

**Etablierung und Charakterisierung von  
transgenen Mauslinien zur Untersuchung der  
Pathogenese von Chondrodysplasien**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
**Markus Schmitz**  
*aus Bedburg (Erft)*

Köln 2005

Berichterstatter:

**Prof. Dr. Mats Paulsson**

**Prof. Dr. H. W. Klein**

Prüfungsvorsitzender:

**Prof. Dr. J. Brüning**

Tag der mündlichen Prüfung:

Freitag, 13. Januar 2006

*Für meine Familie*

# Abstract

Mutations in the cartilage oligomeric matrix protein (COMP) cause chondrodysplasias in humans. The effects of the most common mutation in COMP (D469 $\Delta$ ) on the pathogenesis of pseudoachondroplasia (PSACH) were analysed in two experimental systems. In a cell culture model, primary bovine and murine chondrocytes were transfected with myc tagged wild type and mutant COMP variants. Transgenic wild type COMP was continuously secreted and furthermore integrated into a collagenous extracellular matrix. In contrast, secretion of mutant COMP was delayed due to a distinct retention within the ER. A small amount of mutant COMP still secreted did not associate with the extracellular matrix (ECM). In addition, the viability of cells expressing mutant COMP was decreased. As a second system, transgenic mouse lines with a cartilage specific expression of wild type or mutant COMP were generated. The transgene expression was confirmed on the RNA and quantified on the protein level. Transgenic and endogenous COMP monomers were able to form mixed, pentameric molecules. In comparison with wild type COMP, mutant COMP was more difficult to extract from cartilage tissue indicating an altered anchorage within the ECM. Transgenic COMP was detected in the proliferative zone of the tibia epiphysis by immunofluorescence staining. Wild type COMP showed a uniform distribution within the ECM while mutant molecules were restricted to the pericellular matrix. Analysis by EM demonstrated improperly formed collagen fibrils in this region as well as disorganized cell clusters within the proliferative zone. Furthermore, transgenic mice show intersternal fusion of the third and fourth sternebrae as a result of the expression of mutant COMP, indicating a role for COMP during endochondral ossification. Male mice exhibit a tendency for growth retardation, while radiological analysis as well as measurement bone parameter by pQCT revealed no significant differences between mutant and control mice. Even though the skeletal phenotype was milder than expected with regard to the clinical features seen in PSACH patients, the transgenic mouse model allows novel insights into molecular mechanisms involved in the pathogenesis of PSACH.

# **I Einleitung ..... 6**

<b>1. Osteochondrodysplasien .....</b>	<b>6</b>
<b>2. Erkrankungen durch Mutationen in Strukturproteinen der extrazellulären Matrix</b>	<b>8</b>
2.1. Pseudoachondroplasie und multiple epiphyseale Dysplasie.....	8
2.2. Therapie .....	13
<b>3. COMP - Cartilage Oligomeric Matrix Protein .....</b>	<b>14</b>
3.1. Phylogenie und Struktur der Thrombospondine.....	14
3.2. Struktur und Expression von COMP .....	16
3.3. Sekretion, posttranslationale Modifizierung und Lokalisation von COMP .....	19
3.4. Interaktionspartner von COMP .....	20
3.5. Mutationen in COMP und deren Auswirkungen im Knorpel .....	21
<b>4. Ziel der Arbeit .....</b>	<b>25</b>

# **II Material und Methoden ..... 26**

<b>1. Material .....</b>	<b>26</b>
1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	26
1.2. Radiochemikalien .....	26
1.3. Lösungen und Puffer .....	26
1.4. Kits .....	27
1.5. Oligonukleotide.....	28
1.6. Enzyme .....	29
1.7. Antikörper .....	30
1.8. Bakterienstamm und Nährmedium .....	31
<b>2. Methoden.....</b>	<b>32</b>
2.1. Klonierungsarbeiten .....	32
2.1.1. Herstellung von Bakterienkulturen.....	32
2.1.2. Lagerung und Konservierung von Bakterien.....	32
2.1.3. Herstellung kompetenter Bakterien (Rubidiumchlorid-Methode) .....	33
2.1.4. Transformation von Bakterien.....	33
2.1.5. Klonierungs- und Expressionsvektoren .....	34
2.1.5.1. Klonierungsvektor .....	34

2.1.5.2.	Expressionsvektoren.....	34
2.1.5.2.1.	CMV-COMP Konstrukte .....	34
2.1.5.2.2.	Col2a1-COMP Konstrukte .....	36
2.1.6.	DNA Präparation und Präzipitation .....	37
2.1.7.	Restriktionsverdau .....	37
2.1.8.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	38
2.2.	Zellkultur und Mauspräparation.....	39
2.2.1.	Ursprung der primären Zellen .....	39
2.2.2.	Zellkulturarbeiten .....	39
2.2.3.	Isolierung primärer boviner Knorpelzellen .....	41
2.2.4.	Isolierung primärer muriner Knorpelzellen.....	41
2.2.5.	Transfektion primärer Knorpelzellen .....	42
2.2.6.	Ernte des Zellüberstandes und des Zellrasens.....	42
2.2.7.	Mauspräparation.....	43
2.2.8.	Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien .....	43
2.2.9.	Isolierung von Gesamt-RNA aus Mausgewebe .....	44
2.2.10.	Proteinextraktion aus Gewebe.....	44
2.2.10.1.	Sequentielle Extraktion (3-Schritt Extraktion).....	44
2.2.10.2.	Sequentielle Extraktion (2-Schritt Extraktion).....	45
2.3.	Analysen.....	46
2.3.1.	Molekularbiologische Analysen.....	46
2.3.1.1.	Denaturierende Agarosegelelektrophorese .....	46
2.3.1.2.	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) .....	46
2.3.1.3.	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	47
2.3.1.4.	Verdau genomischer DNA .....	48
2.3.1.5.	Agarosegelelektrophorese .....	48
2.3.1.6.	Elution von DNA Fragmenten aus Agarosegelen .....	49
2.3.1.7.	Southern Blot .....	50
2.3.1.8.	Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA.....	50
2.3.1.9.	Hybridisierung radioaktiv markierter DNA Sonden .....	51
2.3.1.10.	DNA Sequenzierung .....	52
2.3.2.	Proteinbiochemische Analysen.....	52
2.3.2.1.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	52
2.3.2.2.	Protein-Fällung.....	52
2.3.2.2.1.	Ethanol (EtOH)-Fällung .....	52
2.3.2.2.2.	Trichloressigsäure (TCA)-Fällung.....	53

2.3.2.3.	Immunpräzipitation.....	53
2.3.2.4.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	54
2.3.2.5.	Coomassie Blue Färbung .....	55
2.3.2.6.	Silberfärbung.....	56
2.3.2.7.	Western Blot .....	56
2.3.2.8.	Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	57
2.3.2.9.	Chemolumineszenz Detektion .....	57
2.3.3.	Cytologische und histologische Analysen.....	58
2.3.3.1.	Analyse der Sekretionskinetik (Pulse-Chase Experiment).....	58
2.3.3.2.	Zellvitalitätsexperiment .....	58
2.3.3.3.	Gewebefixierung .....	59
2.3.3.4.	Entmineralisierung .....	59
2.3.3.5.	Präparation von Paraffinschnitten.....	59
2.3.3.6.	Entparaffinierung.....	60
2.3.3.7.	Übersichtsfärbungen.....	60
2.3.3.7.1.	Hämatoxylin & Eosin (HE) Färbung.....	60
2.3.3.7.2.	Safranin O / Fast Green Färbung.....	61
2.3.3.7.3.	Alcian Blau / Kernechtrot Färbung .....	61
2.3.3.7.4.	von Kossa / Safranin O Färbung .....	61
2.3.3.8.	Immunhistochemische Färbungen.....	62
2.3.3.8.1.	IF Färbungen von kultivierten primären Knorpelzellen.....	62
2.3.3.8.2.	IF und IHC Färbungen von Gewebe Paraffinschnitten.....	62
2.3.3.8.3.	Fluoreszenz.....	63
2.3.3.8.4.	Peroxidase .....	63
2.3.4.	Morphometrische Analysen .....	64
2.3.4.1.	Messung von Länge und Körpergewicht.....	64
2.3.4.2.	Skelettfärbung (Alcian Blau / Alizarin Rot Färbung).....	64
2.3.4.3.	Röntgenuntersuchung.....	64
2.3.4.4.	Periphere quantitative Computertomographie (pQCT) .....	65
2.3.4.5.	Elektronenmikroskopie.....	66
2.4.	Auswertung .....	67
2.4.1.	Quantifizierung mittels Phosphor Imager Technologie .....	67
2.4.2.	Mikroskopie.....	67
2.4.3.	Computeranalyse.....	67

# III Ergebnisse ..... 68

<b>1. Transgene Konstrukte und ihre Expression im Zellkulturmodell.....</b>	<b>68</b>
1.1. Primäre bovine und murine Knorpelzellen .....	68
1.1.1. Isolierung und Kultur .....	68
1.1.2. Transfektion und Überexpression von COMP Konstrukten .....	68
1.2. Sekretionskinetik und Lokalisation von transgenem COMP .....	70
1.2.1. Sekretionskinetik.....	70
1.2.2. Subzelluläre Lokalisation .....	72
1.2.3. Extrazelluläre Lokalisation .....	74
1.2.4. Morphologie und Vitalität transfizierter Zellen.....	75
1.3. Transgene Col2a1-COMP Konstrukte.....	76
1.3.1. Herstellung der Col2a1-COMP Konstrukte .....	76
1.3.2. Expressionskontrolle in MC615 Zellen.....	77
<b>2. Etablierung und Genotypisierung von transgenen Mauslinien .....</b>	<b>78</b>
2.1. Herstellung transgener Mäuse .....	78
2.1.1. Vorbereitung der Col2a1-COMP Konstrukte.....	78
2.1.2. Mikroinjektion .....	79
2.1.3. Transgene Linien im genetischen Hintergrund des C57Bl/6 Stammes .....	80
2.1.4. Transgene Linien mit COMP defizientem Hintergrund .....	81
2.2. Genotypisierung .....	82
2.2.1. Identifizierung integrierter Transgen Kopien .....	82
2.2.2. PCR und Southern Blot.....	83
2.2.3. Quantifizierung integrierter Transgen Kopien .....	86
2.2.4. Analyse transgener Mäuse .....	87
<b>3. Expression von transgenem COMP .....</b>	<b>88</b>
3.1. Transkripte des Transgens.....	88
3.1.1. RNA Isolation und RT-PCR .....	88
3.2. Transgene Proteine .....	89
3.2.1. Nachweis und Quantifizierung von COMP im Gewebextrakt.....	89
3.2.2. Nachweis von hybriden COMP Molekülen.....	90
3.2.3. Sequentielle Proteinextraktion aus Gewebe .....	91

<b>4. Histologische und morphometrische Analysen .....</b>	<b>93</b>
4.1. Histologische Analysen .....	93
4.1.1. Struktur der Wachstumsfuge .....	93
4.1.2. Lokalisation von transgenem COMP im Gewebe .....	95
4.1.3. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	98
4.1.4. Lokalisation knorpelspezifischer Proteine.....	99
4.2. Morphometrische Analysen.....	102
4.2.1. Länge und Körpergewicht.....	102
4.2.2. Radiologische Untersuchungen.....	104
4.2.3. Periphere Quantitative Computertomographie (pQCT) .....	105
4.2.4. Skelettfärbungen.....	107
 <b>IV Diskussion .....</b>	 <b>113</b>
1. Transgene Expression im Zellkulturmodell.....	115
2. Transgene Expression in der Maus.....	119
 <b>V Zusammenfassung .....</b>	 <b>133</b>
 <b>VI Literatur.....</b>	 <b>134</b>
 <b>VII Abkürzungen.....</b>	 <b>143</b>
 <b>VIII Danksagung .....</b>	 <b>145</b>
 <b>IX Erklärung.....</b>	 <b>146</b>
 <b>X Lebenslauf .....</b>	 <b>147</b>

# I Einleitung

## 1. Osteochondrodysplasien

Das menschliche Skelett ist ein komplexes Gebilde, das aus Knorpel- und Knochengewebe besteht und hauptsächlich drei Zelltypen enthält: Chondrozyten bzw. Knorpelzellen, Osteoblasten und Osteoclasten. Die etwa 200 Knochen bilden das Stützgerüst des menschlichen Körpers, sind Teil des Bewegungsapparates, erfüllen eine Schutzfunktion für verschiedene Organe und agieren als Blut- und Mineralspeicher (Faller, 1995). Primäre Störungen des Knorpel-Knochen-Systems beim Menschen können zu Erkrankungen führen, die unter dem Begriff Osteochondrodysplasien zusammengefasst sind. Diese Gruppe mit mehr als 220 verschiedenartigen Krankheitsformen ist charakterisiert durch eine verminderte Wachstums- und Entwicklungspotenz sowie einer Umordnung des Knorpel- und Knochengewebes. Die unterschiedlich schwer ausgeprägten, bis hin zu letalen Abweichungen können Schädel, Wirbelsäule oder die Extremitäten betreffen. Einige manifestieren sich bereits bei der Geburt, andere Krankheitsbilder werden erst im Wachstum deutlich. Sie können ein abgeflachtes Gesicht, deformierte Wirbelkörper bis hin zur Ausbildung von Skoliosen und Kyphosen, eine Erschlaffung der Bänder, gebogene Beine mit einhergehender Gangstörung bis hin zu stark disproportionierten Kleinwuchs sowie Arthrose verursachen. Die Osteochondrodysplasien betreffen etwa eine von 2000 Individuen (Baitner, 2000; Savarirayan und Rimoin 2004). Osteochondrodysplasien können weiter in Hypoplasien, Dysostosen und Dysplasien unterteilt werden. Charakteristisch für Hypoplasien ist eine verminderte Anzahl normal funktionierender Zellen. Diese Reduktion betrifft das gesamte Knorpel-Knochen-System und führt so zu proportioniertem Kleinwuchs. Dysostosen sind Organdefekte und betreffen einzelne Knochen. Gestört sind frühe Mechanismen der Skelettentwicklung (Zellinduktion, Proliferation, Differenzierung, Kondensation, Apoptose), wobei es nicht immer zu Kleinwuchs kommen muss. Bei den Dysplasien sind bestimmte Zellsysteme betroffen, wie beispielsweise Knorpelzellen oder Osteoblasten. Diese chronischen Erkrankungen, die kontinuierlich das Wachstum und die Entwicklung beeinträchtigen, führen zu einem disproportionierten Kleinwuchs (Spranger, 1997).

Die Nosologie der Osteochondrodysplasien basiert auf einer im Jahre 1972 in Paris etablierten Nomenklatur, die durch eine internationale Arbeitsgruppe für konstitutionelle Skeletterkrankungen mehrmals überprüft und ergänzt wurde. Als wichtigste Änderung wurden zunächst nur noch radiologische Kriterien für die Einteilung in Krankheitsfamilien zugelassen. Andere klinische Befunde wurden ausgeschlossen. Später wurden neben der röntgenmorphologischen Basisdiagnostik auch ätiopathogenetische Kriterien die den Gen- bzw. Proteindeфекt betreffend miteinbezogen. Dies führte zum Teil zu einer Neugruppierung der Krankheitsfamilien. Letztlich wurden die bestehenden 33 Gruppen der Osteochondrodysplasien, die bis dahin ausschließlich Entwicklungsstörungen im knorpeligen Gewebe beschrieben, um drei Dysostose Gruppen, die Fehlentwicklungen in einzelnen Knochen oder Knochengruppen beschreiben, erweitert (Spranger et al., 1992; International Working Group on Constitutional Diseases of Bone, 1998; Hall, 2002). Über die Internet Datenbank *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) stehen Informationen über die Syndrome und die in diesem Zusammenhang betroffenen Gene bzw. Proteine direkt und ständig aktualisiert zur Verfügung (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>). Da jedoch nicht für alle skeletalen Entwicklungsstörungen eine molekulare Ursache bekannt ist, und in der Diagnostik auch nicht die klinischen Kriterien miteinbezogen werden, ist eine einheitliche Systematik nach Aussage der internationalen Arbeitsgruppe schwierig.

Um die Erkenntnisse aus der klinischen Forschung bezüglich der Zusammenhänge der Pathogenese von Krankheiten und die therapeutischen Anwendungen zu verbinden, wurde von Superti-Furga et al. (2001), eine ergänzende Klassifizierung vorgeschlagen. Alle Krankheiten mit bekannter genetischer Ursache wurden basierend auf klinischen, molekularpathogenetischen sowie radiologischen Kriterien systematisch in insgesamt sieben Gruppen eingeteilt. Hierin wurden Defekte in extrazellulären Strukturproteinen, in metabolischen Transduktionskaskaden, in nukleären Proteinen und Transkriptionsfaktoren, in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, bei der Faltung und Degradierung von Makromolekülen sowie bei der Prozessierung von RNA und DNA zusammengefasst.

## **2. Erkrankungen durch Mutationen in Strukturproteinen der extrazellulären Matrix**

### **2.1. Pseudoachondroplasie und multiple epiphyseale Dysplasie**

Die Pseudoachondroplasie (PSACH; OMIM 177170) wird zusammen mit der multiplen epiphysealen Dysplasie (MED; OMIM 132400) nach internationaler Klassifizierung in einer Krankheitsfamilie zusammengefasst (Superti-Furga et al., 2001, Hall, 2002). Die Krankheitsbilder von PSACH und MED überlappen teilweise (Langer et al., 1993). MED steht für die mildere Krankheitsform, wobei das Spektrum von einem milden Ribbing-Typ (Ribbing et al., 1937) bis zu einem schweren Fairbank-Typ (Fairbank, 1947) reicht. PSACH gilt als die schwerere Krankheitsform und betrifft etwa eine von 250000 Individuen innerhalb der weißen Bevölkerung (Kohler und Hesse 2004). Der Fairbank-Typ überlappt mit den typisch milden PSACH Fällen (Maroteaux et al., 1980).

Genetische Kartierungen lokalisierten die für PSACH und eine Form von MED (EDM1) verantwortlichen Genloci auf derselben pericentromerischen Region des humanen Chromosoms 19 (Briggs et al., 1993; Hecht et al., 1993; Oehlmann et al., 1994). Das Gen für das humane cartilage oligomeric matrix protein (COMP) wurde an gleicher Stelle (19p13.1) lokalisiert (Newton et al., 1994). Daher wurden Mutationen in COMP als Ursache für PSACH und EDM1 angenommen (Briggs et al., 1995; Hecht et al., 1995).

Kinder mit PSACH sind bei der Geburt normal entwickelt. Die Symptome äußern sich erstmals während der frühen Kindheit im Alter von etwa zwei Jahren durch ein gestörtes Gangbild. Als charakteristisches Merkmal gilt der disproportionierte Kleinwuchs (80-120 cm) mit langem Rumpf und kurzen Extremitäten. Außerdem sind eine Verkrümmung der Beine, eine Deformation der Kniegelenke und eine Überstreckbarkeit der Gelenke typisch. Weiterhin charakteristisch sind Bandlaxität und eine Einschränkung in der Beweglichkeit der Ellenbogen durch eine früh einsetzende Arthrose. Der Kopf und die Gesichtsform sind nicht betroffen. Intelligenz, genereller Gesundheitszustand und die Lebensspanne sind normal. (Heselson, 1977; International Working Group on Constitutional Diseases of Bone, 1998; Unger et al., 2001). In der radiologischen Diagnostik fallen unregelmäßige Epiphysen und Veränderungen in den Metaphysen (Wachstumsfugen) auf. Die Röhrenknochen in den Händen von PSACH Patienten sind aufgrund einer verzögerten epiphysealen Ossifikation

verkürzt. Die Hüftgelenkspfannen sind flach und die Femurepiphysen klein und deformiert. Die Wirbelkörper zeigen während der Entwicklung im Kindesalter einen typischen unregelmäßigen Verlauf, gleichen sich aber bis ins Erwachsenenalter wieder an die Normalform an. 10-20% der betroffenen Individuen weisen eine Instabilität der Halswirbel auf. Ein Drittel bis die Hälfte der PSACH Patienten benötigen mit etwa 30 Jahren einen Hüftersatz als therapeutische Maßnahme (Unger et al., 2001).

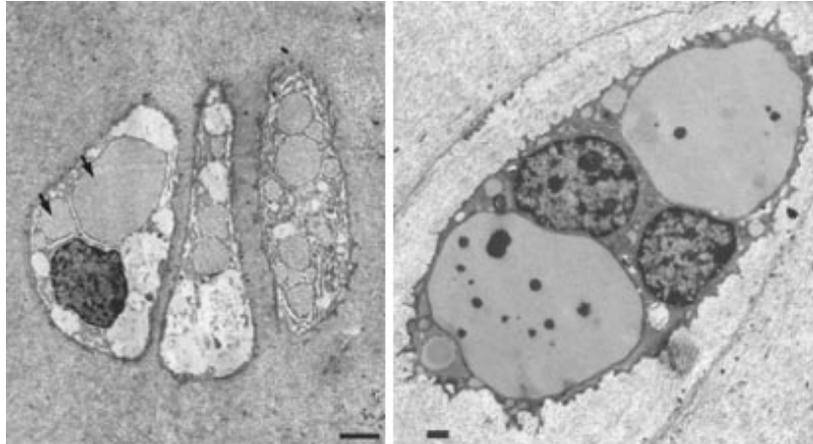


**Abb. I 1: Erscheinungsbild und Röntgenaufnahmen von PSACH Patienten**

Typisches Erscheinungsbild von zwei PSACH Patienten (links) [aus: Hall et al., 1995]. Röntgenbilder der Lendenwirbelsäule in lateraler Position (Mitte) und der Hand mit Handwurzel in anterior-posterior Position (rechts) zeigen typische Veränderungen bei PSACH [aus: Unger und Hecht 2001]. Die Lendenwirbel bei Kindern weisen Unregelmäßigkeiten auf, die jedoch im Laufe der Entwicklung verschwinden können. Die Mittelhandknochen sind verkürzt und erweitert. Die Handwurzelknochen sind klein und nicht einheitlich in ihrer Kontur.

Lichtmikroskopische Untersuchungen der Metaphyse zeigen gleichmäßig verteilte Knorpelzellen mit normal einsetzender Proliferation, die jedoch unvollständig bleibt und zu einer herdförmigen Ausbildung von verkleinerten und verklumpten Knorpelsäulen führt. Die Knorpelzellen weisen häufig große Vakuolen und exzentrisch angeordnete Zellkerne auf. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an fibularen Epiphysen von PSACH Patienten zeigen in unterschiedlichem Ausmaß charakteristische Einschlüsse im rauen endoplasmatischen Retikulum (rER). Diese lamellären oder granulären Strukturen führen zu einer Dilatation der ER Zisternen in den Knorpelzellen (Maynard et al., 1972; Cooper et al., 1973). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass COMP und andere Proteinen in diesen Einschlüssen lokalisiert sind. Es handelt sich dabei sowohl um Strukturproteine der extrazellulären Matrix wie die Kollagene des Typs IX, XI und XII und um die Proteoglykane Decorin und Fibromodulin. Kollagen II und Aggrekan wurden dagegen normal sekretiert. Außerdem konnten einige Proteine des sekretorischen Signalweges, wie die Chaperone

HSP47, PDI und Calnexin innerhalb der rER Inklusionen vermehrt nachgewiesen werden (Cohn et al., 1996; Délot et al., 1998, 1999; Hecht et al., 1998a, b; Maddox et al., 1997; Maynard et al., 1972; Stanescu et al., 1982a,b; Stevens et al., 1999; Vranka et al. 2001).



**Abb. 1 2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Knorpelzellen aus PSACH Patienten**

EM Bilder [aus Maddox et al., 1997 und Vranka et al., 2001] von Knorpelzellen aus PSACH Patienten zeigen erweiterte Zisternen des rER (schwarze Pfeile). Innerhalb dieser Inklusionen konnte COMP, Kollagene des Typs IX, XI und XII, die Proteoglykane Decorin und Fibromodulin und die Chaperone HSP47, PDI und Calnexin nachgewiesen werden. Andere Proteine, Proteoglykane oder auch Chaperone, wie Kollagen II, Aggrekan, Cyclophilin B oder Grp78, wurden nicht innerhalb dieser Inklusionen gefunden. Maßstab: rechts 2 µm; links 1 µm.

Im Vergleich zu PSACH äußern sich Symptome von MED erst später in der Entwicklung und fallen in der Regel auch weniger schwer aus. Steife Gelenke, chronische Hüftschmerzen sowie ein mild ausgeprägtes disproportioniertes Wachstum sind typische Merkmale. In der radiologischen Diagnostik fallen eine verbreiterte Form und verzögerte Verknöcherung der femoralen Epiphysen auf. Die Metaphysenentwicklung der Wirbelkörper hingegen ist normal (Rimoin et al., 1994; Weaver et al., 1993; Unger et al., 2001). EM Untersuchungen der Knorpelzellen von MED Patienten zeigen zum Teil ähnliche Einschlüsse im rER wie sie auch bei PSACH Patienten zu sehen sind (Stanescu et al., 1993; Cotterill et al., 2005).

Genetische Kartierungen lokalisierten die für PSACH und eine Form von MED (EDM1) verantwortlichen Genloci auf derselben pericentromerischen Region des humanen Chromosoms 19 (Briggs et al., 1993; Hecht et al., 1993; Oehlmann et al., 1994). Das Gen für das humane *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP) wurde an gleicher Stelle (19p13.1) lokalisiert (Newton et al., 1994). Daher wurden Mutationen in COMP als Ursache für PSACH und EDM1 angenommen (Briggs et al., 1995; Hecht et al., 1995).

Nahezu alle beschriebenen Fälle von PSACH sind auf Mutationen in COMP zurückzuführen. Bei einem Geschwisterpaar konnte jedoch kürzlich eine skeletale Erkrankung mit einem PSACH ähnlichen Phänotyp beschrieben werden, die nicht mit einer Mutation in COMP einhergeht. Da der verantwortliche Genlocus noch nicht identifiziert werden konnte, werden auch Mutationen in anderen Matrixproteinen im Zusammenhang mit PSACH ähnlichen Formen als Ursache vermutet (Spranger et al., 2005). In einer früheren Arbeit von Ikegawa et al. (1998) konnte ein PSACH Patient mit einer Deletion auf Chromosom 11 (del11q21q22.2) beschrieben werden, was ebenfalls zu Spekulationen über mögliche andere PSACH Loci führte. Vergleichbare Beobachtungen konnten für MED gemacht werden. Die Erkrankungen sind sowohl klinisch als auch genetisch sehr heterogen, da mehrere Gene extrazellulärer Matrixproteine des Knorpels betroffen sein können, die jeweils zu ähnlichen aber klar definierten MED Formen führen. Mutationen der kodierenden Regionen für die  $\alpha$ 1- (Czarny-Ratajczak et al., 2001), die  $\alpha$ 2- (Holden et al., 1999; Muragaki et al., 1996) und die  $\alpha$ 3-Kette (Bönnemann et al., 2000; Paassilta et al., 1999) von Kollagen Typ IX führen zu den MED Formen EDM2, EDM3 und EDM6. Außerdem führen Mutationen in der von Willebrand Faktor A Domäne von Matrillin-3 zu einer milden MED Variante (EDM5). Als rezessive MED Form (EDM4) sind Mutationen im „*diastrophic dysplasia sulphate transporter*“ (DTDST) nachgewiesen worden (Chapman et al., 2003). Eine kürzlich veröffentlichte Mutationsanalyse bekannter MED Genloci ergab, dass die Mutationen in den oben beschriebenen Matrixproteinen für weniger als die Hälfte der MED Erkrankungen verantwortlich sind. Vielmehr werden durch den Ausschluss der bisher bekannten MED Genloci bei einzelnen Patienten weitere unbestimmte Krankheitsgene prognostiziert (Jakkula et al., 2005).

Nach dem derzeitigen Stand der Forschung lassen sich nur wenige Osteochondrodysplasien auf Defekte in extrazellulären Matrixproteinen zurückführen. Neben MED und PSACH, die durch Mutationen in den oben erwähnten Matrixproteine hervorgerufen werden, finden sich außerdem die im Weiteren beschriebenen Erkrankungen, hervorgerufen durch Mutationen in anderen Matrixproteinen, wie Kollagen I, II, X und XI sowie den Proteoglykanen Perlekan und Aggrekan (Superti-Furga et al., 2001; Gleghorn et al., 2005).

Kollagen Typ I ist Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix von Knochen sowie Haut und Sehnen. Humanes Kollagen I ist ein Heterotrimer aus zwei  $\alpha 1$  (Col1a1) und einer  $\alpha 2$  (Col1a2) Kette. Osteogenesis Imperfecta beschreibt vier Subtypen (OI Typ I-IV) einer autosomal dominant vererbaren Erkrankung, hervorgerufen durch Mutationen in Genloci auf den Chromosomen 17 und 7, die jeweils für eine der beiden Ketten von Kollagen I codieren (Ogilvie et al., 1986). Die „Infantile kortikale Hyperostose“ (Caffey Erkrankung) wird durch eine Mutation in der  $\alpha 1$ -Kette von Kollagen I verursacht (Gensure et al., 2005).

Kollagen Typ II ist Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix des Knorpels. Es ist außerdem im *Nucleus pulposus*, dem Gallertkern der Bandscheiben und im Glaskörper des Auges zu finden. Humanes Kollagen II ist ein Homotrimer aus drei identischen Ketten (Col2a1), die von einem Gen auf Chromosom 12 (12q13.1-q13.2) codiert werden (Huerre-Jeanpierre et al., 1986). Mutationen innerhalb dieses Gens führen zu einer Reihe von Chondrodysplasien, wie dem Stickler Syndrom, der Achondrogenesis Typ II (ACH Typ II), der Hypochondrogenesis, der spondyloepiphysealen Dysplasie Congentia (SEDC) und der Kniest Dysplasie (Baitner et al., 2000). Kollagen Typ X wird von hypertrophierenden Knorpelzellen während der Entwicklung der langen Knochen gebildet. Humanes Kollagen X ist ein Homotrimer aus drei identischen kurzen Ketten (Col10a1). Mutationen sind fast ausschließlich in der C-terminalen NC1 Trimerisierungsdomäne lokalisiert und unterteilen sich in zwei Typen: *Nonsense* Mutationen und *Missense* Mutationen. Letztere können zu fehlerhaften Kollagen X Molekülen führen, die nicht sekretiert und intrazellulär degradiert werden. Beide verursachen den MCDS Phänotyp hauptsächlich durch eine Haploinsuffizienz (Chan et al., 1999; Wilson et al., 2005; Bateman et al., 2004, 2005). Kollagen Typ XI ist zusammen mit Kollagen II als fibrillärer Bestandteil in die extrazelluläre Matrix des Knorpels eingebaut. Humanes Kollagen XI ist ein Heterotrimer aus drei verschiedenen Ketten (Col2a1, Col11a1 und Col11a2). Strukturelle Mutationen in Col11a1 und Col11a2 verursachen eine Form des Stickler Syndroms (Typ II) mit ähnlichen phänotypischen Erscheinungen (Ritvaniemi et al., 1995). Perlekan ist ein großes Heparansulphat Proteoglykan (HSPG) und Bestandteil von Basalmembranen und anderen extrazellulären Matrices, wie etwa der des Knorpels. Mutationen im Perlekan Gen (HSPG2) führen zu zwei Klassen skeletaler Erkrankungen, der milden SJS und der schweren neonatal lethalen dyssegmentalen Dysplasie, Silverman-Handmaker Typ (DDSH) (Arikawa-Hirasawa et al., 2002; Anderson et al., 1990). Der Genlocus für SEDK liegt auf Chromosom 15 (15q26.1) und codiert das knorpelspezifische Core-Protein des Proteoglykans Aggrekan (Gleghorn et al., 2005).

## 2.2. Therapie

Folge eines gestörten Wachstums ist eine Knochenfehlstellung, die zu einem Ungleichgewicht zwischen Belastbarkeit und mechanischer Beanspruchung der Gelenke führen kann. Dies kann eine Osteoarthrose (OA) verursachen, eine chronische degenerative, nicht entzündliche Erkrankung des Gelenkknorpels mit einhergehender Umbildung des knorpelnahe Knochen. Als sekundäre Folge der Knorpeldegeneration treten Schmerzen auf. Dem gegenüber steht die rheumatoide Arthritis (RA), eine entzündliche Erkrankung mit unbestimmter Ursache, die neben dem Gelenkknorpel auch Organe betreffen kann. Als symptomatisch wirksame Maßnahme zur Erleichterung der Beschwerden bei der Arthrose gelten neben der Verabreichung von Schmerzmitteln und Cortisonpräparaten die Physiotherapie und die physikalische Therapie. Weiterhin wird auch die Gabe von Hyaluronsäure in das Kniegelenk als Schmerztherapie eingesetzt. Da es zur Zeit keine kausale Therapie der Arthrose gibt, stehen immer noch die operativen Maßnahmen zur Behandlung der betroffenen Patientien im Vordergrund. Nach fortlaufendem Verschleiß des Knorpels verbleibt dem erwachsenen Patienten als endgültige Therapieoption der endoprothetische Gelenkersatz (Spranger et al., 1997; Bruns et al., 2000). Therapien von Knorpel- und Knochenkrankheiten mit Wachstumshormonen sind noch nicht ausreichend etabliert. Kurzzeitbehandlungen mit der Ausrichtung auf das lineare Wachstum und die Körperproportionen von Patienten mit Achondroplasie wurden bereits durchgeführt und zeigten, vor allem während der Pubertät, einen positiven Einfluss auf den Grad der Disproportionierung. Langzeitstudien fehlen in diesem Zusammenhang (Hagenäs und Hertel 2003). Andere Kurzzeitstudien über die Effizienz einer Wachstumshormontherapie bei Patienten mit verschiedenen Knorpel- und Knochenkrankheiten wiesen deutliche Unterschiede je nach Art der Erkrankung auf. So hatte die Gabe von Wachstumshormonen einen positiven Effekt bei den Krankheiten Achondroplasie, Hypochondroplasie und der metaphysealen Dysplasie Schmid Typ. Wachstumshormone hatten dagegen bei der Pseudoachondroplasie und der spondyloepiphysealen Dysplasie Congenita keinen Einfluss (Kanazawa et al., 2003).

Im Bereich des „tissue engineering“ mit dem Ziel des biologischen Knorpelersatzes als auch in der Wachstumshormontherapie sind fundierte Kenntnisse über Art und Entstehung des Knorpelschadens Voraussetzung. Dadurch können pharmakologische Ziele auf molekularer Ebene erst definiert werden.

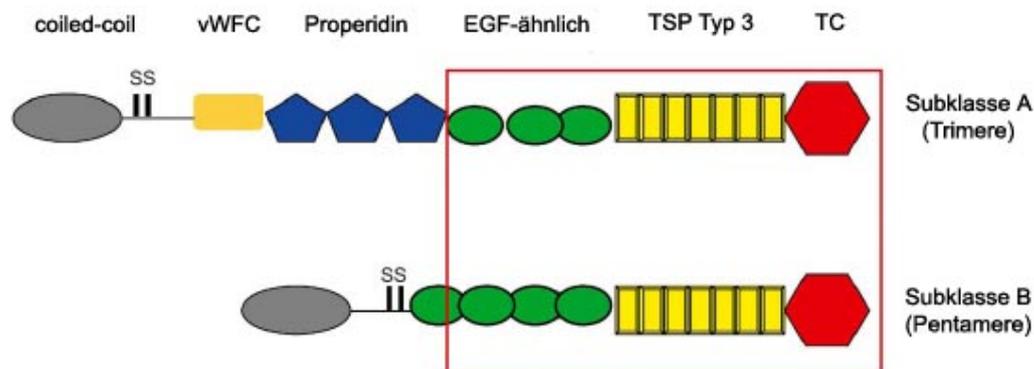
### 3. COMP - Cartilage Oligomeric Matrix Protein

Wie bereits erwähnt sind Mutationen im Gen für COMP verantwortlich für die Erkrankungen Pseudoachondroplasie (PSACH) und Multiple Epiphyseale Dysplasie (MED). Im Folgenden wird über die nun aufgezählten Themengebiete referiert: Struktur und Expression von COMP, Sekretion, posttranslationale Modifizierung und Lokalisation von COMP; Interaktionspartner von COMP, Mutationen in COMP und deren Auswirkungen im Knorpel. Da COMP zur Proteinfamilie der Thrombospondine (TSPs) gehört, wird mit einer kurzen Einführung über die Phylogenie und Struktur dieser Proteine begonnen.

#### 3.1. Phylogenie und Struktur der Thrombospondine

COMP gehört zur Familie der Thrombospondine (TSP). Hierbei handelt es sich um multimeren kalziumbindende Glykoproteine der extrazellulären Matrix, die einen modularen Domänenbau besitzen. Die TSPs übernehmen verschiedenste Aufgaben während der Entwicklung. Unter anderem sind sie an Prozessen der Wundheilung, der Immunantwort oder des Tumorwachstums beteiligt. Die TSPs sind hoch konserviert und wie Laminine und Kollagene sowohl in den Genomen von Protostomiern als auch von Deuterostomiern zu finden. Das Genom von *Drosophila melanogaster* codiert beispielsweise nur für ein einzelnes pentameren TSP. Im *Ciona intestinalis* Genom sind zwei TSP Formen codiert. Bei *Caenorhabditis elegans* wiederum konnte kein TSP Gen identifiziert werden (Adams et al., 2003, Adams und Lawler 2004). Bei Vertebraten wurden insgesamt fünf Mitglieder der TSP Familie beschrieben: TSP-1 (Lawler et al., 1978), TSP-2 (Bornstein et al., 1991), TSP-3 (Vos et al., 1992), TSP-4 (Lawler et al., 1993) und COMP bzw. TSP-5 (Hedbom et al., 1992; Mörgelin et al., 1992; Oldberg et al., 1992). Aufgrund ihrer molekularen Architektur und ihres Oligomerisierungsstatus, der durch die Ausbildung einer *coiled-coil* Superhelix erreicht wird (Malashkevich et al., 1996), werden die TSPs in zwei Subklassen (A und B) aufgeteilt. TSP-1 und TSP-2 sind Homotrimere und bestehen aus einer amino-terminalen *coiled-coil* Domäne, einer von Willebrand Faktor Typ C (vWFC) Domäne, drei sogenannten TSP Typ 1 oder auch Properdin Domänen gefolgt von drei EGF-ähnlichen Domänen, sieben TSP Typ 3 (T3) Domänen sowie einer TSP spezifischen carboxy-terminalen globulären (TC) Domäne (Adams und Lawler 2004). Neben TSP-1 und -2 bilden auch andere Matrixmoleküle Trimere, wie beispielsweise Laminine (Engel et al., 1992), Tenascine (Kammerer et al., 1998) oder

einige Matriline (Paulsson et al., 1999). TSP-3, -4 und -5 sind Homopentamere. Somit sind sie bislang die einzigen Matrixmoleküle mit der Fähigkeit zur Ausbildung von Pentameren (Engel 2004). Sie haben einen ähnlichen modularen Aufbau wie TSP-1 und -2, ihnen fehlen allerdings die vWFC und die drei Properdin Domänen und besitzen vier anstelle von drei EGF-ähnlichen Domänen. Die TSPs weisen spezifische räumliche und zeitliche Expressionsmuster auf, werden unterschiedlich reguliert und haben eigenständige Funktionen (Adams und Lawler 2004).



**Abb. 13: Domänenstruktur der Thrombospondine (verändert nach Adams und Lawler 2004)**

TSP-1 und TSP-2 bilden Homotrimere (Subklasse A). Sie bestehen aus einer amino-terminalen *coiled-coil* Domäne, einer von Willebrand Faktor Typ C (vWFC) Domäne, drei Properdin Domänen, gefolgt von drei EGF-ähnlichen Domänen, sieben TSP Typ 3 Domänen sowie einer TSP spezifischen carboxy-terminalen globulären (TC) Domäne. TSP-3, TSP-4 und TSP-5 bilden Homopentmere (Subklasse B). Ihnen fehlen die vWFC und die drei Properdin Domänen. Außerdem besitzen sie vier EGF-ähnliche Domänen. Die rote Box umfasst die Domänenkassette, die in allen TSPs konserviert ist.

Das COMP Gen wurde während der Vertebratenevolution ebenfalls hoch konserviert und zeigt unter verschiedenen Spezies einen noch höheren Grad an Übereinstimmungen auf Ebene der Proteinsequenz. In seiner nativen Form wurde COMP erstmals aus bovinem artikulärem Knorpel sowie aus einem Ratten-Chondrosarkom isoliert und charakterisiert. Nach Sedimentations-Gleichgewichts-Zentrifugation konnte das Molekulargewicht von pentamerem COMP auf 524 Kilodalton (kDa) festgelegt werden. Das theoretische Molekulargewicht der COMP Untereinheiten beträgt ungefähr 82 kDa (Hedbom et al., 1992; Mörgelin et al., 1992; Newton et al., 1994; Oldberg et al., 1992). Jede COMP Untereinheit ist zusammengesetzt aus einer amino-terminalen Oligomerisierungsdomäne, vier EGF-ähnlichen Domänen, acht T3 Domänen und einer carboxy-terminalen TC Domäne. Die physiologische Funktion von COMP konnte bislang nicht eindeutig aufgeklärt werden. Der COMP Knockout führt in der Maus zu keinem offensichtlichem Phänotyp (Svensson et al.,

2002). Den einzelnen Domänen des COMP Moleküls konnten jedoch bestimmte funktionelle Eigenschaften zugewiesen werden.

### 3.2. Struktur und Expression

Das humane Gen für COMP (Accession No.: NM\_000095) besteht aus 19 Exons, die ein offenes Leseraster von 2471 Nukleotiden umfassen und 757 Aminosäuren codieren. Eine häufig verwendete alternative Exon- und Domänenbezeichnung leitet sich von homologen Thrombospondin Mitgliedern ab (Cohn et al., 1996; Briggs et al., 1995; Newton et al., 1994). Die ersten 30 Aminosäuren (M1-L30) codieren das endogene Signalpeptid von humanem COMP.

Die Exons eins bis vier codieren das amino-terminale  $\alpha$ -helikale *coiled coil* Oligomerisierungsmotiv (Aminosäuren G31-C72). Spezifische Aminosäurereste sind jeweils in sechs charakteristischen Heptad Wiederholungen (abcdefg)<sub>n</sub> arrangiert, wobei die Positionen a und d meist durch hydrophobe Reste und die anderen Positionen durch polare Reste besetzt sind. Die rechtsgängigen  $\alpha$ -Helices assemblieren zu einer linksgängigen Superhelix (Engel, 2004). Da diese Domäne die Oligomerisierung von fünf COMP Untereinheiten vermittelt, wird sie auch als Pentamerisierungsdomäne (PD) bezeichnet. Jeweils zwei Cysteine (C69 und C72) innerhalb einer PD stabilisieren die Oligomerisierung durch Ausbildung von Disulfidbrücken. Im COMP Pentamer werden die Untereinheiten zu einer bouquetähnlichen Struktur arrangiert. Für die PD konnte eine Röntgenstrukturanalyse durchgeführt werden (Cohn et al., 1996; Malashkevich et al., 1996; Mörgelin et al., 1992). Als spezifisches Kennzeichen pentamerer TSPs wurde ein zylindrischer hydrophober Kanal mit einer Länge von 7,3 nm und einem Durchmesser von 0,2-0,6 nm nachgewiesen. Diese ionenkanalähnliche Struktur kann Vitamin D<sub>3</sub> und all-trans Retinolsäure binden (Guo et al., 1998; Özbek et al., 2002). Deshalb wurde spekuliert, ob COMP möglicherweise als Speicherprotein dient. Durch die Speicherung dieser Moleküle in der extrazellulären Matrix könnten wichtige Vitamin D<sub>3</sub> abhängige Entwicklungsprozesse, wie das Knochenwachstum, unterstützt werden.

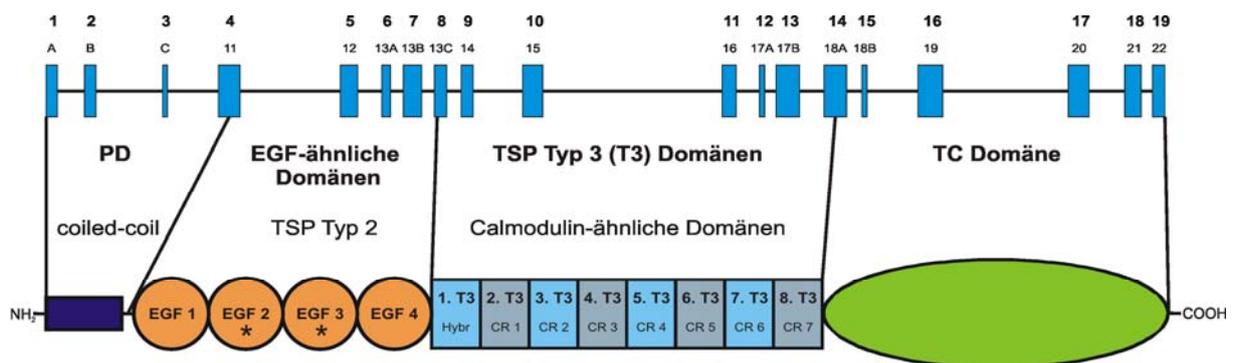
Nach der PD folgt eine Linkersequenz, die vom Exon vier codiert wird und 18 Aminosäuren (G73-H90) umfasst (Thur et al., 2001). Die Sequenz verbindet die PD mit den EGF-ähnlichen Domänen.

Die vier EGF-ähnlichen Domänen (C91-C266) werden auch als TSP Typ 2 Domänen bezeichnet und durch die Exons vier bis acht codiert. Die Funktion dieser EGF-ähnlichen Domänen in COMP ist nicht geklärt; sie sind nach dem *epidermal growth factor* benannt, in

dem diese Strukturelemente zuerst beschrieben wurden. Dabei setzt sich jedes EGF-ähnliche Motiv aus fünf  $\beta$ -Faltblättern zusammen, die jeweils durch drei Disulfidbrücken stabilisiert werden. Eine Konsensussequenz in der zweiten und dritten EGF-ähnlichen Domäne, die jeweils vor dem ersten Cystein liegt, verleiht wahrscheinlich eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindefähigkeit (Baron et al., 1992).

Die Exons acht bis 14 codieren acht TSP Typ 3 (T3) Domänen (G267-A524). Alternativ werden diese Domänen auch als calmodulinähnliche Wiederholungen (*calmodulin-like repeats*, CR oder CLR) bezeichnet. In TSP-1 besitzen die homologen T3 Domänen eine  $\text{Ca}^{2+}$  Bindefähigkeit (Lawler, 1983; Misenheimer, 1995), die zunächst auch für die T3 Domänen in COMP postuliert wurde (Lawler und Hynes, 1986; Misenheimer und Mosher, 1995). Mittels Gleichgewichtsdialyse konnte diese Fähigkeit zur Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen für COMP quantitativ bestimmt werden. Jede Wildtyp Untereinheit von COMP ist in der Lage bis zu 14  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen zu binden. Durch Mutationen innerhalb der T3 Domänen wird die Anzahl der gebundenen  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen reduziert, was wiederum die Kollagenbindefähigkeit negativ beeinflusst (Chen et al., 2000; Kleerekoper et al., 2002; Maddox et al., 2000; Thur et al., 2001).

Die Exons 14 bis 19 codieren eine globuläre Domäne (E525-A757) am carboxy-terminalen Ende (TC) (Cohn et al., 1996; Newton et al., 1994). Diese TC Domäne ist spezifisch für die Familie der TSP. Die Röntgenstrukturen rekombinanter C-terminaler Fragmente von TSP-1 (6. T3 bis TC) (Kvansakul et al., 2004) sowie von TSP-2 (EGF-1 bis TC) (Carlson et al., 2005) konnten dargestellt werden. Wegen der hohen Sequenzhomologie konnten diese 3D Modelle auch auf COMP übertragen werden.



**Abb. I 4: Exon-Domänen Struktur von humanem COMP**

Die 19 Exons von COMP umfassen ein offenes Leseraster von 2471 Nucleotiden und codieren 757 Aminosäuren. COMP besteht aus einer amino-terminalen PD, vier EGF-ähnlichen Domänen, acht T3 Domänen und einer carboxy-terminalen TC Domäne. Die hier verwendeten Bezeichnungen von Exons und Domänen sind fett unterlegt. Die alternativen Bezeichnungen unter den fett gedruckten Exonangaben leiten sich von homologen TSP Mitgliedern ab. Dabei wurden nur sieben T3 bzw. calmodulinähnliche Domänen (*calmodulin-like repeats*, CR) beschrieben, da die erste T3 Domäne als Hybrid Domäne galt.

Eine COMP Expression wurde vor allem in muskulo-skeletalem Gewebe mesodermalem Ursprungs nachgewiesen (Fang et al., 2000, Kipnes et al., 2000). COMP konnte hauptsächlich im Knorpel (Hedbom et al., 1992; Mörgelin et al., 1992), aber auch in Bändern (Délot et al., 1998; Maddox et al., 1997), Sehnen (Délot et al., 1998; Hauser et al., 1995; Maddox et al., 1997; Smith et al., 1997), im synovialen Gewebe (DiCesare et al., 1997; Recklies et al., 1998), in vaskulären glatten Muskelzellen (Riessen et al., 2001) und Osteoblasten (DiCesare et al., 2000) detektiert werden. Die Expression von COMP während der Entwicklung wurde in der Maus detailliert untersucht und beginnt etwa zehn Tage postcoitum, etwa mit Beginn der Chondrogenese, welche den Entwicklungsprozess der Knorpelanlagen aus mesenchymalen Zellen darstellt. Der Grad der gewebespezifischen COMP Expression geht einher mit dem fortschreitenden Entwicklungsstadium der Zellen. In undifferenzierten mesenchymalen Zellen wird COMP nur basal exprimiert, wohingegen die COMP Expression in Knorpelzellen hochreguliert ist (Fang et al., 2000). Werden bovine artikuläre Knorpelzellen isoliert und als 2D Monolayer kultiviert wechseln sie innerhalb weniger Wochen ihre Morphologie und ihr biosynthetisches Profil. Durch diese fortschreitende Dedifferenzierung gleichen sie sich einem fibroblastenähnlichen Zelltyp an, was sich unter anderem auch in einer verminderten Expression COMP äußert (Zaucke et al., 2001). Durch Deletionsanalysen wurde eine *Silencer* Region im murinen COMP Promotor identifiziert. Ein 30 Basenpaare umfassendes NRE (*negativ regulatory element*) innerhalb des Silencers bindet spezifische Proteinkomplexe, die nur in Nicht-Knorpelzellen ausreichend vorliegen (Han et al., 2002; Issack et al., 2000, 2004). Liu et al. (2004) konnte über ein *Yeast One-Hybrid Screening* dieser transkriptionale Repressor für das COMP Gen ermittelt werden. Es handelt sich um den *Leukemia/Lymphoma related factor* (LRF), einem nukleären Protein mit einer amino-terminalen POZ (*poxvirus zinc finger*) Domäne und einer carboxy-terminalen *Krüppel-like zinc finger* DNA-Bindedomäne. LRF ist das Gegenstück zum humanen FBI-1 (*factor that binds to the HIV-1 inducer of short transcripts*) und des OCZF (osteoclast-derived zinc finger) Proteins aus der Ratte. Außerdem konnten Kipnes et al. (2003) zeigen, dass eine ektopische COMP Expression in einem Modell mit pluripotenten murinen mesenchymalen Zellen, die durch das *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2) zur Chondrogenese angeregt wurden, einen zusätzlichen positiven Effekt hat. Daher kann eine regulierende Rolle für COMP bei dem Prozess der Chondrogenese angenommen werden.

### 3.3. Sekretion, posttranslationale Modifizierung und Lokalisation

COMP wird als homopentamer Glykoprotein in die ECM sekretiert. Délot et al. (1998) konnte an isolierten Knorpelzellen von PSACH Patienten zeigen, dass die Pentamerisierung von COMP intrazellulär stattfindet, da pentameres COMP sowohl extra- als auch intrazellulär nachzuweisen war.

Sekretionsproteine werden von ER gebundenen Ribosomen synthetisiert und anschließend durch die ER Membran geschleust. Im ER Lumen werden die Proteine mit Hilfe von Chaperonen gefaltet und Glykoproteine erhalten dort ihre N-gebundenen *Core*-Kohlenhydratstrukturen. Anschließend werden die Proteine zum Golgi Apparat transportiert, wo die Kohlenhydrateinheiten der Glykoproteine verändert und vollendet werden. Dabei werden bestehende N-Glykosylierungen modifiziert und ggf. neue O-Glykosylierungen angefügt. Anschließend werden die Proteine über spezielle Mechanismen aus der Zelle transportiert.

Humanes COMP besitzt drei potentielle Stellen für eine N-Glykosylierung an den Asparaginen N121, N144 und N742 (Oldberg et al., 1992). Der Grad und die Art der Substitution von Glykosylierungsstellen können im Laufe der Entwicklung variieren, wie es beispielsweise bei Aggrekan gezeigt werden konnte (Barry et al., 1995). Eine MALDI-TOF Analyse ergab für die Glykosylierung von COMP altersabhängige Unterschiede.

Grundsätzlich werden immer nur die Asparagine N121 (in der ersten EGF-ähnlichen Domäne) und N742 (in der TC Domäne) glykosyliert. Im Gegensatz dazu bleibt das Asparagin N144 stets unbesetzt. Bei adultem humanen COMP betrug die Masse der N121-Oligosaccharide etwa 1847 Da, was der Masse eines mannosereichen Typs mit der Struktur  $(\text{HexNAc})_2-(\text{Man})_8-(\text{Fuc})_1$  entspricht. Die Masse bei N742 betrug etwa 1723 Da. Im Vergleich zu adultem COMP variierte die äußere Kettenstruktur der N121-Oligosaccharide bei fötalem COMP. Diese Oligosaccharidstrukturen werden vor Sekretion im *trans* Golgi substituiert und sind abhängig von der Bewegungsrate des Proteins durch den Golgi Apparat (Zaia et al., 1997).

Neben der Art der N-Glykosylierung ist auch die Verteilung von COMP im Knorpelgewebe altersabhängig. Während der frühen Entwicklung weist COMP vornehmlich eine perizelluläre und territoriale Matrixverteilung um die Knorpelzellen auf (Shen et al., 1994). Nach Ausbildung des sekundären Ossifikationszentrums ist COMP zwar nicht mehr in den kalzifizierten Bereichen zu finden, verbleibt aber in der Wachstumsfuge. Im reifen artikulären Knorpel ist COMP in der interterritorialen Matrix nachweisbar (Franzen et al., 1987). Ebenso zeigten immunhistologische Färbungen von COMP in humanem artikulärem Knorpel von

fötalem Gewebe eine perizelluläre COMP Verteilung, wobei in adultem Gewebe eine Verschiebung von COMP in die interterritoriale Matrix festzustellen war (DiCesare et al., 1995).

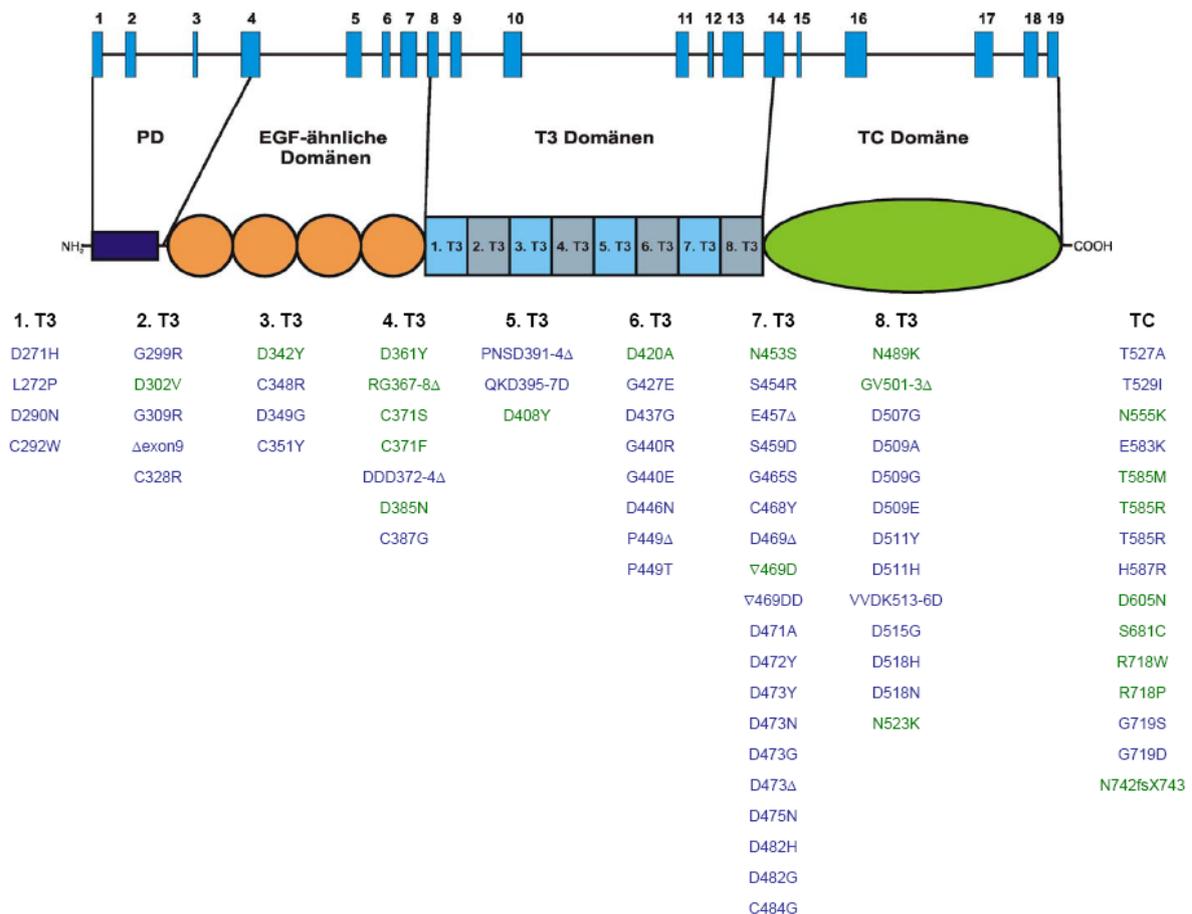
Aufgrund der beobachteten altersabhängigen Unterschiede bei der N-Glykosylierung bzw. der Lokalisation von COMP in der Knorpelmatrix wurde eine entsprechende zeitabhängige Funktion spekuliert. Die Bindefähigkeit von COMP mit anderen Matrixproteinen könnte durch einen unterschiedlichen Glykosylierungsgrad verändert werden, was sich wiederum in der Verteilung von COMP während der skeletalen Entwicklung widerspiegelt (Zaia et al., 1997).

### 3.4. Interaktionspartner

Als potentielle Interaktionspartner von COMP konnten verschiedene Proteine der extrazellulären Matrix des Knorpels identifiziert werden. Über die TC Domäne interagiert COMP  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Zn}^{2+}$ -abhängig mit den Kollagen des Typs I, II und IX sowie mit Prokollagen I und II (Thur et al., 2001; Holden et al., 2001; Rosenberg et al., 1998). Neben dieser Bindefähigkeit katalysiert COMP die Fibrillogenese von Kollagen I und II. COMP interagiert bevorzugt mit freien Kollagen I und II Molekülen. Die Anzahl und die Organisation fibrillärer Kollagenmoleküle waren in Gegenwart von pentamerem COMP erhöht. Monomeres COMP ohne die amino-terminale *coiled-coil* Domäne inhibiert dagegen die Fibrillenbildung (Rosenberg, 2001). COMP besitzt außerdem eine hohe Affinität zu Fibronectin. Die TC Domäne von COMP und ein amino-terminales Fragment von Fibronectin wurden hierbei als Interaktionspartner identifiziert. Diese Interaktion ist  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mn}^{2+}$ -abhängig (DiCesare et al., 2002). Außerdem konnte eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Interaktion mit Matrilin-1, -3 und -4 nachgewiesen werden (Mann et al., 2004).

### 3.5. Mutationen in COMP und deren Auswirkungen im Knorpel

Die Osteochondrodysplasien PSACH und MED (EDM1) konnten auf Mutationen im COMP Gen zurückgeführt werden (Briggs et al., 1995; Hecht et al., 1995). Wie eine Mutation zum entsprechenden Krankheitsbild führt, bleibt allerdings spekulativ. Etwa 80% der beschriebenen Mutationen liegen in den T3 Domänen von COMP, die restlichen 20% sind in der TC Domäne lokalisiert (Kennedy et al., 2005). Bisher konnten keine Chondrodysplasie verursachenden Mutationen in der PD oder den EGF-ähnlichen Domänen nachgewiesen werden, wobei nicht geklärt ist, ob diese Mutationen möglicherweise letal sind. Größtenteils führen die über 70 verschiedenen Mutationen im COMP Gen zum Austausch einzelner Aminosäuren. Es wurden aber auch einige Deletionen und Insertionen von Aminosäuren beschrieben. Bisher wurde erst eine Mutation nachgewiesen, die ein frühzeitig auftretendes Stop Codon generiert. Diese MED verursachende Mutation ist 15 Aminosäuren vor dem regulären C-Terminus lokalisiert (Mabuchi et al., 2003). Etwa zwei Drittel der Mutationen betreffen saure Aminosäurereste. Bei etwa 30% der COMP Mutationen in PSACH Patienten sind ein oder zwei von fünf aufeinander folgenden GAC Codons, die eine Folge von fünf Asparaginsäuren codieren, im Leseraster deletiert. Andere häufig auftretende Mutationen betreffen Cysteine, was sehr wahrscheinlich zu einer Veränderung der Faltung und zur Instabilität von COMP führt und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindefähigkeit beeinflusst (Kleerekoper et al., 2002; Loughlin et al., 1998; Thur et al., 2001). Durch eine verminderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen Bindekapazität (Chen et al., 2000; Maddox et al., 2000; Thur et al., 2001) könnte die Integrität der ECM negativ beeinflusst werden. Mutationen in der TC Domäne könnten eine ähnliche destabilisierende Wirkung auf die ECM ausüben. Im 3D Modell der TC Domäne zeigt sich, dass die Mutationen weitgehend auf zwei Regionen verteilt sind. Die Mutationen in der einen Region betreffen die Schnittstelle zwischen den T3 Domänen und der TC Domäne, was möglicherweise zu einer Destabilisierung der gesamten Struktur führt (Kvansakul et al., 2004). Die andere Gruppe von Mutationen betrifft eine Region von  $\beta$ -Faltblattstrukturen, was zu einer Störung von intra- und intermolekularen Interaktionen führen kann (Kennedy et al., 2005).



#### **Abb. I 5: PSACH und MED verursachende Mutationen in COMP**

PSACH verursachende Mutationen sind blau, MED verursachende Mutationen sind grün unterlegt. Etwa 80% sind in den  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden T3 Domänen lokalisiert. Meist sind Substitutionen von Aspartatresten beschrieben. Sie beeinflussen in unterschiedlichem Ausmaß die  $\text{Ca}^{2+}$  Bindekapazität. Ein *Hot Spot* für Mutationen scheint Exon 13 darzustellen, dass die siebte T3 Domäne codiert. Etwa 20% der Mutationen liegen in der TC Domäne. Die PD und die EGF-ähnlichen Domänen sind nicht betroffen. Die betroffenen Aminosäuren sind in verschiedenen Spezies konserviert. Die am häufigsten gefundene Mutation in PSACH Patienten ist eine Aspartatdeletion in der siebten T3 Domäne von COMP (D469Δ).

Mutationen in COMP werden autosomal dominant vererbt. Das bedeutet, dass nur ein Allel von COMP durch die Mutation betroffen sein muss, wohingegen das andere Allel als Wildtyp vorliegt. Bei gleicher Transkriptions- und Translationsrate würde ein mutiertes Monomer im Vergleich mit Wildtyp Monomeren mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 97% in die Pentamere eingebaut werden. Als Folge würden nur etwa 3% aller synthetisierten COMP Pentamere ausschließlich Wildtyp COMP Monomere enthalten. Alle anderen COMP-Pentamere enthielten mindestens eine mutierte Untereinheit (Hecht et al., 1995; Maddox et al., 1997). Es ist bisher ungeklärt, ob eine bestimmte Anzahl mutierter COMP Untereinheiten in pentamere COMP Moleküle eingebaut und in die ECM sekretiert werden, oder ob nur die

3% der reinen Wildtyp Pentamere sekretiert werden, wodurch ein Fehlen von ausreichenden COMP Mengen in der ECM verursacht werden könnte. Im Mausmodell hat ein Fehlen von COMP keine Auswirkung auf die skeletale Entwicklung. COMP defiziente Mäuse zeigen keinen offensichtlichen skeletalen Phänotyp (Svensson et al., 2002).

Als charakteristisches Merkmal für Knorpelzellen aus PSACH Patienten gelten große Zisternenerweiterungen des rERs mit Akkumulationen von extrazellulären Proteinen. Dies konnte durch elektronenmikroskopische Analysen an Knorpelbiopsien von PSACH Patienten nachgewiesen werden. Außerdem waren die Kollagenfibrillen in der Matrix teilweise dichter und dicker (Cooper et al., 1973; Maynard et al., 1972; Stanescu et al., 1993; Cohn et al., 1996; Maddox et al., 1997; Délot et al., 1998, 1999; Hecht et al., 1998, 2001; Vranka et al., 2001). Mittels Immunogold-Markierung konnten Proteine wie COMP oder Kollagen IX in den rER Einschlüssen detektiert werden. Aber auch andere Proteine der extrazellulären Matrix, wie Kollagen XI und XII, sowie Decorin oder Fibromodulin wurden nachgewiesen. Das Schicksal von Aggrekan ist nicht eindeutig, da es bei einigen Biopsieproben in den rER Einschlüssen nicht nachgewiesen konnte, stattdessen aber in der Matrix detektierbar war. Andere Knorpelproteine wie Kollagen II oder VI wurden hingegen normal in die ECM sekretiert (Maddox et al., 1997, Vranka et al., 2001; Hecht et al 2005). Erweiterungen des rERs konnten auch in Knorpelzellen von MED Patienten nachgewiesen werden. Diese Erkrankungen waren auf Mutationen in COMP, Matrilin-3 bzw. in der  $\alpha 3$  Kette von Kollagen IX zurückzuführen (Cohn et al., 2000; Cotterill et al., 2005; Bönnemann et al., 2000). Mutationen in Kollagen II führen zu skeletalen Erkrankungen wie beispielsweise der Kniest Dysplasie oder der spondyloperipheralen Dysplasie. Auch hier konnten in Knorpelzellen stark erweiterte Zisternen des rERs nachgewiesen werden (Gilbert-Barnes et al., 1996; Zabel et al., 1996).

Bislang konnten mittels EM keine rER Einschlüsse nachgewiesen werden, die einen PSACH Phänotyp aufgrund von Mutationen in der TC Domäne verursachen. Gleiches gilt für Patienten, bei denen MED Erkrankungen durch Mutationen in der  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  Kette von Kollagen IX bzw. im DTDST verursacht werden. Außerdem konnten keine Akkumulationen in Zellen angrenzender Sehnen und Bänder beobachtet werden (Maddox et al., 1997). Daher wird spekuliert, ob eine Retention von mutiertem COMP möglicherweise von der Umgebung in den Knorpelzellen und durch eine Interaktion knorpelspezifischer Komponenten abhängt. Wann und wo eine solche Interaktion *in vivo* stattfindet, ist zur Zeit nicht bekannt.

Die Funktion und Vitalität von Zellen ist unter anderem von einer effizienten Proteinfaltung abhängig. Chaperone katalysieren ATP-abhängig die Bindung nicht-nativer Polypeptide und ihre Faltung in die native Form. Mutationen können zu einer Fehlfaltung von Proteinen führen. Fehlgefaltete Proteine werden normalerweise durch bestimmte Mechanismen, wie dem Ubiquitin-Proteasom System degradiert. Eine Störung während des Faltungs- oder Degradierungsprozesses kann zu einer toxischen Akkumulation, einer Inaktivierung funktioneller Proteine oder zum Tod der Zelle führen (McClellan et al., 2005). Bestimmte Chaperone (PDI, CRT, Grp94, ERp72 und BiP) üben eine bedeutende Rolle bei der Qualitätskontrolle von COMP in normalen Knorpelzellen und bei der Retention von mutiertem COMP in Knorpelzellen von PSACH Patienten aus. So konnte eine erhöhte Menge bestimmter Chaperone (HSP47, PDI, Calnexin) in den rER Akkumulationen nachgewiesen werden (Hecht et al., 2001; Vranka et al., 2001). Zudem zeigte sich in Knorpelbiopsien aus PSACH Patienten eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen (Duke et al., 2003; Hecht et al., 2004). Ob und in wie weit eine durch Mutationen verursachte Fehlfaltung von COMP, die zu toxisch wirkenden Einschlüssen im rER führen kann, für die Pathogenese von PSACH oder MED verantwortlich ist, bleibt spekulativ. In Dinser et al. (2002) konnte eindeutig gezeigt werden, dass mutiertes COMP neben intrazellulären auch extrazelluläre Veränderungen verursacht. Es wurde unter anderem sowohl eine Retention im ER sowie eine verminderte Zellvitalität als auch amorphe Aggregate sowie unorganisierte Kollagenfibrillen in der extrazellulären Matrix nachgewiesen. Die in Knorpelbiopsien von PSACH Patienten beschriebenen Veränderungen wurden durch Mutationen verursacht, die alle in den T3 Domänen von COMP lokalisiert waren. Ob vergleichbare Beobachtungen auch in Zellen gemacht werden können, die eine PSACH verursachende Mutationen in der TC Domäne besitzen ist unbekannt. Dies gilt vor allem dann, wenn Positionen betroffen sind, die die Faltung oder Struktur von COMP nur unwesentlich beeinflussen.

## 4. Ziel der Arbeit

Ziel der Dissertation ist die Generierung einer transgenen Mauslinie mit einer Mutation in COMP, die beim Menschen zu Pseudoachondroplasie führt. Die anschließende detaillierte histologische und biochemische Charakterisierung der Mäuse soll einerseits Einblick in die Rolle von COMP bei der Pathogenese von PSACH geben aber auch andererseits zur Klärung der physiologischen Funktion von COMP beitragen.

Die hier untersuchte Mutation in der siebten T3 Domäne von COMP wurde vor allem aufgrund ihrer Häufigkeit in Patienten ausgewählt. Außerdem existieren zu dieser Mutante bereits Vorarbeiten, die einen Vergleich von Zellkultur- und Tiermodell ermöglichen.

Zunächst soll in primären Knorpelzellen die Expression und Sekretion der mutierten Variante mit dem Wildtyp verglichen werden. Von besonderem Interesse ist hierbei, ob sich die in Patienten beobachtete Retention von mutiertem Protein im Zellkulturmodell reproduzieren lässt. Das Zellkulturmodell erlaubt dann außerdem eine detaillierte Analyse der Lokalisation des mutierten Proteins innerhalb der Zelle bzw. in der extrazellulären Matrix.

Im Tiermodell soll mutiertes COMP knorpelspezifisch exprimiert werden. Hierzu soll der bereits früher charakterisierte Kollagen Typ II Promoter verwendet werden. Neben der mutierten Variante soll analog auch das Wildtyp Protein transgen exprimiert werden, um parallel Effekte einer vergleichbaren Überexpression von Wildtyp COMP untersuchen zu können. Die Konstrukte sind mit einem Tag versehen und erlauben so eine Unterscheidung zwischen endogenem und transgenem COMP. Dies ist im Patienten nicht möglich und erlaubt so erstmals auch die Analyse der molekularen Zusammensetzung von zum Teil mutierten COMP Pentameren.

Die Mäuse sollen während ihrer Entwicklung bis zu einem Alter von mehreren Monaten mit verschiedenen Techniken charakterisiert werden. Mittels radiologischen, computertomographischen und histologischen Methoden soll zunächst das gesamte Skelett analysiert werden. Anschließend soll mittels immunhistochemischen Färbungen und biochemischen Methoden die Verteilung und Verankerung relevanter Matrixproteine und mittels EM die Ultrastruktur des Knorpels untersucht werden.

# II Material und Methoden

## 1. Material

### 1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Chemikalien der Qualität *pro analysi* (p. a.) wurden von den Firmen Biozym, BMA, Calbiochem, Fluka, Life Technologies, Merck, New England Biolabs (NEB), Roche oder Sigma bezogen. Falls von weiteren Firmen Chemikalien, Enzyme oder andere Verbrauchsmaterialien genutzt wurden, werden diese an entsprechender Stelle aufgeführt.

### 1.2. Radiochemikalien

Der L-[<sup>35</sup>S] Cystein/L-[<sup>35</sup>S] Methionin Mix *NEG-772 Easytag™ Express Protein Labeling Mix [<sup>35</sup>S]* wurde von Perkin Elmer Life Sciences, Inc. (Boston, USA) bezogen. Die spezifische Aktivität betrug 43,5 TBq/mmol.

Zur radioaktiven Markierung doppelsträngiger DNA wurde [alpha <sup>32</sup>P] dCTP (spezifische Aktivität: 0,4 MBq bzw. 10,8 µCi in 1 µl) der Firma Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, verwendet.

### 1.3. Lösungen und Puffer

Das Wasser zur Herstellung der Lösungen wurde durch eine Reinstwasseranlage (MilliQ Plus PF, Millipore) entionisiert und anschließend autoklaviert (40 min bei 121°C und 1 bar Überdruck).

Für die Arbeiten mit RNA wurde DEPC behandeltes Wasser verwendet und die benötigten Glaswaren 4 h bei 180°C gebacken. Plastikgegestände wurde in 0,4 M NaOH eingelegt und mit DEPC Wasser gespült. Oberflächen wurden mit „RNase Away“ behandelt.

Zur Herstellung DNase freier RNase A wurde RNase A ( $10 \text{ mg/ml}$ ) in  $0,1 \text{ M NaAc}$ , pH 5,2 für 15 min bei  $100^\circ\text{C}$  gekocht, um vorhandene DNAsen zu inaktivieren. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde der pH Wert durch Zugabe von  $1/10$  Volumen  $1 \text{ M TrisHCl}$ , pH 7,4 erhöht, die Lösung aliquotiert und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

Folgende Puffer wurden in dieser Arbeit verwendet:

<b>PBS</b>	140 mM NaCl, 10 mM KCl, 8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4
<b>TAE</b>	40 mM TrisHCl, 20 mM HOAc, 1 mM EDTA, pH 7,4
<b>TBS</b>	150 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, pH 7,4
<b>TBS-T</b>	TBS, 0,1% Tween20 (v/v)
<b>TE</b>	10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
<b>TBE (5x)</b>	445 mM TrisHCl, 445 mM $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 10 mM EDTA, pH 8,0

#### 1.4. Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen Kits sind in der Tabelle II 1 angegeben und wurden nach Herstellerangaben unter Verwendung der angegebenen oder mitgelieferten Hilfsmittel, Lösungen und Chemikalien eingesetzt.

**Tabelle II 1: Kommerziell erhältliche Kits**

Bezeichnung	Hersteller
Nucleobond AX 100	Macherey-Nagel
Nucleo Spin Plasmid	Macherey-Nagel
BC-Assay Kit UP40840A	Uptima
GeneClean II	Q Bio Gene; Bio 101, Inc.
Ladderman Labeling Kit	Takara Biomedicals, Takara Shuzo Co. Ltd.

## 1.5. Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden bei Sigma-Genosys Ltd., London, bezogen und sind in der Tabelle II 2 aufgeführt.

**Tabelle II 2: Oligonukleotide mit zugehöriger Sequenz**

Bezeichnung	Sequenz
Ex9f-ratCOMP	5'-GGATGGAGTTCCTAATGAGC-3'
Ex11r-ratCOMP	5'-CCCAACACCATCACCATCG-3'
Seq 1	5'-TACACCGGCAACGGCTC-3'
Seq 2	5'-ACACAGACCTGGACGGTT-3'
Seq 3	5'-TTCGAAACCCAGACCAG-3'
Seq 4	5'-TGTCCCCAGAAAGACAAC-3'
Seq 6	5'-GGCATTCAACGGTGTAG-3'
T3	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'
T7	5'-GCCCTATAGTGAGTCGTATTAC-3'
M13	5'-ACTGGCCGTCGTTTTAC-3'
M13 reverse	5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'

Die Oligonukleotide *Ex9f-ratCOMP* und *Ex11r-ratCOMP* wurden zur Identifizierung von genomischem bzw. transgenem COMP eingesetzt. Sie hybridisieren in Exon 9 bzw. Exon 11 von COMP und flankieren ein ~250 bp cDNA- bzw. ein ~2000 bp gDNA-Fragment.

*Seq 1*, *Seq 2*, *Seq 3*, *Seq 4* und *Seq 6* wurden zur vollständigen Sequenzierung der COMP cDNA verwendet. Sie hybridisieren in regelmäßigen Abständen an den Leitstrang.

*T3*, *T7*, *M13* und *M13 reverse* wurden für die Sequenzierung der Übergänge vom Vektor pBluescript II KS zum Insert verwendet.

## 1.6. Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in der Tabelle II 3 aufgeführt und wurden gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt.

**Tabelle II 3: Verwendete Enzyme und Hersteller**

Enzyme	Hersteller
Restriktionsenzyme	NEB
RNase	Boehringer Mannheim
T4 DNA Ligase	NEB
<i>shrimp alkaline phosphatase</i> (SAP)	Amersham Pharmacia
calf intestinal alkaline phosphatase (CIP)	NEB
T4 DNA Polymerase I, großes (Klenow) Fragment	NEB
<i>Ampli Taq</i> DNA Polymerase	Applied Biosystems
<i>EXL</i> DNA Polymerase	Stratagene
<i>GoldStar</i> DNA Polymerase	Eurogentec
<i>Expand Long Template</i> Polymerase	Roche

## 1.7. Antikörper

Die verwendeten Antikörper wurden nach Herstellerangaben für Immunoblots (IB), Immunpräzipitationen (IP) sowie bei Immunfluoreszenz (IF)- und immunhistochemischen (IHC) Färbungen eingesetzt und bei 4°C oder –20°C gelagert. Alle verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind jeweils in den Tabellen II 4 bzw. II 5 aufgeführt.

**Tabelle II 4: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper**

Antikörper gegen	Spezies	Anbieter / Referenz	WB	IHC	IF
PDI	m (monocl.)	Stressgen Bioreagents	--	--	1:1200
Golgi 58K Protein	m (monocl.)	Sigma-Aldrich	--	--	1:800
c-Myc (A-14) sc-789	rb (polycl.)	Santa Cruz Biotech	1:2000	1:1000	1:600
c-Myc (9E10) sc-40	m (monocl.)	Santa Cruz Biotech	1:2000	1:1000	1:600
COMP	rb (polycl.)	Hedbom et al., 1992	1:3000	1:2000	1:2000
TSP-1	m (monocl.)	Santa Cruz Biotech	--	1:1000	1:1000
Matrilin-3	rb (polycl.)	Klatt et al., 2000	1:500	1:200	1:200
Matrilin-4	rb (polycl.)	Klatt et al., 2001	1:500	1:200	1:200
Aggrekan	rb (polycl.)	Aspberg et al., 1999	--	1:2500	1:2500
Kollagen II	m (monocl.)	Calbiochem	1:1000	1:1000	1:1000
Kollagen IX (NC4)	rb (polycl.)	Budde et al., 2005	1:1000	1:2500	1:2500

[rb: rabbit, Kaninchen; m: mouse, Maus; monocl.: monoklonal; polycl.: polyklonal]

**Tabelle II 5: Liste verwendeter Sekundärantikörper**

Antikörper gegen	Typ	Anbieter	WB	IHC/IF
IgG Kaninchen	HRP-konj.	Dako	1:3000	1:100
IgG Maus	HRP-konj.	Dako	1:3000	1:100
IgG Maus	Cy3-konj.	Jackson Laboratories	--	1:500
IgG Kaninchen	Alexa488-konj.	Molecular Probes	--	1:1000

## 1.8. Bakterienstamm und Nährmedium

Klonierungen wurden mit dem Escherichia coli (E.coli) Stamm DH5 $\alpha$  durchgeführt. Der Genotyp des Stammes ist unten beschrieben. Die Bakterien *Subcloning Efficiency*<sup>TM</sup> DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> *Competent Cells* (Invitrogen) wurden bei -80°C gelagert und vor Gebrauch erneut transformationskompetent gemacht. Der Stamm ist defizient für Methylasen (dam, dcm) und geeignet für eine Blau-Weiß-Selektion.

**Genotyp** F<sup>-</sup>,  $\Phi$ 80, lacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, recA1, endA1, hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>), phoA, supE44,  $\lambda$ <sup>-</sup>, thi-1, gyrA96, relA1,  $\lambda$ <sup>-</sup>

Luria-Bertani (LB) Medium und LB Agar wurden nach Herstellerangaben (GibcoBRL, Life Technologies) angesetzt und autoklaviert. Als Selektionsmarker wurde das Antibiotikum Ampicillin (Amp) [Stammlösung: 50 mg/ml in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>] in einer Endkonzentration (f.c.) von 50  $\mu$ g/ml in Medien und Agar eingesetzt.

**LB Medium (steril)**  
1% (w/v) NaCl  
0,5% (w/v) Hefe-Extrakt  
1,5% (w/v) Pepton

**LB Agar (steril)**  
LB Medium  
1,5% (w/v) Agar

## 2. Methoden

Allgemeine Arbeitsanweisungen der Molekularbiologie, Proteinbiochemie, Zellkultur, Histologie sowie tierexperimentelle Arbeiten, welche hier nicht näher beschrieben sind, wurden auf Grundlage von Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1989; Mülhardt 2000, Rehm, 2000) durchgeführt und ggf. optimiert.

### 2.1. Klonierungsarbeiten

#### 2.1.1. Herstellung von Bakterienkulturen

Bakterien wurden je nach Bedarf in entsprechenden Mengen LB Medium kultiviert. Bei Verwendung von transformierten Bakterien mit Ampicillin Resistenz wurde zusätzlich 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (f.c.) Ampicillin in das Medium gegeben. Die Flüssigkulturen wurden bei 37°C im Schüttelinkubator (250 Upm), die auf LB Platten ausgestrichenen Bakterien bei 37°C im Brutschrank (Heraeus, Typ B5050 E, Heraeus Instruments) inkubiert.

Für eine DNA Präparation kleineren Maßstabs wurde eine 2,5 ml Flüssigkultur mit einer einzelnen, von einer LB<sub>AMP</sub> Agarplatte gepickten Bakterienkolonie angeimpft und für 8 h inkubiert. Aus 2 ml der Bakterienkultur wurde die Plasmid DNA gewonnen. Mit den übrigen 0,5 ml der Bakteriensuspension wurde eine 100 ml Kultur angeimpft, in einem Erlenmeyerkolben mit Schikane im Schüttelinkubator 16 h inkubiert und anschließend für eine Plasmid DNA Präparation mittleren Maßstabs verwendet.

#### 2.1.2. Lagerung und Konservierung von Bakterien

Flüssigkulturen wurden eine Woche, LB<sub>AMP</sub>-Agarplatten mit Bakterienkolonien vier Wochen bei 4°C gelagert. 100 ml Bakterienkulturen wurden zunächst zentrifugiert (4000 x g, 5 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Bakterienpellet bei -20°C gelagert.

Zur dauerhaften Lagerung transformierter Bakterien wurden aus einer 100 ml Übernachtkultur 900  $\mu\text{l}$  Bakteriensuspension entnommen und mit 100  $\mu\text{l}$  sterilem Glycerol

(100%) vermischt. Die Probe wurde sofort bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und konnte so mindestens ein Jahr gelagert werden.

### 2.1.3. Herstellung kompetenter Bakterien (Rubidiumchlorid-Methode)

Ein Abstrich der bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten E.coli Bakterien (DH5 $\alpha$ ) wurde 16 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einer 5 ml Flüssigkultur schüttelnd (250 Upm) inkubiert. Anschließend wurde 1 ml der Übernachtskultur zur Inokulation von 50 ml LB-Medium benutzt. Die Zellen wurden unter ständiger photometrischen Kontrolle bei einer Wellenlänge von 600 nm vermehrt, bis eine optische Dichte (OD) zwischen 0,4 bis 0,5 erreicht war. Die Bakteriensuspension wurde 15 min auf Eis inkubiert und danach zentrifugiert (4000 x g, 15 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Das Pellet wurde in 33 ml steriler RF I Lösung resuspendiert, erneut zentrifugiert und anschließend in 8 ml steriler RF II Lösung aufgenommen. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen im Kühlraum zu jeweils 200  $\mu\text{l}$  aliquotiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und sofort bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Qualität der Bakterienpräparation wurde in einem Kompetenztest untersucht (Hanahan, 1983).

#### RF I Lösung

100 mM RbCl<sub>2</sub>  
50 mM MnCl<sub>2</sub>  
30 mM KAc  
10 mM CaCl<sub>2</sub>  
15% (v/v) Glycerin  
pH 5,8

#### RF II Lösung

10 mM MOPS  
10 mM RbCl<sub>2</sub>  
75 mM CaCl<sub>2</sub>  
15% (v/v) Glycerin  
pH 6,8

### 2.1.4. Transformation von Bakterien

Ein 200  $\mu\text{l}$  Aliquot tiefgefrorener, kompetenter E.coli Bakterien (DH5 $\alpha$ ) wurde zusammen mit der entsprechenden Plasmid DNA auf Eis aufgetaut. Zu 100  $\mu\text{l}$  Bakteriensuspension wurden 10 ng Plasmid DNA pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Hitzebehandlung für 45 sec bei  $42^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad mit erneuter Inkubation für 2 min auf Eis. Zur Regeneration der Zellen wurde der Ansatz in 1 ml LB-Medium für eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach wurden 100  $\mu\text{l}$  auf LB<sub>AMP</sub>-Agarplatten ausgestrichen. Die übrige

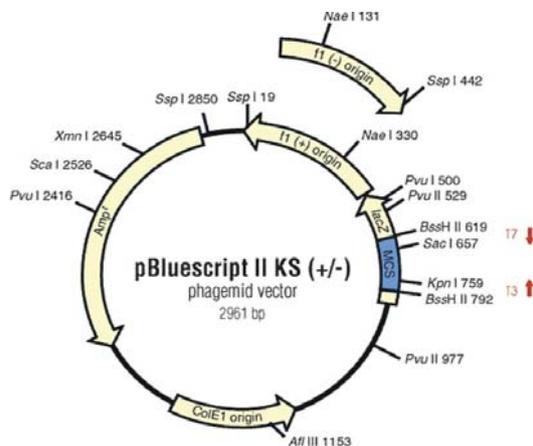
Zellsuspension wurde zentrifugiert (4000 x g, 2 min, RT) und ebenfalls ausplattiert. Beide Ansätze wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und Einzelkolonien auf die gewünschte Transformation hin untersucht.

## 2.1.5. Klonierungs- und Expressionsvektoren

### 2.1.5.1. Klonierungsvektor

Zu Klonierungszwecken wurde der Plasmid-Vektor *pBluescript II KS* (Stratagene) verwendet, der in Abbildung II 1 dargestellt ist.

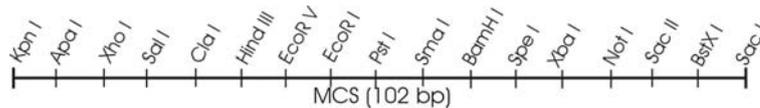
a



**Abbildung II 1: Vereinfachte Darstellung des Plasmid-Vektors *pBluescript II KS***

- a) Es handelt sich um ein *high copy plasmid* mit einem Ampicillin Resistenz Gen ( $Amp^R$ ), einem bakteriellen Replikationsursprung (*origin*) und einem *lacZ*-Gen für die Blau-Weiß-Selektion. Die *multiple cloning site* (MCS) ist blau unterlegt.
- b) MCS des Vektors *pBluescript II KS* mit singulären Restriktionsschnittstellen.

b

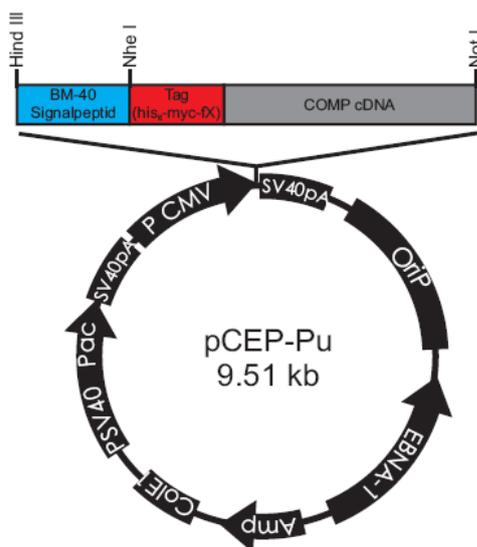


### 2.1.5.2. Expressionsvektoren

#### 2.1.5.2.1. CMV-COMP Konstrukte

Zur eukaryotischen, episomalen Expression in primären bovinen und murinen Knorpelzellen wurden die kodierenden Sequenzen von Wildtyp und mutiertem COMP in den Expressionsvektor pCEP-Pu (Kohfeldt *et al.*, 1997), einem Derivat des Vektors pCEP4

(Invitrogen), kloniert. Der Vektor enthält eine Kopie des EBNA-1-Gens, das für das virale, DNA-bindende Protein „*nuclear antigen 1*“ kodiert, welches an die Epstein-Barr Virus Replikationsstelle (*oriP*) bindet und zu einer starken extrachromosomalen Replikation des Plasmids führt. Dadurch ist, über die Zellteilung hinaus, eine Vervielfältigung des Expressionsvektors gewährleistet. Der Vektor pCEP-Pu repliziert bakteriell wegen seines *ColE1 ori* und ist in Bakterien durch die Ampicillin Resistenz selektionierbar. Die MCS mit dem BM-40 Signalpeptid befindet sich zwischen dem CMV Promotor und dem Polyadenylierungs- und Terminationssignal des SV-40 Virus. Der CMV Promotor stammt aus dem humanen Cytomegalovirus. Die klonierte cDNA wurde unter der Kontrolle des konstitutiven CMV-Promotors transkribiert und die mRNA wegen des Polyadenylierungssignals von SV-40 polyadenyliert. Das BM-40 Signalpeptid des Vektors sorgt für eine Zielsteuerung des Proteins über das endoplasmatische Retikulum (ER), den Golgi-Apparat und sekretorische Vesikel in den Extrazellulärraum.



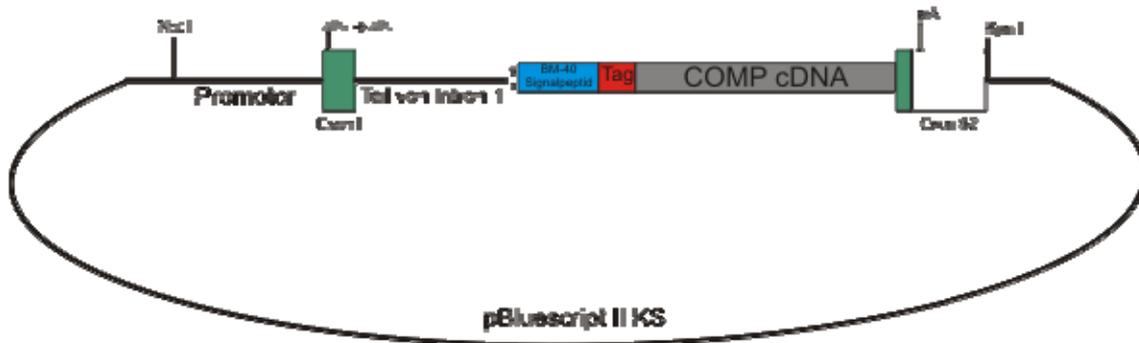
**Abbildung II 2: Vereinfachte Darstellung des Plasmid-Vektors pCEP-Pu mit Insert**

Die im Vektor pCEP-Pu enthaltenen DNA Abschnitte sind im genauen Verhältnis gemäß ihrer Größe und Lage dargestellt. Das BM-40 Signalpeptid, der Tag und die COMP cDNA sind vergrößert und nicht den Größenverhältnissen entsprechend dargestellt. Als cDNA wurde entweder die Wildtyp Sequenz oder die mutante Sequenz D469 $\Delta$  eingefügt. Zusätzlich sind die Schnittstellen der wichtigsten Restriktionsendonukleasen gezeigt.

Die COMP Konstrukte wurden in früheren Arbeiten hergestellt und lagen im Institut vor (Thur et al., 2001). Die COMP cDNA wurde mit einem *Tag*, bestehend aus einem Hexahistidinmotiv (*his<sub>6</sub>*), einem *myc*-Epitop (*c-myc*) und einer Faktor X Proteaseschnittstelle (*factor x*) versehen und wurde im Leseraster hinter das BM-40 Signalpeptid kloniert. Zur Identifizierung positiver Klone wurde in das mutierte COMP Konstrukt außerdem eine neue Restriktionsendonukleasenschnittstelle eingeführt.

### 2.1.5.2.2. Col2a1-COMP Konstrukte

Zur knorpelspezifischen, transgenen Expression von COMP in der Maus wurde die kodierende Sequenz für Wildtyp bzw. mutiertes COMP unter die Kontrolle des gewebespezifischen Kollagen Typ II Promotors der Maus kloniert. Die Col2a1-COMP Konstrukte wurden innerhalb meiner Diplomarbeit im Institut angefertigt (Schmitz, 2002).



**Abb. II 3: Vereinfachte Darstellung des Vektors Col2a1-COMP**

Dargestellt ist das Col2a1-COMP Transgen Konstrukt im Vektor pBluescript II KS. Das Konstrukt beinhaltet drei Kilobasen (kb) der Promotor-Region, Exon 1 mit einem mutierten Startcodon (ATG → ATC), ein 2,5 kb-Fragment von Intron 1, einer Splicing Akzeptorstelle (sa) gefolgt von der codierenden Sequenz des jeweiligen COMP Konstruktes incl. BM-40 Signalpeptid und his<sub>6</sub>-myc-fx tag fusioniert wurde. Abschließend findet sich das Exon 52 mit dem Polyadenylierungssignale Vor Mikroinjektion wurde der Vektor mit den Restriktionsendonukleasen Not I und Kpn I aus dem Klonierungsvektor pBluescript II KS geschnitten und linearisiert.

Der Vektor, der in Abbildung II 3 schematisch dargestellt ist, beinhaltet die 5' Sequenzen des Typ II Kollagen Gens der Maus. Er beinhaltet 3 Kilobasen (kb) der Promotor-Region, Exon 1 mit einem mutierten Startcodon (ATG → ATC), ein 2,5 kb-Fragment von Intron 1 mit einem 182 Basenpaare umfassenden *Enhancer* Motiv sowie eine Splicing Akzeptorstelle (sa) gefolgt von dem nuklearen Lokalisationssignal des SV-40 T Antigens, welches mit der codierenden Sequenz des jeweiligen COMP Konstruktes incl. BM-40 Signalpeptid und his<sub>6</sub>-myc-fx tag fusioniert wurde. Abschließend findet sich das Exon 52 mit dem Polyadenylierungssignal (Sakai et al., 2001).

### 2.1.6. DNA Präparation und Präzipitation

Die Isolierung von Plasmid DNA im mittleren Maßstab („MIDI-Präp“) für präparative Zwecke wurde nach dem Protokoll des Herstellers mit dem *Nucleobond® AX 100 Kit* durchgeführt. Die resultierende DNA wurde in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> oder TE Puffer aufgenommen. Eine Isolierung von Plasmid DNA im kleinen Maßstab („MINI-Präp“) für Sequenzierungen und Restriktionsanalysen wurde mit dem *NucleoSpin® Plasmid Kit* gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Beide Methoden zur DNA-Präparation beruhen auf einer modifizierten Methode nach Birnboim (Birnboim et al., 1979). Einer alkalischen Lyse der Zellen im DNase-freien RNase A Puffer folgte eine Anionenaustauschchromatographie und Ethanolfällung der Plasmid DNA.

Falls notwendig wurde für eine weitere Ethanolfällung 1 Volumen gelöste DNA mit 1/10 Volumen 3 M NaOAc, pH 5,2 versetzt. Anschließend wurde das doppelte Volumen Ethanol (96%) zugegeben und 30 min bei –20°C inkubiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation (15000 x g, 10 min, 4°C) sedimentiert, das DNA Pellet zweimal mit Ethanol (70%) gewaschen, erneut zentrifugiert und nach Trocknen in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> oder TE Puffer aufgenommen.

### 2.1.7. Restriktionsverdau

Für das Schneiden von Plasmid DNA wurden Restriktionsendonukleasen entsprechend den Angaben des Herstellers (New England Biolabs) in den mitgelieferten Puffern und bei den empfohlenen Temperaturen eingesetzt. Bei der Verwendung von zwei Restriktionsenzymen wurde entweder ein Doppelverdau im entsprechenden Puffer durchgeführt oder, falls empfohlen, nacheinander verdaut, wobei zuerst das Enzym verwendet wurde, welches einen Puffer mit niedrigerer Salzkonzentration benötigt. Falls erforderlich, wurde das zuerst verwendete Enzym nach Verdau inaktiviert. Der Verdau erfolgte 1-2 h bei 37°C. Ein Standardverdau beinhaltet in 20 µl Gesamtvolumen folgende Komponenten:

DNA	0,2 - 2 µg
Enzym	5 Units
10x Puffer	1 µl
ggf. 100x BSA	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	add 20 µl

### 2.1.8. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Niedrige DNA Konzentrationen wurden in einem mit Ethidiumbromid (EtBr) [3 µl einer 1%igen EtBr-Lösung pro 100 ml Agarosegel] versetzten TAE-Agarosegel abgeschätzt. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 5 ng DNA pro Bande. Dabei wurde die Bandenintensität einer aufgetragenen DNA Lösung mit der eines DNA-Größenmarkers bekannter Konzentration verglichen.

Hohe DNA und RNA Konzentrationen und deren Reinheit wurden photometrisch über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei einer Küvettschichtdicke von 1 cm und einer Wellenlänge von 260 nm entspricht eine OD<sub>260</sub> von 1 für dsDNA 50 µg/ml und für RNA 40 µg/ml. Die dsDNA und RNA Konzentration ergeben sich aus folgenden Formeln:

$$\text{dsDNA Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{280}) \times 2 \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\text{RNA Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{280}) \times 2 \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Als Maß für den Reinheitsgrad gilt das Verhältnis der optischen Dichten (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>). Der Quotient reiner DNA Lösungen sollte bei etwa 1,8 liegen.

## **2.2. Zellkultur und Mauspräparation**

### **2.2.1. Ursprung der primären Zellen**

Zur zellbiologischen und biochemischen Analyse wurden frisch isolierte primäre Knorpelzellen aus Maus und Rind verwendet.

Dabei wurden artikuläre bovine Knorpelzellen aus dem Schultergelenkknorpel eines adulten Schlachtrindes gewonnen. Das Gewebe wurde dazu am Tage der Isolierung frisch aus der städtischen Fleischversorgung bezogen. Murine Knorpelzellen wurden aus Sterni neugeborener Tiere gewonnen. Neben den primären Knorpelzellen wurde die Zelllinie MC615 verwendet (Mallein-Gerin et al., 1995).

### **2.2.2. Zellkulturarbeiten**

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter Verwendung einer Sterilbank durchgeführt. Glasgeräte wurden vor Gebrauch autoklaviert. Nicht-sterile Chemikalien wurden im serumfreien Medium gelöst und mit einem 0,2 µm Filter sterilfiltriert.

Kunststoffmaterialien waren steril verpackt und wurden nach Gebrauch entsorgt.

Zur adhärennten Kultivierung der Zellen wurde das unten angegebene Kulturmedium benutzt.

Die Inkubation der Zellkulturen erfolgte in einem Begasungsbrutschrank in wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Konzentration.

#### **Kulturmedium**

500 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM Nut Mix F-12), Gibco

50 ml FCS, Biochrom KG

10 ml Streptomycin/Penicillin (10 mg/ml)

5 ml L-Glutamin (200 mM)

3,5 ml G418 (50 mg/ml)

Ascorbat (f.c.: 100 µM)

Gentamycin (f.c.: 0,5 µg/ml)

### **Mediumwechsel**

Der Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage, jedoch spätestens, wenn der Säure-Base Indikator des Mediums nach Gelb umschlug. Vor der Zugabe des frischen Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen.

### **Passagieren von Zellen**

Konfluent gewachsene Zellen wurden vom Boden der Kulturschale gelöst und auf mehrere Gewebekulturschalen verteilt. Dazu wurde zuerst das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, da das im Medium enthaltene FCS Trypsininhibitoren enthält. Um den Kontakt der Zellen vom Boden der Gewebekulturschale zu lösen wurde eine EDTA/Trypsin-Lösung (2 mM/0,25%) zugegeben und im Brutschrank inkubiert. Durch die Zugabe von frischem, serumhaltigem Medium wurde das Trypsin inaktiviert. Die Zellen wurden mit einer Pipette langsam vereinzelt und die Zellsuspension auf mehrere Platten verteilt.

### **Kryokonservierung von Zellen**

Einfriermedium mit 20% FCS und 10% DMSO wurde auf 4°C vorgekühlt. Nach Ablösung der Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung und anschließender Zentrifugation (100 x g, 5 min, RT) wurde das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium aufgenommen, resuspendiert und in Einfrier Röhrchen pipettiert. Die Röhrchen wurden in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox (Nalgene Cryo 1°C Freezing Container) (Abkühlrate: 1°C/min) auf -80°C gekühlt. Für eine längere Lagerung wurden die Zellen nach einigen Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

### **Auftauen von Zellen**

Ein tiefgefrorenes Aliquot wurde in einem Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut. Um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen, wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und durch Zentrifugation (100 x g, 5 min, RT) pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 10 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert und in Kulturschalen überführt.

### **2.2.3. Isolierung primärer boviner Knorpelzellen**

Die freigelegte und mit Ethanol gespülte Knorpeloberfläche wurde mit einem Skalpell vom Knochen entfernt. Das Gewebe wurde 90 min in einer 0,4%igen (w/v) Pronase-Lösung in einem Rührer bei mittlerer Rührgeschwindigkeit im Brutschrank inkubiert. Danach wurde mit kaltem, serumfreiem Medium gewaschen und anschließend für 15 h in einer 0,025%igen (w/v) Collagenase P Lösung inkubiert. Dabei wurde pro Gramm Knorpelgewebe 12 ml Kulturmedium eingesetzt und das Antibiotikum *Gentamycin* in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben. Nach dem Verdau wurde die Knorpelsuspension gewaschen und von größeren, unverdauten Bestandteilen befreit. Dazu wurde das nach der Zentrifugation (100 x g, 5 min, RT) erhaltene Pellet in serumfreiem Medium resuspendiert und anschließend nacheinander durch einen 100 µm bzw. 40 µm Zellsieb filtriert. Nach einer letzten Zentrifugation wurde das Zellpellet in 10 ml serumfreiem Medium aufgenommen, die Zellzahl mittels Neubauer-Kammer bzw. Zellzähler bestimmt und die Knorpelzellen je nach Bedarf in speziellen Zellkulturschalen ausplattiert und kultiviert.

### **2.2.4. Isolierung primärer muriner Knorpelzellen**

Als Quelle für primäre murine Knorpelzellen dienten die Sterni und die Rippen neugeborener, maximal 4 Tage alter Mäuse. Es wurden 4 bis 6 Tiere für eine Isolation verwendet. Die Rippen wurden auf halbem Weg zur Wirbelsäule durchtrennt und zusammen mit dem Sternum entnommen. Auf fusselfreiem Tuch wurde überschüssiges Haut-, Muskel- oder anderes Gewebe entfernt, bevor das gesäuberte Knorpelgewebe in steriles PBS überführt und gewaschen wurde. Danach wurden die Sterni in 10 ml einer Collagenase P Verdauungslösung [ $1 \text{ mg/ml}$ ] für 16 h im Brutschrank in kleinen Zellkulturschalen inkubiert. Die Suspension wurde danach zentrifugiert (5 min, 100 x g, RT), das Pellet in 10 ml serumfreiem Medium aufgenommen und durch einen 100 µm sowie einen 40 µm Filter filtriert. Die Zentrifugationsschritte wurden noch zwei weitere Male zur Reinigung der Zellen durchgeführt. Abschließend wurde das Zellpellet in 10 ml serumfreiem Medium aufgenommen und die Zellzahl mittels Neubauer-Kammer bzw. Zellzähler bestimmt. Die murinen Knorpelzellen wurden je nach Bedarf in speziellen Zellkulturschalen ausplattiert und kultiviert.

### **2.2.5. Transfektion primärer Knorpelzellen**

Zur transgenen Expression verschiedener COMP Konstrukten wurden die entsprechenden Plasmide in primäre bovine oder murine Knorpelzellen mit Hilfe eines nicht liposomalen Reagenzes (*FuGENE 6 Transfection Reagent*, Roche) transfiziert. Die Transfektion erfolgte für Sekretionsuntersuchungen in 6-Loch Zellkulturschalen oder für Immunfluoreszenz-Färbungen in Objektträger mit Kammerstruktur (Chamber Slides). Nachdem die Zellen zu etwa 60-80% konfluent gewachsen waren, wurde das Kulturmedium gewechselt und das Reagenz nach Herstellerangaben zugegeben. Zur Transfektion von Zellen in 6-Loch Zellkulturschalen wurden vorab 3 µl *FuGENE 6* direkt in 97 µl serumfreies Medium im sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und 5 min bei RT inkubiert. 1 µg DNA wurde in ein weiteres Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, tropfenweise mit dem verdünnten *FuGENE 6* versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die *FuGENE 6*/DNA-Lösung auf die vorbereiteten Zellkulturen gegeben. Die Platten wurden leicht geschwenkt und im Brutschrank inkubiert. Zur Transfektion von Zellen in Chamber Slides wurden die eingesetzten Mengen entsprechend der Fläche des Kammerbodens berechnet.

### **2.2.6. Ernte des Zellüberstandes und des Zellrasens**

Zur Untersuchung der Sekretionskinetik wurden primäre Knorpelzellen in 6-Loch Zellkulturschalen kultiviert. Nach definierten Zeitpunkten wurden Zellüberstände und Zellrasen geerntet. 2 ml Zellüberstand aus einer Kulturschale wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert. Der Zellrasen wurde mit PBS gewaschen, in 200 µl SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen und mit einer Intervallschaltung (1 sec Ultraschallstoß / 1 sec Pause) zweimal für 10 sec beschallt. Zur Analyse in einer SDS-PAGE wurde 1/10 Volumen (200 µl) der im Zellüberstand enthaltenen Proteine mit Ethanol gefällt und 1/10 Volumen (20 µl) vom Zelllysat direkt eingesetzt.

### **2.2.7. Mauspräparation**

Neugeborene Mäuse wurden durch Enthauptung, adulte Mäuse durch cerebrale Dislokation getötet. Die Gewebe wurden unmittelbar entnommen und entweder in geeigneten Gefäßen gelagert oder sofort weiterverarbeitet. Für die RNA Isolation oder Proteinextraktion wurden entsprechende Gewebe in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße oder Plastikröhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Gewebe für histologische Analysen wurden in entsprechende Fixierlösungen überführt. Femurknochen für Knochendichtemessungen wurden in eine Mullbinde gewickelt, die vorab in einer NaCl-Lösung (150 mM) getränkt wurde, in Aluminiumfolie verpackt und bis zur Analyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.2.8. Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien**

Die genomische DNA wurde jeweils aus einem etwa 1 cm langen Stück der Schwanzspitze gewonnen, welche zuerst über Nacht in 500  $\mu\text{l}$  Lysepuffer bei  $55^{\circ}\text{C}$  im Ofen inkubiert wurde. Anschließend wurde die DNA mit einem Volumen Isopropanol gefällt und mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze gefischt. Der DNA Faden wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 200  $\mu\text{l}$  TE Puffer pH 8,0 überführt, drei Stunden bei  $55^{\circ}\text{C}$  inkubiert und schließlich bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **Schwanzspitzen Lysepuffer**

100 mM TrisHCl

5 mM EDTA

0,2% SDS

200 mM NaCl

pH 8,0

Zu 10 ml Lysepuffer wurde vor Gebrauch 200  $\mu\text{l}$  Proteinase K [ $10^{\text{mg}}/\text{ml}$ ] gegeben.

### **2.2.9. Isolierung von Gesamt-RNA aus Mausgewebe**

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe wurde nach einer modifizierten Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987) mit Trizol Reagenz durchgeführt. Dazu wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff gemörsert und in 10 Volumen (1 ml pro 100 mg Gewebe) Trizol Reagenz (Life Technologies) aufgenommen. Anschließend wurde der Extrakt mit einem Polytron Messer homogenisiert. Das Homogenat wurde 5 min bei RT inkubiert und in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dann wurde Chloroform (200 µl pro ml Trizol) zugegeben und 15 sec geschüttelt. Nach 3 min Inkubation bei RT wurde die Probe zentrifugiert (21000 x g, 15 min, 4°C). Das Gemisch trennt sich dabei in drei Phasen wobei die obere Phase die RNA, die Interphase die DNA und die untere Phase die Proteine enthält. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und erneut zentrifugiert (21000 x g, 10 min, 4°C). Das gelartige Pellet wurde in 1 ml Ethanol (75%) gewaschen und zentrifugiert (5000 x g, 5 min 4°C). Das Pellet wurde für 5-10 min luftgetrocknet und dann in 100 µl RNAse freiem H<sub>2</sub>O resuspendiert. Abschließend wurde die Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C gelöst, auf Eis gekühlt und die Konzentration über die Messung der optischen Dichte bestimmt. Die Gesamt-RNA wurde dann zur Synthese von cDNA verwendet.

### **2.2.10. Proteinextraktion aus Gewebe**

#### **2.2.10.1.      *Sequentielle Extraktion (3-Schritt Extraktion)***

Zur sequentiellen Extraktion von Proteinen in drei Schritten wurde das Gewebe nach Präparation zunächst in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Zur Extraktion wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff gemörsert, in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in 2 ml kaltem Extraktionspuffer 1 aufgenommen. Die Suspension wurde über Nacht im Kühlraum rotierend inkubiert und anschließend zentrifugiert (21000 x g, 25 min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C gelagert. Das Pellet wurde in 2 ml Extraktionspuffer 2 resuspendiert und wie oben weiterbehandelt. Analog wurde mit Extraktionspuffer 3 gearbeitet.

### **2.2.10.2.      *Sequentielle Extraktion (2-Schritt Extraktion)***

Für die sequentielle Extraktion von Proteinen in zwei Schritten wurde das Gewebe zunächst in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend in 2 ml Extraktionspuffer 2 aufgenommen. Die Suspension wurde für 6-8 Stunden im Kühlraum rotierend inkubiert und schließlich zentrifugiert (21000 x g, 25 min, 4°C). Der Überstand (Fraktion 1) wurde abgenommen und das Pellet erneut in 2 ml Extraktionspuffer 2 aufgenommen und über Nacht inkubiert. Nach Zentrifugation (21000 x g, 25 min, 4°C) wurde der Überstand (Fraktion 2) mit Fraktion 1 vereinigt, das Pellet mit 2 ml Extraktionspuffer 3 resuspendiert und für 6-8 Stunden bei 4°C inkubiert. Der resultierende Überstand ist Fraktion 3.

<b>Extraktionspuffer 1</b>	<b>Extraktionspuffer 2</b>	<b>Extraktionspuffer 3</b>
50 mM TrisHCl	50 mM TrisHCl	4M GuanidinHCl
150 mM NaCl	150 mM NaCl	50 mM TrisHCl
	10 mM EDTA	150 mM NaCl
		10 mM EDTA

Alle Puffer wurden auf pH 7,4 eingestellt und auf 4°C vorgekühlt. Vor Gebrauch wurden sie mit jeweils 2 mM (f.c.) der Proteaseinhibitoren PMSF und NEM versetzt.

## 2.3. Analysen

### 2.3.1. Molekularbiologische Analysen

#### 2.3.1.1. *Denaturierende Agarosegelelektrophorese*

Zur elektrophoretischen Auftrennung von RNA wurden Gele mit einer Endkonzentration von 1% Agarose verwendet. Es wurde 0,25 g Agarose in 18,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> in der Mikrowelle aufgeköcht und auf etwa 60°C abgekühlt. Dann wurden 2,5 ml 10x MOPS Puffer (pH 8,0) und 4 ml Formaldehydlösung (37%) zugegeben. Das Gel wurde in eine horizontale Gel-Apparatur gegossen und nach Härtung mit Laufpuffer (1x MOPS pH 8,0) überschichtet. Etwa 1 µg RNA wurde mit 2 Volumen RNA Probenpuffer und Farbmarker versetzt, 10 min bei 65°C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt. Dann wurden die Proben auf das Agarosegel aufgetragen und bei einer Spannung von 6 V/cm Elektrodenabstand getrennt.

10x MOPS Puffer	RNA Probenpuffer	10x Farbmarker
200 mM MOPS	50 µl 10x MOPS	1 g RNase freie Sucrose (50%)
50 mM NaAc	83 µl Formaldehyd (37%)	2 ml H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>
10 mM EDTA	250 µl Formamid	Bromphenolblau (Spatelspitze)
pH 8,0 (mit NaOH)		(1µl EtBr [100 mg/ml] pro 20 µl Farbmarker)

#### 2.3.1.2. *Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)*

Für die Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA wurde die Reverse Transkriptase Superscript II (Invitrogen) benutzt. In einem allgemeinen Ansatz wurden zu 5 µg Gesamt-RNA jeweils 1 µl Oligo dT-Primer (0,5 µg/µl) bzw. dNTP Mix (10 mM je Nukleotid) pipettiert. Der Ansatz wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> auf 12 µl aufgefüllt, die RNA für 5 min bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Danach wurden 4 µl 5x *First-Strand* Puffer, 2 µl DTT (0,1%), 1 µl RNase Inhibitor (40 U/µl) und 1 µl Superscript II (200 U) hinzugegeben. Die cDNA

Synthese erfolgte bei 42°C für 50 min. Das Enzym wurde danach in 15 min bei 70°C inaktiviert. Abschließend erfolgte nach Zugabe von 1 µl RNase ein 20 minütiger Verdau verbliebender RNA Reste. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert und dann zur Amplifikation in einer PCR eingesetzt. Die Standard PCR Methode wurde individuell auf die Hybridisierungstemperaturen der verwendeten Primer bzw. Elongationszeiten der zu generierenden Fragmente adaptiert.

### 2.3.1.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung der auf genomischer DNA enthaltenen endogenen oder integrierten transgenen Abschnitte wurde das *Expand Long Template PCR System* (Roche) benutzt. Ein Standardverdau beinhaltet in 50 µl Gesamtvolumen folgende Komponenten:

gDNA	1,5 µl
Expand Long Template Buffer 1	5 µl
dNTPs	0,25 mM
Oligonukleotide	jeweils 50 pmol
Expand Polymerase	2 U
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	add 50 µl

Der Ansatz wurde auf Eis gekühlt. Die *touch down* PCR Methode wurde mit folgendem PCR Programm mit *Hot Start* durchgeführt:

Schritt	Zyklenzahl	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1x	95 °C	3 min
Denaturierung		95 °C	30 sec
Hybridisierung	10x	62-57 °C	30 sec
Synthese		68 °C	3 min
Denaturierung		95 °C	30 sec
Hybridisierung	25x	58 °C	30 sec
Synthese		68 °C	3 min
Endsynthese	1x	68 °C	10 min

#### **2.3.1.4. Verdau genomischer DNA**

Vor der Southern Blot Analyse wurde die gDNA mit einer spezifischen Restriktionsendonuklease behandelt. Für einen Nachweis integrierter Kopien des Transgens wurde die gDNA mit dem Enzym EcoR V behandelt. Für den Nachweis COMP defizienter Mäuse wurde die gDNA wie von Svensson et al. 2002 beschrieben, mit dem Enzym BamH I behandelt. Der Verdau erfolgte bei 37°C über Nacht in einem 50 µl Standard Ansatz:

gDNA	30 µl
Puffer (10x)	5 µl
BSA (100x)	0,5 µl
Enzym	1 µl
Spermidin	2 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	add 50 µl

#### **2.3.1.5. Agarosegelelektrophorese**

Mit dem Verfahren der Agarosegelelektrophorese können DNA Moleküle aufgrund ihres negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückrats in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Lineare DNA bewegt sich umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Länge, wobei der Trennbereich der Nukleinsäure Fragmente von der Agarosekonzentration abhängt.

Agarose (*Seakem<sup>®</sup> LE Agarose*) wurde in einem definierten Volumen TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Das hierbei verdampfte Wasser wurde ersetzt. Nach Abkühlung der Agaroselösung auf ~ 60°C wurde 0,5 µg/ml (f.c.) EtBr zugegeben, das in doppelsträngige DNA (dsDNA) interkaliert. Mit ultraviolettem (UV)-Licht wird EtBr zur Lumineszenz angeregt und emittiert Licht im orange-roten Bereich.

Die Agaroselösung wurde in eine kombinierte Gieß- und Laufkammer gegossen. Nachdem die Agarose polymerisiert war, wurde das Gel in der Kammer mit TAE Puffer vollständig überschichtet. Zu den DNA Proben wurde 0,1 Volumen 10x DNA Probenpuffer gegeben. Neben den DNA Proben wurde als Referenzwert ein DNA-Größenmarker (Life Technologies) aufgetragen, der DNA Fragmente definierter Größe zwischen 75 und 12216 Basenpaaren (bp) enthält ist. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 4-8 V/cm Elektrodenabstand durchgeführt.

Die Banden wurden mittels eines UV-Transiluminators im Gel sichtbar gemacht und durch ein Videosystem dokumentiert. Größe und Menge der aufgetragenen DNA-Fragmente ließen sich über einen Vergleich mit dem Referenzwert abschätzen.

#### **10x DNA Probenpuffer**

80% (w/v) Glycerin

0,1% (w/v) Bromphenolblau

0,1% (w/v) Xylencyanol

10 mM TrisHCl

50 mM EDTA

pH 8,0

#### **2.3.1.6. *Reinigung von PCR Produkten und Elution von DNA Fragmenten aus Agarosegelen***

DNA Fragmente und PCR Produkte wurden zur Reinigung zunächst im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, woraufhin die DNA Banden unter UV-Durchlicht mit einem Skalpell aus dem TAE Agarosegel ausgeschnitten wurden. Anschließend wurde die DNA aus den Gelstücken mit Hilfe des *GeneClean<sup>®</sup> II* Kit gemäß den Angaben des Herstellers eluiert.

### **2.3.1.7. Southern Blot**

Als Southern Blot bezeichnet man den Transfer der im Agarosegel aufgetrennten DNA auf eine Nylonmembran. Anschließend folgt die Identifizierung spezifischer Fragmente durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA Sonde.

Um später eine größenspezifische Zuordnung der radioaktiven Signale zu ermöglichen, wurde vorab das Agarosegel nach elektrophoretischer Auftrennung der verdauten genomischen DNA im UV-Durchlicht mit einem Lineal fotografiert. Danach wurde die DNA im Gel ca. 30 min (max. bis zur Gelbfärbung der Bromphenolblau-Bande) in 0,25 M HCl depuriniert und anschließend das Gel 4x kurz in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen. Dann wurde die DNA im Gel erneut ca. 30 min (bis zur Blaufärbung der Bromphenolblau-Bande) in Denaturierungspuffer inkubiert. Der Transfer der DNA mittels Kapillarmethode auf die Nylonmembran (Roth) wurde über Nacht in Denaturierungspuffer durchgeführt. Nach Transfer wurde die Nylonmembran 2x kurz in 2x SSC Lösung gewaschen und zwischen Blot Papier (Whatman) getrocknet.

<b>Depurinierungspuffer</b>	<b>Denaturierungspuffer</b>
0,25 M HCl	1,5 M NaCl
	0,25 M NaOH

### **2.3.1.8. Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA**

Zur radioaktiven Markierung der DNA Sonden wurde das *Ladderman<sup>TM</sup> Labeling Kit* (Takara) nach Herstellerangaben benutzt. Die zu markierenden DNA Fragmente wurden entweder durch PCR gewonnen (Sonde für „Transgen Detektion“) oder über spezifische Restriktionsendonukleasen aus einem Plasmid Vektor geschnitten (Sonde für „COMP Knockout Detektion“; zur Verfügung gestellt von Dr. Åke Oldberg, Lund). Für die radioaktive Markierung wurden 50 ng DNA eingesetzt. Die Aktivität [*alpha* <sup>32</sup>P] dCTP wurde von Hartmann Analytic bezogen. Für größere Membranen (25 x 21 cm) wurden 5 µl der Aktivität (2 MBq; 50 µCu), für kleinere Membranen (14 x 12 cm) 2,5 µl der Aktivität (1 MBq; 25 µCu) eingesetzt.

Nicht inkorporierte Nukleotide wurden über eine *Nick<sup>TM</sup> Sephadex G-50* Säule (Pharmacia Biotech) abgetrennt. Die radioaktiven Sonden wurden vor Gebrauch im Southern Blot oder Northern Blot 5 min bei 100°C im Wasserbad erhitzt, 5 min auf Eis gekühlt und anschließend direkt in 10 ml Prähybridisierungslösung gegeben.

### **2.3.1.9.      *Hybridisierung radioaktiv markierter DNA Sonden mit filtergebundener DNA und RNA***

Die Membranen aus dem Southern Blot wurden in 30 ml Formamid-Mix für 4 Stunden in Hybridisierungsröhren bei 42°C im Ofen inkubiert. Die Lösung wurde vorab auf 60°C erhitzt und zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der radioaktiv markierten Sonden mit 700 µl denaturiertem Heringssperma [10<sup>mg/ml</sup>] versetzt. Nach Prähybridisierung wurden 20 ml der Lösung verworfen und die denaturierte radioaktive Sonde zu den übrigen 10 ml Lösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C im Ofen. Anschließend wurde die radioaktive Hybridisierungslösung abgegossen und die Membran für jeweils 15 min in Waschlösung 1 und Waschlösung 2 sowie 10 min in Waschlösung 3 bei 65°C inkubiert. Falls die gemessene Emission größer als 10 *counts per second* war, wurde die Membran erneut in Waschlösung 3 inkubiert. Die Membran wurde anschließend in Frischhaltefolie verpackt und in einer Phosphor Imager Kassette (Molecular Dynamics) fixiert. Die Dauer der Exposition war abhängig von der Intensität der Strahlung. In der Regel konnten bereits nach 6 Stunden im Phosphor Imager Scanner mit der Image Quant Software Signale visualisiert und quantifiziert werden.

<b>Formamid-Mix (Southern Blot)</b>	<b>50x Denhards</b>	<b>10x SSPE</b>
5x Denhards	5 g Fico L type 400	3 M NaCl
1,5% SDS	5 g Polyvinylpyrrolidon K90	200 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
50% Formamid	5 g BSA (fraction V)	20 mM EDTA
5x SSPE	add 500 ml H <sub>2</sub> O	pH 7,4

<b>Waschlösung 1</b>	<b>Waschlösung 2</b>	<b>Waschlösung 3</b>
2x SSC	0,4x SSC	0,1x SSC
0,1% SDS	0,1% SDS	0,1% SDS

### **2.3.1.10. DNA Sequenzierung**

Alle Sequenzierungen wurden durch Mitarbeiter des Servicelabors des Zentrums für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) durchgeführt. Dazu wurde mit dem automatischen Sequenziergerät *ABI Prism™ 377 DNA Sequencer* der Firma Applied Biosystems und der *Taq FS BigDye-Terminator cycle sequencing* Methode analysiert.

Für die Sequenzierung wurde 100-500 ng *template* DNA und die vom Servicelabor bereitgestellten Standard-Oligonukleotide (*M13*, *M13 reverse*, *T3*, *T7*) bzw. eigene Oligonukleotide (3-10 pmol) kombiniert eingesetzt.

## **2.3.2. Proteinbiochemische Analysen**

### **2.3.2.1. Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem BC (*Bicinchoninsäure*) Protein Assay Kit (Uptima) nach der Standardvorschrift für Mikrotiterplatten bestimmt. Aus der Messung einer BSA-Konzentrationsreihe wurde nach linearer Regression eine Eichgerade ermittelt aus der die Proteinkonzentration unbekannter Proben bestimmt werden konnte. Die Extinktionen wurden mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen.

### **2.3.2.2. Protein-Fällung**

#### **2.3.2.2.1. Ethanol (EtOH)-Fällung**

Eine Proteinlösung wurde mit dem 10fachen Volumen Ethanol (96%) versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde der Niederschlag durch Zentrifugation (20 min, 21000 x g, 4°C) pelletiert und mit eiskaltem Aceton gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Aceton abgenommen, das Pellet etwa 10 min luftgetrocknet und in SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen.

#### 2.3.2.2.2. *Trichloressigsäure (TCA)-Fällung*

1 ml Proteinlösung wurde mit 10 µl TritonX100 (10% in PBS) und 250 µl TCA (50% in PBS) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die präzipitierten Proteine zentrifugiert (20 min, 21000 x g, 4°C), der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml eiskaltem Aceton gewaschen. Anschließend wurde erneut zentrifugiert, der Überstand entfernt, das Pellet bei RT luftgetrocknet und in SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen.

#### 2.3.2.3. *Immunpräzipitation*

Zur Immunpräzipitation wurden Antikörper eingesetzt, die gegen das myc-Epitop (*c-myc*) bzw. *COMP* gerichtet waren. Die Antikörper wurden zunächst an Protein A Agarose (Roche) gekoppelt. Dazu wurden pro Ansatz jeweils 20 µl Protein A Agarose Suspension und 5 µl *c-myc* Antikörper bzw. 3 µl *COMP* Antikörper in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß für 4 h bei RT rotierend inkubiert. Danach wurde zentrifugiert (30 sec, 21000 x g, RT), der Überstand vorsichtig abgenommen und mit 1 ml BSA (10% in PBS) für eine Stunde rotierend bei RT blockiert. Nicht gekoppelter Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Während der Kopplung des Antikörpers wurden unspezifische Protein A Agarose Bindungen entfernt (*preclearing*), indem die Proteinlösung mit jeweils 30 µl der ungekoppelten Protein A Agarose Suspension versetzt und bei 4°C inkubiert wurde.

Die an Protein A Agarose gekoppelten Antikörper wurden zu 1 ml Überstand bzw. 500 µl Zellextrakt gegeben. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Danach wurden die Proben zentrifugiert (4 min, 21000 x g, RT) und 3x mit TritonX100 (0,25% in TBS) gewaschen.

Das Pellet wurde in 30 µl SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen und 10 min bei 95°C im Heizblock erhitzt. Dann wurde zentrifugiert (3 min, 21000 x g, RT) und der Überstand mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

#### **2.3.2.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zellkulturüberstände, Zellrasen oder gefällte Proteine wurden in SDS-PAGE Probenpuffer (Laemmli-Puffer) aufgenommen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Die diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli trennt Proteine durch den Siebeffekt nach ihren molaren Massen im konstanten elektrischen Feld. Negativ geladene SDS-Moleküle lagern sich in einem konstanten Verhältnis (1,4 g SDS / 1 g Protein) an die Proteine an. Die Mobilität der Proteine im Polyacrylamidgel ist weitgehend unabhängig von der räumlichen Struktur und der Nettoladung, da durch den SDS-Protein-Komplex die nicht kovalenten Wechselwirkungen unterbrochen werden und alle Proteine eine negative Ladung erhalten. Im Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer durchlaufen die Proteine zuerst ein weitmaschiges Sammelgel, an dessen Grenzschicht die Proteinlösung konzentriert wird und als scharfe Bande gleichmäßig ins Trenngel einwandert. Als Trennmatrix wurde eine Lösung aus Acrylamid und N,N'-Methylen-bisacrylamid (National Diagnostics) im Verhältnis 37,5:1 verwendet, welche durch radikalische Polymerisation nach Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) entsteht. Die Minigele für die vertikale Flachbettelektrophorese hatten Maße von ~ 10 cm x 8 cm x 0,15 cm. Zuerst wurden die entsprechenden Trenngele gegossen und mit wassergesättigtem Butanol überschichtet. Unter reduzierenden Bedingungen wurden Trenngele mit einer Polyacrylamid Konzentration von 6% oder 7,5% verwendet, unter nicht reduzierenden Bedingungen wurden Trenngele mit einer Polyacrylamid Konzentration von 4% bzw. 6% verwendet oder lineare Gradienten-Trenngele von 3-12% hergestellt. Nach Auspolymerisieren wurde das Butanol entfernt und das Sammelgel mit einer Polyacrylamid-Konzentration von 3% gegossen. Mittels Teflonkämme wurden die Taschen im Sammelgel ausgespart, die zur Aufnahme von 10 oder 15 Proben dienen. Die SDS-PAGE wurde unter Wasserkühlung bei konstanter Spannung (160 V) oder konstanter Stromstärke (25 mA/Gel) durchgeführt. Zur Abschätzung der Massen wurden zusätzlich Molekulargewichtsstandards aufgetragen. Unter reduzierenden Bedingungen diente der *High Molecular Weight* Marker (HMW, Roche), unter nicht reduzierenden Bedingungen der *Low Molecular Weight* Marker (LMW, Pharmacia Biotech) mit Zugabe von Fibronectin als Standard.

**Elektrophoresepuffer**

25 mM TrisHCl  
 200 mM Glycin  
 0,1% SDS  
 pH 8,3

**2x Laemmli-Puffer**

160 mM TrisHCl  
 4% SDS  
 22,8% Glycerol  
 0,08% Bromphenolblau  
 pH 6,8

**High Molecular Weight Marker (HMW)**

Myosin	200 kDa
$\beta$ -Galaktosidase	116 kDa
Phosphorylase B	97 kDa
Rinderserumalbumin	66 kDa
Aldolase	39 kDa

**Low Molecular Weight Marker (LMW)**

Fibronektin	~450 kDa
Phosphorylase B	97 kDa
Serumalbumin	66 kDa
Ovalbumin	43 kDa
Carboanhydrase	30 kDa
Trypsin Inhibitor	20 kDa
$\alpha$ -Lactalbumin	14 kDa

**2.3.2.5. Coomassie Blue Färbung**

Nach der SDS-PAGE wurden Proteingele für 20 min in saurer, methanolischer Coomassie Lösung denaturiert, fixiert und gefärbt. Danach wurde über Nacht in einer Entfärberlösung schüttelnd bei RT bis zur Vollentwicklung des Bandenmusters entfärbt. Pro Bande liegt die Nachweisgrenze der Coomassie Blue Färbung bei etwa 0,5  $\mu$ g Protein. Die Gele wurden in 5% Essigsäure aufbewahrt.

**Coomassie Lösung**

0,2% Coomassie Brilliant Blue R250  
 50% Methanol  
 10% Essigsäure

**Entfärberlösung**

40% Methanol  
 7% Essigsäure

### 2.3.2.6. Silberfärbung

Zum Nachweis geringer Proteinmengen im Polyacrylamidgel, die unterhalb der Nachweisgrenze von Coomassie Brilliant Blue liegen, wurde die Silberfärbung benutzt. Die Nachweisgrenze bei der Silberfärbung liegt bei etwa 10 ng Protein pro Bande. Dazu wurden Coomassie gefärbte Gele nach einer Methode von Heukeshoven und Dernik (1988) nachgefärbt. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde zuerst in einer Silbernitrat-Lösung inkubiert, welches anschließend im basischen Milieu mit Formaldehyd reduziert wurde und so zur Farbentwicklung führte. Pro Gel wurde jeweils ein Lösungsvolumen von 50 ml verwendet, welche vor Gebrauch frisch angesetzt wurden. Ein SDS-Polyacrylamidgel wurde zunächst für 10 min in Fixierlösung inkubiert. Es folgte eine 15 minütige Inkubation in Lösung 1. Danach wurde das Gel 3x 5 min und 1x 10 min in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen und für 15 min in Lösung 2 inkubiert. Anschließend wurde bis zum Erscheinen der ersten Banden (etwa 30 sec) in Lösung 3 gewaschen, welche dann erneuert und bis zur Vollentwicklung der Banden weiter inkubiert wurde. Gestoppt wurde die Reaktion in 5% Essigsäure.

<b>Fixierlösung</b>	<b>Lösung 1</b>	<b>Lösung 2 (Silbernitrat)</b>	<b>Lösung 3 (Reduktion)</b>
30% Ethanol	30% EtOH	0,6 mM Silbernitrat	2,5% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
10% Essigsäure	4 M NaOAc 0,3% Eisessig 0,5% Glutaraldehyd 0,4 mM Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,001% Formaldehyd	0,03% Formaldehyd

### 2.3.2.7. Western Blot

Nach erfolgter SDS-PAGE wurden die Proteine elektrophoretisch im Tankblot-Verfahren auf eine Nitrocellulose (NC) Membran (Schleicher & Schuell) übertragen. Die NC Membran wurde kurz im Transferpuffer inkubiert, das SDS-Polyacrylamidgel luftblasenfrei auf die Membran gelegt, beiderseits von jeweils einer Lage feuchtem Blot-Papier und getränkten Schwammtüchern umgeben. Diese Transfereinheit wurde in einer Gitterkassette in einen puffergefüllten Transfertank gehängt. Der anschließende elektrophoretische Transfer wurde im Kühlraum durchgeführt. Bei konstanter Stromstärke bei 100 mA über Nacht oder bei 400 mA für 1 h wandern die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld zur Anode und werden durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran gebunden.

### **Transferpuffer**

50 mM Borsäure

10% Methanol

pH 8,5

#### **2.3.2.8. Immunologischer Nachweis von Proteinen**

Die NC Membran wurde nach dem Western Blot für 3 min bei RT in einer PonceauS Lösung (0,2% in 0,3% TCA, Serva) schüttelnd inkubiert und dann kurz in  $H_2O_{dest}$  gewaschen. Der Farbstoff färbt die Proteine reversibel, pro Bande liegt die Nachweisgrenze bei etwa 1-2  $\mu$ g Protein. Banden der Standardproteine wurden markiert. Die Membran wurde kopiert und die PonceauS Färbung vollständig mit TBS entfernt. Nach einer Stunde Blockieren mit entfettetem Milchpulver (5% MMP (w/v) in TBS) wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran abgesättigt. Anschließend wurde die Membran für mindestens 1 h mit einem spezifischen Primärantikörper inkubiert, der in 5% MMP/TBS in optimaler Konzentration eingesetzt wurde. Nach Inkubation wurde die Membran 3x 5 min mit Tween20 (0,05% in TBS) gewaschen. Der sekundäre, mit *horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelte Antikörper (IgG Maus und IgG Kaninchen) wurde ebenfalls in 5% MMP/TBS verdünnt und die Membran damit für 1 h inkubiert. Er erkennt den  $F_c$ -Teil des ersten Antikörpers und kann durch Chemolumineszenz detektiert werden. Abschließend wurde erneut 3x 5 min mit Tween20 (0,05% in TBS) gewaschen und die Membran der Chemolumineszenz Detektionsmethode unterzogen.

#### **2.3.2.9. Chemolumineszenz Detektion**

Die an die Sekundärantikörper konjugierte Peroxidase katalysiert unter alkalischen Bedingungen die Oxidation von Luminol. Als direktes Reaktionsprodukt entsteht eine elektronisch angeregte Form des 3-Aminophthalats, das bei Relaxation in den elektronischen Grundzustand Strahlung abgibt. Diese reichte aus, um einen Röntgenfilm zu belichten. Die Chemolumineszenz Reaktion wurde in 10 ml 100 mM Tris-HCl mit 90 mM (f.c.) *p-Coumaric (4-Hydroxycinnamic Acid*, Sigma) und 250 mM (f.c.) *Luminol* (Fluka) angesetzt und durch Zugabe von 3  $\mu$ l *Wasserstoffperoxid* ( $H_2O_2$ ) gestartet. Die Membran wurde für 2 min in der Lösung inkubiert und in einer Fotokassette mit Röntgenfilmen gelegt, welche nach einer entsprechenden Expositionszeit entwickelt wurde.

### 2.3.3. Cytologische und histologische Analysen

#### 2.3.3.1. Analyse der Sekretionskinetik (Pulse-Chase Experiment)

Zur radioaktiven Markierung von Proteinen wurde ein L-[<sup>35</sup>S] Cystein/L-[<sup>35</sup>S] Methionin Mix verwendet. Bovine Knorpelzellen wurden hierzu in 6-Loch-Zellkulturschalen kultiviert und mit COMP Konstrukten transfiziert. Nach 2 Tagen wurde die Kinetik der Sekretion durch ein Pulse-Chase-Experiment untersucht. Die Zellen wurden vorab für 2 h in einem cystein- und methioninfreien Mangelmedium (*GibcoBRL*, Life Technologies) kultiviert. Anschließend wurde die Aktivität (100 µCi/ml) für 2 h hinzugegeben (Pulse). Danach wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit serumfreiem Medium gewaschen und Kulturmedium zugegeben (Chase). Der Überstand und der Zellrasen wurden jeweils 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h nach dem Chase geerntet. Dazu wurde zuerst der Überstand in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, anschließend der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 1 ml Lysepuffer (1% NP-40, 50 mM TrisHCl, pH 7,4) wurden die Zellen lysiert und mit einem Zellschaber vollständig vom Boden des Zellkulturgefäßes, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert. Die Proben wurden mit einem an Protein A Agarose gekoppelten Antikörper gegen das myc Epitop präzipitiert und in einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Die SDS-Polyacrylamidgele wurden mit Coomassie Blue gefärbt und danach für eine Stunde in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen und fotografiert. Nach einer weiteren Stunde in einer 1 M Natriumsalicylatlösung wurden sie für 4 h bei 60°C unter Vakuum im Geltdrockner getrocknet. Die Emission wurde mittels Phosphor Imager Technologie erfasst und ausgewertet.

#### 2.3.3.2. Zellvitalitätsexperiment

Die Zellen werden für drei bis sechs Tage nach Transfektion in 6-Loch Titerplatten kultiviert. Die Vitalität der Zellen wurde gemessen, indem Tetrazoliumsalz (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazoliumhydroxid (XTT)) dem Medium zugesetzt wird. Die Zellen metabolisieren XTT zu einem Formazanprodukt, welches wasserlöslich ist und photometrisch nachgewiesen werden kann. Die Reduktion des XTT verbessert sich durch die Zugabe von Phenazinmethosulphat (PMS). Zu je 5 ml XTT-Lösung (1 mg/ml in Medium, 37°C) werden 25 µl PMS-Lösung (5 mM in PBS) gegeben, und das Medium durch diese PMS-XTT-Lösung ersetzt. Nach vier Stunden Inkubation wird die Extinktion des ÜS bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

### **2.3.3.3. Gewebefixierung**

Zur Insolubilisierung der organischen Matrix und zur Erhaltung der Gewebestruktur wurde das Gewebe chemisch fixiert. Dazu wurden die frisch präparierten Gewebe über Nacht bei 4°C in 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS schüttelnd inkubiert.

### **2.3.3.4. Entmineralisierung**

Zur Entmineralisierung bzw. Dekalzifizierung wurde PFA fixiertes Gewebe adulter Mäuse in 0,5 M EDTA über einen Zeitraum von mindestens 4 Wochen bei 4°C schüttelnd inkubiert. Die Lösung wurde in diesem Zeitraum mehrmals gewechselt.

### **2.3.3.5. Präparation von Paraffinschnitten**

Zur Paraffineinbettung wurde das fixierte und entmineralisierte Gewebe vorab in PBS gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert, in Xylol überführt, mit Paraffin (Richard-Allan Scientific) infiltriert und eingebettet.

Ethanolreihe:	40%	4 h	RT
	70%	ÜN	4°C
	80%	4 h	RT
	90%	4 h	RT
	96%	ÜN	4°C
	100%	ÜN	4°C
Xylol:		1-3 h	RT
Paraffin:	Typ 3	6 h	60°C (Vakuum)
	Typ 6	ÜN	60°C (Vakuum)

Die Entwässerung des Gewebes erfolgte in Rollrand-Schnappdeckel-Gläsern auf einem Schüttler. Die Paraffin-Infiltration wurde mit Hilfe eines Einbettautomaten unter Vakuum durchgeführt. Mittels Gießstation wurde anschließend das Gewebe in Plastik-Gussformen mit flüssigem Paraffin (Typ 9) übergossen, ausgerichtet und zur Aushärtung für 3 h auf einer Kühlplatte bei 4°C inkubiert. Die Paraffin-Blöcke wurden bei 4°C im Kühlraum gelagert.

Von dem in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden 5 µm dicke Schnitte mit Hilfe eines Mikrotoms angefertigt. Die Schnitte wurden zur Streckung 2 min in einem 42°C warmen Wasserbad inkubiert und anschließend auf Objektträger (Shannon) gezogen. Diese wurden über Nacht bei 37°C auf einem Strecktisch getrocknet und dann bei 4°C gelagert.

#### **2.3.3.6. Entparaffinierung**

Zur vollständigen Entparaffinierung wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten in folgenden Lösungen bei RT inkubiert:

Xylol:	2x 5 min
Isopropanol:	2x 5 min
Ethanol-Reihe:	96%, 70%, 50% jeweils 3 min
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> :	5 min

#### **2.3.3.7. Übersichtsfärbungen**

##### *2.3.3.7.1. Hämatoxylin & Eosin (HE) Färbung*

Als gebräuchlichste Übersichtsfärbung gilt die HE Färbung. Hämatoxylin (hier: Eisenlack) ist ein bei niedrigem pH Wert positiv geladener Farbstoff, welcher negativ geladene Strukturen anfärbt. Eosin ist ein negativ geladener Farbstoff und dient zur Gegenfärbung. Es wurden die entparaffinierten Schnitte zunächst für 5 min mit Hämatoxylin gefärbt, 1 min in Leitungswasser gewaschen und 10 sec in 1% Salzsäure in Ethanol (70%) differenziert. Danach wurde etwa 10 min unter fließendem Leitungswasser bis zur Entstehung einer Blaufärbung gewaschen und dann mit 1% Eosin für 5 min gegengefärbt. Zur Entwässerung folgte jeweils eine 2 minütige Inkubation in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 90%, 96%), Isopropanol sowie Xylol. Die Präparate wurden in Entellan (Sigma) eingedeckt. Durch die HE Färbung erscheinen die Zellkerne blau-schwarz, das Zytoplasma blassrot, das Muskelgewebe rot, Knorpel bläulich, rote Blutzellen rot-orange und Bindegewebe rot bis blassrosa-rot.

#### 2.3.3.7.2. *Safranin O / Fast Green Färbung*

Safranin O (3,7-Diamino-2,8-dimethyl-5-phenyl-phenaziniumchlorid) ist ein wasserlöslicher, positiv geladener Farbstoff und gehört zu den sog. Azinfarbstoffen (metylierte 5-Aryldiaminophenazine). Es wird zur Detektion von PFA fixierten, in Paraffin eingebetteten Knorpelschnitten verwendet. Die entparaffinierten Schnitte wurden zunächst für 5 min mit Hämatoxylin gefärbt, 1 min in Leitungswasser gewaschen und 10 sec in 1% Salzsäure in Ethanol (70%) differenziert. Danach wurde etwa 10 min unter fließendem Leitungswasser bis zur Entstehung einer Blaufärbung gewaschen und dann in 0,001% Fast Green Lösung für 5 min inkubiert. Es folgte eine Differenzierung in 1% Essigsäure für 10 sec und dann die Färbung in 0,1% Safranin O Lösung für weitere 5 min. Zur Entwässerung folgte jeweils eine 2 minütige Inkubation in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 90%, 96%), Isopropanol sowie Xylol. Die Präparate wurden in Entellan eingedeckt. Durch die Safranin O / Fast Green Färbung werden die Zellkerne blau-schwarz, der Knorpel rot-orange und der Hintergrund grau-grün gefärbt.

#### 2.3.3.7.3. *Alcian Blau / Kernechtrot Färbung*

Alcian Blau ist ein positiv geladener Farbstoff und wird zur Detektion von sauren, sulfatierten Glykosaminoglykanen in PFA fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben verwendet. Die entparaffinierten Schnitte wurden zunächst für 15 min mit Alcian Blau Lösung (pH 2,2) gefärbt und anschließend für 1 min in Leitungswasser gewaschen. Dann wurden die Schnitte für 10 sec in  $H_2O_{\text{dest}}$  getaucht, 5 min in 0,1% Kernechtrot Lösung gegengefärbt und erneut für 1 min in Leitungswasser gewaschen. Die Entwässerung erfolgte jeweils für 2 min in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 90%, 96%), Isopropanol und Xylol. Die Präparate wurden in Entellan eingedeckt. Durch die Alcian Blau / Kernechtrot Färbung werden die Zellkerne rosa-rot, das Zytoplasma blassrot und die stark sauren sulfatierten Bestandteile blau gefärbt.

#### 2.3.3.7.4. *von Kossa / Safranin O Färbung*

Die von Kossa Färbung dient zur Detektion von kalzifiziertem Knochengewebe. Die entparaffinierten Schnitte wurden zunächst für 45 min mit einer 2,5%igen Silbernitrat Lösung behandelt. Dabei wurden die Präparate UV oder starkem, hellen Licht ausgesetzt wodurch Kalziumablagerungen reduziert und durch Silberablagerungen ersetzt wurden. Anschließend wurde für 2x 10 min in  $H_2O_{\text{dest}}$  gewaschen und dann in einer 5%igen Natriumthiosulfat Lösung inkubiert. Nach 2x 10 min Waschen mit Leitungswasser erfolgte die Gegenfärbung

mit Safranin O für 5 min und die Entwässerung über eine aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 90%, 96%), Isopropanol sowie Xylol für jeweils 2 min. Die Präparate wurden anschließend in Entellan eingedeckt. Durch die von Kossa / Safranin O Färbung werden Kalziumablagerungen im mineralisierten Knochen durch eine schwarze, Knorpel durch eine rot-orange Färbung sichtbar gemacht.

### **2.3.3.8. Immunhistochemische Färbungen**

#### *2.3.3.8.1. Immunfluoreszenz (IF) Färbungen von kultivierten primären Knorpelzellen*

Die IF Färbung erfolgte in Chamber Slides. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen 15 min in 2% PFA fixiert, 10 min in TritonX100 (0,25% in PBS) permeabilisiert und mit PBS gewaschen. Blockiert wurde 1 h in 2% Ziegen-Normalserum (*normal goat serum*, NGS). Anschließend wurden die Zellen für 3 h bei RT mit den entsprechenden Primärantikörpern inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurde für zwei Stunden mit fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern inkubiert und eine 2 minütige Kernfärbung mit Bisbenzimidin (f.c.: 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durchgeführt. Die Zellen wurden mit Eindeckmedium (Dako Mounting Medium) eingedeckelt und mikroskopisch analysiert.

#### *2.3.3.8.2. IF Färbungen und immunhistochemische Färbungen von Gewebe Paraffinschnitten*

Zur Detektion verschiedener Knorpelproteine in skeletalen Geweben wurden die Paraffinschnitte auf den Objektträgern zunächst mit einem Fettstift (Dako) umrandet. Es folgte ein Verdau des Gewebes zunächst mit Hyaluronidase (500  $\text{U}/\text{ml}$ , 45 min, 37°C) und anschließend mit Proteinase K (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10 min, 55°C). Dann wurde das Gewebe für 10 min in 4% PFA fixiert und anschließend die unspezifischen Bindungsstellen durch Blockieren in 10% NGS (45 min, RT) abgesättigt. Die Inkubation des Primärantikörpers, welcher in 5% NGS Lösung verdünnt wurde, erfolgte für 3 h bei RT. Die Präparate wurden dann 3x mit TBS gewaschen und je nach Färbemethode weiterbehandelt.

#### 2.3.3.8.3. *Fluoreszenz*

Die Paraffinschnitte wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Sekundärantikörpern inkubiert (1 h, RT). Die Verdünnung des Sekundärantikörpers erfolgte in 2% NGS. Danach wurden die Schnitte 4 min in Bisbenzimidin (f.c.: 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) inkubiert, 3x mit TBS gewaschen, kurz mit H<sub>2</sub>O gespült, luftgetrocknet und mit Eindeckmedium (Dako Mounting Medium) eingedeckelt und mikroskopisch analysiert.

#### 2.3.3.8.4. *Peroxidase*

Nach Inkubation mit einem Primärantikörper erfolgte eine Inkubation mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper für 1 h bei RT. Die Detektion erfolgte entweder durch Oxidation von AEC (3-**A**mino-9-**E**thyl**C**arbazol) unter Bildung eines rötlich-braunen Farbstoffes oder von „True Blue“ eines auf TMB (3,3',5,5'-**T**etramethyl**b**enzidin) basierenden Reagenzes unter der Bildung eines hellblauen Farbstoffes.

#### **Hyaluronidase Puffer**

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

100 mM NaAc

pH 5,0

#### **Proteinase K Puffer**

50 mM TrisHCl

1 mM EDTA

pH 7,4

## **2.3.4. Morphometrische Analysen**

### **2.3.4.1. Messung von Länge und Körpergewicht**

Für die Messung der Länge der Mäuse wurden diese nach Genickbruch mit angewinkelten Extremitäten auf den Bauch gelegt. Die Länge des Tieres wurde von der Nasenspitze bis zum Anus erfasst. Die Körpermasse wurde mit einer Feinwaage gemessen.

### **2.3.4.2. Skelettfärbung (Alcian Blau / Alizarin Rot Färbung)**

Für eine Detektion skeletaler und knorpeliger Strukturen wurde die Alcian Blau / Alizarin Rot Färbemethode verwendet. Alle Schritte wurden bei RT auf einem Schüttler durchgeführt. Die entnommenen Gewebeproben wurden zunächst für 4 Tage in 95% Ethanol fixiert. Danach erfolgte eine Inkubation in Alcian Blau Färbelösung für 3 Tage. Die Probe wurde dann für 6 h in Ethanol überführt und anschließend das Gewebe in einer 2% KOH Lösung über Nacht gelöst. Es folgte eine Inkubation in einer Alizarin Rot Färbelösung für einen Tag. Danach wurde das Gewebe für 6 h in einer 1% KOH Lösung gewaschen und dann in einer 1% KOH/20% Glycerol Lösung bis zur gewünschten Farbentwicklung inkubiert. Abschließend wurde die Probe in eine 50%Glycerol/50%EtOH Lösung überführt, fotografiert und gelagert. Durch die Alcian Blau / Alizarin Rot Färbung wird Knorpelgewebe blau und Knochengewebe rot angefärbt.

#### **Alcian Blau Lösung**

0,03% Alcian Blau

80% Ethanol

20% Essigsäure

#### **Alizarin Rot Lösung**

0,03% Alizarin Rot

1% KOH

H<sub>2</sub>O

### **2.3.4.3. Röntgenuntersuchung**

Die Tiere wurden mittels Ketavet narkotisiert. Die Röntgenaufnahmen wurden unter Leitung von Dr. Michael Wicht von den Mitarbeiterinnen der Kölner Zahnklinik erstellt. Die Aufnahme erfolgte bei einer Spannung von 44 kV unter Verwendung eines Dentus Ortholux Film (Agfa) in einer X-Omatic Kassette.

#### **2.3.4.4. Periphere quantitative Computertomographie (pQCT)**

Zur Untersuchung der Femora mittels pQCT wurde das Gerät XCT Research SA (Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim, Deutschland) verwendet. Die mittlere Röhrenenergie betrug 37 keV mit einer Energieverteilung von 18 keV (FWHM) nach Filterung. Der Sanner (maximale axiale Weglänge: 170 mm, zentrale Durchtrittsöffnung: 90 mm) basiert auf dem Translations-Rotations-Prinzip mit einem Schnitt. Ein Detektorgehäuse mit 12 Detektoren umkreiste das zu messende Femur. Nach jedem Scan wurde das Messsystem um 13° gedreht (der Winkel zwischen zwei Projektionen beträgt 1°). Nach den 15 CT-Scanpositionen ergaben sich somit 180 Winkelschnitte, die für die Berechnung des CT-Bildes ausgewertet wurden. Beim CT-Scan war die Probe horizontal mit der anterioren Seite nach oben in einer Plastikspritze splaziert, die mit 0.9 % NaCl gefüllt war. Der Messstrahl durchquerte den Knochen quer zur Knochenachse. Durch einen Übersichtsscan (*scout view*) der kompletten Probe konnten die drei Scanpositionen an der Metaphyse (15 %, 17.5 % und 20 % der Gesamtknochenlänge; gemessen von der distalen Gelenklinie) und ein Schnitt an der Diaphysenmitte (50 % der Knochenlänge) festgelegt werden.. Die Schnittdicke betrug 500 µm mit einer Pixelauflösung von 70 µm × 70 µm. Die Knochenmineraldichte wurde aus der Schwächung der Röntgenstrahlung beim Durchgang durch das durchstrahlte Gewebe bestimmt. Um eine quantitative Aussage über den Knochenmineralgehalt machen zu können, wurde der Computertomograph vor der Messung mit Knochenmineralstandards (Hydroxylapatit) kalibriert. Die Bilddaten wurden mit der Software (Version 5.4) des Herstellers analysiert. Jeder Schnitt wurde mit dem Konturmodus 1, Abschälmodus 20 (30 %) und Kortikalismodus 1 (710 mg/cm<sup>3</sup>) ausgewertet. An der Metaphyse des Femurs wurden die folgenden Parameter als Mittelwert aus den drei gemessenen Schnitten bestimmt: Gesamtknochenquerschnittsfläche (total cross sectional bone area, CSA, mm<sup>2</sup>), Gesamtknochendichte (total bone mineral density, BMD, mg/cm<sup>3</sup>), Gesamtknochenmineralgehalt (total bone mineral content, BMC, mg), trabekuläre Knochenquerschnittsfläche (trabecular cross sectional area, Tb.CSA, mm<sup>2</sup>), trabekuläre Knochendichte (trabecular BMD, Tb.BMD, mg/cm<sup>3</sup>) und trabekulärer Knochenmineralgehalt (trabecular BMC, Tb.BMC, mg). Durch den Schnitt an der Diaphyse wurde die kortikale Knochenquerschnittsfläche (cortical area, Ct.CSA, mm<sup>2</sup>), die kortikale Knochendichte (cortical BMD, Ct.BMD, mg/cm<sup>3</sup>), der kortikale Knochenmineralgehalt (cortical BMC, Ct.BMC, mg), die kortikale Dicke (cortical thickness, Ct.thickness, mm), der periosteale Umfang (periosteal circumference, mm) und der endosteale Umfang (endosteal circumference, mm) ermittelt.

### **2.3.4.5. Elektronenmikroskopie**

Zur Darstellung von Zellen der Wachstumsfuge im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) (Leo 906E Zeiss) wurden die Proben wie folgt vorbereitet und zur weiteren Analyse zu Dr. Nicolai Miosge ins Zentrum für Anatomie (Abtl. Histologie, Universität Göttingen) geschickt.

Tibia Epiphysen von Kontroll- und transgenen Tieren wurden präpariert und für 1 Stunde bei 4°C in Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeprobe 10 Minuten in 0,15 M Sörensen Puffer gewaschen und danach für mindestens 1 Woche in einer 0,5 M EDTA Lösung entmineralisiert.

Die Proben wurden so nach Göttingen verschickt, wo sie dann erst 90 Minuten osmiert und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert wurden. Vor der Einbettung in Epon wurden sie zunächst zweimal für 15 Minuten in Propylenoxid bei 4°C und 1 Stunde in einem Gemisch aus Propylenoxid und Epon (1:1) inkubiert. Dann folgte eine Inkubation für Stunden in einem Epon/Propylenoxid Gemisch (3:1). Nach Einbettung der Proben in Epon bei 60°C für 24 Stunden wurden diese geschnitten und elektronenmikroskopisch analysiert.

#### **Fixierlösung**

#### **Sörensen Puffer**

	<b>Lösung A (18,2 ml)</b>	<b>Lösung B (81,8 ml)</b>
3% Paraformaldehyd	41,37 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	42,58 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
3% Glutaraldehyd	add 1000 ml H <sub>2</sub> O	add 1000 ml H <sub>2</sub> O
0,15 M Sörensen	Lagerung bei 4°C	Lagerung bei RT

## 2.4. Auswertung

### 2.4.1. Quantifizierung mittels Phosphor Imager Technologie

Die radioaktive Emission der Membran mit  $^{32}\text{P}$  hybridisierter gDNA bzw. die getrockneten SDS-Gele mit  $^{35}\text{S}$  markierten Proteinen wurden mit einem „Phosphor Imager“ detektiert. Die BaFBr:Eu-Kristalle des beschichteten Schirms („storage imager screen“) wurden durch die Emission der radioaktiven Isotope in einen angeregten, stabilen Zustand ( $\text{Eu} \rightarrow \text{Eu}^{2+}$ ) versetzt. Das Auslesen wurde mit Hilfe eines Scanners durchgeführt. Hierbei tastet ein Laserstrahl die Kristalle auf dem Schirm ab und versetzt diese in einen erhöhten angeregten und instabilen Zustand ( $\text{Eu}^{2+} \rightarrow \text{Eu}^{3+}$ ). Fallen die Elektronen in ihren Grundzustand zurück ( $\text{Eu}^{3+} \rightarrow \text{Eu}$ ), kann die abgegebene Lichtenergie detektiert und im Phosphor Imager Scanner (Molecular Dynamics) gemessen und mit dem Programm Image Quant densitometrisch ausgewertet werden.

### 2.4.2. Mikroskopie

Zur mikroskopischen Analyse wurde das konfokale Laser Scanning Mikroskop von Leica (TCS SL) und das Axiophot von Zeiss verwendet. Das konfokale Laser Scanning Mikroskop ist mit einer Kombination aus einem Argon und einem Helium Laser ausgestattet, wodurch eine Detektion im Bereich von 400 bis 850 nm möglich ist. Durch die Verwendung spezifischer Filter konnten am Axiophot die Emission des mit dem Alexa488 (Abs: 495nm / E: 519 nm) oder Cy3 (Abs: 553nm / E: 575 nm) Fluorophor gekoppelten Sekundärantikörpers detektiert werden.

### 2.4.3. Computeranalyse

Die Auswertung der gewonnenen Daten aus der DNA Sequenzierung erfolgte mit dem Programm *Chromas*. Die in silico Analysen der auf DNA basierenden Daten wurde mit dem Programm *OMIGA* erstellt. Zur Auswertung der mit der Phosphor Imager Technologie erhaltenen Daten und anderen densitometrischen Analysen diente das Programm *Image Quant*. Die Bildinformationen am Zeiss Mikroskop wurden über das Programm *Meta Morph* bearbeitet; die Überlagerung der Doppel-Immunfluoreszenz Aufnahmen wurde in dem Programm *Adobe Photoshop* erstellt.

# III Ergebnisse

## 1. Transgene Konstrukte und ihre Expression im Zellkulturmodell

### 1.1. Primäre bovine und murine Knorpelzellen

#### 1.1.1. Isolierung und Kultur

Im Zellkulturmodell wurden primäre Knorpelzellen verwendet, die entweder frisch aus dem artikulären Knorpel des Schultergelenks eines Schlachtrindes oder den Sterni neugeborener Kontroll- bzw. COMP defizienter Mäuse gewonnen wurden.

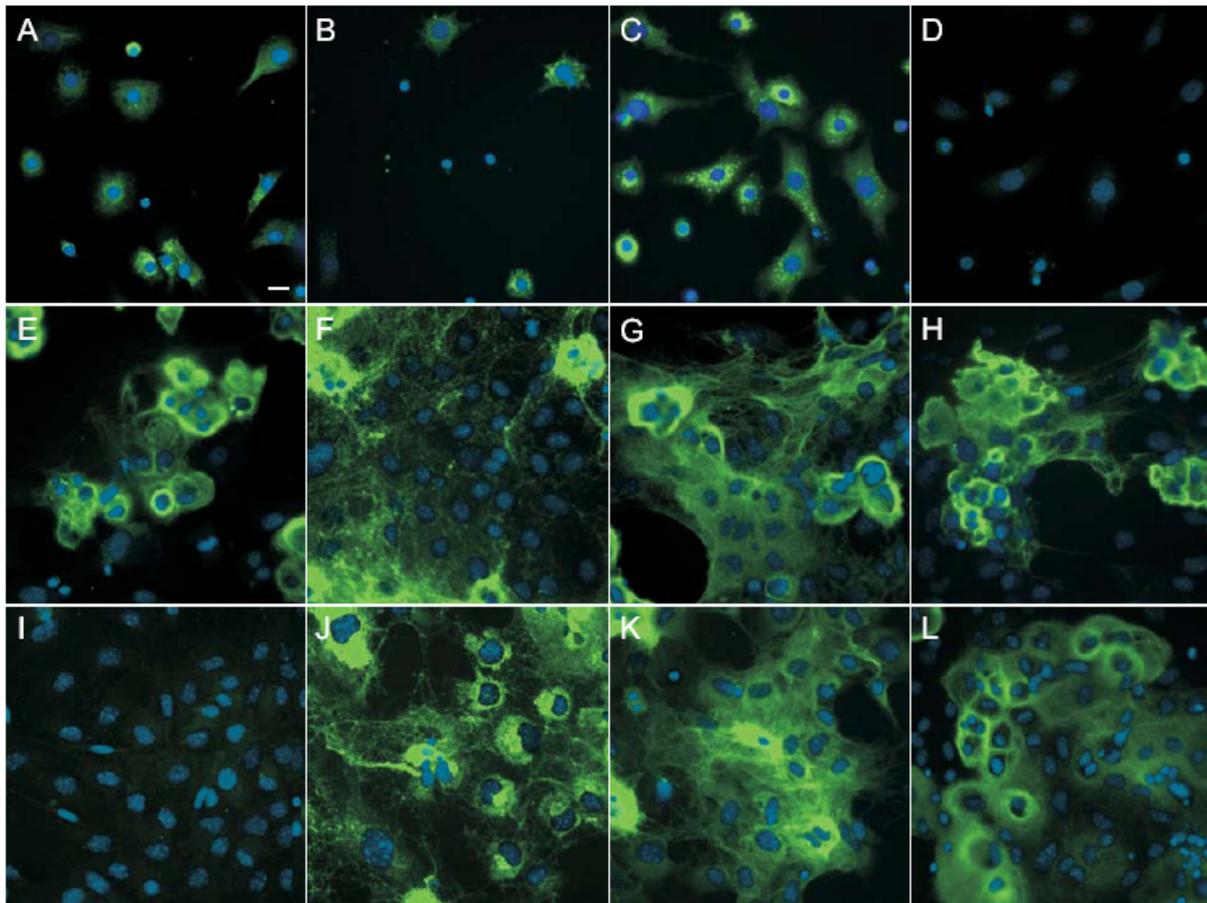
Die Zellen wurden durch einen Collagenase P Verdau aus ihrem Gewebeverband isoliert und unter Standardbedingungen im Begasungsbrutschrank in speziellen Kammersystemen als zweidimensionale Zellrasen (Monolayer) kultiviert. Durch die Zugabe von Ascorbat wurde die Bildung einer kollagenhaltigen extrazellulären Matrix unterstützt. Die Zellen wurden nie länger als zwei Wochen kultiviert, um eine Dedifferenzierung zu verhindern.

Sowohl die bovinen als auch die murinen Knorpelzellen exprimierten knorpelspezifische Markerproteine wie beispielsweise COMP, Kollagen Typ II und Kollagen Typ IX sowie Aggrecan (nicht gezeigt) oder Matrilin-3 (Abbildung III 1). Die Matrilin-3 Expression war in den adulten bovine Zellen deutlich schwächer als in den murinen Zellen aus neugeborenen Mäusen. Die murinen Knorpelzellen besitzen im Vergleich zu den bovinen Zellen zudem ein größeres Potential zur Ausbildung kollagener Netzwerke.

#### 1.1.2. Transfektion und Überexpression von COMP Konstrukten

Für eine episodale Expression von his<sub>6</sub>-myc markierten Wildtyp und mutierten COMP Konstrukten zur Untersuchung der Sekretionskinetik bzw. subzellulären Lokalisation, wurde das nicht liposomale Transfektionsreagenz FuGENE 6 (Roche) verwendet. Damit konnten die Konstrukte mit einer Effizienz von etwa 20% in die Zellen eingeschleust werden. Der im

pCEP-pu Vektor verwendete CMV Promotor fördert eine starke Überexpression der COMP Varianten in den Zellen.



**Abb. III 1: Charakterisierung von bovinen und murinen Knorpelzellen mittels Immunfluoreszenzfärbung von knorpelspezifischen Proteine**

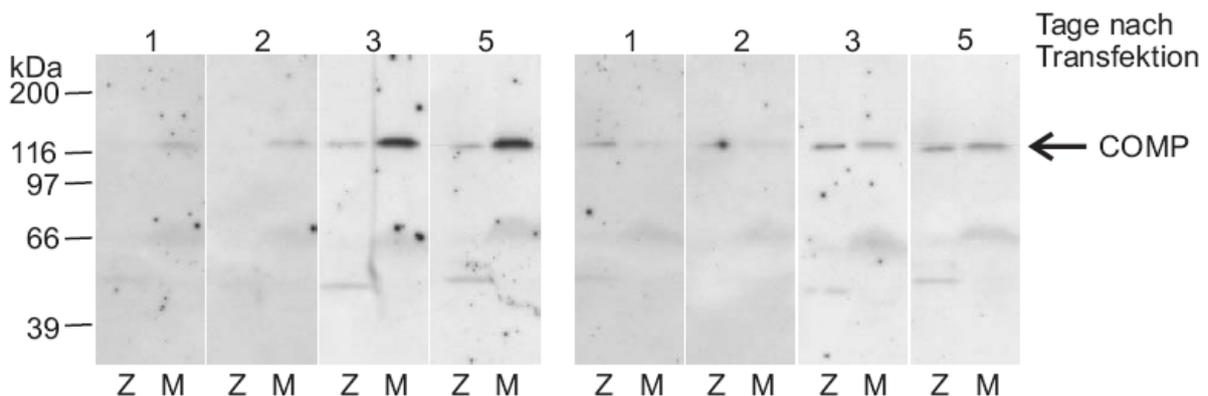
Vergleich der Expression von COMP (A, E und I), Kollagen Typ II (B, F und J), Kollagen Typ IX (C, G und K) und Matrilin-3 (D, H und L) in bovinen Knorpelzellen (A-D), murinen Zellen aus Kontrolltieren (E-H) und murinen Knorpelzellen aus COMP defizienten Tieren (I-L). Die Fluoreszenz des Alexa488 gekoppelten Sekundärantikörpers (grün) wurde am Axiophot (Zeiss) detektiert. Die Zellkerne wurden mit Bisbenzimidin gefärbt (blau). Maßstab: 2,5  $\mu\text{m}$ .

Zur Analyse der Sekretionskinetik wurde das bovine Zellsystem gewählt. Neben dem Nachweis der gewünschten knorpelspezifischen Proteinexpression ließ die verminderte Netzwerkbildung eine genaue Unterscheidung zwischen sekretiertem COMP im Medium und intrazellulärem COMP im Zellrasen zu. Zur Untersuchung der Lokalisation von extrazellulärem COMP wurde das murine Zellsystem genutzt, das aufgrund des Potentials zur Netzwerkbildung eine kollagenhaltige Matrix aufweist.

## 1.2. Sekretionskinetik und Lokalisation von transgenem COMP

### 1.2.1. Sekretionskinetik

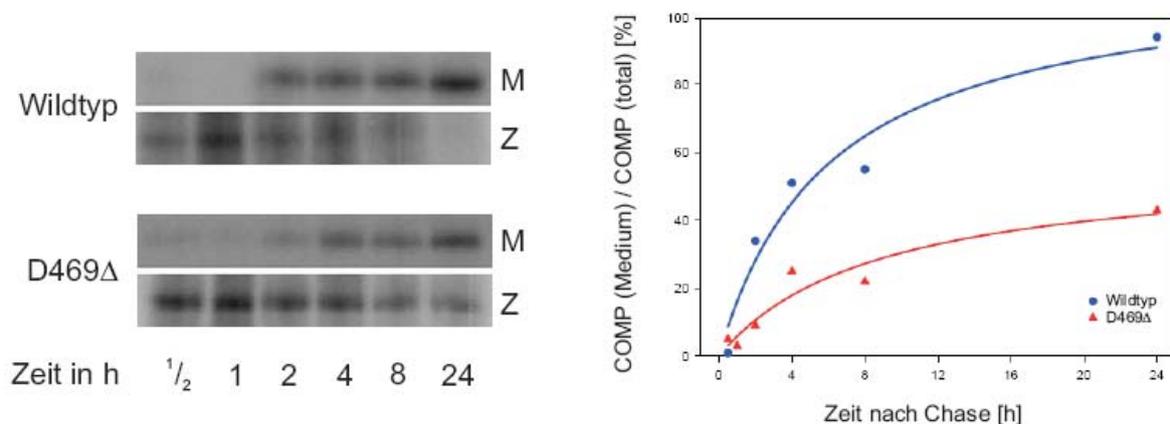
In einer früheren Arbeit (Schmitz, 2002) konnte gezeigt werden, dass mutiertes COMP (D469 $\Delta$ ) im Vergleich zu Wildtyp COMP eine unterschiedliche intra- und extrazelluläre Verteilung aufweist. His<sub>6</sub>-myc markierte COMP Konstrukte wurden in bovine Knorpelzellen transfiziert. Die Verteilung von COMP im Medium bzw. im Zellrasen wurde ein, zwei, drei und fünf Tage nach Transfektion analysiert. Die Detektion erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben in einer reduzierenden SDS-PAGE und anschließendem Western Blot mit einem gegen das myc Epitop gerichteten Antikörper. Wildtyp COMP sammelt sich nach mehreren Tagen im Kulturmedium an. Bereits in den ersten zwei Tagen konnte Wildtyp COMP nur im Medium detektiert werden. Nach fünf Tagen wurde der größte Anteil extrazellulär nachgewiesen, was eine kontinuierliche Sekretion des Proteins demonstriert. Dagegen ist in den Zellen, die die Mutante D469 $\Delta$  exprimieren, eine Veränderung der Verteilung zu erkennen. Mutiertes COMP wurde kaum in das Medium sekretiert, und das Verteilungsverhältnis lag mehr auf Seiten des Zellen-Lysats. Mit fortschreitender Zeit wurde die Bande im Zellen-Lysat noch stärker. Nach 5 Tagen zeigten sich in Medium und Zellrasen vergleichbare Signale. Die Sekretion der Mutante scheint im Vergleich zum Wildtyp verzögert zu sein.



**Abb. III 2: Verteilung von COMP in bovinen Zellen nach Transfektion**

Bovine Knorpelzellen wurden mit Wildtyp COMP (links) und D469 $\Delta$  COMP (rechts) transfiziert und kultiviert. Nach jeweils 1, 2, 3 und 5 Tage wurden Medium (M) und Zellrasen (Z) geerntet. Transgenes COMP konnte nach reduzierender SDS-PAGE und anschließendem Western Blot mit einem Antikörper gegen das myc Epitop detektiert werden. Der Pfeil markiert die Laufhöhe der COMP Monomere. Die COMP Konstrukte zeigten eine unterschiedliche intra- und extrazelluläre Verteilung. Wildtyp COMP wird kontinuierlich in das Medium sekretiert. Die Sekretion von mutiertem COMP scheint verzögert und ist zu gleichen Teilen sowohl im Medium als auch im Zellrasen detektierbar.

Um diese Retention genauer zu untersuchen und zu quantifizieren, wurde das Experiment erweitert. Zur Analyse der Sekretionskinetik wurde ein Pulse Chase Experiment durchgeführt. Die transfizierten Zellen wurden zunächst für zwei Stunden in Cys/Met-freiem Mangelmedium kultiviert und anschließend für weitere zwei Stunden mit einem  $^{35}\text{S}$  markierten Cys/Met-Mix inkubiert [PULSE]. Dann wurde das radioaktive Medium abgenommen und durch Vollmedium ersetzt [CHASE]. Die Kinetik der neusynthetisierten, radioaktiven COMP Varianten wurde durch die Ernte des Kulturmediums und des Zellrasens zu definierten Zeitpunkten ( $1/2$ , 1, 2, 4, 8, 24 Stunden nach CHASE) untersucht. Die Resultate sind in der Abbildung III 3 dargestellt.



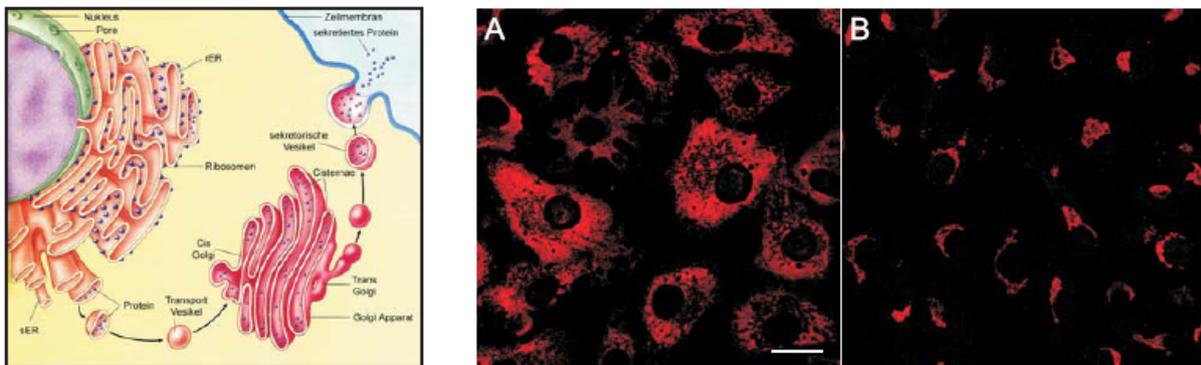
### **Abb. III 3: Quantifizierung der Sekretionskinetik**

Die Kinetik der Sekretion von Wildtyp und mutiertem COMP wurde durch ein Pulse Chase Experiment in einem definierten Zeitintervall ermittelt. Nach Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen das myc Epitop wurde das sekretierte COMP (M: Medium) und das intrazelluläre COMP (Z: Zellrasen) in einer reduzierenden SDS-PAGE aufgetrennt. Die Quantifizierung wurde mit dem Programm Image Quant durchgeführt. Aufgetragen wurde die sekretierte extrazelluläre Menge COMP im Verhältnis zur gesamten COMP Menge in Prozent gegen die Zeit in Stunden. Das Experiment zeigte, dass die Wildtyp COMP Variante kontinuierlich in das Medium sekretiert wurde, wobei gleichzeitig die COMP Menge in den Zellen abnimmt. Nach 24 Stunden waren so etwa 90% des Wildtyp Proteins im Medium vorzufinden. Im Vergleich dazu zeigte die D469Δ COMP Variante einen deutlichen Unterschied. Im gleichen Zeitraum wurden nur etwa 40% in das Medium sekretiert. Gleichzeitig konnte mutiertes COMP auch nach 24 Stunden noch intrazellulär nachgewiesen werden.

Dieses Experiment bestätigte das Ergebnis aus der vorangegangenen Western Blot Analyse (s. Abb III 2). Die Wildtyp Variante zeigte innerhalb von 24 Stunden eine nahezu vollständige Sekretion (~90%) des neusynthetisierten und markierten Proteins in das Kulturmedium. Demgegenüber steht die PSACH verursachende COMP Variante D469Δ, die im gleichen Zeitraum in einer deutlich geringeren Menge (~40%) in das Medium sekretiert wird. Zudem konnte mutiertes COMP auch nach 24 Stunden noch in den Zellen nachgewiesen werden.

### 1.2.2. Subzelluläre Lokalisation

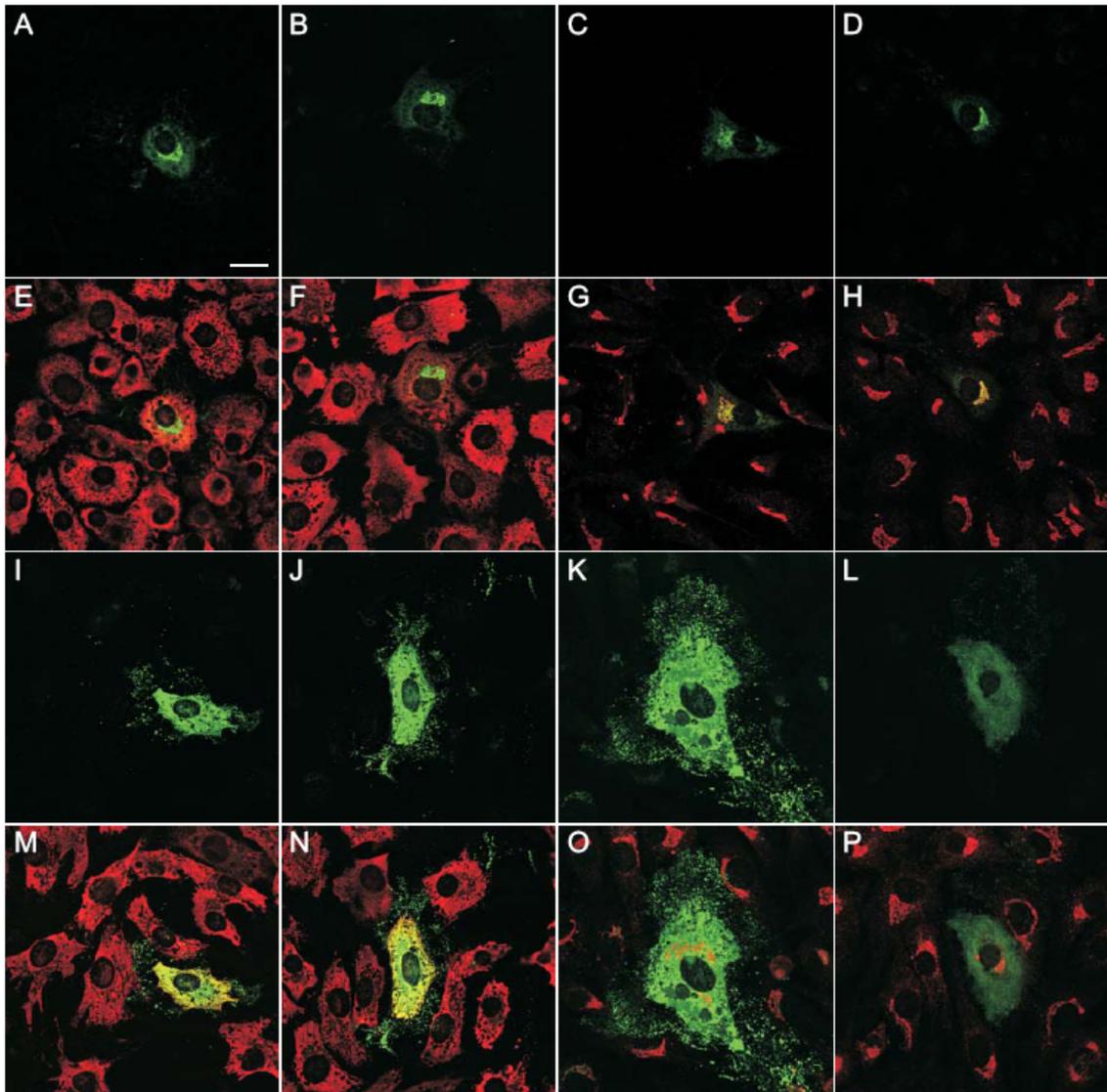
Zur Detektion der subzellulären Lokalisation der COMP Varianten wurden die Zellen zwei Tage nach Transfektion fixiert und mit spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Analyse erfolgte am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Leica). Zur Unterscheidung zellulärer Kompartimente wurden Antikörper gegen Markerproteine des endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Golgi Apparats eingesetzt. In der Abbildung III 4 sind die Immunfluoreszenzfärbungen dieser beiden für die Sekretion relevanten Kompartimente in bovinen Knorpelzellen gezeigt.



**Abb. III 4: Immunfluoreszenzfärbung von ER und Golgi Apparat**

Die Zeichnung illustriert den Weg eines Sekretionsproteins durch das ER über den Golgi Apparat in den extrazellulären Raum. In bovinen Knorpelzellen wurde die Proteindisulfidisomerase (PDI) als Marker für das ER (A) und das 58K Protein als Marker für den Golgi Apparat (B) eingesetzt. Beide Antikörper wurden mit einem Cy3 gekoppelten Sekundärantikörper detektiert (rot) und am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Leica) visualisiert. Das ER erstreckt sich nahezu über die gesamte Zelle, was die hohe Syntheseleistung einer Knorpelzelle reflektiert, die zur Herstellung einer hochfunktionellen ECM notwendig ist. Der Golgi Apparat ist als sichelförmige Struktur um den Zellkern herum zu erkennen. Maßstab: 2,5  $\mu\text{m}$

Zur Detektion der transgenen COMP Varianten wurde zusätzlich mit einem Antikörper gegen das myc Epitop inkubiert. Das Signal für Wildtyp COMP war zum größten Teil im Golgi Apparat erkennbar. Die COMP Variante D469 $\Delta$  zeigte hingegen eine Kollokalisierung mit dem ER Marker, nicht aber mit dem Golgi Marker. In der Abbildung III 5 sind die Immunfluoreszenzfärbungen der COMP Varianten in bovinen Knorpelzellen gezeigt. Das Ergebnis konnte in murinen Knorpelzellen, gewonnen aus Kontroll oder COMP defizienten Mäusen, reproduziert und bestätigt werden.

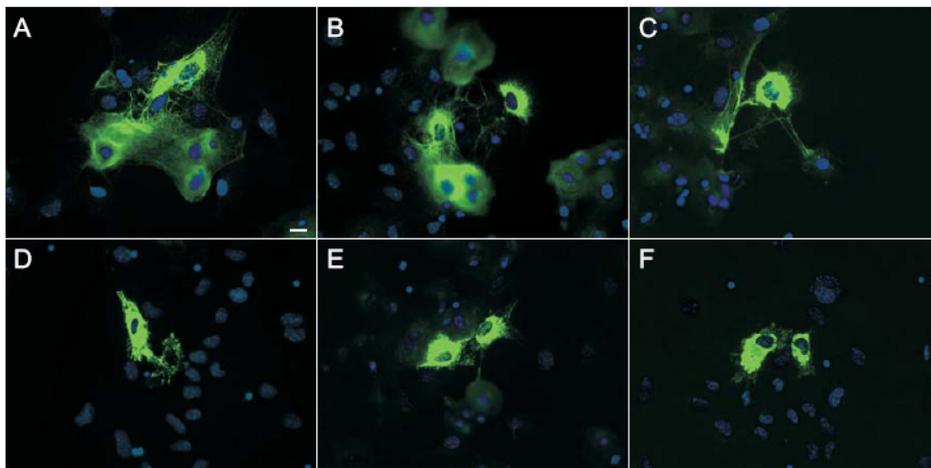


**Abb. III 5: Subzelluläre Lokalisation von transgenem COMP**

Bovine Knorpelzellen wurden mit der Wildtyp COMP (A-H) bzw. mutierten D469 $\Delta$  COMP Variante (I-P) transfiziert. Die Detektion erfolgte zwei Tage nach Transfektion mittels konfokalem Laser Scanning Mikroskop (Leica). Der Primärantikörpern gegen das myc Epitop der COMP Varianten wurde über einen Alexa488 gekoppelten Sekundärantikörper visualisiert [grün]. Die Primärantikörper, gerichtet jeweils gegen Markerproteine des ER (PDI: Proteindisulfidisomerase) und des Golgi Apparats (58K Protein), wurden mit einem Cy3 gekoppelten Sekundärantikörper visualisiert [beide jeweils rot]. Eine Kolokalisation ist durch die Überlagerung der Signale gekennzeichnet [gelb]. Wildtyp COMP ist nicht mit dem ER (E,F), aber mit dem Golgi Apparat (G,H) kolokalisiert. Mutiertes COMP ist mit dem ER (M,N), aber kaum mit dem Golgi Apparat (O,P) kolokalisiert. Maßstab: 2,5  $\mu$ m

### 1.2.3. Extrazelluläre Lokalisation

Zur Untersuchung der extrazellulären Lokalisation von Wildtyp und mutierten COMP Varianten wurden Knorpelzellen aus COMP defizienten Mäusen mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert. Da diese Zellen kein endogenes COMP exprimieren, konnte transgenes Wildtyp und mutiertes Protein mit einem Antikörper gegen COMP nachgewiesen werden. Die murinen Knorpelzellen bilden eine kollagenhaltige Matrix. Die Wildtyp COMP Variante konnte sowohl intrazellulär als auch in dem Kollagennetzwerk nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu konnte die mutierte COMP Variante vorwiegend intrazellulär nachgewiesen werden. Eine Assoziation mit der kollagenen Matrix war kaum nachweisbar.



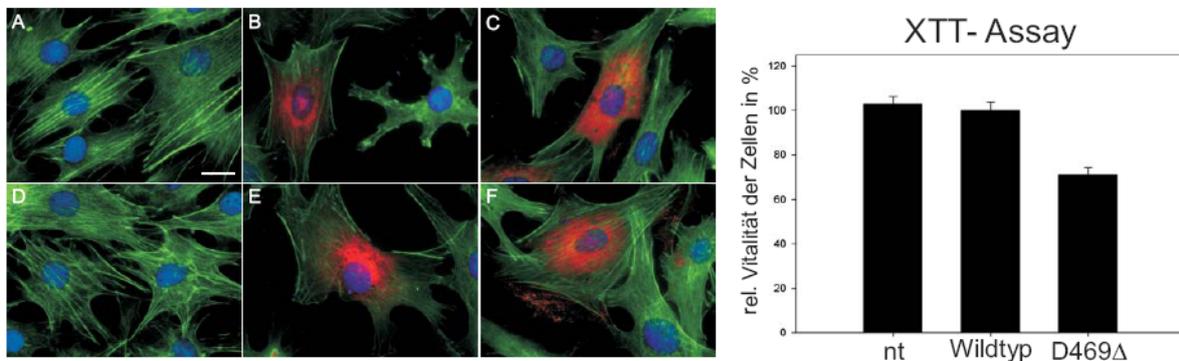
#### **Abb. III 6: Extrazelluläre Lokalisation von transgenem COMP**

Murine Knorpelzellen aus COMP defizienten Mäusen wurden mit dem Wildtyp (A-C) bzw. mutiertem (D-F) COMP Konstrukt transfiziert. Mittels Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gerichtet gegen COMP konnte die extrazelluläre Lokalisation zwei Tage nach Transfektion nachgewiesen werden. Die Fluoreszenz des Alexa488 gekoppelten Sekundärantikörpers wurde am Axiophot (Zeiss) visualisiert (grün). Die Zellkerne wurden mit Bisbenzimidin gefärbt (blau). Sekretiertes Wildtyp COMP ist mit einer extrazellulären Kollagenmatrix assoziiert. Der sekretierte Anteil der mutierten COMP Variante ist hingegen kaum in dieser Matrix nachweisbar. Maßstab: 2,5  $\mu\text{m}$

#### 1.2.4. Morphologie und Vitalität transfizierter Zellen

Die Morphologie transfizierter boviner Knorpelzellen, die COMP Varianten unter der Kontrolle des CMV Promotors überexprimieren wurde ebenfalls beobachtet und dokumentiert.

Dramatische morphologische Veränderungen konnten zwei Tage nach Transfektion nicht erkannt werden. So war beispielsweise die Architektur des Zytoskeletts in transfizierten Zellen vergleichbar mit der nicht transfizierter Zellen. Durch weitere Untersuchungen mittels Vitalitätstest (XTT-Assay) der gesamten Kulturen konnte jedoch eine leicht reduzierte Vitalität in Zellen nachgewiesen werden, die mutiertes COMP (D469 $\Delta$ ) exprimieren. Die Wildtyp COMP exprimierenden Zellen waren nicht beeinträchtigt und vergleichbar mit nicht transfizierten (nt) Kontrollkulturen.



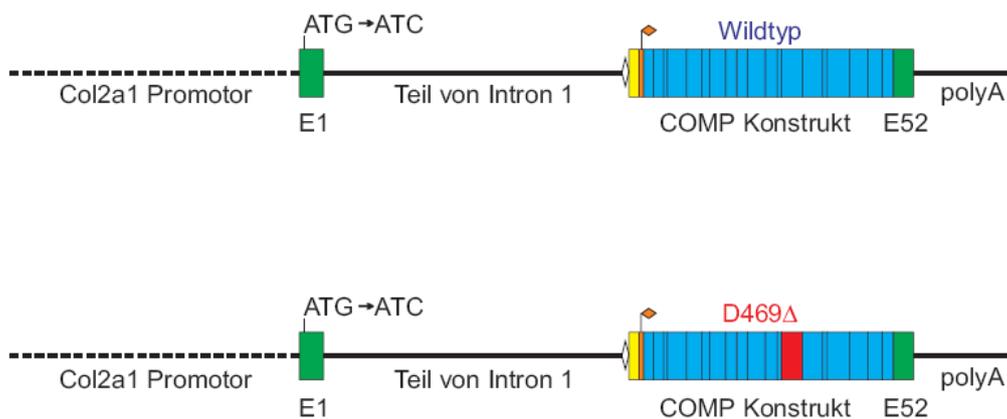
#### **Abb. III 7: Morphologie und Vitalität transfizierter boviner Knorpelzellen**

Bovine Knorpelzellen wurden mit Wildtyp (B und E) und mutiertem (C und F) COMP transfiziert. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte Zellen (A und D). Mittels Immunfluoreszenzfärbung mit einem FITC-konjugiertem Phalloidin konnte die Aktinstruktur zwei Tage nach Transfektion am Axiophot (Zeiss) visualisiert werden (grün). Transgene COMP Varianten wurden mit einem Antikörper gegen das myc Epitop detektiert. Die Fluoreszenz des Cy3 gekoppelten Sekundärantikörpers ist als rotes Signal in den Zellen erkennbar. Die Zellkerne wurden mit Bisbenzimidin gefärbt (blau). Die Architektur des Zytoskeletts in transfizierten bovinen Zellen ist nicht betroffen. Maßstab: 2,5  $\mu$ m. Mittels XTT-Assay (Diagramm rechts) wurde die Vitalität gesamt plasmidtransfizierter Kulturen getestet. Die Vitalität der Zellen die Wildtyp COMP exprimieren war vergleichbar mit nichttransfizierten (nt) Zellen. Zellen die die mutierte COMP Variante (D469 $\Delta$ ) exprimieren zeigten eine leicht reduzierte Vitalität.

### 1.3. Transgene Col2a1-COMP Konstrukte

#### 1.3.1. Herstellung der Col2a1-COMP Konstrukte

Für die knorpelspezifische Expression von transgenem Wildtyp und mutiertem COMP in der Maus wurden Konstrukte hergestellt, in denen his<sub>6</sub>-myc markierte COMP cDNAs aus der Ratte unter die Kontrolle der regulatorischen Region des Kollagen Typ II Gens der Maus kloniert wurden. Die Col2a1-wt-COMP und Col2a1-D469 $\Delta$ -COMP Konstrukte wurden während meiner Diplomarbeit am Institut hergestellt. Die knorpelspezifische Expression ähnlicher Col2a1 Konstrukte wurde bereits in Sakai et al. (2001) beschrieben. Dort wurden transgenen Mauslinien mit Cre Rekombinase (Cre) unter Kontrolle des Col2a1 Promoter Konstruktes hergestellt und charakterisiert. Das dort beschriebene Col2a1-Cre Konstrukt diente als Grundlage zur Herstellung der Col2a1-COMP Konstrukte.

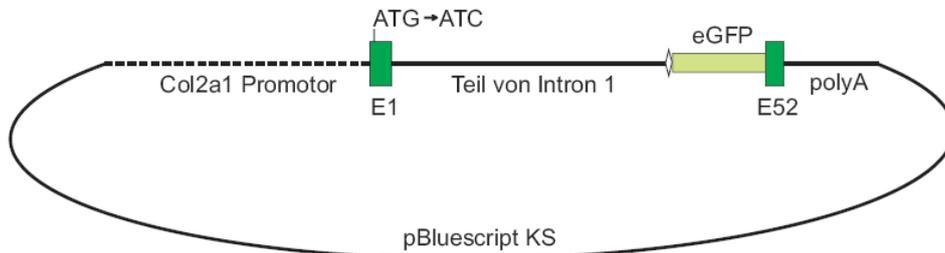


**Abb. III 8: Col2a1-COMP Konstrukte**

Für die knorpelspezifische Expression von myc markiertem Wildtyp (oben) und mutiertem (unten) COMP in Mäusen wurden die entsprechenden Konstrukte unter die Kontrolle der regulatorischen Region des Kollagen Typ II Gens der Maus kloniert. Das Transgen besteht aus der Col2a1 Promotor Region, dem Exon 1 mit einem mutierten Start Codon (ATG → ATC), einem Teil von Intron 1 mit einem Enhancer Motiv, einer Splicing Akzeptor Stelle gefolgt vom COMP Konstrukt mit BM40 Signalpeptid, his<sub>6</sub>-myc Signal und entsprechender cDNA. Abschließend liegt das Exon 52 sowie das Polyadenylierungssignal (polyA). Die Mutation D469 $\Delta$  liegt in Exon 13 von COMP, welches hier rot unterlegt ist.

### 1.3.2. Expressionskontrolle in MC615 Zellen

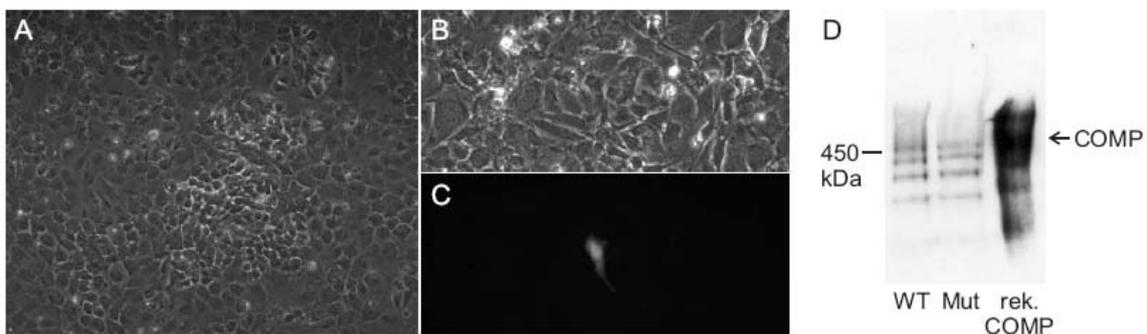
Zur Kontrolle der Funktionsfähigkeit der Promotorregion wurde zusätzlich ein Konstrukt mit der kodierenden Sequenz des *enhanced green fluorescence protein* (eGFP) kloniert.



**Abb. III 9: Col2a1-eGFP Konstrukt**

Als Test zur Funktionsfähigkeit der regulatorischen Region des Col2a1 Gens, wurde die codierende Sequenz des *enhanced green fluorescence protein* (eGFP) anstelle des COMP Konstruktes kloniert. Das im Vektor pBluescript KS enthaltene Transgen wurde in Kollagen Typ II exprimierende MC615 Zellen eingeschleust.

Die Funktionsfähigkeit der regulatorischen Region der Col2a1-COMP Konstrukte wurde vor der Herstellung transgener Mäuse in Zellen getestet. Dazu wurden das Col2a1-eGFP und die Col2a1-COMP Konstrukte in eine Knorpelzelllinie aus der Maus (MC615) transfiziert. Diese Zelllinie wurde aus embryonalen Extremitätenanlagen der Maus gewonnen (Mallein-Gerin et al., 1995). Die Zellen exprimieren knorpelspezifische Proteine wie z.B. Aggrekan sowie die Kollagene des Typs II, IX und XI. Diese spezifische Expression setzte allerdings erst ein, als die Zellen im Zellrasen konfluent gewachsen waren und Zellaggregate bildeten. Die Abbildung III 10 zeigt, wie innerhalb eines solchen Aggregates ein eGFP Signal detektiert werden konnte sowie den Nachweis von transgenem Wildtyp bzw. mutiertem COMP im Immunoblot.



**Abb. III 10: Nachweis von Col2a1-Konstrukten in transfizierten MC615 Zellen**

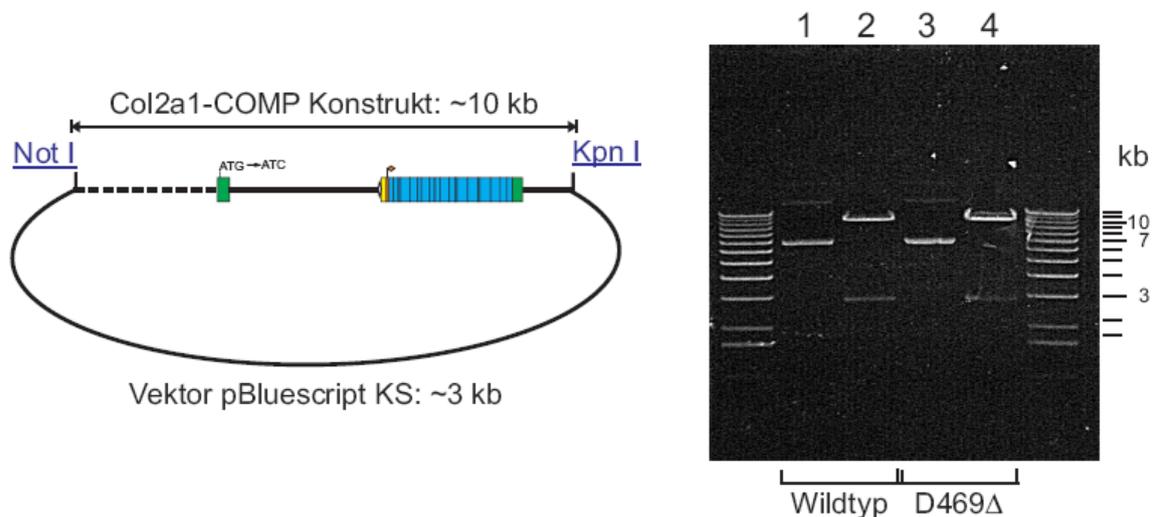
MC615 Zellen bilden nach Erreichen der Konfluenz Zellaggregate und exprimieren vor allem dort knorpelspezifische Proteine wie z.B. Kollagen Typ II (A). Zur Untersuchung ob das Transgen exprimierbar war, wurde ein Col2a1-eGFP in die Zellen eingeschleust. Die Transfektionseffizienz war sehr gering. Nach Transfektion der Zellen mit dem Konstrukt Col2a1-eGFP konnte in einzelnen Zellen (B) ein Fluoreszenzsignal (C) detektiert werden. Der Zellextrakt der Col2a1-COMP transfizierten Zellen wurde ebenfalls gesammelt und transgenes Wildtyp (WT) und mutiertes (Mut) COMP nach nicht-reduzierender SDS-PAGE und Western Blot mit einem myc Antikörper nachgewiesen (D).

## 2. Etablierung und Genotypisierung von transgenen Mauslinien

### 2.1. Herstellung transgener Mäuse

#### 2.1.1. Vorbereitung der Col2a1-COMP Konstrukte

In Rahmen dieser Arbeit wurde das Col2a1-wt-COMP und das Col2a1-D469 $\Delta$ -COMP in das Genom der jeweiligen Linien integriert. Vor der Mikroinjektion wurden die transgenen Konstrukte im Vektor pBluescript KS in Bakterien vermehrt. Danach wurde die Plasmid DNA isoliert und jeweils die Col2a1 Konstrukte mit einer Größe von etwa 10 kb durch die Restriktionsendonukleasen Kpn I und Not I aus dem Vektor geschnitten.

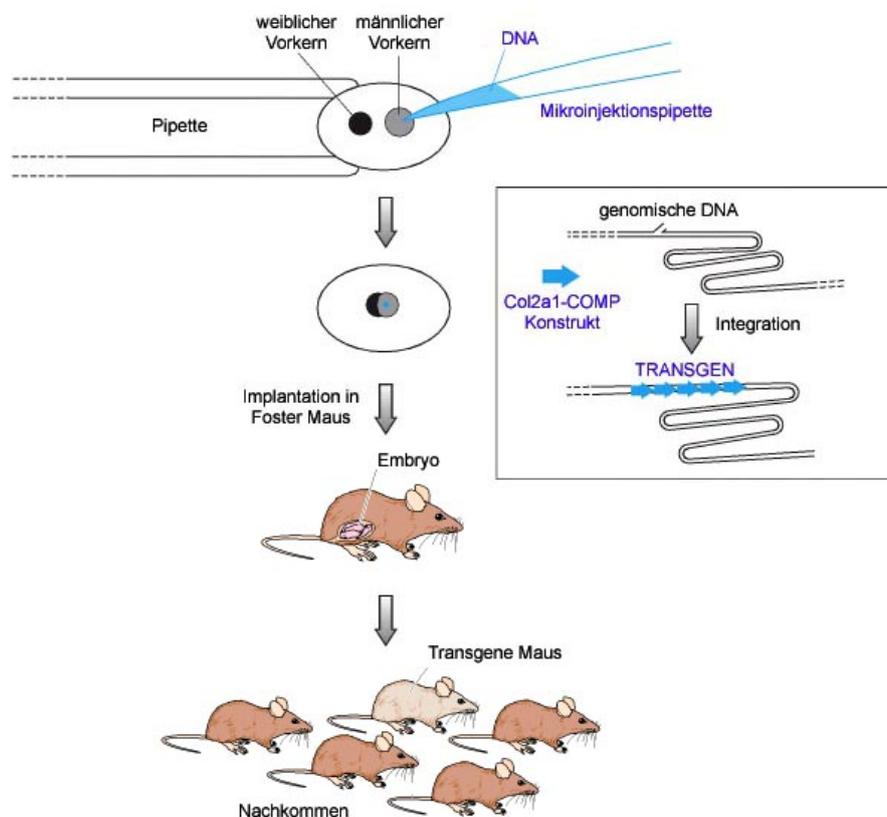


#### **Abb. III 11: Linearisierung der Col2a1-COMP Konstrukte**

Die Col2a1-COMP Konstrukte wurden in den Vektor pBluescript KS kloniert. Vor der Mikroinjektion erfolgte eine Linearisierung mit den Restriktionsenzymen Not I und Kpn I, wodurch Fragmente von 3 kb und 10 kb entstehen (Spur 2 und 4). Die Auftrennung der unverdauten Konstrukte mittels Agarosegelelektrophorese ergab neben der erwarteten Bande auch Banden für die superspiralisierte Form bei etwa 7 kb (Spur 1 und 4). Als Standard diente die 1 kb Leiter.

### 2.1.2. Mikroinjektion

Für die stabile Integration der transgenen DNA Konstrukte in das Mausgenom wurde das Verfahren der Mikroinjektion genutzt. Die Mikroinjektion wurde in der vorliegenden Arbeit von Wieslaw Krzyzak im Zentrum Biochemie durchgeführt. Jeweils 50 ng Plasmid DNA wurde dazu vorab linearisiert und gereinigt. Die DNA Lösung wurde in den männlichen Vorkern einer Oocyte injiziert. Die manipulierte Oocyte wurde dann in den reproduktiven Trakt einer scheinträchtigen Foster Maus (Amme) implantiert. Als Nachkommen wurden Foundertiere mit genetisch einheitlichen Zellen geboren, wovon einige das Transgen in die Keimbahn eingebaut hatten.

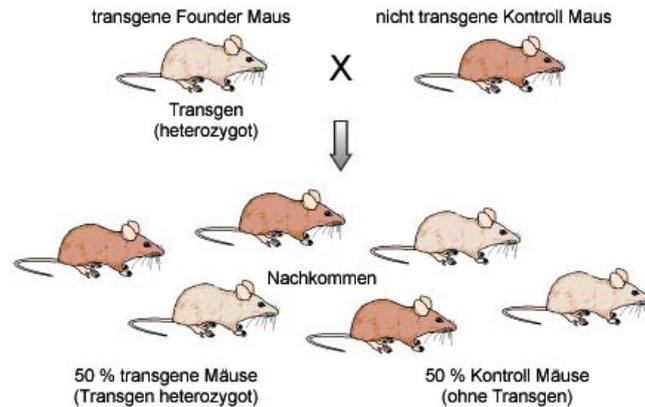


**Abb. III 12: Mikroinjektion zur Herstellung transgener Mäuse**

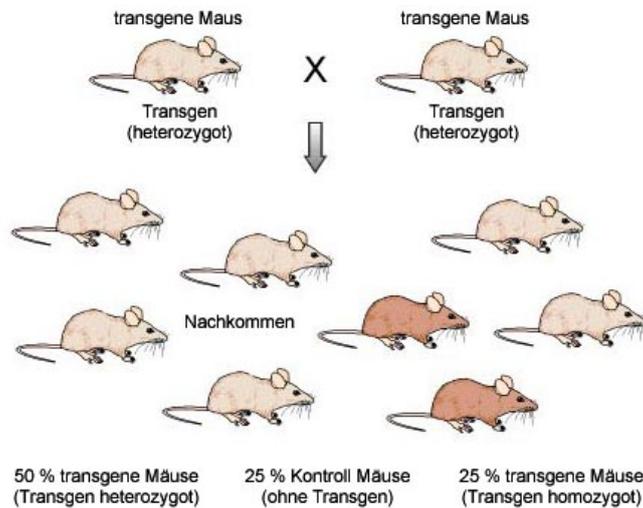
Das Schaubild zeigt die wesentlichen Schritte bei der Herstellung transgener Mäuse durch Mikroinjektion. Bei dieser Methode werden häufig viele Kopien tandemartig wiederholt ins Genom integriert. Der Integrationsort ist zufällig und nicht vorhersehbar. Um dem Positionseffekt entgegenzuwirken, wurden zunächst mehrere positive Founderlinien gesichert. Die beiden endgültigen Zuchtlinien zeichneten sich durch eine niedrige bzw. eine hohe Anzahl integrierter Kopien des Transgens aus.

### 2.1.3. Transgene Linien im genetischen Hintergrund des C57Bl/6 Stammes

Zum Aufbau und zur Sicherung der transgenen Stämme wurden die Foundertiere zunächst mit nicht transgenen C57Bl/6 Kontrolltieren verpaart, da sie denselben genetischen Hintergrund besaßen. Die Vererbung des Transgens folgte den Mendelschen Gesetzen.



Später wurden auch heterozygot transgene Tiere untereinander verpaart, um so homozygot transgene Mäuse zu erhalten, deren Nachkommen nur stichprobenweise auf Transgenität überprüft werden mussten.

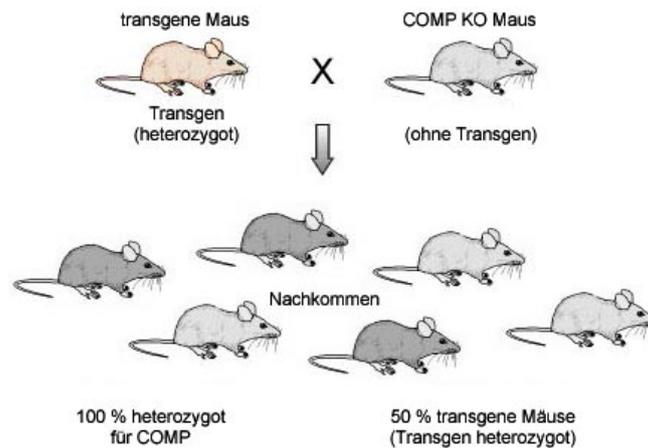


#### **Abb. III 13: Zuchtpläne Teil I (genetischer Hintergrund: C57Bl/6)**

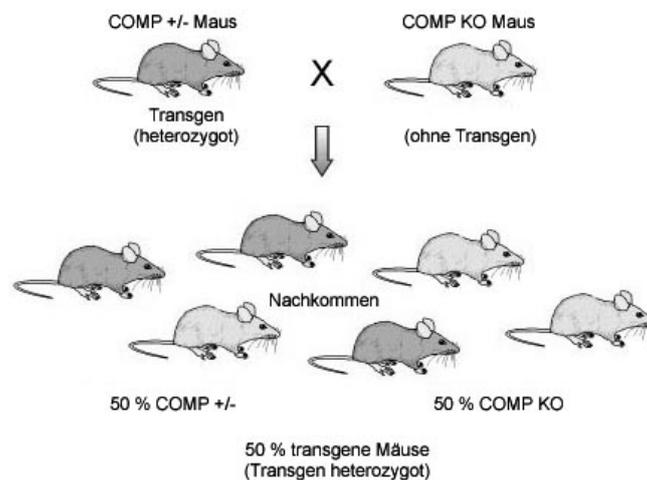
Nach den Mendelschen Vererbungsgesetzen sind in der Nachkommenschaft eines heterozygot transgenen Foundertieres und eines nicht transgenen Kontrolltieres 50% der Tiere heterozygot transgen. Die anderen 50% entsprechen dem nicht transgenen Kontrollhintergrund (Abb. oben). Bei der Verpaarung zweier heterozygot transgener Mäuse sind 25% der Nachkommen nicht transgen, von den 75% transgenen Mäusen sind 50% heterozygot transgen und 25% homozygot transgen (Abb. unten).

### 2.1.4. Transgene Linien mit COMP defizientem Hintergrund

Neben den oben genannten Stämmen wurden transgene Tiere auch mit COMP defizienten Mäusen verpaart. Die COMP Knockout Mäuse wurden von Å. Oldberg, Lund, Schweden, zur Verfügung gestellt (Svensson et al., 2002). Neben der Vererbung des Transgens war nun auch der Genotyp bezüglich des COMP Gens zu beachten.



Zur Herstellung transgener Mäuse im COMP defizienten Hintergrund wurde abschließend wie folgt verpaart.



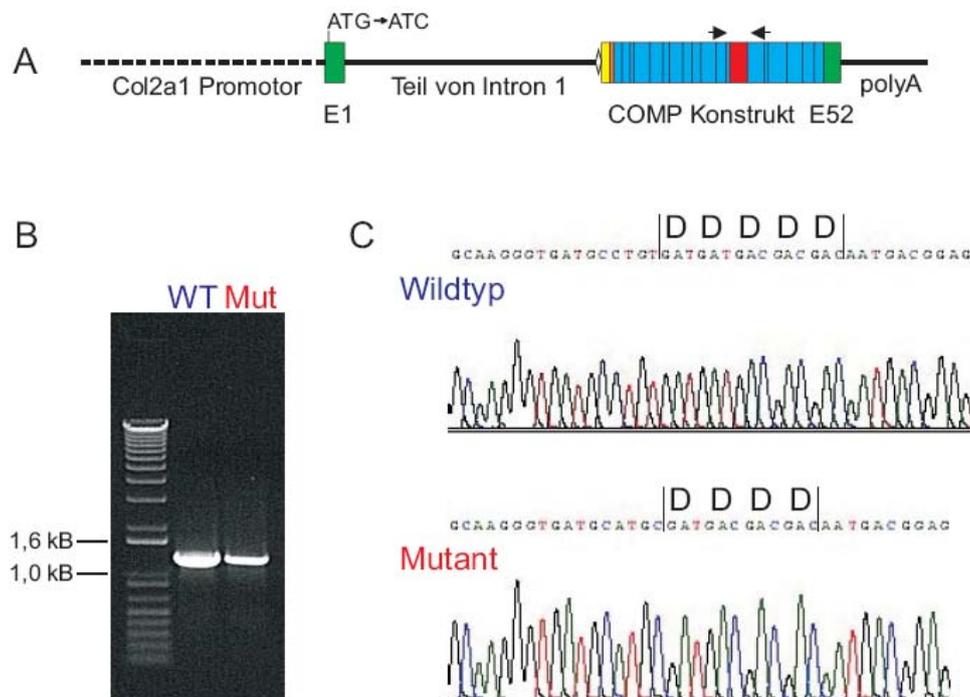
#### **Abb. III 14: Zuchtpläne Teil II (genetischer Hintergrund; COMP Knockout)**

Bei der Verpaarung einer heterozygot transgenen Maus im C57Bl/6 Hintergrund mit einer COMP defizienten Maus sind 100% der Nachkommen heterozygot für das COMP Gen und 50% zusätzlich heterozygot transgen (Abb. oben). Bei der Verpaarung einer letztgenannten Maus mit einer COMP defizienten Maus sind wieder 50% heterozygot transgen mit einer 50%igen Wahrscheinlichkeit auf einen COMP Knockout Hintergrund (Abb. unten).

## 2.2. Genotypisierung

### 2.2.1. Identifizierung integrierter Transgen Kopien

Nach der Integration des Transgens in das Mausgenom wurde zur Kontrolle erneut die Identität der Konstrukte in den entsprechend beschriebenen Linien über PCR kontrolliert. Die Abbildung III 15 zeigt die etwa 1,2 Kilobasen (kB) großen PCR Fragmente, die nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem Agarosegel eluiert und sequenziert wurden. Die Transgene konnten eindeutig als Wildtyp bzw. Mutante identifiziert werden.



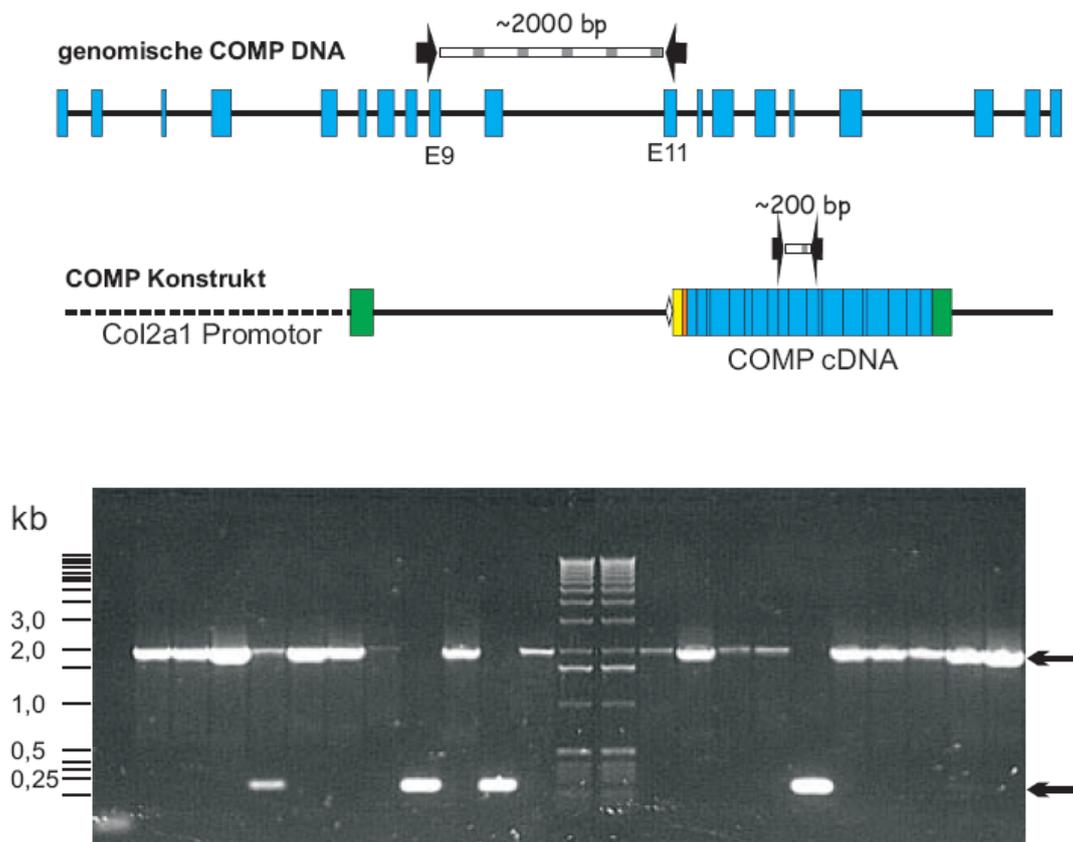
#### **Abb. III 15: Identifizierung integrierter Transgen Kopien**

Für die PCR wurden die Hybridisierungsstellen des Oligonukleotidpaares so gewählt, dass die Sequenz, die für die 7. TSP Typ 3 Domäne codiert und die Deletion enthält, amplifiziert wurde (A). Nach Agarosegelelektrophorese (B) (links) und Sequenzierung erfolgte eine Analyse der Sequenzen mit dem Programm Chromas (C). Die Deletion eines Aspartatrests konnte in der mutanten Mauslinie eindeutig bestätigt werden.

### 2.2.2. PCR und Southern Blot

Der Genotyp der Mäuse wurde mit zwei unabhängigen Methoden, der PCR und dem Southern Blot Verfahren bestimmt.

Die genomische DNA für diese Verfahren wurde aus den Schwanzspitzen der Mäuse gewonnen. Durch die PCR konnte, unmittelbar nach Isolierung genomischer DNA, eine qualitative Aussage über die An- bzw. Abwesenheit von Transgen Kopien im Mausgenom gemacht werden.

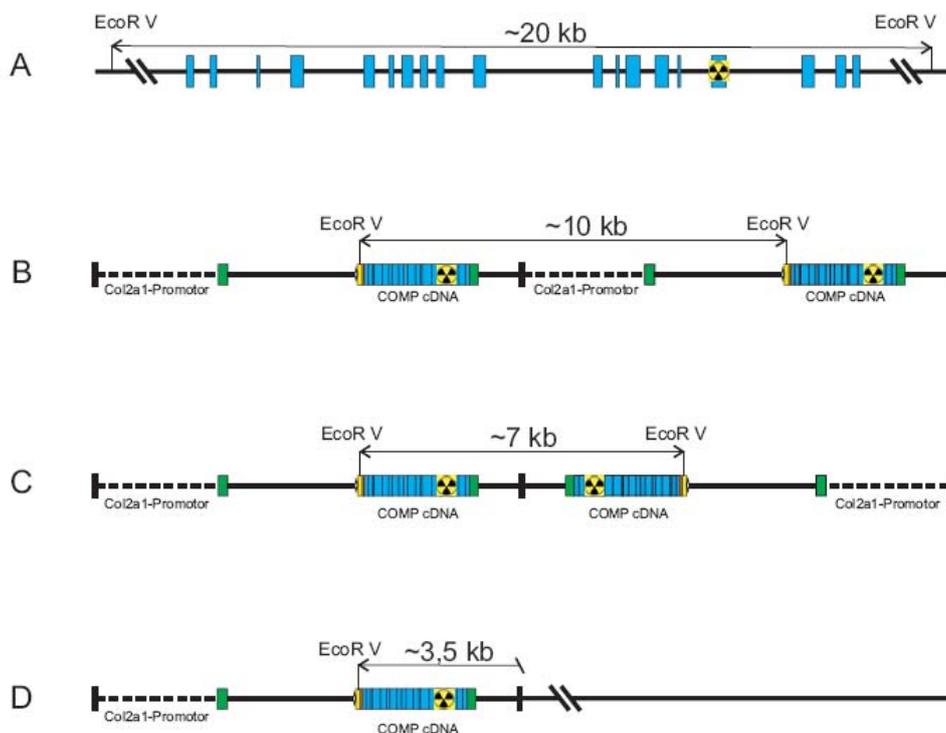


**Abb. III 16: Genotypisierung mittels PCR**

Zur Genotypisierung wurden identischer Oligonukleotide verwendet, die nach PCR mit genomischer bzw. cDNA Fragmente unterschiedlicher Größe erzeugten. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, das sie im Exon 9 bzw. Exon 11 von COMP hybridisieren. Für das endogene COMP, welches im Gegensatz zu den transgenen Kopien noch die Intronsequenzen beinhaltet, wurde ein Fragment von etwa 2000 bp (Pfeil oben) amplifiziert.

Demgegenüber sollte ein etwa 200 bp Fragment für die transgene cDNA amplifiziert werden. Das Agarosegel zeigt exemplarisch, wie aus 21 verschiedene Proben 4 Mäuse eindeutig als Transgen positiv identifiziert werden konnten (Pfeil unten).

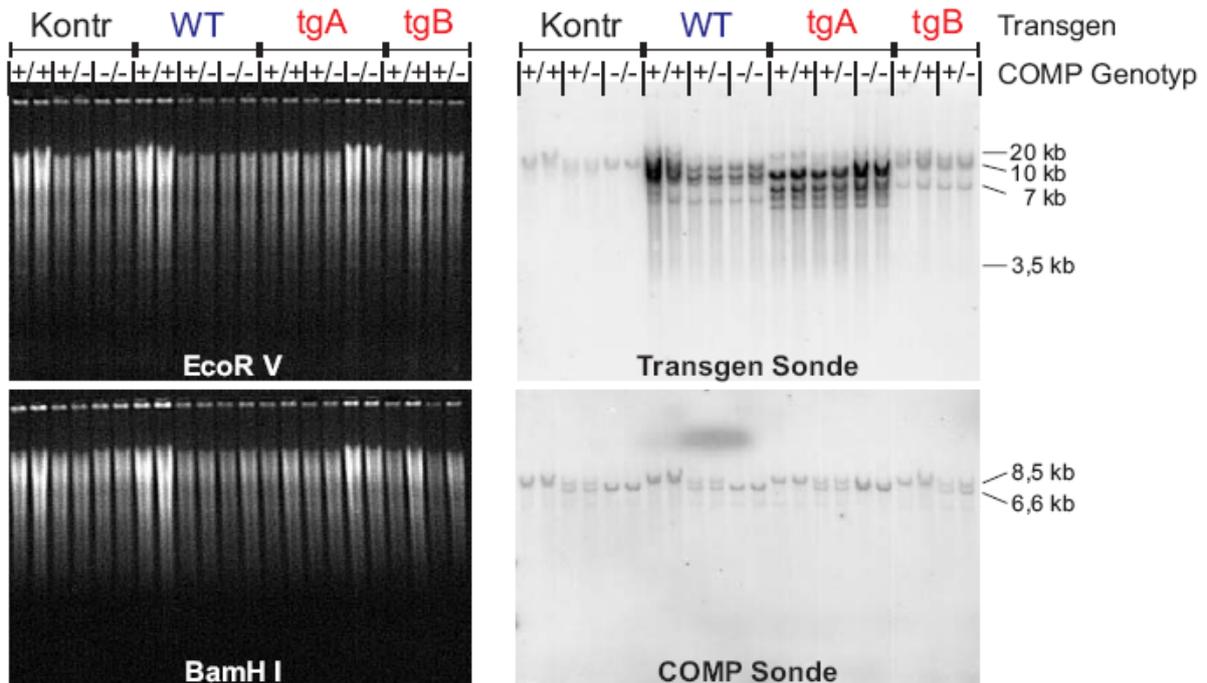
Die Genotypisierung über den Southern Blot mit anschließender radioaktiven Detektion der transgenen Kopien ist zeitaufwendiger aber auch sensitiver als die PCR und gibt eine zusätzliche quantitative Aussage über die Anzahl der integrierten Transgen Kopien. Zur Bestimmung des COMP Genotyps wurde genomische DNA zunächst zusammen mit dem Restriktionsenzym BamH I inkubiert. Für das Wildtyp Allel wurde eine 8,5 kb großes Fragment und für das mutierte Allel ein 6,6 kb großes Fragment erwartet. Für die Identifizierung der Transgen Kopien wurde die genomische DNA mit dem Restriktionsenzym EcoR V geschnitten, welches nur im BM40 Signalpeptid der transgen Kopien schneidet. Die daraus resultierenden Fragmentgrößen sind in der Abbildung III17 schematisch dargestellt. Nach Hybridisierung der mit  $^{32}\text{P}$  markierten Sonde wurde die Emission über einen Phosphor Imager Schirm gemessen. Das resultierende Bandenmuster gab Auskunft über Art der Integration und Anzahl der Transgen Kopien.



### **Abb. III 17: Verdau der genomischen DNA und integrierter Transgene**

Innerhalb des COMP Gens gibt es keine Schnittstelle für EcoR V, wohl aber im BM40 Signalpeptid des Transgens. Daraus ergeben sich für endogene COMP Allele Fragmente von etwa 20kb Länge (A). Zu berücksichtigen ist, dass mehrere Transgen Kopien tandemartig wiederholt ins Genom integrieren können. Dadurch ergeben sich Fragmente von etwa 10 kb Länge (B). Die Transgen Kopien nehmen z.T. auch eine umgekehrte Orientierung zueinander ein, was wiederum etwa 7 kb große Fragmente erzeugt (C). Durch Einzelinsertionen von Transgen Kopien entstehen Fragmente von mindestens 3,5 kb Länge, die um eine unbestimmte Größe verlängert werden, da die Lage einer genomischen EcoR V Schnittstelle nicht bekannt ist (D). Die radioaktiv markierte Sonde hybridisiert im Bereich von Exon 16.

Das Agarosegel mit der verdauten genomischen DNA sowie die mittels Phosphor Imager bestimmte Emission der  $^{32}\text{P}$  markierten DNA ist in Abbildung III 18 wiedergegeben und zeigt alle elf Genotypen der hier verwendeten Mäuse.

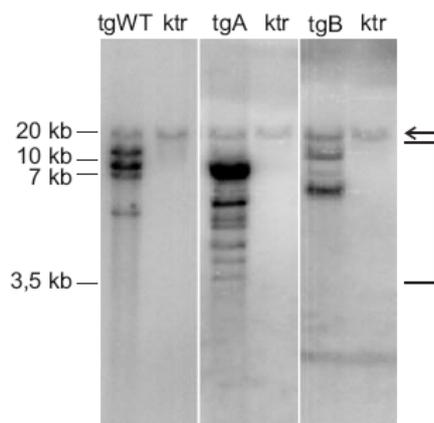


**Abb. III 18: Genotypisierung mittels Southern Blot**

Die genomische DNA wurde entweder mit EcoR V oder mit BamH I verdaut und im 0,8%igen TBE Agarosegel elektrophoretisch getrennt (links). Nach dem Transfer wurde die Nylonmembran zum Nachweis transgener Konstrukte sowie COMP defizienter Linien mit spezifischen radioaktiven Sonden hybridisiert. Die mit dem Phosphor Imager detektierten Banden entsprachen den errechneten Fragmentgrößen wie sie in Abb III 17 angegeben (transgene Linien) bzw. in Svensson et al. 2002 beschrieben (Knockout Linien) wurden.

### 2.2.3. Quantifizierung integrierter Transgen Kopien

Die bei der Southern Blot Genotypisierung gewonnenen Bandenmuster repräsentieren eine bestimmte Anzahl von Einzelintegrationen sowie eine unbestimmte Anzahl von tandemartigen Integrationen. Die Einzelkopien konnten durch Abzählen, die Tandemkopien über die Intensität der Banden mit Hilfe des Programmes Image Quant quantifiziert werden. Als Kontrolle dienten die C57Bl/6 Linien ohne Transgen (ktr) sowie eine Linie mit zusätzlicher transgener Wildtyp COMP Expression (tgWT). Da in seltenen Fällen ein essentielles Gen durch die zufällige Integration zerstört werden kann, wurde im folgenden jeweils mit einer Linien mit einer hohen Anzahl mutierter Transgen Kopien (tgA) bzw. einer geringeren Anzahl mutierter Transgen Kopien (tgB) gearbeitet, die unterschiedliche Integrationsorte besitzen. Dabei ist in erster Linie nicht die Anzahl der integrierten Kopien entscheidend, sondern der Ort der Integration. Denn dieser Positionseffekt berücksichtigt die Exprimierbarkeit der Konstrukte aufgrund ihrer chromosomalen Lage. Dennoch kann die Menge an exprimierten transgenen Proteinen im Verhältnis zur Kopienzahl stehen.



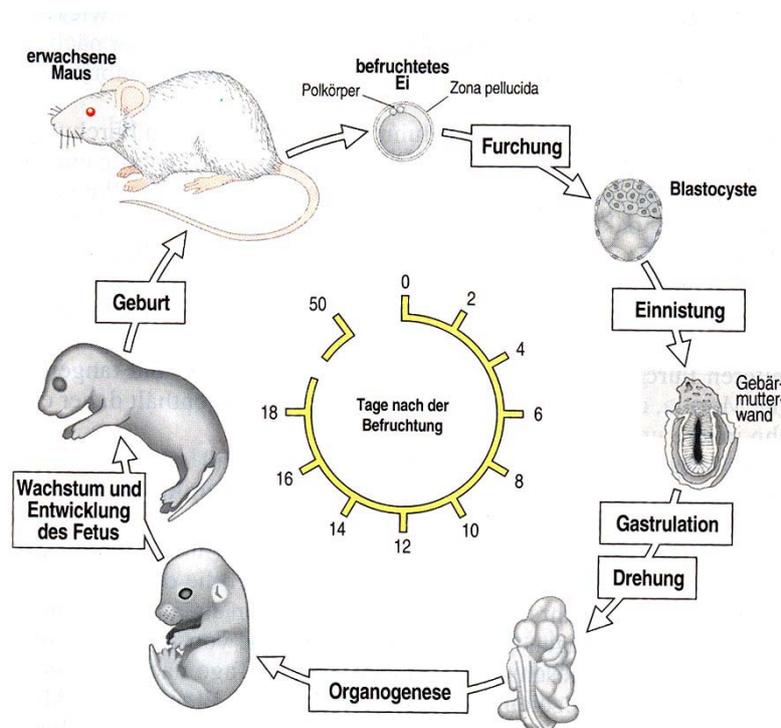
	tgWT	tgA	tgB
Einzelkopien	3	6	1
Tandemkopien	2	12	5
<i>(head to tail)</i>	(2)	(9)	(2)
<i>(head to head)</i>	(-)	(3)	(3)
<b>Gesamtkopien</b>	<b>5</b>	<b>18</b>	<b>6</b>

#### **Abb. III 19: Quantifizierung der integrierten Transgen Kopien**

Die Transgen Kopien wurden nach Southern Blot und radioaktiver <sup>32</sup>P Markierung mit der Phosphor Imager Technologie visualisiert und mit dem Programm Image Quant quantifiziert. Der Pfeil markiert das endogene COMP, die Klammer die gesamte Anzahl der integrierten Transgen Kopien. Die nebenstehende Tabelle schlüsselt die Gesamtzahl der Kopien in Einzel- und Tandemkopien auf. In Klammern steht jeweils die Kopienzahl, die entweder tandemartig in gleicher Orientierung (*head to tail*) oder in entgegengesetzter Orientierung (*head to head*) angeordnet sind (vergleiche Abb. III 17). Danach ließen sich für die transgene Wildtyp Linie (tgWT) insgesamt fünf Kopien und für die beiden transgenen mutierten Linien (tgA und tgB) jeweils 18 bzw. sechs Kopien ermitteln.

## 2.2.4. Analyse transgener Mäuse

Die transgenen Mäuse waren fertil und brachten jeweils eine normale Anzahl von Nachkommen hervor (~6-10 Mäuse pro Wurf). Die Tiere hatten einen normalen Lebenszyklus und ihre Lebenserwartung entsprach der einer normalen Labormaus, was unter optimalen Bedingungen etwa 2-3 Jahren entspricht. Die Vererbung der Transgene folgte den Mendelschen Regeln. Tiere unterschiedlicher Linien wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung biochemisch, histologisch und morphometrisch analysiert. Der Vergleich zwischen den Linien tgWT und tgA bzw. tgB konnte nur in unterschiedlichen Würfen vorgenommen werden, doch für einen direkten Vergleich von transgenen und Kontrolltieren ohne Transgen (ktr) wurden jeweils Geschwisterpaare eines Geschlechts herangezogen.



**Abb. III 20: Lebenszyklus der Maus (aus Wolpert 1999)**

Die Embryonalentwicklung einer Maus beginnt mit der befruchteten Eizelle und dauert bis zum adulten, geschlechtsreifen Tier etwa neun bis elf Wochen. Nach Abschluß der Tragzeit von etwa 20 Tagen beginnt eine drei wöchige Stillzeit. Die endgültige Geschlechtsreife erreichen die Mäuse sechs bis acht Wochen nach ihrer Geburt.

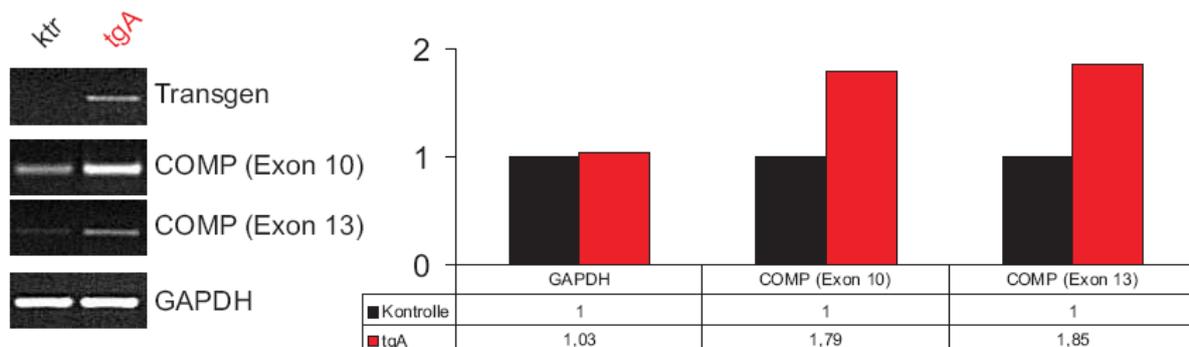
### 3. Expression von transgenem COMP

#### 3.1. Transkripte des Transgens

##### 3.1.1. RNA Isolation und RT-PCR

Die Expression des Transgen Konstruktes wurde zunächst auf RNA Ebene geklärt. Dazu wurde Gesamt-RNA aus den Extremitäten neugeborener Mäuse gewonnen. Die RNA wurde zur weiteren Analyse in einer RT-PCR eingesetzt. Vorab wurde die Qualität der RNA über eine denaturierende Agarosegelelektrophorese sowie über die Bestimmung der optischen Dichten bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm überprüft.

Die Transgen Expression wurde nach reverser Transkription über eine PCR ermittelt. Die Abbildung III 21 zeigt die qualitative Bestimmung der transgenen Expression in der mutanten Linie (tgA) im Vergleich zur Kontrolllinie (ktr). Ferner konnte durch eine semi-quantitative Analyse, über den Vergleich mit dem internen Standard GAPDH, eine Erhöhung der gesamten COMP Transkripte in Linie tgA um den Faktor 1,8 bestimmt werden.



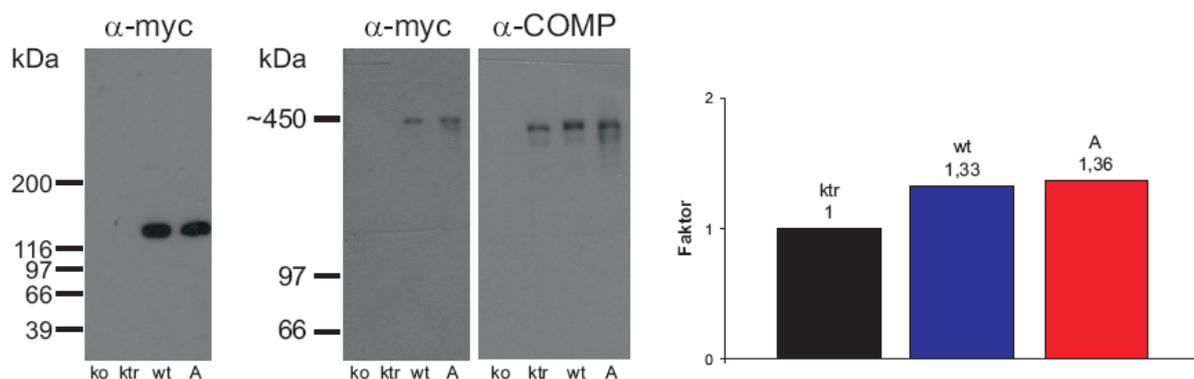
##### **Abb. III 21: Semi-quantitative Bestimmung der COMP Expression**

Die DNA Fragmente wurden über eine PCR amplifiziert und in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Zum qualitativen Nachweis des Transgens wurden Oligonukleotide gewählt, die nur im Transgen Konstrukt ein Fragment erzeugten, da sie im BM-40 Signalpeptid und im Exon 9 von COMP hybridisieren. Außerdem wurden Oligonukleodidpaare verwendet, die Fragmente an verschiedenen Positionen der COMP cDNA (Exon 10 und Exon 13) flankieren, womit sowohl die endogenen als auch die Transgen Transkripte erfasst wurden. Als interner Standard, zur semi-quantitativen Aussage über das Mengenverhältnis zwischen endogenen und transgenen COMP Transkripten in Kontroll- und transgenen Mauslinien, diente GAPDH. In der Linie tgA konnte eine Erhöhung der gesamten COMP Transkripte um den Faktor 1,8 nachgewiesen werden.

## 3.2. Transgene Proteine

### 3.2.1. Nachweis und Quantifizierung von COMP im Gewebextrakt

Zum Nachweis von transgenem his<sub>6</sub>-myc markierten COMP in den unterschiedlichen Mauslinien (tgWT und tgA) wurden Proteine aus den Extremitäten neugeborener Mäuse extrahiert. Als Kontrolle diente dabei die Linie ohne Transgen (ktr) bzw. die COMP defiziente Linie (ko). Mittels SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen und anschließendem Immunoblot waren spezifischen Signale bei den erwarteten Laufhöhen für COMP Monomere bei etwa 120 kDa bzw. COMP Pentamere bei etwa 450 kDa detektierbar. Dadurch konnte sowohl die Expression von transgenen COMP Untereinheiten als auch der Einbau dieser Untereinheiten in die oligomeren Moleküle nachgewiesen werden. Die Frage, ob die beobachtete transgene Proteinexpression einen messbaren Effekt auf die Gesamtmenge von COMP hatte, konnte mit einem Immunoblot und der Verwendung eines gegen COMP gerichteten Antikörpers beantwortet werden. Dabei wurden die transgenen Linien untereinander und mit der Kontrolllinie verglichen. Die COMP Menge wurde mit dem Programm Image Quant quantifiziert und war in den Linien tgWT (wt) bzw. tgA (A) im Vergleich zur Kontrolllinie (ktr) um den Faktor 1,3 bzw. 1,36 erhöht. Die Linien tgWT und tgA exprimieren demnach eine vergleichbare Menge des transgenen Proteins.

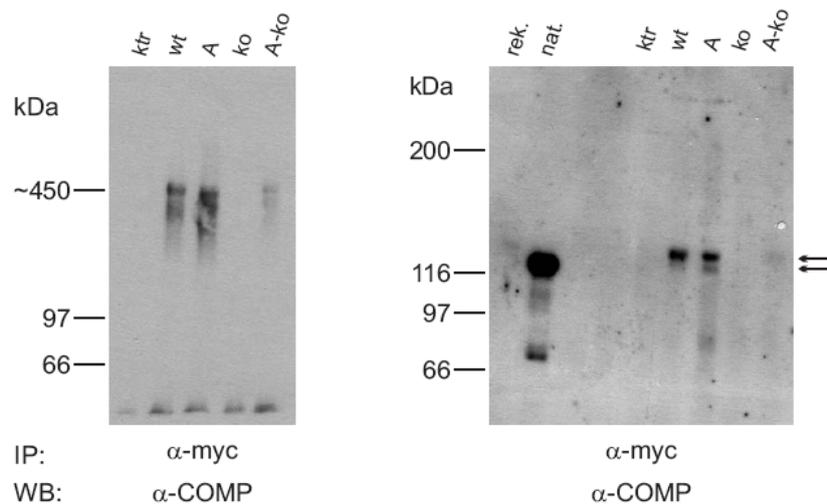


**Abb III 22: Nachweis und Quantifizierung von COMP in Kontroll- und transgenen Linien**

Aufgetragen wurde der EDTA Extrakt der transgenen Wildtyp (wt) und mutanten (A) Linien, sowie der Kontroll- (ktr) und COMP Knockout Linie (ko). Nach SDS-PAGE unter reduzierenden (links) und nicht reduzierenden Bedingungen (Mitte und rechts), wurde mit Antikörpern jeweils gegen das myc Epitop oder gegen COMP inkubiert. Wie erwartet konnte mit dem myc Antikörper ein Signal nur in den transgenen Linien bei ~120 kDa für monomeres (links) und ~450 kDa für pentameres (rechts) COMP detektiert werden. Zur Quantifizierung wurde nach Detektion mit einem Antikörper gegen COMP (rechts) die gemessene Lumineszenz mit dem Programm Image Quant quantifiziert. Die transgene Expression in den Linien tgWT bzw. tgA führt zu einer Erhöhung der gesamten COMP Menge um den Faktor 1,33 bzw. 1,36.

### 3.2.2. Nachweis von hybriden COMP Molekülen

Die Expression von transgenem COMP führte zu einer Erhöhung der Gesamtmenge von COMP in transgenen Tieren. Weiter ungeklärt war bisher, ob es ausschließlich zur Bildung von homopentameren transgenen bzw. endogenen COMP Molekülen kommt, oder ob transgene und endogene COMP Monomere zu hybriden COMP Molekülen pentamerisieren. Der experimentelle Ansatz zum Nachweis dieser Hybride bestand in einer Immunpräzipitation mit einem an Protein A Agarose gekoppelten myc Antikörper, der alle COMP Moleküle mit mindestens einer transgenen, myc markierten COMP Untereinheit präzipitiert. Durch Reduktion dieses Präzipitates zerfallen die Pentamere in ihre Untereinheiten. Die Detektion nach reduzierender SDS-PAGE und Western Blot erfolgte dann mit einem Antikörper gegen COMP. Der Antikörper detektiert sowohl myc markierte als auch endogene COMP Untereinheiten, die im SDS Gel eine unterschiedliche Laufhöhe hatten. Mit dieser Methode konnten hybride COMP Moleküle in transgenen Tieren eindeutig nachgewiesen werden. Dabei ist interessant, dass nicht nur transgene Wildtyp sondern auch mutierte Untereinheiten mit endogenem COMP pentamerisieren.

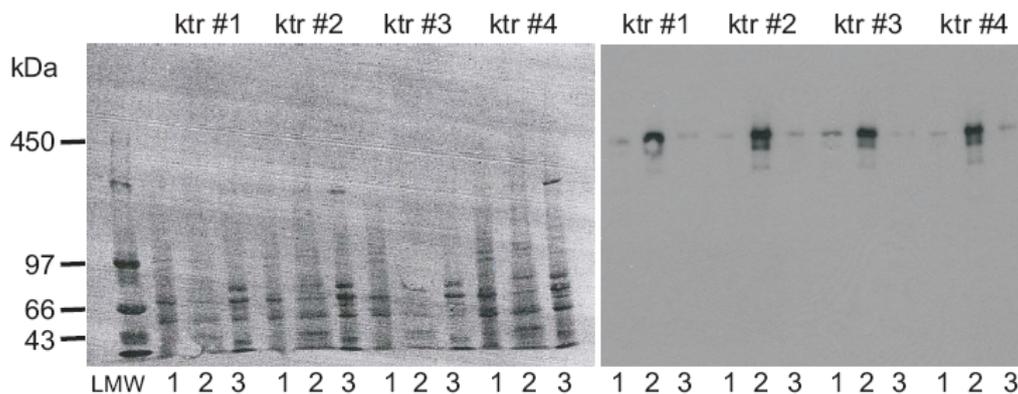


**Abb. III 23: Nachweis hybrider COMP Moleküle**

Die EDTA Extrakte aus den Kontrolllinien (ktr und ko) sowie den transgenen Linien (tgWT, tgA und tgA-KO) wurden vorab mit Protein A Agarose präinkubiert (*pre clearing*). Nach erfolgter Immunpräzipitation (IP) mit dem gekoppelten myc Antikörper wurde ein Teil der Proben unter nicht reduzierenden Bedingungen im 3-12%igen SDS Gel aufgetrennt (links). Dies zeigte, dass COMP Pentamere präzipitiert wurden, die transgene Monomere enthielten. Der übrige Teil der Proben wurde reduziert und ebenfalls elektrophoretisch in einem 3-12%igem SDS Gel aufgetrennt (rechts). Als Positivkontrollen dienten rekombinates COMP mit myc Tag (rek.) und natives COMP ohne myc Tag (nat.). Die Detektion nach Western Blot (WB) mit einem Antikörper gegen COMP zeigte in beiden transgenen Linien (wt und A) eine Doppelbande, die mit den erwarteten unterschiedlichen Laufhöhen der Positivkontrollen korrelierten. Im Gegensatz dazu konnte bei der COMP Knockout Linie mit zusätzlicher mutierter Transgen Expression nur eine Bande auf Höhe der myc markierten Monomere nachgewiesen werden.

### 3.2.3. Sequentielle Proteinextraktion aus Gewebe

Die Proteine wurden sequentiell in drei Schritten aus dem Gewebe extrahiert. Dabei wurden die leicht löslichen Proteine zunächst in einer neutral gepufferten TBS Lösung extrahiert. Anschließend wurde durch Zugabe von 10 mM EDTA der Entzug divalenter Kationen gefördert. Im Guanidin Puffer wurden sämtliche, schwerlöslichen Proteine gesammelt. Die Extraktion von COMP aus dem Gewebe wurde mit der Drei-Schritt Methode an Tieren mit identischem Genotyp (ktr #1-4) getestet. Das Ergebnis ist in Abbildung III 24 dargestellt und belegte die Reproduzierbarkeit der Extraktionsmethode. Das stärkste Signal für COMP war im EDTA Extrakt (2) nachweisbar. Schwächere COMP Signale konnten sowohl im TBS Extrakt (1) als auch im Guanidin Extrakt (2) detektiert werden.



**Abb. III 24: Sequentielle COMP Extraktion aus Kontrollmäusen**

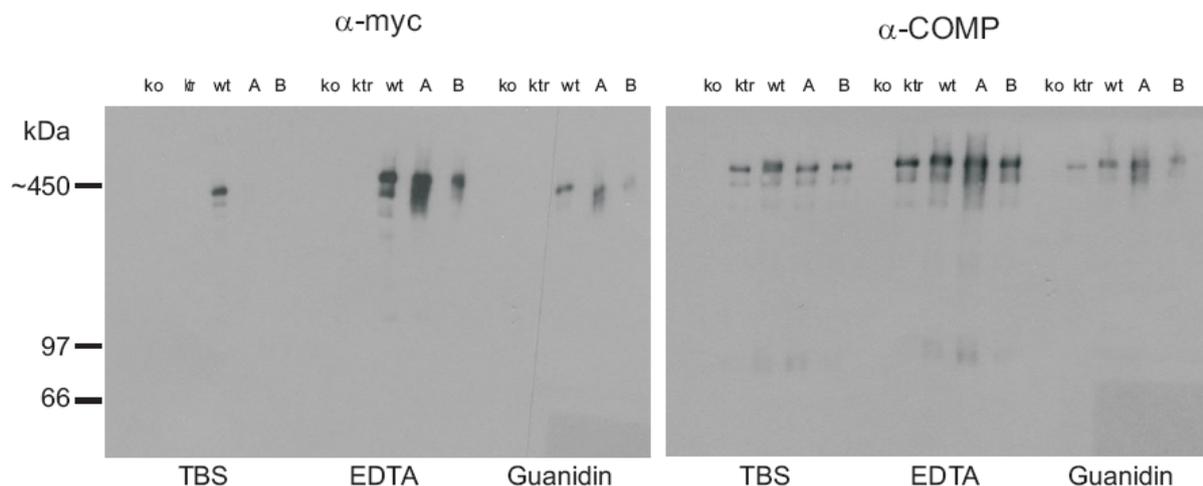
In einer nicht reduzierenden SDS-PAGE wurden verschiedene Extrakte (1: TBS; 2: EDTA; 3: Guanidin) von vier genetisch identischen Kontrolltieren (ktr #1-4) aufgetragen und im Western Blot Verfahren auf eine Nylonmembran übertragen. Als Standard diente der LMW Marker mit Fibronectin. Die Membran wurde mit Ponceau S gefärbt (links). Anschließend wurde mit einem Antikörper gegen COMP inkubiert und die Lumineszenz auf einem Röntgenfilm gemessen (rechts). Das stärkste Signal für COMP wurde im EDTA Extrakt (2) gemessen. Schwächere COMP Signale zeigten sich auch im TBS (1) und im Guanidin Extrakt (3).

Die sequentielle Drei-Schritt Extraktion von COMP aus den Geweben von genetisch unterschiedlichen Tieren ist in Abbildung III 25 wiedergegeben. Wildtyp und mutierte COMP Moleküle zeigten einen deutlichen Unterschied im Extraktionsverhalten

Um nur COMP Moleküle mit integrierten transgenen Monomeren zu erfassen wurde ein Antikörper gegen das myc Epitop verwendet. In den Kontrollgeweben ohne Transgen (ktr, ko) konnte erwartungsgemäß kein Signal detektiert werden. Bei den Geweben aus

transgenen Tieren (wt, A, B) ergab sich ein unterschiedliches Bild. Bei der Linie tgWT wurde in allen drei Fraktionen ein Signal auf entsprechender Höhe der COMP Pentamere detektiert. Auch hier war die größte COMP Menge im EDTA Extraktionspuffer gelöst. Bei den Linien tgA und tgB waren nur Signale in den EDTA- und Guanidin Extraktionspuffern detektierbar. Die EDTA Fraktion enthielt wieder den größten Anteil an COMP Molekülen.

Um zusätzlich reine endogene COMP Moleküle bei transgenen Tieren zu berücksichtigen, wurde mit einem Antikörper gegen COMP detektiert. In der COMP Knockout Maus (ko) konnte kein Signal detektiert werden. Im Vergleich zum Kontrolltier ohne Transgen (ktr) war die Gesamtmenge an COMP in der Wildtyp Linie (wt) in allen drei Fraktionen erhöht, wohingegen bei der mutierten Linie (A und B) die COMP Mengen nur in der EDTA und Guanidin Fraktionen erhöht war. Es zeigte sich, dass Pentamere mit mutierten Monomeren schwerer löslich waren als Pentamere mit Wildtyp Monomeren. Die Banden in der mutierten Linie sind weniger scharf und erscheinen zudem diffuser.



**Abb. III 25: Sequentielle COMP Extraktion aus Kontroll- und transgenen Mäusen**

Aufgetragen wurden jeweils identische Mengen der Extrakte (TBS, EDTA und Guanidin) aus den Linien ko (COMP Knockout Maus), ktr (Kontrollmaus), wt (Transgen Wildtyp), A und B (Tiere mit unterschiedlicher Kopienzahl mutierter Transgene). Nach nicht reduzierender SDS-PAGE und Western Blot wurde mit einem Antikörper gegen das myc Epitop (links) sowie gegen COMP (rechts) inkubiert. Auffällig ist im linken Bild ein Fehlen von transgenen mutiertem COMP im TBS Extrakt. Mutiertes Protein erschien erst nach Zugabe von 10 mM EDTA in den Extraktionspuffer. Pentamere mit mutierten Untereinheiten sind schwerer löslich.

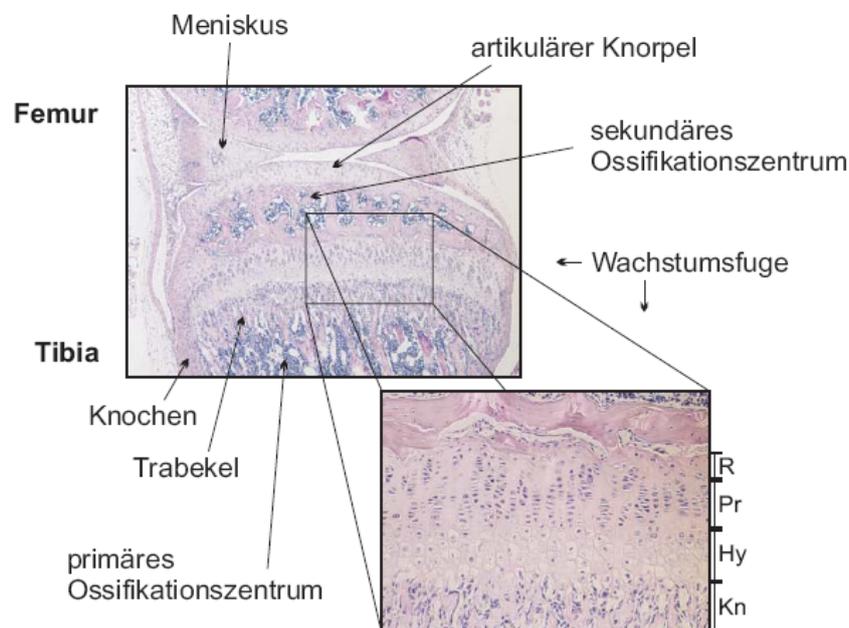
Bei der Detektion weiterer Matrixproteine, wie Fibronectin, Kollagen Typ II und Typ IX oder Matrilin-1, -3, und -4, konnten nach sequentieller Extraktion keine dramatischen Unterschiede im Extraktionsverhalten oder in den Bandenmustern beobachtet werden.

## 4. Histologische und morphometrische Analysen

### 4.1. Histologische Analysen

#### 4.1.1. Struktur der Wachstumsfuge

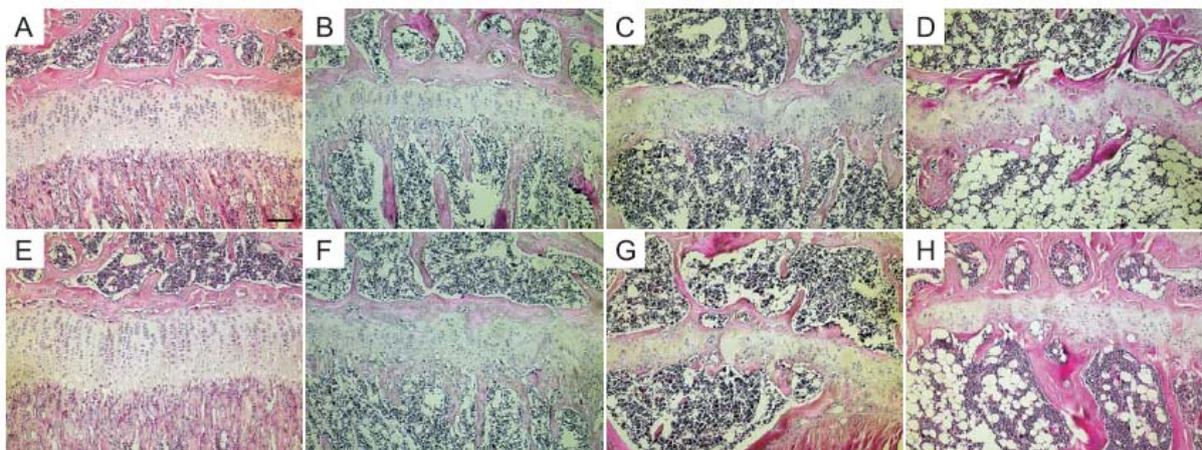
Zu unterschiedlichen Entwicklungsstufen wurden Paraffinschnitte mit einer Dicke von 5  $\mu\text{m}$  verschiedener knorpeliger Gewebe von Kontroll- und transgenen Mäusen angefertigt. Von besonderem Interesse waren hierbei die Kniegelenke mit Epi- und Metaphyse. Signifikante Unterschiede waren vor allem in der Metaphyse (Wachstumsfuge) nach vier Wochen zu erkennen. Unterschiede im artikulärem Knorpel konnten zu diesem Zeitpunkt nicht festgestellt werden. Die Struktur der Fuge noch sehr gut erhalten, was in Abbildung III 26 am Beispiel der Tibia Epiphyse einer Kontrollmaus dargestellt ist. Die Unterteilung in die verschiedenen Knorpelzonen ist klar abgrenzbar in eine ruhende Knorpelzone, eine Proliferationszone, eine Hypertrophiezone und den angrenzenden Knochen.



**Abb. III 26: Überblick der Epiphyse der Tibia**

Hämatoxylin/Eosin (HE) Färbung der Tibia Epiphyse. Hervorgehoben wurde ein vergrößerter Ausschnitt der Wachstumsfuge. Kennzeichnend ist die Unterteilung der Fuge in die Ruhezone (R), die Proliferationszone (Pr), die Hypertrophiezone (Hy) und den Knochen (Kn).

Die Wachstumsfuge verändert im Laufe der Entwicklung auf gravierende Weise ihre Struktur. Die für das Längenwachstum der langen Knochen notwendige Unterteilung in die unterschiedlichen Zonen wird immer mehr aufgehoben. Diese Schließung der Wachstumsfuge findet in der Mausentwicklung nach etwa drei Monaten statt und bedeutet den Zusammenbruch einer hochorganisierten Struktur und führt zum Wachstumsstillstand. Die Fuge verschwindet aber niemals vollständig, sondern es verbleibt immer eine restliche Knorpelregion. Abbildung III 27 zeigt die Entwicklung der Wachstumsfugen in der Tibia Epiphyse von Kontroll- und transgenen (tgA) Tieren nach jeweils einem, zwei, sechs und neun Monaten. Die gravierenden Veränderungen der Knorpelzonen finden in beiden Linien im vergleichbaren zeitlichen Rahmen statt.

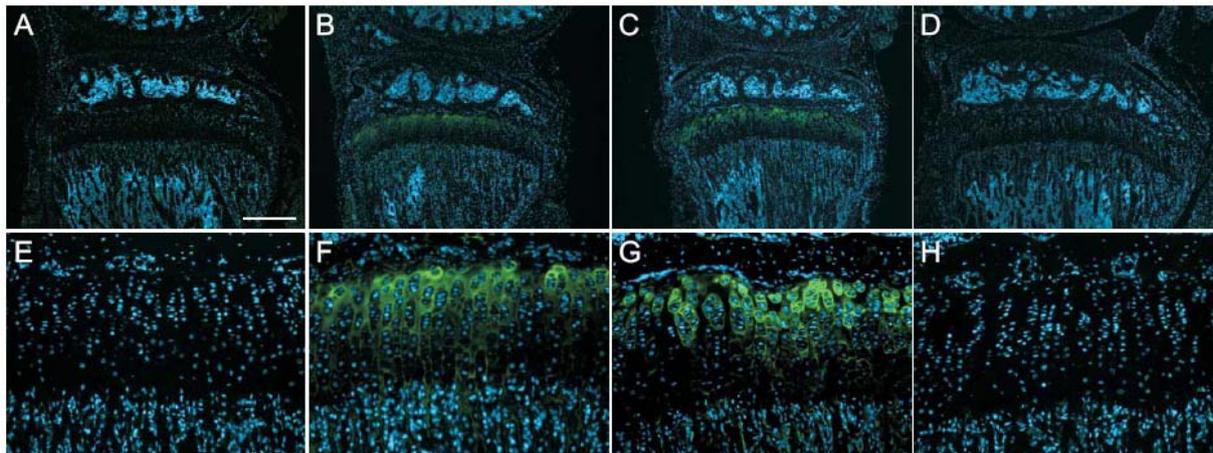


**Abb. III 27: Entwicklung der Wachstumsfugen von Kontroll und transgenen Mäusen**

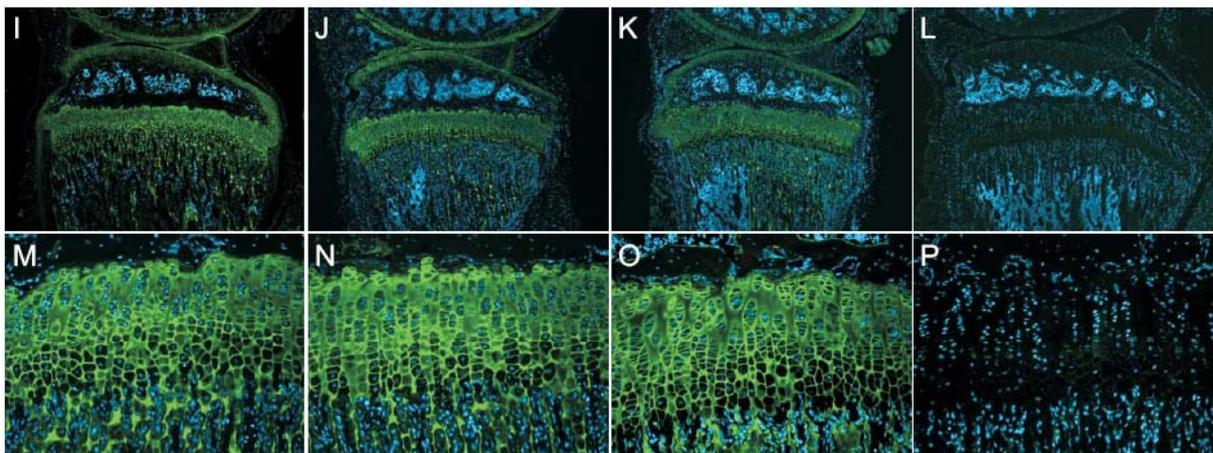
Dargestellt sind HE Färbungen die Wachstumsfugen von Kontroll (A-D) und transgenen (tgA) Mäusen (E-H) nach vier Wochen (A und E), zwei Monaten (B und F), sechs Monaten (C und G) und neun Monaten (D und H). Die Wachstumsfugen beider Linien durchlaufen auf ähnliche Weise eine dramatische Entwicklung, was zum Wachstumsstillstand in den langen Knochen führt. Der Maßstab beträgt 50 µm.

#### 4.1.2. Lokalisation von transgenem COMP im Gewebe

Nachdem die Expression von transgenem COMP und ein verändertes Extraktionsverhalten von mutiertem gegenüber Wildtyp COMP nachgewiesen werden konnte, wurde die Lokalisation nun im Gewebeschnitt untersucht. Dazu wurden zunächst die Kniegelenke von Kontroll und transgenen Mäusen mit einer Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Mit einem Antikörper gegen das myc Epitop, wurde nur in transgenen Linien ein charakteristisches Signal vor allem im Bereich der Proliferationszone detektiert.



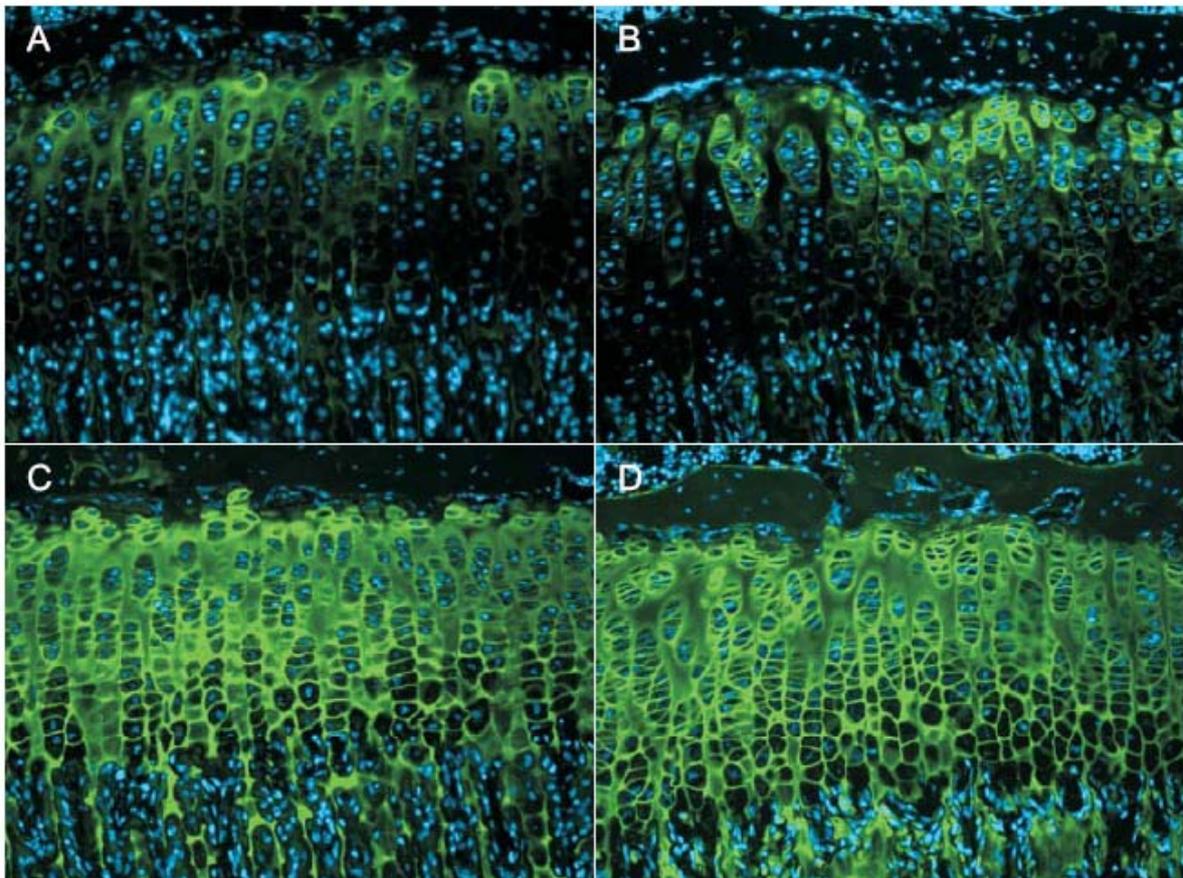
Durch Verwendung eines gegen COMP gerichteten Antikörpers wurde sowohl endogenes als auch transgenes COMP detektiert.



**Abb. III 28: Immunfluoreszenzfärbung der Epiphysen vier Wochen alter Kontroll und transgener Mäuse**

Die Paraffinschnitte von Kontroll (A, E, I, M), tgWT (B, F, J, N), tgA (C, G, K, O) und COMP Knockout Mäusen (D, H, L, P) wurden mit Antikörpern gegen das myc Epitop (A-H) und gegen COMP (I-P) inkubiert. Die Fluoreszenz des Alexa488 gekoppelten Sekundärantikörpers (grün) wurde am Axiophot (Zeiss) mit 50 bzw. 100 facher Vergrößerung aufgenommen. Die Zellkerne wurden mit Bisbenzimidin gefärbt (blau). Maßstab: 100  $\mu\text{m}$  (A-D und I-L) bzw. 25  $\mu\text{m}$  (E-H und M-P).

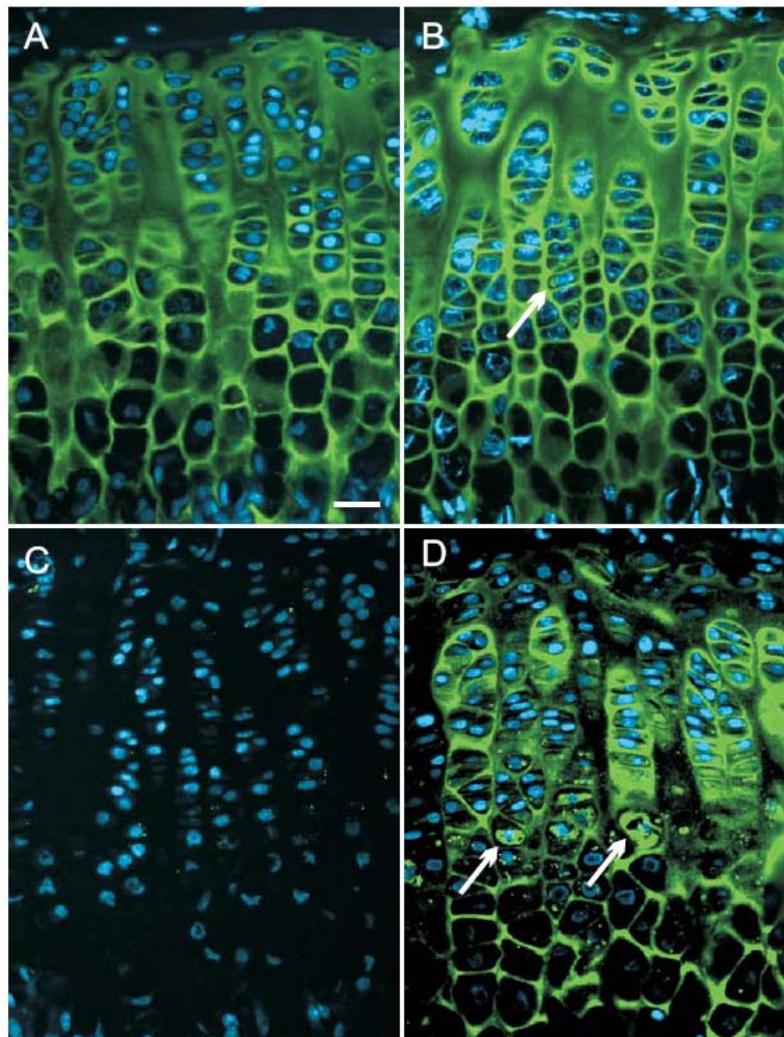
Bei näherer Betrachtung der Wachstumsfuge der Wildtyp und mutierten Linie zeigte sich eine eindeutige Veränderung der COMP Verteilung. COMP Moleküle mit Wildtyp Transgen verteilten sich wie endogenes COMP in Kontrolltieren in der peri- und interterritorialen Matrix. Dahingegen sammelten sich COMP Moleküle mit mutiertem Transgen um die Zellen herum an. Es konnte keine mutierten COMP Moleküle mit dem myc spezifischen Antikörper in der interterritorialen Matrix detektiert werden. Bei Verwendung des COMP spezifischen Antikörpers wurde dieses charakteristische Färbung durch das zusätzliche Signal des endogenen Proteins ergänzt. Hier zeigte sich nun auch in der Linie tgA ein eindeutiges Signal in der interterritorialen Matrix. Auffällig war die zum Teil ungeordnete Struktur der Wachstumsfuge in Mäusen mit mutierten COMP Molekülen. Der gleichmäßige säulenartige Aufbau der Knorpelzellen in der Proliferationszone erschien beeinträchtigt.



**Abb. III 29: Verteilung von transgenem COMP in Wachstumsfuge in Wildtyp und mutanten Mäusen**

Vergrößerte Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung aus Abbildung III 28 von tgWT (A und C) und tgA (B und D) Mäusen. Die Detektion mit einem myc spezifischen (A und B) bzw. COMP spezifischen (C und D) Antikörper ergeben ein charakteristisches Bild in der Verteilung des transgenen Proteins (grün) in der Wachstumsfuge. Die Zellkerne sind blau angefärbt.

Das mutierte Transgen zeigte neben seiner auffällig anderen Matrixverteilung in einigen Fällen außerdem eine verstärkte intrazelluläre Lokalisation. Mit einem COMP spezifischen Antikörper konnte das Protein im Vergleich mit Kontrolltieren auch innerhalb der Zelle nachgewiesen werden. Dieser Effekt war in transgenen Mäusen mit einer COMP Defizienz besonders deutlich sichtbar, da hier ausschließlich mutiertes Protein exprimiert wird. In Kontrolltieren konnte zu keiner Zeit eine intrazelluläre Färbung nachgewiesen werden, was auf eine intrazelluläre Retention von COMP aufgrund der Mutation hindeutet.

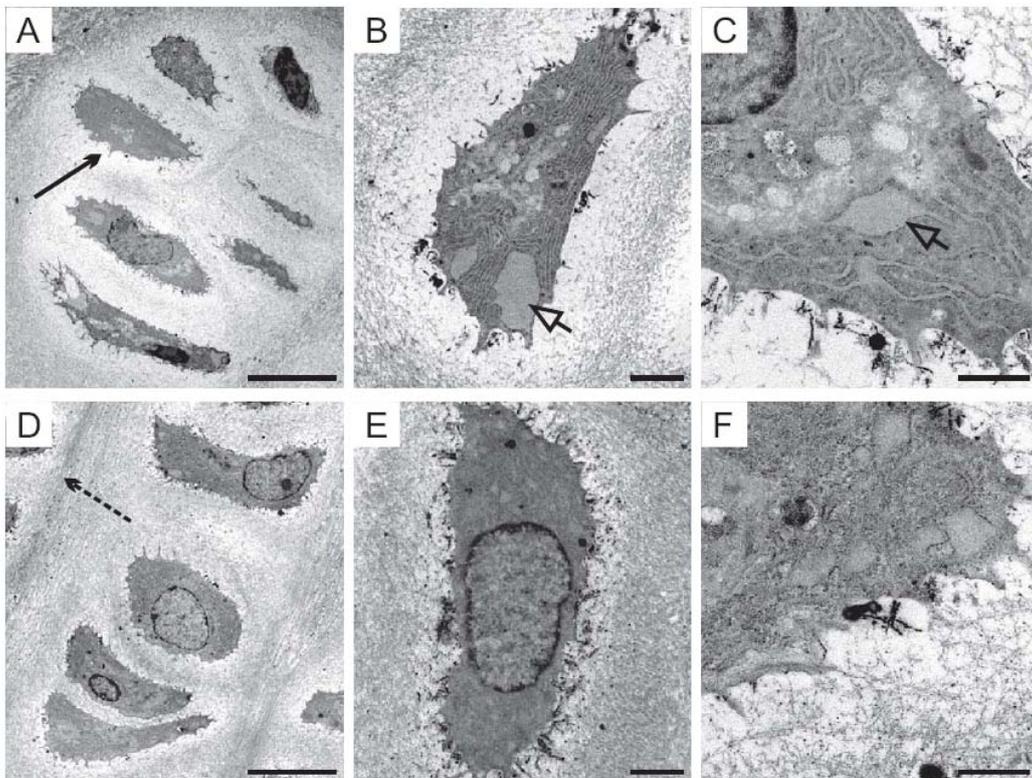


**Abb. III 30: Intrazelluläre Ansammlung von mutierten COMP Molekülen**

Immunfluoreszenzfärbung der Wachstumsgugen von Kontroll (A), tgA (B), ko (C) und tgA-ko (D) Mäusen. Detektiert wurde nach Inkubation mit COMP spezifischen Antikörper. In COMP Defizienten Mäusen, die ausschließlich mutiertes COMP exprimieren, konnten deutlich intrazelluläre Signale nachgewiesen werden (Pfeil), was auf eine Ansammlung des mutierten Proteins hinweist. Die Fluoreszenz des Alexa488 gekoppelten Sekundärantikörpers wurde am Axiophot (Zeiss) erfasst (grün) und bei 400 facher Vergrößerung aufgenommen. Die Zellkerne wurden mit Bisbenzimidin gefärbt (blau). Maßstab: 6,25  $\mu\text{m}$ .

### 4.1.3. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Struktur der Wachstumsfuge in Kontroll- und transgenen Mäusen wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) in Kooperation mit Dr. Nicolai Miosge in Göttingen detailliert analysiert. Auf dieser Ebene wurde eine deutliche Veränderung der ECM in Mäusen sichtbar, die mutierte COMP Moleküle exprimieren. Auffällig in der perizellulären Matrix waren helle Bereiche. Diese Bereiche zeichneten sich durch das Fehlen einer kollagenen Matrix aus, die in entsprechenden Kontrolltieren vorhanden war. Außerdem waren nur um die Zellen der tgA Tiere im großen Maße ungeordnete Ablagerungen zu erkennen. Zusätzlich konnte in einigen Zellen eine Vergrößerung des ERs beobachtet werden.

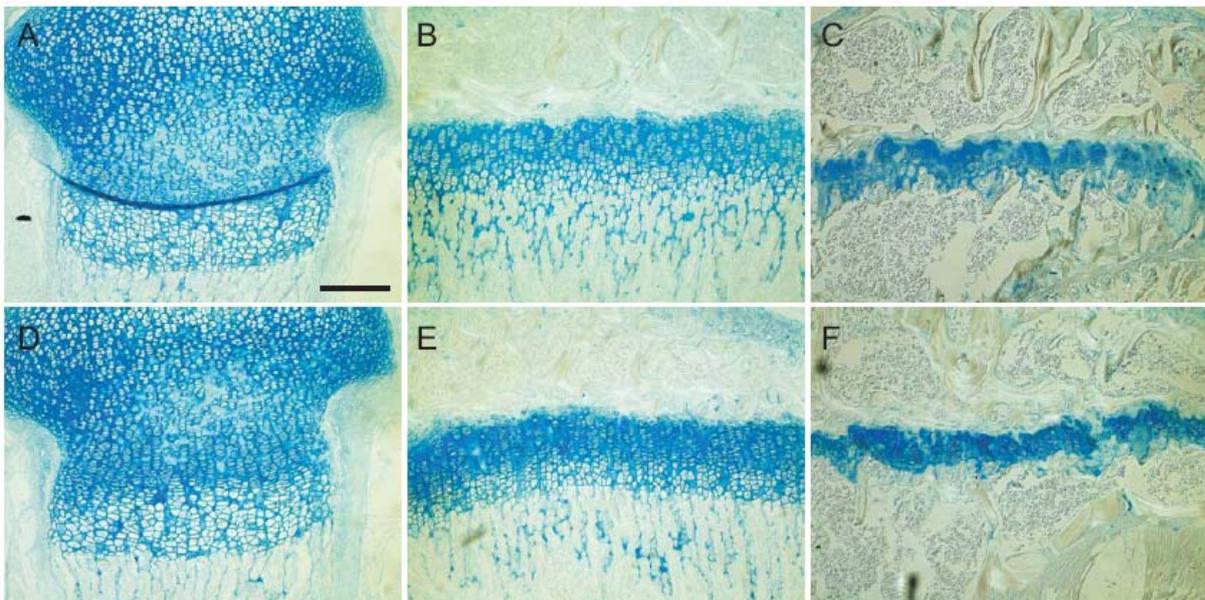


#### **Abb. III 31: Elektronenmikroskopische Untersuchungen**

Gezeigt sind TEM Aufnahmen von Zellen der Proliferationszone von Mäusen der Linie tgA (A-C) und tgWT (D-F). Die Linie tgA zeigt helle Bereiche in der perizellulären Matrix (durchgehende Pfeile). Vergrößerungen des ERs sind in einigen Fällen in tgA Tieren erkennbar (offener Pfeil). Zudem ist die fibrilläre Kollagenmatrix im perizellulären Bereich der tgA Tiere nur schlecht ausgebildet. Die Kontrolltiere zeigen hingegen eine gut ausgebildete Kollagenmatrix auch im perizellulären Bereich sowie parallel zum Säulenverlauf der Zellen charakteristische Kollagenanordnungen (gestrichelter Pfeil). Der Maßstab beträgt in den Bildern A und D 10  $\mu\text{m}$ , in den Bildern B und E 2000 nm und in den Bildern C und F 1000 nm.

#### 4.1.4. Lokalisation knorpelspezifischer Proteine

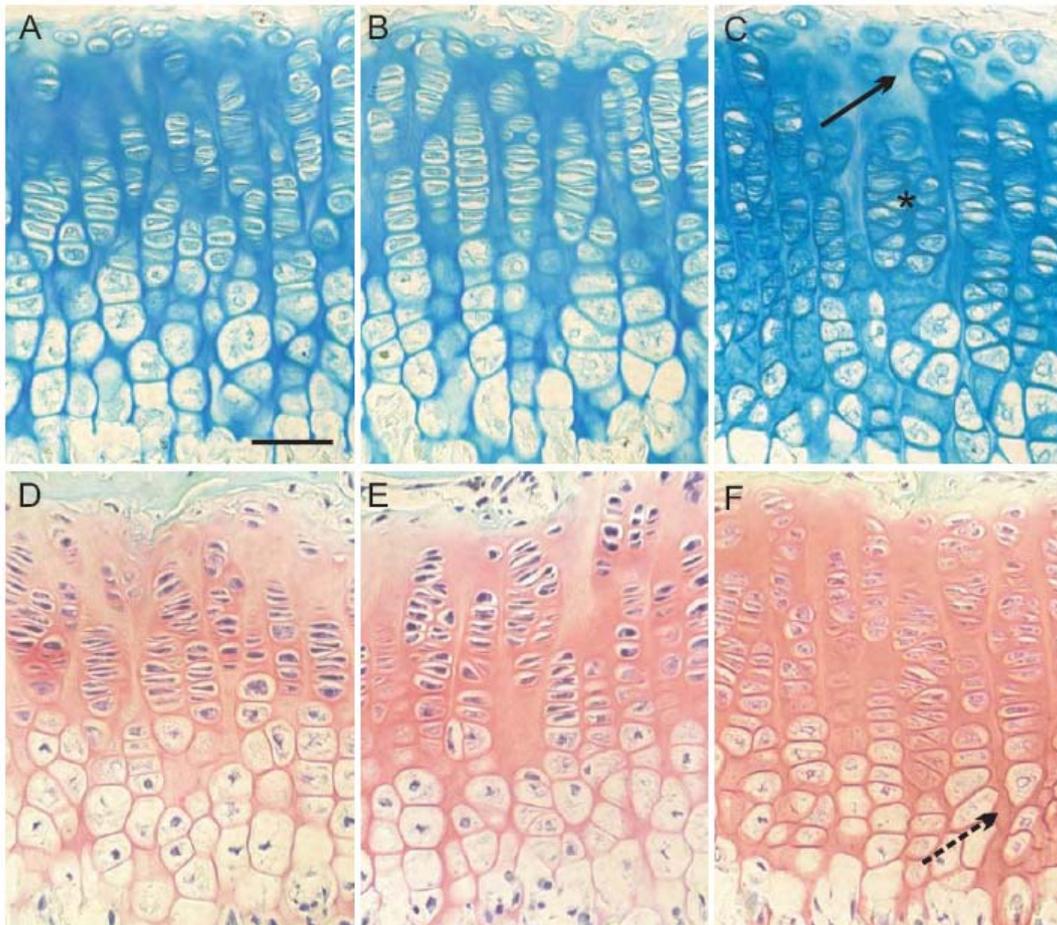
Die Verteilung knorpelspezifischer Proteoglykane, wie dem stark sauren Proteoglykan Aggrecan und anderer sauren Komponenten, ließ sich über eine allgemeine Alcian Blau Färbung sichtbar machen (Abb III 32). Innerhalb der ersten Tage der postnatalen Entwicklung, noch vor der Ausbildung des sekundären Ossifikationszentrums, sind diese Veränderungen besonders deutlich. Hier ist eine Alcian Blau Färbung mehr in der peri- als in der interterritorialen Matrix nachweisbar. Nach vier Wochen ist in Kontrolltieren eine gleichmäßige Färbung in der gesamten Matrix erkennbar. Später in der Entwicklung wird diese Färbung ungleichmäßiger. In Tieren der Linie tgA mit Expression mutierter COMP Moleküle ist die Alcian Blau Färbung zu keinem Zeitpunkt gleichmäßig verteilt, was besonders bei höherer Vergrößerung (siehe Abb III 33) sichtbar wird.



**Abb. III 32: Proteoglykanfärbung in Kontroll- und transgenen Tieren**

Eine allgemeine Detektion von Proteoglykanen in der Epiphyse- und Metaphyse von Kontroll (A-C) und Tieren der Linie tgA (D-F) nach zehn Tagen (A und D), vier Wochen (B und E) und sechs Monaten (C und F) wurde durch einer Alcian Blau Färbung erzielt. Die Verteilung der sauren Bestandteile der extrazellulären Matrix verändert sich im Laufe der Entwicklung. In Kontrolltieren nach zehn Tagen eine perizelluläre Färbung erkennbar, die nach vier Wochen in eine gleichmäßige Färbung der gesamten Matrix übergeht. Später in der Entwicklung wird die Alcian Blau Färbung erneut ungleichmäßiger. In Mäusen mit mutierten COMP Molekülen ist diese gleichmäßige Matrixfärbung zu keinem Zeitpunkt deutlich. Der Maßstab beträgt 100  $\mu$ m.

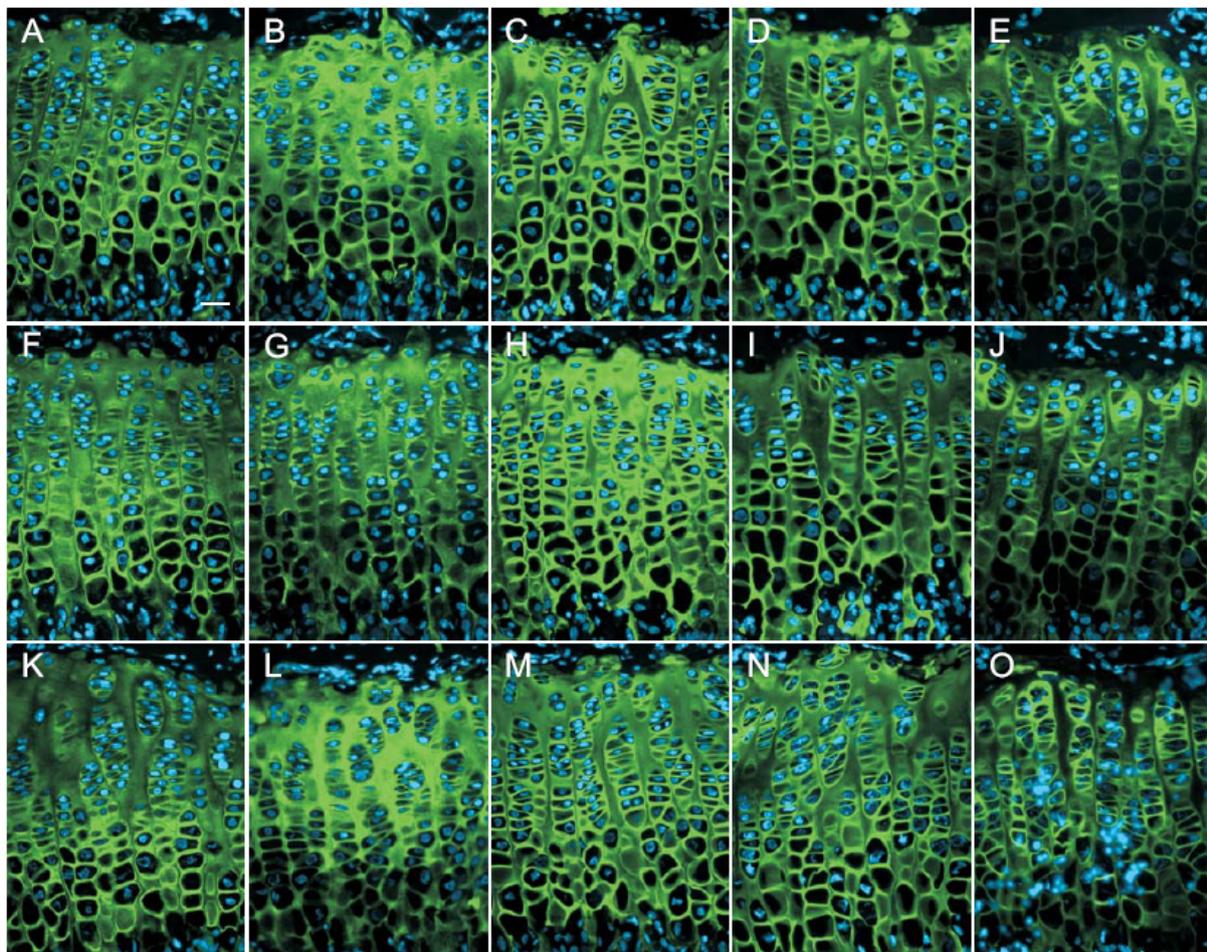
Bei näherer Betrachtung der Wachstumsfugen von vier Wochen alten Kontroll- und transgenen Tieren werden zum Teil auch strukturelle Veränderungen besser deutlich. Die säulenförmige Anordnung der Zellen in der Proliferationszone ist gut in der Kontrolllinie und in tgWT Mäusen zu sehen. Bei tgA Mäusen sind zum Teil ungeordnete Zellhaufen zu erkennen. Auch erscheint die Anordnung der Zellen in der hypertrophen Zone weniger dicht als bei Kontroll und tgWT Tieren.



**Abb. III 33: Proteoglykanfärbung der Epiphyse nach vier Wochen**

Proteoglykanfärbung (SafraninO: A-C / Alcian Blau: D-F) in der Wachstumsfuge vier Wochen alter Kontroll (A, D), tgWT (B, E) und tgA (C, F) Tiere. Die Alcian Blau Färbung ist in den Kontrolltieren und den tgWT Tieren gleichmäßig in der gesamten extrazellulären Matrix verteilt. Im zellnahen Bereich der Linie tgA ist sie stärker, und in einigen interterritorialen Matrixbereichen zum Teil nur sehr schwach ausgeprägt (durchgehender Pfeil). Hier wird außerdem die teilweise Aufhebung der säulenförmigen Anordnung in der Proliferationszone deutlich. Statt untereinander angeordneter Zellen zeigen sich hier größere ungeordnete Zellansammlungen (Sternchen). Die Wachstumsfuge aller Tiere ist gleichmäßig mit SafraninO gefärbt. Bei der Linie tgA reicht diese Färbung auch bis in die hypertrophe Zone hinein. Diese Zone erscheint in dieser Linie aufgelockert, was sich durch zum Teil durch größere Abstände zwischen den Zellen äußert (gestrichelter Pfeil). Maßstab: 5  $\mu$ m

Mit einer Immunfluoreszenzfärbung gegen spezifische Knorpelproteine sollte geklärt werden, ob deren Verteilung in der extrazellulären Matrix verändert war. Dramatische Änderungen der Lokalisation der verwendeten Marker konnten allerdings nicht gezeigt werden. Dennoch konnten geringfügige Veränderungen erkannt werden. So ist beispielsweise die Aggrekanfärbung in Kontrolltieren (ktr und tgWT) über die gesamte Wachstumsfuge erstreckt. Bei Mäusen mit mutierter Transgen Expression (tgA) erscheint diese Färbung im Bereich der Proliferationszone weniger deutlich ausgeprägt. Als weiteres Beispiel dienen die Matrilin-4 Färbungen. In Kontrolltieren (ktr und tgWT) erscheint sie auf die Bereiche des ruhenden Knorpels und der Proliferationszone begrenzt zu sein. Bei mutierter Transgen Expression (tgA) ist diese Färbung weniger klar abgegrenzt und reicht bis in die Hypertrophiezone.



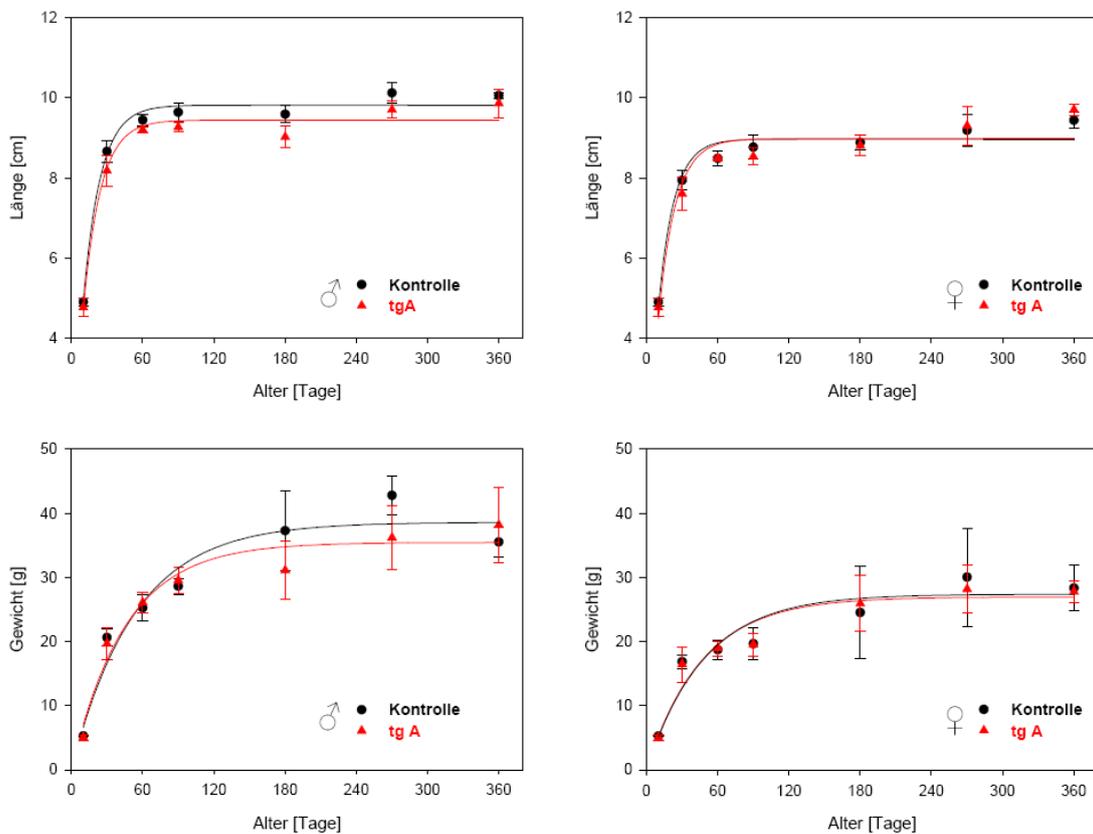
**Abb. III 34: Immunfluoreszenzfärbungen gegen spezifische Knorpelproteine**

Dargestellt sind Immunfluoreszenzfärbungen der Wachstumsfuge von Kontroll (A-E), tgWT (F-J) und tgA Tieren (K-O). Als knorpelspezifische Marker wurden Aggrekan (A, F, K), Kollagen Typ II (B,G,L), Kollagen Typ IX (C,H,M), Matrilin-3 (D, I, N) und Matrilin-4 (E, J, O) eingesetzt. Die Fluoreszenz des Alexa488 gekoppelten Sekundärantikörpers (grün) wurde am Axiophot (Zeiss) visualisiert. Die Zellkerne sind mit Bisbenzimidin gefärbt (blau). Geringe Veränderungen sind bei der Aggrekan und Matrilin-4 Färbung zu erkennen. Der Maßstab beträgt 6,25  $\mu\text{m}$ .

## 4.2. Morphometrische Analysen

### 4.2.1. Länge und Körpergewicht

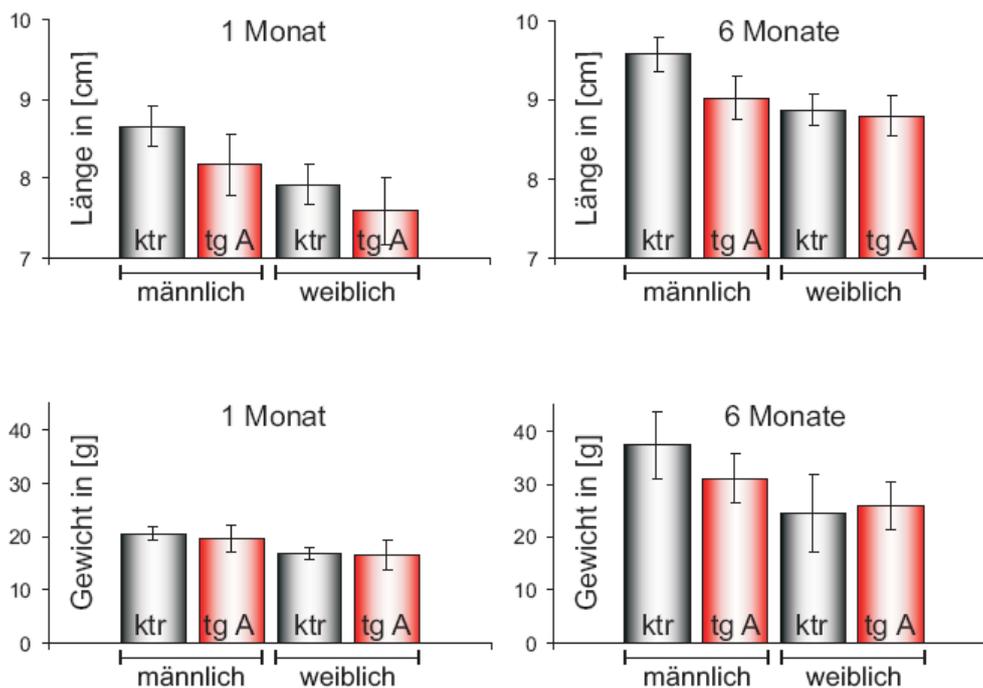
Die Körperlänge und das Körpergewicht der Mäuse wurden zu definierten Zeitpunkten gemessen. Insgesamt wurden 446 Tiere metrisch erfasst wovon 219 Tiere männlich (links) und 227 Tiere weiblich (rechts) waren. Alle zeigten ein gleichmäßiges Wachstum. In Abbildung III 35 sind Länge und Gewicht von Kontroll- und transgenen Mäusen (tgA) vergleichend dargestellt. Es konnte nur bei den männlichen Tieren der transgenen Linie ein Trend zum verminderten Wachstum festgestellt werden.



**Abb. III 35: Wachstum von Kontroll- und transgenen Mäusen**

Es wurde jeweils der Mittelwert aus Körperlänge in cm (oben) und Körpergewicht in g (unten) der Kontroll- (Punkte) bzw. transgenen, mutanten Tiere (Dreiecke) aus verschiedenen Würfen zum entsprechenden Zeitpunkt berechnet und mit Standardabweichung dargestellt. Erfasst wurde ein Zeitraum über zwölf Monaten. Die Tierzahl zu den jeweiligen Zeitpunkten lag zwischen drei und neun Mäusen. Alle Tiere zeigten ein gleichmäßiges Wachstum, wobei die männlichen Tiere (links) erwartungsgemäß schneller wuchsen als die weiblichen Tiere (rechts) und zudem eine größere Gesamtlänge erreichten. Interessanterweise war nur bei männlichen Tieren der Linie tgA ein Trend zum verminderten Wachstums zu beobachten. Beim der Gewichtsmessung wurden sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen hohe individuelle Schwankungen beobachtet.

Die unterschiedlichen Linien zeigten ein ähnliches gleichmäßiges Wachstum. Die männlichen Tiere wuchsen schneller und erreichten ein höheres Gesamtkörpergewicht als die weiblichen Tiere. In Abbildung III 36 sind die metrischen Daten nach vier Wochen und sechs Monaten gezeigt. Der Längenunterschied bei den männlichen Mäusen der Linie tgA nach sechs Monaten von etwa 6% zeichnete sich bereits tendenziell nach vier Wochen ab. Bei dem Körpergewicht zeigten sich nach sechs Monaten große individuelle Schwankungen, so dass lediglich ein Trend zu vermuten war.

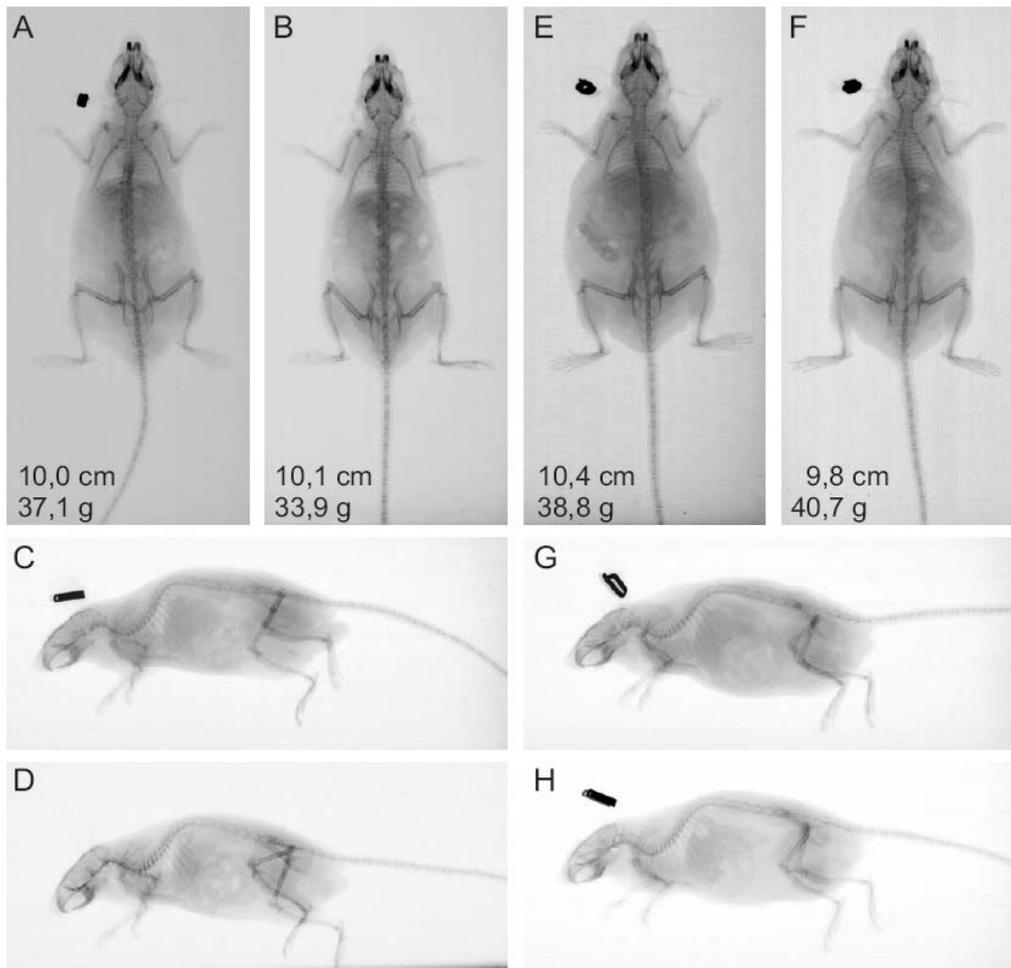


**Abb. III 36: Länge und Körpergewicht nach einem und 6 Monaten**

Körperlänge (oben) und Körpergewicht (unten) von Kontroll (schwarze Balken) und tgA Mäusen (rote Balken) nach vier Wochen und sechs Monaten. Die Längenskala wurde so gewählt, dass der Längenunterschied von 6% zwischen männlichen Kontroll- und transgenen Tieren deutlicher ist. Die Anzahl der Mäuse nach sechs Monaten betrug n=6 für männliche und n=5 für weibliche Kontrollmäuse, sowie n=5 für männliche und n=7 für weibliche transgene Mäuse.

#### 4.2.2. Radiologische Untersuchungen

Die radiologische Untersuchung von 12 Monate alten männlichen Kontroll- und mutanten Mäusen zeigte keine auffälligen Veränderungen der skeletalen Morphologie. Die Form und die Länge der langen Röhrenknochen und anderer Knochen, sowie die Knochendichte erschienen bei diesen Tieren identisch.

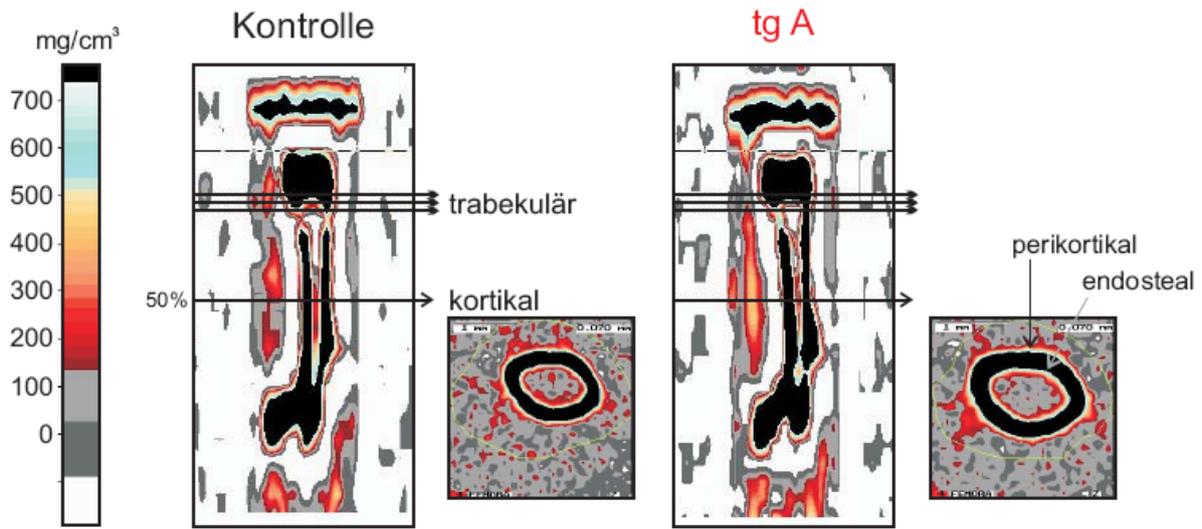


#### **Abb. III 37: Radiologische Untersuchung**

Männliche Geschwisterpaare wurden nach zwölf Monaten radiologisch analysiert. Die Röntgenbilder der beiden Kontrollmäuse (A -D) sind links, die der transgenen Mäuse der Linie tgA (E-H) sind rechts, jeweils mit Angabe der Körperlänge und des Gewichtes, dargestellt. Die Mäuse zeigen keine morphologischen Unterschiede. In Form und Länge der Knochen konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Zur detaillierten Analyse wurden skeletale Bereiche angefärbt oder für histologische Untersuchungen in Paraffin eingebettet.

### 4.2.3. Periphere Quantitative Computertomographie (pQCT)

Zur detaillierten Analyse der verschiedenen Knochenparameter wurden Messungen an Femurknochen mittels peripherer quantitativer Computertomographie (pQCT) durchgeführt. Verglichen wurden weibliche, sechs Monate alte Kontrollmäuse mit transgenen Tieren der Linie A. Die Abbildung III 38 zeigt die gewählten Meßbereiche zur Bestimmung des Mineralgehalts und der Knochendichte sowie die Bereiche zur Bestimmung von Fläche, Dicke und Umfang und Länge (Tabelle III 1) des Knochens.

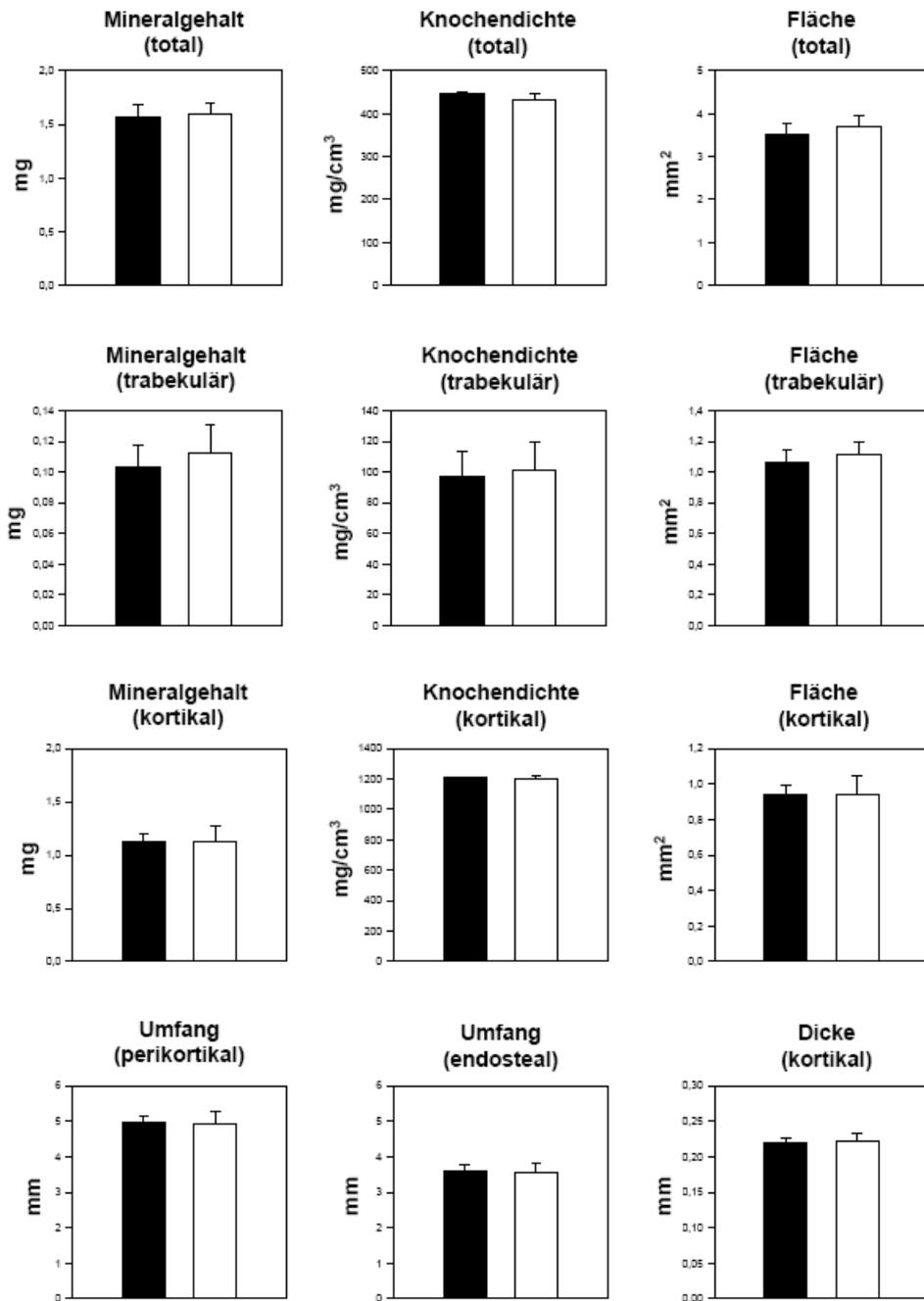


**Tabelle III 1: Länge der Femurknochen sechs Monate alter weiblicher Mäuse**

	Kontrolle	tg A
<b>Anzahl</b>	5	5
<b>Nr.1</b>	16,3	15,5
<b>Nr.2</b>	15,9	16,0
<b>Nr.3</b>	16,0	16,5
<b>Nr.4</b>	16,5	16,8
<b>Nr.5</b>	16,8	16,7
<b>Mittelwert</b>	16,3 ± 0,37	16,3 ± 0,54

**Abb. III 38: Knochendichtemessung mittels pQCT**

Die Abbildung zeigt die hier gewählten Meßbereiche. Die Länge der Femurknochen von Kontroll und transgenen mutierten Mäusen wurde bestimmt und sind in der Tabelle unten angegeben. Auf dieser Grundlage basierte die Festlegung des kortikalen Wertes im Knochenmittelpunkt und die entsprechenden Bereiche für die trabekuläre Messung. Der kleine Bildausschnitt zeigt den Querschnitt bei 50% Gesamtlänge.



**Abb. III 39: Biometrische Femurparameter von Kontroll- und transgenen Tieren**

Abgebildet sind die biometrischen Femurparameter sechs Monate alter weiblicher Kontroll- (schwarze Balken) und tgA Tiere (weiße Balken). Für den Mineralgehalt, die Knochendichte und die Fläche sind neben dem Totalwert jeweils auch die Werte für den trabekulären Knochen und des kortikalen Bereiches angegeben. Die Dicke wurde kortikal bei 50% der Gesamtlänge gemessen. Der Umfang an derselben Stelle jeweils perikortikal und endosteal. Die Werte zeigen keine signifikante Unterschiede.

#### 4.2.4. Skelettfärbungen

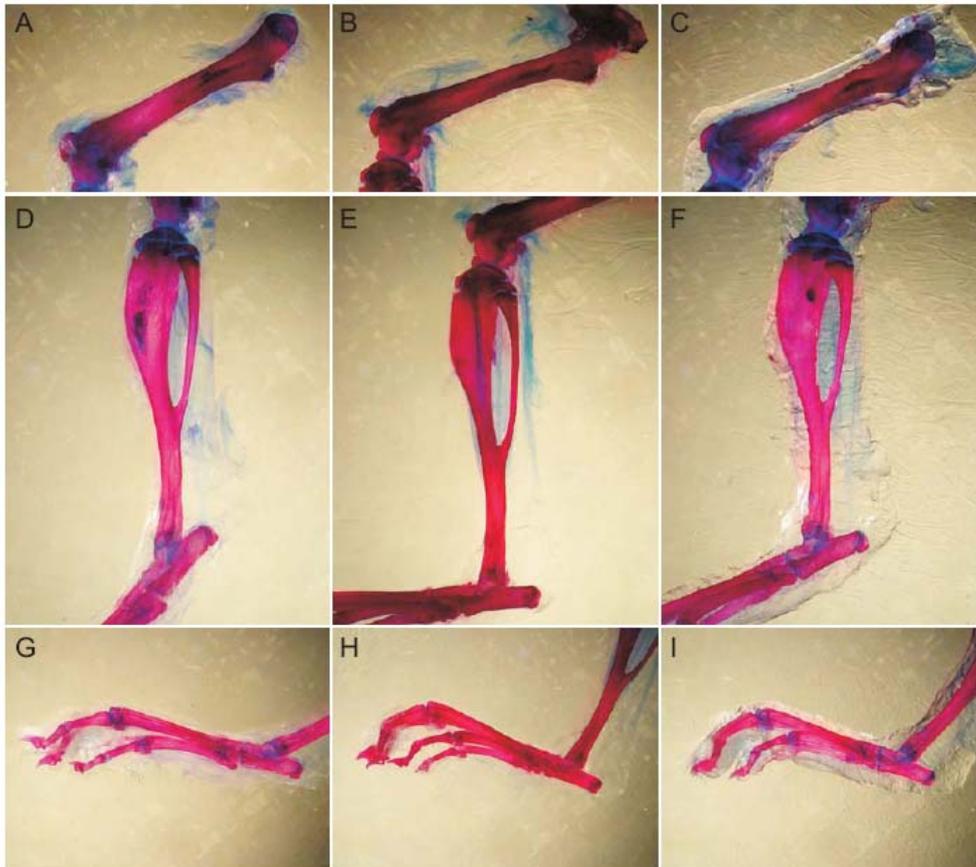
Für eine genauere morphologische Analyse des Skeletts wurden Knorpel und Knochen mit Alcian Blau und Alizarin Rot gefärbt. Sterni, Schwanz und Hinterläufen verschiedener Linien wurden zu unterschiedlichen Entwicklungsstufen verglichen.



**Abb. III 40: Knorpel-Knochen Färbung skeletaler Bereiche einer vier Wochen alten Kontrollmaus**

Abgebildet sind Brustkorb (oben links), Teil des Hinterlaufs (oben rechts), Teil des Schwanzes (unten links) und der obere Bereich der Wirbelsäule (unten rechts) einer vier Wochen alter Kontrollmaus. Knorpel wurde durch den Farbstoff Alcian Blau und Knochen durch den Farbstoff Alizarin Rot angefärbt. Besonders hervorgehoben sind beim Brustkorb das Manubrium (M), die vier Sternumsegmente (S1-S4), die fünf Rippenpaare (R1-R5) sowie der Schwertfortsatz (S). Durch Pfeile markiert sind die intersternbralen Bereiche. Beim Hinterlauf ist der Oberschenkelknochen (Fe: Femur), das Schienbein (Ti: Tibia) und das Wadenbein (Fi: Fibula) gekennzeichnet.

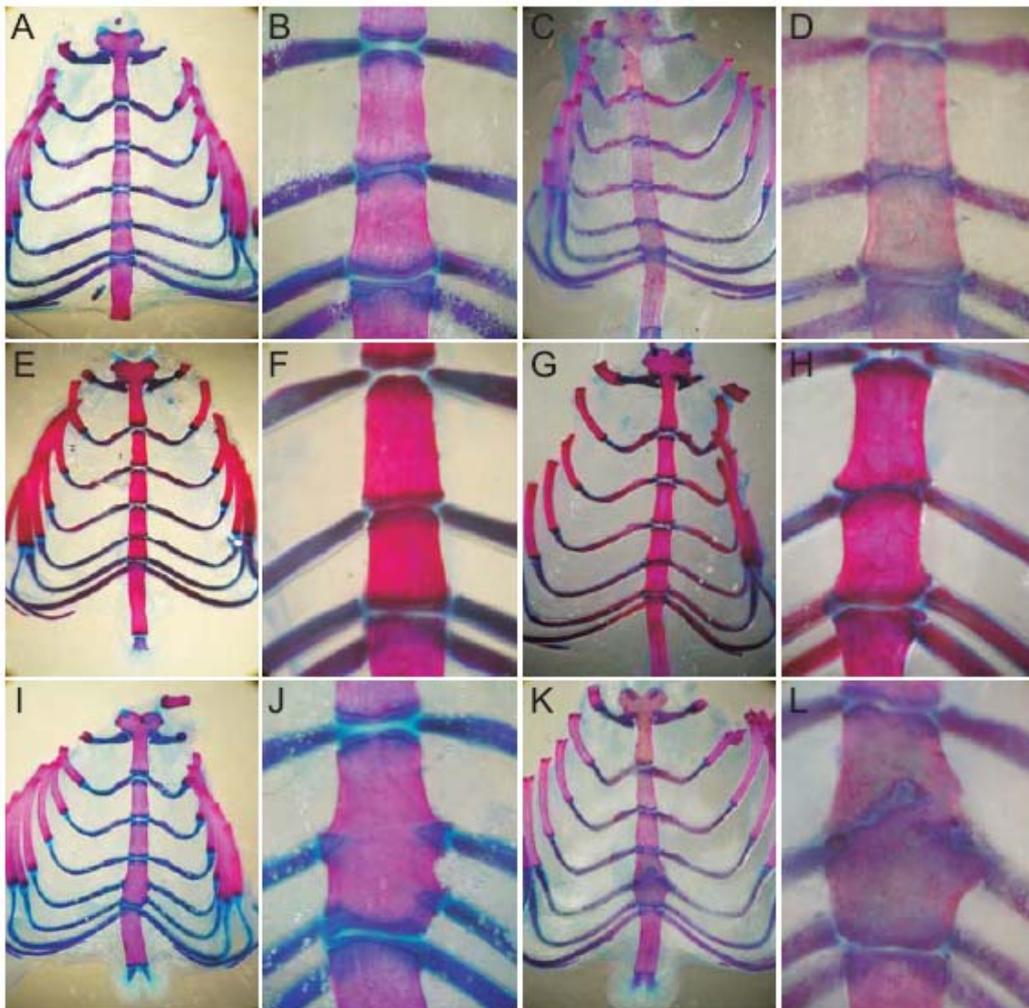
Die Knochen des Schwanzes und der Hinterläufe der transgenen Tiere zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren keine signifikante Größenunterschiede oder Fehlentwicklungen. Nur die Struktur der Knochenoberfläche von Femur, Tibia, Fibula und Tarsus der mutanten Linie erschien unregelmässig.



**Abb. III 41: Knorpel-Knochen Färbung der Hinterläufe vier Wochen alter Mäuse**

Gezeigt sind Färbungen der Hinterläufe von Kontroll (A, D, G), tgWT (B, E, H) sowie tgA Mäusen (C, F, I). Die Intensität der Färbungen ist unter anderem abhängig von der Dauer der Färbung und der Dicke des zu durchdringenden Gewebes. Unterschiede in der Farbintensität stellen hier keinen Befund dar. Die untersuchten Proben zeigten keine dramatischen morphologischen Unterschiede.

Im Fall der untersuchten Brustkörbe konnte in überdurchschnittlich vielen Fällen eine intersternbrale Fusion des dritten und vierten Segments bei transgenen mutierten Tieren beobachtet werden. Dabei waren männliche und weibliche Tiere gleichermaßen betroffen. Ebenfalls deutlich war bei diesen Tieren eine unterschiedlich stark ausgebildete Fehlstellung des Schwertfortsatzes. Dieser Phänotyp konnte nicht bei allen Tieren desselben Genotyps beobachtet werden und war außerdem unterschiedlich stark ausgebildet.



**Abb. III 42: Knorpel-Knochen Färbung von Sterni juveniler und adulter Mäuse**

Von vier Wochen alten (A, B / E, F / I, J) und neun Monate alten (C, D / G, H / K, L) Mäusen sind Übersichts-färbung des Brustkorbs und Vergrößerung des dritten und vierten Segments dargestellt. Abgebildet sind Mäuse der Kontrolllinie (A-D) sowie die transgenen Linien tgWT (E-H) und tgA (I-L). Die Intensität der Färbungen ist unter anderem abhängig von der Dauer der Färbung und der Dicke des zu durchdringenden Gewebes. Unterschiede in der Farbintensität stellen hier keinen Befund dar. Deutlich erkennbar ist eine Fusion des dritten und vierten Sternumsegmentes in tgA Tieren. Auch der Schwertfortsatz nimmt eine abnormale Position ein.

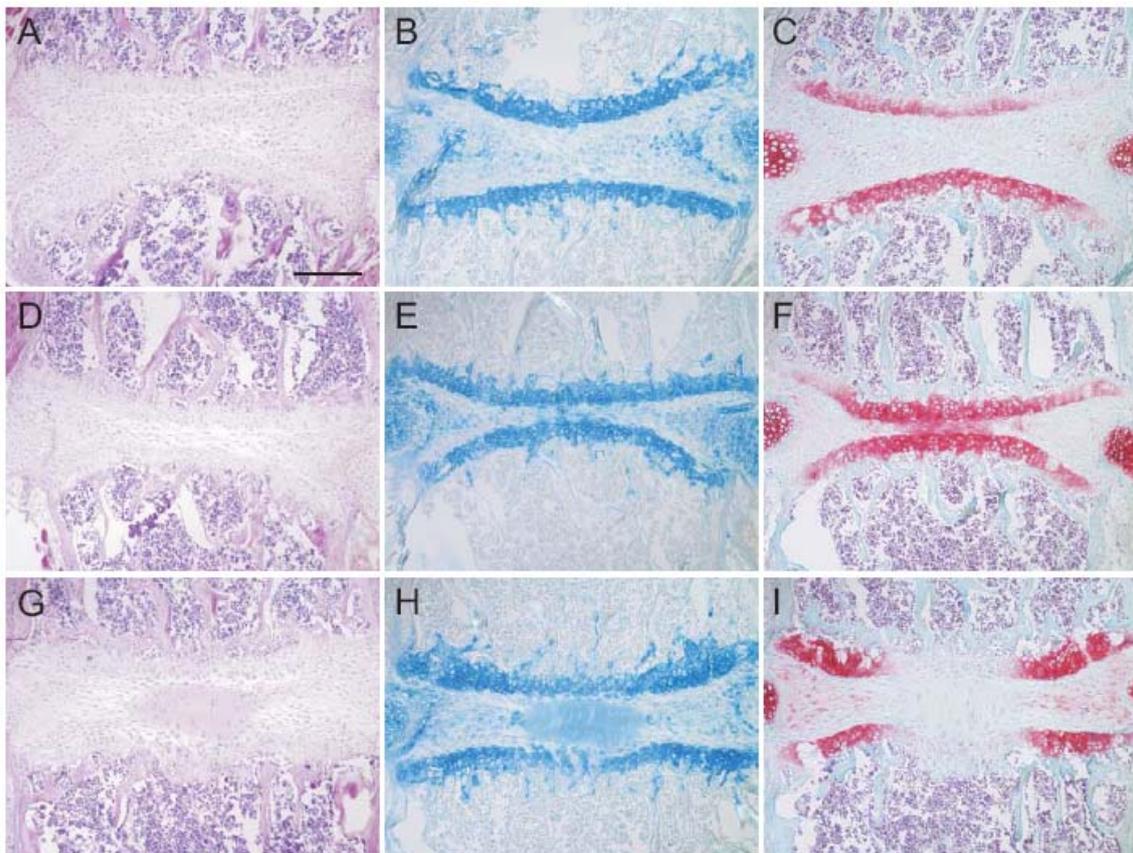
In älteren Tieren der mutierten Linie konnte zudem eine auffällige strukturelle Veränderung der entsprechenden Sternumsegmente beobachtet werden, die auch hier nicht immer mit einer Fusion einherging. Auch konnte in seltenen Fällen diese Fusion in Kontrolltieren nachgewiesen werden.

**Tabelle III 2: Fusion des dritten und vierten Sternumsegments in juvenilen und adulten Mäusen**

	Anzahl	Keine Fusion	Fusion
<b>ktr</b>	n=29	27 <b>(93%)</b>	2 <b>(7%)</b>
4 Wochen		12	0
> 6 Monate		15	2
<b>tgWT</b>	n=14	14 <b>(100%)</b>	0 <b>(0%)</b>
4 Wochen		9	0
> 6 Monate		5	0
<b>tgA</b>	n=38	23 <b>(60%)</b>	15 <b>(40%)</b>
4 Wochen		2	4
> 6 Monate		21	11
<b>ko</b>	n=13	11 <b>(85%)</b>	2 <b>(15%)</b>
4 Wochen		5	1
> 6 Monate		6	1

#### 4.2.5. Paraffinschnitte des Sternums

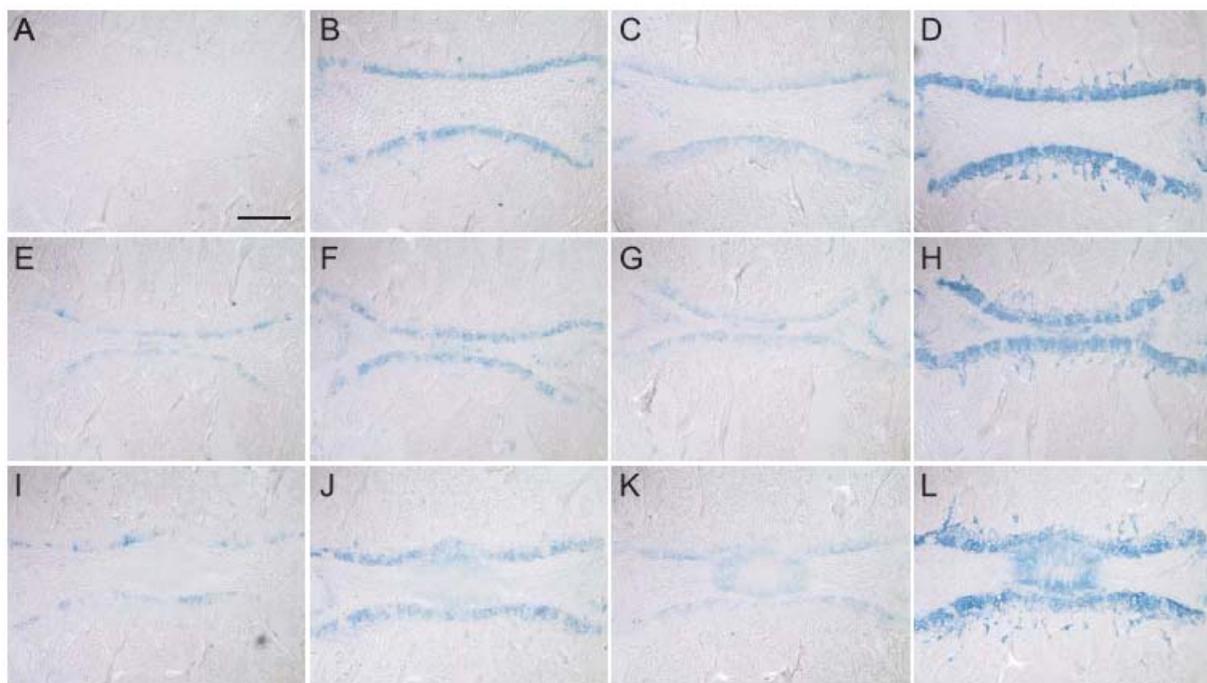
Für eine genauere Analyse auf zellulärer Ebene wurden Übersichtsfärbungen auf Paraffinschnitten angefertigt. Die strukturellen Veränderungen zwischen dem dritten und vierten Sternumsegment waren eindeutig erkennbar. Der intersternale Bereich ist mit Zellen ausgefüllt, die sich weder mit Alcian Blau noch Safranin O färben ließen. Beide Farbstoffe binden an die stark aciden Proteoglykane der ECM. Die abnormale Struktur im Inneren dieses Abschnitts in tgA Tieren scheint die umgebenen Zellanordnungen zu stören. Durch eine HE Färbung können die Knorpelzonen morphologisch eindeutig zuteilt werden. Aufgrund der Ausbreitung der veränderten Zellen zwischen den Sternumsegmenten scheinen die knorpelspezifischen Expressionsmuster in den angrenzenden Bereichen verändert zu sein, da dort die Färbung, vor allem mit Safranin O, deutlich beeinträchtigt war.



**Abb III 43: Histologische Übersichtsfärbungen der Sterni von vier Wochen alten Mäusen**

Intersternale Bereich zwischen dem dritten und vierten Sternumsegment von vier Wochen alten Kontroll (A-C), tgWT (D-F) und tgA (G-I) Mäusen. Durch die HE Färbung (links) waren die Knorpelzonen der Wachstumsfuge klar nachweisbar. Die Zellen im intersternalen Bereich ließen sich weder durch Alcian Blau (Mitte) noch durch Safranin O (rechts) anfärben. Die in tgA Tieren vorkommenden abnormal veränderten Zellen im Inneren des intersternalen Abschnitts veränderten angrenzende Zellenbereiche. Diese zeigten eine verminderte Färbung mit den proteoglykanspezifischen Farbstoffen Alcian Blau und Safranin O. Der Maßstab beträgt 50  $\mu\text{m}$ .

Mittels immunhistologischer Färbung mit Antikörper gerichtet gegen das myc Epitop und knorpelspezifische Proteine wie COMP, Kollagen II und Kollagen IX konnte diese Komponenten in den proximalen Bereichen der Segmente in den Wachstumsfugen lokalisiert werden. Der HRP-konjugierte Sekundärantikörper wurde über eine TrueBlue Färbung visualisiert. Die Kontrolllinie zeigt erwartungsgemäß kein Signal bei Detektion mit dem myc Antikörper. COMP ist dagegen eindeutig in diesen Bereichen exprimiert, genauso wie Kollagen II und IX. Die Linie tgWT zeigt eine spezifische Expression des Transgens im Bereich der Proliferationszone sowie eine deutlich gleichmäßige Verteilung in der extrazellulären Matrix. Die Lokalisation der anderen Matrixproteine ist trotz Überexpression vergleichbar mit der Kontrolllinie. In der tgA Linie ist mutiertes COMP ebenfalls in der Proliferationszone lokalisiert und zeigt auch hier die charakteristische perizelluläre Verteilung. Außerdem ist im intersternenbralen Bereich eine Ansammlung von abnormalen, sich ausbreitenden Zellen zu erkennen. Diese lassen sich mit sowohl mit COMP als auch mit den Kollagen II und IX färben.



**Abb III 44: Immunhistologische Färbungen der Sterni von vier Wochen alten Mäusen:**

Intersternobraler Bereich zwischen dem dritten und vierten Sternumsegment von vier Wochen alten Kontroll (A-D), tgWT (E-H) und tgA (I-L) Mäusen. Proteine wurden immunhistologisch mit Antikörper gerichtet gegen das myc Epitop (A, E, I), COMP (B, F, J), Kollagen II (C, G, K) und Kollagen IX (D, H, L) mittels Peroxidase basierendem Färbereagenz (True Blue) gefärbt (blau) und konnten in allen Linien deutlich in der Wachstumsfuge der Segmente nachgewiesen werden. Das Signal für transgenes Wildtyp (E) und mutiertes COMP (I) war nur in der Proliferationszone von tgWT und tg A Tieren klar nachweisbar, wobei sich bei der tgA Linie die charakteristische perizelluläre Verteilung zeigte. Die Zellen im intersternobralen Bereich brachten bei der Kontroll- und tgWT Linie kein Signal hervor. In tgA Tieren zeigten die abnormal veränderten Zellen zudem knorpelspezifische Signale für COMP sowie Kollagen II und IX.  $\Delta\epsilon\rho\text{M}\alpha\downarrow\sigma\tau\alpha\beta$ : 50  $\mu\text{m}$ .

## IV Diskussion

Die extrazelluläre Matrix des Knorpels setzt sich aus verschiedenen Kollagenen und einer Vielzahl nicht-kollagener Proteoglykanen sowie Glykoproteinen zusammen (Paulsson und Heinegård, 1984). COMP ist eines dieser nicht-kollagenen Glykoproteine der extrazellulären Matrix, das hauptsächlich im Knorpel exprimiert wird. Mutationen in COMP verursachen die autosomal dominant vererbten Knochenkrankheiten PSACH und MED (Briggs et al., 1995; Hecht et al., 1995). Bisher konnten über 70 verschiedene Mutationen im COMP Gen identifiziert werden. Davon sind über 80% in den  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden T3 Domänen lokalisiert. Etwa 20% der Mutationen betreffen die globuläre TC Domäne (Carlson et al., 2005). Die bei Patienten am häufigsten vorkommende Mutation führt zur Deletion eines Aspartats (D469 $\Delta$ ) in einer Folge von fünf aufeinander folgenden Aspartatresten in der siebten T3 Domäne von COMP (Hecht et al., 1995). Folgen solcher Mutationen sind unter anderem ein verändertes Längenwachstum der Röhrenknochen, was zum Teil zu einem dramatischen Kleinwuchs führt. Charakteristisch für Knorpelzellen aus PSACH Patienten sind stark vergrößerte Zisternen des rER, die bei elektronenmikroskopischer Analyse lamelläre oder granuläre Einschlüsse bzw. Inklusionen aufweisen. Diese zum Teil cytotoxisch wirkenden Inklusionen konnten als Akkumulationen von Matrixproteinen wie COMP und Kollagen IX und Chaperonen identifiziert werden. Bisher konnten solche Akkumulationen nicht in anderen Zelltypen wie beispielsweise in Sehnen oder Bändern nachgewiesen werden (Maynard et al., 1972; Cooper et al., 1973; Stanescu et al., 1982a, b, 1993; Cohn et al., 1996; Maddox et al., 1997; Délot et al., 1998, 1999; Hecht et al., 1998, 2001; Stevens, 1999; Vranka 2001). Bei Kultivierung von Knorpelbiopsien von PSACH Patienten konnten solche charakteristische Einschlüsse im rER erst beobachtet werden, als die Zellen über einen längeren Zeitraum in einer dreidimensionalen Matrix wuchsen. Diese rER Inklusionen wurden allerdings auch dann nicht in kultivierten Zellen aus Sehnen und Bändern beobachtet (Délot et al., 1998, 1999; Hecht et al., 1998). Unbeantwortet bleibt bislang, wie verschiedene Mutationen in unterschiedlichen Domänen von COMP die unterschiedlich schwer ausgeprägten Krankheitsbilder auslösen können. Da PSACH autosomal dominant vererbt wird, ist nur ein Allel des COMP Gens betroffen. Ob mutierte COMP Untereinheiten zusammen mit Wildtyp COMP Untereinheiten gemischte Pentamere bilden, konnte im Patienten bislang nicht geklärt werden, da eine Unterscheidung zwischen Wildtyp und mutierten COMP Molekülen

nicht möglich ist. Im Zellkulturmodell mit doppelt-transfizierten HEK-293 Zellen konnte zumindest die Assemblierung von rekombinanten Wildtyp und mutanten COMP Monomeren zu gemischten Pentameren gezeigt werden (Holden et al., 2005). Unklar bleibt aber, welche Rolle die Zusammensetzung der Pentamere für die Sekretion bzw. Retention spielt und ob der Phänotyp ausschließlich durch die Retentionen in den erweiterten rER Zisternen hervorgerufen wird. Zusätzlich denkbar ist auch ein extrazellulärer Effekt. Im Zellkulturmodell konnte gezeigt werden, dass in der T3 Domäne mutiertes COMP verzögert aber letztlich doch in geringen Mengen in das Zellkulturmedium sekretiert wird (Dinser et al., 2002). Im Knorpel von PSACH Patienten konnten zudem geringe COMP Mengen auch in der Matrix nachgewiesen werden (Hecht et al., 2004). Die direkte Interaktion von COMP mit einer Reihe anderer Knorpelproteine wie Matrilin-1, -3 und -4 (Mann et al., 2004), Fibronectin (DiCesare et al., 2002), Kollagen I, II und IX sowie Prokollagen I und II wurde bereits nachgewiesen (Rosenberg et al., 1998; Thur et al., 2001). Außerdem katalysiert pentamerer COMP die Fibrillogenese von Kollagen I und II (Rosenberg et al., 2001). Mutiertes COMP könnte ursächlich für die in lichtmikroskopischen Untersuchungen gezeigten veränderten Knorpelzellenmatrices mit schlecht ausgeprägten Kollagenfibrillen verantwortlich sein (Heselson et al., 1977; Cohn, 1996; Stevens 1999). COMP defiziente Mäuse zeigen keinen skeletalen Phänotyp. Das Wachstum und die Entwicklung der Röhrenknochen waren normal. Außerdem konnte keine veränderten Kollagenfibrillen nachgewiesen werden. Die Expressionsraten anderer TSPs blieben unverändert (Svensson et al., 2002). Ein völliges Fehlen von COMP wird offensichtlich kompensiert wenn auch ungeklärt bleibt wodurch.

Die in PSACH Patienten am häufigsten identifizierte Deletionsmutante D469 $\Delta$  ist in der Literatur am ausführlichsten beschrieben und daher im Rahmen dieser Arbeit in transgenen Expressionssystemen sowohl in der Zellkultur als auch im Mausmodell untersucht worden. In Patienten konnten Sekretionsstörungen nur in den Zellen des Knorpels und nicht in Zellen der Sehnen und Bänder beobachtet werden. Daher wurden rekombinante Wildtyp und mutierte COMP Varianten in primären Knorpelzellen transgen exprimiert. Im Vordergrund stand zunächst die Analyse der Sekretion mit Schwerpunkt auf die Sekretionskinetik und die subzelluläre Lokalisation.

# 1. Transgene Expression im Zellkulturmodell

Die COMP Konstrukte wurden in den Plasmid Vektor pCEP-Pu kloniert, wo sie unter der Kontrolle des viralen CMV Promotors exprimiert werden. Die Zielsteuerung des rekombinanten COMP in das ER Lumen wird durch Verwendung eines BM-40 Signalpeptids erreicht. Die Konstrukte sind zur spezifischen Detektion zusätzlich mit einem his<sub>6</sub>-myc tag versehen. Neben dem COMP Wildtyp Konstrukt wurden verschiedene Mutationen ausgewählt, die in unterschiedliche Domänen von COMP liegen. In der vorliegenden Arbeit sind nur Ergebnisse der PSACH verursachenden Deletionsmutante D469Δ gezeigt.

Als Monolayer kultivierte primäre bovine artikuläre Knorpelzellen verändern innerhalb weniger Wochen ihre Morphologie und ihr biosynthetisches Profil, was sich unter anderem in einer verminderten Expression von Kollagen II und IX sowie COMP äußert. Durch die fortschreitende Dedifferenzierung gleichen sich die Knorpelzellen einem fibroblastenähnlichen Zelltyp an (Abbott und Holtzer, 1966; Benya et al., 1978; Benya und Schaffer, 1982; Zaucke et al., 2001). Deshalb wurden die in dieser Arbeit verwendeten Knorpelzellen zur Untersuchung der Sekretionskinetik und subzellulären Lokalisation nie länger als zwei Wochen im Monolayer kultiviert. Die bovinen artikulären Knorpelzellen sind für diese Untersuchung als Modell besonders geeignet. Sie besitzen den knorpelspezifischen Phänotyp, weshalb relevanten Faktoren zur Sekretion von COMP vorausgesetzt werden können. Der Vergleich von intra- und extrazellulären COMP Mengen wird dadurch erleichtert, dass Zellen aus adulten Tieren nur ein geringes Potential zur Bildung kollagener Netzwerke besitzen. Sekretiertes COMP kann quantitativ aus dem Kulturmedium nachgewiesen werden. Mögliche Verluste durch die Bindung an eine extrazelluläre Matrix können ausgeschlossen werden. Intrazelluläres Material wird aus dem Lysat der Zellen gewonnen. Die intra- und extrazelluläre Verteilung von transgenem Wildtyp und mutiertem COMP wurde in einem Zeitraum von bis zu fünf Tagen nach Transfektion untersucht. Nach fünf Tagen wurde der größte Anteil der synthetisierten Wildtyp COMP Untereinheiten im Medium detektiert, was eine kontinuierliche Sekretion des Proteins demonstriert. Dahingegen lag das Verteilungsverhältnis der Untereinheiten der D469Δ COMP Variante mit fortschreitender Zeit mehr auf Seiten des Zellen-Lysats, was auf eine Retention der mutierten Untereinheiten schließen ließ. Eine genauere Untersuchung der Retention mit der Möglichkeit zur Quantifizierung wurde durch ein Pulse-Chase Experiment erreicht. Die Sekretionskinetik wurde detailliert bis zu 24 Stunden nach Chase untersucht. Die Wildtyp COMP Variante wurde kontinuierlich in das Medium sekretiert, wobei gleichzeitig die COMP Menge in den

Zellen abnahm. Im Vergleich dazu zeigte die D469 $\Delta$  COMP Variante deutliche Unterschiede in der Sekretionskinetik. Im gleichen Zeitraum wurden ein weitaus geringerer COMP Anteil in das Medium sekretiert.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Sekretion von mutierten COMP Varianten im Vergleich zum Wildtyp gestört ist. Dieser Mechanismus wurde auch bei Erkrankungen festgestellt, die durch Mutation in anderen extrazellulären Strukturproteinen wie beispielsweise Kollagen II und IX (Bönnemann et al., 2000; Gilbert-Barnes et al., 1996; Zabel et al., 1996) oder Matrilin-3 (Otten et al., 2005; Cotterill et al., 2005) verursacht werden. Um zu klären, ob Signale von transgenen COMP Varianten bestimmten Kompartimenten der Knorpelzelle vermehrt zugeordnet werden können, wurde zwei Tage nach Transfektion eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Sekretionsproteine werden nach ihrer Translation am rER auf cytosolischer Seite in das Lumen des rER translociert. Bereits dort werden sie posttranslational modifiziert und gelangen anschließend in den Golgi Apparat wo weitere Modifikationen stattfinden. Abschließend gelangt das Protein in die extrazelluläre Matrix. Als Markerproteine für das ER wurde die Proteindisulfidisomerase (PDI) und für den Golgi Apparat das 58K Protein verwendet. Die transgenen COMP Varianten wurden spezifisch über das myc Epitop detektiert und die Fluoreszenzfärbung am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop dokumentiert. Die normal sekretierte Wildtyp Variante zeigt eine deutliche Kolokalisation mit dem Golgi Marker. Die verzögerte Sekretion der D469 $\Delta$  Variante resultiert in einer deutlichen Kolokalisation mit dem ER. Außerdem wurde zwei Tage nach Transfektion kein Signal im Golgi detektiert, was bedeutet, dass diese mutierte COMP Variante das ER noch nicht passiert hat. Außerdem konnten in unmittelbarer Umgehung der Zellen granuläre Ablagerungen detektiert werden, die möglicherweise auf extrazellulär aggregierte COMP Moleküle zurückzuführen sind. Dieses Resultate konnten sowohl in murinen Knorpelzellen aus C57Bl/6 Mäusen als auch in Zellen aus COMP Knockout Mäusen reproduziert werden.

Die Retention des mutierten Proteins bestätigt grundsätzlich die Beobachtungen, die nach adenoviraler Infektion boviner Knorpelzellen mit der Deletionsmutante D469 $\Delta$  in einer dreidimensionalen Langzeitkultur gemacht wurden. Neben dieser Sekretionsverzögerung konnten zudem mutierte COMP Moleküle mit den Chaperonen Grp78 und Calreticulin assoziiert im ER nachgewiesen werden. Bei der Analyse von einzelnen transzfizierten Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung war zumindest die Morphologie der Zellen nicht beeinträchtigt. Weitere Untersuchungen mittels Vitalitätstests gesamter plasmidtransfizierter Kulturen weisen jedoch auf eine leicht reduzierte Vitalität hin (Schmitz et al., 2005). Die Toxizität ist sehr wahrscheinlich von der Expressionsrate abhängig (Dinser et al., 2002). Die

extrazelluläre Matrix war durch amorphe Aggregate und dünne Kollagenfibrillen gekennzeichnet (Dinser et al., 2002). In diesem Zusammenhang ist eine näher gehende Untersuchung der extrazellulären Auswirkungen von besonderem Interesse.

Zur Detektion von extrazellulärem Wildtyp bzw. mutiertem COMP wurden Knorpelzellen aus COMP Knockout Mäusen isoliert und mit entsprechenden COMP Varianten transfiziert. Diese Zellen exprimieren kein endogenes COMP und besitzen ein großes Potential zur Ausbildung kollagener Netzwerke. Die Wildtyp COMP Variante konnte sowohl intrazellulär als auch im Kollagennetzwerk nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass Wildtyp COMP mit einer gegebenen Kollagenmatrix interagiert. Im Gegensatz hierzu konnte die mutierte COMP Variante vorwiegend intrazellulär nachgewiesen werden. Eine Assoziation mit der kollagenen Matrix war kaum nachweisbar. Obwohl mutiertes COMP verzögert sekretiert wird, gelangt ein Teil in den extrazellulären Raum. Allerdings scheint dieser Anteil im Gegensatz zu Wildtyp COMP nicht mit der kollagenen Matrix assoziiert zu sein, sondern sich löslich im Kulturmedium zu befinden. Möglicherweise besitzt mutiertes COMP ein eingeschränktes Potential zur Bindung an die extrazelluläre Matrix.

Dass COMP in Zellen von PSACH Patienten in Einschlüssen des rERs zurückgehalten wird, wurde zudem in verschiedenen Arbeiten gezeigt (Cooper et al., 1973; Maynard et al., 1972; Stanescu et al., 1993). Ob eine rER Retention die prinzipielle Folge einer Mutation ist, konnte bislang nicht ausreichend geklärt werden. Von den mehr als 70 beschriebenen PSACH und MED verursachenden Mutationen in COMP wurde nur etwa acht mittels EM auf rER Einschlüsse hin untersucht. Alle beschriebenen Mutationen waren zudem in den T3 Domänen lokalisiert. Bislang wurde kein vergleichbarer Phänotyp nachgewiesen, der durch eine Mutation innerhalb der TC Domäne hervorgerufen wird. Eine weitere in dieser Arbeit verwendete COMP Variante (H587R) liegt in der Kollagen bindenden Region der TC Domäne von COMP. Diese Mutation zeigt eine Sekretionskinetik, die dem Wildtyp sehr ähnlich ist. Zudem konnte mittels Immunfluoreszenzfärbung keine Kolo-kalisation mit dem ER festgestellt werden.

Problematisch bei der Interpretation dieser Beobachtungen könnte die Verwendung des BM-40 Signalpeptids in den verwendeten COMP Konstrukten sein. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde die Sekretion von Wildtyp und mutierten COMP Varianten in Rattenchondrosarcom Zellen (RCS Zellen) und menschlichen Nierenzellen (HEK-293 Zellen) verglichen. Hier beinhalteten die Konstrukte entweder das endogene COMP Signalpeptid oder das in der vorliegenden Arbeit verwendete BM-40 Signalpeptid. Bei Verwendung des endogenen Signalpeptids konnte eine Retention auch in der nicht knorpelspezifischen

Zelllinie beobachtet werden. Bei der Verwendung des BM-40 Signalpeptids wurde diese Retention deutlich abgeschwächt (Holden et al., 2005). Zwar wird die Retention durch Verwendung des BM-40 Signalpeptids nicht grundsätzlich unterdrückt, doch könnte die Abschwächung eines ohnehin moderaten Phänotyps möglicherweise durch die Verwendung eines ungeeigneten Signalpeptids maskiert werden. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Deletionsmutante D469 $\Delta$  zeigt in primären Knorpelzellen jedoch selbst unter Verwendung des BM-40 Signalpeptids eine eindeutige intrazelluläre Retention. In zukünftigen Untersuchungen auch anderer Mutationen sollte allerdings die Verwendung des Signalpeptids überdacht werden

Die erweiterten rER Zisternen sind bei kultivierten PSACH Knorpelzellen erst nach Wochen zu erkennen. Da es auch nicht zu einer vollständigen Verhinderung der Sekretion kommt, gelangt immer eine gewisse COMP Menge in die extrazelluläre Matrix. Neben der Interaktion mit verschiedenen Matrixmolekülen hat COMP auch eine katalytische Wirkung auf die Fibrillogenese von Kollagen I und II. Beobachtungen von abnormalen dicken Kollagenfibrillen im PSACH Gewebe oder von amorphen Aggregaten in Zellkulturmodellen unterstreichen eine mögliche zusätzliche extrazelluläre Wirkung (Cohn et al., 1996; Dinser et al., 2002). Zurzeit wird als Ursache von PSACH vor allem die Folge der cytotoxisch wirkenden intrazellulären Einschlüsse in Knorpelzellen von Patienten spekuliert. Ein zusätzlicher extrazellulärer Effekt könnte möglicherweise durch Rückkopplungsmechanismen von der Matrix zur Zelle erklärt werden, auch wenn Akkumulationen ausbleiben. Beispielsweise wird der Lebenszyklus von Osteoblasten unter anderem durch unbesetzte Integrin Rezeptoren ( $\alpha_v\beta_3$ ) reguliert. Dadurch werden positive Apoptosesignale an die Zelle weitergegeben (Zhao et al., 2005). Vorstellbar ist ein solcher Mechanismus auch in Zusammenhang mit COMP Mutationen, die normal sekretiert werden. Sowohl synoviale Fibroblasten als auch Knorpelzellen können mittels Integrin-Rezeptoren ( $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_5\beta_1$ ) an COMP binden (Neidhart et al., 2005, Chen et al., 2005). Dass eine über  $\beta$ -Integrine vermittelte Interaktion vor allem mit Kollagen II entscheidend ist für das Überleben der Knorpelzelle konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden (Cao et al., 1999; Hirsch et al., 1997). Eine Degradierung der extrazellulären Kollagenmatrix induziert zudem Apoptose in Knorpelzellen (Lo et al., 2004). Mutiertes COMP kann möglicherweise nicht mehr an die entsprechenden Rezeptoren binden, oder zur Ausprägung einer schlecht organisierten extrazelluläre Matrix beitragen (Cohn et al., 1996; Dinser et al., 2002), und so Einfluss auf die Vitalität der Knorpelzelle nehmen. Die Struktur und Organisation der Wachstumsfuge könnte deshalb gestört sein, weil Zellen aufgrund von Retentionen oder negativen Matrix-Zellen Signalen unkontrolliert

absterben (Duke et al, 2003; Hecht et al., 2004; Hashimoto et al., 2003). Da Zellen aber ständig neu aus der ruhenden Knorpelzone hervorgehen, wird möglicherweise die Säulenstruktur in der Proliferationszone unregelmäßig, und das lineare Wachstum ist dadurch gestört.

Die Untersuchung extrazellulärer Mechanismen im Zellkulturmodell ist nur begrenzt möglich. Die Herstellung einer äquivalenten Knorpelmatrix wäre Voraussetzung, da zur genaueren Analyse eine gewebespezifische Einbettung der Zellen notwendig ist. Deshalb wurde der Ansatz einer transgenen Maus mit knorpelspezifischer Expression einer PSACH verursachenden COMP Mutation gewählt. Durch Verwendung his<sub>6</sub>-myc markierter COMP Konstrukte kann nun auch *in vivo* zwischen Wildtyp und mutierten Molekülen unterschieden werden.

## 2. Transgene Expression in der Maus

In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass die skeletale Entwicklung in COMP Knockout Mäusen nicht gestört ist (Svensson et al., 2002). Ein Fehlen von COMP führt zu keinem chondrodysplasie-ähnlichen Phänotyp. Im Patienten sind Mutationen in COMP jedoch verantwortlich für die Krankheiten PSACH und MED. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit als experimenteller Ansatz die Generierung transgener Mäuse mit einer PSACH verursachenden Mutation in COMP gewählt. Die grundsätzlichen Vorteile dieser Methode sind die knorpelspezifische Expression und die Verwendung von myc markierten Konstrukten. Die gewebespezifische Expression erlaubt einen Focus auf relevante Bereiche und schließt auch Überexpressionseffekte in Geweben aus, die normalerweise kein COMP exprimieren. COMP wird hauptsächlich im Knorpel exprimiert, weshalb eine physiologische Funktion vor allem dort zu erwarten ist. Patienten zeigen zudem charakteristische Veränderungen in den knorpeligen Geweben. Diese gewebespezifische Expression wird durch Verwendung des Kollagen II Promotors der Maus erreicht. Die Aktivität und spezifische Expression wurde bereits früher dokumentiert. Etwa 12,5 Tage postcoitum, zu einem Zeitpunkt an dem die meisten Knorpelanlagen bereits gebildet wurden, konnte eine Col2a1 Aktivität unter anderem in den Extremitäten, den Wirbelkörpern und in den Rippen nachgewiesen werden (Sakai et al., 2001). Die Expressionsmuster von Col2a1 und COMP sind vergleichbar und überschneiden sich zeitlich und räumlich. Die Expression von COMP startet zu einem vergleichbar frühen Zeitpunkt der Entwicklung nach etwa 10 Tagen postcoitum (Tuan, 2004). Im adulten Knochen ist die Expression von Col2a1 und COMP auf

den artikulären Knorpel und die Knorpelregion in der Metaphyse konzentriert. In der Wachstumsfuge ist die Expression vor allem auf die Proliferationszone begrenzt (Forriol und Shapiro, 2005). Aufgrund der Verwendung eines myc Tags kann *in vivo* zwischen endogenem und transgenem COMP unterschieden werden, was im Patienten nicht möglich ist. Die Mäuse wurden im genetischen Hintergrund des C57Bl/6 Mausstammes gezüchtet. Hergestellt wurden Linien mit integrierten Wildtyp Transgen Konstrukten (tgWT) sowie Linien mit einer hohen Anzahl mutierter Transgen Konstrukte (tgA) und einer niedrigen Anzahl mutierter Transgen Konstrukte (tgB). Als Kontrolle dienten Mäuse ohne Transgen Konstrukte (ktr).

Im Folgenden wird zunächst die quantitative Auswertung der Transgenexpression in den verschiedenen Mauslinien beschrieben sowie auf die proteinbiochemische Charakterisierung knorpeliger Gewebe eingegangen. Anschließend folgt die Diskussion der morphologischen, radiologischen, computertomographischen und histologischen Analysen.

### **Transgenexpression in unterschiedlichen Mauslinien**

Die transgene Expression von COMP ist unter anderem abhängig von der Aktivität des knorpelspezifischen murinen Col2a1-Promotors. Weiterhin sind aber auch Anzahl der Transgen Kopien sowie der jeweilige Integrationsort mitentscheidend. Die zufällige Integration von Transgen Kopien in das Mausgenom ist aufgrund des sogenannten „Positionseffekts“ von besonderer Bedeutung. Ungünstige Chromatinstrukturen oder Methylierungsmuster können eine transgene Expression verhindern. Die Anzahl der integrierten Kopien ist daher nicht zwangsläufig proportional zur Proteinexpression. Die Kontrolle der Expression auf Ebene der Transkripte und vor allem auf Ebene der Proteinsynthese ist essentiell (Schenkel, 1995). Auf RNA Ebene konnten Transkripte der Transgen Kopien mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Die gewonnene Gesamt-RNA wurde nach reverser Transkription zur weiteren Analyse in einer PCR eingesetzt. Das Oligonukleotidpaar wurde so gewählt, dass ein Transgen spezifischer Abschnitt flankiert wurde. Zur semiquantitativen Analyse der COMP Transkripte wurden Oligonukleotidpaare gewählt, die unterschiedliche Exonbereiche von COMP flankieren. Die Transkriptionsrate wurde mittels GAPDH Expression normiert. Im Vergleich zur Kontrolllinie ohne Transgen konnte eine um den Faktor 1,8 erhöhte COMP Transkript Menge in den transgenen Linien nachgewiesen werden. Im Patienten ist nur ein Allel des COMP Gens mutiert, weshalb wahrscheinlich die Mengen an Wildtyp und mutiertem COMP im Verhältnis 1:1 vorliegen. In diesem Zusammenhang ist aber vor allem das Verhältnis auf Protein Ebene von

entscheidender Bedeutung. So sollte analysiert werden, in welcher Größenordnung transgenes COMP in den Mäusen überexprimiert wird, und ob die COMP Mengen aus den tgWT und tgA bzw. tgB Linien miteinander vergleichbar sind. Weiterhin sollte untersucht werden, ob transgene COMP Monomere zu pentameren Molekülen assemblieren. Zum Nachweis und zur Quantifizierung von transgenem COMP wurde eine Proteinextraktion in einem EDTA enthaltenen Puffer durchgeführt. COMP löst sich unter diesen Bedingungen aus dem Gewebe (Mörgelin et al., 1992). Zunächst wurde die Gesamtmenge von COMP in Kontroll- und transgenen Mäusen quantifiziert und verglichen. Als Kontrolle diente hier Gewebe aus Mäusen ohne Transgen sowie aus COMP Knockout Mäusen. Die Quantifizierung ergab in beiden transgenen Linien eine vergleichbare Erhöhung der gesamten COMP Menge um den Faktor 1,3. Das angestrebte Mengenverhältnis von 1:1 zwischen endogenem und mutiertem COMP, wie es auch im Patienten erwartet wird, konnte somit nicht erreicht werden. Es konnten aber immerhin Linien generiert werden, die das Wildtyp (tgWT) bzw. transgene COMP (tgA) in einer vergleichbaren Menge exprimieren. In späteren Untersuchungen kann daher die tgWT Linie als geeignete Kontrolle angesehen werden. Im Immunoblot mit einem gegen das myc Epitop gerichteten Antikörper wurden spezifische Signale ausschließlich in den transgenen Linien sowohl für COMP Monomere als auch für Pentamere detektiert. Die Kontrolllinien ohne Transgen zeigten erwartungsgemäß kein Signal. Daraus kann gefolgert werden, dass transgene Monomere zumindest in Pentamere eingebaut werden und die Pentamerisierung selbst prinzipiell nicht beeinträchtigen. Die Frage, ob es sich dabei ausschließlich um reine transgene Pentamere handelt, die nur myc markierte Wildtyp bzw. mutierte Untereinheiten besitzen, oder um gemischte Pentamere zusammengesetzt aus transgenen und endogenen COMP Molekülen wurde in einem weiteren Experiment geklärt. Die Proteinextrakte wurden mit einem an Protein A Agarose gekoppelten myc Antikörper inkubiert. Dadurch wurden ausschließlich diejenigen COMP Pentamere präzipitiert, die mindestens eine transgene Untereinheit mit myc tag besaßen. Alle Homopentamere aus endogenen Untereinheiten wurden hier nicht erfasst. Nach Reduktion zerfallen diese Moleküle in ihre Untereinheiten und unterscheiden sich nach Auftrennung in einer reduzierenden SDS-PAGE durch ihre unterschiedliche Laufhöhe aufgrund des Tags. Im Immunoblot konnten mit einem gegen COMP gerichteten Antikörper jeweils beide Banden detektiert werden. Als Kontrolle wurde eine Probe aus einer Transgen exprimierenden COMP Knockout Maus verwendet, die erwartungsgemäß nur eine Bande auf entsprechender Höhe zeigte. COMP Pentamere in transgenen Tieren sind also zumindest zum Teil Hybridmoleküle, bestehend aus endogenen und transgenen Monomeren. Interessanterweise kann ein pentamerer Molekül aus mutierten und Wildtyp

Monomere bestehen. In COMP Knockout Mäusen assemblieren ausschließlich mutierte Untereinheiten zu Pentameren. Im Patienten würden bei angenommener gleicher Transkriptions- und Translationsrate mutierte Monomer im Vergleich mit Wildtyp Monomeren mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 97% in die Pentamere eingebaut werden. Als Folge würden entsprechend nur etwa 3% aller COMP Pentamere ausschließlich Wildtyp bzw. mutierte COMP Monomere enthalten. Alle anderen COMP-Pentamere enthielten mindestens eine mutierte Untereinheit (Hecht et al., 1995; Maddox et al., 1997). In den vorliegenden transgenen Mauslinien liegt endogenes und transgenes COMP nicht im Verhältnis 1:1 vor, sondern die Menge des transgenen COMP ist deutlich geringer als die Menge des endogenen COMP. Als Folge entstehen hier weitaus mehr Pentamere die ausschließlich aus endogenen COMP Monomeren bestehen bzw. weniger als 3% würden ausschließlich aus mutierten Untereinheiten bestehen. Das könnte den hier unerwartet schwachen Phänotyp auf molekularer Ebene erklären.

### **Biochemische Charakterisierung von Knorpelgewebe**

Erste Hinweise auf Auswirkungen mutierter COMP Moleküle wurden in der biochemischen Analyse mittels sequentieller Proteinextraktion aus knorpeligem Gewebe neugeborener Mäuse gefunden. Dazu wurden Gewebeextrakte zuerst in einer neutral gepufferten Salzlösung inkubiert. Anschließend werden sie nacheinander in Pufferlösungen mit jeweils zusätzlichen Mengen an EDTA bzw. Guanidin inkubiert. COMP wurde mit dieser Methode erstmals aus einem Ratten Chondrosarkom isoliert, wobei große Mengen im EDTA haltigen Extraktionspuffer vorhanden war. Kleinere Mengen an COMP wurden aber auch im neutral gepuffertem Salzpuffer und im guanidinhaltigen Puffer gefunden (Mörgelin et al., 1992). Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Ergebnisse mit Knorpelgewebe von genetisch identischen Kontrolltieren reproduziert werden. Auch hier war der größte COMP Anteil im EDTA haltigen Extraktionspuffer gelöst. Geringe Mengen waren ebenfalls im neutral gepuffertem Salzpuffer und im guanidinhaltigen Puffer detektierbar. Eine veränderte Extrahierbarkeit kann durch veränderte Interaktionseigenschaften von mutierten Proteinen oder das Fehlen von Interaktionspartnern erklärt werden. In früheren Untersuchungen an Knockout Mäusen konnten durch den Mangel an einem knorpelspezifischen Protein, zum Teil Unterschiede im Extraktionsverhalten anderer Knorpelproteine festgestellt werden. In der Kollagen IX Knockout Maus ist ein Unterschied in der Extrahierbarkeit von Matrilin-3 festgestellt worden. Durch die fehlende Verankerung des Proteins in der Matrix wurde Matrilin-3 leichter aus dem Gewebe freigesetzt (Budde et al., 2005). Dahingegen konnten in

der Matrilin-3 Knockout Maus keine Veränderungen bei der Extrahierbarkeit von Knorpelkomponenten festgestellt werden (Ko et al., 2004). Im COMP Knockout gibt es zur Extrahierbarkeit anderer Proteine keine Untersuchungen. Interessant in diesem Zusammenhang war nun, ob eine zusätzliche Menge an Wildtyp oder auch mutiertem COMP einen ähnlichen Effekt in den transgenen COMP Mäusen zeigt. Falls transgenes COMP äquivalent zu endogenem COMP extrahierbar ist, ist bei einer Überexpression von COMP in transgenen Mäusen ein gleichmäßiger Anstieg in allen drei Fraktionen zu erwarten. Dies konnte bei der Überexpression von Wildtyp COMP auch tatsächlich beobachtet werden. Bei der Überexpression mutierter Moleküle ist COMP dagegen schwerer aus dem Gewebe zu extrahieren. Durch Inkubation in der neutral gepufferten Salzlösung werden mutierte Moleküle nicht aus dem Gewebe freigesetzt. Spezifische Signale konnte erst in der EDTA- bzw. guanidinhaltigen Fraktion detektiert werden, welche im Vergleich zum Wildtyp auch weniger scharf und diffuser erschienen. Daraus folgt, dass mutiertes COMP entweder mit entsprechenden Interaktionspartnern stärker assoziiert oder auch schwerlösliche Aggregate mit anderen Komponenten bildet. Ob eine solche Interaktion bereits intrazellulär stattfindet und möglicherweise zu intrazellulärer Aggregation führt, oder ob ein extrazellulärer Phänotyp der die Matrix betrifft vorliegt, konnte anhand dieser Daten nicht geklärt werden. Daher wurden zu einer detaillierteren Analyse weitere morphologische Untersuchungen durchgeführt.

### **Immunhistologische, radiologische und computertomographische Analysen**

Ein besonderes Interesse galt der Analyse der Wachstumsfuge, da sich hier die relevanten Prozesse für das lineare Wachstum der Röhrenknochen abspielen. Patienten mit PSACH leiden unter anderem an einem stark ausgeprägten Kleinwuchs. Diese Fehlentwicklung beginnt postnatal etwa im Alter von etwa zwei Jahren. Die Struktur der Epi- und Metaphyse der Maus verändert sich mit fortschreitender Entwicklung deutlich. Die für das Längenwachstum notwendige Unterteilung in die unterschiedlichen Knorpelzonen innerhalb der Wachstumsfuge werden immer mehr aufgehoben. Dies führt letztlich zum Wachstumsstillstand. Diese „Schließung der Wachstumsfuge“ findet während der Mausentwicklung etwa nach drei Monaten statt. In den Wachstumsfugen vier Wochen alter Mäuse konnten Unterschiede in der Verteilung von Wildtyp und mutiertem COMP in der extrazellulären Matrix nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt ist die Fuge noch als hochorganisierte Struktur erkennbar, mit einer deutlichen Unterteilung in die folgenden

Knorpelzonenbereiche: ruhender Knorpel, Proliferationszone, Hypertrophiezone und mineralisierte Zone mit angrenzendem Knochengewebe.

Mittels Immunfluoreszenzfärbungen auf Paraffinschnitten konnte transgenes COMP in unterschiedlichen Entwicklungsstadien detektiert werden. In Kontrollmäusen ohne Transgen Expression ist endogenes COMP in der gesamten extrazellulären Matrix verteilt. Dabei sind Signale nahezu in der gesamten Fuge nachweisbar. Eine vergleichbare Verteilung zeigt sich in transgenen Mäusen mit zusätzlicher Wildtyp COMP Expression. Auch hier sind Signale in der gesamten extrazellulären Matrix detektierbar, vornehmlich in der Proliferationszone, was auf das charakteristische Expressionsmuster des Col2a1-Promotors zurückzuführen ist. Demgegenüber konnten COMP Pentamere, die mutierte Monomere enthalten und so mit dem myc Antikörper detektierbar sind fast ausschließlich in der perizellulären Matrix der Proliferationszone nachgewiesen werden. Der interterritoriale Bereich weist wenn überhaupt nur sehr schwache Signale für mutiertes COMP auf. Dies zeigt, dass mutierte Pentamere zwar in die extrazelluläre Matrix sekretiert werden, diese dort aber nicht gleichmäßig verteilt werden, wie es bei Wildtyp COMP der Fall ist. Durch die Expression von COMP Molekülen mit mutierten Untereinheiten findet eine Ansammlung in der perizellulären Matrix statt. Möglicherweise wird eine weitere Diffusion in die interterritoriale Matrix aufgrund der Bildung von Aggregaten mit anderen Faktoren verhindert. Ebenfalls vorstellbar ist eine verstärkte Assoziation im perizellulärem Bereich mit einem potentiellen Interaktionspartner wie Kollagen II. Dieser Effekt wird bestätigt durch die Expression mutierter Moleküle in COMP Knockout Mäusen. In diesen tgA-ko Mäusen existieren ausschließlich Pentamere, bestehend aus fünf mutierten Untereinheiten. Überraschenderweise werden auch diese überwiegend sekretiert, sind aber ebenfalls nur in der perizellulären Matrix lokalisiert. Hier konnten zusätzlich auch deutliche intrazelluläre COMP Signale nachgewiesen werden, was ein Hinweis auf eine mögliche Retention ist. Diese intrazellulären COMP Signale sind in der tgA Linie nicht nachweisbar, was mit der Menge der reinen mutierten COMP Moleküle zusammenhängen könnte. Wie bereits erwähnt, wird im Vergleich zur Transgenexpression ein noch größerer Anteil endogener COMP Moleküle gebildet, wodurch ein Effekt der Mutation in dieser Linie angeschwächt werden könnte.

Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen der Wachstumsfuge vier Wochen alter transgener Tiere zeigen deutliche Unterschiede, welche besonders im Bereich der perizellulären Matrix erkennbar sind. Sowohl in Kontrollmäusen als auch in transgenen Mäusen mit zusätzlicher Wildtyp COMP Expression ist die perizelluläre Matrix von ausgeprägten fibrillären Strukturen gekennzeichnet, was auf eine kollagenreiche Matrix

hindeutet. Ein anderes Bild zeigt sich in Tieren mit mutierten COMP Molekülen. Die perizelluläre Zone ist im EM Bild durch helle Bereich gekennzeichnet, worin nur wenige und zudem schlecht ausgeprägte fibrilläre Strukturen erkennbar sind. Die Bildung einer intakten Kollagenmatrix ist dort offensichtlich gestört. Die Kollagenmatrix im interterritorialen Bereiche aller Linien erscheint vollständig und normal entwickelt. Parallel zum Säulenknorpel verlaufen in der Regel längs angeordnete Kollagenfibrillen. Diese sind in der transgenen Linie mit mutiertem COMP nicht zu sehen. Möglicherweise dienen diese Strukturen dazu die definierte Anordnung der Zellen in den Säulen aufrecht zu erhalten. In Linien mit mutiertem COMP erscheint diese Ordnung zum Teil beeinträchtigt, was sich durch die Ausbildung von Zellnestern äußert. Bei transgenen Mäusen mit mutiertem COMP sind außerdem Erweiterungen innerhalb des ERs zu erkennen, was beim Patienten ebenfalls beobachtet werden konnte. Ob diese Erweiterungen durch Akkumulationen von Proteinen entstehen, kann auf Grundlage dieser Daten noch nicht gesagt werden. Daher werden in diesem Zusammenhang weitere elektronenmikroskopische Analysen angestrebt, mit dem Ziel einer Immunogoldfärbung zur Identifizierung spezieller Matrixmoleküle (Maddox et al., 1997; Vranka et al., 2001). In transgenen Mäusen mit mutierten COMP Molekülen ist die fibrilläre Kollagenmatrix im zellnahen Bereich betroffen. Möglicherweise ist dies auf eine nicht korrekte Fibrillogenese von Kollagen II zurückzuführen. Dies könnte direkt durch mutiertes COMP verursacht werden, was seine potentielle katalytische Funktion während der Fibrillogenese nicht ausüben kann. Andererseits könnte durch eine gestörte Sekretion ein Ungleichgewicht entstehen, was dazu führt, dass wichtige Knorpelkomponenten wie Kollagen IX oder XI nicht in die Matrix gelangen.

Dass extrazelluläre Effekte, hervorgerufen durch mutierte COMP Moleküle, möglicherweise über eine Integrin vermittelte Matrix-Zellen Kommunikation zur Apoptose führen könnte (Lo et al., 2004; Zhao et al., 2005; Neidhart et al., 2005, Chen et al., 2005), wurde bereits bei der Diskussion der Zellkulturergebnisse angesprochen. Interessanterweise konnte in einer früheren Arbeit gezeigt werden, dass auch der Kollagenrezeptor DDR2 die Proliferation von Knorpelzellen reguliert und ein Ausschalten dieses Rezeptors zu Kleinwuchs in den untersuchten Mäusen führt (Labrador et al., 2001). Eine durch COMP herbeigeführte Störung der zellnahen extrazellulären Kollagenmatrixbildung könnte einen ähnlichen negativen Effekt verursachen. Eine entsprechende Matrix-Zellen Kommunikation könnte hier durch die schlecht ausgeprägte Kollagenmatrix herbeigeführt werden.

Spezifische immunhistologische Färbung mit Antikörpern gegen Aggrekan und Matrilin-4 führten zu geringen Abweichungen im Färbemuster. Die Aggrekanfärbung in Kontrolltieren

ersteckt sich über die gesamte Wachstumsfuge. Bei Mäusen mit mutierter Transgen Expression ist diese Färbung im Bereich der Proliferationszone weniger deutlich ausgeprägt. Die Matrilin-4 Färbung in Kontrolltieren erscheint auf die Bereiche des ruhenden Knorpels und die Proliferationszone begrenzt zu sein. Bei mutierter Transgenexpression ist diese Färbung weniger klar abgegrenzt und reicht bis in die hypertrophen Zonen hinein. Die beschriebene fibrillenarme Matrix in Tieren mit mutierten COMP Molekülen beeinflusst offensichtlich die zonale Expression einiger Matrixproteine, die nun weiter innerhalb der Knorpelzonen diffundieren können. Färbungen weiterer Matrixmoleküle wie beispielsweise Matrilin-3 zeigten keine dramatischen Veränderungen in Bezug auf die Lokalisation dieser Proteine in der Wachstumsfuge.

Obwohl die Organisation der Wachstumsfuge in Mäusen mit mutiertem COMP in manchen Bereichen betroffen ist, waren die Ausdehnungen der einzelnen Knorpelzonen, wie der Ruheknorpel, die Proliferations- und hypertrophe Zonen sowie die mineralisierte Zone grundsätzlich vergleichbar mit denen in Kontrolltieren. Dabei spielt eventuell die Menge der mutierten Moleküle eine entscheidende Rolle. Ein Effekt in diesem Bereich könnte möglicherweise durch mehr transgenes Protein herbeigeführt werden. Dass ein Fehlen von COMP keinen Einfluss auf die Skelettentwicklung hat, konnte in der Maus bereits gezeigt werden (Svensson et al., 2002). Auch bei anderen Matrixmolekülen, wie Matrilin-3 oder Kollagen IX, wo Mutationen im Menschen Chondrodysplasien auslösen, wurden in entsprechenden Knockout Modellen keine dramatischen skeletalen Veränderungen beobachtet (Ko et al., 2004; Hagg et al., 1997). Eine ausreichende Menge an zusätzlichem mutiertem Protein ist möglicherweise der ausschlaggebende Faktor zur Manifestation eines Phänotyps. In PSACH Patienten wird ein Mengenverhältnis zwischen Wildtyp und mutierten COMP Molekülen von 1:1 angenommen, gleichwohl nicht geklärt ist, ob andere Mengenverhältnisse ebenfalls bereits zu entsprechenden Phänotypen führen können. Wie bereits erwähnt, wird eine rezessive Form der MED durch Mutationen im DTDST (*diastrophic dysplasia sulfate transporter*) hervorgerufen. In einem Knock-in Mausmodell wurden Tiere charakterisiert, die homozygot für eine DTDST Mutation waren. Diese Mäuse zeigten Wachstumsstörungen und entwickelten zudem eine skeletale Dysplasie (Forlino et al., 2005). Die Möglichkeit der Expression von ausschließlich mutierten COMP Molekülen in der Maus ergibt sich durch Kreuzung von transgenen Tieren mit COMP Knockout Mäusen. Dies ist zwar wiederum nicht mit der physiologischen Situation im Patienten vergleichbar, wo neben mutierten COMP auch Wildtyp COMP exprimiert wird. Die Analyse von heterozygoten COMP Knockout Mäusen mit zusätzlichem mutiertem COMP könnte in diesem Zusammenhang besser geeignet sein, um weitere Einblicke in die Pathogenese von PSACH zu erhalten.

Die postnatale Entwicklung ist beim Menschen mit PSACH von besonderer Bedeutung, da sich erste Anzeichen der Erkrankung erst im Alter von etwa zwei Jahren äußern. Die Patienten zeigen ein gestörtes lineares Wachstum und entwickeln im Erwachsenenalter zum Teil eine Osteoarthritis. Daher wurde die Entwicklung der transgenen Mäuse vor allem in den nachgeburtlichen Stadien beobachtet. Im Fall der in dieser Arbeit analysierten transgenen Mäuse konnte eine derart dramatische Veränderung der Wachstumsfuge zu keinem Zeitpunkt der postnatalen Entwicklung beobachtet werden. Das Ausschalten von Proteasen, wie der Matrixmetalloproteinase 13 (MMP-13 oder Kollagenase-3), die Funktionen während des Knorpelumbaus übernehmen und dadurch eine Mineralisierung vorbereiten, führen beispielsweise zu einer Vergrößerung der Wachstumsfuge im Bereich der hypertrophen Zone, dem Hauptwirkungsort von MMP-13. Die dadurch verspätet eintretende Ossifikation führt zu einem chondrodysplasieähnlichen Phänotyp in frühen embryonalen Stadien der Entwicklung. Diese Entwicklung normalisierte sich nach der Geburt. Der Unterschied in der Femurlänge bei Wildtyp und MMP-13 Knockout Mäusen lag bei etwa 8%, andere Bereiche wie Schädel oder Wirbelsäule waren nicht betroffen (Inada et al., 2004). Die Matrixmetalloproteinase 9 (MMP-9) und MMP-13 wirken synergetisch und erfüllen Aufgaben bei der Resorption von Kollagen II und Aggrecan, den Hauptbestandteilen der extrazellulären Knorpelmatrix. Ein Doppel-Knockout dieser Faktoren führt zu dramatischen Störungen während des Prozesses der endochondralen Ossifikation, was zu drastisch verkleinerten Knochen führt. Hervorgerufen wird dieser Phänotyp unter anderem durch eine Verlängerung des Lebenszyklus von Knorpelzellen und einer verminderten Umgestaltung der extrazellulären Matrix (Stickens et al., 2004). Ob bei den transgenen COMP Mäusen ebenfalls solche Veränderungen innerhalb embryonaler Stadien stattgefunden haben und sich bis zur Geburt normalisieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Eine Analyse embryonaler Stadien mit Schwerpunkt auf die Struktur der Knorpelzonen und Lebenszyklus der Knorpelzellen sowie extrazellulärer Signalmoleküle könnte weitere Einblicke in die Zusammenhänge der skeletalen Entwicklung liefern. Frühe Veränderungen könnten Auswirkungen auf die spätere Entwicklung haben, ohne dass sie dabei zunächst einen sichtbaren Einfluss auf die betroffenen Regionen haben. Im Fall der PSACH Patienten äußern sich skeletale Veränderungen erst im Alter von etwa zwei Jahren. Dass frühe Anlegen eines solchen skeletalen Irrtums ist im Zusammenhang mit dem frühen Auftreten von COMP etwa 10 Tage postcoitum und seiner potenziellen Bindungspartner vorstellbar.

Größe und Gewicht der Mäuse wurde in einem Zeitraum von zwölf Monaten gemessen. Die Kontroll- und transgenen Tiere zeigten insgesamt ein normales lineares Wachstum. Dabei waren die männlichen Tiere erwartungsgemäß größer und auch schwerer als die weiblichen Tiere. Das kontinuierliche Längenwachstum erreichte nach etwa 60 Tagen sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen seinen Endpunkt. Danach wurde keine weitere Zunahme der Größe beobachtet. Das Körpergewicht stieg bei beiden Geschlechtern noch bis zu einem Alter von vier Monaten an. Die individuellen Schwankungen waren insgesamt bei dem Körpergewicht höher als bei der Körperlänge.

Ein Vergleich von männlichen Kontroll- und transgenen Tieren nach einem bzw. sechs Monaten zeigte einen Trend zum verminderten Wachstum bei transgenen Tieren mit mutiertem COMP. Das Körpergewicht beider Linien lag innerhalb der berechneten Standardabweichung. Bei weiblichen Tieren war ein solcher Trend nicht zu beobachten. Insgesamt wurde nach sechs Monaten ein Längenunterschied von etwa 6% deutlich. Dieser Trend zeigt sich bereits nach wenigen Wochen und setzt sich über den Zeitraum von zwölf Monaten kontinuierlich fort. Mutiertes COMP scheint das Wachstum der Mäuse in Bezug auf die finale Körpergröße zu beeinflussen, da die entsprechenden transgenen Tiere im Durchschnitt zu keinem Zeitpunkt die Körpergröße der Kontrolltiere erreichten. Das lineare Wachstum scheint jedoch nicht beeinflusst zu sein. Dass die beobachtete Differenz relativ gering ausfällt hängt damit zusammen, dass nur einige transgene Mäuse ein unterentwickeltes Wachstum zeigten. Ein großer Anteil war in Größe und Gewicht mit den Kontrolltieren vergleichbar, wodurch sich zum Teil die Überschneidungen in den Standardabweichungen erklären. Dass nur ein Teil der Tiere durch die Auswirkungen der mutierten COMP Moleküle betroffen sind, lässt vermuten, dass zusätzliche Faktoren mitbestimmend sind. Diese Faktoren konnten bisher jedoch noch nicht identifiziert werden.

Ob ein noch deutlicherer Unterschied in der Körperlänge durch die zusätzliche Expression von endogenem COMP unterdrückt wird, sollte die Untersuchung der transgenen Tiere im COMP defizientem Hintergrund ergeben. Bis zu diesem Zeitpunkt liegen allerdings noch keine ausreichenden Messwerte zur statistischen Analyse vor. Die vorliegenden Daten weisen allerdings auf einen stärker ausgeprägten Unterschied hin. In diesem Zusammenhang könnten Belastungstests möglicherweise weitere Erkenntnisse liefern. Eine gezielte Beanspruchung der gewichtstragenden Elemente könnte die negative Wirkung der mutierten COMP Moleküle und anderer unbestimmter Faktoren unterstützen. Dadurch könnte die Mobilität der Mäuse messbar beeinträchtigt werden oder der Verschleiß von knorpeligen Elementen nachweisbar vorangetrieben werden (McCauley, 2001).

Da nicht abzusehen war, welche Tiere unter welchen Voraussetzungen ein vermindertes Wachstum entwickelten, ist unter diesem Aspekt die Interpretation einzelner radiologischer sowie der morphometrischer Analysen schwierig. Die für die röntgenmorphologische Langzeitkontrolle verwendeten Kontroll- und transgenen Tiere erreichten nach zwölf Monaten eine vergleichbare Körpergröße. Unabhängig von der Größe konnten jedoch Beobachtungen in Bezug auf allgemeine Skelettstrukturen gemacht werden, bei denen allerdings keine dramatischen Unterschiede festgestellt wurden.

Die Analyse der biometrischen Daten ist auch aufgrund einer kürzlich veröffentlichten Arbeit über den Knockout eines weiteren Mitglieds der TSP Familie von besonderem Interesse (Hankenson et al., 2005). TSP-3 ist wie COMP ein pentameres Molekül mit fast identischem Domänenaufbau und hoher Sequenzhomologie und wird ähnlich wie COMP unter anderem im frühen Knorpelgewebe exprimiert (Qabar et al., 1994). Junge TSP-3 Knockout Mäuse sind schwerer als Kontrolltiere. Zudem zeigen adulte Tiere geometrische und biomechanische Änderungen in den Röhrenknochen. Die computertomographische Analyse mittels pQCT ist besonders geeignet zur Charakterisierung verschiedener Knochenparameter (Schmidt et al., 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Femurknochen weiblicher Tiere biometrisch mittels pQCT analysiert. Es konnten jedoch keine Unterschiede in den untersuchten Knochenparametern gemessen werden. Wie bereits beschrieben, zeigten die weiblichen Tiere im Vergleich zu männlichen Tieren keinen Größenunterschied. Die Werte für die Gesamtlänge, die kortikale Dicke und den Umfang der Femurknochen von Kontroll- und transgenen Mäusen waren vergleichbar. Mineralgehalt und Knochendichte lagen im Rahmen der gemessenen Standardabweichung und wiesen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede auf. Die Ausweitung dieser Untersuchung insbesondere auf männliche Tiere erweist sich möglicherweise als mehr aufschlussreich. In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass bei der systematischen Überexpression von Wachstumshormonen in den Knochen transgener Mäuse Unterschiede festgestellt werden konnten, die unter anderem eindeutig vom Geschlecht der Tiere abhängig waren. So konnte hier eine erhöhte Knochendichte in den Trabekeln ausschließlich in weiblichen Tieren gemessen werden, dagegen wurde nur in männlichen Tieren eine höhere kortikale Fläche festgestellt (Eckstein et al., 2004).

Färbungen von Knorpel und Knochengewebe verschiedener skeletaler Elemente in Hinterläufen, Wirbelsäule, Brustkasten oder Schwanz sollten Aufschluss über mögliche morphologische Unterschiede geben. Die allgemeine Morphologie war bei Kontroll- und

transgenen Tieren vergleichbar und war im Bereich der Wirbelsäule, der Hinterläufe und der Schwanzknochen ähnlich. Die Sterni transgener Tieren unterschieden sich jedoch im Bereich des dritten und vierten Segments von den Sterni der Kontrolltiere. In 40% der untersuchten Fälle kam es zu einer intersternbralen Fusion dieser Elemente. Bei den übrigen 60%, die nicht fusioniert waren, war zumindest die Oberfläche der Segmente in diesem Bereich zum Teil abnormal verändert. Auch die Stellung des Schwertfortsatzes im Sternum betroffener Tiere war verändert. Diese Krümmung könnte möglicherweise ein sekundärer Effekt der Segmentfusion sein. Obwohl eine Segmentfusion in Einzelfällen auch bei adulten Kontrolltieren beobachtet werden konnte, ist eine deutliche Steigerung dieser Fusionsrate, vor allem bei jungen Tieren, auf den Effekt mutierter COMP Molekülen zurückzuführen. Es kann ausgeschlossen werden, dass transgenes COMP in diesem Bereich ektoisch exprimiert wird. Immunhistologische Färbungen von Gewebeschnitten in diesem Bereich zeigen eindeutige Signale für COMP aber auch für andere knorpelspezifische Proteine wie Kollagen II und IX. Dass nicht die reine Überexpression von COMP in diesem Bereich sondern das Vorhandensein mutierter COMP Moleküle die Folge dieser Segmentfusionen ist, zeigt sich in transgenen Mäusen mit zusätzlicher Wildtyp COMP Expression. Hier wurden keine sternbralen Fusionen beobachtet.

Die Transformation aus mesenchymalen Knorpelanlagen zu hochkomplexen Strukturen wie den langen Röhrenknochen wird durch den Prozess der endochondralen Ossifikation beschrieben. Das zeitlich und räumlich korrekt koordinierte Zusammenspiel verschiedener regulatorischer Faktoren, wie beispielsweise Transkriptionsfaktoren, Signalmoleküle und Rezeptoren sowie Strukturproteinen ist Grundvoraussetzung für eine normale Entwicklung (Tuan, 2004).

In diesem Zusammenhang sind Mitglieder *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) Superfamilie wie die *bone morphogenetic proteins* (BMP) Familie interessant. BMPs sind Regulatoren wichtiger Entwicklungsprozesse vor allem auch der skeletalen Entwicklung (Lories et al., 2005). Ihr Name ergibt sich durch die Fähigkeit zur ektoischen Knochen- und Knorpelbildung. BMPs sind Liganden für bestimmte Serin/Threonin-Kinase Rezeptoren, welche wiederum intrazelluläre Signalkaskaden durch die Phosphorylierung verschiedener Smad Proteine aktivieren. Interessanterweise zeigten BMP-6 Knockout Mäuse keinen offensichtlichen Phänotyp in den meisten skeletalen Geweben. Nur im Sternum konnte eine signifikante Verzögerung der Ossifikation festgestellt werden (Solloway et al., 1998). Mutationen im *growth/differentiation factor 5* (GDF-5), einem Mitglied der BMP Familie, resultieren unter anderem in skeletalen Veränderungen wie ein vermindertes Wachstum der

langen Röhrenknochen. Mutationen führen außerdem zur Mineralisierung von Sternumsegmenten oder zu einer verminderten Proliferationsrate von Knorpelzellen in der Wachstumsfuge (Storm und Kingsley, 1999). Die Signalkaskade der BMPs wird durch inhibitorische Smad Proteine blockiert. Da die weitere Funktion inhibitorischer Smads, wie beispielsweise Smad6, weitgehend ungeklärt ist, wurden transgene Mäuse mit einer knorpelspezifischen Überexpression von Smad6 generiert. Diese Mäuse entwickelten einen postnatalen Zwergwuchs und Osteopenie. Dies ging einher mit einer normalen Proliferationsrate von Knorpelzellen aber einer signifikant verspäteten Knorpelzellenhypertrophie sowie der Ausbildung dünner Trabekel (Horiki et al., 2004).

Die Störungen bei der Sternumsegmentierung wurden in den hier etablierten transgenen Mäusen durch die Expression mutierter COMP Moleküle hervorgerufen. Ein vermindertes Wachstum deutet sich nur bei männlichen Mäusen an. Möglicherweise sind hier ähnliche regulierende Mechanismen betroffen, wie sie beispielsweise in GDF-5 Mutanten oder BMP-6 Knockout Mäusen beschrieben wurden. Ob diese Störung durch eine Veränderung der Knochenhomöostase verursacht wird, die ihren Ursprung bereits in der frühen Knorpel-Knochenentwicklung hat, oder möglicherweise durch eine Retention unbestimmter Faktoren in späteren Entwicklungsstadien hervorgerufen wird, ist zu diesem Zeitpunkt noch Spekulation. Interessant für weitere Untersuchungen ist jedoch die Einbeziehung der Expressionsrate und Lokalisation verschiedener Wachstumsfaktoren und anderer Faktoren im embryonalen und adulten Knorpel. In diesem Zusammenhang sind auch die Proteine der Hedgehog Familie von besonderem Interesse. Diese sekretierten Polypeptide übernehmen unter anderem während der frühen Embryonalentwicklung wichtige Funktionen wie im Bereich der Zelldifferenzierung. Die Überexpression von humanem SHH (*sonic hedgehog*) unter der Kontrolle des hier verwendeten Col2a1 Promotors führt zum Tod der Mäuse bei der Geburt aufgrund einer schweren Craniorachischisis (Neuralrohrschlussdefekt). Daneben zeigen die Mäuse skeletale Defekte in den Rippen, dem Sternum und der Röhrenknochen (Tavella et al., 2004).

Die Aufklärung allgemeiner Mechanismen der Knorpel- und Knochenentwicklung ist notwendig für das Erkennen und zum Verständnis unterschiedlicher skeletaler Entwicklungsstörungen und zur Etablierung von Therapien. Als ein sehr wichtiges Werkzeug sind Mausmodelle zur Aufklärung von molekularen Mechanismen der Skelettentwicklung etabliert. Dennoch stehen über allem immer die folgenden Kriterien: die Reproduzierbarkeit der gewonnenen experimentellen Daten auch in unterschiedlichen Stämmen, die

Vergleichbarkeit der verwendeten Linien und Kontrollen und vor allem die Übertragbarkeit der Ergebnisse von der Maus auf den Mensch. In diesem Zusammenhang wird deutlich, dass auch in eindeutig reproduzierten Bedingungen nicht immer ein Phänotyp in der Maus zu erwarten ist. Ausfallmutanten von *Wnt-1-inducible signaling protein* (Wisp3) verursachen beim Menschen die autosomal rezessive Skeletterkrankung *progressive pseudorheumatoid dysplasia* (PPD). Sowohl Wisp3 Knockout Mäuse als auch transgene Mäuse mit einer Überexpression von Wisp3 entwickeln sich normal und rekapitulieren keine der in PPD beschriebenen Veränderungen (Kutz et al., 2005), woraus folgt, dass Wisp3 keine essentielle Funktion während der skeletalen Entwicklung der Maus übernimmt. Weiterhin können in Mausmodellen auch zusätzliche Defekte auftreten, die dem Krankheitsbild beim Menschen nicht entsprechen. Mutationen in Sox9 verursachen beim Menschen eine schwere skeletale Dysplasie (*campomelic dysplasia, CD*). Sox9 Knock-in Mäuse mit einer entsprechenden Mutationen zeigen einerseits eine Reihe Defekte die sich auch bei der humanen Erkrankung äußern, andererseits besitzen diese Mäuse auch skeletale Phänotypen, die nicht mit der humanen Dysplasie assoziiert sind (Bi et al., 2001). Die Diskrepanzen lassen sich möglicherweise durch die offensichtlichen Unterschiede beim Menschen und der Maus erklären.

Die Beanspruchung der Gelenke beim Menschen könnten durch den aufrechten Gang erhöht sein. Diese Abnutzungsmechanismen werden dann durch früh angelegte Skelettirrtümer besonders gefördert. Möglicherweise werden diese Abweichungen bei der Maus aufgrund eines geringeren Gesamtwachstums sowie durch die Körperanatomie diese Änderungen weniger deutlich. Aber auch die Mengenverhältnisse der endogenen und transgenen COMP Moleküle in den Tieren wird von Bedeutung sein. Daher stellt die indirekte Erhöhung der mutierten COMP Menge durch Ausschalten der endogenen COMP Allele einen guten Ansatz zu weiteren Untersuchung der Pathogenese von PSACH in den bereits etablierten Mauslinien dar. Erste Ergebnisse zeigen einen Trend zur Verstärkung des Phänotyps, der wie beschrieben bereits in Mäusen mit geringer zusätzlicher Transgenexpression beobachtet werden konnte. Auch wenn der skeletale Phänotyp im Vergleich zum Patienten eher schwach ausfiel, erlaubt dieses Mausmodell nun erstmals Einblicke in molekulare Mechanismen der Pathogenese von PSACH *in vivo*.

# V Zusammenfassung

Mutationen im *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP) führen beim Menschen zu Chondrodysplasien. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung der Pathogenese der Pseudoachondroplasie (PSACH) die Auswirkungen der am häufigsten identifizierten Mutation in COMP (D469Δ) sowohl im Zellkulturmodell als auch in transgenen Mäusen untersucht. Zur Analyse im Zellkulturmodell wurden sowohl primäre bovine als auch murine Knorpelzellen jeweils mit einem myc markierten Wildtyp bzw. mutiertem COMP Konstrukt transfiziert. Transgenes Wildtyp COMP wird von den Knorpelzellen kontinuierlich sekretiert und war extrazellulär mit einer kollagenhaltigen Matrix assoziiert. Mutiertes COMP zeigt dagegen eine deutlich verzögerte Sekretion mit eindeutiger Retention im ER. Der trotz Mutation sekretierte COMP Anteil war nicht mit der Kollagenmatrix assoziiert, sondern löslich im Überstand nachweisbar. Außerdem war die Vitalität in Zellen, die mutiertes COMP exprimieren, beeinträchtigt. In einem zweiten Ansatz wurden transgene Mäuse hergestellt, die Wildtyp und mutiertes COMP knorpelspezifisch exprimieren. Die Expression des Transgens wurde eindeutig auf RNA Ebene und Proteinebene nachgewiesen und quantifiziert. Transgene und endogene COMP Untereinheiten bilden gemischte, pentamere Moleküle, unabhängig davon, ob das transgene COMP mutiert ist. Mutiertes COMP ist schwerer aus Knorpelgewebe extrahierbar als Wildtyp COMP, was auf eine veränderte Verankerung in der ECM hinweist. Transgenes COMP konnte durch IF Färbung auf Paraffinschnitten in der Proliferationszone der Tibia Epiphyse nachgewiesen werden. Dabei zeigt Wildtyp COMP eine gleichmäßige Verteilung in der gesamten ECM, wohingegen mutiertes COMP auf die perizelluläre Matrix begrenzt war. EM Analysen zeigten sowohl mangelhaft ausgeprägte Kollagenfibrillen im perizellulärem Bereich als auch ungeordnete Zellcluster in der Proliferationszone. Im Sternum konnte eine Fusion des dritten und vierten Segments festgestellt werden, die eindeutig auf die Expression von mutiertem COMP zurückzuführen war, und auf einen Einfluss von COMP in der endochondralen Ossifikation deutet. Männliche Tiere zeigten einen Trend zu einem geringeren Längenwachstum. Sowohl radiologische Analysen als auch die Untersuchungen verschiedener Knochenparameter weiblicher Tiere mittels pQCT zeigten keine signifikanten Unterschiede zu Kontrollmäusen. Der eher schwache skeletale Phänotyp ist möglicherweise auf eine zu hohe endogene COMP Menge zurückzuführen, weshalb die Mäuse mit COMP defizienten Tieren gekreuzt wurden. Auch wenn der skeletale Phänotyp im Vergleich zum Patienten eher schwach ausfiel, erlaubt die Maus erste Einblicke in molekulare Mechanismen der Pathogenese von PSACH *in vivo*.

# VI Literatur

- Abbott J and Holtzer H** (1966). "The loss of phenotypic traits by differentiated cells. 3. The reversible behavior of chondrocytes in primary cultures." J Cell Biol 28(3): 473-487.
- Adams JC** (2004). "Functions of the conserved thrombospondin carboxy-terminal cassette in cell-extracellular matrix interactions and signaling." Int J Biochem Cell Biol 36(6): 1102-1114.
- Adams JC and Lawler J** (2004). "The thrombospondins." Int J Biochem Cell Biol 36(6): 961-968.
- Adams JC, Monk R, Taylor AL, Ozbek S, Fascetti N, Baumgartner S and Engel J** (2003). "Characterisation of *Drosophila* thrombospondin defines an early origin of pentameric thrombospondins." J Mol Biol 328(2): 479-494.
- Anderson HC** (1990). "The role of cells versus matrix in bone induction." Connect Tissue Res 24(1): 3-12.
- Arikawa-Hirasawa E, Le AH, Nishino I, Nonaka I, Ho NC, Francomano CA, Govindraj P, Hassell JR, Devaney JM, Spranger J, Stevenson RE, Iannaccone S, Dalakas MC and Yamada Y** (2002). "Structural and functional mutations of the perlecan gene cause Schwartz-Jampel syndrome, with myotonic myopathy and chondrodysplasia." Am J Hum Genet 70(5): 1368-1375.
- Aspberg A, Adam S, Kostka G, Timpl R and Heinegård D** (1999). "Fibulin-1 is a ligand for the C-type lectin domains of aggrecan and versican." J Biol Chem 274(29): 20444-20449.
- Baitner AC, Maurer SG, Gruen MB and Di Cesare PE** (2000). "The genetic basis of the osteochondrodysplasias." J Pediatr Orthop 20(5): 594-605.
- Baron M, Norman DG, Harvey TS, Handford PA, Mayhew M, Tse AG, Brownlee GG and Campbell ID** (1992). "The three-dimensional structure of the first EGF-like module of human factor IX: comparison with EGF and TGF- $\alpha$ ." Protein Sci 1(1): 81-90.
- Barry FP, Rosenberg LC, Gaw JU, Gaw JU, Koob TJ and Neame PJ** (1995). "N- and O-linked keratan sulfate on the hyaluronan binding region of aggrecan from mature and immature bovine cartilage." J Biol Chem 270(35): 20516-20524.
- Bateman JF, Freddi S, McNeil R, Thompson E, Hermanns P, Savarirayan R and Lamande SR** (2004). "Identification of four novel COL10A1 missense mutations in Schmid metaphyseal chondrodysplasia: further evidence that collagen X NC1 mutations impair trimer assembly." Hum Mutat 23(4): 396.
- Bateman JF, Wilson R, Freddi S, Lamande SR and Savarirayan R** (2005). "Mutations of COL10A1 in Schmid metaphyseal chondrodysplasia." Hum Mutat 25(6): 525-534.
- Benya PD, Padilla SR and Nimni ME** (1978). "Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture." Cell 15(4): 1313-1321.
- Benya PD and Shaffer JD** (1982). "Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels." Cell 30(1): 215-224.
- Bi W, Huang W, Whitworth DJ, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR and 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.
- Bonnemann CG, Cox GF, Shapiro F, Wu JJ, Feener CA, Thompson TG, Anthony DC, Eyre DR, Darras BT and Kunkel LM** (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.
- Bornstein P, Devarayalu S, Li P, Disteché CM and Framson P** (1991). "A second thrombospondin gene in the mouse is similar in organization to thrombospondin 1 but does not respond to serum." Proc Natl Acad Sci U S A 88(19): 8636-8640.
- Bornstein P, O'Rourke K, Wikstrom K, Wolf FW, Katz R, Li P and Dixit VM** (1991). "A second, expressed thrombospondin gene (*Thbs2*) exists in the mouse genome." J Biol Chem 266(20): 12821-12824.
- Briggs MD, Hoffman SM, King LM, Olsen AS, Mohrenweiser H, Leroy JG, Mortier GR, Rimoin DL, Lachman RS, Gaines ES and et al.** (1995). "Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia due to mutations in the cartilage oligomeric matrix protein gene." Nat Genet 10(3): 330-336.
- Briggs MD, Rasmussen IM, Weber JL, Yuen J, Reinker K, Garber AP, Rimoin DL and Cohn DH** (1993). "Genetic linkage of mild pseudoachondroplasia (PSACH) to markers in the pericentromeric region of chromosome 19." Genomics 18(3): 656-660.

- Bruns J and Steinhagen J** (2000). "Der Knorpelschaden als präarthrotische Deformität – Biologische Grundlagen" Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin 52(2): 42-47.
- Budde B, Blumbach K, Ylöstalo J, Zaucke F, Ehlen HWA, Wagener R, Ala-Kokko L, Paulsson M, Bruckner P and Grässle S** (2005). "Altered integration of matrilin-3 into cartilage extracellular matrix in the absence of collagen IX." Mol Cell Biol in press
- Carlson CB, Bernstein DA, Annis DS, Misenheimer TM, Hannah BL, Mosher DF and Keck JL** (2005). "Structure of the calcium-rich signature domain of human thrombospondin-2." Nat Struct Mol Biol 12(10): 910-914.
- Cao L, Lee V, Adams ME, Kiani C, Zhang Y, Hu W and Yang BB** (1999). "beta-Integrin-collagen interaction reduces chondrocyte apoptosis." Matrix Biol 18(4): 343-355.
- Chan D, Freddi S, Weng YM and Bateman JF** (1999). "Interaction of collagen alpha1(X) containing engineered NC1 mutations with normal alpha1(X) in vitro. Implications for the molecular basis of Schmid metaphyseal chondrodysplasia." J Biol Chem 274(19): 13091-13097.
- Chapman KL, Briggs MD and Mortier GR** (2003). "Review: clinical variability and genetic heterogeneity in multiple epiphyseal dysplasia." Pediatr Pathol Mol Med 22(1): 53-75.
- Chen FH, Thomas AO, Hecht JT, Goldring MB and Lawler J** (2005). "Cartilage oligomeric matrix protein/thrombospondin 5 supports chondrocyte attachment through interaction with integrins." J Biol Chem 280(38): 32655-32661.
- Chen H, Deere M, Hecht JT and Lawler J** (2000). "Cartilage oligomeric matrix protein is a calcium-binding protein, and a mutation in its type 3 repeats causes conformational changes." J Biol Chem 275(34): 26538-26544.
- Chen TL, Stevens JW, Cole WG, Hecht JT and Vertel BM** (2004). "Cell-type specific trafficking of expressed mutant COMP in a cell culture model for PSACH." Matrix Biol 23(7): 433-444.
- Cohn DH, Briggs MD, King LM, Rimoin DL, Wilcox WR, Lachman RS and Knowlton RG** (1996). "Mutations in the cartilage oligomeric matrix protein (COMP) gene in pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia." Ann N Y Acad Sci 785: 188-194.
- Cohn DH** (2001). "Defects in extracellular matrix structural proteins in the osteochondrodysplasias" The Molecular Basis of Skeletogenesis 232: 195-212.
- Cooper RR, Ponseti IV and Maynard JA** (1973). "Pseudoachondroplastic dwarfism. A rough-surfaced endoplasmic reticulum storage disorder." J Bone Joint Surg Am 55(3): 475-484.
- Cotterill SL, Jackson GC, Leighton MP, Wagener R, Mäkitie O, Cole WG and Briggs MD** (2005). "Multiple Epiphyseal Dysplasia Mutations in MATN3 Cause Misfolding of the A-Domain and Prevent Secretion of Mutant Matrilin-3." Human Mutation in press DOI10.1002/humu.20263
- Czarny-Ratajczak M, Lohiniva J, Rogala P, Kozłowski K, Perala M, Carter L, Spector TD, Kolodziej L, Seppanen U, Glazar R, Krolewski J, Latos-Bielenska A and Ala-Kokko L** (2001). "A mutation in COL9A1 causes multiple epiphyseal dysplasia: further evidence for locus heterogeneity." Am J Hum Genet 69(5): 969-980.
- Delot E, Brodie SG, King LM, Wilcox WR and Cohn DH** (1998). "Physiological and pathological secretion of cartilage oligomeric matrix protein by cells in culture." J Biol Chem 273(41): 26692-26697.
- Delot E, King LM, Briggs MD, Wilcox WR and Cohn DH** (1999). "Trinucleotide expansion mutations in the cartilage oligomeric matrix protein (COMP) gene." Hum Mol Genet 8(1): 123-128.
- Di Cesare PE, Chen FS, Moergelin M, Carlson CS, Leslie MP, Perris R and Fang C** (2002). "Matrix-matrix interaction of cartilage oligomeric matrix protein and fibronectin." Matrix Biol 21(5): 461-470.
- Di Cesare PE, Fang C, Leslie MP, Tulli H, Perris R and Carlson CS** (2000). "Expression of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) by embryonic and adult osteoblasts." J Orthop Res 18(5): 713-720.
- DiCesare PE, Morgelin M, Carlson CS, Pasumarti S and Paulsson M** (1995). "Cartilage oligomeric matrix protein: isolation and characterization from human articular cartilage." J Orthop Res 13(3): 422-428.
- Dinser R, Kreppel F, Zaucke F, Blank C, Paulsson M, Kochanek S and Maurer P** (2001). "Comparison of long-term transgene expression after non-viral and adenoviral gene transfer into primary articular chondrocytes." Histochem Cell Biol 116(1): 69-77.
- Dinser R, Zaucke F, Kreppel F, Hultenby K, Kochanek S, Paulsson M and Maurer P** (2002). "Pseudoachondroplasia is caused through both intra- and extracellular pathogenic pathways." J Clin Invest 110(4): 505-513.
- Duke J, Montufar-Solis D, Underwood S, Lalani Z and Hecht JT** (2003). "Apoptosis staining in cultured pseudoachondroplasia chondrocytes." Apoptosis 8(2): 191-197.

- Eckstein F, Weusten A, Schmidt C, Wehr U, Wanke R, Rambeck W, Wolf E and Mohan S** (2004). "Longitudinal *in vivo* effects of growth hormone overexpression on bone in transgenic mice." J Bone Miner Res 19(5): 802-810.
- Efimov VP, Engel J and Malashkevich VN** (1996). "Crystallization and preliminary crystallographic study of the pentamerizing domain from cartilage oligomeric matrix protein: a five-stranded alpha-helical bundle." Proteins 24(2): 259-262.
- Engel J** (1992). "Laminins and other strange proteins." Biochemistry 31(44): 10643-10651.
- Engel J** (2004). "Role of oligomerization domains in thrombospondins and other extracellular matrix proteins." Int J Biochem Cell Biol 36(6): 997-1004.
- Faller A**, (1995). "Der Körper des Menschen." 12. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart
- Fang C, Carlson CS, Leslie MP, Tulli H, Stolerman E, Perris R, Ni L and Di Cesare PE** (2000). "Molecular cloning, sequencing, and tissue and developmental expression of mouse cartilage oligomeric matrix protein (COMP)." J Orthop Res 18(4): 593-603.
- Fairbank T** (1947). "Dysplasia epiphysealis multiplex." Br J Surg 26: 225-232.
- Forlino A, Piazza R, Tiveron C, Della Torre S, Tatangelo L, Bonafe L, Gualeni B, Romano A, Pecora F, Superti-Furga A, Cetta G and Rossi A** (2005). "A diastrophic dysplasia sulfate transporter (SLC26A2) mutant mouse: morphological and biochemical characterization of the resulting chondrodysplasia phenotype." Hum Mol Genet 14(6): 859-871.
- Forriol F and Shapiro F** (2005). "Bone development: interaction of molecular components and biophysical forces." Clin Orthop Relat Res(432): 14-33.
- Franzen A, Heinegård D and Solursh M** (1987). "Evidence for sequential appearance of cartilage matrix proteins in developing mouse limbs and in cultures of mouse mesenchymal cells." Differentiation 36(3): 199-210.
- Gensure RC, Makitie O, Barclay C, Chan C, Depalma SR, Bastepe M, Abuzahra H, Couper R, Mundlos S, Silience D, Ala Kokko L, Seidman JG, Cole WG and Juppner H** (2005). "A novel COL1A1 mutation in infantile cortical hyperostosis (Caffey disease) expands the spectrum of collagen-related disorders." J Clin Invest 115(5): 1250-1257.
- Gilbert-Barnes E, Langer LO, Jr., Opitz JM, Laxova R and Sotelo-Arila C** (1996). "Kniest dysplasia: radiologic, histopathological, and scanning electronmicroscopic findings." Am J Med Genet 63(1): 34-45.
- Gleghorn L, Ramesar R, Beighton P and Wallis G** (2005). "A mutation in the variable repeat region of the aggrecan gene (AGC1) causes a form of spondyloepiphyseal dysplasia associated with severe, premature osteoarthritis." Am J Hum Genet 77(3): 484-490.
- Guo Y, Bozic D, Malashkevich VN, Kammerer RA, Schulthess T and Engel J** (1998). "All-trans retinol, vitamin D and other hydrophobic compounds bind in the axial pore of the five-stranded coiled-coil domain of cartilage oligomeric matrix protein." Embo J 17(18): 5265-5272.
- Hagenas L and Hertel T** (2003). "Skeletal dysplasia, growth hormone treatment and body proportion: comparison with other syndromic and non-syndromic short children." Horm Res 60 Suppl 3: 65-70.
- Hagg R, Hedbom E, Mollers U, Aszodi A, Fassler R and Bruckner P** (1997). "Absence of the alpha1(IX) chain leads to a functional knock-out of the entire collagen IX protein in mice." J Biol Chem 272(33): 20650-20654.
- Hall CM** (2002). "International nosology and classification of constitutional disorders of bone (2001)." Am J Med Genet 113(1): 65-77.
- Hall JW, 3rd, Prentice CH, Smiley G and Werkhaven J** (1995). "Auditory dysfunction in selected syndromes and patterns of malformations: review and case findings." J Am Acad Audiol 6(1): 80-92.
- Han F, Kipnes JR, Li Y, Tuan RS and Hall DJ** (2002). "The murine COMP (cartilage oligomeric matrix protein) promoter contains a potent transcriptional repressor region." Osteoarthritis Cartilage 10(8): 638-645.
- Hanahan D and Meselson M** (1983). "Plasmid screening at high colony density." Methods Enzymol 100: 333-342.
- Hankenson KD, Hormuzdi SG, Meganck JA and Bornstein P** (2005). "Mice with a disruption of the thrombospondin 3 gene differ in geometric and biomechanical properties of bone and have accelerated development of the femoral head." Mol Cell Biol 25(13): 5599-5606.
- Hashimoto Y, Tomiyama T, Yamano Y and Mori H** (2003). "Mutation (D472Y) in the type 3 repeat domain of cartilage oligomeric matrix protein affects its early vesicle trafficking in endoplasmic reticulum and induces apoptosis." Am J Pathol 163(1): 101-110.
- Hauser N, Paulsson M, Kale AA and DiCesare PE** (1995). "Tendon extracellular matrix contains pentameric thrombospondin-4 (TSP-4)." FEBS Lett 368(2): 307-310.

- Hecht JT, Deere M, Putnam E, Cole W, Vertel B, Chen H and Lawler J** (1998). "Characterization of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in human normal and pseudoachondroplasia musculoskeletal tissues." Matrix Biol 17(4): 269-278.
- Hecht JT, Francomano CA, Briggs MD, Deere M, Conner B, Horton WA, Warman M, Cohn DH and Blanton SH** (1993). "Linkage of typical pseudoachondroplasia to chromosome 19." Genomics 18(3): 661-666.
- Hecht JT, Hayes E, Haynes R and Cole WG** (2005). "COMP mutations, chondrocyte function and cartilage matrix." Matrix Biol 23(8): 525-533.
- Hecht JT, Hayes E, Snuggs M, Decker G, Montufar-Solis D, Doege K, Mwalle F, Poole R, Stevens J and Duke PJ** (2001). "Calreticulin, PDI, Grp94 and BiP chaperone proteins are associated with retained COMP in pseudoachondroplasia chondrocytes." Matrix Biol 20(4): 251-262.
- Hecht JT, Makitie O, Hayes E, Haynes R, Susic M, Montufar-Solis D, Duke PJ and Cole WG** (2004). "Chondrocyte cell death and intracellular distribution of COMP and type IX collagen in the pseudoachondroplasia growth plate." J Orthop Res 22(4): 759-767.
- Hecht JT, Montufar-Solis D, Decker G, Lawler J, Daniels K and Duke PJ** (1998). "Retention of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and cell death in redifferentiated pseudoachondroplasia chondrocytes." Matrix Biol 17(8-9): 625-633.
- Hecht JT, Nelson LD, Crowder E, Wang Y, Elder FF, Harrison WR, Francomano CA, Prange CK, Lennon GG, Deere M and et al.** (1995). "Mutations in exon 17B of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) cause pseudoachondroplasia." Nat Genet 10(3): 325-329.
- Hedbom E, Antonsson P, Hjerpe A, Aeschlimann D, Paulsson M, Rosa-Pimentel E, Sommarin Y, Wendel M, Oldberg A and Heinegård D** (1992). "Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage." J Biol Chem 267(9): 6132-6136.
- Heselson NG, Cremin BJ and Beighton P** (1977). "Pseudoachondroplasia, a report of 13 cases." Br J Radiol 50(595): 473-482.
- Hirsch MS, Lunsford LE, Trinkaus-Randall V and Svoboda KK** (1997). "Chondrocyte survival and differentiation in situ are integrin mediated." Dev Dyn 210(3): 249-263.
- Holden P, Canty EG, Mortier GR, Zabel B, Spranger J, Carr A, Grant ME, Loughlin JA and Briggs MD** (1999). "Identification of novel pro-alpha2(I) collagen gene mutations in two families with distinctive oligo-epiphyseal forms of multiple epiphyseal dysplasia." Am J Hum Genet 65(1): 31-38.
- Holden P, Keene DR, Lunstrum GP, Bachinger HP and Horton WA** (2005). "Secretion of cartilage oligomeric matrix protein is affected by the signal peptide." J Biol Chem 280(17): 17172-17179.
- Holden P, Meadows RS, Chapman KL, Grant ME, Kadler KE and Briggs MD** (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.
- Horiki M, Imamura T, Okamoto M, Hayashi M, Murai J, Myoui A, Ochi T, Miyazono K, Yoshikawa H and Tsumaki N** (2004). "Smad6/Smurf1 overexpression in cartilage delays chondrocyte hypertrophy and causes dwarfism with osteopenia." J Cell Biol 165(3): 433-445.
- Huerre-Jeanpierre C, Mattei MG, Weil D, Grzeschik KH, Chu ML, Sangiorgi FO, Sobel ME, Ramirez F and Junien C** (1986). "Further evidence for the dispersion of the human fibrillar collagen genes." Am J Hum Genet 38(1): 26-37.
- Ikegawa S, Ohashi H, Hosoda F, Fukushima Y, Ohki M and Nakamura Y** (1998). "Pseudoachondroplasia with de novo deletion [del(11)(q21q22.2)]." Am J Med Genet 77(5): 356-359.
- Ikegawa S, Ohashi H, Nishimura G, Kim KC, Sannohe A, Kimizuka M, Fukushima Y, Nagai T and Nakamura Y** (1998). "Novel and recurrent COMP (cartilage oligomeric matrix protein) mutations in pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia." Hum Genet 103(6): 633-638.
- Inada M, Wang Y, Byrne MH, Rahman MU, Miyaura C, Lopez-Otin C and Krane SM** (2004). "Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification." Proc Natl Acad Sci U S A 101(49): 17192-17197.
- International Working Group on Constitutional Diseases of Bone** (1998). "International nomenclature and classification of the osteochondrodysplasias (1997)." Am J Med Genet 79(5): 376-382.
- Issack PS, Fang C, Leslie MP and Di Cesare PE** (2000). "Chondrocyte-specific enhancer regions in the COMP gene." J Orthop Res 18(3): 345-350.
- Issack PS, Liu CJ, Prazak L and Di Cesare PE** (2004). "A silencer element in the cartilage oligomeric matrix protein gene regulates chondrocyte-specific expression." J Orthop Res 22(4): 751-758.

- Jakkula E, Makitie O, Czarny-Rataczak M, Jackson GC, Damignani R, Susic M, Briggs MD, Cole WG and Ala-Kokko L** (2005). "Mutations in the known genes are not the major cause of MED; distinctive phenotypic entities among patients with no identified mutations." *Eur J Hum Genet* 13(3): 292-301.
- Kammerer RA, Schulthess T, Landwehr R, Lustig A, Fischer D and Engel J** (1998). "Tenascin-C hexabrachion assembly is a sequential two-step process initiated by coiled-coil alpha-helices." *J Biol Chem* 273(17): 10602-10608.
- Kanazawa H, Tanaka H, Inoue M, Yamanaka Y, Namba N and Seino Y** (2003). "Efficacy of growth hormone therapy for patients with skeletal dysplasia." *J Bone Miner Metab* 21(5): 307-310.
- Kennedy J, Jackson G, Ramsden S, Taylor J, Newman W, Wright MJ, Donnai D, Elles R and Briggs MD** (2005). "COMP mutation screening as an aid for the clinical diagnosis and counselling of patients with a suspected diagnosis of pseudoachondroplasia or multiple epiphyseal dysplasia." *Eur J Hum Genet* 13(5): 547-555.
- Kennedy J, Jackson GC, Barker FS, Nundlall S, Bella J, Wright MJ, Mortier GR, Neas K, Thompson E, Elles R and Briggs MD** (2005). "Novel and recurrent mutations in the C-terminal domain of COMP cluster in two distinct regions and result in a spectrum of phenotypes within the pseudoachondroplasia -- multiple epiphyseal dysplasia disease group." *Hum Mutat* 25(6): 593-594.
- Kipnes J, Carlberg AL, Loreda GA, Lawler J, Tuan RS and Hall DJ** (2003). "Effect of cartilage oligomeric matrix protein on mesenchymal chondrogenesis in vitro." *Osteoarthritis Cartilage* 11(6): 442-454.
- Kipnes JR, Xu L, Han F, Rallapalli R, Jimenez S, Hall DJ, Tuan RS and Li Y** (2000). "Molecular cloning and expression patterns of mouse cartilage oligomeric matrix protein gene." *Osteoarthritis Cartilage* 8(3): 236-239.
- Klatt AR, Nitsche DP, Kobbe B, Macht M, Paulsson M and Wagener R** (2001). "Molecular structure, processing, and tissue distribution of matrilin-4." *J Biol Chem* 276(20): 17267-17275.
- Klatt AR, Nitsche DP, Kobbe B, Morgelin M, Paulsson M and Wagener R** (2000). "Molecular structure and tissue distribution of matrilin-3, a filament-forming extracellular matrix protein expressed during skeletal development." *J Biol Chem* 275(6): 3999-4006.
- Kleerekoper Q, Hecht JT and Putkey JA** (2002). "Disease-causing mutations in cartilage oligomeric matrix protein cause an unstructured Ca<sup>2+</sup> binding domain." *J Biol Chem* 277(12): 10581-10589.
- Ko Y, Kobbe B, Nicolae C, Miosge N, Paulsson M, Wagener R and Aszodi A** (2004). "Matrilin-3 is dispensable for mouse skeletal growth and development." *Mol Cell Biol* 24(4): 1691-1699.
- Kohfeldt E, Maurer P, Vannahme C and Timpl R** (1997). "Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican." *FEBS Lett* 414(3): 557-561.
- Kohler G and Hesse B** (2004). "[Epiphyseal dysplasia--symptoms and differential diagnostic aspects]." *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 142(4): 397-402.
- Kutz WE, Gong Y and Warman ML** (2005). "WISP3, the gene responsible for the human skeletal disease progressive pseudorheumatoid dysplasia, is not essential for skeletal function in mice." *Mol Cell Biol* 25(1): 414-421.
- Kvansakul M, Adams JC and Hohenester E** (2004). "Structure of a thrombospondin C-terminal fragment reveals a novel calcium core in the type 3 repeats." *Embo J* 23(6): 1223-1233.
- Labrador JP, Azcoitia V, Tuckermann J, Lin C, Olaso E, Manes S, Bruckner K, Goergen JL, Lemke G, Yancopoulos G, Angel P, Martinez C and Klein R** (2001). "The collagen receptor DDR2 regulates proliferation and its elimination leads to dwarfism." *EMBO Rep* 2(5): 446-452.
- Langer LO, Jr., Wolfson BJ, Scott CI, Jr., Reid CS, Schidlow DV, Millar EA, Borns PF, Lubicky JP and Carpenter BL** (1993). "Further delineation of spondylo-meta-epiphyseal dysplasia, short limb-abnormal calcification type, with emphasis on diagnostic features." *Am J Med Genet* 45(4): 488-500.
- Lawler J, Duquette M, Whittaker CA, Adams JC, McHenry K and DeSimone DW** (1993). "Identification and characterization of thrombospondin-4, a new member of the thrombospondin gene family." *J Cell Biol* 120(4): 1059-1067.
- Lawler J and Hynes RO** (1986). "The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins." *J Cell Biol* 103(5): 1635-1648.
- Lawler J and Simons ER** (1983). "Cooperative binding of calcium to thrombospondin. The effect of calcium on the circular dichroism and limited tryptic digestion of thrombospondin." *J Biol Chem* 258(20): 12098-12101.
- Lawler JW, Slayter HS and Coligan JE** (1978). "Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets." *J Biol Chem* 253(23): 8609-8616.
- Liu CJ, Prazak L, Fajardo M, Yu S, Tyagi N and Di Cesare PE** (2004). "Leukemia/lymphoma-related factor, a POZ domain-containing transcriptional repressor, interacts with histone deacetylase-1 and inhibits cartilage oligomeric matrix protein gene expression and chondrogenesis." *J Biol Chem* 279(45): 47081-47091.

- Lo MY and Kim HT** (2004). "Chondrocyte apoptosis induced by collagen degradation: inhibition by caspase inhibitors and IGF-1." J Orthop Res 22(1): 140-144.
- Lories RJ and Luyten FP** (2005). "Bone Morphogenetic Protein signaling in joint homeostasis and disease." Cytokine Growth Factor Rev 16(3): 287-298.
- Loughlin J, Irven C, Mustafa Z, Briggs MD, Carr A, Lynch SA, Knowlton RG, Cohn DH and Sykes B** (1998). "Identification of five novel mutations in cartilage oligomeric matrix protein gene in pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia." Hum Mutat Suppl 1: S10-17.
- Mabuchi A, Manabe N, Haga N, Kitoh H, Ikeda T, Kawaji H, Tamai K, Hamada J, Nakamura S, Brunetti-Pierri N, Kimizuka M, Takatori Y, Nakamura K, Nishimura G, Ohashi H and Ikegawa S** (2003). "Novel types of COMP mutations and genotype-phenotype association in pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia." Hum Genet 112(1): 84-90.
- Maddox BK, Keene DR, Sakai LY, Charbonneau NL, Morris NP, Ridgway CC, Boswell BA, Sussman MD, Horton WA, Bachinger HP and Hecht JT** (1997). "The fate of cartilage oligomeric matrix protein is determined by the cell type in the case of a novel mutation in pseudoachondroplasia." J Biol Chem 272(49): 30993-30997.
- Maddox BK, Mokashi A, Keene DR and Bachinger HP** (2000). "A cartilage oligomeric matrix protein mutation associated with pseudoachondroplasia changes the structural and functional properties of the type 3 domain." J Biol Chem 275(15): 11412-11417.
- Malashkevich VN, Kammerer RA, Efimov VP, Schulthess T and Engel J** (1996). "The crystal structure of a five-stranded coiled coil in COMP: a prototype ion channel?" Science 274(5288): 761-765.
- Mallein-Gerin F, Ruggiero F, Quinn TM, Bard F, Grodzinsky AJ, Olsen BR and van der Rest M** (1995). "Analysis of collagen synthesis and assembly in culture by immortalized mouse chondrocytes in the presence or absence of alpha 1(IX) collagen chains." Exp Cell Res 219(1): 257-265.
- Mann HH, Ozbek S, Engel J, Paulsson M and 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.
- Maroteaux P, Stanescu R, Stanescu V and Fontaine G** (1980). "The mild form of pseudoachondroplasia. Identity of the morphological and biochemical alterations of growth cartilage with those of typical pseudoachondroplasia." Eur J Pediatr 133(3): 227-231.
- Maynard JA, Cooper RR and Ponseti IV** (1972). "A unique rough surfaced endoplasmic reticulum inclusion in pseudoachondroplasia." Lab Invest 26(1): 40-44.
- McClellan AJ, Tam S, Kaganovich D and Frydman J** (2005). "Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations." Nat Cell Biol 7(8): 736-741.
- McCauley LK** (2001). "Transgenic mouse models of metabolic bone disease." Curr Opin Rheumatol 13(4): 316-325.
- Misenheimer TM and Mosher DF** (1995). "Calcium ion binding to thrombospondin 1." J Biol Chem 270(4): 1729-1733.
- Morgelin M, Heinegård D, Engel J and Paulsson M** (1992). "Electron microscopy of native cartilage oligomeric matrix protein purified from the Swarm rat chondrosarcoma reveals a five-armed structure." J Biol Chem 267(9): 6137-6141.
- Mülhardt C**, (2000). "Der Experimentator: Molekularbiologie." 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg
- Muragaki Y, Mariman EC, van Beersum SE, Perala M, van Mourik JB, Warman ML, Olsen BR and Hamel BC** (1996). "A mutation in the gene encoding the alpha 2 chain of the fibril-associated collagen IX, COL9A2, causes multiple epiphyseal dysplasia (EDM2)." Nat Genet 12(1): 103-105.
- Neidhart M, Hauser N, Paulsson M, DiCesare PE, Michel BA and Hauselmann HJ** (1997). "Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation." Br J Rheumatol 36(11): 1151-1160.
- Neidhart M, Zaucke F, von Knoch R, Jungel A, Michel BA, Gay RE and Gay S** (2005). "Galectin-3 is induced in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts after adhesion to cartilage oligomeric matrix protein." Ann Rheum Dis 64(3): 419-424.
- Newton G, Weremowicz S, Morton CC, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA and Lawler J** (1994). "Characterization of human and mouse cartilage oligomeric matrix protein." Genomics 24(3): 435-439.
- Oehlmann R, Summerville GP, Yeh G, Weaver EJ, Jimenez SA and Knowlton RG** (1994). "Genetic linkage mapping of multiple epiphyseal dysplasia to the pericentromeric region of chromosome 19." Am J Hum Genet 54(1): 3-10.
- Ogilvie D, Wordworth P, Thompson E and Sykes B** (1986). "Evidence against the structural gene encoding type II collagen (COL2A1) as the mutant locus in achondroplasia." J Med Genet 23(1): 19-22.
- Oldberg A, Antonsson P, Lindblom K and Heinegård D** (1992). "COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins." J Biol Chem 267(31): 22346-22350.

- Otten C, Wagener R, Paulsson M and Zaucke F** (2005). "Matrilin-3 mutations that cause chondrodysplasias interfere with protein trafficking while a mutation associated with hand osteoarthritis does not." J Med Genet 42(10): 774-779.
- Ozbek S, Engel J and Stetefeld J** (2002). "Storage function of cartilage oligomeric matrix protein: the crystal structure of the coiled-coil domain in complex with vitamin D(3)." Embo J 21(22): 5960-5968.
- Paassilta P, Lohiniva J, Annunen S, Bonaventure J, Le Merrer M, Pai L and Ala-Kokko L** (1999). "COL9A3: A third locus for multiple epiphyseal dysplasia." Am J Hum Genet 64(4): 1036-1044.
- Paulsson M and Heinegård D** (1984). "Noncollagenous cartilage proteins current status of an emerging research field." Coll Relat Res 4(3): 219-229.
- Paulsson M, Piecha D, Segat D, Smyth N and Wagener R** (1999). "The matrilins: a growing family of A-domain-containing proteins." Biochem Soc Trans 27(6): 824-826.
- Posey KL, Davies S, Bales ES, Haynes R, Sandell LJ and Hecht JT** (2005). "In vivo human Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) promoter activity." Matrix Biol.
- Posey KL, Hayes E, Haynes R and Hecht JT** (2004). "Role of TSP-5/COMP in pseudoachondroplasia." Int J Biochem Cell Biol 36(6): 1005-1012.
- Qabar AN, Lin Z, Wolf FW, O'Shea KS, Lawler J and Dixit VM** (1994). "Thrombospondin 3 is a developmentally regulated heparin binding protein." J Biol Chem 269(2): 1262-1269.
- Recklies AD, Baillargeon L and White C** (1998). "Regulation of cartilage oligomeric matrix protein synthesis in human synovial cells and articular chondrocytes." Arthritis Rheum 41(6): 997-1006.
- Rehm H**, (2000). "Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics." 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg
- Ribbing S**, (1937). "Studien über hereditäre multiple Epiphysenstörungen." Acta Radiol Suppl 34: 1-107.
- Rimoin DL, Rasmussen IM, Briggs MD, Roughley PJ, Gruber HE, Warman ML, Olsen BR, Hsia YE, Yuen J, Reinker K and et al.** (1994). "A large family with features of pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia: exclusion of seven candidate gene loci that encode proteins of the cartilage extracellular matrix." Hum Genet 93(3): 236-242.
- Rosenberg K, Olsson H, Morgelin M and Heinegård D** (1998). "Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen." J Biol Chem 273(32): 20397-20403.
- Rosenberg R**, (2001). "Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) – function in collagen binding and assembly." Dissertation, Lund University, Faculty of Medicine.
- Sakai K, Hiripi L, Glumoff V, Brandau O, Eerola R, Vuorio E, Bosze Z, Fassler R and Aszodi A** (2001). "Stage- and tissue-specific expression of a Col2a1-Cre fusion gene in transgenic mice." Matrix Biol 19(8): 761-767.
- Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T** (1989). "Molecular cloning : a laboratory manual." Cold Spring Harbo, Cold Spring Harbo Laboratory Press.
- Savarirayan R and Rimoin DL** (2004). "Skeletal dysplasias." Adv Pediatr 51: 209-229.
- Schenkel J**, (1995). "Transgene Tiere." Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg
- Schmidt C, Priemel M, Kohler T, Weusten A, Muller R, Amling M and Eckstein F** (2003). "Precision and accuracy of peripheral quantitative computed tomography (pQCT) in the mouse skeleton compared with histology and microcomputed tomography (microCT)." J Bone Miner Res 18(8): 1486-1496.
- Schmitz M**, (2002). "Herstellung eines Konstruktes zur Generierung von transgenen Mäusen mit Chondrodysplasie-assoziierten Mutation im cartilage oligomeric matrix protein." Diplomarbeit, Universität zu Köln, Institut für Biochemie II, Medizinische Fakultät.
- Shen J** (1994). "Spatial-dynamic population systems: analysis and projection." Environ Plan A 26(3): 471-488.
- Smith RK, Zunino L, Webbon PM and Heinegård D** (1997). "The distribution of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in tendon and its variation with tendon site, age and load." Matrix Biol 16(5): 255-271.
- Solloway MJ, Dudley AT, Bikoff EK, Lyons KM, Hogan BL and Robertson EJ** (1998). "Mice lacking Bmp6 function." Dev Genet 22(4): 321-339.
- Spranger J** (1992). "International classification of osteochondrodysplasias. The International Working Group on Constitutional Diseases of Bone." Eur J Pediatr 151(6): 407-415.

- Spranger J, Menger H, Mundlos S, Winterpacht A and Zabel B** (1994). "Kniest dysplasia is caused by dominant collagen II (COL2A1) mutations: parental somatic mosaicism manifesting as Stickler phenotype and mild spondyloepiphyseal dysplasia." Pediatr Radiol 24(6): 431-435.
- Spranger J, Winterpacht A and Zabel B** (1994). "The type II collagenopathies: a spectrum of chondrodysplasias." Eur J Pediatr 153(2): 56-65.
- Spranger J** (1997). "Irrtümer der Skelettentwicklung." Monatsschr Kinderheilkd 145: 334-341.
- Spranger JW, Zabel B, Kennedy J, Jackson G and Briggs M** (2005). "A disorder resembling pseudoachondroplasia but without COMP mutation." Am J Med Genet A 132(1): 20-24.
- Stanescu R, Stanescu V, Muriel MP and Maroteaux P** (1993). "Multiple epiphyseal dysplasia, Fairbank type: morphologic and biochemical study of cartilage." Am J Med Genet 45(4): 501-507.
- Stanescu V, Maroteaux P and Stanescu R** (1982). "The biochemical defect of pseudoachondroplasia." Eur J Pediatr 138(3): 221-225.
- Stanescu V, Stanescu R and Maroteaux P** (1982). "Pathogenesis of pseudoachondroplasia and diastrophic dysplasia." Prog Clin Biol Res 104: 385-394.
- Stevens JW** (1999). "Pseudoachondroplastic dysplasia: an Iowa review from human to mouse." Iowa Orthop J 19: 53-65.
- Stickens D, Behonick DJ, Ortega N, Heyer B, Hartenstein B, Yu Y, Fosang AJ, Schorpp-Kistner M, Angel P and Werb Z** (2004). "Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice." Development 131(23): 5883-5895.
- Storm EE and Kingsley DM** (1999). "GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development." Dev Biol 209(1): 11-27.
- Superti-Furga A, Bonafe L and Rimoin DL** (2001). "Molecular-pathogenetic classification of genetic disorders of the skeleton." Am J Med Genet 106(4): 282-293.
- Svensson L, Aszodi A, Heinegård D, Hunziker EB, Reinholt FP, Fassler R and Oldberg A** (2002). "Cartilage oligomeric matrix protein-deficient mice have normal skeletal development." Mol Cell Biol 22(12): 4366-4371.
- Tavella S, Biticchi R, Schito A, Minina E, Di Martino D, Pagano A, Vortkamp A, Horton WA, Cancedda R and Garofalo S** (2004). "Targeted expression of SHH affects chondrocyte differentiation, growth plate organization, and Sox9 expression." J Bone Miner Res 19(10): 1678-1688.
- Thur J, Rosenberg K, Nitsche DP, Pihlajamaa T, Ala-Kokko L, Heinegård D, Paulsson M and 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.
- Tuan RS** (2004). "Biology of developmental and regenerative skeletogenesis." Clin Orthop Relat Res(427 Suppl): S105-117.
- Unger S and Hecht JT** (2001). "Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia: New etiologic developments." Am J Med Genet 106(4): 244-250.
- Unger S, Korkko J, Krakow D, Lachman RS, Rimoin DL and Cohn DH** (2001). "Double heterozygosity for pseudoachondroplasia and spondyloepiphyseal dysplasia congenita." Am J Med Genet 104(2): 140-146.
- Unger SL, Briggs MD, Holden P, Zabel B, Ala-Kokko L, Paassilta P, Lohiniva J, Rimoin DL, Lachman RS and Cohn DH** (2001). "Multiple epiphyseal dysplasia: radiographic abnormalities correlated with genotype." Pediatr Radiol 31(1): 10-18.
- Vos HL, Devarayalu S, de Vries Y and Bornstein P** (1992). "Thrombospondin 3 (Thbs3), a new member of the thrombospondin gene family." J Biol Chem 267(17): 12192-12196.
- Vranka J, Mokashi A, Keene DR, Tufa S, Corson G, Sussman M, Horton WA, Maddox K, Sakai L and Bachinger HP** (2001). "Selective intracellular retention of extracellular matrix proteins and chaperones associated with pseudoachondroplasia." Matrix Biol 20(7): 439-450.
- Weaver EJ, Summerville GP, Yeh G, Hervada-Page M, Oehlmann R, Rothman R, Jimenez SA and Knowlton RG** (1993). "Exclusion of type II and type VI procollagen gene mutations in a five-generation family with multiple epiphyseal dysplasia." Am J Med Genet 45(3): 345-352.
- Wilson R, Freddi S, Chan D, Cheah KS and Bateman JF** (2005). "Misfolding of collagen X chains harboring Schmid metaphyseal chondrodysplasia mutations results in aberrant disulfide bond formation, intracellular retention, and activation of the unfolded protein response." J Biol Chem 280(16): 15544-15552.
- Wolpert L**, (1999). "Entwicklungsbiologie." Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg

**Zabel B, Hilbert K, Stoss H, Superti-Furga A, Spranger J and Winterpacht A** (1996). "A specific collagen type II gene (COL2A1) mutation presenting as spondyloperipheral dysplasia." Am J Med Genet 63(1): 123-128.

**Zaia J, Boynton RE, McIntosh A, Marshak DR, Olsson H, Heinegård D and Barry FP** (1997). "Post-translational modifications in cartilage oligomeric matrix protein. Characterization of the N-linked oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry." J Biol Chem 272(22): 14120-14126.

**Zaucke F, Dinser R, Maurer P and Paulsson M** (2001). "Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and collagen IX are sensitive markers for the differentiation state of articular primary chondrocytes." Biochem J 358(Pt 1): 17-24.

**Zhao H, Ross FP and Teitelbaum SL** (2005). "Unoccupied alpha(v)beta3 integrin regulates osteoclast apoptosis by transmitting a positive death signal." Mol Endocrinol 19(3): 771-780.

# VII Abkürzungen

AEC	<b>3-Amino-9-Ethyl</b> carbazol
AK	<b>Antikörper</b>
amp	<b>Ampicillin</b>
BC-Assay	<b>Bicinchoninsäure-Assay</b>
BMP	<b>bone morphogenetic protein</b>
bp	<b>Basenpaare</b>
BSA	<b>bovines Serumalbumin</b>
COMP	<b>cartilage oligomeric matrix protein</b>
dam	<i>DNA adenine methylase</i>
dcm	<i>DNA cytosine methylase</i>
DNA	<i>desoxyribonucleinacid</i>
ECM	<b>extracellular matrix</b> (Extrazelluläre Matrix)
E.coli	<b>Escherichia coli</b>
EM	<b>Elektronenmikroskopie</b>
ER	<b>endoplasmatisches Retikulum</b>
EtBr	<b>Ethidiumbromid</b>
EtOH	<b>Ethanol</b>
f.c.	<i>final concentration</i> (Endkonzentration)
GAPDH	<b>Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase</b>
GDF	<i>growth/differentiation factor</i>
HE	<b>Hämatoxylin &amp; Eosin</b>
HMW	<i>high molecular weight</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IF	<b>Immunfluoreszenz</b>
IP	<b>Immunpräzipitation</b>
IHC	<b>Immunhistochmie</b>
kDa	<b>Kilodalton</b>
ktr	<b>Kontrollline ohne Transgen</b>
LB	<b>Luria-Bertani</b>
LMW	<i>low molecular weight</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MED	<b>multiple epiphyseale Dysplasie</b>

MeOH	<b>Methanol</b>
MMP	<b>Matrixmetalloproteinase</b>
NC	<b>Nitrocellulose</b>
NEM	<b>N-Ethylmaleinimid</b>
nt	<b>Nicht transfiziert</b>
OD	<b>Optische Dichte</b>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	<b>Paraformaldehyd</b>
PMSF	<b>Phenylmethansulfonylfluorid</b>
pQCT	<b>Periphere quantitative Computertomographie</b>
PSACH	<b>Pseudoachondroplasie</b>
rER	<b>rauhes Endoplasmatisches Retikulum</b>
sf	<b>serumfrei</b>
TCA	<i>trichloroacetic acid</i>
TEM	<b>Transmissionselektronenmikroskopie</b>
tgA	Linie mit hoher Anzahl mutierter <b>Transgen</b> Kopien (Linie <b>A</b> )
tgA-ko	COMP <b>KO</b> Linie mit mutierten <b>Transgen</b> Kopien
tgB	Linie mit niedriger Anzahl mutiertem <b>Transgen</b> Kopien (Linie <b>B</b> )
tgWT	Linie mit <b>Wildtyp</b> <b>Transgen</b> Kopien
TMB	<b>3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin</b>
Upm	<b>Umdrehungen pro Minute</b>
ÜS	<b>Überstand</b> (Zellkulturmedium)
UV	<b>Ultraviolett</b>
WB	<b>Western Blot</b>
wt	<b>Wildtyp</b>
XTT	Tetrazoliumsalz
ZE	<b>Zellrasenextrakt</b> (Zellen-Lysat)
ZMMK	<b>Zentrum für Molekulare Medizin in Köln</b>

## VIII Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich und ganz ehrlich bei einigen Menschen bedanken, die alle in irgendeiner Form dazu beigetragen haben, dass ich es tatsächlich geschafft habe!

Bei Herrn Prof. Dr. Mats Paulsson bedanke ich mich für ein äußerst interessantes Thema, und für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit unter sehr guten Bedingungen. Besonders auch für die Möglichkeit, an nationalen und internationalen Kongressen teilnehmen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Helmut W. Klein und Herrn Prof. Dr. Jens Brüning danke ich für die freundliche Bereitschaft das Zweitgutachten bzw. den Prüfungsvorsitz zu übernehmen.

Ich danke vor allem meinem Chef Herrn Dr. Frank Zaucke fürs Aufbauen. Fürs Fördern und Fordern. Für kritische Fragen und wichtige Antworten. Für die ständige Bereitschaft und fürs Networking.

Danke auch an Herrn Wislav Kryzack für die Mikroinjektion. Aber vor allem auch für die wertvollen Tipps im Umgang mit den Mäusen. Herrn Dr. Nicolai Miosge für die EM Untersuchungen. Frau Dr. Anja Niehoff für die pQCT Analysen.

Sehr wichtig ist mir auch der Dank an meine Arbeitsgruppe. Für ein hervorragendes Teamwork und Hilfe untereinander. Für Beekers Vitalität, für Katrins, Christianes und Salins Zellen und für Tamaras RNA. Für die Lust auf Diskussion aber auch für das Interesse. Allen Mitarbeitern des Zentrums der Biochemie möchte ich herzlich für eine entspannte und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft und auch materielle Unterstützung danken, für lockere Draußensitzrunden und Aufdemdachfeierstunden.

An letzter und wichtigster Stelle sage ich meiner ganzen Familie „Danke!“, meiner Lebensgefährtin Nina und unserem Sohn Sebastian, unseren Eltern und Schwestern, meinem Schwager, meinem Neffen und meiner Nichte. Für so Vieles ! Einfach für Alles !!!

# IX Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, die anderen Werken in Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass die Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität vorgelegt und noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Ablauf des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Mats Paulsson betreut worden.

Köln, 27. Oktober 2005

# X Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: **Markus Schmitz**  
geb.: 13. Dezember 1973, Bedburg (Erft)  
Familienstand: eheähnliche Gemeinschaft, 1 Kind  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Anschrift: Vürfels 91, 51427 Bergisch Gladbach

## Schulabschluss, Zivildienst und Hochschulstudium

26.05.1994 **Abitur**  
am städtischen Gymnasium in Bedburg (Erft)

08/1994 – 10/1995 **Zivildienst**  
als Pflegehelfer im St. Hubertus-Krankenhaus in Bedburg (Erft)

10/1995 – 02/2001 **Studium der Biologie an der Math.-Nat.-Fakultät in Köln**  
Schwerpunkte: Genetik, Entwicklungsbiologie, Biochemie

05/2001 – 02/2002 **Diplomarbeit**  
Universitätsklinikum Köln, Zentrum für Biochemie, Med.- Fak.  
Betreuung durch Prof. Dr. Mats Paulsson  
Abschluss: Diplom-Biologe

03/2002 – 01/2006 **Promotion**  
Universitätsklinikum Köln, Zentrum für Biochemie, Med.- Fak.  
Betreuung durch Prof. Dr. Mats Paulsson

13.01.2006 Disputation

*Köln, 31. Januar 2006*