondrocytes at multiple steps. *Development.* 129(12), 2977-2986.

Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S., Kishimoto, T., (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 89(5), 755-764.

Kronenberg, H. M., (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature.* 423(6937), 332-336.

Kruse, U., Qian, F., Sippel, A. E., (1991). Identification of a fourth nuclear factor I gene in chicken by cDNA cloning: NFI-X. *Nucleic Acids Res.* 19, 6641.

- Kruse, U., 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.
- Kruse, U., Sippel, A. E., (1994b). Transcription factor nuclear factor I proteins form stable homo- and heterodimers. *FEBS Lett.* 348, 46-50.
- Kulyk, W. M., Rodgers, B. J., Greer, K., Kosher, R. A., (1989). Promotion of embryonic chick limb cartilage differentiation by transforming growth factor-beta. *Dev.Biol.* 135(2), 424-430.
- 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., Cheah, K. S., (1997). Abnormal compartmentalization of cartilage matrix components in mice lacking collagen X: implications for function. *J.Cell Biol.* 136(2), 459-471.
- Laemmli, U. K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
- Lanske, B., Karaplis, A. C., Lee, K., Luz, A., Vortkamp, A., Pirro, A., Karperien, M., Defize, L. H., Ho, C., Mulligan, R. C., bou-Samra, A. B., Juppner, H., Segre, G. V., Kronenberg, H. M., (1996). PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science.* 273(5275), 663-666.
- Leahy, P., Crawford, D. R., Grossman, G., Gronostajski, R. M., 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(13), 8813-8822.
- Leboy, P., Grasso-Knight, G., D'Angelo, M., Volk, S. W., Lian, J. V., Drissi, H., Stein, G. S., Adams, S. L., (2001). Smad-Runx interactions during chondrocyte maturation. *J.Bone Joint Surg.Am.* 83-A Suppl 1(Pt 1), S15-S22.
- Leegwater, P. A., van Driel, W., van der Vliet, P. C., (1985). Recognition site of nuclear factor I, a sequence-specific DNA-binding protein from HeLa cells that stimulates adenovirus DNA replication. *EMBO J.* 4(6), 1515-1521.
- Lefebvre, V., Li, P., 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(19), 5718-5733.
- Levanon, D., Brenner, O., Negreanu, V., Bettoun, D., Woolf, E., Eilam, R., Lotem, J., Gat, U., Otto, F., Speck, N., Groner, Y., (2001). Spatial and temporal expression pattern of Runx3 (Aml2) and Runx1 (Aml1) indicates non-redundant functions during mouse embryogenesis. *Mech.Dev.* 109(2), 413-417.
- Lewinson, D., Silbermann, M., (1992). Chondroclasts and endothelial cells collaborate in the process of cartilage resorption. *Anat.Rec.* 233(4), 504-514.
- 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., Itoharu, S., Inazawa, J., Abe, T., Hagiwara, A.,

- Yamagishi, H., Ooe, A., Kaneda, A., Sugimura, T., Ushijima, T., Bae, S. C., Ito, Y., (2002). Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell*. 109(1), 113-124.
- 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., ., (1995). A fibrillar collagen gene, Col11a1, is essential for skeletal morphogenesis. *Cell*. 80(3), 423-430.
- Linsenmayer, T. F., Chen, Q. A., Gibney, E., Gordon, M. K., Marchant, J. K., Mayne, R., Schmid, T. M., (1991). Collagen types IX and X in the developing chick tibiotarsus: analyses of mRNAs and proteins. *Development*. 111(1), 191-196.
- Liu, C. Y., Olsen, B. R., Kao, W. W., (1993a). Developmental patterns of two alpha 1(I) collagen mRNA isoforms in mouse. *Dev.Dyn*. 198(2), 150-157.
- Liu, J. P., Baker, J., Perkins, A. S., Robertson, E. J., Efstratiadis, A., (1993b). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*. 75(1), 59-72.
- Löffler, Petrides, (2003). *Biochemie & Pathobiochemie*.
- Long, F., Sonenshein, G. E., 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(11), 6542-6549.
- Lu Valle, P., Iwamoto, M., Fanning, P., Pacifici, M., Olsen, B. R., (1993). Multiple negative elements in a gene that codes for an extracellular matrix protein, collagen X, restrict expression to hypertrophic chondrocytes. *J.Cell Biol*. 121, 1173-1179.
- Lu, G. H., Schlichter, D., Wicks, W. D., (1992). Interaction of a nuclear factor 1-like protein with a cAMP response element-binding protein in rat liver. *Int.J.Biochem*. 24(3), 455-464.
- Lu, W., Quintero-Rivera, F., Fan, Y., Alkuraya, F. S., Donovan, D. J., Xi, Q., Turbe-Doan, A., Li, Q. G., Campbell, C. G., Shanske, A. L., Sherr, E. H., Ahmad, A., Peters, R., Rilliet, B., Parvex, P., Bassuk, A. G., Harris, D. J., Ferguson, H., Kelly, C., Walsh, C. A., Gronostajski, R. M., Devriendt, K., Higgins, A., Ligon, A. H., Quade, B. J., Morton, C. C., Gusella, J. F., Maas, R. L., (2007). NFIA haploinsufficiency is associated with a CNS malformation syndrome and urinary tract defects. *PLoS.Genet*. 3, e80.
- LuValle, P., Daniels, K., Hay, E. D., Olsen, B. R., (1992). Type X collagen is transcriptionally activated and specifically localized during sternal cartilage maturation. *Matrix*. 12(5), 404-413.
- LuValle, P., Hayashi, M., Olsen, B. R., (1989). Transcriptional regulation of type X collagen during chondrocyte maturation. *Dev.Biol*. 133(2), 613-616.
- Lyons, K. M., Pelton, R. W., 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(4), 833-844.

Macias, D., Ganan, Y., Sampath, T. K., Piedra, M. E., Ros, M. A., 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(6), 1109-1117.

Magee, C., Nurminskaya, M., Faverman, L., Galera, P., Linsenmayer, T., (2005). SP3/SP1 transcription activity regulates specific expression of collagen type X in hypertrophic chondrocytes. *J.Biol.Chem*.

Mann, H. H., Ozbek, S., Engel, J., Paulsson, M., Wagener, R., (2004). Interactions between the cartilage oligomeric matrix protein and matrilins. Implications for matrix assembly and the pathogenesis of chondrodysplasias. *J.Biol.Chem*. 279(24), 25294-25298.

Meisterernst, M., Rogge, L., Foeckler, R., Karaghiosoff, M., Winnacker, E. L., (1989). Structural and functional organization of a porcine gene coding for nuclear factor I. *Biochemistry* 28, 8191-8200.

Mendler, M., Eich-Bender, S. G., Vaughan, L., Winterhalter, K. H., Bruckner, P., (1989). Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI. *J.Cell Biol*. 108(1), 191-197.

Mermod, N., O'Neill, E. A., Kelly, T. J., Tjian, R., (1989). The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-I is distinct from the replication and DNA binding domain. *Cell*. 58(4), 741-753.

Merriman, H. L., van Wijnen, A. J., Hiebert, S., Bidwell, J. P., Fey, E., Lian, J., Stein, J., 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(40), 13125-13132.

Milhorat, T. H., Chou, M. W., Trinidad, E. M., Kula, R. W., Mandell, M., Wolpert, C., Speer, M. C., (1999). Chiari I malformation redefined: clinical and radiographic findings for 364 symptomatic patients. *Neurosurgery*. 44(5), 1005-1017.

Minina, E., Kreschel, C., Naski, M. C., Ornitz, D. M., Vortkamp, A., (2002). Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev.Cell*. 3(3), 439-449.

Minina, E., Wenzel, H. M., Kreschel, C., Karp, S., Gaffield, W., McMahon, A. P., Vortkamp, A., (2001). BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development*. 128(22), 4523-4534.

Mizui, Y., Yamazaki, K., Kuboi, Y., Sagane, K., Tanaka, I., (2000). Characterization of 5'-flanking region of human aggrecanase-1 (ADAMTS4) gene. *Mol.Biol.Rep*. 27, 167-173.

Morales, T. I., (2007). Chondrocyte moves: clever strategies? *Osteoarthritis.Cartilage*. 15, 861-871.

Morgan, B. A., Fekete, D. M., (1996). Manipulating gene expression with replication-competent retroviruses. *Methods Cell Biol*. 51, 185-218.

- Muratoglu, S., Bachrati, C., Malpeli, M., Szabo, P., Neri, M., Dozin, B., Deak, F., Cancedda, R., Kiss, I., (1995). Expression of the cartilage matrix protein gene at different chondrocyte developmental stages. *Eur.J.Cell Biol.* 68(4), 411-418.
- Nagata, K., Guggenheimer, R. A., Enomoto, T., Lichy, J. H., 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(21), 6438-6442.
- Nagata, K., Guggenheimer, R. A., Hurwitz, J., (1983). Specific binding of a cellular DNA replication protein to the origin of replication of adenovirus DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 80(20), 6177-6181.
- Nah, H. D., Barembaum, M., Upholt, W. B., (1992). The chicken alpha 1 (XI) collagen gene is widely expressed in embryonic tissues. *J.Biol.Chem.* 267(31), 22581-22586.
- Nebl, G., Mermoud, N., Cato, A. C., (1994). Post-transcriptional down-regulation of expression of transcription factor NF1 by Ha-ras oncogene. *J.Biol.Chem.* 269(10), 7371-7378.
- Nehls, M. C., Grapilon, M. L., Brenner, D. A., (1992). NF-I/Sp1 switch elements regulate collagen alpha 1(I) gene expression. *DNA Cell Biol.* 11(6), 443-452.
- Nehls, M. C., Rippe, R. A., Veloz, L., 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.
- Ng, L. J., Wheatley, S., Muscat, G. E., Conway-Campbell, J., Bowles, J., Wright, E., Bell, D. M., Tam, P. P., Cheah, K. S., Koopman, P., (1997). SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev.Biol.* 183(1), 108-121.
- Nicolae, C., Ko, Y. P., Miosge, N., Niehoff, A., Studer, D., Enggist, L., Hunziker, E. B., Paulsson, M., Wagener, R., Aszodi, A., (2007). Abnormal collagen fibrils in cartilage of matrilin-1/matrilin-3-deficient mice. *J.Biol.Chem.* 282, 22163-22175.
- Norman, A. W., Hurwitz, S., (1993). The role of the vitamin D endocrine system in avian bone biology. *J.Nutr.* 123(2 Suppl), 310-316.
- Novak, A., Goyal, N., Gronostajski, R. M., (1992). Four conserved cysteine residues are required for the DNA binding activity of nuclear factor I. *J.Biol.Chem.* 267(18), 12986-12990.
- Nowock, J., Borgmeyer, U., Puschel, A. W., Rupp, R. A., Sippel, A. E., (1985). The TGGCA protein binds to the MMTV-LTR, the adenovirus origin of replication, and the BK virus enhancer. *Nucleic Acids Res.* 13(6), 2045-2061.
- Ohlsson, C., Nilsson, A., Isaksson, O., Bentham, J., Lindahl, A., (1992). Effects of triiodothyronine and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on alkaline phosphatase activity, [3H]thymidine incorporation and IGF-I receptor mRNA in cultured rat epiphyseal chondrocytes. *J.Endocrinol.* 135(1), 115-123.

- Okubo, Y., Reddi, A. H., (2003). Thyroxine downregulates Sox9 and promotes chondrocyte hypertrophy. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 306(1), 186-190.
- Olsen, B. R., (1996). Role of cartilage collagens in formation of the skeleton. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 785, 124-130.
- Olsen, B. R., (1997). Collagen IX. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 29(4), 555-558.
- Olsen, B. R., Reginato, A. M., Wang, W., (2000). Bone development. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 16, 191-220.
- Ortega, N., Behonick, D., Stickens, D., Werb, Z., (2003). How proteases regulate bone morphogenesis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 995, 109-116.
- Osada, S., Daimon, S., Nishihara, T., Imagawa, M., (1996). Identification of DNA binding-site preferences for nuclear factor I-A. *FEBS Lett.* 390, 44-46.
- Osada, S., Ikeda, T., Xu, M., Nishihara, T., Imagawa, M., (1997). Identification of the transcriptional repression domain of nuclear factor 1-A. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 238(3), 744-747.
- Osada, S., Matsubara, T., Daimon, S., Terazu, Y., Xu, M., Nishihara, T., 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.
- 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., Owen, M. J., (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell.* 89(5), 765-771.
- Paasilta, P., Lohiniva, J., Annunen, S., Bonaventure, J., Le, M. M., Pai, L., Ia-Kokko, L., (1999). COL9A3: A third locus for multiple epiphyseal dysplasia. *Am.J.Hum.Genet.* 64(4), 1036-1044.
- Pateder, D. B., Rosier, R. N., Schwarz, E. M., Reynolds, P. R., Puzas, J. E., D'Souza, M., O'Keefe, R. J., (2000). PTHrP expression in chondrocytes, regulation by TGF-beta, and interactions between epiphyseal and growth plate chondrocytes. *Exp.Cell Res.* 256(2), 555-562.
- Pevny, L. H., Lovell-Badge, R., (1997). Sox genes find their feet. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 7(3), 338-344.
- Plumb, D. A., Dhir, V., Mironov, A., Ferrara, L., Poulosom, R., Kadler, K. E., Thornton, D. J., Briggs, M. D., Boot-Handford, R. P., (2007). Collagen XXVII is developmentally regulated and forms thin fibrillar structures distinct from those of classical vertebrate fibrillar collagens. *J.Biol.Chem.* 282(17), 12791-12795.
- Porter, S., Clark, I. M., Kevorkian, L., Edwards, D. R., (2005). The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem.J.* 386(Pt 1), 15-27.
- Quarto, R., Campanile, G., Cancedda, R., Dozin, B., (1992). Thyroid hormone, insulin, and glucocorticoids are sufficient to support chondrocyte differentiation to hypertrophy: a serum-free analysis. *J.Cell Biol.* 119(4), 989-995.

- Quarto, R., Dozin, B., Bonaldo, P., Cancedda, R., Colombatti, A., (1993). Type VI collagen expression is upregulated in the early events of chondrocyte differentiation. *Development*. 117(1), 245-251.
- Quinn, P. G., Wong, T. W., Magnuson, M. A., Shabb, J. B., Granner, D. K., (1988). Identification of basal and cyclic AMP regulatory elements in the promoter of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol.Cell Biol.* 8(8), 3467-3475.
- Reddi, A. H., (1992). Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *Curr.Opin.Cell Biol.* 4(5), 850-855.
- Reginato, A. M., Lash, J. W., Jimenez, S. A., (1986). Biosynthetic expression of type X collagen in embryonic chick sternum cartilage during development. *J.Biol.Chem.* 261(6), 2897-2904.
- Reinecke, M., Schmid, A. C., Heyberger-Meyer, B., Hunziker, E. B., Zapf, J., (2000). Effect of growth hormone and insulin-like growth factor I (IGF-I) on the expression of IGF-I messenger ribonucleic acid and peptide in rat tibial growth plate and articular chondrocytes in vivo. *Endocrinology*. 141(8), 2847-2853.
- Riccio, A., Pedone, P. V., Lund, L. R., Olesen, T., Olsen, H. S., Andreasen, P. A., (1992). Transforming growth factor beta 1-responsive element: closely associated binding sites for USF and CCAAT-binding transcription factor-nuclear factor I in the type 1 plasminogen activator inhibitor gene. *Mol.Cell Biol.* 12(4), 1846-1855.
- Richardson, G. P., Russell, I. J., Duance, V. C., Bailey, A. J., (1987). Polypeptide composition of the mammalian tectorial membrane. *Hear.Res.* 25(1), 45-60.
- Riemer, S., Gebhard, S., Beier, F., Poschl, E., 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(4), 688-699.
- 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(7), 999-1004.
- Rosenthal, A. K., 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(2), 395-401.
- Rossi, P., Karsenty, G., Roberts, A. B., Roche, N. S., Sporn, M. B., de Crombrughe, B., (1988). A nuclear factor 1 binding site mediates the transcriptional activation of a type I collagen promoter by transforming growth factor-beta. *Cell* 52, 405-414.
- Roughley, P. J., (2001). Articular cartilage and changes in arthritis: noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of cartilage. *Arthritis Res.* 3(6), 342-347.
- Roulet, E., Armentero, M. T., Krey, G., Corthesy, B., Dreyer, C., Mermoud, N., 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(10), 5552-5562.

Rupp, R. A., Kruse, U., Multhaup, G., Gobel, U., Beyreuther, K., 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.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A., (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239, 487-491.

Sambrook, J., (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual.*

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R., (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology.* 24:104-8., 104-108.

Santoro, C., Mermod, N., Andrews, P. C., 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(6179), 218-224.

Savontaus, M., Ihanamaki, T., Perala, M., Metsaranta, M., Sandberg-Lall, M., Vuorio, E., (1998). Expression of type II and IX collagen isoforms during normal and pathological cartilage and eye development. *Histochem.Cell Biol.* 110(2), 149-159.

Schafer, A. J., Foster, J. W., Kwok, C., Weller, P. A., Guioli, S., 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.

Schepers, G. E., Bullejos, M., Hosking, B. M., Koopman, P., (2000). Cloning and characterisation of the Sry-related transcription factor gene Sox8. *Nucleic Acids Res.* 28(6), 1473-1480.

Schmid, T. M., Linsenmayer, T. F., (1983). A short chain (pro)collagen from aged endochondral chondrocytes. Biochemical characterization. *J.Biol.Chem.* 258(15), 9504-9509.

Schmid, T. M., Linsenmayer, T. F., (1985). Immunohistochemical localization of short chain cartilage collagen (type X) in avian tissues. *J.Cell Biol.* 100, 598-605.

Schmid, T. M., Linsenmayer, T. F., (1987). Type X collagen. In: R.Mayne, R:E: Burgeson (Eds.), *Structure and function of collagen types.* Academic Press, Orlando, Florida, pp. 223-259.

Sekiya, I., Tsuji, K., Koopman, P., Watanabe, H., Yamada, Y., Shinomiya, K., Nifuji, A., 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(15), 10738-10744.

Serra, R., Johnson, M., Filvaroff, E. H., LaBorde, J., Sheehan, D. M., Derynck, R., Moses, H. L., (1997). Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *J.Cell Biol.* 139(2), 541-552.

- Serra, R., Karaplis, A., Sohn, P., (1999). Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)-dependent and -independent effects of transforming growth factor beta (TGF-beta) on endochondral bone formation. *J.Cell Biol.* 145(4), 783-794.
- Shuman, S., (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J.Biol.Chem.* 269, 32678-32684.
- Silvestrini, G., Ballanti, P., Patacchioli, F. R., Mocetti, P., Di Grezia, R., Wedard, B. M., Angelucci, L., Bonucci, E., (2000). Evaluation of apoptosis and the glucocorticoid receptor in the cartilage growth plate and metaphyseal bone cells of rats after high-dose treatment with corticosterone. *Bone.* 26(1), 33-42.
- Smink, J. J., Koster, J. G., Gresnigt, M. G., Rooman, R., Koedam, J. A., Van Buul-Offers, S. C., (2002). IGF and IGF-binding protein expression in the growth plate of normal, dexamethasone-treated and human IGF-II transgenic mice. *J.Endocrinol.* 175(1), 143-153.
- Smits, P., Li, P., Mandel, J., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., de Crombrughe, B., Lefebvre, V., (2001). The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev.Cell.* 1(2), 277-290.
- Sock, E., Schmidt, K., Hermanns-Borgmeyer, I., Bosl, M. R., Wegner, M., (2001). Idiopathic weight reduction in mice deficient in the high-mobility-group transcription factor Sox8. *Mol.Cell Biol.* 21(20), 6951-6959.
- Söderhall, C., Marenholz, I., Kerscher, T., Ruschendorf, F., Esparza-Gordillo, J., Worm, M., Gruber, C., Mayr, G., Albrecht, M., Rohde, K., Schulz, H., Wahn, U., Hubner, N., Lee, Y. A., (2007). Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis. *PLoS.Biol.* 5(9), e242.
- Spitz, F., Salminen, M., Demignon, J., Kahn, A., Daegelen, D., Maire, P., (1997). A combination of MEF3 and NFI proteins activates transcription in a subset of fast-twitch muscles. *Mol.Cell Biol.* 17(2), 656-666.
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M., McMahon, A. P., (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* 13(16), 2072-2086.
- Stevenson, S., Hunziker, E. B., Herrmann, W., Schenk, R. K., (1990). Is longitudinal bone growth influenced by diurnal variation in the mitotic activity of chondrocytes of the growth plate? *J.Orthop.Res.* 8(1), 132-135.
- Stricker, S., Fundele, R., Vortkamp, A., Mundlos, S., (2002). Role of Runx genes in chondrocyte differentiation. *Dev.Biol.* 245, 95-108.
- Sun, P., Dong, P., Dai, K., Hannon, G. J., Beach, D., (1998). p53-independent role of MDM2 in TGF-beta1 resistance. *Science.* 282(5397), 2270-2272.
- Swiderski, R. E., 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(2), 118-127.

- Sylvia, V. L., Schwartz, Z., Ellis, E. B., Helm, S. H., Gomez, R., Dean, D. D., Boyan, B. D., (1996). Nongenomic regulation of protein kinase C isoforms by the vitamin D metabolites 1 α ,25-(OH) $_2$ D $_3$ and 24R,25-(OH) $_2$ D $_3$. *J.Cell Physiol.* 167(3), 380-393.
- Szabo, P., Moitra, J., Rencendorj, A., Rakhely, G., Rauch, T., Kiss, I., (1995). Identification of a nuclear factor- κ B family protein-binding site in the silencer region of the cartilage matrix protein gene. *J.Biol.Chem.* 270, 10212-10221.
- Szűts, V., Möllers, U., Bittner, K., Schurmann, G., Muratoglu, S., Deak, F., Kiss, I., 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.
- Thur, J., Rosenberg, K., Nitsche, D. P., Pihlajamaa, T., la-Kokko, L., Heinegard, D., Paulsson, M., Maurer, P., (2001). Mutations in cartilage oligomeric matrix protein causing pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia affect binding of calcium and collagen I, II, and IX. *J.Biol.Chem.* 276(9), 6083-6092.
- Tschan, T., Böhme, K., Conscience-Egli, M., Zenke, G., Winterhalter, K. H., 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.
- van der Eerden, B. C., Karperien, M., Gevers, E. F., Lowik, C. W., 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(6), 1045-1055.
- van der Rest, M., Mayne, R., Ninomiya, Y., Seidah, N. G., Chretien, M., Olsen, B. R., (1985). The structure of type IX collagen. *J.Biol.Chem.* 260(1), 220-225.
- Vaughan, L., Mendler, M., Huber, S., Bruckner, P., Winterhalter, K. H., Irwin, M. I., Mayne, R., (1988). D-periodic distribution of collagen type IX along cartilage fibrils. *J.Cell Biol.* 106(3), 991-997.
- Veit, G., Kobbe, B., Keene, D. R., Paulsson, M., Koch, M., Wagener, R., (2006). Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. *J.Biol.Chem.* 281(6), 3494-3504.
- von der Mark, K., Kirsch, T., Nerlich, A., Kuss, A., Weseloh, G., Gluckert, K., Stoss, H., (1992). Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheum.* 35(7), 806-811.
- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G. V., Kronenberg, H. M., Tabin, C. J., (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science.* 273(5275), 613-622.
- Vu, T. H., Shipley, J. M., Bergers, G., Berger, J. E., Helms, J. A., Hanahan, D., Shapiro, S. D., Senior, R. M., Werb, Z., (1998). MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell.* 93(3), 411-422.

- Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., Held, M., Zimmer, J., Pasantes, J., Bricarelli, F. D., Keutel, J., Hustert, E., ., (1994). Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell*. 79(6), 1111-1120.
- Walker, G. D., Fischer, M., Gannon, J., Thompson, R. C., Jr., Oegema, T. R., Jr., (1995). Expression of type-X collagen in osteoarthritis. *J.Orthop.Res.* 13(1), 4-12.
- Wallis, G. A., (1996). Bone growth: coordinating chondrocyte differentiation. *Curr.Biol.* 6(12), 1577-1580.
- Wang, J., Zhou, J., Bondy, C. A., (1999). Igf1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy. *FASEB J.* 13(14), 1985-1990.
- Warman, M. L., Abbott, M., Apte, S. S., Hefferon, T., McIntosh, I., Cohn, D. H., Hecht, J. T., Olsen, B. R., Francomano, C. A., (1993). A type X collagen mutation causes Schmid metaphyseal chondrodysplasia. *Nat.Genet.* 5(1), 79-82.
- Weil, D., Mattei, M. G., Passage, E., N'Guyen, V. C., Pribula-Conway, D., Mann, K., Deutzmann, R., Timpl, R., Chu, M. L., (1988). Cloning and chromosomal localization of human genes encoding the three chains of type VI collagen. *Am.J.Hum.Genet.* 42(3), 435-445.
- Weir, E. C., Philbrick, W. M., Amling, M., Neff, L. A., Baron, R., Broadus, A. E., (1996). Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93(19), 10240-10245.
- Weiss, B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T. R., Fareed, G. C., Richardson, C. C., (1968). Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J.Biol.Chem.* 243, 4543-4555.
- Werb, Z., (1997). ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell*. 91(4), 439-442.
- Winterbottom, N., Tondravi, M. M., Harrington, T. L., Klier, F. G., Vertel, B. M., Goetinck, P. F., (1992). Cartilage matrix protein is a component of the collagen fibril of cartilage. *Dev.Dyn.* 193(3), 266-276.
- Woods, K. A., Camacho-Hubner, C., Savage, M. O., Clark, A. J., (1996). Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N.Engl.J.Med.* 335(18), 1363-1367.
- Wozney, J. M., (1992). The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol.Reprod.Dev.* 32(2), 160-167.
- Wright, E., Hargrave, M. R., Christiansen, J., Cooper, L., Kun, J., Evans, T., Gangadharan, U., Greenfield, A., Koopman, P., (1995). The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat.Genet.* 9(1), 15-20.
- Wu, J. J., Eyre, D. R., (1998). Matrilin-3 forms disulfide-linked oligomers with matrilin-

1 in bovine epiphyseal cartilage. *J.Biol.Chem.* 273(28), 17433-17438.

Wu, J. J., Eyre, D. R., (2003). Intervertebral disc collagen. Usage of the short form of the alpha1(IX) chain in bovine nucleus pulposus. *J.Biol.Chem.* 278(27), 24521-24525.

Wurbs, B., (2010). Identifikation differentiell exprimierter Gene in der Chondrozytenreifung: Einfluss von Kollagen VIII auf die späte Differenzierung von Chondrozyten des embryonalen Hühnersternums. Dissertation Universität Münster .

Xiao, Z. S., Hjelmeland, A. B., Quarles, L. D., (2004). Selective deficiency of the "bone-related" Runx2-II unexpectedly preserves osteoblast-mediated skeletogenesis. *J.Biol.Chem.* 279(19), 20307-20313.

Xu, M., Osada, S., Imagawa, M., Nishihara, T., (1997). Genomic organization of the rat nuclear factor I-A gene. *J.Biochem.* 122(4), 795-801.

Yagishita, N., Yamamoto, Y., Yoshizawa, T., Sekine, K., Uematsu, Y., Murayama, H., Nagai, Y., Krezel, W., Chambon, P., Matsumoto, T., Kato, S., (2001). Aberrant growth plate development in VDR/RXR gamma double null mutant mice. *Endocrinology.* 142(12), 5332-5341.

Yang, X., Chen, L., Xu, X., Li, C., Huang, C., Deng, C. X., (2001). TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *J.Cell Biol.* 153(1), 35-46.

Yoshida, C. A., Yamamoto, H., Fujita, T., Furuichi, T., Ito, K., Inoue, K., Yamana, K., Zanma, A., Takada, K., Ito, Y., Komori, T., (2004). Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev.* 18(8), 952-963.

Zambotti, A., Makhlef, H., Shen, J., Ducy, P., (2002). Characterization of an osteoblast-specific enhancer element in the CBFA1 gene. *J.Biol.Chem.* 277(44), 41497-41506.

Zhang, M., Xie, R., Hou, W., Wang, B., Shen, R., Wang, X., Wang, Q., Zhu, T., Jonason, J. H., Chen, D., (2009). PTHrP prevents chondrocyte premature hypertrophy by inducing cyclin-D1-dependent Runx2 and Runx3 phosphorylation, ubiquitylation and proteasomal degradation. *J.Cell Sci.* 122(Pt 9), 1382-1389.

Zheng, Q., Keller, B., Zhou, G., Napierala, D., Chen, Y., Zabel, B., Parker, A. E., Lee, B., (2009). Localization of the cis-enhancer element for mouse type X collagen expression in hypertrophic chondrocytes in vivo. *J.Bone Miner.Res.* 24(6), 1022-1032.

Zheng, Q., Zhou, G., Morello, R., Chen, Y., Garcia-Rojas, X., Lee, B., (2003). Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo. *J.Cell Biol.* 162(5), 833-842.

Zoller, M. J., Smith, M., (1982). Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA. *Nucleic Acids Res.* 10, 6487-6500.

7 Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Peter Bruckner für die Möglichkeit der Durchführung dieser Dissertation in seinem Arbeitskreis danken.

Herrn Prof. Dr. Martin Bähler danke ich für die kurzfristige Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Arno Tiedtke möchte ich für die Übernahme meiner Betreuung im Fachbereich Biologie danken.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Dr. Rita Dreier für die Betreuung meiner Arbeit und deren Korrektur.

Besonders möchte ich auch Herrn Dr. Stephan Niland danken, nicht zuletzt für die hilfreiche Durchsicht dieser Arbeit. Sein Interesse an meiner Arbeit und seine Unterstützung gingen weit über das Selbstverständliche hinaus.

Für die Unterstützung im Labor danke ich besonders Alletta Schmidt-Hederich und Marianne Ahler, die immer ein offenes Ohr hatten und hilfreich zur Seite standen.

Philipp Uhlig möchte ich für die Unterstützung meiner Schreibarbeit danken, besonders aber für seine ständige Hilfsbereitschaft und das stete Aufmuntern.

Birgit Wurbs möchte ich für die Abwechslung im Laboralltag danken, sowie für die gemeinsamen, schweißtreibenden aber schönen Stunden bei der WRFS.

Außerhalb des Labors gilt mein Dank Renate und Paul Elberich, die mich bei sich aufgenommen haben, als ich am Ende meiner praktischen Arbeit schon keinen Wohnsitz mehr in Münster hatte. Die Abende am Reitstall haben mich immer wieder auf andere Gedanken kommen und Kraft schöpfen lassen.

Astrid Lüring bin ich zutiefst dankbar, da sie immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte und mich während der Arbeit und darüber hinaus mit viel Geduld bei meinem Pferd unterstützt hat.

Meinen Eltern möchte ich aus ganzem Herzen danken, da sie mich in jeglicher Hinsicht unterstützt haben und immer für mich da waren. Meinen Schwiegereltern möchte ich für ihr Verständnis und für die Ablenkung von den Sorgen danken.

An letzter und wichtigster Stelle möchte ich Jens für seine Liebe, Hilfsbereitschaft, Geduld...(die Liste wäre einfach zu lang) danken, und einfach dafür, dass es ihn gibt.

