

# **Untersuchungen zur Funktion der Knorpelproteine Ucma und Matrilin-1 im Zebrafisch**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Cristian Dan Neacsu**

aus Bukarest / Rumänien

Köln 2011

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Mats Paulsson  
und  
Prof. Dr. rer. nat. Matthias Hammerschmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2011

Katerina

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A	Ampere
AB	Alcianblau
Abb.	Abbildung
ad.	“addiere” auffüllen auf
AP	alkalische Phosphatase
AR	Alizarinrot
BC	Bicinchoninsäure
BCIP	5Brom-4Chlor-3’Indoxylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CNBr	Cyanogenbromid
const.	konstante Einstellung
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP(s)	2’-Desoxyribonukleosid-5’-triphosphat(e)
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemoluminescence
ECM	extrazelluläre Matrix
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	engl. “expressed sequence tag”
FBS	fetal bovine serum
G	Erdbeschleunigung [ $\text{ms}^{-2}$ ]
G	Guanin
G	Giga ( $10^9$ )
GB	Gigabasen
Gla	$\gamma$ -Carboxyglutamat
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	zweifach destilliertes Wasser

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HABA	2-(4-Hydroxyazobenzol)-Benzoessäure
HEK	human embryonic kidney
HRP	Meerrettichperoxidase
k	Kilo (10 <sup>3</sup> )
KAc	Kaliumacetat
LB	lysogeny broth (spezifisch Lennox L Broth Base®)
M	Mega (10 <sup>6</sup> )
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
m	Mili (10 <sup>-3</sup> )
Matn-(1-4)	Matrilin (1-4)
Morpholino	Phosphordiamidat Morpholino Oligonukleotid
mRNA	messenger-RNA
n	Nano (10 <sup>-9</sup> )
NaAc	Natriumacetat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NEM	N-Ethylmaleimid
PAA	Polyacrylamid
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBT	phosphatgepufferte Salzlösung mit 0,05% (v/v) Tween 20
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonukleinsäure
rtPCR	Reverse Transkriptase Polymerasen-Kettenreaktion
s. o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	TRIS gepufferte Salzlösung
TBST	TRIS gepufferte Salzlösung mit 0,05% (v/v) Tween 20
TEMED	Tetramethyldiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling
V	Volt
Vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen (Volumenprozent)
vWA	von Willebrand Faktor A
w/v	Gewicht pro Volumen (Gewichtsprozent)



# 1. Einleitung

## 1.1. Das Skelett als definierendes Organ

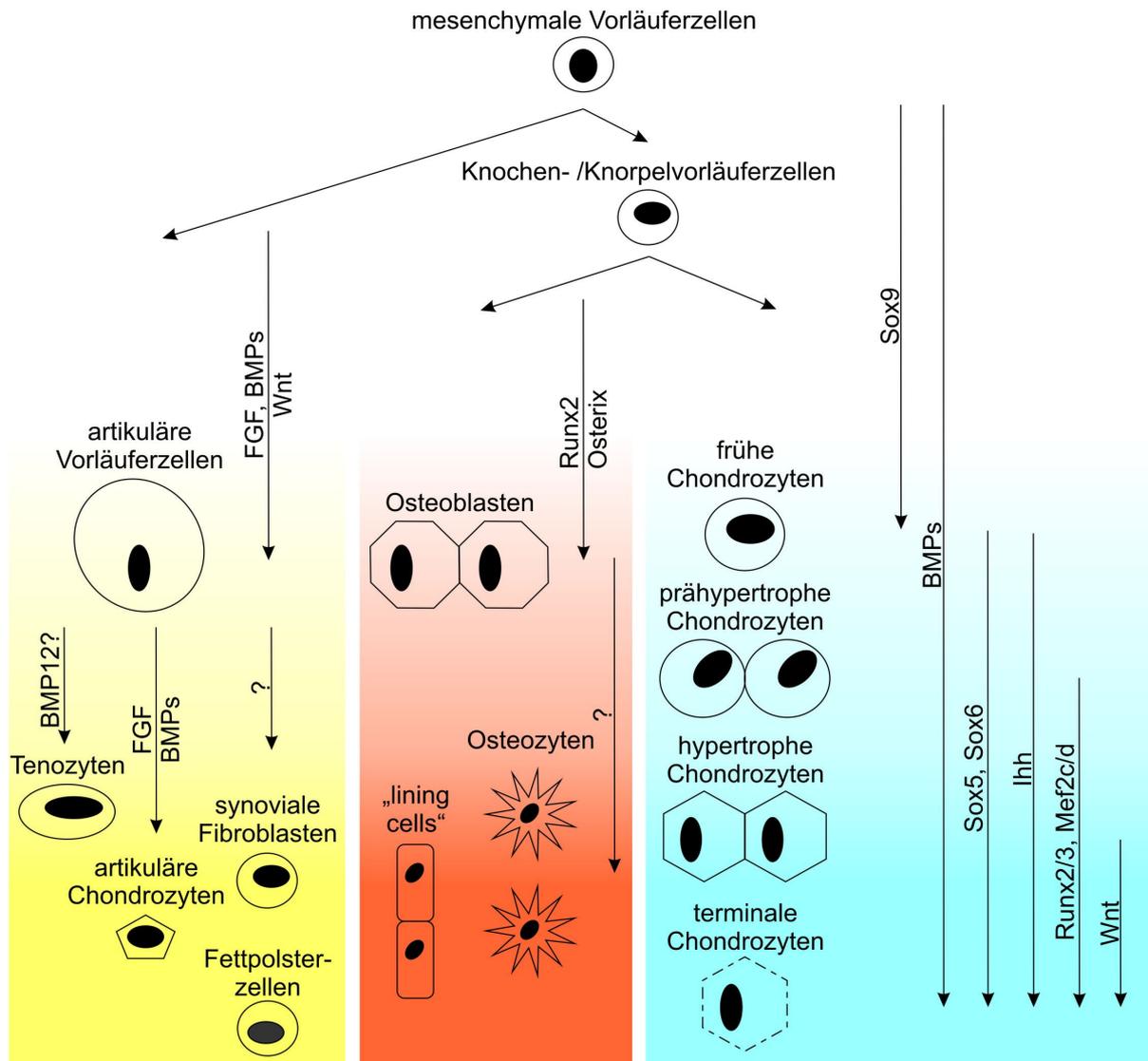
### 1.1.1. Vorwort

Der *Homo sapiens* gehört zum Subphylum der Wirbeltiere, dessen definierendes Organ die Wirbelsäule ist. Die Wirbelsäule wiederum ist der entwicklungsgeschichtlich älteste Teil des Endoskeletts, das allen Wirbeltieren gemeinsam ist. Es besteht aus Knorpeln, Knochen, Bändern und Sehnen, von denen die Knochen dabei mengenmäßig den größten Anteil ausmachen und beim Menschen bis zu 13% des Körpergewichts beisteuern können (Reynolds, Karlotski, 1977). Das Skelett hat primär Stütz- und Schutzfunktionen. Es dient als mechanisches Widerlager für muskelbetriebene Fortbewegung und ermöglicht eine große Variation an morphologisch unterschiedlichen Bauplänen der Wirbeltiere, vom Zebrafisch bis hin zum Menschen. Es dient ebenfalls dem Schutz von inneren Organen, wie den Kreislauf- und Respirationszentren sowie den hämatopoetischen Organen und dem Gehirn. Darüber hinausgehend wurde das Spektrum der wahrgenommenen Skeletteigenschaften während der letzten Jahrzehnte stetig um weitere Funktionen erweitert. So wurde festgestellt, dass das Skelett als Speicher für Mineralien (Grabowski, 2009) und Zytokine (Blair u. a., 2002), sowie als Modulator des Energiemetabolismus (Karsenty, 2006; Wolf, 2008) und Entgiftungsorgan (Lefebvre, Bhattaram, 2010) fungiert. Ein erwachsener Mensch hat mehr als 200 knöcherne skelettale Strukturelemente (Lefebvre, Bhattaram, 2010), die während der Entwicklung schrittweise angelegt werden und einem fortwährendem Reifungs- und Umbauprozess unterliegen. Diese Elemente haben gemeinsam, dass sie größtenteils aus extrazellulärer Matrix (ECM), bestehend aus Kollagenen und anderen Matrixproteinen, Proteoglykanen, und, im Falle von Knochen Hydroxylapatit, mit einem geringen Anteil an Zellen, aufgebaut sind (Velleman, 2000). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung der Expression und Funktion zweier bislang weniger intensiv analysierter vorkommender Komponenten der extrazellulären Matrix des Knorpels, den Proteinen UCMA und Matrilin-1.

### 1.1.2. Skelettale Entwicklung

Während der skelettalen Organogenese wird ein Gerüst aus über 200 Knochenelementen geplant und gebaut, von denen jedes mit seinen Nachbarn durch Gelenke, Bänder und Sehnen verbunden ist. Jedes Element entsteht an einem bestimmten Ort und entwickelt sich gemäß einem spezifischen Bauplan. Solche überaus komplexen Vorgänge beschäftigen Wissenschaftler verschiedener Fachrichtungen seit der Antike. Wie werden generell Baupläne innerhalb eines Embryos angelegt? Aristoteles formulierte als erster den wissenschaftlichen Konflikt zwischen dem Gedanken der Präformation, bei der alle Strukturen bereits im Keim angelegt sind, und der Epigenese, ein Vorgang, bei dem jene Strukturen nicht angelegt wurden und stattdessen aus einem ungeformten Potential entstehen (zusammengefasst in (Gottlieb, 1942)). Im 19. Jahrhundert wurde durch die Etablierung der Zelltheorie (Schwann, 1839) und der Postulierung der Keimplasmatheorie (Weismann, 1892) der Weg für die Untersuchung der Embryonalentwicklung und Organogenese geebnet. Jetzt, knappe 200 Jahre später, hat die Forschung einen Punkt erreicht, an dem die Grundlagen dieser Prozesse in Ansätzen zu verstehen ist.

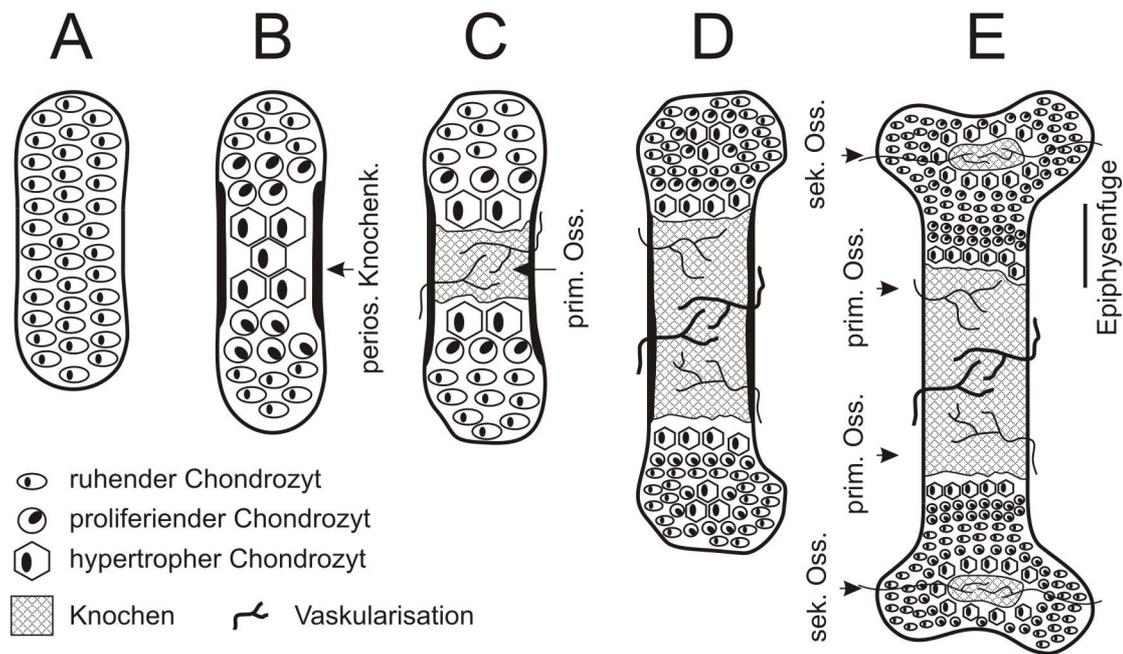
Komplexe Netzwerke von Faktoren steuern die Anlage und Bildung des Skeletts. Die Skelettentwicklung beginnt, sobald multipotente mesenchymale Zellen aus Ekto- und Mesoderm entstehen, im entwickelnden Körper an die spätere Position der Skelettelemente wandern und sich zu Zellen des Skelettsystems determinieren. Ein Großteil der Knochen des Skeletts wird zu diesem Zeitpunkt als Knorpelschablone angelegt. Unter dem Einfluss von sogenannten „bone morphogenic proteins“ (BMPs), dem Transkriptionsfaktor Sox9 und dem „fibroblast growth factor“ (FGF)-Signalweg teilt sich die Skelettvorläuferzelllinie in Gelenkvorläuferzellen und Knochen-/Knorpelvorläuferzellen. Die Gelenkvorläuferzellen differenzieren weiter zu artikulären Chondrozyten, Tenozyten, synoviale Fibroblasten und Fettpolsterzellen. Unter dem Einfluss der Transkriptionsfaktoren Runx2 und Osterix differenzieren sich aus den Knochen-/Knorpelvorläuferzellen sogenannte Osteoblasten (knochenbildende Zellen), die weiter zu Osteozyten oder „lining cells“ reifen können. Die Knorpelzelldifferenzierung ist dabei der am besten verstandene Vorgang. Durch Einwirken von Sox9 und den BMPs BMP-2, -4 und -7 bilden sich aus den Vorläuferzellen die sogenannten frühen Chondrozyten. Diese werden durch Sox5, Sox6 und Indian Hedgehog (IHH) zur hypertrophen Reifung angeregt. Durch diesen Vorgang, bei dem die Knorpelzellen durch Teilung und Sekretion von ECM-Molekülen die Extrazellulärmatrix anlegen und anschließend apoptotisch werden, wird die Knorpelbildung abgeschlossen



**Abb. 1.1: Differenzierungswege von Skelettzellen aus mesenchymalen Vorläuferzellen**

Eine Übersicht über den aktuellen Wissensstand der Differenzierungswege von Skelettzellen aus mesenchymalen Vorläuferzellen mit den wichtigsten daran beteiligten Wachstums- und Differenzierungsfaktoren. Gelb: Gelenkzellbildung, Orange, Knochenzellbildung, Blau, Knorpelzellbildung, Die Abbildung wurde unter Verwendung von Angaben aus folgenden Publikationen erstellt: (Becerra u. a., 2010; Bonewald, 2011; Chun u. a., 2008; Goldring u. a., 2006; Grabowski, 2009; Lefebvre, Bhattaram, 2010; Olney, 2009; Onyekwelu u. a., 2009; St-Jacques u. a., 1999)

(vgl. Abb. 1.1 und zusammenfassend (Becerra u. a., 2010; Bonewald, 2011; Chun u. a., 2008; Goldring u. a., 2006; Grabowski, 2009; Lefebvre, Bhattaram, 2010; Olney, 2009; Onyekwelu u. a., 2009; St-Jacques u. a., 1999). Die Steuerung der Knochenbildung sowie der zellulären Differenzierungsvorgänge wird nach wie vor erforscht. Die in Abb. 1.1 dargestellten Fragezeichen deuten an, dass viele Schlüsselkomponenten im Regulationsnetzwerk entweder



### Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Knochenentwicklung

Schematische Darstellung der chondralen Ossifikation am Beispiel eines Röhrenknochens. Nach Anlegen einer Knorpelschablone (A) beginnt die perichondrale Ossifikation durch Anlegen eines periostalen Knochenkranzes sowie mit der Reifung von ruhenden Chondrozyten zu hypertrophen Chondrozyten (B). Durch den Übergang der ruhenden Chondrozyten zu terminalen Chondrozyten werden Blutgefäße und Osteoblasten rekrutiert, Knochenmatrix wird abgelagert und das primäre Ossifikationszentrum entsteht (C). Parallel zum Längswachstum über die Epiphysenfuge wird proximal und distal des primären Ossifikationszentrums die Entwicklung der sekundären Ossifikationszentren eingeleitet (D, E). Abbildung nicht maßstabsgetreu, die Vergrößerung nimmt von A nach E ab. Perios. Knochenk., periostaler Knochenkragen, prim. Oss., primäres Ossifikationszentrum, sek. Oss., sekundäres Ossifikationszentrum. Die Abbildung wurde unter Verwendung von Angaben aus folgenden Publikationen erstellt: (Blumer u. a., 2008; Boskey, Coleman, 2010; Mackie u. a., 2008)

noch unbekannt sind oder kontrovers diskutiert werden. Der stete Zufluss an neuen Informationen sorgt mitunter für eine Neuordnung des Modells, wie kürzlich z.B. durch die Neubewertung der Rolle der Retinsäure, einer bis dahin als wichtiges Morphogen der Gliedmaßenentwicklung angesehene Substanz, verdeutlicht (Lewandoski, Mackem, 2009).

Grundsätzlich wird zwischen zwei verschiedene Formen der Knochenbildung unterschieden. Die erste und häufigste Form ist die der „chondralen Ossifikation“. Bei dieser Form der Osteogenese wird, wie bereits erläutert, zunächst eine Knorpelschablone angelegt. Diese wird später entweder von innen (enchondrale Ossifikation) oder von außen (perichondrale Ossifikation) durch Knochen ersetzt. Die Chondrozyten reifen dabei über morphologisch unterscheidbare Zwischenschritte zu terminalen Chondrozyten heran und

sezernieren während dieser Differenzierungsvorgänge Bestandteile der Knorpelmatrix und Wachstumsfaktoren, die Osteoblasten und Blutgefäße rekrutieren und die Knochenbildung abschließen (Vgl. Abb. 1.2 und (Blumer u. a., 2008; Boskey, Coleman, 2010; Mackie u. a., 2008)). Die chondrale Ossifikation ist verantwortlich für die Bildung der meisten Knochen des Wirbeltierskeletts, einschließlich der Knochen der Wirbelsäule, Rippen und Gliedmaßen. Die zweite Form wird als „desmale Ossifikation“ bezeichnet. Der Knochen wird hierbei anhand einer mesenchymalen Vorlage aufgebaut, ohne zwischenzeitlich eine Knorpelschablone zu verwenden. Die mesenchymalen Zellen differenzieren direkt zu Knochen bildenden Zellen (Vgl. Abb. 1.1). Beim Menschen entstehen die Knochen des Schädeldachs und des Gesichtschädels durch desmale Ossifikation.

### **1.1.3. Die skelettale Extrazellulärmatrix**

Primär bestehen Extrazellulärmatrizen aus größtenteils modular aufgebauten Makromolekülen. Die Kombination aus verschiedenen Makromolekülen und deren Mengenverhältnisse definieren die morphologischen, physiologischen und physikalischen Eigenschaften der jeweiligen ECM. Die ECM des Skeletts besteht hauptsächlich aus Proteoglykanen, Proteinen und, im Falle von Knochen, dem Mineral Hydroxylapatit.

Proteoglykane bestehen aus einem Kernprotein mit kovalent verknüpften, modifizierten Kohlenhydratketten, den sogenannten Glycosaminoglykanseitenketten (GAGs), die bis zu 95% der Gesamtmasse des Proteoglykans ausmachen können. Daneben gibt es das frei vorliegende Hyaluronan. Proteoglykane werden aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften und der subzellulären Lokalisierung in drei Gruppen eingeteilt, namentlich die „kleinen leucinreichen Proteoglykane“ (SLRPs, z.B. Decorin und Biglycan), die „modularen Proteoglykane“ (z.B. Aggrecan) und die Zelloberflächenproteoglykane (z.B. Syndecan). Die an das Kernprotein gebundenen GAGs können aufgrund der chemischen Eigenschaften der enthaltenen Zucker in vier verschiedene Untergruppen eingeteilt werden: Chondroitinsulfat, Keratansulfat, Dermatansulfat und Heparansulfat. Proteoglykane sind aufgrund der auf ihren Seitenketten vorhandenen Sulfat- und Carboxylgruppen stark negativ geladen und hydratisiert. Die Hydratisierung ihrer Seitenketten erlaubt den Aufbau eines hydrostatischen Drucks und verleiht beispielsweise dem Knorpel die charakteristische Elastizität. Zu den weiteren „klassischen“ Aufgabenbereichen von Proteoglykanen zählen, unter anderem, ihre Rolle bei Zelladhäsion, Migration und als biologische Filter (zusammengefasst in (Iozzo, 1998; Iozzo, Murdoch, 1996)). Die Forschung der letzten 30 Jahre hat das Funktionsspektrum

der Proteoglykane, das hauptsächlich auf ihrer Spezialisierung als rein statische Strukturproteine basiert, erweitert. Durch ihre Eigenschaft, sowohl Zytokine als auch Zelloberflächenrezeptoren zu binden, spielen Proteoglykane eine wichtige Rolle in Zellkommunikation, -proliferation und -überleben (Iozzo, Schaefer, 2010; Schaefer, Schaefer, 2010; Theocharis u. a., 2010). Weiterhin wurde festgestellt, dass Proteoglykane eine bedeutende Rolle bei der Fibrillogenese von Kollagenen haben (Reed, Iozzo, 2002). Proteoglykane sind ebenfalls bei der Entstehung von verschiedenen Krankheiten beteiligt, wie z.B. Krebs (Iozzo, Schaefer, 2010; Schaefer, Schaefer, 2010; Theocharis u. a., 2010), Alzheimer (Ariga u. a., 2010) und Arthrose (Bertrand u. a., 2010).

Die Proteine der extrazellulären Matrix scheinen evolutionär aus wenigen Ausgangsmolekülen entstanden zu sein (Huxley - Jones u. a., 2009) und können in Kollagene und nicht-kollagene Proteine unterteilt werden. Die Proteinzusammensetzung innerhalb der ECMs einzelner skelettaler Gewebe kann sich stark untereinander und von der Zusammensetzung anderer skelettaler Gewebe unterscheiden.

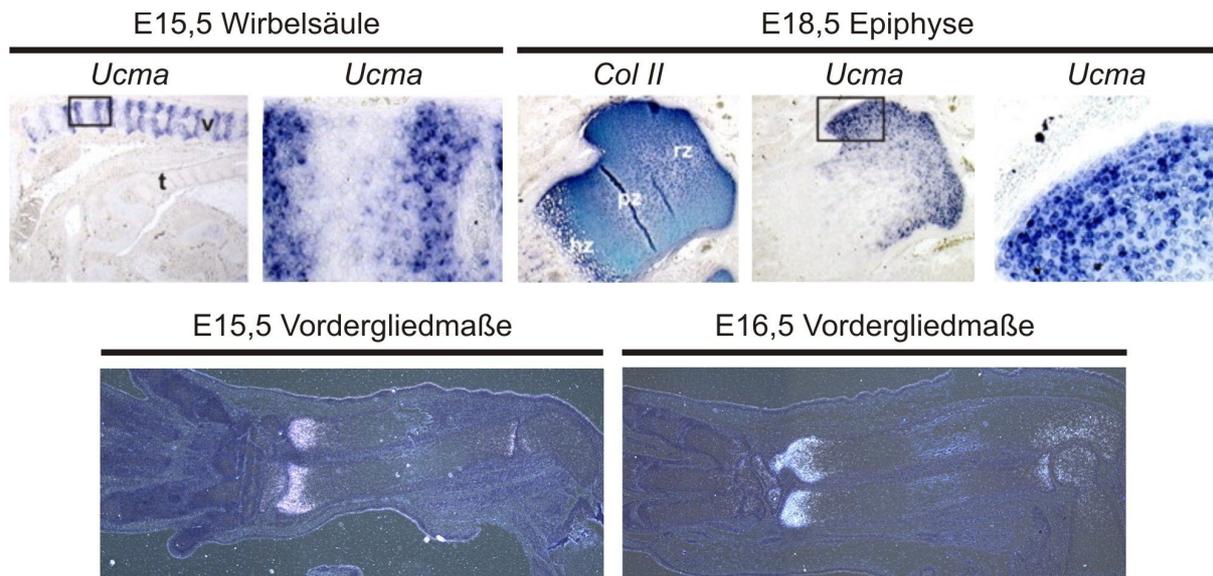
Die Familie der Kollagene umfasst mindestens 28 Mitglieder, die durch mindestens 46 verschiedene Gene kodiert werden. Die Kollagene sind die häufigsten Proteine im Menschen und stellen bis zu einem Drittel der gesamten Proteinmasse. Kollagene bestehen aus drei parallelen linksgängigen Polyprolin Typ II Helices, angeordnet in einer rechtsgängigen „Superhelix“. Diese streng geometrischen Strukturen (auch Kollagendomänen genannt) können von „nicht-kollagenen“ Abschnitten unterbrochen werden. Die Primärstruktur der kollagenen Domäne besteht aus einem Aminosäuretriplett mit der Zusammensetzung GlyXY wobei die Aminosäuren auf Positionen X und Y häufig jeweils Prolin und Hydroxyprolin sind. Die Kollagene werden nach dem Aggregationsverhalten ihrer „Superhelices“ in Gruppen eingeteilt wie z.B. die fibrillären Kollagene (z.B. Kollagen I und Kollagen II), die Fibrillenassoziierten Kollagene mit unterbrochenen Tripelhelices (FACITs, z.B. Kollagene IX und XIV), die Netzbildenden Kollagene (z.B. Kollagen VIII) und mehrere Andere. Diese Kollagenaggregate bilden die Strukturgerüste der extrazellulären Matrix und deren Eigenschaften und Kombinationen bestimmen anteilig die Eigenschaften der Matrizen, in denen sie eingebaut werden (zusammengefasst in (Myllyharju, Kivirikko, 2004; Shoulders, Raines, 2009)). Die häufigsten Kollagene in Knochen und Knorpel sind jeweils Kollagen I und II. Vererbte Defekte in Synthese, Assemblierung, Sekretion oder Umsatz von Kollagenen führen zu schwerwiegenden Krankheiten beim Menschen, wie zum Beispiel Ehlers-Danlos-Syndrom, Osteogenesis Imperfecta oder Bethlem-Myopathie (Shoulders, Raines, 2009).

Die Gruppe der „nicht-kollagenen“ Proteine umfasst den Rest der in der ECM vorhandenen Proteine, und stellt definitionsgemäß eine sehr heterogene Gruppe dar. Viele dieser Proteine haben regulatorische (z.B. Osteocalcin) oder strukturelle Funktionen (z.B. Laminin), bei einigen ist die Funktion noch kontrovers oder schlicht unbekannt. Die Untersuchung zweier im Folgenden im Detail beschriebener nicht-kollagener Proteine war die Aufgabe der vorliegenden Arbeit.

#### 1.1.3.1. UCMA/GRP

Das Protein „upper zone of growth plate and cartilage matrix associated protein“ (UCMA) oder alternativ „Gla-rich protein“ (GRP), ein neuartiges, nicht-kollagenes, Vitamin-K abhängiges Protein der ECM mit einzigartigen Eigenschaften, wurde erst vor kurzem entdeckt (Surmann-Schmitt u. a., 2008; Tagariello u. a., 2008; Viegas u. a., 2008). *UCMA* ist entwicklungsgeschichtlich sehr alt und bereits in primitiven Vertebraten wie dem Neunauge vorhanden (siehe Abb. 1.3 A). Interessanterweise konnte kein *UCMA*-Ortholog in Vögeln nachgewiesen werden, jedoch sind in vielen Knochenfischen zwei Orthologe vorhanden ((Tagariello u. a., 2008; Viegas u. a., 2008), vgl. 1.2.3 und Abb. 1.7). UCMA enthält ein 27 Aminosäuren langes Signalpeptid und wird als ein Vorläuferprotein von 111 Aminosäuren Länge sekretiert. Nach der Sekretion wird UCMA in ein N-terminales Fragment von 37 Aminosäuren Länge und ein C-terminales Fragment von 74 Aminosäuren Länge gespalten. Eine hochkonservierte putative Proproteinkonvertaseschnittstelle konnte identifiziert werden, und ein Schnitt an dieser Stelle würde die beschriebenen Fragmente generieren (vgl. Abb. 1.3 B). Zusätzlich zu dieser mengenmäßig dominierenden Vollängenform konnten in der Maus drei alternative Spleißformen von UCMA nachgewiesen werden. In diesen alternativen Spleißformen fehlen entweder Exon 2, welches die Signalpeptidschnittstelle enthält, oder Exon 4, welches die meisten  $\gamma$ -Carboxyglutamatreste enthält, oder beide Exons zugleich. Da den zwei Spleißformen, die kein Exon 2 enthalten, das Signalpeptid fehlt, werden diese nicht sekretiert und bilden große perinukleäre Aggregate, deren physiologische Bedeutung bisher unbekannt ist (Le Jeune u. a., 2010). *Ucma* wird von ruhenden Chondrozyten in den distalen und peripheren Zonen der Epiphysen- und Wirbelknorpel exprimiert (siehe Abb. 1.4), es konnte aber auch in Knochen, Haut, Blutgefäßen und im Serum detektiert werden. Darüber hinaus konnte eine hohe Konzentration an UCMA an Stellen ektopischer Kalzifizierung in menschlicher Haut und Blutgefäßen nachgewiesen werden (Viegas u. a., 2009).





#### Abb. 1.4: Räumliche Expression von *UcmA* in der Maus

Analyse der räumlichen Expression von *UcmA* durch Verwendung von spezifischen gegen Maus *UcmA* mRNA gerichtete RNA Sonden in embryonaler Wirbelsäule, Epiphyse (oben, Einzelabbildungen entnommen aus (Surmann-Schmitt u. a., 2008)) und Vordergliedmaßen (unten, Einzelabbildungen entnommen aus (Tagariello u. a., 2008)). *UcmA* wird in den distalen Bereichen des Wirbelknorpels (oben links) und der Epiphyse (oben rechts, unten) exprimiert. v, Wirbelsäule, t, Trachea, rz, Ruhezone, pz, Proliferationszone, hz, hypertrophe Zone.

UCMA weist eine ungewöhnlich starke negative Ladung auf. Diese geht zum Teil auf eine Sulfatierung von Tyrosinresten zurück (Surmann-Schmitt u. a., 2008), wird aber hauptsächlich durch einen sehr hohen Anteil an Vitamin-K abhängiger  $\gamma$ -Carboxylierung von Glutamatresten hervorgerufen. Die Vitamin-K abhängige  $\gamma$ -Carboxylierung ermöglicht es Proteinen, Calcium zu binden, mit Phospholipidoberflächen zu interagieren und dadurch ihre jeweiligen Funktionen auszuüben. Zu diesen Funktionen zählen unter anderem Bluthämostasie und Knochenentwicklung (Furie, Furie, 1991; Vermeer u. a., 1996). In aus dem Mittelmeerstör isoliertem UCMA wurden 16  $\gamma$ -Carboxyglutamatreste (Gla) gefunden, dass den höchsten Anteil dieser Aminosäuremodifikation in allen bisher untersuchten Proteinen darstellt (Viegas u. a., 2008). Da sowohl die  $\gamma$ -Carboxylierungsstellen als auch die putative  $\gamma$ -Carboxylasenbindungsstelle konserviert sind (vgl. Abb. 1.3 A), kann davon ausgegangen werden, dass UCMA auch in anderen Spezies carboxyliert wird. Daher und wegen der strukturellen Ähnlichkeit sowohl zu knochen- und matrixassoziierten Gla Proteinen als auch zu Gerinnungsfaktoren wird UCMA als neues Mitglied der Vitamin-K abhängigen Proteine aufgeführt (Viegas u. a., 2008).

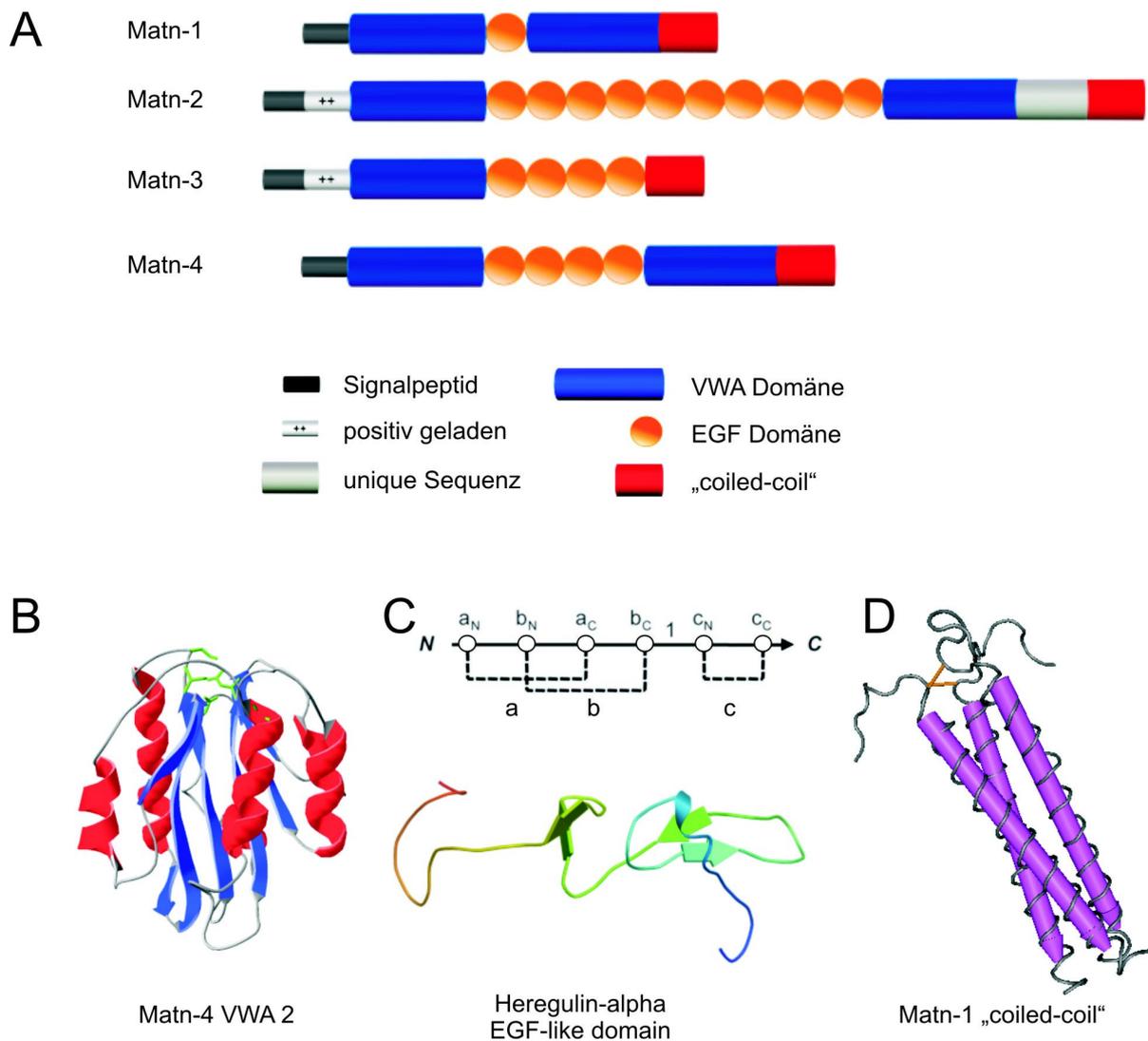
Obwohl die bisherigen Daten eine mögliche Rolle von UCMA in der Knorpel- und Bindegewebsentwicklung und Kalzifizierung vermuten lassen, konnte die genaue Funktion,

auch wegen des nicht vorhandenen Mausmodells, noch nicht ermittelt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung des Zebrafischmodells untersucht, inwiefern UCMA und dessen Vitamin-K abhängige  $\gamma$ -Carboxylierung eine Rolle bei der Entwicklung des Zebrafischskeletts spielt.

#### 1.1.3.2. **Matriline**

Matrilin-1 ist das archetypische Mitglied der Familie der Matriline, die vier Mitglieder, Matrilin-1 bis Matrilin-4 (im Folgenden mit Matn-x abgekürzt), umfasst. Matriline sind modular aufgebaute, nicht-kollagene Proteine der ECM. In der reifen Form bestehen sie aus bis zu zwei von Willebrand Faktor A Domänen (VWA), die durch eine variable Anzahl an „epidermal growth factor“-ähnlichen Domänen (EGF) verbunden sind. Am C-Terminus befindet sich jeweils eine  $\alpha$ -helikale „coiled-coil Oligomerisierungsdomäne“, mit der die einzelnen Monomere untereinander und mit anderen Mitgliedern der Proteinfamilie Trimere oder Tetramere formen können (Hauser, Paulsson, 1994). Abweichend von diesem Standardschema besitzen Matn-2 und Matn-3 eine zusätzliche N-terminale, positiv geladene Domäne, sowie Matn-2 eine „unique“ C-terminale Domäne. Bei matn-3 fehlt die zweite VWA Domäne (siehe Abb. 1.5 A).

Die VWA Domäne ist eine Protein-Protein Interaktionsdomäne, die in allen Eukaryoten sowie in Bakterien und Archaea vorhanden ist (Whittaker, Hynes, 2002; Côte u. a., 2011). Die entwicklungsgeschichtlich älteste Variante der VWA Domäne wird als Bestandteil von intrazellulären Proteinen vermutet, erst später wurde diese Domäne als Adhäsionsmodul bei Proteinen der ECM eingesetzt (Whittaker, Hynes, 2002). Eine VWA Domäne besteht aus einem so genannten „Rossmann-fold“, einer Struktur bestehend aus einem zentralen  $\beta$ -Faltblatt, das von  $\alpha$ -Helices umgeben ist. VWA Domänen enthalten häufig Bindungsstellen für divalente Kationen („metal ion dependent adhesion sites“, MIDAS Motive), die an Protein-Protein Wechselwirkungen beteiligt sein können (zusammengefasst in Abb. 1.5 B). Weil bereits alternative Spleißformen von Matrilinen beschrieben wurden, die keine EGF Domänen enthalten (Ko u. a., 2005), besteht die Vermutung, dass die VWA Domänen die primären Interaktionsmodule in Matrilinen darstellen. Obwohl die Struktur der VWA Domänen einiger Proteine bereits aufgeklärt wurde, können aufgrund der geringen Homologie der Matrilin VWA Domänen zu den bekannten Strukturen ( $\leq 30\%$  Homologie) nur wenige Aussagen zur Struktur der Matrilin VWA Domänen gemacht werden (zusammengefasst in (Klatt u. a., 2011)).



### Abb. 1.5: Struktureller Aufbau der Matrilin und ihrer Domänen

Domänenstruktur der Matrilin (A) und struktureller Aufbau einer VWA Domäne (B), einer EGF Domäne (C), und einer „coiled-coil“ Superhelix (D). Schematische Darstellung der Domänenstruktur der längsten Spleißvarianten der Maus Matrilin (A) adaptiert nach (Klatt u. a., 2011). Struktureller Aufbau der VWA 2 Domäne von Matn-4. Rot,  $\alpha$ -Helix, Blau,  $\beta$ -Faltblatt, Grün, MIDAS Motiv. Teilabbildung entnommen aus (Klatt u. a., 2011) (B). Disulfid Verknüpfungen in der Primärstruktur einer EGF Domäne, bei der die Cysteine 1 und 3, 2 und 4 und 5 und 6 jeweils eine Disulfidbrücke bilden (C, oben, Abbildung adaptiert nach (Wouters u. a., 2005)). Beispiel der zwei strukturebenden  $\beta$ -Faltblätter einer EGF Domäne anhand einer vereinfachten Darstellung der EGF Domäne von Heregulin-alpha (C, unten, Abbildung generiert mit dem Programm OpenAstexViewer, <sup>(c)</sup> 2007-2008 Mike Hartshorn, unter Verwendung von Angaben aus (Nagata u. a., 1994)). Räumliche Anordnung der „coiled-coil“ Superhelix von Matn-1. Gelbe Balken kennzeichnen die N-terminalen Disulfidverknüpfungen. (D, Abbildung generiert mit dem Programm Cn3D 4.3, <sup>(c)</sup> NCBI unter Verwendung von Angaben aus (Dames u. a., 1998)).

EGF Domänen sind hauptsächlich in extrazellulären Proteinen anzutreffen und üben vielfältige Funktionen aus. Bei der Zellkommunikation und der Blutgerinnung spielen sie eine Rolle als Adhäsionsdomänen (Stenflo, 1991). Ihr häufig perlenschnurartiges Auftreten, oft in Kombination mit anderen Proteindomänen, führte zur Annahme, dass EGF Domänen auch als Abstandhalter fungieren können. EGF Domänen bestehen aus 30-40 Aminosäureresten, die zwei durch drei Disulfidbrücken stabilisierte  $\beta$ -Faltblätter formen (siehe Abb. 1.5 C). Die genaue Verknüpfung dieser Disulfidbrücken unterteilt die EGF Domänen in zwei Gruppen, hEGF („human EGF like“) und cEGF („C1r-like“), zu der auch die EGF Domänen der Matrilin gehören. EGF Domänen können calciumbindende Motive enthalten, deren physiologische Bedeutung jedoch bisher unklar ist (Wouters u. a., 2005).

„Coiled-coil“ Oligomerisierungsdomänen sind weit verbreitete amphiphile  $\alpha$ -helikale Strukturen, die Protein-Protein Wechselwirkungen ermöglichen und zu den am besten charakterisierten Proteindomänen gehören. Sie sind Bestandteil von sehr unterschiedlichen intra- wie extrazellulären Proteinen, wie zum Beispiel intrazellulären Signalmolekülen (z.B. „leucin zipper“ Signalmoleküle wie NEMO (Agou u. a., 2004)) bis hin zu den extrazellulären Lamininen (Barlow u. a., 1984; Paulsson u. a., 1985) oder viralen Hüllproteinen (z.B. HIV-1 gp41 (Jiang, Debnath, 2000)). Die rechtsgängigen  $\alpha$ -Helices einzelner Proteine winden sich umeinander und bilden eine bündelartige „Superhelix“ (siehe Abb. 1.5 D). Diese Konformation gibt Matrilinen ihr klassisches „bouquetartiges“ Aussehen (Hauser, Paulsson, 1994).

Die räumliche und zeitliche Expression der Matrilin in der Embryonalentwicklung der Maus wurde bereits extensiv (Aszódi u. a., 1994, 1996; Klatt u. a., 2001, 2000; Mundlos, Zabel, 1994; Piecha u. a., 1999; Segat u. a., 2000) und die in der Entwicklung des Zebrafisches teilweise (Ko u. a., 2005) untersucht (siehe 1.2.3). Matn-3 ist in der Maus hauptsächlich in Knorpel und Knochen exprimiert, während Matn-2 und Matn-4 eine breitere Gewebeverteilung aufweisen. Matn-1, bei seiner ersten Charakterisierung „cartilage matrix protein“ (CMP) genannt (Paulsson, Heinegård, 1979, 1981), weist wie auch Matn-3, eine knorpelspezifische Expression auf. Es ist aber im Gegensatz zu Matn-3 nicht im Knochen exprimiert (vgl. Tab. 1.1). Matn-1 kann, wie auch Matn-3, bereits im kondensierenden Mesenchym 12,5 Tage nach der Befruchtung nachgewiesen werden. Darüber hinaus sind beide in der Wachstumsfuge von Röhrenknochen in ruhendem, proliferierendem und hypertrophem Knorpel vorhanden, wo sie während des Einsetzens der Kalzifizierung in die Knochenmatrix eingelagert werden. Die Expression von Matn-3 wird nach der Geburt

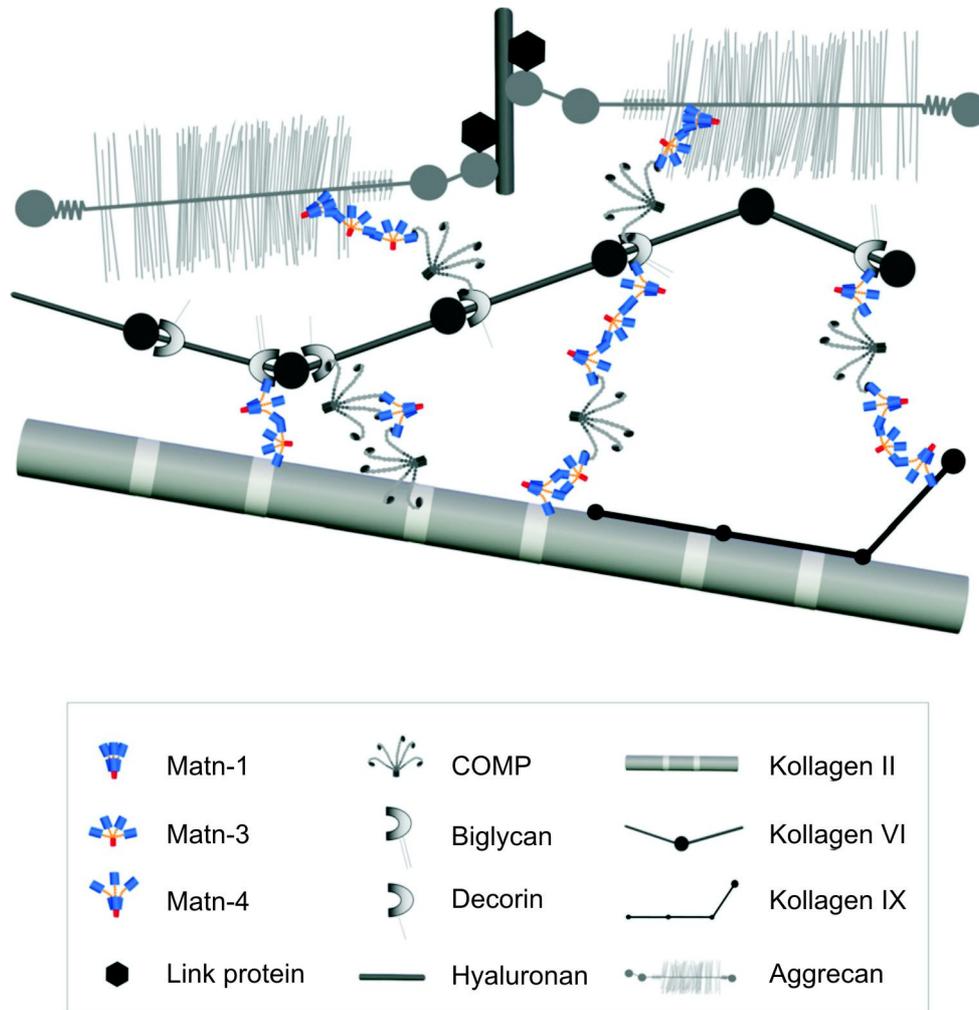
Gewebe	Matn-1	Matn-2	Matn-3	Matn-4
Gelenkknorpel	+ <sup>h/m</sup>	+ <sup>h/m</sup>	+ <sup>h/m</sup>	+ <sup>h/m</sup>
Epiphysenknorpel	+++	++	+++	+++
Wirbelknorpel	++/+++* <sup>(e)</sup>	++/+++* <sup>(e)</sup>	+++ <sup>(e)</sup>	+++ <sup>(e)</sup>
Schädelknochen und Nasenknorpel	+++ <sup>(e)</sup>	+ <sup>(e)</sup>	+++ <sup>(e)</sup>	+++ <sup>(e)</sup>
Brustbeinknorpel	+++	++	+++	++
Rippenknorpel	+++	-	+++	+
Luftröhrenknorpel	+++	+	+++	+++ <sup>(e)</sup>
Perichondrium	+++	+++	+++	+++
Knochen (Peri-/Endosteum)	-	++	+	++
Zähne	nd	nd	nd	+
Bänder und Sehnen	+	++	-	++
Skelettmuskel	-	-	-	-
Herz	+ <sup>e</sup>	+ <sup>(e)</sup>	- <sup>e</sup>	+
Haut	nd	+ <sup>(e)</sup>	nd	+
Auge	+ <sup>h,e</sup>	+ <sup>h,*</sup>	- <sup>h</sup>	+ <sup>h/m,*</sup>
Darm	-	++	-	+++ <sup>e</sup>
Oesophagus	nd	+++ <sup>e</sup>	nd	+
Niere	-	+ <sup>e</sup>	-	+ <sup>e</sup>
Leber	-	+ <sup>r</sup>	-	-
Lunge	-	+ <sup>e</sup>	-	+
Gehirn	-	+	-	+++*

**Tabelle 1.1: Expression und Gewebsverteilung der Matrilin nach** (Klatt u. a., 2011)

Falls nicht anders angegeben, stammen die Ergebnisse aus der Maus. <sup>h</sup>, Mensch, <sup>r</sup>, Ratte, <sup>h/m</sup>, Mensch und Maus, <sup>e</sup>, nur in Embryonalstadien nachgewiesen, <sup>(e)</sup>, sowohl in Embryonalstadien als auch in adulten Tieren nachgewiesen, \*, nach Alter unterschiedlich, -, nicht nachgewiesen, +, schwache Expression, ++, mittlere Expression, +++, starke Expression, nd, nicht bestimmt.

eingestellt, die Expression von Matn-1 bleibt jedoch das ganze Leben hindurch in allen knorpelartigen Geweben, mit Ausnahme der Oberfläche der Gelenkknorpel, detektierbar (zusammengefasst in (Klatt u. a., 2011)). Zusätzlich wurde Matn-1 in der embryonalen humanen Retina gefunden (Mundlos, Zabel, 1994).

Auf molekularer Ebene wurde die Hypothese bekräftigt, dass Matrilin als Adapterproteine fungieren und in der Lage sind, die zwei Hauptkomponenten der ECM, das Kollagenetzwerk und das Proteoglykangel, miteinander zu verbinden (dargestellt in Abb. 1.6, zusammengefasst in (Klatt u. a., 2011)). Matn-1 wurde erst durch die Koextraktion mit Aggrecan entdeckt (Paulsson, Heinegård, 1979), und weitergehende Untersuchungen konnten zeigen, dass es im Laufe der Knorpelreifung zum Teil kovalent mit dem Kernprotein von Aggrecan verknüpft wird (Hauser u. a., 1996). Weiterhin wurde gezeigt, dass Matn-1 direkte Wechselwirkungen mit den SLRPs Decorin und Biglycan eingeht (Wiberg u. a., 2003). Die Interaktion von Matrilinen mit dem Kollagenetzwerk ist weitergehend untersucht worden. Eine Bindung von Matn-1, -3 und -4 an die Knorpelkollagene Kollagen II und Kollagen XI



### Abb. 1.6: Matrilin als Adaptorproteine in der Knorpelmatrix

Schema des bisherigen Wissensstands zur Rolle der Matrilin in der Assemblierung der supramolekularen Strukturen der Knorpelmatrix, entnommen aus (Klatt u. a., 2011). Matrilin und das „cartilage oligomeric matrix protein“ (COMP oder auch Thrombospondin-5) verbinden die Kollagen II/Kollagen IX Fibrillen mit den Kollagen VI Filamenten und dem Kernprotein von Aggrecan. Die Verbindung ist entweder direkt oder wird, im Falle von Kollagen VI, durch Decorin/Biglycan vermittelt.

(Mann u. a., 2004; Otten u. a., 2010) sowie an Kollagen VI (Wiberg u. a., 2003) wurde ebenso gezeigt, wie die Bindung von Matn-2 an Kollagen I (Piecha u. a., 2002). Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass Matrilin in der Mechanotransduktion und der Zellkommunikation von Bedeutung sind. So können Matn- 1 und -3 die Signalwirkung des für die Skelettentwicklung wichtigen Ihh Signalweges modulieren (Kanbe u. a., 2007). Auch können Matn-1, -2 und -3, aber nicht Matn-4, an Integrine binden, jedoch ist die physiologische Bedeutung dieser Befunde kontrovers diskutiert (Makihira u. a., 1999; Mann u. a., 2007).

Trotz dieser Ergebnisse erwies sich die Aufklärung der genauen Funktion der Matriline als schwierig. Die Versuche, die Funktion der Matriline im Mausmodell zu untersuchen, waren bisher größtenteils ohne Erfolg, da *Matn-1*, *-2* und *-3* defiziente „knockout“ Mäuse keine offensichtlichen Phänotypen aufwiesen (Aszódi u. a., 1999; Ko u. a., 2004; Mátés u. a., 2004), ein Hinweis auf eine mögliche Redundanz innerhalb der Proteinfamilie. Allerdings wurde auf molekularer Ebene festgestellt, dass in *Matn-1* „knockouts“ die Kollagen II Fibrillogenese gestört war (Huang u. a., 1999). In *Matn-1/Matn-3* Doppel-„knockouts“ konnte gezeigt werden, dass die Fibrillendichte zunahm. Außerdem wurde festgestellt, dass die Extrahierbarkeit von *Matn-4* erhöht war, ein Hinweis darauf, dass der strukturelle Aufbau der ECM gestört ist (Nicolae u. a., 2007). Dass sich das Mausmodell als potentiell ungeeignet für die Erforschung der Funktion einer ganzen Proteinfamilie erweisen könnte (da keine deutlichen Phänotypen festgestellt wurden, s. o.), erscheint nur auf dem ersten Blick überraschend. Die untersuchten transgenen Mauslinien waren ausnahmslos Nullmutanten, also Tiere, bei denen das betroffene Protein nicht mehr hergestellt wird (Aszódi u. a., 1999; Ko u. a., 2004; Mátés u. a., 2004; Nicolae u. a., 2007). Allerdings wurden Mutationen in Matrilingenen gefunden, die mit menschlichen Krankheiten verbunden sind.

Polymorphismen im nicht translatierten Bereich des *Matn-1* Gens konnten mit idiopathischer Skoliose im Menschen in Verbindung gebracht werden (Chen u. a., 2009; Montanaro u. a., 2006), jedoch in anderen Studien nicht bestätigt werden (Takahashi u. a., 2011). Eindeutig sind jedoch die Ergebnisse, die zeigen, dass Mutationen im *Matrilin 3* Gen zu Chondrodysplasien führen. Als Chondrodysplasien werden Krankheiten beschrieben, bei denen die Knorpelsynthese betroffen ist. Handelt es sich bei dem Gewebe um die Knorpelschablonen, die im Laufe der Entwicklung und des Wachstums durch chondrale Ossifikation verknöchern (s. o.), sind Missbildungen des Skeletts wie z.B. Zwergwuchs nicht selten. Die bisher bekannten 17 Aminosäureaustausche in der VWA Domäne von *Matn-3* verursachen verschiedene Formen von „multipler epiphysärer Dysplasie“ (MED) ((Chapman u. a., 2001; Cotterill u. a., 2005; Fresquet u. a., 2008; Jackson u. a., 2004; Mabuchi u. a., 2004; Mostert u. a., 2003), zusammengefasst in (Klatt u. a., 2011)). Dabei handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte Chondrodysplasie, charakterisiert durch Zwergwuchs, skeletomuskuläre Veränderungen und frühem Einsetzen von Arthrose (Briggs, Chapman, 2002). Eine autosomal rezessive Mutation in der ersten EGF Domäne von *Matn-3* und eine autosomal dominante Mutation in der VWA Domäne von *Matn-3* verursachen SEMD („spondylo-epi-metaphyseal dysplasia“, (Borochowitz u. a., 2004)) bzw. BHMED („bilateral hereditary micro-epiphyseal dysplasia“, (Mostert u. a., 2003)). Beide Chondrodysplasien

haben Ähnlichkeiten zu MED. Eine weitere Mutation in der ersten EGF Domäne von Matn-3 wurde mit Hand-Osteoarthrose assoziiert (Stefánsson u. a., 2003; Min u. a., 2006; Pullig u. a., 2007).

In Zellkultur konnte gezeigt werden, dass viele der erwähnten Mutationen zur intrazellulären Retention von Matn-3 und zur Akkumulation des Proteins im endoplasmatischen Retikulum (ER) führen (Cotterill u. a., 2005; Otten u. a., 2005). In einem transgenen Mausmodell für MED, bei der eine Mutation in die VWA Domäne von Matn-3 eingeführt wurde, führt diese Akkumulation zu „Zellstress“, der wiederum verschiedene Signalwege auslöst, unter Anderem den „ER-Stress“ bzw. „unfolded protein response“ (UPR) Signalweg (Leighton u. a., 2007; Nundlall u. a., 2010). Sollten durch den Signalweg ausgelöste Änderungen im Zellstoffwechsel (Wachstumsverzögerung, Hochregulation von Chaperonen (zur verbesserten Proteinfaltung) und des proteasomvermittelten Abbaus (ERAD, ER assoziierte Degradation, um überschüssige ungefaltete Proteine zu entsorgen) nicht zur Verbesserung der Situation führen, droht in letzter Konsequenz der gerichtete Zelltod in Form von Apoptose (zusammengefasst in (Schröder, Kaufman, 2005)). Da man Veränderungen der für den UPR wichtige Proteine BIP und XBP1 auf mRNA-Ebene nachweisen kann, lässt sich die Induktion der Signalwege vergleichsweise einfach quantifizieren (jeweils zusammengefasst in (Dudek u. a., 2009) und (Glimcher, 2009)).

## **1.2. Der Zebrafisch als Modellorganismus in der Erforschung der extrazellulären Matrix**

Der Zebrafisch, *Danio rerio*, oder auch *Brachydanio rerio*, ist ein südostasiatischer Süßwasserfisch und gehört zu den karpfenartigen Fischen (Cyprinidae). In seiner natürlichen Umgebung lebt er in langsam fließenden und stehenden Gewässern und wird unter guten Haltungsbedingungen über drei Jahre alt. Seit seiner Erstbeschreibung (Hamilton, 1822) erfreut sich der Zebrafisch wegen seiner geringen Haltungsansprüche und seines attraktiven Aussehens großer Beliebtheit als Zierfisch.

### **1.2.1. Eigenschaften und Vorteile des Zebrafischmodells**

George Streisinger, von vielen als der Pionier und Gründervater des Zebrafischmodells angesehen, hat bei seiner Suche nach Anwendungsmöglichkeiten im vorigen Jahrhundert gewonnenen Wissens über die molekularen Grundlagen der Vererbung den Zebrafisch als

Labortier und Modellorganismus zur Untersuchung der Wirbeltierentwicklung durch systematische Mutagenese etabliert (Streisinger u. a., 1981). Inzwischen wird der Zebrafisch auch auf weiteren Forschungsgebieten eingesetzt, wie zum Beispiel bei der Erforschung des Immunsystems (Lieschke, Trede, 2009; Yoder u. a., 2002), und in der Toxikologie (Hill u. a., 2005).

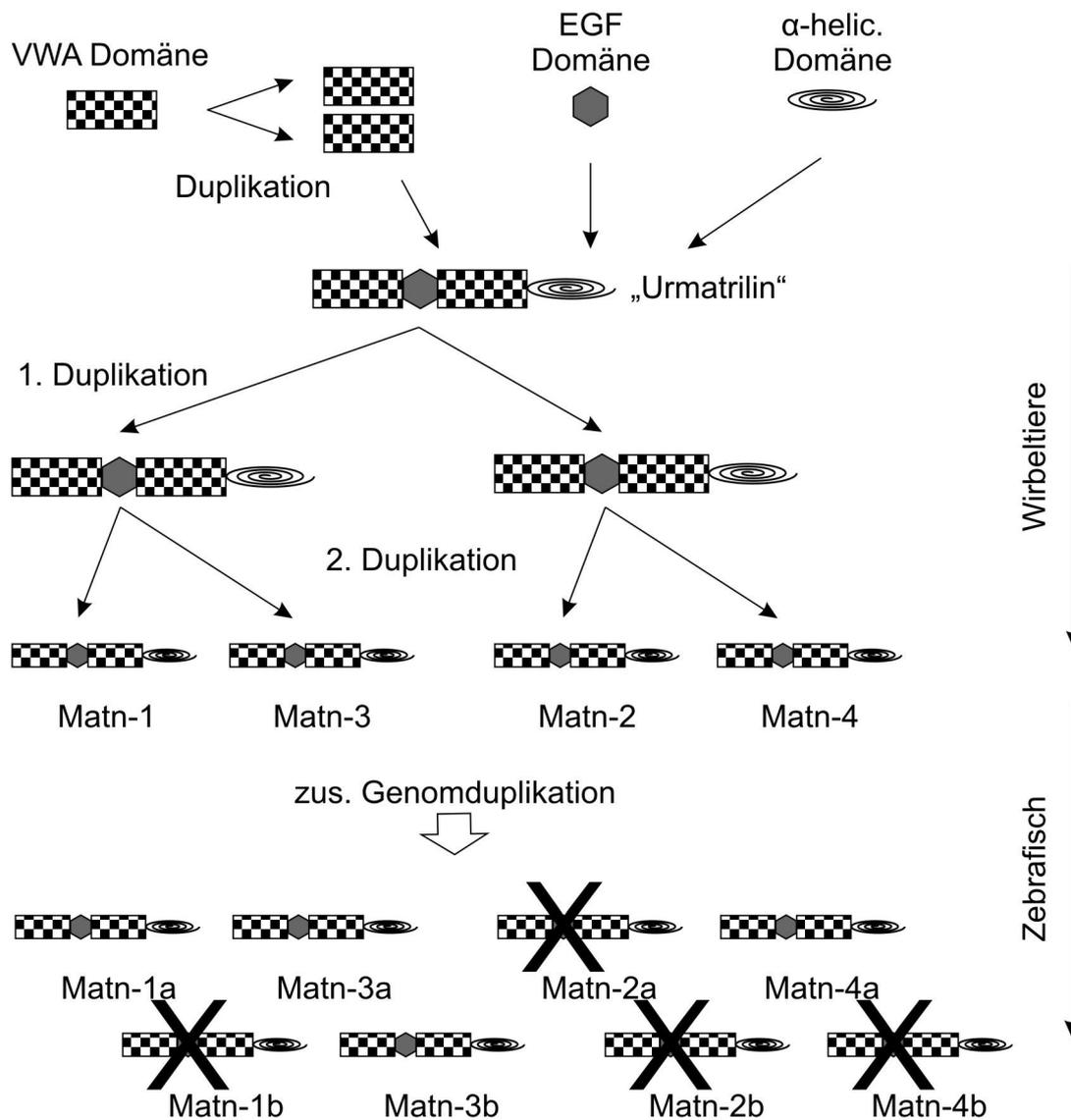
Der Zebrafisch hat einige Vorteile gegenüber anderen Wirbeltiermodellen. Der Zebrafisch ist einfach und vor allem kostengünstig zu halten, erzeugt viele Nachkommen in kurzer Zeit, und die Generationszeit ist mit drei Monaten sehr kurz. Das Zebrafischgenom ist vergleichsweise einfach zu manipulieren und die Nachkommen entwickeln sich außerhalb des Körpers in sehr kurzer Zeit, was deren Manipulation, Stadieneinteilung (Kimmel u. a., 1995) und Dokumentation vereinfacht. Die Palette der Manipulationsmöglichkeiten wurde durch die Entwicklung der Morpholino Antisense-Technologie erweitert und die Attraktivität dieses Modellorganismus weiter erhöht (siehe 1.2.4). Ein Nachteil jedoch ist, dass zum Zeitpunkt der Erstellung der vorliegenden Arbeit erst 87% des 1,7 GB großen Zebrafischgenoms sequenziert und assembliert waren (The Danio rerio Sequencing Project ([http://www.sanger.ac.uk/Projects/D\\_rerio/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/)); Wellcome Trust Sanger Institute).

### **1.2.2. Der Zebrafisch in der Erforschung der extrazellulären Matrix**

Der Zebrafisch wurde bereits erfolgreich bei der Erforschung der Funktion von Proteinen der extrazellulären Matrix eingesetzt. So konnten Fortschritte bei der Charakterisierung der Funktionen vieler der in Abb. 1.6 bereits erwähnten Komponenten der Extrazellulärmatrix wie Kollagen II $\alpha$ 1 (Yan u. a., 1995a), Kollagen VI (Telfer u. a., 2010), Kollagen IX (Huang u. a., 2009), Decorin (Zoeller u. a., 2009), Biglycan (Shintani u. a., 2000) und „Link protein“ (Kang u. a., 2008) gemacht werden. Trotz des noch nicht abgeschlossenen Zebrafischgenomprojekts gibt es allerdings starke Hinweise, dass es kein COMP Ortholog im Zebrafisch gibt (McKenzie u. a., 2006).

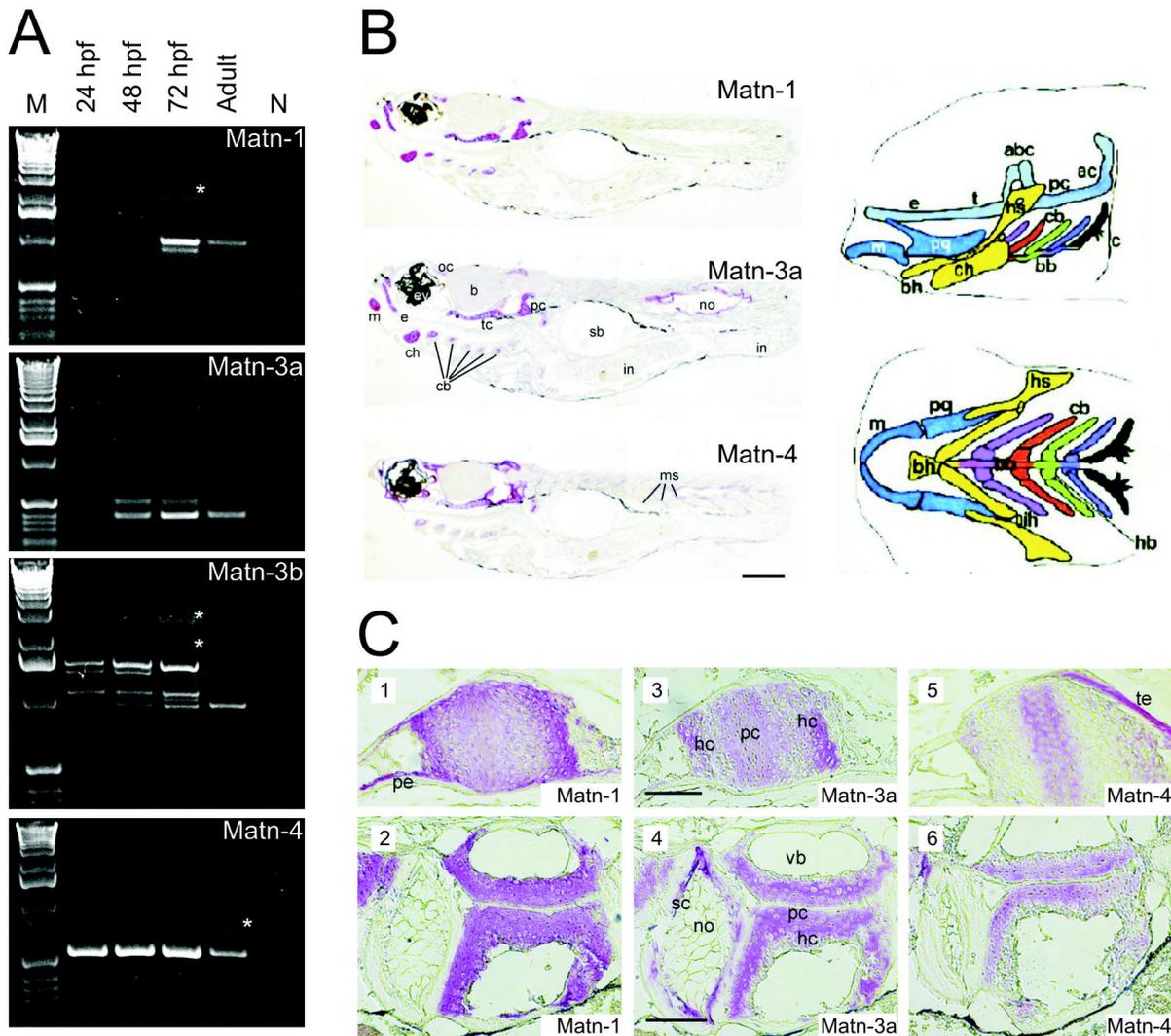
### **1.2.3. Matriline im Zebrafisch**

Wie in allen bisher untersuchten Wirbeltiergenomen, gibt es Matriline auch im Zebrafisch (Ko u. a., 2005). Da das Genom der Knochenfische nach deren Abspaltung von den übrigen Wirbeltieren eine zusätzliche Duplikation erfahren hat (Venkatesh, 2003), kommen viele



**Abb. 1.7: Evolutionsmodell der Matriline im Zebrafisch**

Erweitertes Evolutionsmodell der Matriline im Zebrafisch verändert übernommen nach (Deák u. a., 1999). Ein „domain shuffling“ Ereignis bringt eine bereits duplizierte VWA Domäne mit einer EGF Domäne und einer  $\alpha$ -Helikalen Domäne zusammen und erzeugt ein „Urmatrilin“. Zwei genomweite Duplikationereignisse erzeugen vier Matrilinparaloge. Ein zusätzliches Genomduplikationsereignis in den Knochenfischen erzeugt eine Kopie von jedem Paralog, die von Matn-1 und Matn-4, ebenso wie beide Kopien von Matn-2, gehen jedoch zwischenzeitlich verloren (schwarze „X“). Duplikationen der EGF Domänen und Einschübe von zusätzlichen Merkmalen (siehe Abb. 1.5) wurden nicht berücksichtigt.



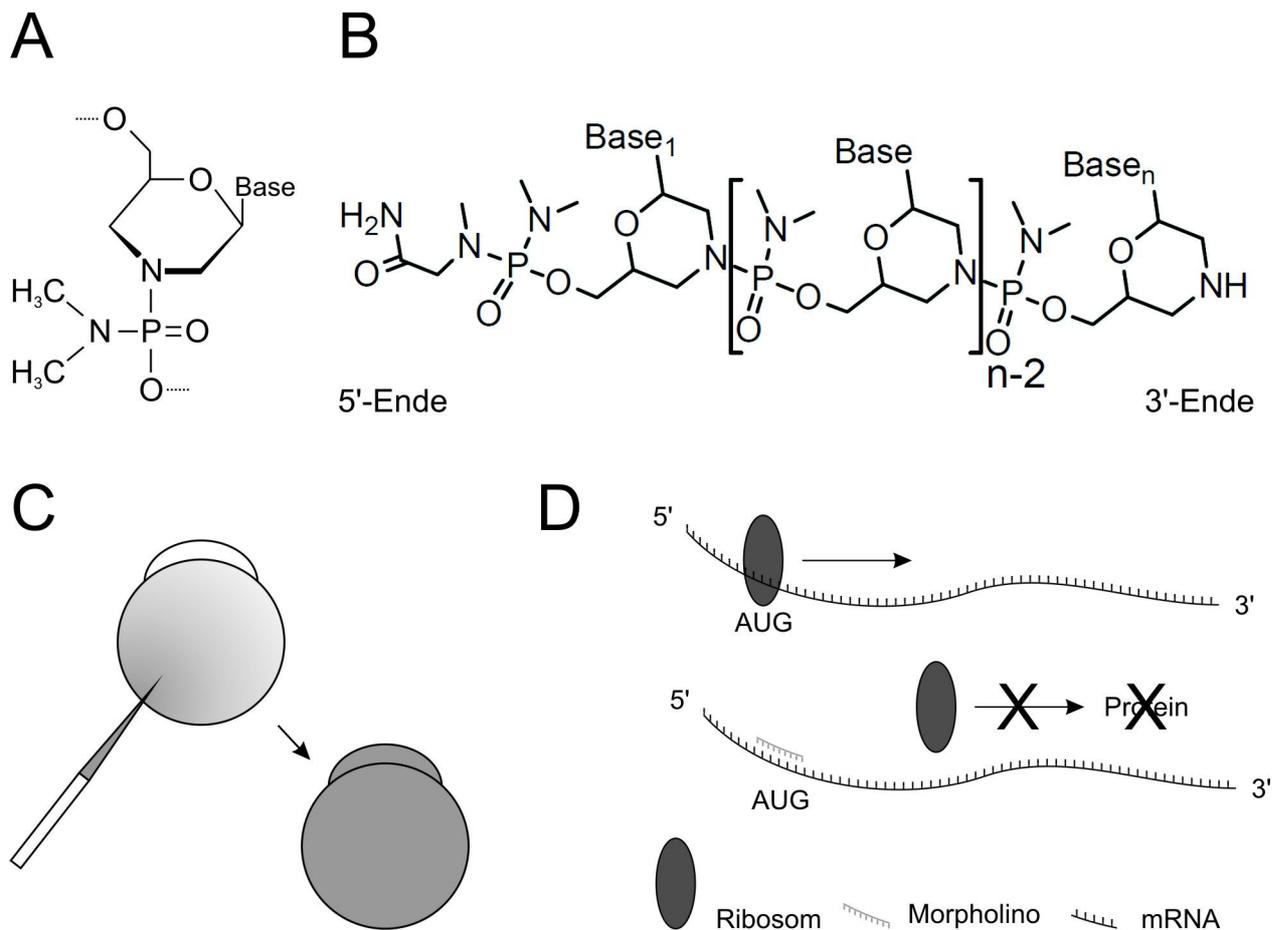
**Abb. 1.8: Matrilinexpression während der Zebrafiscentwicklung**

Expression der Matrilin mRNA zwischen 24 hpf und 72 hpf (A), Räumliche Expression von Matn-1, -3a und -4 Protein in 5 Tage alten Larven (B) und in vier Monate alten erwachsenen Zebrafischen (C). Teilabbildungen entnommen und adaptiert aus (Ko u. a., 2005). Matn-1 Expression konnte während der ersten 48 hpf nicht detektiert werden. Matn-3a, -3b und -4 Expression wurde zu allen untersuchten Zeitpunkten festgestellt. M, Markerbande, N, Negativkontrolle, Sternchen, PCR-Artefakte (A). Die Matn-1, -3a und -4 Proteine konnten fünf Tage nach Befruchtung durch immunohistochemische Färbungen in allen kraniofazialen Geweben gefunden werden, Matn-3a zusätzlich noch im Notochord und Matn-4 in den Myosepta. b, Gehirn, cb, Kiemenbögen, ch, Ceratohyalknorpel, e, Ethmoidknorpel, ey, Auge, in, Darm, no, Notochord, m, Meckel-Knorpel, oc, Occipitalbogen, pc, Parachordalknorpel, pq, Palatoquadratum, sb, Schwimmblase, tc, trabekulärer Knorpel. (B). Die Detailanalyse von Matn-1, -3a und -4 im trabekulären Knochen (C, 1, 3, 5) und Wirbelknochen (C, 2, 4, 6) von 4 Monate alten Zebrafischen wies Matn-1 im ganzen Knorpel und im Perichondrium nach (C, 1, 2). Matn-3a wurde in proliferierenden Chondrozyten, hypertrophen Chondrozyten, sowie im „secondary chordal sheath“ nachgewiesen (C, 3, 4) und Matn-4 ausschließlich im proliferierenden Knorpel (C, 5, 6). hc, hypertropher Knorpel, no, Notochord, pe, Perichondrium, pc, proliferierender Knorpel, sc, „secondary chordal sheath“, vb, Wirbel.

Gene, die bei Mensch und Maus nur einzeln vorkommen, beim Zebrafisch in zwei Kopien vor. Dies trifft zum Teil auch für die Matriline zu, da *Matriline 3* in zwei Kopien vorliegt, *Matriline 3a* und *Matriline 3b*. Auf der anderen Seite hat der Zebrafisch offensichtlich seine Kopie von *Matriline 2* verloren (siehe Abb. 1.7 und (Ko u. a., 2005; Chakravarti, Adams, 2006)). Eine endgültige Bestätigung dieser Befunde wird allerdings erst möglich sein, wenn das Zebrafischgenom vollständig assembliert wurde (siehe 1.2.1). Die Lokalisierung der Matriline wurde bereits grundlegend zwischen 24 Stunden und 72 Stunden nach Befruchtung („hours post fertilization“, hpf) während der Zebrafischentwicklung beschrieben (Ko u. a., 2005). *Matriline 3a*, *-3b* und *-4* waren von 24 hpf an stark exprimiert. Immunhistochemische Färbungen konnten zeigen, dass, ähnlich wie in der Maus, sowohl *Matn-1* und *Matn-3a* als auch *Matn-4* im sich entwickelnden Skelett (Kraniofazialskelett, Flossenstrahlen) von fünf Tage alten Larven vorhanden waren. *Matn-3a* konnte zusätzlich noch im Notochord und *Matn-4* in den Myosepta, den Augen und der Haut lokalisiert werden (siehe Abb. 1.8 B). In vier Monate alten Fischen wurde eine differentielle Matrilineexpression in trabekulären Knochen und in Wirbelknochen nachgewiesen. *Matn-1* wurde im gesamten Knorpel gefunden, einschließlich des Perichondriums, wohingegen *Matn-3a* eine differenziertere Expression aufwies und ausschließlich in proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten, sowie im „secondary chordal sheath“ lokalisiert wurde. *Matn-4* zeigte eine schwache Expression ausschließlich im proliferierenden Knorpel (siehe Abb. 1.8 C). Im Gegensatz zur Maus konnten einleitende Morpholino „knockdown“ Experimente zeigen, dass eine Reduktion der Matrilinemenge dramatische Konsequenzen für die Entwicklung der Zebrafischlarven hatte (Ko et. al., persönliche Kommunikation).

#### **1.2.4. Morpholino antisense “knockdown”**

Die Idee, die Auswirkungen des Verlustes eines Genprodukts *in vivo* untersuchen zu können, ohne dafür das Genom eines der beteiligten Untersuchungsobjekte manipulieren zu müssen, ist keineswegs neu: Seit 1978 verwendet man Oligonukleotide, um die Transkription von Proteinen zu unterdrücken (Zamecnik, Stephenson, 1978). Der Mechanismus dabei ist denkbar einfach. Die Oligonukleotide sind so gestaltet, dass sie die Antisensesequenz zur Ziel-mRNA aufweisen. So können sie in einer Zelle spezifisch an diese mRNA binden (hybridisieren) und den Heteroduplex-mRNA vermittelten Abbau dieser, entweder durch Aktivierung der RNaseH (Walder, Walder, 1988) oder des DICER Komplexes



### Abb. 1.9: Struktur und Funktion von Morpholinos

Schematische Darstellung eines Morpholin-Phosphoramidat-Monomers (A) adaptiert nach (Summerton, Weller, 1997) (A) und eines Morpholino Oligonukleotids (Teilabbildung entnommen aus (Moulton, Jiang, 2009), B), Skizze des Injektionsvorgangs in den Dotter eines Zebrafischembryos im Einzellstadium und die Verteilung des Morpholinos (C). Beispiel der Funktion eines Morpholinos anhand der sterischen Translationsinhibition. Das Morpholino bindet an die Translationsinitiationsstelle und verhindert die Assemblierung des Ribosoms und damit die Translation (D). Auf dieselbe Weise wird die Assemblierung des Spleißosoms verhindert.

(Banerjee, Slack, 2002), einleiten (zusammengefasst in (Achenbach u. a., 2003)). Beide Methoden haben allerdings einen entschiedenen Nachteil: Die verwendeten Antisenseoligonukleotide werden im selben Verhältnis wie die Ziel-mRNA abgebaut. Man musste also Möglichkeiten finden, die verwendete Substanz in Zellen stabil zu halten.

Morpholino Oligonukleotide, kurz “Morpholinos”, sind chemisch modifizierte Oligonukleotide, deren Eigenschaften ähnlich zu denen natürlich vorkommender Nukleotide (DNA, RNA) sind. Die Basen in einem Morpholino und in DNA oder RNA sind identisch. Die Struktur des Rückgrats basiert jedoch nicht auf Ribose oder Desoxyribose und Phosphat, wie in DNA oder RNA, sondern auf Morpholin-Phosphordiamidat (siehe Abb. 1.9 A, B)

(Summerton, Weller, 1997). Dies macht die Morpholinos unverdaubar für alle Enzyme, die das Rückgrat natürlicher Nukleotide angreifen, allen voran die Nukleasen. Die Morpholinos können nun dazu verwendet werden, die Transkription und das Spleißosom (Draper u. a., 2001) sterisch zu blockieren. Das erstere resultiert, wie bei der klassischen Anwendung, in einer verringerten Transkription des Proteins, das zweite führt zu spezifisch fehlgespleißten mRNA-Varianten (siehe Abb. 1.9 D).

Bei der Applikation der Morpholinos, die, wie andere Oligonukleotide, normalerweise direkt in Zellen in Zellkultur eingebracht werden, erwies sich die Embryonalentwicklung des Zebrafisches als geeignet für die Verwendung bei der *in vivo* Analyse von mehrzelligen Organismen. Da die Zellen des Embryos bis zum 32-Zellstadium Plasmabrücken zur Dotterzelle aufrechterhalten (zusammengefasst in (Kimmel, Law, 1985)), nehmen sie jeden Stoff auf, der im Dotter vorhanden ist. Injiziert man nun Morpholinos in den Eidotter der Zebrafischeier bis zum 16-Zellstadium, nehmen alle Tochterzellen, und damit der gesamte Embryo die Morpholinos auf (siehe Abb. 1.9 C und (Nasevicius, Ekker, 2000)). Mit jeder folgenden Zellteilung halbiert sich der Morpholinogehalt in den Zellen, und die „knockdown“ Effizienz nimmt ab. Etwa drei Tage nach der Injektion kann man das Zielprotein wieder nachweisen (empirische Beobachtung).

Da Morpholinoinjektionen auch unspezifische und toxische Nebeneffekte haben können (bei bis zu 20% der angewendeten Morpholinos, siehe (Ekker, Larson, 2001; Summerton, 2007a)), haben sich in den letzten Jahren eine Reihe von Kontrollen etabliert, um diese von tatsächlichen Phänotypen unterscheiden zu können. Zu diesen gehören unter anderem die Injektion von Mismatchmorpholinos, die durch den Einbau von Fehlbasen die Bindungsaffinität zur Ziel-mRNA reduzieren und einen schwächeren Phänotyp erzeugen sollten (zusammengefasst in (Heasman, 2002)) sowie die Koinjektion von reifer mRNA und spleißstellenblockenden Morpholinos, um den Phänotypen zu „retten“ (zusammengefasst in (Eisen, Smith, 2008)). Die Koinjektion eines p53 Morpholinos, der die Translation von p53 unterdrückt, soll den p53 vermittelten, programmierten Zelltod (Apoptose) als Antwort auf den toxischen Stoff verhindern und damit ebenfalls den Phänotyp „retten“ (basierend auf (Plaster u. a., 2005; Robu u. a., 2007)).

### 1.3.Zielsetzungen

Die vorliegende Arbeit hatte zur Aufgabe, die Funktion der nicht-kollagenen ECM Proteine UCMA und Matn-1 im Zebrafischmodell zu untersuchen. Der Zebrafisch wurde als Alternative zur Maus gewählt, da entweder keine Mausmodelle vorlagen (UCMA), oder diese keine offensichtlichen Phänotypen zeigten (Matn-1). Zuerst sollte die Expression beider Proteine im Zebrafisch mittels quantitativer PCR, *in situ* Hybridisierung und immunhistochemischen Färbungen untersucht werden, um abzuklären, wann und wo die Proteine exprimiert werden. Anschließend sollte die Expression beider Proteine mittels Morpholinoinjektion unterdrückt und die möglicherweise daraus resultierenden „knockdown“ Phänotypen morphologisch untersucht werden. Weitere molekularbiologische und zellbiologische Verfahren sollten verwendet werden, um die molekularen Grundlagen der Entstehung der möglichen „knockdown“ Phänotypen beider Proteine zu entschlüsseln. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten helfen, wichtige Hinweise auf die immer noch unzureichend bekannten Funktionen beider Proteine zu erhalten und damit zu einer Verbesserung der zur Zeit gültigen Modelle der Funktionen dieser Proteine beitragen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. DNA und RNA Standardmethoden**

#### **2.1.1. Isolierung von genomischer DNA aus Geweben**

Zur Isolierung von genomischer DNA aus Geweben wurden diese mechanisch zerkleinert und anschließend einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen, um einen hohen Reinheitsgrad der erhaltenen DNA zu gewährleisten. Zur Isolierung von möglichst gering gescherter genomischer DNA wurden die entsprechenden Gewebe in 700µl Tail Lysis Buffer (0,4ml 1M Tris pH 7,5, 8ml 0,5M EDTA pH 8,0, 1ml 20% SDS, 0,8ml, 10mg/ml RNase A, ad. 30ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) aufgenommen und 2h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 30µl einer 15mg/ml Proteinase K Stammlösung hinzugefügt, die Proben über Nacht bei 55°C inkubiert und dann einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen.

#### **2.1.2. Isolierung von DNA aus bakteriellen Kulturen**

Die Isolierung von DNA aus Bakterienkulturen mit geringem Volumen erfolgte mit Hilfe des Plasmid DNA Purification Kits von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers nach dem Anionenaustauscher-Prinzip. Das Protokoll wurde ohne Änderungen übernommen. Die Isolierung von DNA aus Bakterienkulturen mit einem Volumen von mehr als 5ml erfolgte mit Hilfe des Midi Plasmid Purification Kits von Qiagen. Das Protokoll wurde ohne Änderungen übernommen.

#### **2.1.3. Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben**

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben erfolgte mit Hilfe eines RNeasy Mini Kits von Qiagen. Das Protokoll „Extraction from Animal Tissues“ wurde ohne Änderungen übernommen. Die extrahierte RNA wurde anschliessend zur weiteren Aufreinigung einer Natriumacetat-Präzipitation unterzogen. Alternativ wurde das TRIzol-Reagenz von Invitrogen eingesetzt, um hochreine Gesamt-RNA aus Geweben zu erhalten. Das Protokoll „RNA Isolation“ wurde ohne Änderungen übernommen.

#### **2.1.4. Isolierung von mRNA aus Geweben**

Die Isolierung von mRNA aus der erhaltenen Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe eines Oligotex Direct mRNA Kits von Qiagen, bei dem nur die mRNA des Probengemisches durch ihren Poly-A-Schwanz kovalent an der Säulenmatrix gebunden wird. Das Protokoll „Spin-Column Protocol“ wurde ohne Änderungen übernommen. Die isolierte mRNA wurde anschließend zur weiteren Aufreinigung einer Natriumacetat-Präzipitation unterzogen.

#### **2.1.5. Spaltung von DNA mittels Restriktionendonukleasen**

Die Herstellung von Restriktionsfragmenten mittels Restriktionseendonukleasen erfolgte nach Angaben der Hersteller unter Verwendung der mitgelieferten Puffer und unter Berücksichtigung der Aktivität der jeweiligen Enzyme, sowie des Reinheitsgrades der eingesetzten DNA. Die weitere Aufreinigung der Fragmente erfolgte, je nach Art der beabsichtigten Folgeanwendung, entweder durch direkte Isolierung von DNA aus Lösungen, oder durch Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Extraktion der DNA aus Agarosegelen.

#### **2.1.6. Dephosphorylierung gespaltener (linearisierter) Vektoren**

Um bei der Ligation von DNA-Fragmenten eine Religation des linearisierten Vektors zu vermeiden, wurden die Vektoren nach Angaben des Herstellers mit der Antarctic Phosphatase von NEB dephosphoryliert. Das verwendete Enzym wurde nach Beendigung der Reaktion durch Erhitzen auf 65°C inaktiviert.

#### **2.1.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden die Enzyme AmpliTaq DNA Polymerase von Applied Biosystems, Pfu Ultra II von Agilent und Expand High Fidelity von Roche nach Angaben der Hersteller unter Berücksichtigung der Eigenschaften der verwendeten Primer eingesetzt. Bei der Durchführung von nested-PCRs wurden die verschiedenen Reaktionen in unterschiedlichen Räumen angesetzt, um Kreuzkontaminationen durch Aerosole zu vermeiden. Die Primer wurden manuell unter Zuhilfenahme der Online-

Tools von Sigma Aldrich und der Northwestern University (OligoCalc) erstellt und können Tabelle 3 entnommen werden.

#### **2.1.8. Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)**

Die Herstellung von copy-DNA (cDNA) mittels reverser Transkription zur Untersuchung von vollständigen Transkripten erfolgte nach Angaben des Herstellers mit der SuperScript II Reverse Transkriptase von Invitrogen. Im Anschluss an die Transkription wurde die verbliebene mRNA mittels RNase H-Verdau (1 µl/ Ansatz einer 5000U/ml Stammlösung) entfernt.

#### **2.1.9. Ligation von PCR-Fragmenten (Klonierung)**

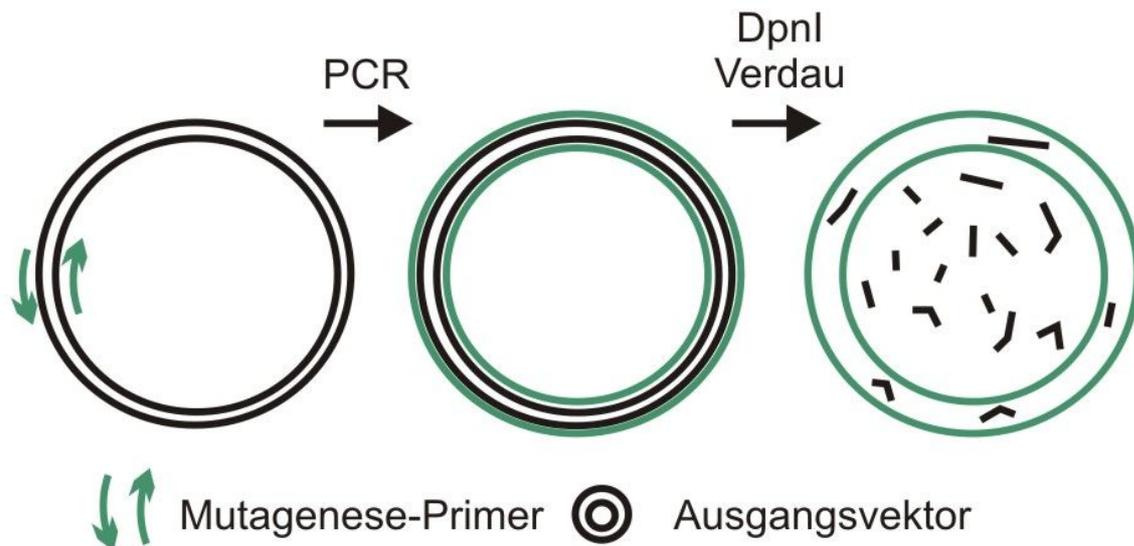
Die Ligation von PCR-Fragmenten wurde nach Angaben des Herstellers mit dem Rapid DNA Ligation Kit von Roche durchgeführt. Um die Wahrscheinlichkeit zu verringern, dass die eingesetzten Vektoren (siehe ) ohne Insert religieren, wurden diese mit Überhang gespalten. Zusätzlich wurde das Insert in hohem Überschuss eingesetzt (Vektor und Insert in einem Verhältnis von 1:5).

#### **2.1.10. Zielgerichtete Mutagenese**

Um gezielte Mutationen einzelner Basen in einer gegebenen DNA-Sequenz einzuführen, wurden mit DNA-Oligonukleotidprimern, welche die erforderliche Mutation enthalten (siehe Tabelle 2.3), PCR-Reaktionen durchgeführt (vgl. Abb. 2.1). Als PCR-Schablone dienten auf pBlueskript II basierende Vektoren, die bereits die zu mutierende Sequenz beinhalteten (siehe ). Zur Entfernung des Ausgangsvektors wurde ein DpnI-Verdau durchgeführt, bei dem nur die methylierte DNA des Ausgangsvektors gespalten wird.

#### **2.1.11. Agarose-Gelelektrophorese von DNA und DIG-markierter RNA**

Die Trennung von DNA und DIG-markierter RNA zur Fragmentlängenanalyse erfolgte mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese in 1-2%igen Gelen (w/v). Als Laufpuffer diente 1x TAE. Zur entsprechenden Nukleinsäure wurde 6x DNA-Probenpuffer



**Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Ablaufs einer zielgerichteten Mutagenese**

Mit Hilfe von Mutagenese-Primern wird ein Vektor repliziert. Der Ausgangsvektor wird durch DpnI-Verdau methylierungsspezifisch zerstört. Der neu synthetisierte, unverdaute Vektor enthält die gewünschte Mutation.

(0,25% (w/v) Bromphenolblau, 70% (v/v) Glycerin oder 0,25% (w/v) Xylencyanol, 70% (v/v) Glycerin) gegeben. Je nach Größe der zu erwartenden Fragmente wurde bromphenolblau- oder xylencyanolhaltiger Puffer verwendet. Zur Größenbestimmung wurden Molekulargewichtsmarker (1kB-Ladder, pUC-Mix-Marker) aufgetragen. Die Trennung der Fragmente nach Größe erfolgte durch das Anlegen einer konstanten Stromstärke von 50-90 mA. Die Visualisierung erfolgte durch Interkalation des Farbstoffs Ethidiumbromid in die Nukleinsäure, welches unter UV-Licht fluoresziert.

**2.1.12. Extraktion von DNA aus Agarosegelen und Lösungen**

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen und Lösungen wurde das UltraClean 15 DNA Purification Kit von MoBio verwendet. Das Protokoll „UltraClean 15 for TAE Agarose gel“ des Herstellers wurde ohne Änderungen übernommen und wird im Folgenden zusammengefasst. Ein Volumen Probe (oder eine Äquivalente Menge TAE Agarose) wurde mit 3 Volumen „Ultra Salt“ für 5 Minuten bei 55°C inkubiert. Nach Zugabe von 6 µl „Ultra Bind“ wurde die Probe für weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur in einem Rotationsschüttler inkubiert. Die im „Ultra Bind“ enthaltenen Glaspartikel mit der daran gebundenen DNA wurden durch Zentrifugation (30 Sekunden, 16000 x g, RT) vom Überstand getrennt und verworfen. Die Glaspartikel wurden in 1 ml „Ultra Wash“ resuspendiert und anschließend durch erneute Zentrifugation (30 Sekunden, 16000 x g, RT)

pelletiert. Nachdem die Glasmatrix, um Ethanolreste zu entfernen, für 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet wurde, konnte die DNA mit 12 µl Wasser eluiert werden. Die extrahierte Polynukleotidmenge wurde photometrisch quantifiziert.

### **2.1.13. Fällung von DNA**

Um DNA zu konzentrieren und Unreinheiten wie z.B. Proteine zu entfernen, wurde die DNA „ausgesalzt“, d.h. mit hohen Salzkonzentrationen und Ethanol präzipitiert. Zur DNA-enthaltenden Lösung wurden 3 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 3M Natriumacetat pH 5,2 gegeben und 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Die DNA wurde durch eine 15 minütige Zentrifugation (16000 x g, 4°C) gefällt und anschließend mit 1ml 70% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (15 Minuten, 16000 x g, 4°C). Das Pellet wurde 5 Minuten auf Eis getrocknet und im gewünschten Volumen H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gelöst.

### **2.1.14. Fällung von RNA**

Analog zur Fällung von DNA wurde mRNA ebenfalls durch Aussalzen konzentriert und aufgereinigt. Zur RNA-enthaltenden Lösung wurden 3 Volumen Ethanol, 1/10 Volumen 3M Natriumacetat pH 5,2 und 6 µl Glykogenlösung (10mg/µl) gegeben und 60 Minuten bei -20°C inkubiert. Die präzipitierte RNA wurde 15 Minuten zentrifugiert (16000 x g; 4°C) und anschließend mit 1ml 70% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (15 Minuten, 16000 x g; 4°C). Das Pellet wurde 15 Minuten auf Eis getrocknet, im gewünschten Volumen H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gelöst und entweder sofort weiterverwendet oder sofort bei -20°C eingefroren.

## **2.2. Spezielle DNA und RNA Methoden**

### **2.2.1. Herstellung von *in situ* Sonden mittels *in vitro*-Transkription**

Der Nachweis von spezifischen mRNA Molekülen im Gewebe erfolgte durch „Whole mount“ *in situ*-Hybridisierung (siehe ). Die dafür benötigten Antisense Sonden wurden nach Angaben des Herstellers mit dem DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) von Roche mit Digoxigenin (DIG) markiert. Die markierten RNA-Fragmente wurden mittels RNA-Präzipitation konzentriert und aufgereinigt (siehe ). Um die Qualität der Sonde abzuschätzen, wurde ein Teil des Produkts mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe ). Die

Bandenfokussierung gab Auskunft darüber, ob und in welchem Maße die Produkte einem eventuellen Abbau durch RNAsen unterlagen. Über die DIG-Markierung wurde die für die nachfolgenden Applikationen notwendige Sondenkonzentration in einem „dot blot“ abgeschätzt. Proben der synthetisierten Sonden wurden in Verdünnungen von  $1 \times 10^{-2}$  bis  $1 \times 10^{-6}$  auf Hybond N Nylonmembran aufgetragen und getrocknet. Die getrocknete Membran wurde mit 10x SSC rehydriert und die RNA mittels UV-Bestrahlung (Stratalinker) kovalent an die Membran gebunden. Die Membran wurde daraufhin für 60 Sekunden in Waschpuffer (100mM TRIS/150mM NaCl, pH 7,5) gewaschen und Proteinbindestellen mit 1% (v/v) Blocking Reagenz, gelöst in Waschpuffer, für 30 Minuten blockiert. Die Membran wurde anschließend für 30 Minuten mit einer 1:5000 Verdünnung eines mit alkalischer Phosphatase gekoppelten DIG-Antikörpers inkubiert und dann 2 x 15 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Die Membran wurde anschließend für zwei Minuten in Färbepuffer (100mM TRIS, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5) umgepuffert. Der Nachweis erfolgte durch Inkubation in Färbelösung (35µl 50mg/ml BCIP in DMF und 45µl 100mg/ml NBT in 70% (v/v) DMF in 10 ml Färbepuffer gelöst) über Nacht unter Ausschluss von Licht.

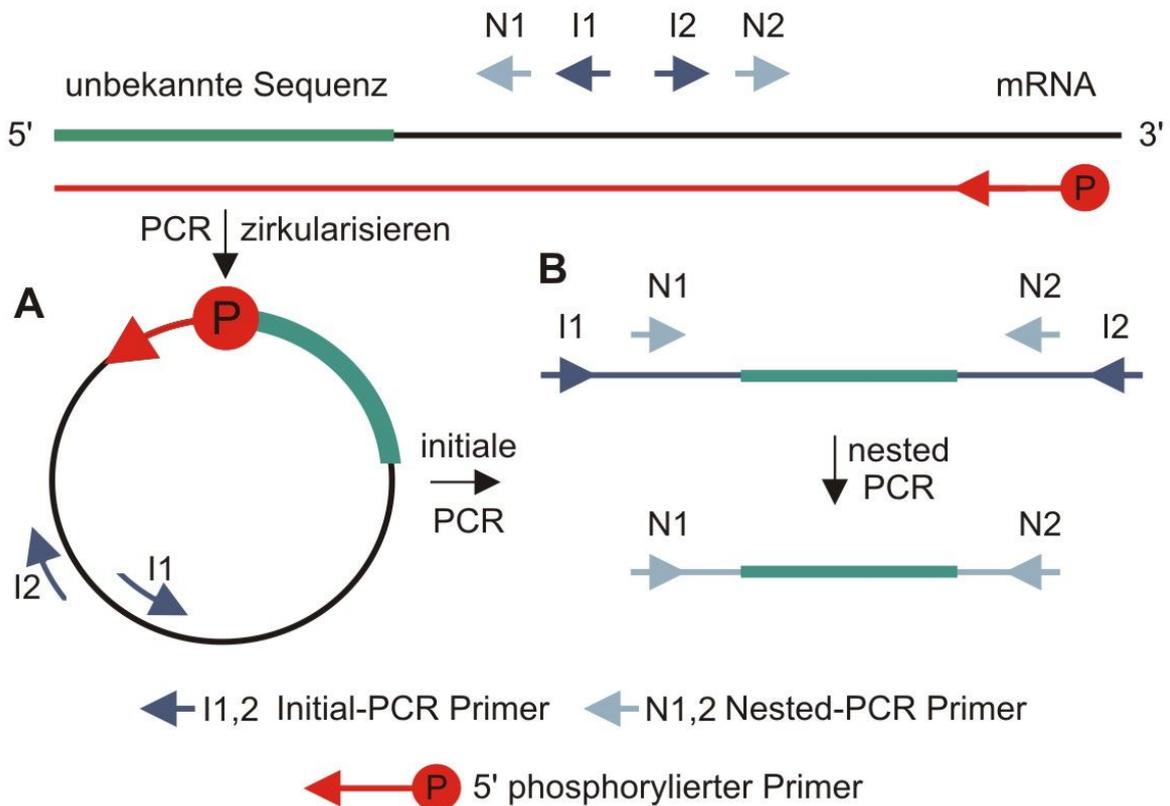
### 2.2.2. Herstellung von mRNA durch *in vitro*-Transkription

Funktionale mRNA für Morpholino-Rescue-Experimente wurde nach Angaben des Herstellers mit dem mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit von Ambion hergestellt. Die synthetisierte mRNA wurde durch Fällung konzentriert und aufgereinigt (siehe ). Um die Qualität der mRNA abschätzen zu können, wurde ein Teil der mRNA mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe ). Die genaue mRNA Konzentration wurde UV-spektrometrisch (Nanodrop) ermittelt.

### 2.2.3. 5'-RACE (**R**apid **A**mplification of **c**DNA **E**nds)

Die sogenannte RACE-Methode wird verwendet, um unbekannte Sequenzen vom 5'- und 3'-Ende von mRNA zu erhalten. Für die Ermittlung des 5'-Endes wird ein phosphorylierter Oligonukleotidprimer verwendet, um eine mRNA revers zu transkribieren, die die unbekannte Sequenz enthält. Dank des phosphorylierten Primerendes lässt sich die entstandene cDNA zirkularisieren und auf dieser einsträngigen, zirkulären cDNA lassen sich initiale bzw. „nested“-PCRs durchführen, um DNA-Fragmente zu amplifizieren, die sequenziert werden können (vgl. Abb. 2.2). Die RACE-Amplifikation und die weiterführenden PCRs wurden

unverändert nach Herstellerangaben mit dem 5'-Full Race Core Set Kit von TaKaRa durchgeführt. Die verwendeten Primer können Tabelle 3 entnommen werden. Die Sequenzierungen wurden in Servicelabor des Zentrums für Molekulare Medizin Köln vorgenommen.



**Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Zwischenschritte bei einer 5'-RACE-Amplifikation**

Mit Hilfe eines phosphorylierten Primers wird mRNA revers transkribiert. Nach RNase-Behandlung der Produkte wird die erhaltene cDNA zirkularisiert (A). Daraufhin wird mittels PCR die unbekannte Sequenz amplifiziert (B)

#### 2.2.4. Quantitative „Real-Time“ PCR

Die sogenannte „Real-Time“ PCR ermöglicht einen quantitativen Nachweis von DNA und RNA bei vorgeschalteter reverser Transkription. Man unterscheidet konzeptuell zwei Methoden, die beide in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung von mRNA verwendet wurden und im Folgenden erläutert werden.

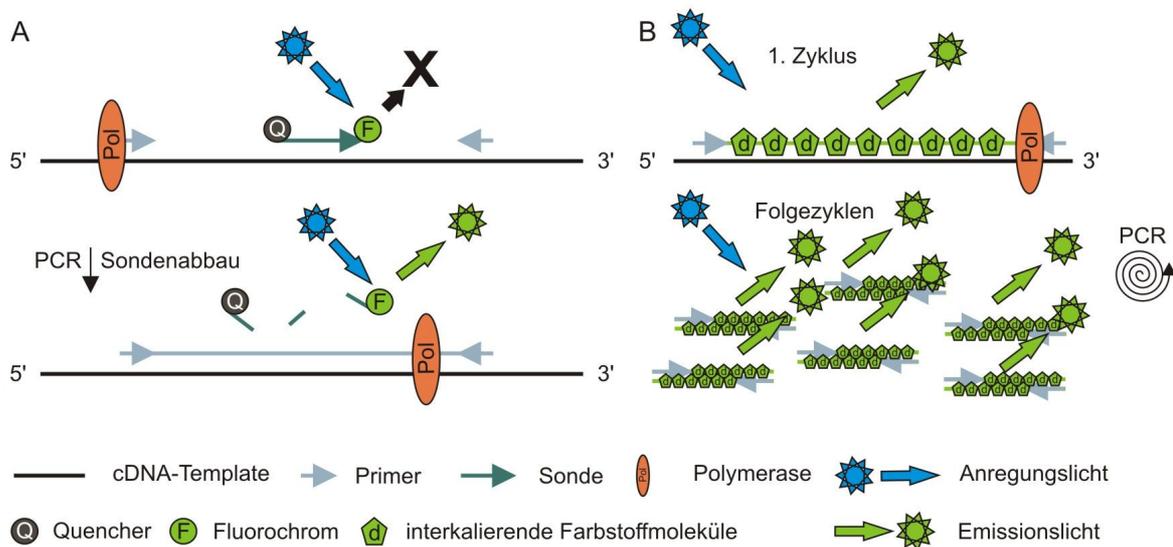
Die TaqMan „Real-Time“ PCR verwendet antisense Oligonukleotidsonden, welche zwischen zwei Primern binden und sich die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der bei der PCR verwendeten

DNA-Polymerase zu Nutze machen. Die Sonde ist an beiden Enden durch Phosphatreste blockiert (und kann damit nicht als Primer fungieren) und ist an einem Ende fluoreszenzmarkiert (typischerweise ein Derivat von Fluorescein). Das andere Ende enthält einen sogenannten Quencher (Löcher). Wird die Sonde in diesem Zustand mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt, sorgt die räumliche Nähe des Quenchers dafür, dass der sogenannte FRET (fluorescence resonance energy transfer) eintritt. Obwohl das Fluorochrom angeregt wird, tritt keine Fluoreszenz auf. Während der PCR Reaktion hingegen wandert die Polymerase an der DNA-Schablone entlang, bis sie auf die Sonde trifft und diese durch ihre 5'-3' Exonuklease-Aktivität verdaut. Das Fluorochrom kann nun bei Anregung mit Licht passender Wellenlänge die aufgenommene Energie in Form von Fluoreszenz wieder abgeben (vgl. Abb. 2.3). Da jedes freigesetzte Fluorochrom-Molekül spezifisch einem DNA-Molekül entspricht, steigt die Fluoreszenz während des Experiments im selben Verhältnis an. Die Quantifizierung erfolgt über die Ermittlung der Anzahl der PCR Zyklen bis zur Überschreitung eines Fluoreszenz-Schwellenwerts, der sich aus dem Zehnfachen der „Basislinie“ (der Wert der ersten zehn Zyklen) ergibt (CT-Wert). Diese Werte lassen sich mit der Expression eines ubiquitär exprimierten Referenzgens (*ribosomal protein II*) vergleichen, um die relative Expression des unbekanntes Gens zu ermitteln. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Berechnung die  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode herangezogen.

Zur Vorbereitung wurde mRNA isoliert und in cDNA revers transkribiert (siehe und ). Die Real-Time-Reaktion wurde in Triplikaten von je 20  $\mu\text{l}$  Volumen nach folgendem Pipettierschema durchgeführt: 7  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ , 10  $\mu\text{l}$  2xTaqMan® Gene Expression Master Mix, 1  $\mu\text{l}$  Sonde und verschiedene Mengen an cDNA (80, 40, 20, 10, 5, 2,5 und 0ng cDNA), aufgefüllt auf 20  $\mu\text{l}$ . Die Amplifikation der Produkte erfolgte nach Angaben des Herstellers und wird im Folgenden zusammengefasst.

Die Quantifizierung bei der Sybr-Green I „Real-Time“ PCR basiert auf der Interkalation des Farbstoffs Sybr-Green I in DNA-Doppelstrang-Moleküle. Die bei jedem Amplifikationszyklus steigende Menge an DNA-Doppelstrangmolekülen führt zu einer Erhöhung der Fluoreszenz in der Probe, die erfasst und ausgewertet wird (siehe Abb. 2.3 B). Um möglichen Variationen der mRNA-Menge Rechnung zu tragen, wurde das konstitutiv exprimierte Gen *TATA-box binding protein* für die Normalisierung der Messwerte verwendet. Die Versuche wurden in einem ABI PRISM 7900 HT in Triplikaten nach folgendem Schema durchgeführt: 2xABsolute Blue QPCR Master Mix, 0,3  $\mu\text{M}$  „forward“ Primer, 0,3  $\mu\text{M}$  „reverse“ Primer (siehe Tabelle 2.4) und 20ng cDNA pro 20  $\mu\text{l}$  Versuchsansatz. Die Zyklen

waren wie folgt: 95°C für 15 Minuten, gefolgt von 40 Zyklen Denaturierung (94°C, 15 Sekunden), Annealing (60°C, 60 Sekunden) und Elongation (72°C, 60 Sekunden).



**Abb. 2.3: Schematische Darstellung der zwei verwendeten Real-Time PCR Methoden**

Eine TaqMan-Sonde ist mit einem Quencher gekoppelt, dessen räumliche Nähe zum Fluorochrom verhindert, dass dieses bei Anregung Licht emittiert. Die 5'-3' Exonukleasefunktion der Polymerase verdaut in jedem Zyklus die an der DNA hybridisierten Sonde und hebt damit die räumliche Nähe von Quencher zum Farbstoff auf. Nach jedem Amplifikationsschritt wird die Fluoreszenz gemessen (A). Die Sybr-Green Real-Time PCR nutzt den interkalierenden Farbstoff Sybr-Green I. Mit steigender Zyklenzahl steigen die Produktmenge (und damit die Menge an Doppelstrang DNA) und die Menge an fluoreszierendem, gebundenem Farbstoff. Die Zunahme der Fluoreszenz wird nach jedem Zyklus gemessen (B).

**2.3. Proteinbiochemische Standardmethoden**

Die Verdünnungen der Antikörper bei immunologischen Methoden können Tabelle 1 entnommen werden.

**2.3.1. Direkte Extraktion von Proteinen aus Zebrafisch**

Zur Analyse wurden Proteine aus den entsprechenden Geweben nach folgendem Protokoll extrahiert: Die Tiere wurden betäubt und getötet (siehe ). Jungtiere wurden gegebenenfalls dechorioniert und der Dottersack wurde entfernt. Wenn nur die Proteine aus dem Kopf extrahiert werden sollten, wurde die gesamte hintere Körperachse, einschließlich des Dottersacks, caudal der Brustflossen entfernt. Das Gewebe wurde gewogen und mit der

fünffachen Menge an Extraktionspuffer (150mM NaCl, 50mM Tris/HCl, 2mM EDTA, 1% (v/v) Nonidet P40, 3 µl 0,5M NEM/100µl und 6µl 0,25M PMSF/100µl eingestellt auf pH 7,4) in einem Glashomogenisator auf Eis zerkleinert. Anschließend wurde die Probe 30 Minuten auf Eis inkubiert und daraufhin durch Zentrifugation (15 Minuten bei 4°C und 21000 x g) von Schwebstoffen befreit. Die erhaltene Lösung wurde zur weiteren Reinigung und zur Anreicherung der Proteine einer Ethanolpräzipitation unterzogen (siehe ).

Zur Extraktion schwerlöslicher Proteine wurden schockgefrorene Embryonen zunächst gewogen, in 10 µl Extraktionspuffer (4M Guanidiniumhydrochlorid, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 2,5 mM NEM, 2,5 mM PMSF, pH 7,4) pro mg Gewebe übertragen und anschließend mit Hilfe eines Eppendorfpistills mechanisch grob aufgeschlossen. Das Rohlysat wurde mit einem Ultraschall Disintegrator 500 W (Novodirect) sonifiziert (30 Sekundenzyklus, 10 Sekunden sonifizieren, 30% Intensität, 20 Sekunden Pause, auf Eis). Die Proteine wurden durch Zugabe von 9 Volumen Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Die Proteinlösung wurde zur weiteren Reinigung einer Proteinpräzipitation unterzogen (siehe ). Das Proteinpellet wurde in 1µl Proteinladepuffer pro mg eingesetztem Gewebe über Nacht bei Raumtemperatur gelöst.

### **2.3.2. Sequentielle Extraktion von Proteinen aus tierischen Geweben**

Die sequentielle Extraktion wurde benutzt, um eine Auftrennung der extrahierten Proteine entsprechend ihrer Verankerung in den Geweben zu erhalten. Extraktionspuffer I (0,15M NaCl, 50mM Tris HCl, 1,5mM NEM, 1,5mM PMSF, pH 7,4) extrahiert wasserlösliche Proteine, Extraktionspuffer II (1M NaCl, 50mM Tris HCl, 10mM EDTA, 1,5mM NEM, 1,5mM PMSF, pH 7,4) extrahiert Proteine, die Protein-Protein-Wechselwirkungen über divalente Kationen aufbauen und Extraktionspuffer III (4M Guanidiniumhydrochlorid, 50mM Tris, 10mM EDTA, 1,5mM NEM, 1,5mM PMSF, pH 7,4) alle verbliebenen extrahierbaren Proteine in der Probe. Nach Tötung und Zerkleinerung der Tiere wurde die Probe anschließend über Nacht in Extraktionspuffer I im Kühlraum auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe zentrifugiert (15 Minuten bei 4°C und 21000 x g), der Überstand mit Ethanol präzipitiert (siehe ) und das verbliebene Pellet mit Extraktionspuffer II resuspendiert. Der oben beschriebene Vorgang wurde jeweils mit Extraktionspuffer II und – III wiederholt.

### 2.3.3. Ethanolpräzipitation von Proteinen

Zur Erhöhung der Proteinkonzentration für die SDS-Gel-Elektrophorese wurden die Extrakte einer Ethanolpräzipitation unterzogen. Mittels Ethanolfällung können auch Nicht-Proteinbestandteile (wie Lipide oder Salze) aus dem Lysat entfernt werden. Dazu wird 1 Vol. Proteingemisch mit 9 Vol. 96% (v/v) Ethanol, auf -20°C vorgekühlt) gemischt und für mindestens 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Die ausgefallenen Proteine werden durch Zentrifugation (15 Minuten bei 4°C und 16000 x g) pelletiert und der Überstand verworfen. Vor der Zugabe von 6x Proteinladepuffer (2% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerin, 0,04% (w/v) Bromphenolblau, 80mM Tris-HCl, pH 6,8) wurde die Probe 5 Minuten auf Eis mit offenem Deckel inkubiert, um eventuelle Ethanolreste zu entfernen.

### 2.3.4. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse in einem Polyacrylamidgel durch Anlegen eines elektrischen Feldes. Polyacrylamid (PA), das durch radikalische Polymerisierung von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid (zuständig für die Quervernetzung) entsteht, dient dabei als molekulares Sieb, bei dem die Porengröße (und damit die Trenneigenschaften des Gels) durch den prozentualen Gehalt an Acrylamid angegeben wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese nach Lämmli (Laemmli, 1970) verwendet. Die Gele bestehen grundsätzlich aus einem Sammelgel (gewöhnlich mit einer Prozentigkeit von unter 4% w/v PA in 0,1% (w/v) SDS, 120mM Tris HCl, pH 6,8) und einem Trenngel (verwendet wurden 8, 10 und 12% PA Gele, bzw. 4-12% PA Gradientengele in 0,1%(w/v) SDS, 375mM Tris HCl, pH 8,8). Die Unterschiede in Porengröße und pH zwischen Sammel- und Trenngel dienen der Fokussierung der Proteine am Ende des Sammelgels. Die Proteine werden durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS; Sodium) denaturiert und erhalten eine negative Ladung.

Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte vertikal in einem Mighty Small II SE250 Gelelektrophorese-System. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 6x SDS-Proteinladepuffer versetzt (siehe ) und, sofern erforderlich, für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und/oder mit 4% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt, um Disulfidbrücken zu spalten und die Proteine zu reduzieren. Zur Größenbestimmung wurde ein Molekulargewichtsmarker

(PageRuler oder BR Protein Marker) aufgetragen. Das Gel wurde in SDS-Laufpuffer (0,1% (w/v) SDS, 400mM Glycin, 50mM Tris) einem elektrischen Feld ausgesetzt (60-100mA = const.) und anschließend einer Coomassie Brilliant Blue Färbung oder einem „Western blot“ unterzogen (siehe und ).

### **2.3.5. Coomassie-Färbung von Proteinen im Polyacrylamidgel**

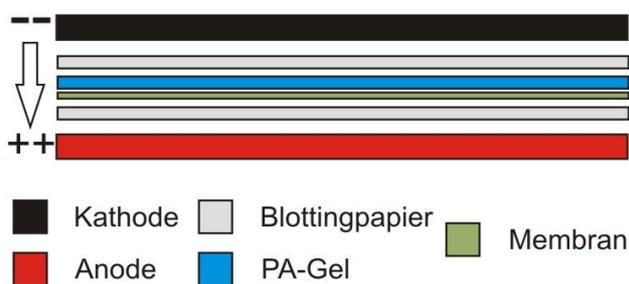
Die Identifizierung von Proteinen in einem SDS-Gel erfolgte entweder indirekt durch „Western blot“ (siehe ) oder direkt, durch eine Färbung mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue R-250. Die Coomassie-Färbung funktioniert vergleichbar zur Bradford Methode (siehe ): Das Absorptionsspektrum des ursprünglich roten Farbstoffs (470nm) verschiebt sich durch die Komplexbildung mit Proteinen nach 595nm. Das zu färbende Gel wurde in einer Färbelösung bestehend aus 0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% (v/v) Methanol und 10% (v/v) Essigsäure über Nacht inkubiert. Überschüssiger Farbstoff und Hintergrundfärbungen des Gels wurden durch das Überführen des Gels in destilliertes Wasser und wiederholtes Aufkochen begleitet von Wasserwechseln entfernt.

### **2.3.6. „Western blot“ und Immunodetektion**

Der spezifische Nachweis von Proteinen nach einer Elektrophorese erfolgt mittels „Western blot“. Bei einem „Western blot“ werden die Proteine mittels Elektrophorese auf eine Membran (z.B. Nitrozellulose oder PVDF) übertragen, woraufhin sie mit gegen die Zielproteine gerichteten spezifischen Antikörpern detektiert werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde der sogenannte Tank-Blot verwendet, bei dem die elektrophoretische Übertragung vollständig in wässriger Umgebung stattfindet. Das zu bearbeitende Gel wurde mit der entsprechenden Membran blasenfrei zwischen Blottingpapier gelegt und in Blottingpuffer (50mM Borsäure, 10% (v/v) Methanol, pH 8,5) getaucht. Die Membran wurde vor dem Blotten kurzzeitig in Methanol aktiviert. Der Versuchsaufbau (vgl. Abb. 2.4) wurde einem elektrischen Feld ausgesetzt (100mA = const. über Nacht). Nach erfolgter Übertragung der Proteine wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt, um einen Überblick über das transferierte Gesamtprotein zu erhalten und anschließend die verbliebenen Proteinbindestellen für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit 5% (w/v) Milchpulver in 0,05% Tween-20 gelöst in PBS (PBT) geblockt. Daraufhin wurde die geblockte Membran für 60 Minuten mit dem affinitätsgereinigten Primärantikörper in entsprechender Verdünnung in 5%

(w/v) Milchpulver gelöst in PBT bei Raumtemperatur inkubiert. Eventuelle Antikörperüberschüsse wurden in zwei Waschschritten von je 5 Minuten mit PBT und einem Waschschritt von 5 Minuten mit PBS entfernt. Die Membran wurde daraufhin mit dem entsprechenden Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper gelöst in PBT mit 5% (w/v) Milchpulver für 60 Minuten inkubiert und danach wie weiter oben beschrieben dreimal gewaschen. Die Detektion des Proteins erfolgte unter Ausnutzung der antikörpergekoppelten Peroxidase mittels Chemolumineszenz unter Verwendung von ECL-Lösung (1ml 1,5M Tris HCl pH 8,8, 22µl 90mM p-Coumarinsäure, 50µl 250mM Luminol, 6µl 30% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ad. 10ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) und Belichtung von Röntgenfilmen.



**Abb.2.4: Schematische Darstellung der elektrophoretischen Übertragung während eines Tankblots.**

Die Proteine aus dem Gel (blau) werden durch Anlegen einer Spannung zwischen Anode und Kathode auf eine Membran (grün) übertragen (weißer Pfeil).

### 2.3.7. Proteinmengenbestimmung (BC Assay)

Der zur Proteinkonzentrationsbestimmung eingesetzte „bichinonic acid assay“ (BC Assay) beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der zweiwertigen Kupferionen an Peptidbindungen binden und ein gefärbter Komplex entsteht, der photometrisch bei einer Wellenlänge von 562nm gemessen werden kann. Die Färbereaktion wurde mit dem „BC Assay protein quantitation kit“ von InterChim nach Angaben des Herstellers ausgeführt. Die Erfassung der Daten erfolgte in einem „Multiskan MS Platereader“ von Labsystems.

### 2.3.8. Proteinmengenbestimmung nach Bradford

Alternativ zum BC Assay (siehe ) kann man zu Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford benutzen. Wie unter (siehe ) beschrieben, kann man mit Coomassie Brilliant Blue R-250 Proteine färben und bei 595nm photometrisch bestimmen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Rinderserumalbumin Verdünnungsreihe erstellt und jeweils 4µl Standardlösung und die zu messenden Probe mit 200µl Bradford-Reagenz (0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 4,78% (v/v) Ethanol, 8,5% (w/v) Phosphorsäure) versetzt und nach 5 Minuten Inkubation die Absorption bei 595nm gemessen.

## **2.4. Spezielle Proteinbiochemische Methoden**

### **2.4.1. Parallel-Detektion multipler Antigene mittels Odyssey Blot**

Durch fluoreszenz-markierter Zweitantikörper wurden mehrere Antigene parallel mittels „Western blot“ unter Verwendung des Odyssey-Systems von Li-Cor nachgewiesen. Die SDS-Gelelektrophorese und die Übertragung der Proteine verliefen wie bereits unter (siehe und ) angegeben. Die Membran wurde anschließend 120 Minuten mit Odyssey-Block-Puffer behandelt. Analog zur Immunodetektion bei gewöhnlichen „Western blots“ (siehe ) wurde die Membran danach gewaschen (2x 10 Minuten 0,05% Tween 20 in TBS (TBT) und 10 Minuten TBS) und für 60 Minuten mit den Primärantikörpern in 5% (w/v) Milchpulver in TBT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (2x 10 Minuten TBT und 10 Minuten TBS) wurden die Odyssey-tauglichen IRDye-Fluoreszenzantikörper in 5% (w/v) Milchpulver in TBT zur Membran gegeben und wiederum für 60 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Nach einem abschließenden Waschschrift (2x 10 Minuten TBT und 10 Minuten TBS) wurde die Membran unter Lichtausschluss getrocknet und mit dem Odyssey Scanner analysiert.

### **2.4.2. Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie**

Die Affinitätschromatographie basiert auf der spezifischen, reversiblen Bindung des zu reinigenden Stoffes an einen Bindungspartner, der kovalent an einer Matrix gebunden ist. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode verwendet, um Proteine aus Lösungen zu extrahieren. Die in HEK-293-EBNA Zellen exprimierten rekombinanten Proteine wurden N-terminal mit einem Doppel-Strep-Tag II (NH<sub>2</sub>-WSHPQFEK-COOH (Schmidt u. a., 1996)) versehen und anschließend über eine 1ml-Strep-Tactin<sup>®</sup>-Säule gereinigt: 500ml des Zellkulturmediums (siehe und ) wurden 10 Minuten bei 8500 rpm zentrifugiert, um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen, und anschließend über Nacht mehrfach über die Strep-Tactin<sup>®</sup>-Säule geleitet. Die Säule wurde anschließend mit 10ml Waschpuffer (100mM Tris HCl pH8,0, 150mM NaCl) gereinigt. Die Elution der gebundenen Proteine wurde mit 20ml Elutionspuffer (100mM Tris HCl pH8,0, 150mM NaCl, 2,5mM Desthiobiothin; 20 Aliquots von 1ml) vorgenommen. Die erhaltenen Aliquots wurden mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließender Coomassiefärbung (siehe und ) analysiert. Das

Säulenmaterial wurde mit 10 Säulenvolumen (hier: 10ml) Regenerationspuffer (100mM Tris HCl pH 8,0, 150mM NaCl, 1mM HABA) von Desthiobiothin befreit und durch einen abschließenden Waschschrift mit 20 Volumen Waschpuffer regeneriert.

#### **2.4.3. Herstellung affinitätsgereinigter, polyklonaler Antikörper**

Zur spezifischen Detektion von Matn-1 im Zebrafisch wurde jeweils ein polyklonaler Antikörper, gerichtet gegen ein Proteinfragment bestehend aus der EGF Domäne und der VWA 2 Domäne von Zebrafisch Matn-1, in Kaninchen und in Meerschweinchen hergestellt. Die Herstellung von Antiseren erfolgte durch Immunisierung von einem Meerschweinchen und einem Kaninchen durch Injektion mit rekombinantem Protein (EGF und die vWA 2 enthaltende Domäne von Zebrafisch Matrilin-1, siehe 2.4.2) und wurde im Auftrag (Pineda Antikörper Service) durchgeführt. Die Präimmunsere, die Seren 60 Tage nach Immunisierung und die Seren der ausgebluteten Tiere wurden mittels „Western blot“ (siehe ) untersucht. Für die Affinitätsreinigung des Antiserums wurde das zur Immunisierung eingesetzte rekombinant hergestellte Antigen unter Verwendung von CNBr-aktivierter Sepharose (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers kovalent an die Säulenmatrix gekoppelt. Die Seren der ausgebluteten Tiere wurden nach folgendem Protokoll aufgereinigt: Das Serum wurde durch Zentrifugation (60 Minuten, 21000 x g, 4°C) von Schwebstoffen befreit und 1:10 mit 10mM Tris HCl pH 7,5 verdünnt. Das verdünnte Serum wurde drei Tage in einem Kreislauf über mit anderen rekombinant exprimierten VWA Domänen anderer Zebrafisch-Matrilin gekoppelten Säulen geleitet (siehe ), um Kreuzreaktivitäten zu diesen zu verringern (Depletion). Das Serum wurde anschließend über Nacht über eine mit rekombinantem Protein gekoppelte Affinitätssäule geleitet. Die mit Antikörpern beladene Säule wurde daraufhin mit 5 Säulenvolumen 10mM Tris HCl pH 7,5 gewaschen. Die Antikörper wurden in 1ml-Schritten mit 0,1M Glycin pH 2,5 eluiert und durch sofortige Zugabe von 15µl 3M Tris HCl pH 8,8 und 20µl 5M NaCl neutralisiert. Der Antikörper-Titer wurde mittels ELISA ermittelt (siehe ). Die Säule wurde sofort nach erfolgter Elution mit alternierenden Waschschriften mit 0,1 M Tris HCl pH 8,0/ 0,5M NaCl und 0,1M NaAc pH 4,0/ 0,5M NaCl regeneriert.

#### **2.4.4. Antikörpertiterbestimmung mittels ELISA**

Mithilfe eines ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) können Antikörpertiter bestimmt werden. Dazu wird das Antigen an der Plastikoberfläche des Reaktionsgefäßes immobilisiert, der Antikörper in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben und die gebundenen Antikörper mit Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern und einer anschließenden Farbreaktion photometrisch nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die rekombinant exprimierte EGF und vWA 2 enthaltende Domäne von Zebrafisch Matrilin-1 in einer Konzentration von 500ng/50µl TBS über Nacht bei Raumtemperatur auf einer Maxisorb ELISA Plate immobilisiert. Die verbliebenen Proteinbindungsstellen wurden für 120 Minuten mit 5% (w/v) Milchpulver in TBT geblockt. Der affinitätsgereinigte Primärantikörper wurde in verschiedenen Verdünnungen für 60 Minuten in 5% (w/v) Milchpulver in TBT appliziert. Nach 4 x 5 Minuten Waschen mit TBT wurden die Primärantikörper mit einem spezifischen Meerrettichperoxidase-gekoppelten Zweitantikörper gerichtet gegen die konstante Domäne des Primärantikörpers in einer vom Hersteller angegebenen Verdünnung in 5% (w/v) Milchpulver in TBT für 60 Minuten inkubiert. Nach 4 x 5 Minuten Waschen mit TBT und 2x 5 Minuten Waschen mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> wurde die Farbreaktion mit 50µl pro Reaktion TMB-Färbelösung (1ml 1M NaAc pH 6,0, 62,5µl 42mM TMB, 15µl 3,5% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 10ml H<sub>2</sub>O) unter Sichtkontrolle durchgeführt. Die Farbreaktion wurde mit 50µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro Reaktion gestoppt, bei der ein Farbumschlag von gelb nach blau stattfindet. Die Proben wurden photometrisch in einem ELISA-Reader bei 450nm gemessen.

## **2.5. Allgemeine Zellkulturmethoden**

### **2.5.1. Herstellung kompetenter *E. coli***

Bei der Herstellung chemisch transformationskompetenter Bakterienzellen wird deren Membran permeabilisiert und so die Aufnahme von DNA (z.B. Plasmiden) ermöglicht. Zellen des Stammes DH5α oder XL1-Blue wurden in LB-Medium (20g Lennox L Broth Base, ad. 1l H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) bei 37°C kultiviert, bis die Lösung bei 600nm eine optische Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,5 erreicht. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation (15 Minuten, 1000 x g) bei 4°C pelletiert, in 33 ml Puffer RF I (100mM RbCl, 50mM MnCl<sub>2</sub>, 30mM KAc, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 15% (v/v) Glycerin, mit Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt) resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Pelletierung (15 Minuten, 1000 x g, 4°C) wurden die Bakterien in 8ml Puffer RF II (10mM MOPS, 10mM RbCl, 75mM CaCl<sub>2</sub>, 15% (v/v) Glycerin, mit

Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt) resuspendiert und nach einer weiteren Inkubation für 15 Minuten auf Eis in Aliquots à 50µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bis zur Benutzung bei -80°C aufbewahrt.

### **2.5.2. Transformation von Plasmiden in chemisch kompetente Bakterien**

Die chemisch kompetenten Zellen wurden vor der Transformation 5 Minuten auf Eis aufgetaut. 2-10 µl (5 - 40ng) des zu transformierenden Plasmids wurden zu 50 µl Bakterienlösung gegeben und gemischt. Der Versuchsansatz wurde für weitere 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 60 Sekunden auf 42°C erhitzt. Nach diesem Hitzeschock wurde die Bakterienlösung für weitere 2 Minuten auf Eis gekühlt. 350µl LB-Medium (siehe ) wurden hinzugegeben (Endvolumen ~400µl) und der Transformationsansatz für 60 Minuten bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Abschließend wurden 100µl und 300 µl des Transformationsansatzes auf LB-Ampicillin-Agarplatten (20g Lennox L Broth Base, 15g Agar-Agar, 200mg Ampicillin (nach Autoklavieren zugeben, kühl lagern), ad. 1l H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, flüssig in Plastik-Petrischalen gießen) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle für die verwendeten Lösungen wurde ein Ansatz mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> transformiert.

### **2.5.3. Kultivierung transformierter Bakterienkulturen**

Ampicillinresistente Bakterien wurden zur Amplifikation des Plasmids vorsichtig durch Verwendung autoklavierter Pipettenspitzen in 2ml - 1,5l LB-Amp-Medium (20g Lennox L Broth Base, 200mg Ampicillin (frisch zugeben), ad. 1l H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) (animpfen) übertragen und über Nacht in einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Die Plasmide wurden daraufhin aus den Bakterien extrahiert (siehe ).

### **2.5.4. Zellkultur von HEK-293-EBNA Zellen**

HEK (human embryonic kidney)-293-EBNA Zellen enthalten das für das „nuclear-antigen“ kodierende Gen des Epstein-Barr Virus (EBNA-1), welches die Replikation und damit die transiente Erhaltung von eingebrachten extrachromosomalen DNA-Konstrukten durch den Replikationsursprung oriP ermöglicht (Meissner u. a., 2001). Transfizierte HEK-293-EBNA Zellen wurden in DMEM F-12 Zellkulturmedium mit 10% (v/v) FBS 1% (v/v) L-Glutamin und 5mg/ml Puromycin (Selektions-Vollmedium) bei 37°C und 5% (v/v) CO<sub>2</sub> in

10ml Plastik-Zellkulturschalen gehalten. Alle 5 Tage (bei 80-90% Konfluenz) wurde das Zellkulturmedium entfernt, durch 2ml 0,05% (v/v) Trypsin/EDTA enthaltendes Medium ersetzt und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert, um die adherenten Zellen von der Oberfläche der Kulturschale zu lösen. Die erhaltene Zellsuspension wurde in 8ml frischem Selektions-Vollmedium aufgenommen, zentrifugiert (5 Minuten, 1000 x g) und der Trypsin enthaltende Überstand verworfen. Das Zell-Pellet wurde vorsichtig in 10ml frischem Selektions-Vollmedium resuspendiert. Auf 10ml aufgefüllte 1:5 Verdünnungen der Zellen wurden in frische Plastik-Zellkulturschalen überführt und bei 37°C inkubiert.

### **2.5.5. Transfektion und Selektion von HEK-293-EBNA Zellen**

EGF und vWA 2 Domäne von Zebrafisch Matrilin 1 wurden rekombinant in der humanen Zelllinie HEK-293-EBNA hergestellt, um die korrekte Faltung und Prozessierung zu gewährleisten. Die zur Selektion und Expression in eukariotischen Zellen benötigten Vektoren basierend auf den pCEP-Pu-Vektor wurden mittels Klonierung erstellt (siehe ) und nach folgendem Protokoll in HEK-293-EBNA Zellen transfiziert: Zur Vorbereitung wurden die untransfizierten Zellen in serum- und puromycinfreiem Medium resuspendiert, in 6-Loch Zellkulturplatten überführt (siehe ) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden wurde nach Angaben des Herstellers eine Mischung aus 97µl serum- und puromycinfreiem Medium, 3µl Fugene-6 Transfektionsreagenz und 1µg Vektor zugegeben und für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die transfizierten Zellen wurden in Vollmedium inkubiert und über die in den Vektoren enthaltene Puromycin-Resistenzkassette selektiert (siehe ).

## **2.6. Histologische Methoden**

Die Verdünnungen der Antikörper bei immunhistologischen Methoden können Tabelle 2.1 entnommen werden.

### **2.6.1. Paraformaldehydfixierung von Geweben**

Zur Fixierung von Geweben wurde Paraformaldehyd (PFA) verwendet, ein Agens, welches Proteine quervernetzt und damit zum Zeitpunkt der Fixierung „einfriert“. In der vorliegenden Arbeit wurden bis zu 2 Wochen alte Zebrafische in 4% (w/v) PFA gelöst in PBS entweder für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C fixiert. Ältere Fische

wurden für drei Tage in 4% (w/v) PFA gelöst in PBS fixiert. Zur Lagerung der fixierten Proben wurde die PFA-Lösung entfernt und die Gewebeproben mit 50% (v/v) Methanol/PBS gewaschen (2 x 5 Minuten). Die Proben wurden daraufhin in 100% Methanol überführt und bei -20°C gelagert.

### **2.6.2. Glutaraldehydfixierung von Geweben zur Vorbereitung für die Transmissionselektronenmikroskopie**

Die grundlegende Vorgehensweise bei der EM-Fixierung beinhaltet eine Glutaraldehydfixierung der Gewebeproteine und eine anschließende Stabilisierung der Membranen mit Osmiumtetroxid. Von den daraufhin in Kunstharz eingebetteten Proben wurden mit einem Mikrotom Ultradünnschnittserien erstellt, welche abschließend mit Schwermetallsalzen (Uranylacetat oder Bleicitrat) kontrastiert wurden. Die Elektronenmikroskopie wurde in Zusammenarbeit mit dem Labor von Herrn Professor W. F. Neiss (Köln) durchgeführt. Die Fixierung mit 3% (v/v) Glutaraldehyd, 0,1M Cacodylat, 0,5% (w/v) Cetylpyridiniumchlorid frisch angesetzt, erfolgte sofort nach der Tötung der Tiere und wurde über Nacht durchgeführt. Die anschließende Einbettung und Kontrastierung erfolgte durch den Kooperationspartner.

### **2.6.3. Paraffineinbettung von Geweben**

Das fixierte Gewebe wurde zunächst durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert (je 5 Minuten 50% (v/v), 70%, 90%, 96% Ethanol, 2 x 10 Minuten Isopropanol) und in Xylol überführt (2 x 10 Minuten). Um das Eindringen des Paraffins ins Gewebe zu erleichtern, wurde es für 30 Minuten bei 60°C mit 50% (v/v) Paraffin 3 in Xylol überschichtet. Anschließend wurden die Proben für 120 Minuten in Paraffin 6 ohne Xylol bei 60°C inkubiert. Nach einer letzten Inkubation für 60 Minuten bei 60°C in Paraffin 9 wurden die Proben unter Sichtkontrolle in Paraffinblöcke gegossen und bei 4°C gelagert, bis mit einem Mikrotom (Mikrom) Gewebeschnitte angefertigt werden konnten.

### **2.6.4. Hämatoxylin-Eosin Färbung auf Paraffinschnitten**

Die Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbemethode umfasst zwei verschiedene Einzelfärbungen, die Hämalaun-Färbung, welche basophile Strukturen (insbesondere Zellkerne und

endoplasmatisches Retikulum) blau anfärbt, und die Eosin-Färbung, welche eosinophile Strukturen (wie Zellplasma- und Extrazellulärproteine) rot färbt. Die Feinschnitte (siehe ) wurden dazu zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (2 x 5 Minuten Rotihistol, 2 x 5 Minuten Isopropanol, je 3 Minuten 96% (v/v), 90%, 70%, 50% Ethanol und 5 Minuten Wasser). Die Schnitte wurden für 3 Minuten in Hämatoxylin-Färbelösung (1g Hämatoxylin, 200mg NaJO<sub>3</sub>, 50g Kalialaun, 50g Chloralhydrat, 1g Essigsäure ad. 1l H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) gefärbt und anschließend nach kurzem Spülen in Leitungswasser in HCl-Alkohol (0,18% (v/v) HCl in 70% (v/v) Ethanol) getaucht. Die Färbung wurde für 5-10 Minuten unter fließendem Leitungswasser entwickelt. Anschließend wurden die Feinschnitte 3 Minuten in Eosin-Färbelösung (1% (w/v) Eosin gelöst in Ethanol) getaucht und kurz mit Wasser abgespült. Die Schnitte wurden mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (je 3 Minuten 70% (v/v), 80%, 96% Ethanol, 2 x 10 Minuten Isopropanol, 2 x 10 Minuten Xylol) und mit „DPX mounting medium“ (Sigma) eingedeckelt. Die so behandelten Schnitte wurden mit einem Axiophot-Mikroskop analysiert.

### **2.6.5. Immunhistologische Färbungen auf Paraffinschnitten**

Der spezifische Nachweis von Proteinen in Geweben auf Feinschnitten wurde mittels immunhistologischer Färbung erbracht. Durch die Verwendung von markierten Sekundärantikörpern konnte dabei das mit einem Primärantikörper markierte Zielprotein sichtbar gemacht werden. Das allgemeine Rehydrierungsprotokoll (siehe ) diente auch hier als Grundlage weiterer Arbeiten. Die rehydrierten Feinschnitte wurden zunächst mit Hyaluronidase (500U/ml in 0,1M NAH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1M NaAc, pH 5,0) demaskiert und anschließend unspezifische Proteinbindestellen für 60 Minuten mit 1% (v/v) Ziegen Serum in PBS (Blockingpuffer) abgesättigt. Die Feinschnitte wurden für weitere 60 Minuten mit den Primärantikörpern in entsprechender Verdünnung in Blockingpuffer inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch Waschen entfernt (2 x 5 Minuten PBT, 5 Minuten PBS). Die Feinschnitte wurden mit den entsprechenden Sekundärantikörpern in angegebener Verdünnung in Blockingpuffer für 60 Minuten inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch Waschen entfernt (2 x 5 Minuten PBT, 5 Minuten PBS). Bei Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Präparate mit „fluorescent mounting medium“ (Dako) eingedeckelt und bis zur mikroskopischen Analyse kühl und dunkel gelagert. Schnitte, die mit alkalischer Phosphatase konjugierten Sekundärantikörper inkubiert wurden, wurden

mit dem „SIGMAFAST Fast Red Kit“ (Sigma) nach Angaben des Herstellers unter Sichtkontrolle gefärbt und abschließend mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt.

#### 2.6.6. „Whole mount“ Alcianblau/Alizarinrot Färbungen

Bei „Whole mount“-Färbungen werden ganze Organe oder ganze Organismen angefärbt. Alcianblau (AB) wird verwendet, um Mucine und Glycosaminoglykane anzufärben und ist daher geeignet, um Mucosa und Knorpel darzustellen. Alizarinrot (AR) färbt spezifisch kalzifizierte Gewebe und dient der Darstellung von Knochen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Protokoll von Walter und Kimmel, 2007 (Walker, Kimmel, 2007) unverändert angewandt. Auf Methanol gelagerte, fixierte Fischlarven (siehe ) wurden zunächst je 5 Minuten mit 50% (v/v) Methanol in Ethanol, 96% Ethanol und 50% (v/v) Ethanol gewaschen. Die Färbung erfolgte durch Inkubation für zwei Tage mit AB/AR-Färbelösung (0,02% (w/v) Alcianblau, 0,5% (w/v) Alizarinrot, 200mM MgCl<sub>2</sub>, 70% (v/v) Ethanol in Wasser) bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Die Entfernung der Hautpigmentierung erfolgte unter Sichtkontrolle bis zu deren vollständigem Verschwinden durch Verwendung einer Bleichlösung (1,5% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1% (v/v) KOH). Die Larven wurden anschließend kurz in Leitungswasser gewaschen. Die milchige Hintergrundfärbung von fixiertem Gewebe wurde durch Inkubation der Larven für mindestens zwei Tage in 20% (v/v) Glycerol/0,25% (v/v) KOH bei 4°C entfernt („clearing“).

#### 2.6.7. „Whole mount“ Immunfluoreszenzfärbungen

Analog zu den „Whole mount“ Alcianblau/Alizarinrot Färbungen (siehe ) wurde der spezifische Nachweis von Proteinen durch immunhistologische Färbungen erbracht. Auf Methanol gelagerte, fixierte Fischlarven (siehe ) wurden rehydriert (je 5 Minuten mit 50% (v/v) Methanol in Ethanol, 96% Ethanol, 50% (v/v) Ethanol und 4 x PBS). Unspezifische Antikörperbindungsstellen wurden durch Inkubation in 1% (v/v) Ziegenerum in PBS (Blockingpuffer) abgesättigt. Die Proben wurden mit dem spezifisch gegen das gesuchte Antigen gerichteten Antikörper, in Blockingpuffer verdünnt, inkubiert. Nach 60 Minuten wurden überschüssige Antikörper abgewaschen (2 x 5 Minuten PBT, 5 Minuten PBS) und ein gegen den Primäantikörper gerichteter Sekundäantikörper, mit Blockingpuffer verdünnt, hinzugegeben. Nach anschließenden Waschen (2 x 5 Minuten PBT, 5 Minuten PBS) wurden

die Proben zum „clearen“ in 20 % (v/v) Glycerin/PBS aufgenommen und für zwei Tage bei 4°C inkubiert (siehe ). Die Analyse erfolgte mit einem Axiophot-Fluoreszenzmikroskop.

#### 2.6.8. „Whole mount“ *in situ* Färbungen

Zur Untersuchung der räumlichen Expression (*in situ*, am Ursprungsort) von mRNA wurde die Methode der „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung verwendet. Bei dieser Methode werden komplementäre Nukleotidsequenzen, sogenannte „*in situ* RNA-Sonden“, mit Digoxigenin (DIG) markiert und nach der Hybridisierung mit DIG-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Das Protokoll „High-resolution *in situ* hybridization to whole-mount zebrafish embryos“ (Thisse, Thisse, 2008) wurde ohne Änderungen übernommen. Die fixierten und in Methanol gelagerten Zebrafischembryonen wurden manuell dechorioniert. Anschließend wurden die Proben rehydriert (5 Minuten 75 % (v/v), 50 % (v/v) und 25 % (v/v) Methanol in PBS). Die Embryonen wurden 4 Mal für je 5 Minuten mit PBT gewaschen und entsprechend dem Entwicklungsstand mit 10µg/ml Proteinase K (Sigma) für 30 Sekunden bis 30 Minuten permeabilisiert. Die Permeabilisierung wurde durch 20 Minuten Inkubation in 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS gestoppt. Reste der Paraformaldehydlösung wurden durch 5 Minuten Waschen mit PBT entfernt. Die Embryonen wurden für 5 Stunden mit 700µl Hybridisierungspuffer (50 % (v/v) Formamid, 5 x SSC, 0,1 % (v/v) Tween 20, 50µg/ml Heparin, 500µg/ml Weizenkeim-tRNA, pH 6,0) bei 70°C inkubiert („Prähybridisierung“). Der Hybridisierungspuffer wurde entfernt und durch 50ng DIG-RNA Antisensesonde (siehe ) in 200 µl Hybridisierungspuffer ersetzt und die Proben über Nacht bei 70°C inkubiert. Überschüssige Sonde wurde durch Waschen (10 Minuten 100 % (v/v), 75 % (v/v), 50 % (v/v), 25 % (v/v), 0 % (v/v), Hybridisierungspuffer (ohne tRNA und Heparin) in 2 x SSC , 2 x 30 Minuten 0,2 x SSC bei 70°C, 10 Minuten 75 % (v/v), 50 % (v/v), 25 % (v/v), 0 % (v/v) 0,2 x SSC in PBT) entfernt. Unspezifische Antikörperbindungsstellen wurden durch 4 Stunden Inkubation mit Blockingpuffer (2 % (v/v) Schafsserum, 2mg/ml Rinderserumalbumin in PBT) geblockt. Die Embryonen wurden über Nacht bei 4°C mit einer 1:10000 Verdünnung eines mit alkalischer Phosphatase gekoppelten DIG-Antikörpers inkubiert und daraufhin gewaschen (6 x 15 Minuten PBT, 3 x 5 Minuten alkalischer Tris-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 9,0, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20)). Die Embryonen wurden unter Sichtkontrolle mit Färbelösung (225 µl einer 50 µg/ml NBT und 175 µl einer 50 mg/ml BCIP Stammlösung, gelöst in alkalischem Tris-Puffer (siehe oben)) gefärbt. Die Färbereaktion wurde durch drei Mal 10 Minuten Waschen mit Stopplösung (1 mM EDTA, 0,1 % (v/v) Tween

20 in PBS) angehalten. Anschließend wurden die Proben für zwei Tage bei 4°C in 20 % (v/v) Glycerol gelagert, um sie von fixierungsbedingter Hintergrundfärbung zu befreien („clearen“) (siehe ).

### **2.6.9. TUNEL-Färbungen**

Die sogenannte TUNEL-Färbung (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) ist eine Methode, bei der freie 3'-OH DNA-Enden enzymatisch mit fluoreszierenden Nukleotiden markiert werden. Freie 3'-DNA-Enden entstehen bei Zellzerfallsprozessen, bei denen fragmentierte DNA auftritt, wie z.B. Apoptose und Nekrose. Die Färbung wurde mit dem Kit „DeadEnd fluorometric TUNEL system“ (Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proben (auf Methanol gelagerte Embryonen, siehe oder rehydrierte Serienschnitte, siehe ) wurden für 10 Minuten in 100 µl Äquilibrationspuffer inkubiert. Die Proben wurden daraufhin in Färbelösung (45 µl Äquilibrationspuffer, 5 µl fluoreszenzmarkierte dNTPs, 1 µl rTDT Enzym) überführt und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Waschen (2 x 5 Minuten 2 x SSC) gestoppt. Die Proben wurden entweder in 20 % Glycerol überführt (Larven) oder mit „fluorescent mounting medium“ (Dako) eingedeckelt (Serienschnitte).

## **2.7. Experimentelle Fischhaltung**

### **2.7.1. Fischzucht und Fischhaltung**

Die Aufgabe der Fischhaltung bestand hauptsächlich darin, genügend Fischeier für die damit verbundenen Experimente zur Verfügung zu stellen. Wildtyp Zebrafische des Stammes Cologne (CO) wurden wie beschrieben gehalten (Nusslein-Volhard, Dahm, 2002), allerdings mit dem Unterschied, dass die Fütterung 4 Mal am Tag erfolgte und die Haltungstemperatur bei 28°C lag. Die Fische wurden, in Einzelpaaren und physikalisch getrennt, alle 10 Tage in zwei parallelen Reihen am Vorabend des Experiments zusammengesetzt. Am darauffolgenden Morgen wurde die Trennung aufgehoben und die Gelege wurden 20 Minuten nach Entfernen der Trennscheibe gesammelt, um eine genaue Einteilung in Entwicklungsstadien zu ermöglichen. Die Embryonen wurden, unabhängig von der Art der experimentellen Behandlung, in Standardembryonenpuffer (10<sup>-5</sup> % (w/v) Methylblau, 5mM

NaCl, 0,17mM KCl, 0,33mM CaCl<sub>2</sub>, 0,33mM MgSO<sub>4</sub>) bei 28°C in einem Inkubator gehalten. Wenn notwendig, wurden die Fischlarven nach 7 Tagen in die Fischzucht überführt.

Erwachsene Fische (drei Monate und älter) und Zebrafischlarven wurden vor dem Töten durch Inkubation in 40 µg/ml Tricain (Sigma) betäubt. Die Tötung erfolgte bei Erwachsenen durch Entfernung des Kopfes mit einem Skalpell, bei Larven durch Einstellen der Betäubungslösung auf 4 % Paraformaldehyd oder durch Schockfrieren in flüssigem Stickstoff.

### **2.7.2. Morpholinoinjektionen**

Morpholinooligonukleotide (kurz: Morpholinos) sind synthetische Oligonukleotidanaloga, in denen die Ribose durch einen Morpholinring und das Phosphat durch ein Phosphoramidat ersetzt sind. Diese Modifikation macht das Molekül extrem widerstandsfähig gegenüber enzymatischem Abbau. Die Morpholinos werden so entworfen, dass sie entweder mit bestimmten Bereichen der prä-mRNA hybridisieren und damit das korrekte Spleißen der mRNA oder mit der reifen mRNA hybridisieren und die Translation des Proteins verhindern. Eine modifizierte Form der Antisenseknockdownmethode (Summerton, Weller, 1997; Summerton, 2007) wurde verwendet, um spezifisch die Expression der Zielgene (UCMAA, Matn-1) zu unterbinden. Die Injektionen wurden quantitativ unter Verwendung einer InjectMan NP2/Femtojet Anlage vorgenommen. Die Kalibrierung wurde für jede neue Injektionskanüle einzeln vorgenommen, indem Injektionsdruck und Injektionszeit angepasst wurden, bis das Zielvolumen von 5nl Injektionslösung pro Injektion erreicht wurde. Da das Injektionsvolumen immer konstant war, wurde die Morpholinokonzentration nach Bedarf variiert (2,5ng-20ng Morpholino und 0,1% (w/v) Phenolrot je Embryo).

### **2.7.3. Toxikologische Untersuchungen**

Die Konsequenzen eines blockierten Proteasomsystems auf die Entwicklung von „knockdown“ und Wildtyp Zebrafischlarven wurden analysiert, indem die Eier nach der Injektion in 10 µM Bortezomib (Millenium Pharmaceuticals), gelöst in Standardembryonenpuffer (siehe ), überführt und für die angegebene Zeit bei 28°C inkubiert wurden. Die Larven wurden anschließend lichtmikroskopisch untersucht.

Es wird vermutet, dass die  $\gamma$ -Carboxylierung von Glutamat in UcmA eine wichtige Rolle in dessen Funktion spielt (Viegas u. a., 2008). Um das Fehlen der  $\gamma$ -Carboxylierung zu

untersuchen, wurden Zebrafischembryonen zu den angegebenen Zeitpunkten in 16 mg/ml bzw. 21 mg/ml Natriumwarfarin (Sigma), gelöst in Standardembryonenpuffer, überführt und für die angegebenen Zeiten darin inkubiert. Die Embryonen wurden lichtmikroskopisch und als „Whole mount“ mittels Alcianblau- und Alizarinrotfärbungen untersucht.

Als Positivkontrolle für die Untersuchung verschiedener Zellstressfaktoren wurden Proteinextrakte (siehe ) von Embryonen verwendet, die 12 Stunden vor Tötung mit 500 nM des Topoisomerasehemmers Camptothecin, gelöst in Standardembryonenpuffer, behandelt wurden. Die Embryonen wurden dann zu den angegebenen Zeitpunkten in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

## 2.8.Reagenzien und Materialien

### 2.8.1. Stammlösungen

Alle Stammlösungen wurden vor dem Benutzen autoklaviert.

10 PBS Stammlösung	
1,4M	NaCl
100mM	KCl
80mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
20mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
pH 7,4	
10x TBS Stammlösung	
1,5M	NaCl
500mM	Tris HCl
pH 7,4	
50x TAE Stammlösung	
240g	Tris-Base
57,1ml	Eisessig
50ml	1M EDTA
ad. 1000ml	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
20x SSC Stammlösung	
3M	NaCl
0,3M	Na-Citrat
pH 7,0	

### 2.8.2. Antikörper

Antikörper	Verd. WB	Verd. IHC	
Alexa488 $\alpha$ r (Kaninchen)	-	1:2000	Invitrogen
Alexa546 $\alpha$ r	-	1:2000	Invitrogen
Alexa488 $\alpha$ gp (Meerschw.)	-	1:2000	Invitrogen
Alexa546 $\alpha$ gp	-	1:2000	Invitrogen
$\alpha$ DIG AP	1:5000	1:10000	Roche
Biotin-IgG $\alpha$ r	-	1:1000	Jackson Immunoresearch
d (Esel) $\alpha$ gp HRP	1:3000	-	Jackson Immunoresearch
IRDye 700 DX $\alpha$ r	1:5000	-	Rockland
IRDye 800 CW $\alpha$ gp	1:5000	-	Rockland
<b>gp</b> $\alpha$ z (Zebrafish) Matn1A2	1:3000	1:2000	Pineda Antikörper Service
<b>r</b> $\alpha$ col2	-	1:200	Polysciences Inc.
<b>r</b> $\alpha$ LC3 NB100	1:200	-	Novus Biologiclas
<b>r</b> $\alpha$ Active Caspase-3	1:200	-	BD Biosciences
<b>r</b> $\alpha$ gp HRP	1:3000	-	Sigma
<b>r</b> $\alpha$ p53 (CT)	1:200	-	AnaSpec
<b>r</b> $\alpha$ z Matn1A1	1:600	1:200	Diss. Ko et. al., 2005
<b>r</b> $\alpha$ z Matn1A2	1:3000	1:2000	Pineda Antikörper Service
<b>r</b> $\alpha$ z Matn3A	1:1000	1:100	Diss. Ko et. al., 2005
<b>r</b> $\alpha$ z Matn3B	1:400	1:800	Diss. Ko et. al., 2005
<b>r</b> $\alpha$ z Matn4A1	1:400	1:800	Diss. Ko et. al., 2005
<b>s</b> (Schwein) $\alpha$ r HRP*	1:3000	-	Dako Cytomation

**Tabelle 2.1:** Antikörper mit den jeweils verwendeten Verdünnungen in „Western blots“ (WB) und immunhistochemischen Färbungen (IHC). In Fettschrift dargestellte Buchstaben kennzeichnen den Spenderorganismus für Primärantikörper.  $\alpha$ : anti, r, Kaninchen, gp, Meerschweinchen

### 2.8.3. Chemikalien und Enzyme

Der Großteil der organischen und anorganischen Salze wurde, sofern nicht im Einzelfall unten anderweitig vermerkt, von der Firma Merck bezogen.

1kB-Marker	New England Biolabs
2-(4'-Hydroxyazobenzol)-Benzoessäure (HABA)	Sigma
5-Bromo-4-Chloro-3'-Indoxylphosphat (BCIP)	Roche
Agar-Agar	Merck
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Ampicillin	Sigma
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs
Blocking Reagenz für RNA Dot-Blots	Roche
Blocking Buffer for Odyssey Western Blotting	Rockland
Bortezomib	Millenium Pharmaceuticals
Broad Range Protein Marker (2-212kDa)	New England Biolabs
Bromphenolblau	Serva
Camptothecin	Calbiochem
Carbenicillin	Sigma
Chloroform	Merck

CNBr-aktivierte Sepharose	GE healthcare
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva
Dako fluorescent mounting medium	Dako
Dimethylformamid (DMF)	Fluka
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
DMEM F-12 Nährmedium - L Glutamin	Gibco
DNA-Polymease AmpliTaq	Applied Biosystems
DNA-Polymerase Expand High Fidelity	Roche
DNA-Polymerase Pfu Ultra II	Agilent
DPX mounting medium	Sigma
Eisessig	VWR
Ethanol	Alfred Quadflieg
Eosin (Erythrosin Extra Blue)	Fluka
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom AG
Formaldehyd	Merck
FuGENE-6	Roche
Glutaraldehyd	Serva
Glycerin	Fluka
Glycin	Merck
Guanidiniumhydrochlorid	Fluka
Hämatoxylin	Merck
Heparin	Sigma
Hyaluronidase	Sigma
Hybond N Nylonmembran	Amersham
Isopropanol	Merck
Kaisers Glyceringelatine	Merck
Lachssperma-DNA	Invitrogen
Lennox L Broth Base (LB)	Invitrogen
L-Glutamin	Gibco
Natriumacetat (NaAc)	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumdodecylsulfat	Serva
Natriumwarfarin	Sigma
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Roche
N-Ethylmaleimid (NEM)	Fluka
Nonidet P40	Sigma
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas
Paraffin (3, 6, 9)	Richard Allen Scientific
Paraformaldehyd	Fluka
Phenol	Carl Roth
Phenolrot	Sigma
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Phosphorsäure	Fluka
Polyacrylamid (Protogel)	National Diagnostics
Ponceau S	Serva
Proteinase K	Sigma
Protran BA45 Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell
pUC-Mix Marker, 8	Fermentas
Puromycin	Gibco
RNAse H 5000 U/ml	New England Biolabs
Restriktionsendonukleasen und Puffer	New England Biolabs

Rinderserumalbumin (BSA)  
 ROTI PVDF Membran  
 Rotihistol  
 Salzsäure  
 Schwefelsäure  
 Superscript RT II  
 Super RX Röntgenfilm  
 Strep-Tactin®  
 Streptavidinkonjugierte alkalische Phosphatase  
 TaqMan® Gene Expression Master Mix  
 Tatramethylbenzidin (TMB)  
 Tetramethylendiamin (TEMED)  
 Tricain  
 Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)-Base  
 TRIzol Reagenz  
 Trypsin/EDTA fü  
 Tween 20  
 Weizenkeim-tRNA  
 Xylencyanol  
 Xylol

Serva  
 Carl Roth  
 Carl Roth  
 VWR  
 VWR  
 Invitrogen  
 Fuji  
 IBA  
 Jackson Immunoresearch  
 Applied Biosystems  
 Merck  
 Sigma  
 Sigma  
 Sigma  
 Invitrogen  
 Biochrom AG  
 Fluka  
 Sigma  
 Carl Roth  
 Karl-Josef Kost

## 2.8.4. Geräte

### 2.8.4.1. Allgemeine Laborgeräte

BioPhotometer  
 Brutschrank 5050 E  
 CM 3050 Cryotom  
 EPS 3500  
 FemtoJet  
 Glashomogenisator  
 GN 3056 Standard Gefrierschrank  
 HM 355 S Mikrotom  
 IKA Combimag RET Heizplatte  
 InjectMan NI 2  
 Mighty Small II SE250 Gelelektrophoresekammer  
 Mikropipetten  
 Multiskan MS Plate ELISA Reader  
 Nanodrop Spectrophotometer DN-1000  
 Odyssey Near Infrared Imaging System  
 OTS 30-3040 Wärmeplatte  
 Owl B2 Horizontales Gelelektrophorese-System  
 PowerPac Basic Netzteil  
 Rotamax 120 Plattformschüttler  
 Thermocell Cooling & Heating Block  
 Ultra-Low Temperature V.I.P. MDF-U73V  
 Ultraschall Desintegrator 500 W  
 Unitron Inkubationsschüttler  
 UV-Stratalinker 2400  
 UV-Transilluminator  
 Evolution LC Monochrom

Eppendorf  
 Heraeus  
 Leica  
 Pharmacia Biotech  
 Eppendorf  
 B. Braun Melsungen  
 Liebherr  
 Microm  
 JK  
 Eppendorf  
 Hoefer  
 Gilson  
 Labsystems  
 Peqlab Biotechnologie  
 Li-Cor  
 Medite Medizintechnik  
 Thermo Scientific  
 Biorad  
 Heidolph  
 Biozym Scientific  
 Sanyo  
 Novodirect  
 InforsHT  
 Stratagene  
 UVP.Inc  
 Weiss Imaging Solutions

**2.8.4.2. Mikroskope und Binokulare Mikroskope**

Axiophot	Zeiss
Digital Sight DS-2MV	Nikon
Axiolab	Zeiss
Eclipse E 200	Nikon
Nikon TMS	Nikon
SMZ 1500	Nikon
Digital Sight DS-Fi1	Nikon

**2.8.4.3. Plastikwaren**

384-well optical plates	Applied Biosystems
BD Conical Tubes	BD Falcon
BD Pipets	BD Falcon
Maxisorb 96 well ELISA plate	Nunc International
Petrischalen	Greiner Bio One
Zellkulturschalen	BD Falcon
6-Loch Zellkulturplatten	BD Falcon
Pipettenspitzen	Greiner Bio One
Einmalpipetten	VWR
Safeseal Reagiergefäße	Sarstedt

**2.8.4.4. Glaswaren**

Deckgläser	Menzel Gläser
Objektträger	Thermo Electron Corporation
Gefräste Objektträger	VWR
Präparierschalen	VWR

**2.8.4.5. Thermocycler**

TPersonal Thermocycler	Biometra
PTC-200 Thermocycler	MJ Research
7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems

**2.8.4.6. Zellkultur**

Begasungsbrutschrank 6000	Heraeus
HERAsafe KS	Heraeus

**2.8.4.7. Zentrifugen**

Biofuge Primo R	Heraeus
J-21 High Speed Refrigerated Centrifuge	Beckmann
Megafuge 1.0 R	Heraeus
Ultrazentrifuge L7-55	Beckmann
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf

### 2.8.5. Kits

Ambion mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra	Katalognummer 1345
InterChim BC Assay protein quantitation kit	Katalognummer FT-40840
Macherey-Nagel NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid DNA Purification Kit	Katalognummer 740588.50
MoBio UltraClean 15 DNA Purification Kit	Katalognummer 12100-300
Promega DeadEnd <sup>™</sup> fluorometric TUNEL system	Katalognummer G3250
Quiagen Midi Plasmid Purification Kit 100	Katalognummer 12145
RNeasy Mini Kit	Katalognummer 74104
Oligotex Direct mRNA Kit Micro	Katalognummer 72012
Roche DIG RNA labelling Kit (SP6/T7)	Katalognummer 11 175 025 910
Rapid DNA Ligation Kit	Katalognummer 11 365 379 001
Sigma SIGMAFAST <sup>™</sup> Fast Red TR/Naphthol AS-MX Tablets	Katalognummer F4648
TaKaRa 5'-Full Race Core Set	Katalognummer 6122
Thermo Scientific ABsolute Blue QPCR Master Mix	Katalognummer AB-4136A

## 2.8.6. Oligonukleotide

### 2.8.6.1. Morpholino Oligonukleotide

Morpholinobezeichnung	5'-3' Sequenz
Matn-1z ATG antisense I	5'-CGGCAATGTCATACTGTAGCGCGGC-3'
Matn-1z ATG mismatch I	5'-CGG <b>g</b> AAT <b>c</b> TCATAgTGTA <b>Ga</b> G <b>Cc</b> GC-3'
Matn-1z ATG Antisense II	5'-TGAGTCCCAATGACCTGCTCCAAAA-3'
Matn-1z SP antisense	5'-GGATGTGTGAATGTCTTACCCATAG-3'
Matn-1z SP mismatch	5'-GGAT <b>c</b> TGT <b>c</b> AAT <b>c</b> TCTTAC <b>g</b> CA <b>a</b> AG-3'
p53z antisense	5'-GCGCCATTGCTTTGCAAGAATTG-3'
UCMAzA antisense I	5'-AAGAGCAGGTTGAGTCCAGGACATG-3'
UCMAzA mismatch I	5'-AA <b>c</b> AGCAGGTT <b>c</b> AGTCC <b>a</b> G <b>g</b> ATG-3'
UCMAzA antisense II	5'-ATTTAGCGGAGCAGGAGTGAAGAAA-3'
UCMAzA mismatch II	5'-ATTT <b>a</b> CGG <b>Ac</b> C <b>Ac</b> GAGT <b>c</b> AA <b>c</b> AAA-3'
Fl. Std. Control	5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'
ZF Chordin	5'-ATCCACAGCAGCCCCTCCATCATCC-3'

**Tabelle 2.2:** In Fettschrift dargestellte Kleinbuchstaben kennzeichnen Mismatchbasen. ATG translationsblockende Morpholino-Oligonukleotide; SP Spleißstellenblockende Morpholino-Oligoneukleotide

### 2.8.6.2. Oligonukleotidprimer

Primerbezeichnung	5'-3' Sequenz
β-Actin_Ex1_f	5'-CCCTTGACTTTGAGCAGGAG-3'
β-Actin_Ex2_r	5'-ACAGGTCCTTACGGATGTCG-3'
M1z_S_SP_f <sup>#</sup>	5'-GTTTGTGATGCTGCTATGC-3'
M1z_S_A1/1_r <sup>#</sup>	5'-AGAGAGACTTCGTTCTTCAC-3'
M1z_S_A1/2_r <sup>#</sup>	5'-CTTCTTGGTGAGCTTCTCG-3'
M1z_S_EGF_r <sup>#</sup>	5'-ACAGTCATGATCACCAGTC-3'
M1z_S_A2/1_r <sup>#</sup>	5'-CGTCTGTGAAGACAATACC-3'
M1z_S_A2/2_r <sup>#</sup>	5'-CTCATCCTCAACTGCATTG-3'
M1z_S_CC1_r <sup>#</sup>	5'-TGGAATTACATTCACAGGG-3'
M1z_S_CC2_r <sup>#</sup>	5'-AACGATCTTGTTCTCCACG-3'
M1z_N_SP_f <sup>#o</sup>	5'-ATCATGGGAGCTCAAGC-3'
M1z_N_A1/1_r <sup>#o</sup>	5'-TCTGCTGGCGTAGTTCAC-3'
M1z_N_A1/2_r <sup>#o</sup>	5'-TCTACGTGATCCTCCAGG-3'
M1z_N_EGF_r <sup>#o</sup>	5'-CACAACCGGCACAAAAGGC-3'
M1z_A2_NheI_f1*	5'-TACTAGCTAGCGTGTCCGACCTATGCGC-3'
M1z_A2_BamHI_r1*	5'-GCGGATCCTCATCCTCTTGACAAACGTTG-3'
M1z_A2_f2*	5'-CAACAGCAAACGATCCC-3'
M1z_A2_r2*	5'-CGCGGATCCTCATCCCTCTTGACAAACGTTG-3'
M4z_A2_NheI_f1*	5'-CTACTAGCTAGCGATAACTTATGCAACACAGTTG-3'
M4z_A2_BamHI_r1*	5'-CGCGGATCCTCACGCTGCGCAGACGTTG-3'
M1z_mut1_f <sup>s</sup>	5'-GTCGGTATTGTCTTCACAG-3'
M1z_mut1_r <sup>s</sup>	5'-CTGTGAAGACAATACCGAC-3'
M1z_5'RACE_P1_r <sup>s</sup>	5'-(P)CTCTCCATGTAGTCC-3'
M1z_5'RACE_f1	5'-CAGAAACCAACACCCAC-3'

M1z_5'RACE_r1	5'-GATCCATTTCTTCACCAG-3'
M1z_5'RACE_N_f1°	5'-GATCCCTGAAAGAAGCTGTG-3'
M1z_5'RACE_N_r1°	5'-CATCTGTGGCTGCATTACTG-3'
M1z_5'RACE_P2_r <sup>§</sup>	5'-(P)TCCAGTTTGTTCGATG-3'
M1z_5'RACE_P3_r <sup>§</sup>	5'-(P)GCACTTGAAAGATCC-3'
M1z_5'RACE_f2	5'-CCAAGAGTGTGAGACCTG-3'
M1z_5'RACE_r2	5'-CCAAGAGTGTGAGACCTG-3'
M1z_5'RACE_N_f2°	5'-TTGAGCTGGTGAAGAAATGG-3'
M1z_5'RACE_N_r2°	5'-TCTGCAGGCGCACTTG-3'
M1z_zm13_NcoI_f*	5'-AACCATGGCAGTCTGTCTCTGGTTTTGG-3'
M1z_zm111_BamH1_f*	5'-AAGGATCCTGGACAATAGCGATGAAGGCAG-3'
M1z_S1_r <sup>#</sup>	5'-GGAAGTTTATTACAATGCTCG-3'
M1z_S2_f <sup>#</sup>	5'-CCTGGCAGGTAACATGTC-3'
M1z_S3_r <sup>#</sup>	5'-CGATGAGGCTGTAGCTC-3'
M1z_S4_f <sup>#</sup>	5'-CAGGCAGATGGCCAG-3'
M1z_S5_r <sup>#</sup>	5'-GGCCTCCTGGAACCTC-3'
M1z_S6_f <sup>#</sup>	5'-GCCAGCAGAGTGAAGAAC-3'
M1z_S7_f <sup>#</sup>	5'-CACAAAACCAAGGGCTG-3'
M1z_S8_r <sup>#</sup>	5'-GAGCTTCTCGATGAGGC-3'
M1z_S9_f <sup>#</sup>	5'-CAGTACATGCGTTGACAG-3'
M1z_S10_r <sup>#</sup>	5'-CTCGCTGGCCATCTG-3'
M1z_S11_f <sup>#</sup>	5'-GGTAACATGTCATTAGTACAG-3'
M1z_S12_r <sup>#</sup>	5'-GGTGAGCTTCTCGATG-3'
M1z_N1_f°	5'-GTCATTGGGACTCACGCCGC-3'
M1z_N2_r°	5'-CCTGCTCGAACTCAGAGGGC-3'
M4z_N3_f°	5'-GCTGTGGAACCTGTGCGAACC-3'
M1z_N4_r°	5'-TACATGCTGAGCGGGAACCTC-3'
M3Bz_N5_f°	5'-ACTGGCATGGCTATCAAAAC-3'
M3Az_N6_f	5'-GTCCTTCATTGGGAGTTTGG-3'
M3Az_N7_r	5'-CGACCTTTGAGATGTTCTTCG-3'
M3Az_N8_f°	5'-ATTGCCTCTCTGTTCTGCTG-3'
M3Az_N9_r°	5'-CCAGGAAGATCTTGACCTTC-3'
M1z_N10_f°	5'-GTCATTGGGACTCACGC-3'
M1z_N11_r°	5'-CCTGCTCGAACTCAGAG-3'
UCMAa_f	5'-TCAAATTCATTCACTGCTCTC-3'
UCMAa_r	5'-CGTCTTGCTCGTCGTTTTTC-3'
UCMAb_f	5'-TGTGCTTCTGGTACCAGCTC-3'
UCMAb_r	5'-ATAGTACTGGCGGTGGTGAG-3'
UCMAa_FL_f*	5'-CACTCCTGCTCCGCTAAATC-3'
UCMAa_FL_r*	5'-TTACCCGCTGATTTAGATGG-3'
UCMAa_S1_f*	5'-CCATCACCTGTGCACTG-3' <sup>a</sup>
UCMAa_S2_f*	5'-GAGATAAACGAGCAAGACG-3'
UCMAa_S3_f*	5'-CGTCTTGCTCGTTTTATCTC-3'
UCMAa_S1_SN_f*°	5'-CCAGCTTCTTCAAACGG-3'
UCMAb_FL_f*	5'-TGATCTTAATTATGGCCTGG-3'
UCMAb_FL_r*	5'-GTTTATAGTACTGGCGGTGG-3'
UCMAb_S1_f*	5'-GTGCTGATCGGACCATCTAAG-3'
UCMAb_S2_f*	5'-GAATACTATGAACACTATG-3'
UCMAb_S2_r*	5'-GTTGTTTAATAGTACTGG-3'
UCMAb_S3_f*	5'-GTGCTGATCGGACCATCTAAG-3'
UCMAb_S3_r*	5'-CTCTCATACTGTTTCATAGTATTCCTCA-3'

**Tabelle 2.3:** f forward-Primer; r reverse-Primer; \* Klonierungsprimer; ° Nested- und Semಿನested-PCR Primer; # Sequenzierungsprimer, § RACE-Primer; § Mutageneseprimer; BamHI/NheI Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen

### 2.8.6.3. SybrGreen Real Time PCR Oligonukleotidprimer

Primerbezeichnung	5'-3' Sequenz
Col2a1z_f1	5'-TGCTATCGCTTGTAAGATGTC-3'
Col2a1z_r1	5'-TCTGTAATATCGCCTGGTTCTC-3'
Col2a1z_f2	5'-GCTTTACATATGGCGTACTTGAG-3'
Col2a1z_r2	5'-TGTACTCGATCACAGTCTTGG-3'
Decorinz_f1	5'-GCAGACCACAAATACATTCAGG-3'
Decorinz_r1	5'-CCTTCTTTGTATTATAGCCTGGTG-3'
Decorinz_f2	5'-AAGGACCTGAAGTACCTTTCTG-3'
Decorinz_r2	5'-CTCCGTGATCTTGTTGTTCTG-3'
DrHspa5-5P (BIP)	5'-CGAAGAAGCCAGATATCGATGA-3'
DrHspa5-3P (BIP)	5'-ACGGCTCTTTCCGTTGAAG-3'
DrUbiquitin-5P	5'-CGAGAAGGGCCAGGTCAA-3'
DrUbiquitin-3P	5'-GCTGGTCCTTCGGCACTCT-3'
DrXbp1-5P	5'-AAGTCCTCCTGATATCGGGAAAA-3'
DrXbp1-5P	5'-TGAAGAGGCTTGATTCGGTATCAT-3'
M3Az_f1	5'-GATCTCTGCGATTCCTATGAC-3'
M3Az_r1	5'-CTACACTGTGAATCTGTAGCTG-3'
M3Az_f2	5'-CAGTGGCTCCTCCTATTACTG-3'
M3Az_r2	5'-CTGAACAATCTCCACCTTCAC-3'
M3Bz_f1	5'-AAGACATTGAGCATTCAAGGG-3'
M3Bz_r1	5'-CTACTCTGACACCTAGTGGAC-3'
M3Bz_f2	5'-TGATGAAGGTTTCGATATTTCCC-3'
M3Bz_r2	5'-CTACTCTGACACCTAGTGGAC-3'
M4z_f1	5'-CACTCAATGACGACAAGAAGAC-3'
M4z_r1	5'-GAGTATCCTTCATCACAGCGA-3'
M4z_f2	5'-GCTCACAGGATGACATTCAG-3'
M4z_r2	5'-GCTGTAGAAGAAGTGTTTCTCC-3'
UcmaAz_f1	5'-GGAACACTTAGAGGAACAGAG-3'
UcmaAz_r1	5'-GGGTATTGAGGGTATTGACCA-3'
UcmaAz_f2	5'-AAAGACAGGAAAGCTCAAGGA-3'
UcmaAz_r2	5'-TTTGCAGACATCTTTACCCTC-3'
UcmaBz_f1	5'-GGAGTATCACGAGGAACAGAG-3'
UcmaBz_r1	5'-TATATTCGTATGACGGGTCCA-3'
UcmaBz_f2	5'-ACTCAAGATGAGATAAACGCTG-3'
UcmaBz_r2	5'-ATTTATTCCTCTGTTCCCTCGTG-3'
Tbpz_f1	5'-CAAGTTTCCCATCCGATTAGAG-3'
Tbpz_r1	5'-AATAACTCCGGTTCATAGCTG-3'
Tbpz_f2	5'-GAACAACAGCCTACCTCCTTT-3'
Tbpz_r2	5'-CCATACGGCATCATAGGACTG-3'

---

**Tabelle 2.4:** f forward-Primer; r reverse-Primer

#### 2.8.6.4. TaqMan® Real Time PCR Sonden

TaqMan Matn1-Sonde: Dr03092841\_m1  
TaqMan rpl13-Sonde: Dr03119263\_m1

#### 2.8.7. Bakterien- und Zellkulturstämmen

<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$	Invitrogen
<i>E.coli</i> XL1-Blue	Agilent
HEK-293-EBNA	Invitrogen

#### 2.8.8. Zebrafischstämmen

COL Stamm	Eigene Zucht
<i>sox10:egfp</i>	Prof. Hammerschmidt

#### 2.8.9. Vektoren

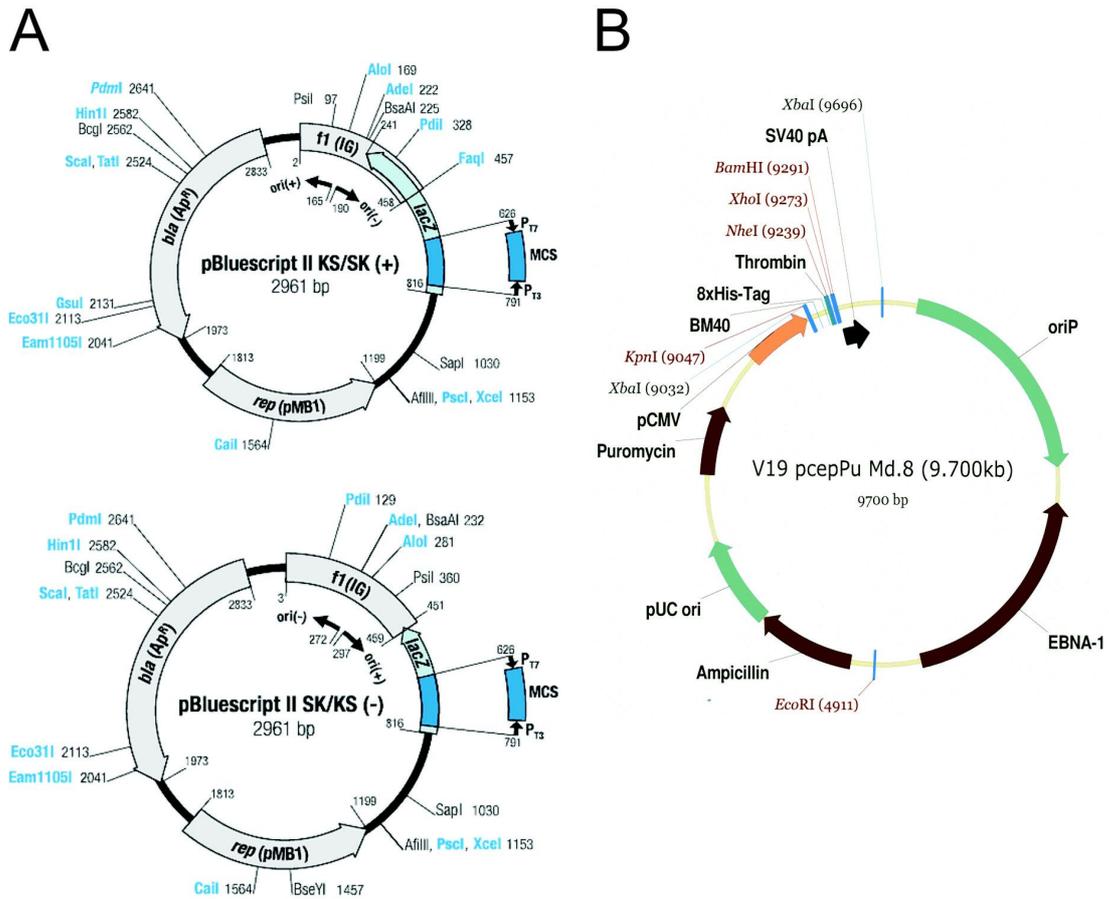
pBluescript II KS (+/-)	GenBank #X52327/#52329 und vgl. Abb. 2.6
V19 pCEP Pu	vgl. Abb. 2.6

### 2.9. Software und Internetbasierende Dienste

Adobe Photoshop CS2	Adobe Systems Incorporated
Adobe Reader 10.0.1	Adobe Systems Incorporated
Chromas Lite 2.01	Technelysium Pty Ltd
Corel Draw X4	Corel Corporation
ImageJ 1.43u	National Institutes of Health
ImageSP 1.1.2.9	TRS & SysProg
IrfanView 4.27	Skiljan Irfan
Microsoft Office 12	Microsoft
OpenOffice 3.3.0	Sun Microsystems/Oracle
VectorNTI 9.0	Invitrogen
OpenAstexViewer 3.0	Astex Therapeutics Ltd.
Cn3D 4.3	NCBI
OligoCalc	<a href="http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html">http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html</a>
SA-Design Tool	<a href="http://www.sigmaldrich.com/configurator/servlet/DesignCenter">http://www.sigmaldrich.com/configurator/servlet/DesignCenter</a>

#### 2.10. Externe Unternehmen

Pineda Antikörper Service	Schkopauer Ring 5, 12681 Berlin
Servicelabor des Zentrums für molekulare Medizin	Robert-Koch-Str. 21, 50931 Köln



**Abb. 2.6: Vektorkarten**

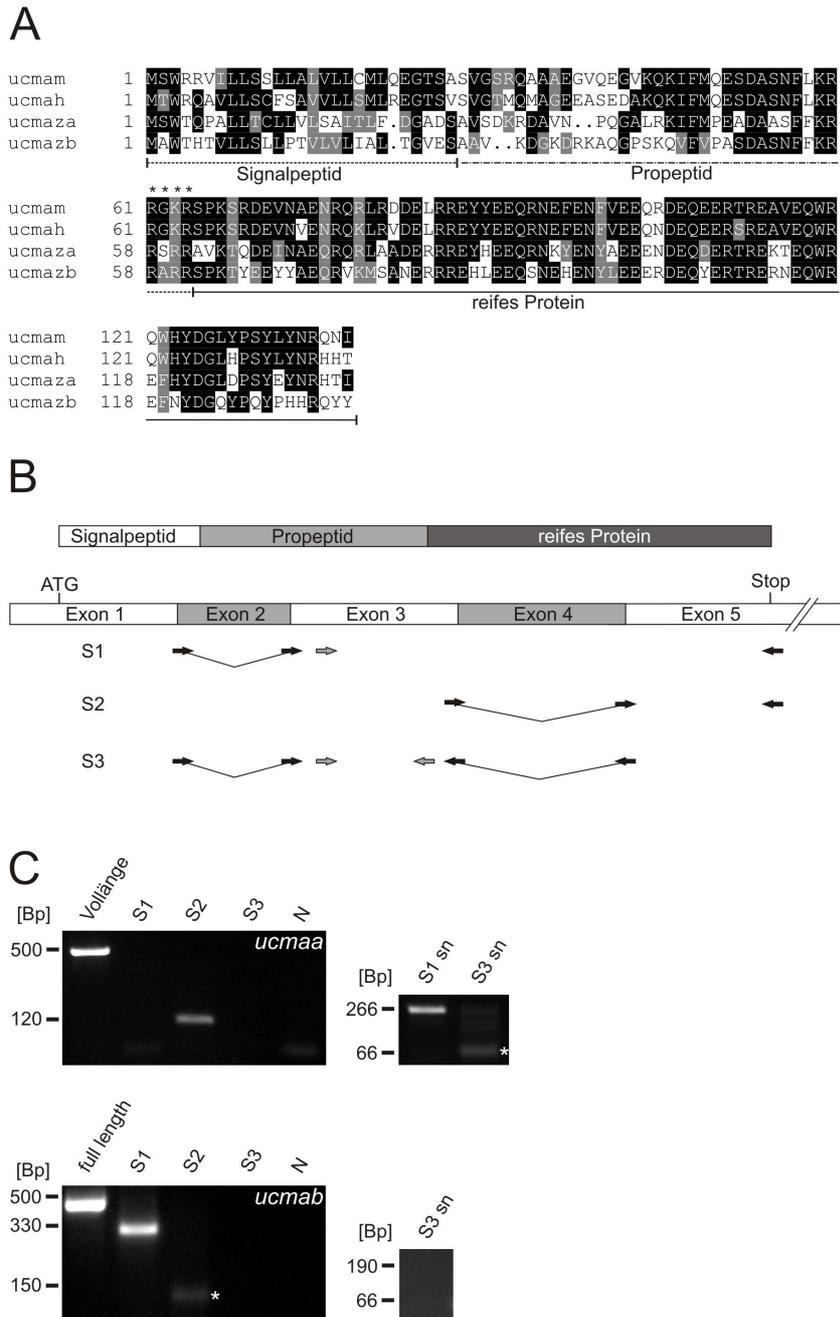
pBluescript II KS (+/-) Klonierungsvektor (A) und V19 Expressionsvektor, freundlichst zur Verfügung gestellt von Prof. Manuel Koch, Köln (basierend auf dem pCEP-PU Vector) (B).  
 Abbildung (A) entnommen aus <http://www.fermentas.com/en/support/technical-reference/phage-plasmid-dna/pbluescriptII>,  
 Abbildung (B) verwendet mit freundlicher Genehmigung von Claudia Bernards, Köln

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Funktionelle Analyse von *Ucma/Grp* im Zebrafisch

#### 3.1.1. Klonierung und bioinformatische Analyse der verschiedenen *ucma* Spleißvarianten im Zebrafisch

Erst vor kurzer Zeit wurde von der Existenz zweier *Ucma/GRP* Formen im Zebrafisch berichtet, die als *Grp1* und *Grp2* bezeichnet werden (Viegas u. a., 2008). In Übereinstimmung mit der etablierten Nomenklatur für duplizierte Gene im Zebrafisch, welche üblicherweise mit „a“ und „b“ gekennzeichnet werden, wurden die Gene in dieser Arbeit in *ucmaa* und *ucmab* umbenannt. Die Vollängen cDNA Sequenz beider Gene (*ucmaa/grp1* (zgc:85838; NM\_212934; BC067652.1) und *ucmab/grp2* (NM\_001089481; BC133944.1)) war bereits in den Nukleinsäuredatenbanken veröffentlicht. Beide cDNAs besitzen ein offenes Leseraster von 405 Basenpaaren, das für ein 135 Aminosäurereste langes Protein kodiert und eine Sequenzähnlichkeit zur Maus von 61,1% aufweist. Die Domänenstruktur zwischen Maus- und Zebrafischprotein ist vollständig konserviert (Abb. 3.1 A). Die Ähnlichkeit der Maus- und Zebrafischproteine auf Aminosäureebene beträgt 63,7% bzw. 57,9%. Die Proteine bestehen aus einem Signalpeptid mit einer Länge von 26 Aminosäureresten, gefolgt von einem Propeptid bestehend aus 25 Aminosäureresten und dem reifen Protein aus 74 Aminosäureresten. Die vorhergesagte „coiled-coil Oligomerisierungsdomäne“ des reifen Proteins (Tagariello u. a., 2008) ist ebenfalls konserviert. Analog zu den vor kurzem beschriebenen *Ucma* Spleißvarianten in der Maus (Le Jeune u. a., 2010), konnten alternativ gespleißte mRNAs von *ucma* und *ucmab* nachgewiesen werden, denen entweder Exon 2 oder Exon 4 fehlen. Eine Spleißvariante in der beide Exons fehlten, konnte hingegen nur für *ucmaa* nachgewiesen werden (Abb. 3.1 C). Wie in der Maus repräsentierten die Spleißvarianten eine seltenere Subpopulation von mRNAs und jene Spleißvariante, der beide Exons fehlen, konnte nur mit einem auf den Exongrenzen 1/3 und 3/5 liegendem Primerpaar amplifiziert werden (Abb. 3.1 B).



**Abb. 3.1: Domänenstrukturvergleich und alternatives Speißen von *ucmaa/b***

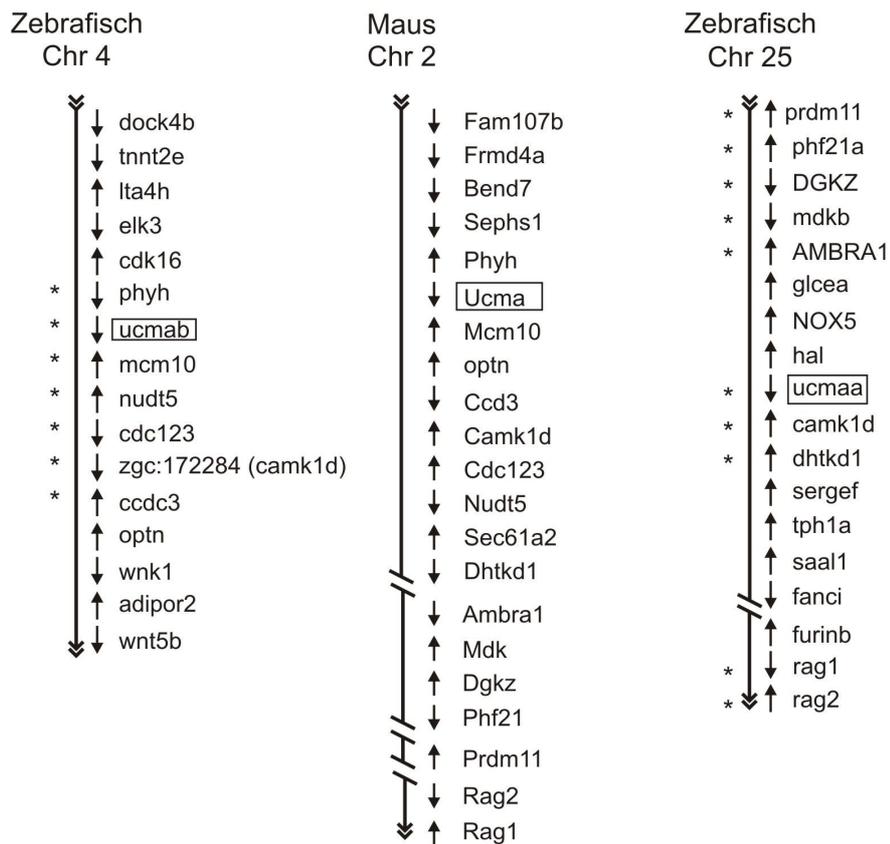
Aminosäuresequenz von Maus (*ucmam*), Mensch (*ucmah*) und Zebrafisch (*ucmaza*, *ucmazb*) UCMA. Die Domänenstruktur ist unterhalb angegeben, die konservierte Schnittstelle für die Proproteinkonvertase ist durch ein Sternchen über dem Sequenzvergleich gekennzeichnet (A). Intron/Exonstruktur von Zebrafisch *ucma* mRNAs und die zur Amplifikation verwendete RT-PCR Strategie. Die entsprechende Domänenstruktur ist oberhalb angegeben, alternatives Spleißen, zu den verschiedenen Spleißvarianten S1, S2 und S3 führt, unterhalb. Die Position von Primern für die initiale RT-PCR ist mit schwarzen Pfeilen markiert und von Primern für „semi-nested“ RT-PCR mit grauen Pfeilen (B). RT-PCR Analyse mittels initialer RT-PCR (linke Spalte) und „semi-nested“ RT-PCR (rechte Spalte) von Zebrafisch *ucmaa* (obere Reihe) und *ucmab* (untere Reihe). Schwache Banden sind mit einem Sternchen markiert. Die Sequenz aller erhaltenen Fragmente wurde mittels Sequenzierung bestätigt (C). Bp, Basenpaare, N, Negativkontrolle, sa, „semi-nested“

### 3.1.2. Struktur der orthologen *ucma* Gene im Zebrafisch

Um zu bestimmen, ob die beiden *ucma* Gene im Zebrafisch Orthologe des Maus *Ucma* Gens und somit das Ergebnis einer Genomduplikation sind, welche sich nach der Abspaltung der Knochenfische (Teleostei) von den restlichen Landwirbeltieren ereignete, wurde der genomische Kontext beider Zebrafisch *ucma* Gene (Ensembl danio rerio version 60.9 (Zv9)) mit der Umgebung des entsprechenden Maus UCMA-Gens (Ensembl Mus musculus version 60.37m (NCBIM37)) auf Chromosom 2 verglichen (Abb. 3.2). Die für Zebrafisch *ucmaa* und *ucmab* kodierenden Gene befinden sich auf den Chromosomen 25 bzw. 4. Der genomische Kontext von Zebrafisch *ucmab* ist stark konserviert. Wie in der Maus wird *ucmab* von *phyh* und *mcm10* flankiert. Orthologe der Mausgene *Nudt5*, *Cdc123*, *Ccdc3* und *Optn* befinden sich stromabwärts von *ucmab*. Der genomische Kontext von *ucmaa* hingegen ist weniger gut erhalten, obwohl die Zebrafisch Orthologe der Mausgene *Camk1d* und *Dhtkd1* in räumlicher Nähe stromabwärts des *ucmaa* Gens liegen. Eine zusätzliche Syntenie zwischen Maus und Zebrafisch ergab sich bei der Betrachtung der Struktur der Gene ca. 100 Megabasen stromabwärts von Maus *Ucma* auf Chromosom 2. Die Gene *Ambra1*, *Mdk*, *Dgkz*, *Phf21a*, *Prdm11*, *Rag2* und *Rag1* sind direkte Nachbarn von *ucmaa* im Zebrafischgenom. Zudem befinden sich jeweils duplizierte Gene kodierend für die „calcium/calmodulin-dependent protein kinase 1D“ (*camk1d* and *zgc:172284*) stromabwärts der beiden Zebrafisch *ucma* Gene, ein weiteres, klares Indiz dafür, dass sich die *ucma* Genkopien auf duplizierten Chromosomensegmenten befinden.

### 3.1.3. Expression der Zebrafisch *ucma* Gene

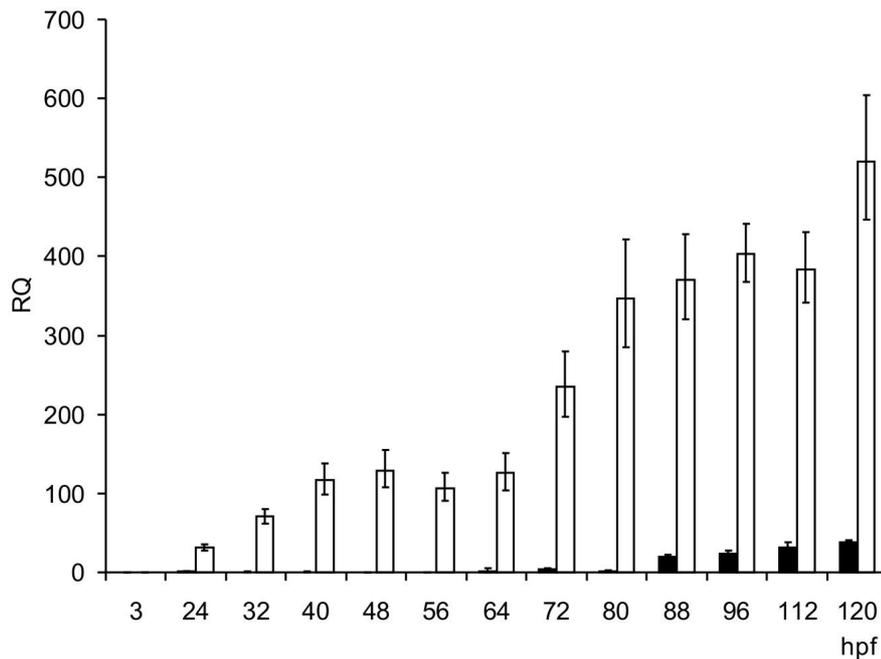
Zur temporalen Analyse der Expression von *ucmaa* und *ucmab* während der Zebrafisch Embryogenese, wurden zu 13 verschiedenen Zeitpunkten zwischen 3 hpf und 120 hpf mRNAs isoliert und in Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Tagariello (Institut für Humangenetik, Erlangen) mittels quantitativer PCR analysiert (Abb. 3.3). Dabei wurde festgestellt, dass sich die Expression der beiden Gene erheblich unterscheidet. Während *ucmaa* mRNA bereits 24 hpf nachgewiesen werden konnte, war *ucmab* erst ab 88 hpf in signifikanten Mengen detektierbar. Auch wurde *ucmab* mRNA zu jedem Zeitpunkt in erheblich kleineren Mengen exprimiert als *ucmaa*. Die Expression von *ucmaa* erfolgt in zwei Stufen. Ein erster Anstieg der Expression erfolgte zwischen 24 und 40 hpf, ein zweiter Anstieg erfolgte nach 64 hpf. Die räumliche Expression von *ucmaa* und *ucmab* wurde mit



**Abb. 3.2: Analyse der chromosomalen Lokalisierung und genetischen Nachbarschaft von Zebrafisch *ucmaa/b* und Maus *Ucma***

Vergleichende Genkarten der näheren Nachbarschaft von *ucma* auf Zebrafisch Chromosom 4 und 25 und Maus Chromosom 2. Die Kästen heben die Position von *ucma* hervor. Die duplizierten Zebrafisch *ucma* Gene sind zwar auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert, weisen aber, wie mit Sternchen hervorgehoben, teilweise Syntenie mit dem Maus Chromosom 2 auf. Chr, Chromosom

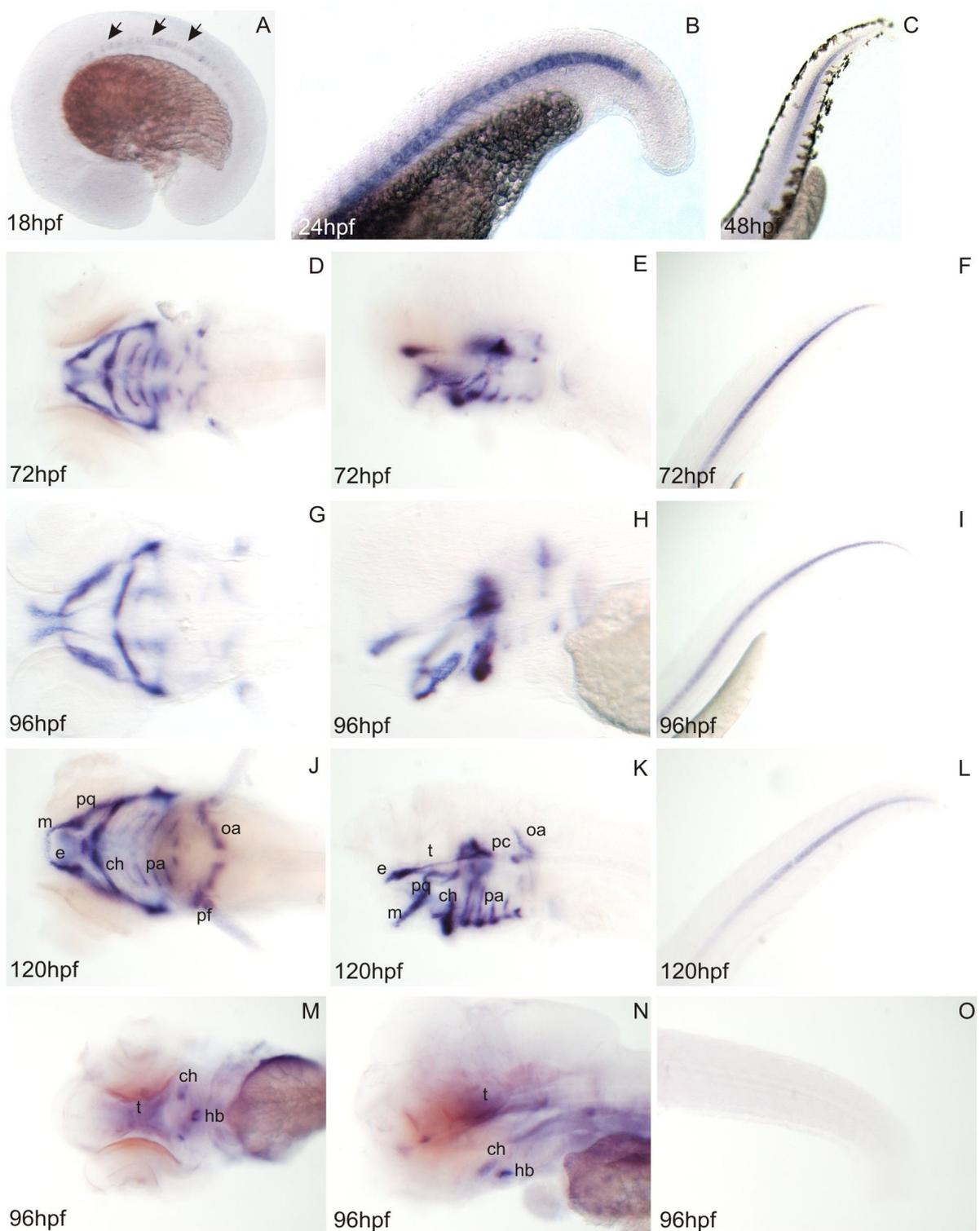
Hilfe von „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung in Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Tagariello (Institut für Humangenetik, Erlangen) untersucht. Die Untersuchungen ergaben, dass das *ucmaa* Gen zuerst von Notochordzellen exprimiert wird. Bei 18 hpf war das Transkript gleichmäßig im Notochord nachweisbar. Die mesenchymalen Vorläuferzellen hingegen, welche zu einem späteren Zeitpunkt das distale Notochord bilden, exprimieren in diesem Entwicklungsstadium kein *ucmaa* (Abb. 3.4 A). Ab 24 hpf konnte *ucmaa* zwar im distalen Teil des Notochords detektiert werden, jedoch nicht in den Notochordzellen der wachsenden Schwanzspitze (Abb. 3.4 B). Im Notochord zwei Tage alter Embryonen hingegen nimmt die Expression von *ucmaa* im proximalen Notochord deutlich ab, blieb jedoch im distalen Notochord jenseits der Dottersackerweiterung („yolk sac extension“) erhalten (Abb. 3.4 C). Die Expression von *ucmaa* im distalen Notochord bleibt bis 120 hpf bestehen (Abb. 3.4 F, I, L). Ab 72 hpf wird *ucmaa* in allen kraniofazialen Elementen inklusive der Ethmoidplatte, des Meckel-Knorpels, des Palatoquadratus, der trabekulären und



**Abb. 3.3: Analyse der temporalen Expression von Zebrafisch *ucmaa* und *ucmaab***

Quantitative PCR Analyse der Zebrafisch *ucmaa* (weiße Balken) und *ucmaab* (schwarze Balken) Expression. Das Gen codierend für das „TATA-Box Binding Protein“ (*tbp*) wurde für die Normalisierung herangezogen. hpf, „hours post fertilisation“ (Stunden nach Befruchtung), RQ, relative Quantifizierung

parachordalen Knorpel, des Occipital-Bogens, sowie in den Kiemenbögen und den sich entwickelnden Brustflossenstrahlen exprimiert (Abb. 3.4 D, E). Diese knorpelspezifische Expression wird bis 120 hpf aufrecht erhalten (Abb. 3.4 G, H, J, K). Erstaunlicherweise wurde in den Kiemenbögen bei 96 hpf eine kurzzeitige Abnahme der Expression von *ucmaa* verzeichnet (Abb. 3.4 G, H). Im Gegensatz zu *ucmaa* werden erste Signale für *ucmaab* erst ab 96 hpf sichtbar. *ucmaab* wird schwach im trabekulären Knorpel, im zentralen Teil des Ceratohyalknorpels und im proximalen Teil des ersten Hypobranchialknorpels exprimiert (Abb. 3.4 M, N). Darüber hinaus konnte *ucmaab* nicht im Notochord nachgewiesen werden (Abb. 3.4 O). Analog zu den Daten der quantitativen PCR waren die *in situ* Hybridisierungssignale von *ucmaab* durchgehend schwächer als jene von *ucmaa* (Abb. 3.4).

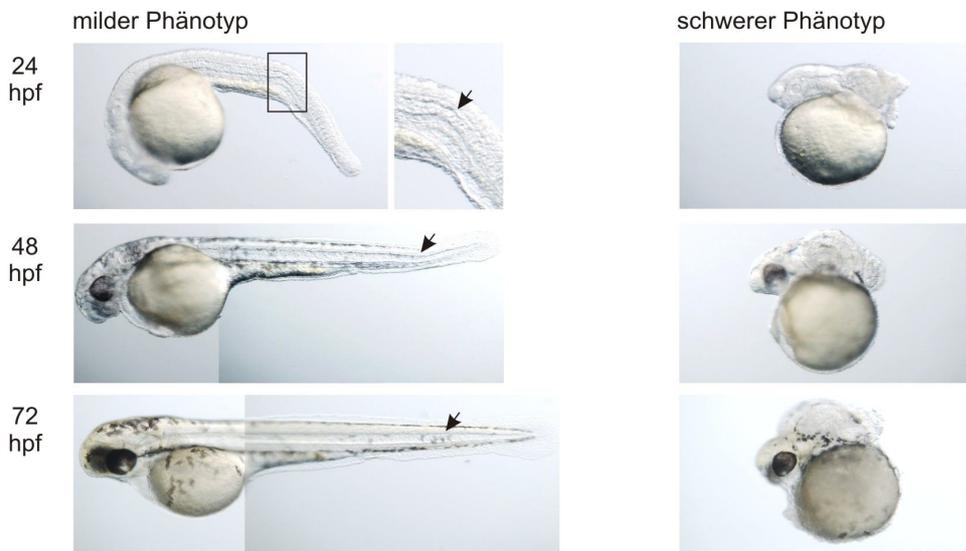
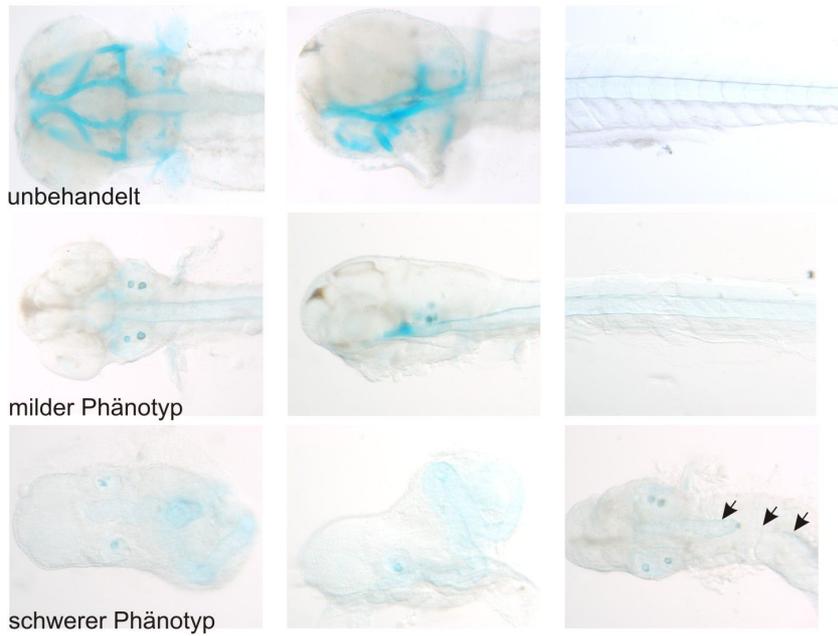
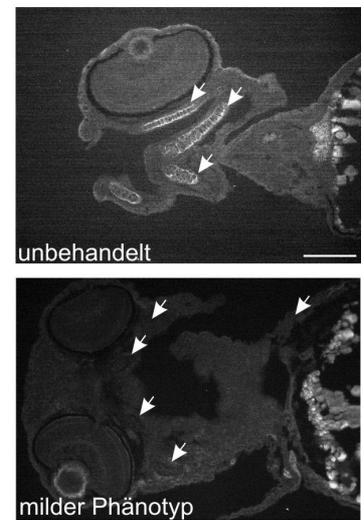


**Abb. 3.4: Analyse der räumlichen Expression von Zebrafisch *ucmaa* und *ucmb***

Zebrafischembryonen angegebenen Alters wurden mit RNA Sonden spezifisch für *ucmaa* (A-L) oder *ucmb* (M-O) hybridisiert. *ucmaa* wurde während der Entwicklung durchgehend im Notochord transkribiert (A durch Pfeile markiert, B, C, F, I, L) und in allen kraniofazialen Knorpelstrukturen wie Ethmoidplatte (e), Meckel-Knorpel (m), Palatoquadratum (pq), trabekulärer (t) und parachordaler (pc) Knorpel, Occipital-Bögen (oa), Kiemenbögen (pa) und Brustflosse (pf) (D, E, G, H, J und K). Im Gegensatz dazu war die Transkription von *ucmb* erst ab 96 hpf in Teilen des trabekulären Knorpels (t), des Ceratohyalknorpels (ch) und des Hypobranchialknorpels (hb) detektierbar (M-O).

### 3.1.4. Morpholino „knockdown“ von Zebrafisch UcmAa

Ein sogenannter „knockdown“, die zeitliche Verhinderung der Expression eines Proteins, wurde durch die Injektion von translationsblockierenden antisense Oligonukleotidanaloga („Morpholinos“) in Zebrafischembryonen (im Folgenden „Morphanten“ genannt) erreicht. Um die Spezifität der Morpholinos zu überprüfen, wurden zwei verschiedene Morpholinos, UCMAzA antisense I und II und als Kontrolle UCMAzA mismatch I und II mit jeweils fünf Basenaustauschen verwendet. Da die Injektion von mehr als 5 ng des UCMAzA II Morpholinos pro Embryo über den Verlauf der ersten 24 Stunden letal war, wurden alle folgenden Experimente mit 2,5 ng Morpholino pro Embryo durchgeführt. Mit 2,5 ng Mismatchmorpholino injizierte Embryonen wurden verwendet, um unspezifische Effekte der Morpholinoinjektion zu untersuchen. Die Mismatchmorphanten wiesen leichte Wachstumsverzögerungen bei 48 hpf auf, welche jedoch bereits bei 72 hpf vollständig verschwanden (Abb. 3.5 A, oberer rechter Abschnitt). Die Antisensemorphanten hingegen zeigten ein breites Spektrum an Phänotypen. Milde Phänotypen (etwa 55% der Morphanten) wiesen schwache Wachstumsverzögerungen auf, die im Gegensatz zu den Mismatchmorphanten, nicht kompensiert wurden. Bei 24 hpf waren sowohl der Kopf, als auch das Notochord der Antisensemorphanten missgebildet. Der Kopf war kleiner und schwächer ausgeprägt. Das Notochord war ungleichmäßig gewellt. Oft konnte eine schwere Verformung des distalen Notochords beobachtet werden, die in der sich entwickelnden Fischlarve zu einem Knick im Schwanz führte. Obwohl die einheitliche Somitenbildung bei den milden Phänotypen nicht beeinflusst wurde, waren die ansonsten scharfen Grenzen der Somiten diffus. Die zwischen 24 hpf und 48 hpf einsetzende Augenpigmentierung war bei den Morphanten weniger deutlich ausgeprägt. Bemerkenswerterweise wurden die meisten beschriebenen Fehlbildungen, bis auf die Wachstumsverzögerung, über den Verlauf der ersten 72 Stunden korrigiert. Obwohl die Morphologie der Körperachse und des Notochords der Morphanten offensichtlich jener der unbehandelten Tiere bei 72 hpf ähnelte, sah der an den Vortagen schwere Missbildungen aufweisende Teil des Notochords, weiterhin wellig und diffus aus (Abb. 3.5 A, unterer linker Abschnitt). Schwere Phänotypen (etwa 45% der Morphanten) wiesen deutlichere Wachstumstörungen auf. Obwohl der Kopf morphologisch vollständig angelegt wurde, entwickelte er sich langsamer und stellte nach 24 hpf das Wachstum komplett ein. Die Augenpigmentierung war, ähnlich dem milden Phänotyp, unvollständig. Der Hinterleib wurde zwar immer angelegt, war aber spiralartig komprimiert

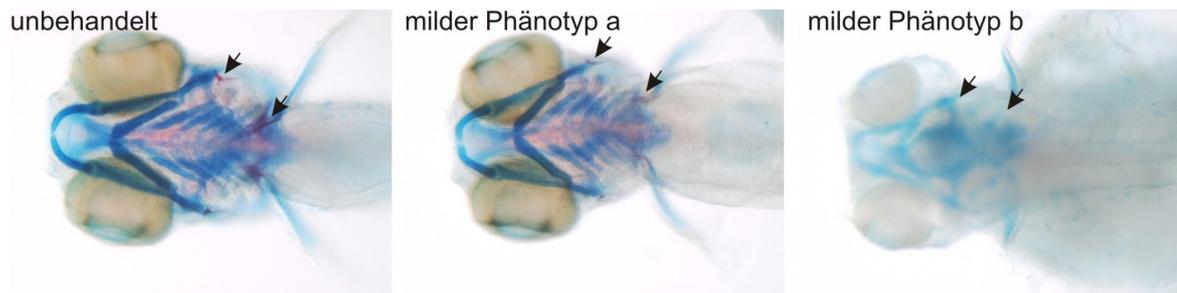
**A****B****C**

und bildete keine Dottersackerweiterung. Im Gegensatz zu den milden Phänotypen konnten keine definierten Somiten identifiziert werden. Schwere Phänotypen erholten sich nicht und die Missbildungen wurden nicht korrigiert (Abb. 3.5 A, unterer rechter Abschnitt). „Whole mount“ Alcianblau- und Kollagen II Immunfluoreszenzfärbungen (Abb. 3.5 B, C) wurden angewandt, um die Knorpelstrukturen von 72 hpf Antisensemorphanten darzustellen. Im Vergleich zu unbehandelten Larven fehlten bei Antisensemorphanten Teile des Kraniofazialknorpels. Obwohl trabekulärer und parachordaler Knorpel in den meisten Fällen unbeeinflusst waren, fehlten andere Bestandteile, inklusive Unterkiefer und Kiemenbögen (Abb. 3.5 B). Kollagen II Immunfluoreszenzfärbungen zeigten einen vollständigen Verlust von Kollagen II im verbliebenen Knorpel der Morphanten, auch in Bereichen, die mit Alcianblau angefärbt waren (Abb. 3.5 C). Die schwache Alcianblaufärbung im Notochord von Larven bis 72 hpf zeigte keinen offensichtlichen Unterschied zwischen milden Phänotypen und unbehandelten Larven (Abb. 3.5 B, obere und mittlere Reihe). Schwere Phänotypen wiesen in fast allen Fällen einen vollständigen Verlust aller Kraniofazialknorpel auf. Das Notochord wurde zwar angelegt, war jedoch spiralartig komprimiert. In seltenen Fällen konnten Unterbrechungen des Notochords festgestellt werden (Abb. 3.5 B, untere Reihe). Die Kalzifizierung bei 7 Tage alten Larven wurde durch „Whole mount“ Alcianblau- und Alizarinrotfärbungen untersucht (Abb. 3.6). Wie erwartet zeigten nur milde Phänotypen eine leicht verminderte, aber ansonsten morphologisch einwandfreie Kalzifizierung, was einen weiteren Beleg dafür darstellt, dass bei milden Phänotypen Knorpelbildung und Verknöcherung stattfinden (Abb. 3.6, mittleres Bild).

---

**Abb. 3.5: Analyse des „knockdowns“ von Zebrafisch *ucmaa***

Darstellung der Entwicklung repräsentativer unbehandelter Zebrafische (oberer linker Abschnitt), Mismatchmorphanten (oberer rechter Abschnitt) und Antisensemorphanten mit mildem (unterer linker Abschnitt) und starkem (unterer rechter Abschnitt) Phänotyp zu den angegebenen Zeitpunkten. Bei den abgebildeten Larven handelt es sich bei allen drei Zeitpunkten um identische Tiere. Morphanten mit mildem Phänotyp konnten sich im Laufe des Experiments von den Bildungsdefekten der Körperachse zum Teil erholen, wie mit der Box bei 24 hpf und anschließend durch Pfeile bei 48 und 72 hpf hervorgehoben. Schwere Phänotypen zeigten irreversible Wachstumsverzögerungen sowie einen schwer beschädigten Kopf und eine verkürzte Körperachse (A). „Whole mount“ Alcianblaufärbungen eines unbehandelten Zebrafische bei 72 hpf (obere Reihe), und Antisensemorphanten mit milden (mittlere Reihe) und schweren (untere Reihe) Phänotypen zeigten einen graduellen Verlust der Alcianblaufärbung des Kraniofazialknorpels mit steigendem Schweregrad des Phänotyps, sowie gelegentliche Unterbrechungen des Notochords in schweren Phänotypen (Pfeile, untere rechte Abbildung). Linke Spalte, Dorsalansicht des Schädels, mittlere Spalte, Lateralansicht des Schädels, rechte Spalte, Detailansicht des Notochords (obere Abbildungen lateral, untere dorsal) (B). Im Gegensatz zu unbehandelten Larven bei 72 hpf (oberes Bild), führte ein „knockdown“ von *ucmaa* bereits bei milden Phänotypen (unteres Bild) zum Verlust der Kollagen II Färbung. Pfeile kennzeichnen Knorpelstrukturen (C).



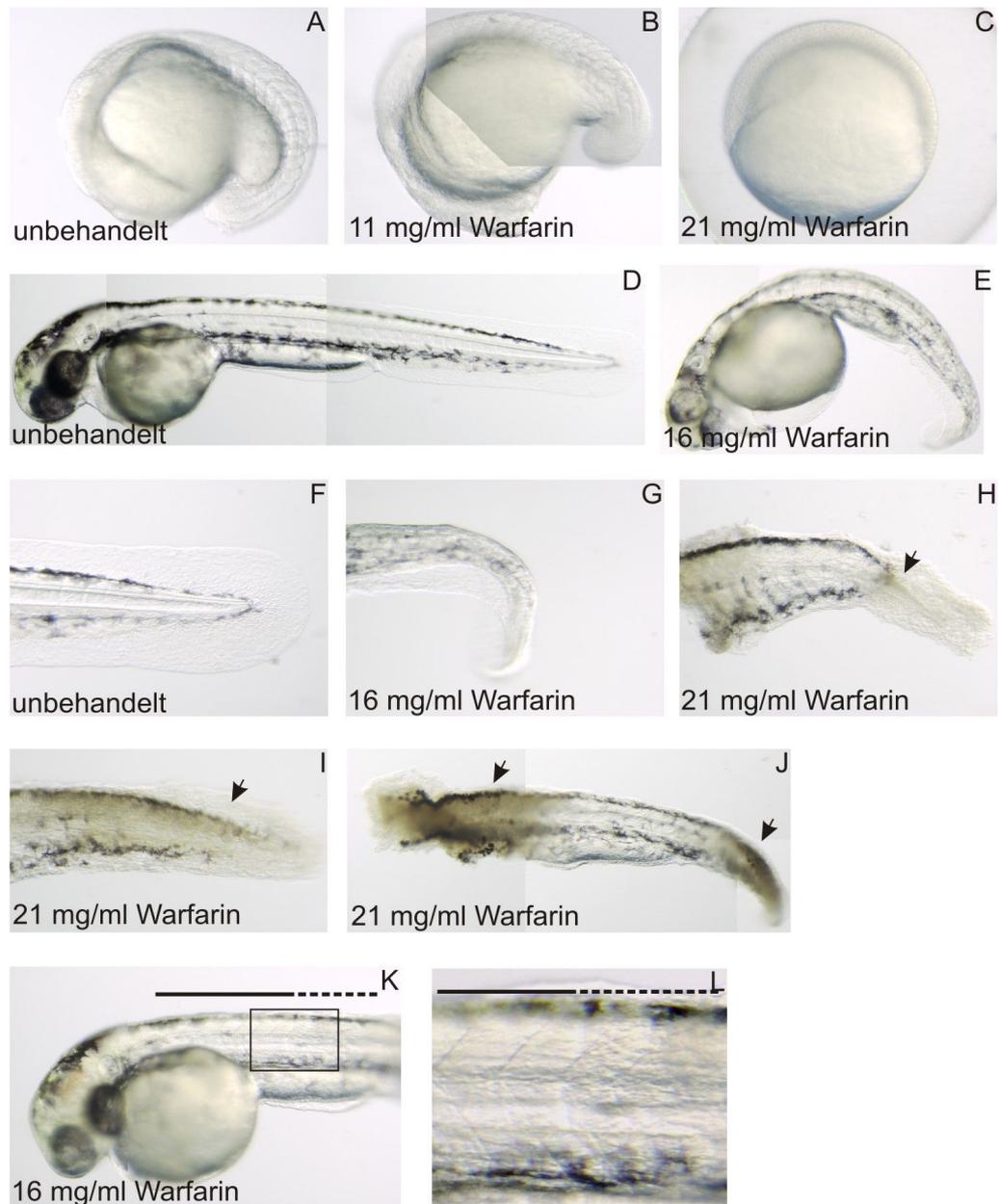
**Abb. 3.6: Analyse der Knochenbildung in Zebrafisch *ucmaa* Antisensemorphanten**

„Whole mount“ Alcianblau-/Alizarinrotfärbung zur Darstellung von verknöcherten Strukturen in 7 Tage alten Zebrafischlarven. Die beiden rechten Bilder zeigen repräsentative Antisensemorphanten mit mildem Phänotyp, die verschiedene Stadien der Erholung erreicht haben. Die meisten milden Phänotypen zeigen eine leichte Verzögerung der Kalzifizierung (mittleres Bild), jedoch weisen einige milde Phänotypen eine schwächere Knorpelfärbung und fehlende Kalzifizierung auf. Die Pfeilspitzen zeigen kalzifizierte Strukturen beziehungsweise deren Fehlen an.

Schwere Phänotypen zeigten keine Verknöcherung (Abb. 3.6 rechtes Bild). Da allerdings der normale Verknöcherungsvorgang bei Zebrafischen erst am sechsten Tag einsetzt, ein Zeitpunkt, bei dem ein Morpholino „knockdown“ nicht mehr funktional ist, konnte der direkte Einfluss von *Ucmaa* auf die Verknöcherung nicht weiter untersucht werden.

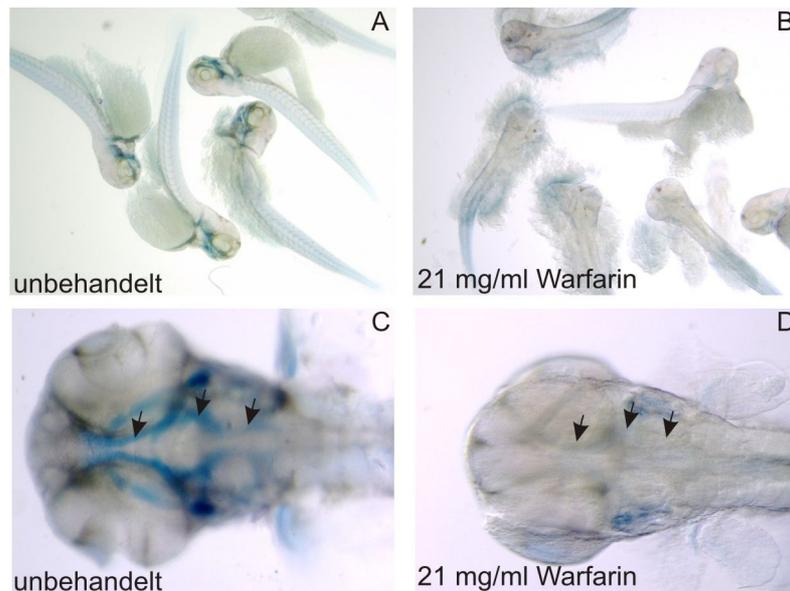
### 3.1.5. Hemmung der Vitamin-K abhängigen $\gamma$ -Carboxylierung während der Zebrafischentwicklung

Um den Effekt einer verminderten Vitamin-K abhängigen  $\gamma$ -Carboxylierung von *Ucmaa* auf die Entwicklung des Kraniofazialknorpels und des Notochords von sich entwickelnden Zebrafischlarven zu untersuchen, wurden 0 hpf, 26 hpf und 56 hpf alte Larven in 11 mg/ml, 16 mg/ml oder 21 mg/ml Natriumwarfarin enthaltenden Puffern inkubiert (Abb. 3.7 A-L). Mit 11 mg/ml behandelte Embryonen entwickelten sich normal (Abb. 3.7 B). Mit 21 mg/ml Warfarin behandelte Embryonen erlitten einen Entwicklungsstillstand im sogenannten „50% Epibolie“ Stadium (~5 hpf) (Abb. 3.7 C). Eine Behandlung von 26 hpf alten Larven mit Warfarin verhinderte bei 48 hpf eine Streckung der Körperachse. In diesen Fällen wurde sowohl ein Ausfall in Körperwachstum, Pigmentierung und Schwanzentwicklung, als auch verzögertes Kopfwachstum festgestellt (Abb. 3.7 E). Der distale Teil der Schwanzspitze zeigte einen dosisabhängigen Effekt der Warfarinbehandlung. Die Verwendung von 16 mg/ml Warfarin führte zu einer Mißbildung der Körperachse, inklusive des Notochords und des sich entwickelnden Flossensaums. Höhere Mengen an Warfarin (21 mg/ml) führten zusätzlich zu den oben beschriebenen Effekten, zu fortschreitendem Zelltod in der Schwanzspitze (Abb. 3.7 F-H).



### Abb. 3.7: Effekte von Warfarin auf die embryonale Zebrafiscentwicklung

Darstellung repräsentativer Embryonen nach Inkubation mit Natriumwarfarin. Inkubation mit 11 mg/ml Warfarin direkt nach Eiablage führte zu keinem offensichtlichen morphologischen Unterschied bei 24 hpf (B). Inkubation mit 21 mg/ml führte zu einem Wachstumsarrest nach etwa 5 Stunden („50% Epibolie“ Stadium). Für 22 Stunden mit 16 mg/ml Warfarin behandelte Embryonen zeigten eine Verringerung der Größe, Kopffehlbildungen und Verformungen der hinteren Körperachse, einschließlich des Notochords, der umgebenden Gewebe und des Flossensaums (E, F). Verwendung von 21 mg/ml Warfarin führte, wie anhand der dunklen und undurchsichtigen Bereichen zu erkennen, zu erhöhtem Zelltod in der wachsenden Schwanzspitze und im Kopf (mit Pfeilen hervorgehoben, H, I, J). Vollständig ausgebildetes Notochord wurde von der Warfarinbehandlung nicht beeinflusst (K, L, durchgehende Linie), wohingegen sich entwickelndes Notochord durch die Warfarinbehandlung beschädigt wurde und, wie das umliegende Gewebe, diffus wirkte (K, L, gestrichelte Linie). A-C, 24 hpf, D-L, 48 hpf.



**Abb. 3.8: Effekte von Warfarin auf die kraniofaziale Knorpelentwicklung**

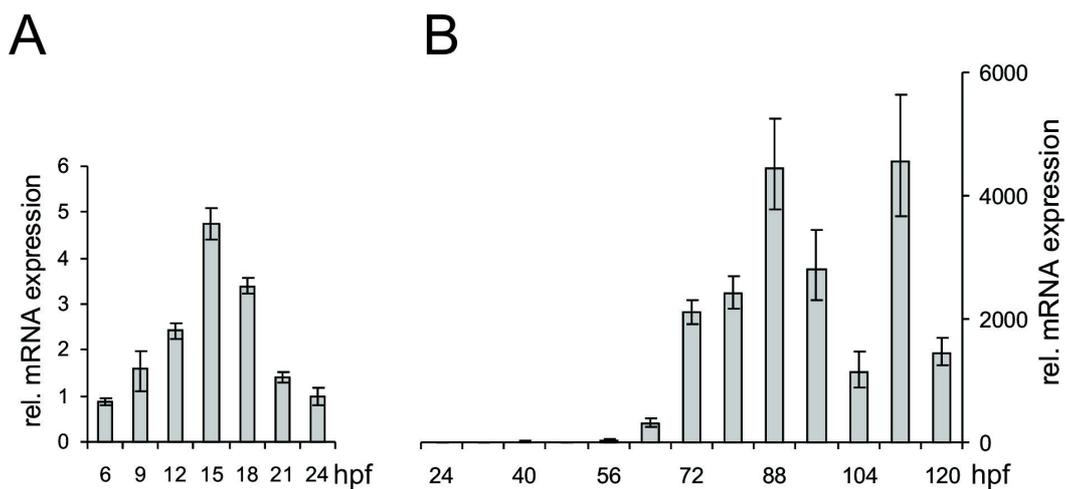
Von 56 hpf an für 16 Stunden mit 21 mg/ml Warfarin behandelte Zebrafischembryonen zeigten bei 72 hpf äußerlich nur leichte Wachstumsverzögerungen (A, B), jedoch einen progressiven Verlust der kraniofazialen Knorpelstrukturen, sichtbar gemacht durch „Whole mount“ Alcianblaufärbung (Pfeile) (C, D).

Die schwersten erhaltenen Phänotypen wiesen massive Nekrose im Kopf und in der caudalen Körperachse auf, die gegebenenfalls bis hin zum Verlust des Kopfes und der Schwanzspitze führte (Abb. 3.7 I, J). Eine nähere Betrachtung des Einflusses von Warfarin auf die Entwicklung des Notochords zeigte, dass nur jener Teil des Notochords von der Wirkung des Warfarins betroffen war, der sich zum Zeitpunkt der Warfarinzugabe noch in der Entwicklung befand (Abb. 3.7 K, L, gestrichelte Linie). Bereits etabliertes Notochord hingegen war nicht betroffen (Abb. 3.7 K, L, durchgehende Linie). Die Behandlung von 56 hpf alten Larven mit Warfarin resultierte in einem sehr milden Phänotyp. Neben einer leichten Verringerung der Körperlänge konnten äußerlich keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen festgestellt werden (Abb. 3.8 A, B). Eine Detailbetrachtung der „Whole mount“ Alcianblau-/Alizarinrotfärbungen hingegen offenbarte einen vollständigen Verlust des Kraniofazialknorpels (Abb. 3.8 C, D), ähnlich dem des *Ucmaa* Antisensemorphanten-Phänotyps. Eine ektopische Kalzifizierung konnte nicht festgestellt werden.

## 3.2. Funktionelle Analyse von Matrilin-1 im Zebrafisch

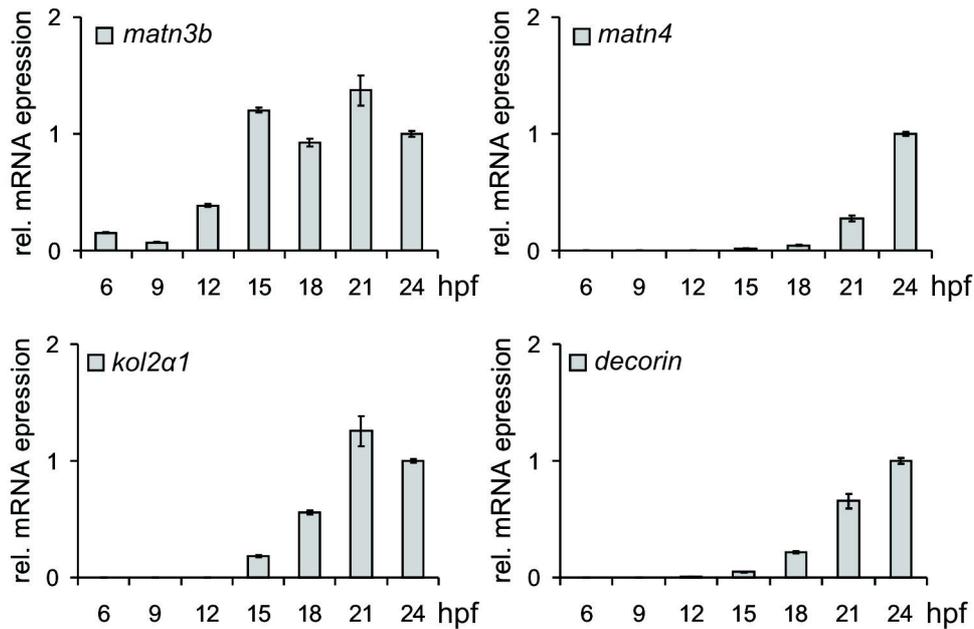
### 3.2.1. Expression des *matrilin-1* Gens im Zebrafisch

Mit der Untersuchung der Expression von *matrilin-1* wurde bereits früher begonnen (Ko u. a., 2005). Da bisher aber wichtige Aspekte nicht hinreichend geklärt werden konnten, wurde diese Arbeit fortgeführt. Zur Analyse der temporalen Expression von *matrilin 1* während der Zebrafischartwicklung auf mRNA Ebene wurden Proben von 20 verschiedenen Zeitpunkten zwischen 3 und 120 hpf mittels quantitativer PCR untersucht. Die bedeutendste neue Beobachtung war das auffallende Expressionsmuster von *matrilin 1* während den ersten 24 hpf (Abb. 3.9 A). Quantitative Analysen zeigten, dass diese frühe Expression einen Höhepunkt bei 15 hpf erreicht,



#### Abb. 3.9: Transkription von *matrilin 1* während der Zebrafischartwicklung

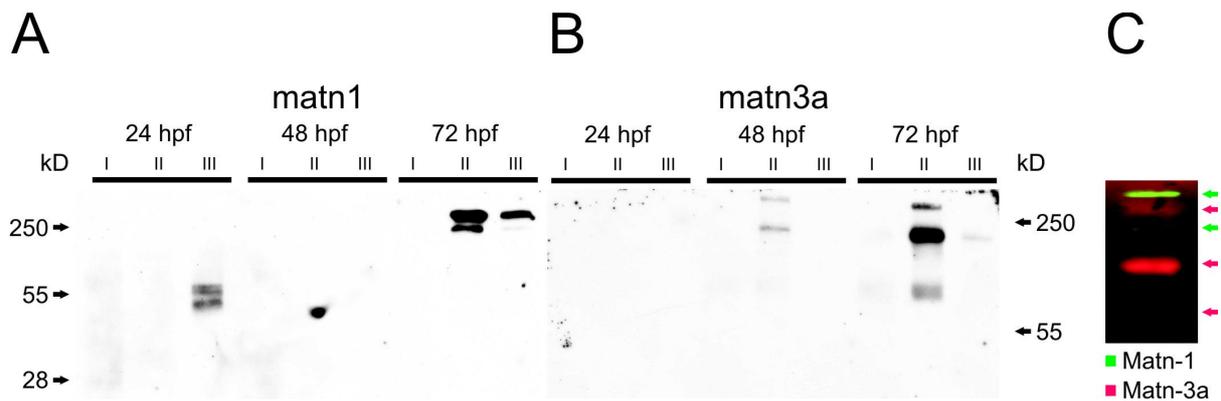
Expression von *matrilin 1* während der ersten 24 hpf (A) und zwischen 24 hpf und 72 hpf (B). *matrilin 1* zeigt einen ersten Expressionshöhepunkt bei etwa 15 hpf, ein Zeitpunkt bei dem die Skelettentwicklung im Zebrafisch noch nicht eingesetzt hat (A). *matrilin 1* weist mindestens zwei weitere Expressionshöhepunkte in der späteren Larvenentwicklung auf, einer beginnend bei etwa 64 hpf, etwa der Zeit zu der die Kraniofazialknorpel angelegt werden und einer zwischen 96 und 120 hpf, der Zeit kurz vor dem Einsetzen der Wirbelsäulenkalzifikation. hpf, Stunden nach Ablage.



**Abb. 3.10: mRNA Expression weiterer Knorpelproteine während der Zebrafiscentwicklung**

mRNA Expression von *matrilin 3b*, *matrilin 4*, *kollagen IIa1* und *decorin* während der ersten 24 hpf. *matrilin 3b* wird von Anfang an exprimiert, erreicht aber einen Expressionshöhepunkt bei etwa 15 hpf, gefolgt von einer anschließenden Plateauphase (oben links). Die Expression von *matrilin 4*, *kollagen IIa1* und *decorin* beginnt etwa zu dem Zeitpunkt, bei dem *matrilin 1* und *matrilin 3b* ihren Expressionshöhepunkt erreichen (etwa 15 hpf). *kollagen IIa1* erreicht um 24 hpf eine Plateauphase, während die Expression von *matrilin 4* und *decorin* weiter ansteigt.

der weitaus schwächer ist als die *matrilin 1* Expression zum Zeitpunkt der Skelettbildung (vgl. Abb. 3.9 B). Zum besseren Verständnis einer frühen transienten Expression eines Knorpelproteins zu einem Zeitpunkt, zu dem noch kein Knorpel im betreffenden Organismus vorhanden ist, wurde die Expression von *matrilin 1* mit der von *matrilin 3a* und *-3b*, *matrilin 4*, *kollagen IIa1* und *decorin* verglichen (Abb. 3.10). Keines dieser Proteine zeigt ein auffallendes, transientes Expressionsmuster ähnlich dem von *matrilin 1* (Abb. 3.9). Während *Matn-3a* während der ersten 24 Stunden nicht exprimiert wird (vgl. Abb. 3.11 B), beginnt die Expression von *matrilin 4*, *kollagen IIa1* und *decorin* bei etwa 15 hpf und steigt daraufhin weiter an. *matrilin 3b* wird bereits ab 6 hpf exprimiert, mit einem Anstieg bei 15 hpf, der jedoch im Vergleich zum *matrilin 1* nicht wieder abnimmt (Abb. 3.9 A). *matrilin 1* wird während einer zweiten Expressionsphase zu Beginn der Entstehung der Kraniofazialknorpel bei etwa 64 hpf hochreguliert, gefolgt von einer Abnahme und einem dritten Expressionsmaximum bei etwa 112 hpf (Abb. 3.9 B). Der Vergleich der relativen mRNA



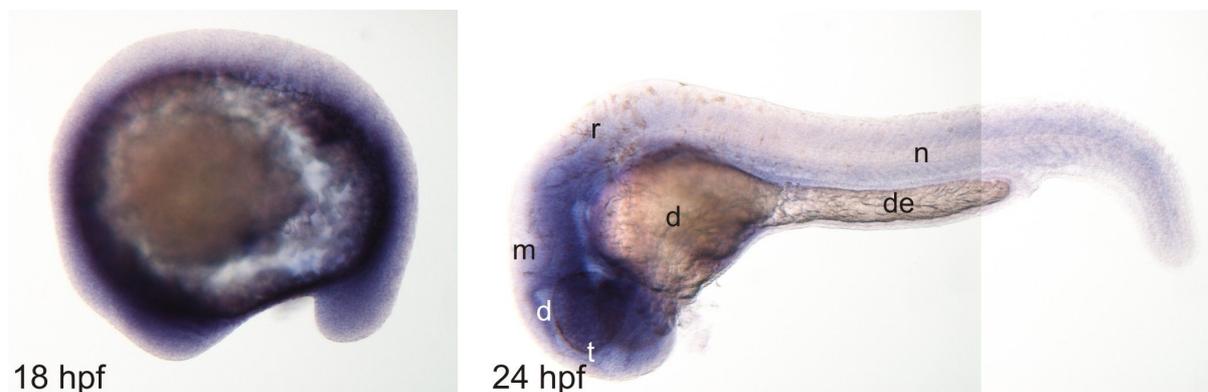
**Abb. 3.11: Expression Matn-1 und Matn-3a während der ersten 72 hpf im Vergleich**

„Western blot“ Analyse der Expression von Matn-1 (A), Matn-3a (B) und Doppelfluoreszenzfärbung von Matn-1 und Matn-3a (C). Matn1 wird bereits bei 24 hpf exprimiert, allerdings ist das Protein erst mittels 4M Guanidiniumchlorid (GuHCl) zu extrahieren und liegt in einer niedermolekularen Form vor. Bei 48 hpf ist kein Signal für Matn-1 detektierbar. Bei 72 hpf kann Matn-1 sowohl mit EDTA, als auch mit GuHCl in einer oligomeren Form extrahiert werden (A). Während der ersten 24 hpf kann Matn-3a nicht detektiert werden. Ab 48 hpf kann Matn-3a mit EDTA in einer oligomeren Form extrahiert werden (B). Fluoreszenzdoppelfärbungen von EDTA Extrakten bei 72 hpf zeigen, dass die Signale von Matn-1 (grün) und Matn-3a (rot) sich nicht überschneiden keine Heterooligomere vorliegen. I, Extraktionspuffer I (NaCl), II, Extraktionspuffer II (EDTA), III Extraktionspuffer III (GuHCl).

Mengen zwischen den späten Maxima mit dem bei 15 hpf zeigt eine um drei Zehnerpotenzen höhere Expression von *matrilin 1* während der Kraniofazialknorpelentwicklung an. „Western blot“ Analysen unter Verwendung von spezifischen Antikörpern gerichtet gegen Matn-1 und Matn-3a bestätigten die mittels quantitativer PCR gewonnenen Ergebnisse (Abb. 3.11). Zur Untersuchung der Proteinexpression wurden Proteine sequentiell aus vollständigen Zebrafischen mit neutralem Salzpuffer (Fraktion I), Hochsalzpuffer mit 10 mM EDTA (Fraktion II) und 4 M GuHCl (Fraktion III) extrahiert. Die „Western blot“ Analyse nach nichtreduzierender SDS-PAGE zeigt, dass sowohl Matn-1 als auch Matn-3a am stärksten in Fraktion II von 72 hpf alten Tieren präsent ist. Zusätzlich kann Matn-1 in Fraktion II von 72 hpf alten Tieren gefunden werden. Entsprechend der Ergebnisse der quantitativen PCR kann Matn-1, jedoch kein Matn-3a in 24 hpf alten Zebrafischembryonen detektiert werden. Aus 24 hpf alten Zebrafischen extrahiertes Matn-1 zeigt jedoch auffallende Unterschiede bezüglich der Extrahierbarkeit und der elektrophoretischen Beweglichkeit zu jenen von 72 hpf alten Tieren. Während Matn-1 in 24 hpf alten Tieren nur unter Verwendung von 4 M GuHCl extrahiert werden kann, reichen bei 72 hpf alten Tieren bereits erhöhte Salzkonzentrationen und EDTA zu dessen Extraktion aus. Zusätzlich tritt Matn-1 bei 24 hpf als Doppelbande von etwa 55 kDa auf, der molekularen Masse von monomerem Matn-1. Matn-1 aus 72 hpf alten Tieren hingegen läuft auf einer Höhe von etwa 250 kDa, ein Beweis dafür, dass Matn-1 auch

im Zebrafisch Oligomere bildet (Abb. 3.11 A, B). Doppelfluoreszenzfärbungen auf „Western blots“ mit Antikörpern spezifisch für Zebrafisch Matn-1 und Matn-3a zeigen, dass die Oligomerbanden lediglich Matn-1 beinhalten. Dieses Ergebnis veranschaulicht, dass, anders als für andere Organismen gezeigt (Kleemann-Fischer u. a., 2001; Wu, Eyre, 1998), im Zebrafisch keine Heterooligomere aus Matn-1 und Matn-3a gebildet werden (Abb. 3.11 C). Überraschenderweise scheint sich Matn-1 im elektrischen Feld einer SDS-PAGE langsamer zu bewegen als Matn-3a, möglicherweise ein Hinweis darauf, dass Matn-1 in Zebrafisch höhere Oligomere bildet als in Säugetieren.

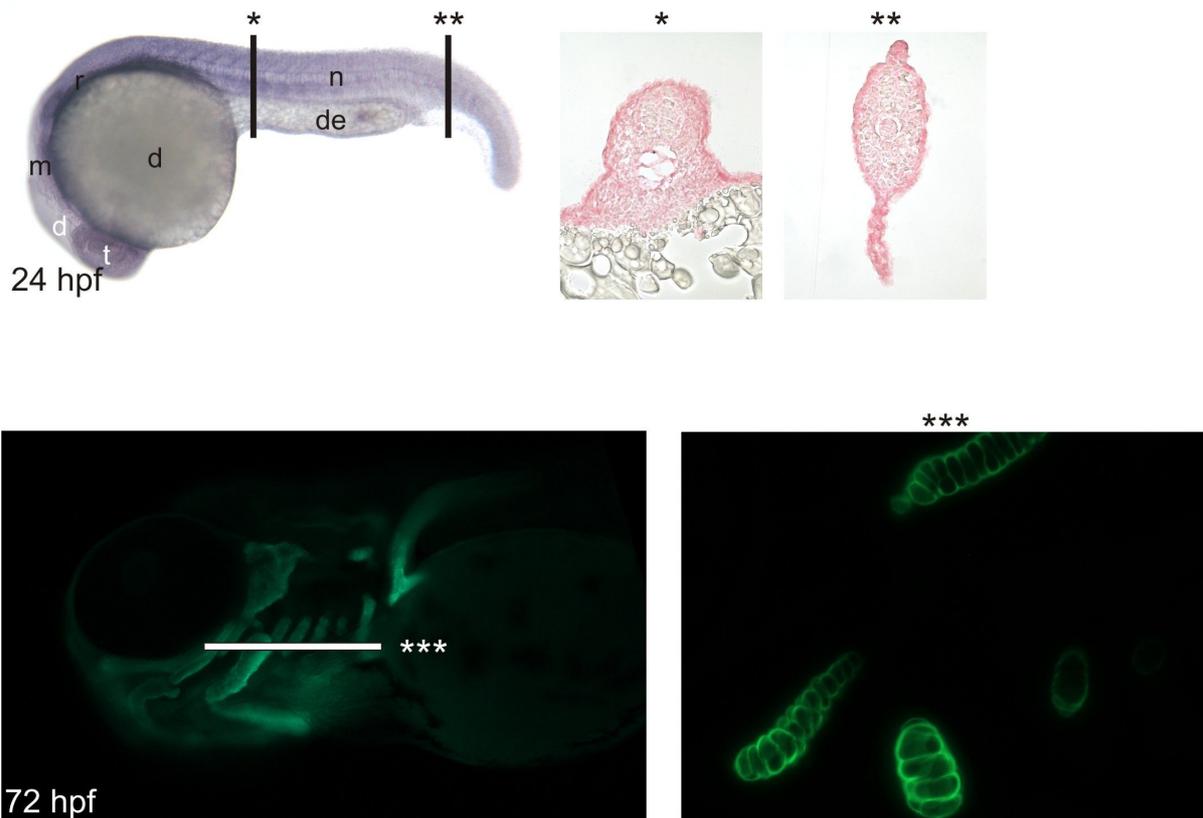
Die räumliche Expression von Matn-1 wurde bereits für 4 und 5 Tage, sowie für 4 Monate alte Tiere ermittelt und offenbarte eine hauptsächlich skelettale Verteilung (Ko u. a., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression zu früheren Entwicklungszeitpunkten untersucht. Die räumliche Expression von Matn-1 wurde mit „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung und immunohistochemischen Färbungen ganzer Tiere und auf Dünnschnitten untersucht (Abb. 3.12 und Abb. 3.13). Bei 18 hpf alten Tieren wird Matn-1 mRNA im ganzen Embryo gefunden, mit einer verstärkten Expression in den entstehenden Kopf- und Schwanzregionen (Abb. 3.12, links). In 24 hpf alten Tieren ist die Expression weitaus differenzierter. Die Matn-1 mRNA Expression im Kopf ist hauptsächlich auf die Hirnregionen des Telenzephalon, Dienzephalon und Mesenzephalon beschränkt, während



**Abb. 3.12:** „Whole mount“ *in situ* Analyse der räumlichen Expression von Matn-1 mRNA bei 18 hpf und 24 hpf

Räumliche Analyse der Matn-1 mRNA Expression durch „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung. Spezifische RNA-Sonden wurden zur Detektion von Matn-1 mRNA verwendet. In 18 hpf alten Embryonen wird Matn-1 mRNA im ganzen Embryo transkribiert. Stärkere Signale finden sich im entstehenden Kopf und Schwanz (linke Abbildung). Bei 24 hpf wird Matn-1 hauptsächlich im Telenzephalon, Dienzephalon und Mesenzephalon exprimiert, mit einer schwächeren Expression im Rhombenzephalon, sowie dorsal und ventral des Notochords (rechte Abbildung). t, Telenzephalon, d, Dienzephalon, m, Mesenzephalon, r, Rhombenzephalon, d, Dottersack, de, Dottersackerweiterung, n, Notochord.

eine schwächere Expression im Rhombenzephalon festgestellt werden kann. Im posterioren Teil der Zebrafischlarve kann Matn-1 mRNA dorsal und ventral des Notochords detektiert werden, wobei ein stärkeres Signal im distalen Schwanzbereich beobachtet werden konnte (Abb. 3.12, rechts). „Whole mount“ immunhistochemische Färbungen von 24 hpf alten Zebrafischen zeigen ein diffuses Signal für Matn-1 im ganzen Embryo. Im Gegensatz zur Verteilung der Matn-1 mRNA (Abb. 3.12), ist das Signal für Matn-1 Protein im



**Abb. 3.13: „Whole mount“ immunhistochemische Analyse der räumlichen Expression von Matn-1 bei 24 hpf und 72 hpf**

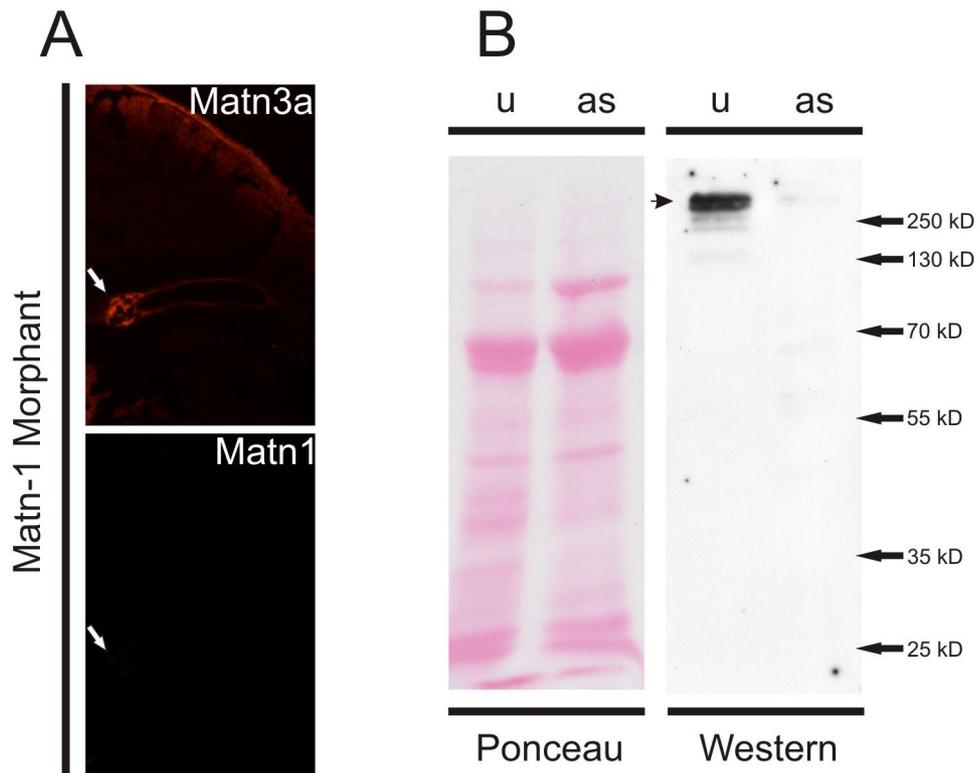
Räumliche Analyse der Matn-1 Expression durch „Whole mount“ immunhistochemische Färbungen bzw. Immunfluoreszenzfärbungen auf Schnitten. Spezifische Antikörper wurden zur Detektion von Matn-1 Protein angewandt. In 24 hpf alten Embryonen wird Matn-1 im ganzen Embryo detektiert. Schwächere Signale finden sich im Telenzephalon, Dienzephalon und Mesenzephalon. Stärkere Signale sind im Rhombenzephalon und im zentralen Rumpfbereich sichtbar (oben links). Antikörperfärbungen auf Schnitten bestätigten die globale Verteilung des Matn-1 Proteins, mit einer verstärkten Expression in der Haut (oben rechts). Bei 72 hpf alten Fischen kann Matn-1 nur noch im Kraniofazialknorpel und in den entstehenden Flossenstrahlen detektiert werden (unten). t, Telenzephalon, d, Dienzephalon, m, Mesenzephalon, r, Rhombenzephalon, d, Dottersack, de, Dottersackerweiterung, n, Notochord. Sternchen und Balken kennzeichnen Ausschnittebenen der Serienschritte in den „Whole mount“ Präparationen.

Telenzephalon, Dienzephalon und Mesenzephalon schwächer ausgeprägt (Abb. 3.13, oben links). Immunfärbungen auf Schnitten zeigen, dass Matn-1 tatsächlich weiträumig im Rumpf des Embryos verteilt vorliegt, am stärksten in der Haut (Abb. 3.13, oben rechts). In drei Tage alten Embryonen hingegen kann Matn-1 nur im Kraniofazialknorpel detektiert werden (Abb. 3.13 unten).

### **3.2.2. Morphologische Analyse des Matrilin-1 Morpholino „Knockdowns“ im Zebrafisch**

Morpholino „Knockdowns“ (Morphanten) wurden generiert, indem zwei verschiedene translationsblockende Morpholinooligonukleotide und ein spleißstellenblockendes Morpholinooligonukleotid (Siehe Tab. 2.2) in den Dottersack von Zebrafischembryonen bis zum 4-Zellstadium injiziert wurden (vgl. Abb. 1.9 C und (Kimmel, Law, 1985)). Die Effizienz des „Knockdowns“ wurde durch immunhistochemische Färbungen und „Western blot“ überprüft (Abb. 3.14). Das Signal für Matn-1, aber nicht für Matn-3a, ein weiteres im Knorpel vorkommendes Mitglied der Matrilinfamilie, war auf Paraffinschnitten von 72 hpf alten Tieren stark reduziert (Abb. 3.14, A, durch Pfeile hervorgehoben). Analog dazu war die Gesamtmenge an Matn-1 Protein in Zebrafischextrakten von 72 hpf alten Morphanten im Vergleich zu unbehandelten Zebrafischen stark verringert (Abb. 3.14, B).

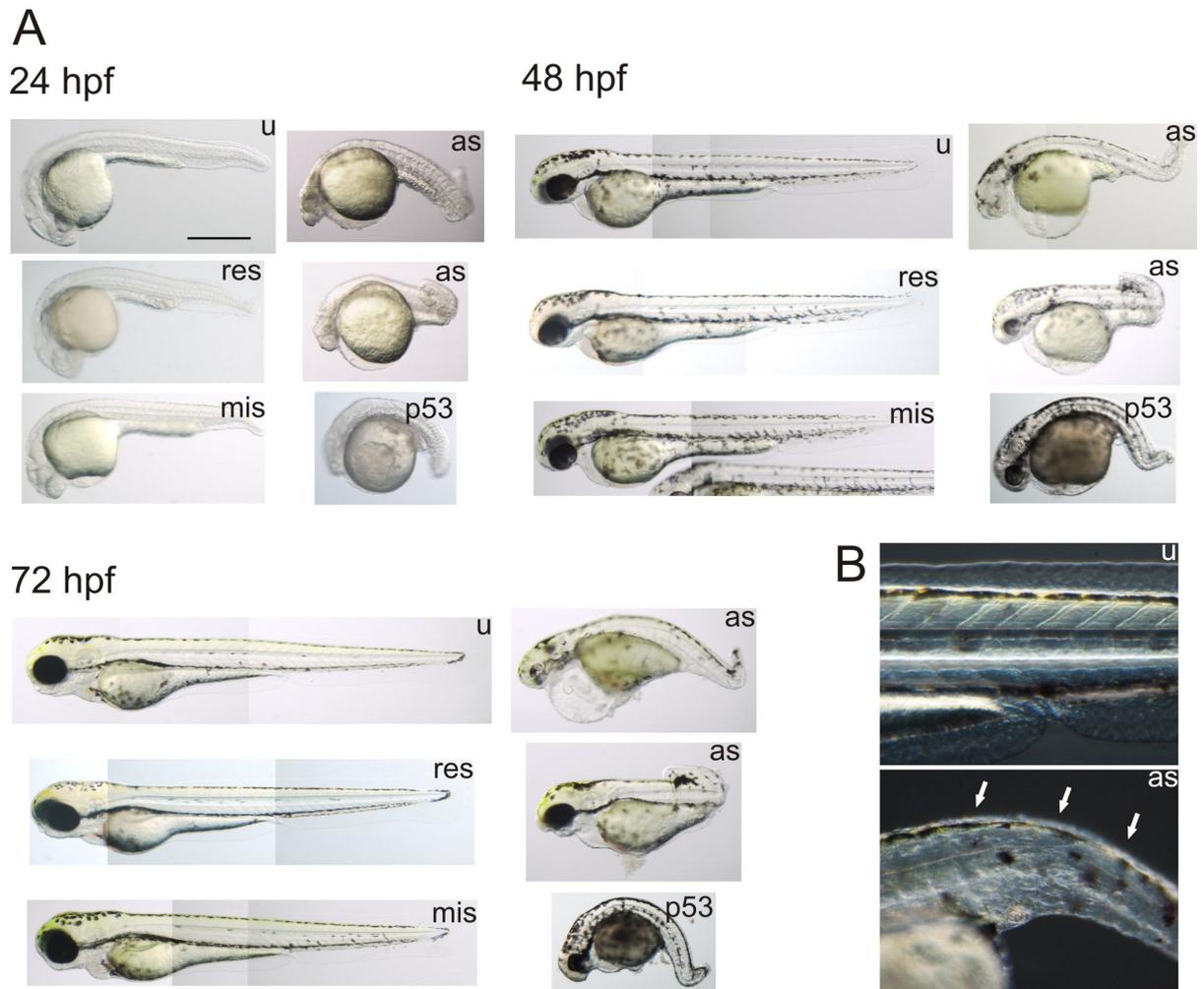
Im Allgemeinen riefen alle Morpholinos ähnliche phänotypische Veränderungen hervor. Die Morphanten zeigten von milden bis hin zu ernsten Phänotypen ein breites Spektrum an phänotypischen Merkmalen (Abb. 3.15 A). Bereits bei 24 hpf waren alle Morphanten kleiner und wiesen missgestaltete Köpfe und kürzere Dottersackerweiterungen auf. Der Rumpf von milden Phänotypen streckte sich nicht vollständig und der Schwanz war verkümmert und wellig abgeknickt (Abb. 3.15 A, 24 hpf, oberes as). Die beschriebenen Schäden waren bei den ernsten Phänotypen stärker ausgeprägt (Abb. 3.15 A, 24 hpf, unteres as). Um die Spezifität der „knockdown“ Experimente zu untermauern, wurden mRNA „Rettungsexperimente“, sowie p53 „ko-knockdown“ Experimente durchgeführt (siehe 1.2.4). Koinjektion von Matn-1 mRNA schwächte die Phänotypen so ab, dass die meisten behandelten Embryonen wildtypisch aussahen (Abb. 3.15 A, 24 hpf, res). Interessanterweise führte die Koinjektion von p53 Morpholinos, und damit der „knockdown“ von p53, zu einer Verstärkung der Phänotypen, bei denen die Embryonen extreme Wachstumsschäden und Missbildungen aufwiesen (Abb. 3.15 A, p53). Alle bei 24 hpf beschriebenen phänotypischen Merkmale



**Abb. 3.14: Verifizierung des Matn-1 „knockdowns“**

Bestätigung des Matn-1 „knockdowns“ durch Immunfluoreszenzfärbungen mit spezifischen gegen die VWA 2 Domäne von Matn-1 gerichteten Antikörpern auf Serienschnitten (A) und „Western blot“ (B). Das Signal für Matn-1, aber nicht für Matn-3a verschwand im Parachordalknorpel von Matn-1 Morphanten (A, durch Pfeile hervorgehoben). Matn-1 konnte im Gegensatz zu Extrakten unbehandelter Embryonen im „Western blot“ von Ganzkörperextrakten selbst bei langen Belichtungszeiten (60 Minuten und mehr) in Extrakten von Morphanten nicht detektiert werden (B). u, unbehandelt, as, Antisensemorphant, Ponceau, Ponceaufärbung als Ladekontrolle, Western,

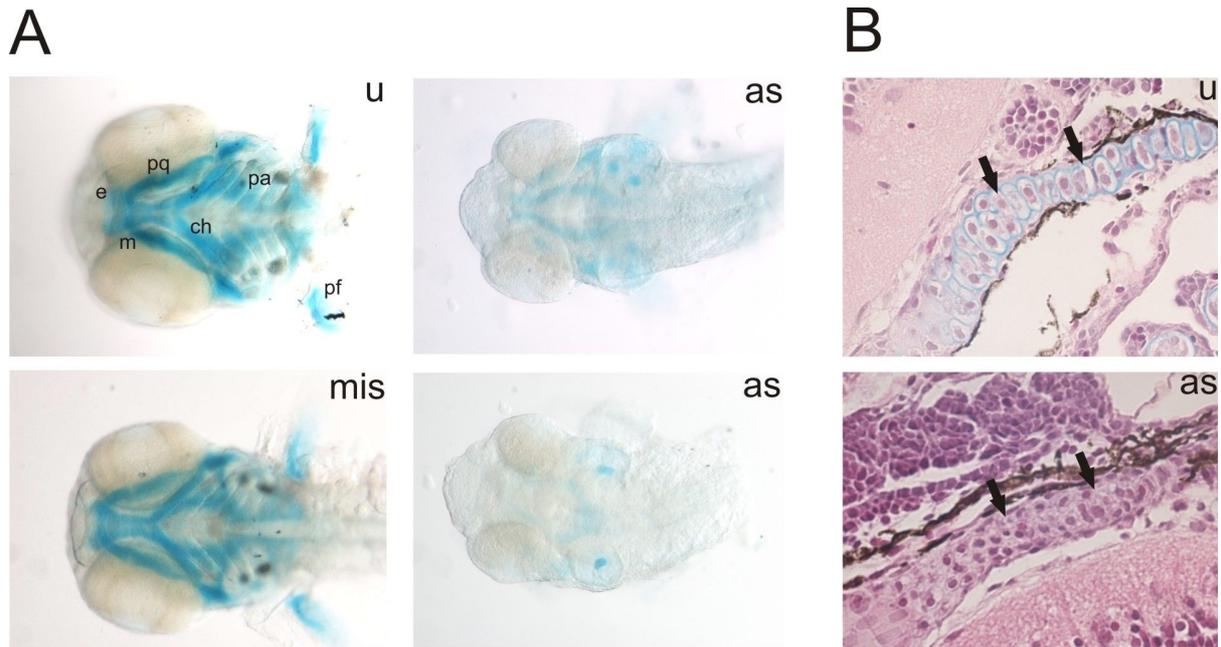
(Wachstumsdefekte, missgestaltete Köpfe und Achsenbildungsfehler) waren auch bei 48 hpf detektierbar. Zusätzlich zeigten sich sowohl in den Augen als auch im Rumpf Pigmentierungsdefekte (Abb. 3.15 A). Interessanterweise waren bei mit p53 Morpholino koinjizierten Morphanten keine Abweichungen im Pigmentierungsmuster zu erkennen (Abb. 3.15 A, 48 hpf, p53). Bei 72 hpf war eine Abnahme der phänotypischen Veränderungen zu verzeichnen. Im Allgemeinen war der Rumpf direkt oberhalb der Dottersackerweiterung weniger stark betroffen als der Rest der hinteren Körperachse, möglicherweise ein Hinweis auf verzögerte Achsenbildung oder eine mögliche Abschwächung des Phänotyps (Abb. 72 hpf, beide „as“). Eine nähere Betrachtung des Rumpfes von 72 hpf alten Morphanten zeigte,



### Abb. 3.15: Morphologische Analyse des Matn-1 „knockdown“ Phänotyps

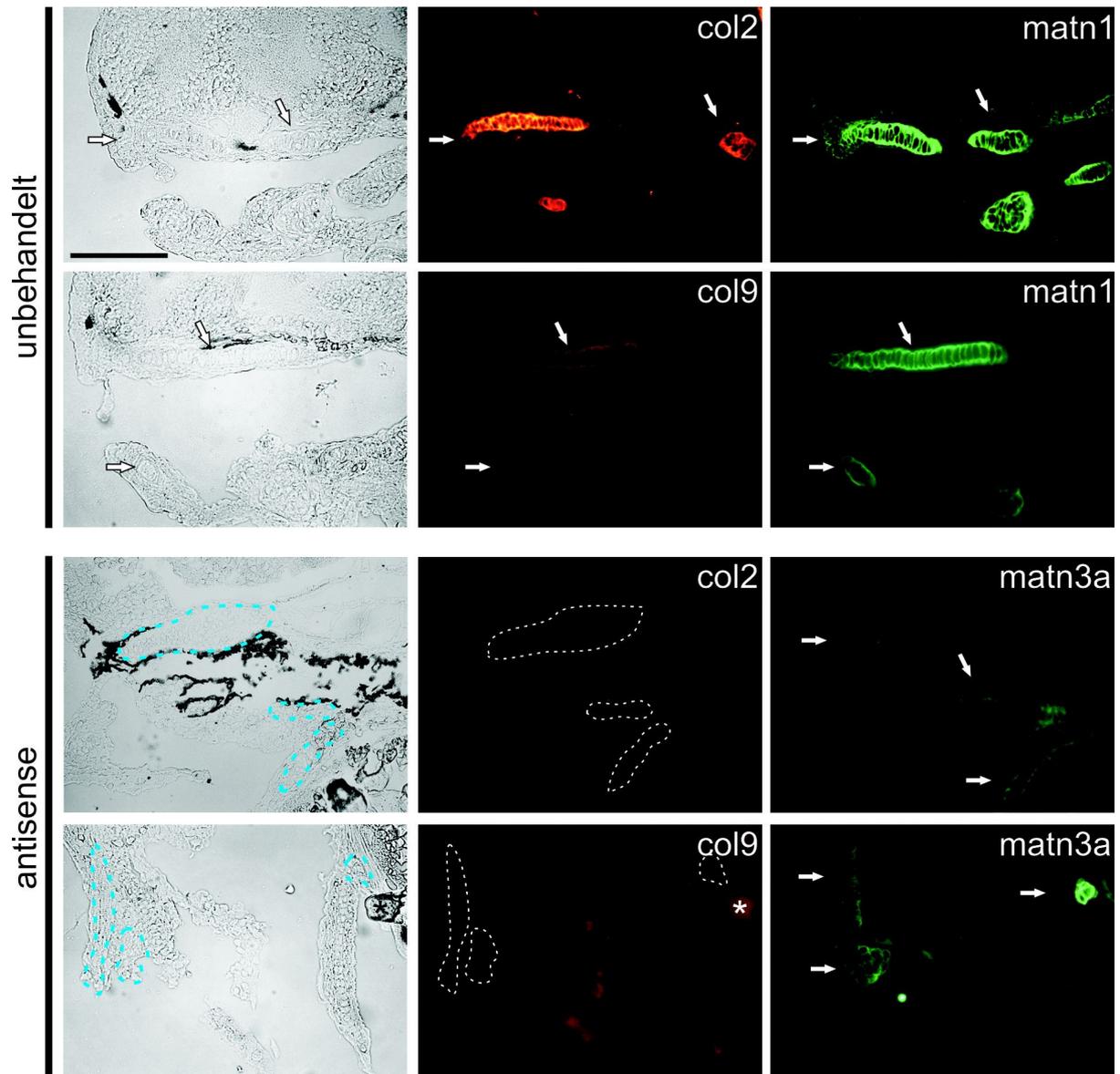
Analyse der phänotypischen Merkmale des Matn-1 „knockdowns“ während der Zebrafischentwicklung bei 24 hpf, 48 hpf und 72 hpf. Es wurden jeweils repräsentative Embryonen ausgewählt und individuell über den Beobachtungszeitraum verfolgt. Das obere „as“ stellt jeweils den milden, das untere „as“ den schweren Phänotypen dar. Matn-1 Morphanten zeigten, im Gegensatz zu den Kontrollen (mRNA Rettungskontrolle und 5-Mismatchkontrolle), verkürzte Körperachsen und Dottersackerweiterungen, sowie Missbildungen des Kopfes und verkümmerte, abgeknickte und gewellte Schwanzspitzen. Der Rumpf konnte sich nicht strecken. Diese Merkmale waren bei den ernsteren Phänotypen ausgeprägter (A, links oben, beide „as“). Die Koinjektion von p53 Morpholino war nicht in der Lage den Phänotypen abzuschwächen, im Gegenteil wurden die phänotypischen Merkmale verstärkt (A, links oben, p53). Alle bei 24 hpf auftretenden Merkmale waren bei 48 hpf in Morphanten weiterhin vorhanden. Darüber hinaus konnte ein Pigmentierungsdefekt im Rumpf und den Augen festgestellt werden, der jedoch bei der p53 Koinjektion nicht auftrat (A, rechts oben). Bei 72 hpf konnte eine schwächere Beeinträchtigung des Rumpfes oberhalb der Dottersackerweiterung beobachtet werden (A, unten links, beide „as“). Eine Detailbetrachtung des beschädigten Gewebes im Rumpf offenbarte den Verlust der Strukturen des Notochords und der „floor plate“, sowie der veränderten Geometrie der Somiten (B, mittlerer Pfeil). Distal und proximal der am stärksten betroffenen Bereiche konnten weniger stark beschädigte Bereiche identifiziert werden (B, rechter und linker Pfeil). u, unbehandelt, res, „rescue“ Rettungskontrolle, mis, 5-Mismatchkontrolle, as, Antisensemorphant, p53, p53/Matn-1 Koinjektion, Maßstab, 500µm.

dass die Abwesenheit von Matn-1 zum Verlust der Notochordintegrität und der „floor plate“ führt. Darüberhinaus verloren die Somitengrenzen ihre scharfe, keilförmige geometrische Anordnung (Abb. 3.15 B). Interessanterweise befanden sich distal und proximal zu den am meisten betroffenen Stellen weniger stark beschädigte Bereiche (durch Pfeile hervorgehoben). Um die Entwicklung des Kraniofazialskeletts zu untersuchen, wurden „Whole mount“ Alcianblaufärbungen von 72 hpf alten Embryonen durchgeführt. Während die Mismatchkontrollen keine wahrnehmbaren Unterschiede zu den unbehandelten Embryonen aufwiesen, zeigten Matn-1 Morphanten einen zunehmenden Verlust an Proteoglykanfärbung der Kopfknochen, der jeweils mit dem phänotypischen Schweregrad korrelierte. Bei milden Phänotypen verschwand zunächst die Färbung der Ceratobranchial- und Basibranchialknochen. Die Ethmoidplatte, der Palatoquadrat sowie die Parachordal-, Trabekulär- und Meckel-Knochen wiesen eine verminderte Färbung oder, im Falle des Palatoquadrats, eine partielle Färbung des distalen Teils auf (Abb. 3.16 A, oberes „as“). Dahingegen wurde bei schweren Phänotypen ein beinahe vollständiger Verlust der Proteoglykanfärbung beobachtet. Eine schwache und unvollständige Proteoglykanfärbung konnte nur in Teilen des Neurokraniums (Ethmoidplatte, Parachordal- und Trabekulärknochen) detektiert werden (Abb. 3.16 A, unteres „as“). Eine nähere Untersuchung der Bereiche, in denen sich der Trabekulärknochen in Morphanten befinden sollte, ergab, dass trotz der vorhandenen Bindegewebsanlagen diese keinerlei Knochenmerkmale aufwiesen. Im Gegensatz zu unbehandelten Embryonen konnte in Morphanten weder die charakteristische münzrollenartige Anordnung der Zellen, noch die intensive Blaufärbung von Matrixproteoglykanen nachgewiesen werden (Abb. 3.16, Pfeile). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von Matn-1 einen vollständigen Verlust der Kollagen II Expression, dem Hauptkollagen des Knochens, und der Kollagen IX Expression zur Folge hatte (Abb. 3.17, as). Eine genauere Untersuchung der beschriebenen Verhältnisse wurde aufgrund der zur Verfügung stehenden, durch ihre Spezifität für die vorliegende Arbeit jedoch suboptimalen, gegen Maus Kollagen II und IX gerichteten Antikörper, verhindert. Im Gegensatz dazu war die Expression von Matn-3a, einem weiteren im Knochen exprimierten Mitglied der Matrilinfamilie, vom Matn-1 „knockdown“ nicht beeinträchtigt (Abb. 3.14 und Abb. 3.17, durch Pfeile hervorgehoben). Um die Spezifität der „knockdown“ Methode zu überprüfen, wurde eine Reihe von Kontrollen durchgeführt und sowohl der relative Anteil der phänotypischen Larven als auch der Schweregrad des Phänotyps 24 Stunden nach Injektion erfasst. Die Injektion steigender Mengen an antisense Morpholino führte zu einem



**Abb. 3.16: Morphologische Analyse des Kraniofazialskeletts in Matn-1 „knockdowns“**  
 Alcianblaufärbungen zur Detektion von Proteoglykanen des Knorpels in „Whole mount“ Präparaten (A) und Serienschnitten (B) zur Analyse der Bildung des Kraniofazialskeletts in Matn-1 „knockdowns“. Die Kraniofazialknorpel in milden Phänotypen zeigten eine generelle Verminderung der Proteoglykanfärbung. Im Falle des Palatoquadrats konnte nur noch der distale Knorpel angefärbt werden. Eine Anfärbung des gesamten Kiemenapparats war nicht möglich (A, oberes „as“). In den ernstesten Phänotypen waren nur noch Teile des Neurokraniums (Parachordalknorpel, Trabekulärer Knorpel und Ethmoidplatte) detektierbar, die aber eine weitaus schwächere Färbung aufwiesen als die entsprechenden Organe beim milden Phänotypen (A, unteres „as“). Das Kraniofazialskelett von 5-Mismatchkontrollen zeigte keinen Unterschied zu jenem von unbehandelten Embryonen (A, links). Die Detailansicht des Trabekulärknorpels in Morphanten zeigte, dass obwohl Extrazellulärmatrix abgelegt wird, diese weder morphologisch (fehlende münzrollenartige Zellanordnung) noch chemisch (fehlende Proteoglykanfärbung) als Knorpelstruktur identifiziert werden konnte (B, durch Pfeile hervorgehoben). u, unbehandelt, mis, 5-Mismatchkontrolle, as, Antisensemorphant, e, Ethmoidplatte, m, Meckel-Knorpel, pq, Palatoquadratum, ch, Ceratohyalknorpel, pa, Kiemenbögen, pf, Brustflossenstrahlen.

dosisabhängigen Anstieg sowohl des Anteils an phänotypischen Larven, als auch des Schweregrads der phänotypischen Merkmale. Kontrollexperimente mit einem „5-mismatch“ Morpholino zeigten ebenfalls einen wenn auch schwächeren dosisabhängigen Anstieg an Phänotypenanzahl und Schweregrad. Dies zeigt deutlich, dass das Einführen von 5 fehlpaarenden Basen in die Morpholinosequenz die Bindungsaffinität der Morpholinos zur Ziel-mRNA zwar verringert, diese jedoch nicht eliminiert. Koinjektion von 3 pg Matn-1 Vollängen-mRNA und 10 ng antisense „splice site“ Morpholino rettete den Phänotypen und reduzierte das relative Phänotypenaufreten um etwa 60% (Abb. 3.18).

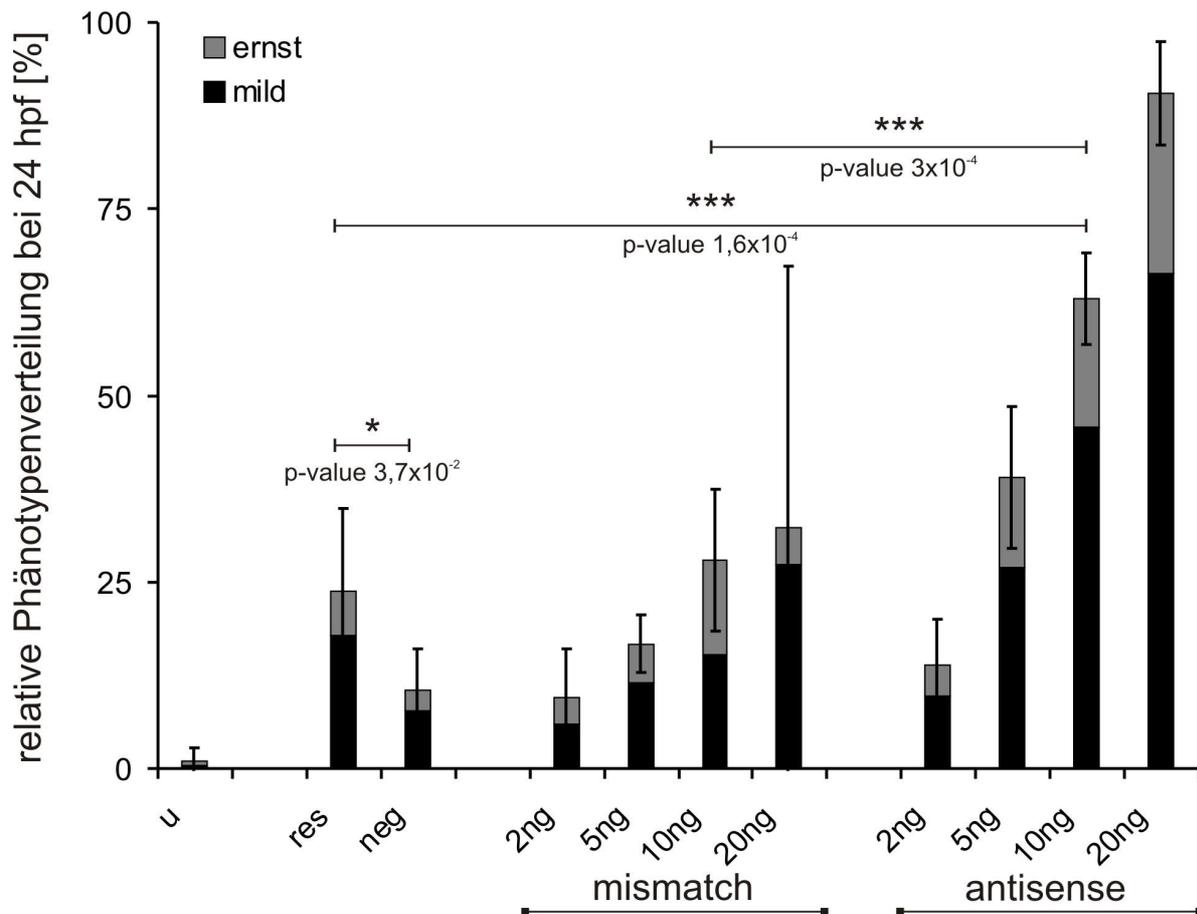


**Abb. 3.17: Analyse der Kollagene II und IX in Matn-1 „knockdowns“**

Immunfluoreszenz Doppelfärbungen mit spezifischen gegen Kollagen II und Kollagen IX gerichteten Antikörpern. Die gegen Kollagen II und Kollagen IX gerichteten Antikörper detektierten in 72 hpf alten unbehandelten Zebrafischlarven dieselben Strukturen wie Antikörper gerichtet gegen Matn-1. Es werden jeweils die Knorpel des Kraniofazialskeletts spezifisch angefärbt (unbehandelt, durch Pfeile hervorgehoben). In 72 hpf alten Morphanten verschwand das Signal sowohl für Kollagen II als auch für Kollagen IX. Matn-3a konnte weiterhin detektiert werden, ein Beweis dafür, dass sich die Knorpel-Bindegewebsanlagen in der Schnittebene befanden (as, durch umrandete Bereiche und Pfeile hervorgehoben). Sternchen, Artefakt, Maßstab, 100µm

### 3.2.3. Transmissionselektronenmikroskopie

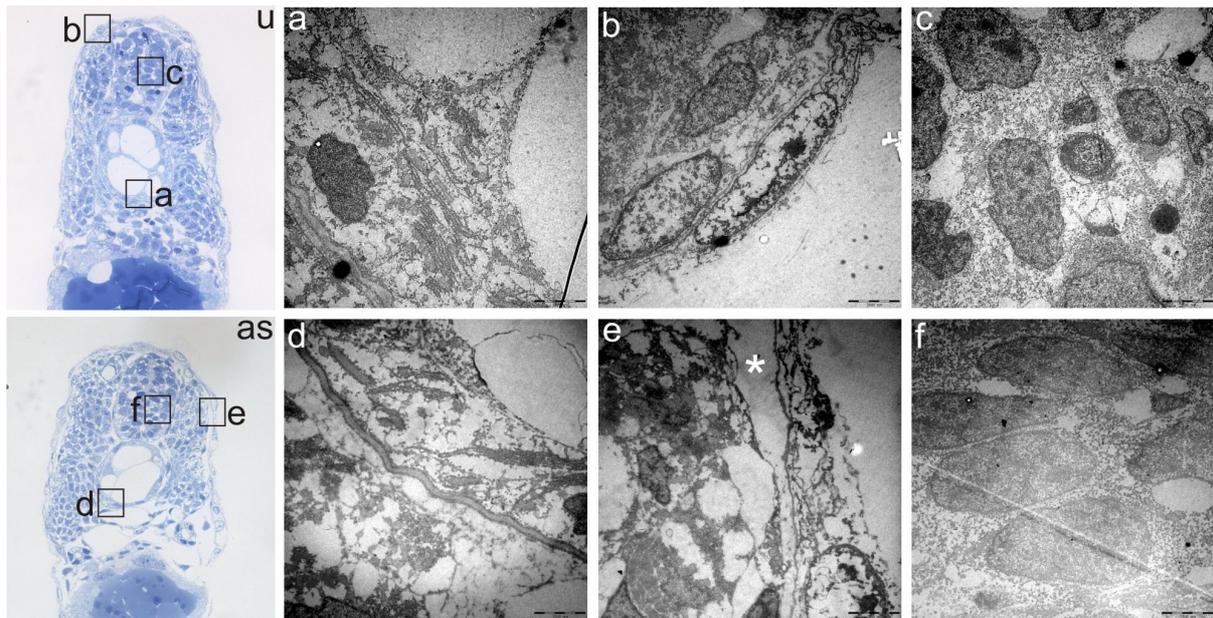
Um die phänotypischen Veränderungen in Matn-1 Morphanten auf subzellulärer Ebene eingehender zu untersuchen, wurden Ultradünnschnitte mittels Transmissions-



**Abb. 3.18: Statistische Analyse der “splice site“ Morpholinospezifität**

Der relative Anteil der phänotypischen Larven sortiert nach mildem und ernstem Phänotyp bei 24 hpf. Mit Antisensemorpholino injizierte Larven zeigten eine dosisabhängige Zunahme sowohl der relativen Phänotypendichte, als auch der erreichten Schweregrade (antisense). Die Injektion des zugehörigen 5-Mismatchmorpholinos führte ebenfalls zu einem dosisabhängigen Zuwachs der angegebenen Parameter, jedoch blieb die Zunahme signifikant kleiner als bei der Injektion mit dem Antisensemorpholino. Die große Varianz des 20 ng-Wertes resultiert aus der erhöhten Todesrate der Embryonen (mismatch). Die Koinjektion von 3 pg Matn-1 mRNA und 10 ng Antisensemorpholino führte zu einer signifikanten Verringerung der Phänotypendichte und des -Schweregrads (res). Da die mRNA-Menge nicht austitriert wurde, ergab sich ein signifikanter Unterschied in den verwendeten Parametern zur Injektion eines Negativ-(Neutral)Morpholinos (neg).

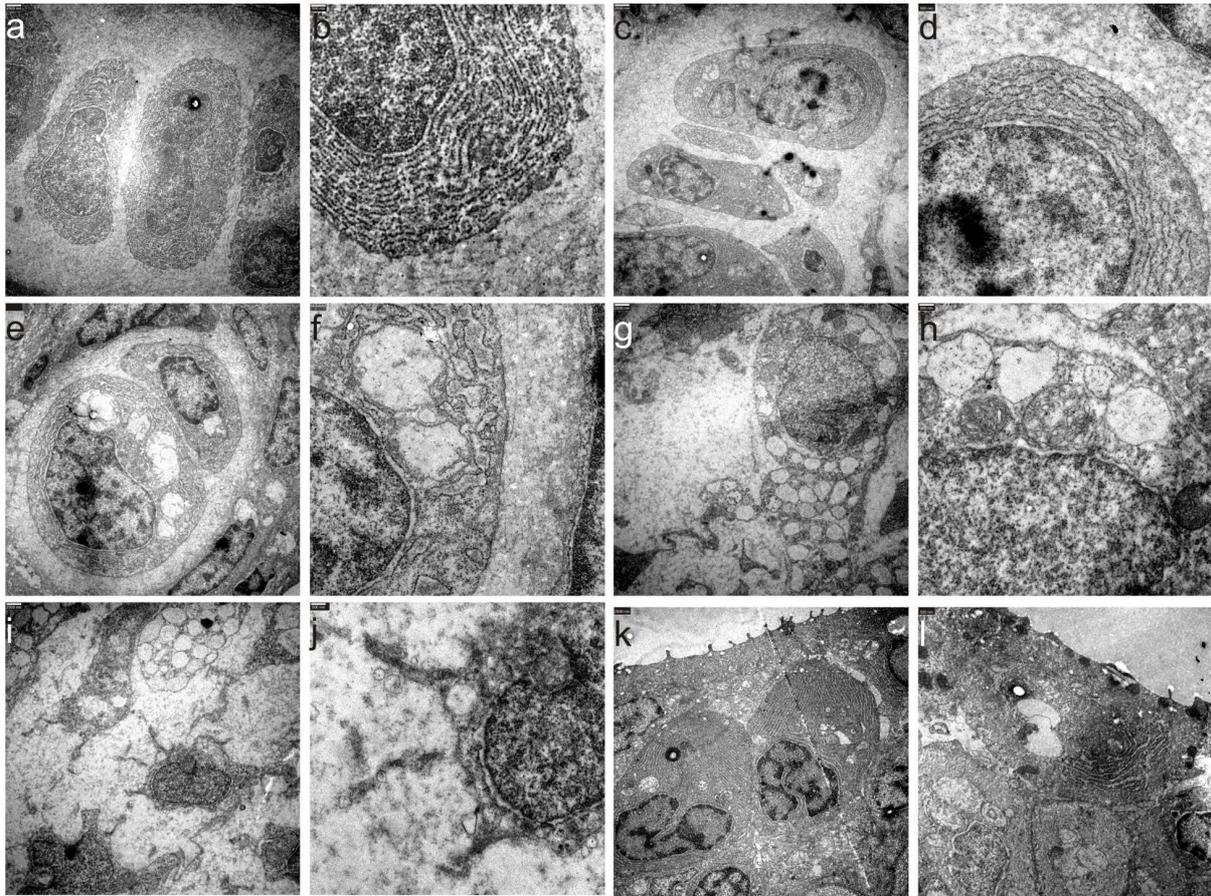
elektronenmikroskopie (TEM) analysiert. Bei 24 hpf zeigten, verglichen zu den entsprechenden Organen unbehandelter Embryonen, weder das Notochord (Abb. 3.19 d) noch das sich entwickelnde Rückenmark (Abb. 3.19 f) von Morphanten signifikante Unterschiede (Abb. 3.19 a,c). Jedoch konnten an der Epidermis von Morphanten leichte lokale Ablösungs-



**Abb. 3.19: Transmissionselektronische Charakterisierung des subzellulären Phänotyps von Matn-1 „knockdowns“ bei 24 hpf**

Vergleich zwischen Semidünnschnitten (zur groben morphologischen Orientierung angegeben) und den darin angegebenen TEM Vergrößerungen von Querschnitten unbehandelter Embryonen (obere Reihe, u) und Morphanten (untere Reihe, as). Weder Notochord noch Rückenmark von Morphanten (d bzw. f) zeigten signifikante Unterschiede zu den entsprechenden Organen unbehandelter Embryonen (a bzw. c). Die Haut von Morphanten zeigte im Vergleich zur Haut unbehandelter Embryonen leichte Ablösungserscheinungen vom darunterliegenden Gewebe (e, mit einem Sternchen hervorgehoben). Maßstab, 2500nm

erscheinungen vom darunterliegenden Gewebe festgestellt werden (Abb. 3.19 e, mit einem Sternchen hervorgehoben). Bei 72 hpf wurden deutliche morphologische Unterschiede zwischen Ethmoidplattenchondrozyten unbehandelter Embryonen und Morphanten ersichtlich. Morphante Chondrozyten wiesen eine verstärkte Auflösung der Struktur des Endoplasmatischen Retikulums (ER) auf, sowie eine erhöhte Anzahl an toten Chondrozyten, die mit steigendem phänotypischen Schweregrad zunahm (Abb. 3.20). Die zentralen Chondrozyten unbehandelter Embryonen wiesen die typische, gestaffelte, münzrollenartige Anordnung auf, waren von ähnlicher Größe und ihr Endoplasmatisches Retikulum besaß konzentrische, hochgradig parallel angeordnete Membranstapel. Die Mitochondrien wiesen eine kompakte Struktur, sowie eine ebenfalls kompakte und elektronendichte Matrix auf (Abb. 3.20 a, b). Obwohl noch immer säulenartig angeordnet, verloren im Gegensatz dazu die Chondrozyten der phenotypisch mildesten Morphanten die streng münzrollenartige Anordnung und zeigten bezüglich der Zellgröße eine breite Varianz auf. Die Membranstapel des Endoplasmatischen Retikulums verloren teilweise ihre parallele Anordnung, erschienen „wellig“ und enthielten mehr Material, was zu einer höheren Schichtdicke der Stapel führte.



**Abb. 3.20: Transmissionselektronische Charakterisierung des subzellulären Phänotyps morphanter Ethmoidplattenchondrozyten bei 72 hpf**

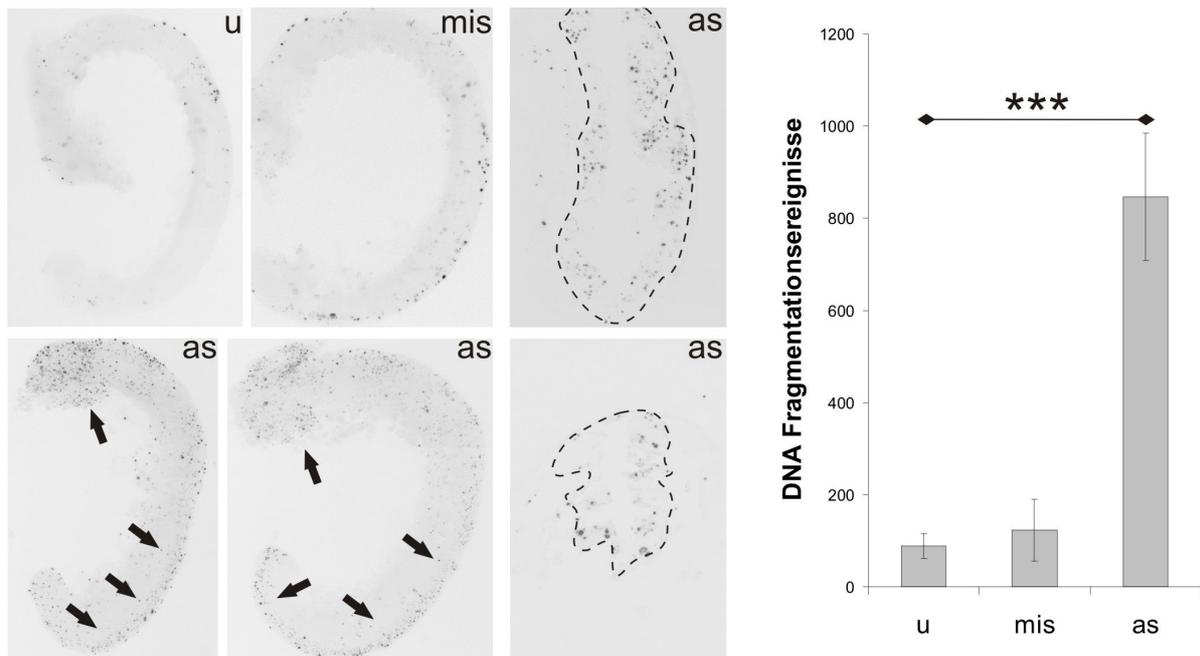
Darstellung progressiver morphologischer Veränderungen in Ethmoidplattenchondrozyten mit steigender Schwere des Phänotyps. Im Vergleich zu Chondrozyten unbehandelter Embryonen (a, b) verloren Chondrozyten mild phänotypischer Morphanten ihre gleichmäßige Größe und ihre münzrollenartige Anordnung. Mitochondrien erscheinen nicht nur als elektronendichte und kompakte Gebilde, sondern auch als aufgeblähte Strukturen geringer Elektronendichte (c). Das ER solcher Zellen wies keine konzentrische Parallelität der Membranstapel auf; die einzelnen Membranen erschienen wellig (d). Das Zellinnere von Chondrozyten intermediärer Phänotypen wurde zu großen Teilen von aufgeblähten Mitochondrien ausgefüllt. Das ER verlor jede Struktur und die Membranen verliefen ohne erkennbares Muster durch das Zytoplasma (e, f). Schwere Phänotypen wiesen eine verringerte Chondrozytenmenge auf. Die verbliebenen Chondrozyten waren von großen Mengen an extrazellulärer Matrix umgeben, rundlich angeschwollen und vollständig mit aufgeblähten Mitochondrien angefüllt (g, h). Vereinzelt konnten einzelne von ECM eingeschlossene Zellkerne und Zelltrümmer identifiziert werden (i, j). Andere Zellen in der Haut von Morphanten mit ernstem Phänotyp wiesen keinerlei ER Veränderungen auf, ein Hinweis darauf, dass der Knockdown chondrozytenspezifisch war (k, l). a, c, e, g, i, k 3000x Vergrößerung, Maßstab, 2500nm, b, d, f, h, j, l 12000x Vergrößerung, Maßstab, 500nm.

Die Mitochondrien erschienen aufgebläht und verloren ihre elektronendichte Erscheinung (Abb. 3.20 c, d). Schwere Phänotypen wiesen eine verringerte Anzahl an abgerundeten und angeschwollenen Chondrozyten auf. Ein signifikanter Anteil des intrazellulären Raumes

wurde von den bereits beschriebenen angeschwollenen Mitochondrien eingenommen. Die konzentrischen, parallel orientierten Membranstapel des ER waren bei schweren Phänotypen nicht auszumachen. Stattdessen nahm das Organell die Form eines weitmaschigen, chaotischen Membrannetzes an (Abb. 3.20 e, f). Die Struktur des Ethmoidplattenknorpels war in den schwersten Phänotypen kaum auszumachen. Eine Orientierung im umliegenden Gewebe war nur anhand der dem Trabekulärknorpel benachbarten Melanozyten möglich. Einzelne überlebende Zellen der Ethmoidplatte waren umgeben von extrazellulärer Matrix und darin eingebetteter Zelltrümmer, die möglicherweise bereits gestorbenen Chondrozyten entstammten. Der Intrazellulärraum der überlebenden Chondrozyten wurde vollständig von aufgeblähten Mitochondrien ausgefüllt und darüber hinaus konnten keine Bestandteile eines Endoplasmatischen Retikulums ausgemacht werden (Abb. 3.20 g, h). Gelegentlich konnten in Extrazellulärmatrix eingebettete Zellkerne, umgeben von Zelltrümmern, gefunden werden, ein Hinweis darauf, dass eher ein regulierter Zelltod und nicht Nekrose die Ursache für das Chondrozytensterben darstellte (Kerr u. a., 1972; Krysko u. a., 2008) (Abb. 3.20 i, j). Hautzellen wiesen eine intakte Morphologie sowie ein normales Endoplasmatisches Retikulum auf, ein Hinweis darauf, dass der Matn-1 „knockdown“ einen chondrozytenspezifischen Effekt hatte (Abb. 2.20 k, l).

#### **3.2.4. TUNEL-Färbungen**

Um festzustellen, ob der „knockdown“ von Matn-1 während der frühen Expression bei etwa 15 hpf bei der Etablierung des frühen Phänotyps zu Zelltod (gemessen anhand von fragmentierter DNA) führt, wurde die TUNEL-Methode (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling) verwendet. 18 hpf alte Morphanten zeigten einen um den Faktor 8 erhöhten Anteil an DNA Fragmentierungsereignissen im Vergleich zu unbehandelten Embryonen. Dabei konnten die meisten Fragmentierungsereignisse in und um die Augen sowie im entstehenden Rückenmark detektiert werden (Abb. 3.21).

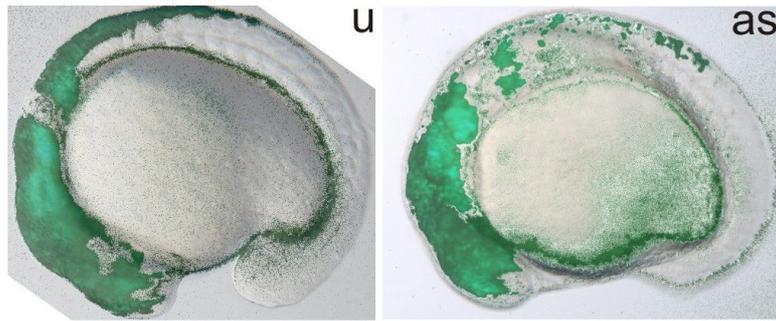


**Abb. 3.21: TUNEL-Färbung zur Ermittlung und Quantifizierung von Zelltod in Morphanten bei 18 hpf**

Zur besseren Kontrastdarstellung gewählt Graustufen-Negativdarstellung von exemplarischen Fluoreszenzbildern von Quetschpräparaten 18 Stunden alter unbehandelter Embryonen (u), 5-Mismatchkontrollen (mis) und Antisensemorphanten (as). Die Anzahl der DNA Fragmentierungsereignisse erhöhte sich in Morphanten um den Faktor 8. Der Hauptteil der detektierten Fluoreszenzsignale befand sich in und um die Augen, so wie im entstehenden Rückenmark (durch Pfeile hervorgehoben). Das entstehende Rückenmark wurde bei Färbungen auf Schnitten mit einer gestrichelten Linie eingerahmt.

### 3.2.5. Untersuchung der Neuralleistenzellwanderungen

Da erhöhter Zelltod im entstehenden neuralen Gewebe festzustellen war, der potentiell mit den morphogenetischen Vorgängen in der frühen Zebrafiscentwicklung interferieren könnte (siehe ), wurde die Wanderung der Neuralleistenzellen (Vorläufer unter anderem aller Kraniofazialknorpelzellen) in lebenden *Sox10* transgenen Zebrafischembryonen (Carney u. a., 2006) beobachtet. Bei der *Sox10* Zebrafischlinie wird das fluoreszierende Protein GFP unter der Kontrolle des *Sox10* Promotors exprimiert, wobei *Sox10* ein Marker für Neuralleistenzellen darstellt. Über den Zeitraum der Neuralleistenzellwanderung hinweg konnten im Bezug auf die Wanderungsrichtung und Wanderungsgeschwindigkeit keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 3.22).

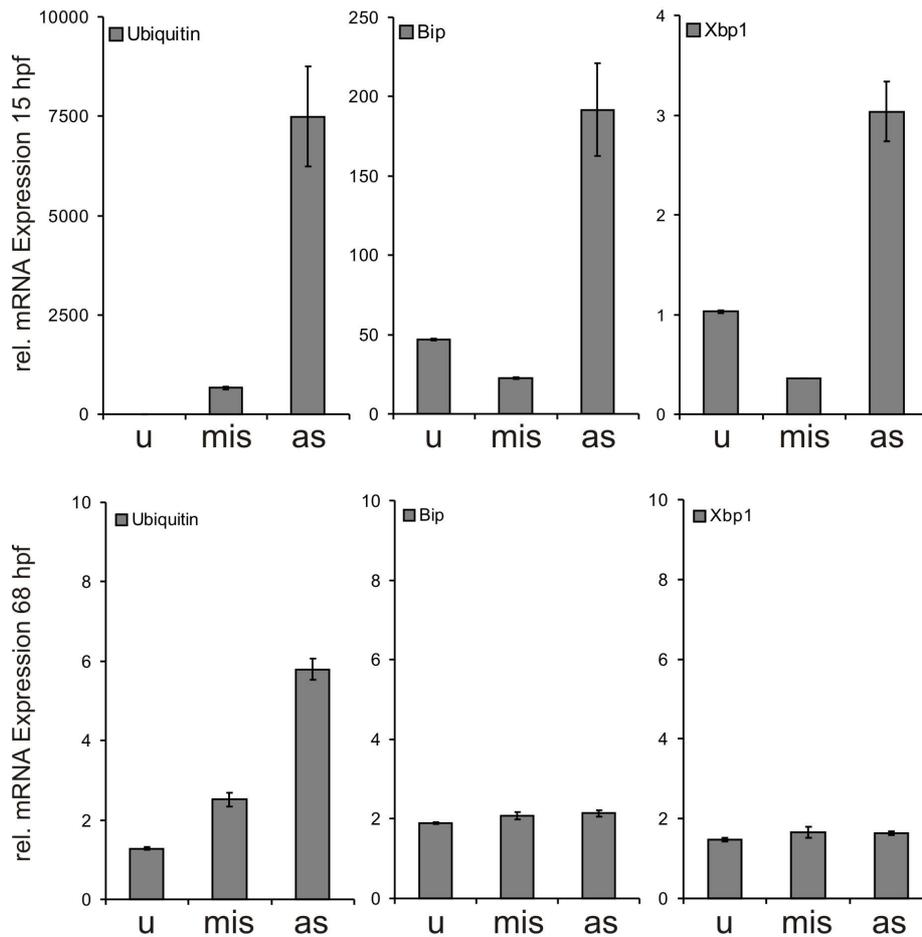


**Abb. 3.22: *In vivo* Untersuchung der Neuralleistenzellwanderung während der Zebrafischentwicklung**

Repräsentative Darstellung von *Sox10* Embryonen im 13 Somiten Stadium. Durchlichtbilder wurden mit Fluoreszenzbildern überlagert. Zwischen Morphanten (as) und unbehandelten Embryonen (u) sind keine offensichtlichen Unterschiede festzustellen.

**3.2.6. Analyse von Zellstressmarkern**

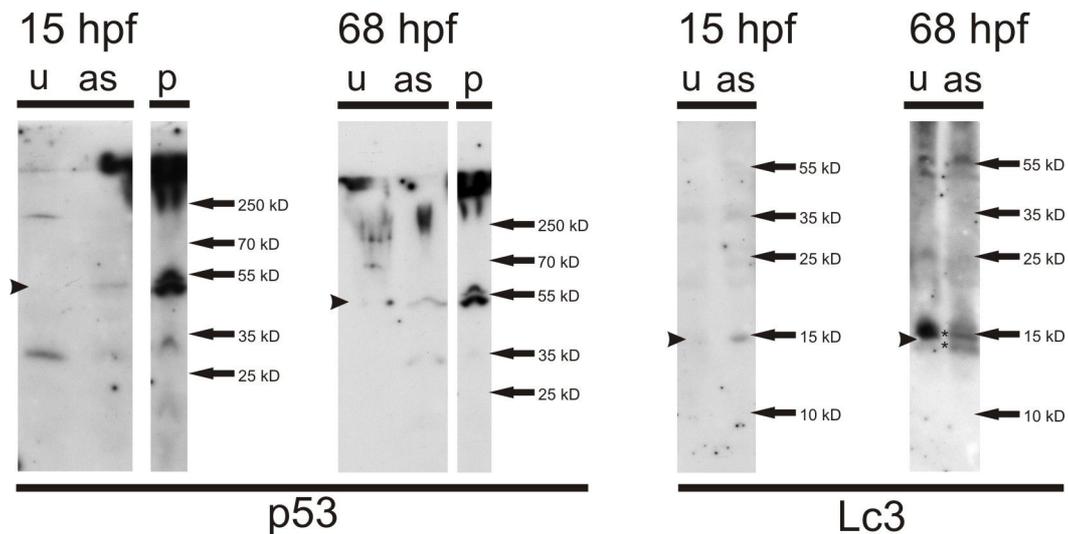
Die TEM-Analyse zeigte eine deutliche Veränderung des Endoplasmatischen Retikulums in morphanten Chondrozyten (siehe ). Um die Rolle von ER-Stress in der Etablierung des Phänotyps zu untersuchen, wurde das relative Expressionsniveau der Proteine Ubiquitin (proteasomvermittelte Abbaumaschinerie), BIP und XBP1 (ER-Stressmarker bzw. „unfolded protein response“ (UPR) Zellstressmarker, siehe 1.1.3.2 und (Leighton u. a., 2007)) durch quantitative PCR bestimmt (Abb. 3.24). Bei 15 hpf zeigten Morphanten im Vergleich zu den Mismatchkontrollen und unbehandelten Embryonen einen starken Anstieg der Ubiquitin- und BIP-mRNA. Die Expression von XBP1 war ebenfalls erhöht, allerdings nicht im selben Maße wie die von Ubiquitin und BIP. Dies kann als ein Hinweis auf eine Beteiligung des UPR-Wegs bei der Etablierung des Matn-1 „knockdown“ Phänotyps gedeutet werden, der eventuell nicht im selben Maße ausschlaggebend ist wie die von Ubiquitin oder BIP (Abb. 3.24 obere Reihe). Bei 68 hpf zeigte weder die Expression von XBP1 noch die Expression von BIP deutliche Unterschiede zwischen Morphanten und Mismatchkontrollen bzw. unbehandelten Embryonen. Abweichend dazu war das Expressionsniveau von Ubiquitin weiterhin erhöht, allerdings lediglich um den Faktor 4, im Gegensatz zum Faktor von 7500 bei 15 hpf (Abb. 3.24 untere Reihe). Daher ist anzunehmen, dass weder ER-Stress noch UPR eine wichtige Rolle bei der Etablierung des späten Phänotyps in den Chondrozyten spielen. Neben dem ER-Stress könnte auch Autophagie für die aufgeblähten Mitochondrien (Abb.3.20) der Chondrozyten verantwortlich sein (Klionsky u. a., 2007; Mizushima, 2004).



**Abb. 3.23: Untersuchung der relativen Expression von Ubiquitin, BIP und XBP1 bei 15 hpf und 68 hpf**

In 15 hpf alten Morphanten waren sowohl Ubiquitin als auch die Zellstressmarker BIP und XBP1 hochreguliert (obere Reihe). Bei 68 hpf alten Morphanten war nur noch Ubiquitin deutlich, wenn auch um drei Zehnerpotenzen weniger stark, hochreguliert (untere Reihe). U, unbehandelt, mis, 5-Mismatchkontrolle, as, Antisensemorphant.

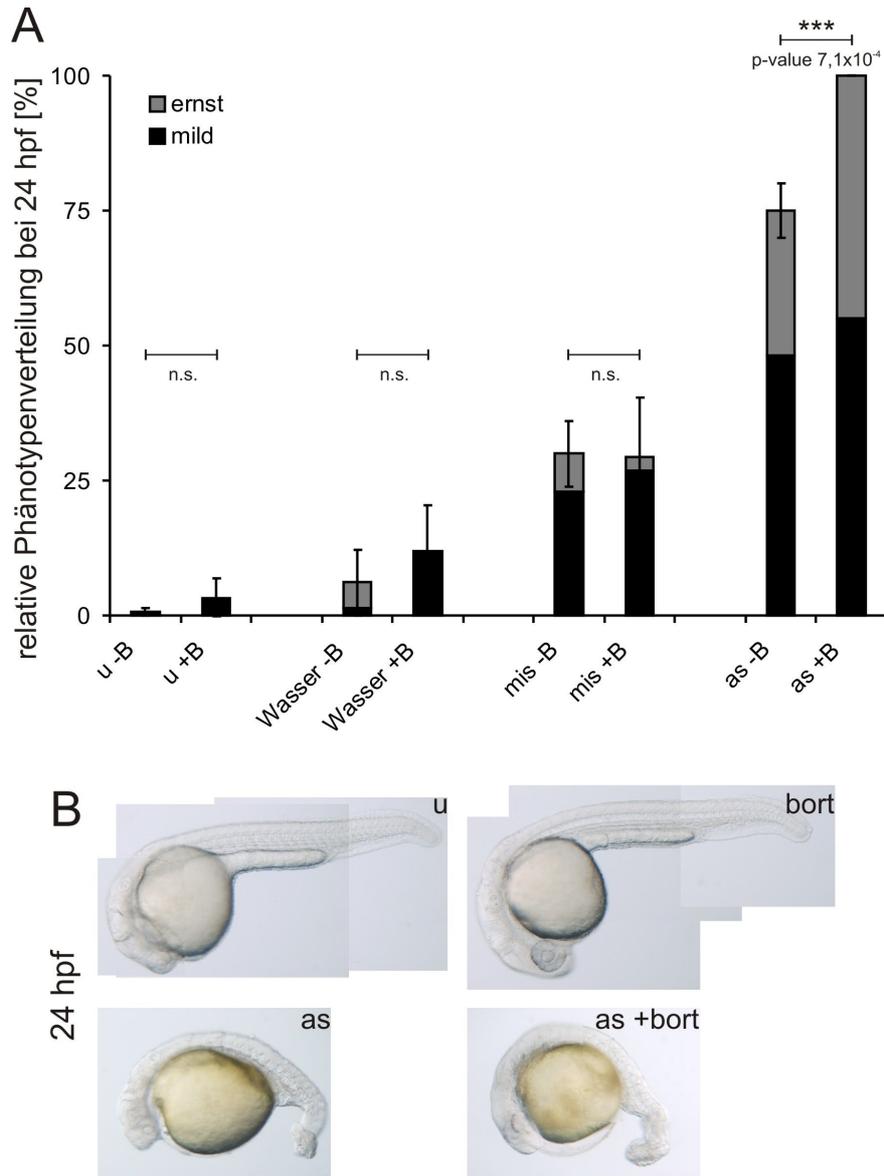
Da aktuelle Studien von einer möglichen Verbindung zwischen Autophagie und p53 vermittelter Apoptose berichten (Gump, Thorburn, 2011), wurde der Status von p53 und dem Autophagiemarker LC3 mittels „Western blot“ Analyse untersucht. Nur in Morphanten konnte sowohl bei 15 hpf als auch bei 68 hpf stabilisiertes p53 nachgewiesen werden (Abb. 3.24, links). Bei 15 hpf wurde LC3 nur in seiner nicht lipidierten, inaktiven und im elektrischen Feld langsamer wandernden Form gefunden, ein Hinweis darauf, dass zu diesem Zeitpunkt Autophagie keine Rolle spielt. Bei 68 hpf hingegen wurde in Morphanten zusätzlich zur inaktiven, die aktive, lipidierte und schneller wandernde Form von LC3 sichtbar (Abb. 3.24, rechts). Dies ist ein klares Zeichen dafür, dass die Autophagie in Morphanten stattfindet und die Zellen ihren Abbau betreiben.



**Abb. 3.24: „Western blot“ Analyse von p53 und dem Autophagiemarker LC3**

Extrakte von 15 hpf alten und 68 hpf alten unbehandelten (u) und morphanten Embryonen (as) wurden mittels spezifisch gegen Zebrafisch p53 und humanem LC3 gerichteter Antikörper untersucht. Induktion von p53 vermittelter Apoptose in nicht injizierten Embryonen durch den Topoisomerasenhemmer Camptothecin diente als Positivkontrolle zur p53 Stabilisierung (p). Stabilisiertes, und damit aktives p53 konnte sowohl bei 15 hpf als auch bei 68 hpf nur in den Morphanten nachgewiesen werden (links, Laufhöhe des p53 Proteins durch Pfeilspitze markiert). Aktives LC3 hingegen (die schneller wandernde Bande) fand sich nur in Extrakten von 68 hpf alten Morphanten (rechts, durch Sternchen markiert).

Um eine Beteiligung des Proteasoms bei der phänotypischen Veränderung in Matn-1 „knockdowns“ zu untersuchen, wurden unbehandelte, mit Wasser injizierte und Mismatchkontrollen bzw. Antisensemorphanten in Embryonenpuffer mit 10  $\mu$ M Proteasominhibitor Bortezomib inkubiert. Während die Inhibition des Proteasoms weder die unbehandelten noch die mit Wasser oder Mismatchmorpholinos injizierten Embryonen beeinflusste, führte diese Behandlung zu einer Erhöhung der relativen Phänotypenrate bei Antisensemorphanten von etwa 75% auf 100% (Abb. 3.19 A). Morphologisch waren in mit 10  $\mu$ M Bortezomib inkubierte Morphanten identisch mit denen, die in normalem Aufzuchtmedium inkubiert wurden. Diese Befunde deuten auf eine Beteiligung der zellulären Abbaumaschinerie an der Entwicklung des Matn-1 „knockdown“ Phänotyps hin.



**Abb. 3.25: Einfluss des Proteasominhibitors Bortezomib auf die Phänotypverteilung und Ausprägung des Matn-1 „knockdown“ Phänotyps**

Der relative Anteil der phänotypischen Larven sortiert nach mildem und erstem Phänotyp bei 24 hpf. Die Inkubation der unbehandelten (u), mit Wasser und 5-Mismatchmorpholino (mis) injizierten Larven in 10  $\mu$ M Bortezomib änderte die relative Phänotypenmenge nicht, verringerte aber den Anteil an schweren Phänotypen. Inkubation von Matn-1 Morphanten in 10  $\mu$ M Bortezomib hingegen erhöhte den Anteil phänotypischer Larven auf 100% und erhöhte gleichzeitig den Anteil an schweren Phänotypen (A). Morphologisch waren mit und ohne Bortezomib behandelte Morphanten nicht zu unterscheiden (B). u, unbehandelt, mis, 5-Mismatchkontrolle, as, Antisensemorphant, +/- B/bort, unter Zugabe oder unter keiner Zugabe von Bortezomib.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit diente der Zebrafisch als Modellorganismus zur Untersuchung der Funktion der „nicht kollagenen“ ECM Proteine *Ucmaa* und *Matn-1*. Da eine UCMA Maus nicht zur Verfügung stand und *Matn-1* defiziente Mäuse keine offensichtlichen phänotypischen Abweichungen zu wildtypischen Tieren zeigen (Aszódi u. a., 1999; Ko u. a., 2004; Mátés u. a., 2004), wurde der Zebrafisch als alternatives System zur funktionalen Analyse der beiden Proteine gewählt.

### 4.1. Zebrafisch *Ucmaa* zeigt viele Ähnlichkeiten zu murinem *Ucma*

UCMA, ein vor kurzem entdecktes, Vitamin K abhängiges Protein mit vielen  $\gamma$ -carboxylierten Glutamatresten, wurde bereits grundlegend in der Maus und im adriatischen Stör untersucht (Surmann-Schmitt u. a., 2008; Tagariello u. a., 2008; Viegas u. a., 2008). Bis auf die Vermutung, UCMA könnte eine strukturelle Rolle während der Chondrozytendifferenzierung spielen (Tagariello u. a., 2008), fehlten bisher weitere Hinweise auf dessen Funktion.

Der Zebrafisch besitzt zwei zur Maus orthologe *Ucma* Gene, *ucmaa* (*Grp1*) und *ucmab* (*Grp2*), die Folge einer zusätzlichen Genomduplikation sind, die nach der Abspaltung der Knochenfische von den restlichen Wirbeltieren stattfand ((siehe Abb. 3.2) und (Venkatesh, 2003)). Genom- oder Genduplikationen sind eine der treibenden Kräfte der Evolution (zusammengefasst in (Ohno, 1999)). Die duplizierten Gene bleiben jedoch nur dann im Genpool erhalten, wenn eine der beiden Kopien „neofunktionalisiert“ wird, also unterschiedliche Funktionen erhält oder zu anderen Zeitpunkten in der Entwicklung exprimiert wird (zusammengefasst in (Force u. a., 1999)). *ucmab* wird nachweislich erst ab 88 hpf (q-PCR) bzw. 96 hpf (*in situ*) in ausgewählten Kraniofazialknorpeln exprimiert, während *ucmaa* bereits ab 15 hpf (*in situ*) detektiert werden konnte (siehe Abb. 3.3 und 3.4). Da der durch Morpholinos manipulierbare Zeitraum während der Zebrafischentwicklung von 0 hpf bis 72 hpf reicht, ist eine funktionelle Untersuchung von *ucmab* mittels „knockdown“ nicht möglich. Allerdings ist anzunehmen, dass *ucmaa* dem Maus *Ucma* am ähnlichsten ist, da beide eine starke Übereinstimmung der zeitlichen und räumlichen Expression zeigen, auch wenn *Ucmaa* im Zebrafisch, im Gegensatz zur Maus, ab 64 hpf stark im sich entwickelnden Schädel exprimiert wird (siehe Abb. 3.4). Es kann also angenommen werden, dass Zebrafisch

*ucmaa* das für die funktionelle Charakterisierung geeignete Zebrafisch *ucma* Gen darstellt, dessen Eigenschaften auch Rückschlüsse auf das in der Maus exprimierte Gen zulassen.

Nicht nur die allgemeine Intron/Exonstruktur von UCMA ist bei beiden Zebrafisch *ucma* Genen stark konserviert, sondern auch die Erkennungsstellen für die Glutamat  $\gamma$ -Carboxylase, die Erkennungssequenz einer putativen Proproteinkonvertase, sowie die Position der Glutamatreste. Auch die in der Maus beschriebenen Spleißvarianten sind vorhanden (siehe 3.1.1. und 3.1.2.). Unter diesen Spleißvarianten gibt es zwei Formen von *ucma*, denen Exon 2 und damit ein Teil des Signalpeptids fehlt und die somit eine intrazelluläre Lokalisierung aufweisen. Der kürzeren der beiden Formen fehlt auch noch das Exon, in dem die meisten Glutamatreste notiert sind (Exon 4, vergleiche (Le Jeune u. a., 2010; Viegas u. a., 2008)). Da die Vitamin K abhängige Glutamat  $\gamma$ -Carboxylierung im ER stattfindet (Berkner, 2000), ist dies ein möglicher Hinweis auf eine von der  $\gamma$ -Carboxylierung unabhängigen Funktion der intrazellulären *Ucma* Spleißvarianten. Diese physiologische Funktion einer intrazellulären Form eines normalerweise am Glutamat  $\gamma$ -carboxylierten ECM Proteins ist unklar. Überexpression von intrazellulärem *Ucma* führte zu perinukleären, Mikrotubulus assoziierten Aggregaten (Le Jeune u. a., 2010). Jedoch sind, im Vergleich zum Vollängenprotein, die kürzeren Spleißformen von UCMA nur in sehr geringen Mengen vorhanden (Le Jeune u. a., 2010). Aus diesem Grund scheint hier eine Funktion von UCMA als Signalprotein, ähnlich zu cNell2, einer alternativ gespleißten, zytosolischen Form des ansonsten extrazellulären Proteins Nell2 (Hwang u. a., 2007), wahrscheinlicher als die eines intrazellulären Strukturproteins.

#### **4.2. *Ucmaa* „knockdown“ führt zu Fehlbildungen des Notochords und des Kraniofazialskeletts**

Der „knockdown“ von *Ucmaa* ergab, dass es eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Notochords und der Kraniofazialknorpel während der Entwicklung des Zebrafisches spielt. Die Analysen wurden mit zwei verschiedenen Antisensemorpholinos durchgeführt und beide führten zu vergleichbaren phänotypischen Veränderungen, ein klares Indiz dafür, dass diese nicht durch unspezifisch-toxische Effekte hervorgerufen wurden (siehe 1.2.4). *Ucmaa* „knockdowns“ wurden durch Injektionen von 2,5 ng Morpholino pro Embryo erzeugt, da Injektionen von 5 ng oder mehr letal waren. Dies lässt die Vermutung zu, dass die beobachteten Veränderungen hypomorphe Phänotypen darstellen und der komplette Verlust von *Ucma* letal ist (vgl auch 4.3). Die Analyse milder und schwerer Phänotypen zeigte, dass

der „knockdown“ von *Ucmaa* zu Wachstumsdefekten und zu Missbildungen in der Kraniofazialskelett- und dem Notochordentwicklung führte (siehe Abb. 3.5). Besonders interessant sind die gelegentlich festgestellten Unterbrechungen im Notochord (Abb. 3.5 B), die wegen der starken Expression von *ucmaa* im Notochord ein Hinweis auf eine Rolle von *Ucmaa* bei der Bildung dieses Gewebes sind.

Das Notochord ist nicht nur ein Entwicklungsorganisator (Stemple, 2005), sondern auch ein skelettales Element, dessen Zusammensetzung eine Verwandtschaft mit dem Knorpel nahe legt. Möglicherweise stellt es eine primitive Form des Knorpels dar, die bis zur Ausbildung der Wirbelsäule als Axialskelett dient (Stemple, 2005). Der Verlust von *Ucmaa*, wie durch Alcianblaufärbung und Antikörperfärbungen gezeigt (siehe Abb. 3.5 B, C), führt im Kraniofazialknorpel zu einem sekundären Verlust der zwei wichtigsten Komponenten des Knorpels, Kollagen II und Aggrecan (siehe 1.1.3). Obwohl zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ersichtlich ist, wie *Ucmaa* die Kollagen II und Aggrecan Expression beeinflussen könnte, sind die morphologischen Konsequenzen für den Knorpel dramatisch. Ähnlich wie *Ucmaa*, werden viele Knorpelproteine im Zebrafisch zur Zeit der Notochordbildung und -entwicklung exprimiert, lange bevor die ersten „klassischen“ Knorpelstrukturen entstehen. Proteine wie die Kollagene II $\alpha$ 1, -V, -VIII  $\alpha$ 1, -XI und -XXVII, sowie Chondromodulin und die Lysyl Oxidasen 1 und -5 wurden bereits in Zebrafischmutanten oder durch Morpholino „knockdown“ untersucht (Baas u. a., 2009; Christiansen u. a., 2009; Fang u. a., 2010; Gansner u. a., 2007; Gansner, Gitlin, 2008; Pagnon-Minot u. a., 2008; Sachdev u. a., 2001; Yan u. a., 1995b), jedoch zeigten nur wenige einen Phänotypen wie der *Ucmaa* „knockdown“. So erinnert die Notochordverformung in Kollagen VIII  $\alpha$ 1 Missensemutanten an jene milder *Ucmaa* Morphanten und wird durch Inhibition der Lysyl Oxidase verstärkt (Gansner, Gitlin, 2008). Daher wurde bei einem partiellen „knockdown“ von *lox11* oder *lox15b* und *col2a1* ein ähnlicher Phänotyp festgestellt. Bei der Koinjektion von *lox11* oder *lox15b* Morpholinos mit der höchsten Menge an *col2a1* Morpholino, die gerade noch keinen Phänotypen erzeugt, zeigten etwa 50% der Embryonen Verformungen des Notochords ähnlich zu denen der *Ucmaa* „knockdowns“ (Gansner u. a., 2007), ein weiterer Hinweis darauf, dass *Ucma* zusammen mit Kollagen II am Aufbau der knorpelartigen Gewebe beteiligt ist.

### 4.3. Bedeutung der Glutamat $\gamma$ -Carboxylierung für die Entwicklung des Notochords und der Kraniofazialknorpel

Ucma ist ein neuartiges Mitglied der Familie der Vitamin K abhängig  $\gamma$ -carboxylierten Proteine. Zu den nächsten Verwandten gehören auch die calciumbindenden Proteine Osteocalcin und Matrix Gla Protein (Viegas u. a., 2008). Osteocalcin ist ein knochenspezifisches Hormon, das im Energiemetabolismus eine Rolle spielt (Lee u. a., 2007; Razzaque, 2011). Osteocalcindefiziente Mäuse weisen einen erhöhten Knochenaufbau sowie eine erhöhte Knochendichte auf (Ducy u. a., 1996). Für Matrix Gla Protein wurde ein inhibitorischer Effekt auf die Kalzifizierung der Extrazellulärmatrix in Knorpel und Blutgefäßen beschrieben und Matrix Gla Protein defiziente Mäuse zeigten spontane ektopische Verknöcherungen in Arterien und Knorpelgewebe, ein Effekt, der möglicherweise durch die  $\gamma$ -Carboxylierung von Glutamatresten vermittelt wird (Luo u. a., 1997). Beide Proteine werden im Zebrafisch exprimiert, allerdings zu späteren Zeitpunkten als Ucma. Matrix Gla Protein kann zum ersten Mal bei 96 hpf und Osteocalcin sieben Tage nach Befruchtung detektiert werden (Gavaia u. a., 2006). Da mutante Fischlinien nicht verfügbar sind und beide Gene außerhalb des von den Morpholinos beeinflussten Zeitfensters von drei Tagen exprimiert werden, konnte deren Funktion bisher im Zebrafisch nicht ermittelt werden.

Interessanterweise war bereits früher gezeigt worden, dass die Inhibition der Vitamin K abhängigen Glutamat  $\gamma$ -Carboxylierung durch Warfarin einen Effekt auf die embryonale Entwicklung des Zebrafisches hat (Hanumanthaiah u. a., 2001). Die Behandlung mit Warfarin führte bei den Fischembryonen zu verschiedenen Zeitpunkten zu Entwicklungsarresten. Bereits vor der Entdeckung von Ucma deuteten diese Ergebnisse auf das Vorhandensein eines neuartigen Vitamin K abhängig Glutamat  $\gamma$ -carboxylierten Proteins mit einer wichtigen Rolle in der Zebrafischentwicklung hin (s. o.).

Tatsächlich konnten bei Zebrafischen, die zu Zeitpunkten mit Warfarin behandelt wurden, an denen Notochord- und Kraniofazialknorpelbildung stattfinden, skelettale Verformungen beobachtet werden, die denen von milden Ucma Morphanten ähneln (siehe Abb. 3.7). Außerdem konnte festgestellt werden, dass Zebrafischembryonen, die direkt nach Ablage mit einer hohen Dosis Warfarin behandelt wurden (21 mg/ml), einen Entwicklungsarrest im 50% Epiboliestadium aufwiesen (5 hpf -6 hpf, siehe Abb. 3.7 C). Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass andere Vitamin K abhängig Glutamat  $\gamma$ -carboxylierte Proteine ebenfalls von der Warfarinbehandlung beeinflusst werden. Jedoch ist es unwahrscheinlich dass Osteocalcin oder Matrix Gla Protein darin involviert sind (Gavaia u. a., 2006), da zu diesem Zeitpunkt

beide Proteine noch nicht exprimiert werden. Es konnten ebenfalls keine verstärkte Knochenbildung oder ektopische Kalzifizierungen beobachtet werden, wie es bei einem Verlust der Osteocalcin oder Matrix Gla Protein Funktion zu erwarten gewesen wäre (s. o. und Abb. 3.8). Die Beobachtung, dass der *Ucmaa* „knockdown“ Phänotyp (siehe 3.1.4 und 4.2) durch Inhibition der Glutamat  $\gamma$ -Carboxylierung repliziert werden konnte, ist ein weiterer Hinweis darauf, dass *Ucma* eine wichtige Rolle bei der Skelettbildung des Zebrafisches spielt und die Vitamin K abhängige  $\gamma$ -Carboxylierung für dessen Funktion essentiell ist. Möglicherweise spielt die Inhibition der Vitamin K abhängigen Glutamat  $\gamma$ -Carboxylierung von *Ucma* auch beim Menschen bei der Pathogenese der „Warfarin Embryopathien“ eine Rolle. Diese äußern sich in der Unterentwicklung von Knorpelstrukturen und der ektopischer Verknöcherung in Embryonen nach Verabreichung von Warfarin als Vitamin K Antagonist während der Schwangerschaft (Hall u. a., 1980). Dies wird zusätzlich unterstützt durch Befunde bei einem Patienten mit Multipler Vitamin K Defizienz, der nicht nur vielfältige Defekte in der Hämostase, sondern auch skelettale Fehlbildungen zeigte, die denen der „Warfarin Embryopathie“ ähneln (Pauli u. a., 1987).

#### **4.4. *Matn-1* Expression beim Zebrafisch setzt bereits vor der Knorpelentwicklung ein**

Die Matrilin bilden eine Familie modular aufgebauter, nicht-kollagener ECM Proteine, die vor allem im Knorpel, aber auch in vielen anderen Extrazellulärmatrizen exprimiert werden. Durch die Eigenschaft sowohl an Bestandteile des Kollagenetzwerks, als auch an die Kernproteine des Proteoglykangels zu binden, sind sie an der ECM Assemblierung und der Verknüpfung dieser zwei größten Strukturen der ECM beteiligt. Das am längsten bekannte *Matn-1* (CMP) kann als prototypisches Familienmitglied bezeichnet werden (Klatt u. a., 2011). Verschiedene Experimente zur Ermittlung der Funktion der einzelnen Matrilin durch Verwendung der „knockout“ Methode bei der Maus erbrachten keine auffälligen Unterschiede zum Wildtyp (zusammengefasst in (Klatt u. a., 2011)). Dies gilt nicht nur für den „knockout“ einzelner Matrilin (Aszódi u. a., 1999; Huang u. a., 1999; Mátés u. a., 2004), sondern auch für *Matn-1/3* Doppel-„knockouts“ (Nicolae u. a., 2007), und selbst die *Matrilin 1/-2/-3/-4* Quadrupelmutante zeigte keine offensichtlichen phänotypischen Veränderungen (Aszodi et al., persönliche Kommunikation). Lediglich die Kollagen Fibrillogenese und deren Fibrillendichte war in *Matn-1* und *Matn-3* „knockouts“ beeinflusst (Huang u. a., 1999; Nicolae u. a., 2007). Dies scheint insofern verwunderlich, weil die Matrilin evolutionär bis

zu den Lanzettfischen hoch konserviert sind (Wagener et. al., persönliche Kommunikation) und man erwarten würde, dass nicht dem Selektionsdruck unterliegende Gene durch Akkumulation von Defekten verloren gehen würden (zusammengefasst in (Demuth, Hahn, 2009)).

Ein gut eingeführter, alternativer Modellorganismus ist der Zebrafisch. In groben Zügen wurde die zeitliche Expression von *matrilin 1* im Zebrafisch bereits beschrieben (siehe 1.2.3 und (Ko u. a., 2005)). Da die Expression von *matrilin 1* bei 24 hpf mittels einfacher RT-PCR nicht nachzuweisen war, Pilotexperimente zum Matn-1 „knockdown“ aber bereits vor 24 hpf starke phänotypische Veränderungen bei behandelten Tieren offenbarten, wurde die *matrilin-1* Expression mit Hilfe von qPCR in diesem Zeitraum genauer untersucht und *matrilin 1* mRNA konnte von 6 hpf an nachgewiesen werden. Von diesem Zeitpunkt an, bis zu einem Höhepunkt bei etwa 15 hpf, konnte eine Expressionszunahme an *matrilin 1* festgestellt werden, die danach wieder bis auf den Anfangswert absank (siehe Abb. 2.9 A). Die Untersuchung der Expressionsniveaus anderer mit Matn-1 potentiell interagierender Knorpelproteine während der Frühentwicklung des Zebrafisches zeigte, dass keines einen ähnlichen Expressionsverlauf wie *matrilin 1* aufwies, obwohl alle untersuchten Gene bereits während der ersten 24 hpf exprimiert werden (siehe Abb. 3.10). Bemerkenswert dabei ist eine mögliche Einteilung der untersuchten ECM Komponenten in zwei Gruppen aufgrund ihrer Expressionsprofile. Die erste Gruppe wurde bereits sehr früh exprimiert und ihre Expression stieg zwischen 12 hpf und 15 hpf an (*matrilin 1*, *matrilin 3b*). Bei der zweiten Gruppe setzte die Expression erst ab dem Expressionshöhepunkt der ersten ein (*kollagen II $\alpha$ 1*, *decorin* und *matrilin 4*).

Die Analyse der räumlichen Verteilung der *matrilin 1* mRNA und des Matn-1-Proteins während der ersten 24 hpf zeigte eine diffuse Verteilung der mRNA im ganzen Embryo und eine stärkere Proteinexpression in der sich entwickelnden anterioren und posterioren Körperachse, sowie in der Haut (siehe Abb. 3.12 und 3.13). Dies entsprach zunächst nicht den Erwartungen, da Matn-1 in Maus, Mensch, Ratte und Rind hauptsächlich im Knorpel lokalisiert ist, dieser aber im Zebrafisch während der ersten zwei Tage nicht gebildet wird. Die einzige knorpelähnliche Struktur, die ECM Proteine wie Kollagen II $\alpha$ 1 enthält (Yan u. a., 1995b), ist das Notochord (vgl. (Glickman u. a., 2003; Stemple, 2005)). Im Notochord des Zebrafisches wird Matn-1 jedoch kaum exprimiert (Abb. 3.12 und 3.13). Ähnlich wie Matn-1 wurde auch der Bindungspartner Decorin (siehe 2.1.2.3 und (Wiberg u. a., 2003)) in den sich entwickelnden anterioren wie posterioren Körperachsen des Zebrafischembryos entdeckt (Zoeller u. a., 2009). Dies weist auf einen wichtigen Unterschied zwischen Landwirbeltier-

und Zebrafischembryonalentwicklung hin und es ist anzunehmen, dass Matn-1 und andere Proteine der ECM des Knorpels wichtige Funktionen bei den Entwicklungsprozessen der Achsenbildung des Zebrafisches übernehmen.

Die quantitative Analyse der *matrilin 1* Expression ergab weiterhin, dass eine zweite, erheblich stärkere Expressionsphase (um den Faktor 1000 stärker) bei ca. 56 hpf beginnt und mindestens zwei Expressionshöhepunkte aufweist, einen bei ca. 88 hpf und einen bei ca. 112 hpf (siehe Abb. 3.9 B). Die Annahme, dass der erste Expressionshöhepunkt mit der mesenchymalen Kondensation und der Bildung des Kraniofazialknorpels überlappt, bestätigte sich bei der Immunfluoreszenzanalyse der Matn-1 Expression unter Verwendung von eigens für die vorliegende Arbeit hergestellten polyklonalen, gegen Zebrafisch Matn-1 gerichteten Antikörpern (siehe Abb. 3.13 untere Reihe). Matn-1 wurde ausschließlich in den Kraniofazialknorpeln und den Flossenstrahlen nachgewiesen. Der zweite Expressionshöhepunkt überlappt teilweise mit der beginnenden Verknöcherung der Zebrafischwirbelsäule bei ca. 120 hpf (Du u. a., 2001). Der frühe und der späte Expressionshöhepunkt weisen nicht nur Unterschiede in der Expressionsstärke auf, sondern auch in der Form des sekretierten Matn-1. Während der ersten 24 hpf wurde eine kleine, potentiell monomere Form von Matn-1 sekretiert, wohingegen im Larvenstadium die größere oligomere Form auftrat. Alternatives Spleißen konnte als Ursache ausgeschlossen werden (Sequenzierungsergebnisse), jedoch kann es sich auch um posttranslationale Prozessierung wie z.B. durch Metalloproteinasen handeln (Klatt u. a., 2001; Ehlen u. a., 2009). Im Gegensatz zu Mensch und Rind konnten keine Matn-1/3a Heterooligomere nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.11 C und (Wu, Eyre, 1998)). Die Beobachtungen, dass Matn-1 biphasisch exprimiert wird und die beiden Phasen sich sowohl in der Expressionsstärke als auch in der sekretierten Form von Matn-1 unterscheiden, weist möglicherweise auf einen funktionalen Unterschied der beiden Formen hin. Leider gelang eine eingehende proteinchemische Charakterisierung der frühen Matn-1 Form wegen der zu geringen Proteinmenge bis jetzt nicht.

#### **4.5. Matn-1 „knockdown“ führt zu schweren Kopf- und Achsendefekten während der Embryonalentwicklung des Zebrafisches**

Um die Konsequenzen einer verringerten Matn-1 Proteinmenge auf die frühe Embryonalentwicklung und die Knorpelbildung des Zebrafisches zu untersuchen, wurden

durch Injektion von Morpholino Oligonukleotiden in befruchtete Eier Matn-1 Zebrafisch „knockdowns“ generiert ( vgl. 2.2.4).

Der „knockdown“ von Matn-1 reduzierte die Matn-1 Proteinmenge auf ein durch Immunfluoreszenzfärbungen auf Serienschritten nicht detektierbares Niveau. Matn-3a hingegen, ein anderes, genau wie Matn-1 im Knorpel vorkommendes Mitglied der Matrilinfamilie, war in diesen Geweben der Matn-1 Morphanten nach wie vor vorhanden, ein wichtiger Hinweis darauf, dass das Gewebe angelegt wird (siehe Abb. 3.14 A). Die „Western blot“ Analyse bestätigte die histologischen Untersuchungen, da die charakteristischen Matn-1 Banden in Morphanten fast vollständig verschwanden (siehe Abb. 3.14 B). Die Untersuchung der verbleibenden Matn-1 Proteinmenge wurde in beiden Fällen bei 72 hpf durchgeführt, zu einem Zeitpunkt, bei dem die Effizienz des „knockdowns“ bereits nachzulassen beginnt (siehe 1.2.4). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die relative Proteinmenge zu vorhergehenden Zeitpunkten noch geringer und damit durch den „knockdown“, wie beabsichtigt, eine starke Reduktion der Proteinmenge erreicht wurde.

Die Unterdrückung der Matn-1 Expression hatte erhebliche Auswirkungen auf die Morphogenese der sich entwickelnden Zebrafischlarve (siehe Abb. 3.15, 3.16 und 3.17). Die phänotypischen Veränderungen konnten in zwei verschiedene Schweregrade unterteilt werden. Die mild phänotypischen Morphanten waren im Vergleich zu unbehandelten Larven kleiner, die Dottersackerweiterung war kürzer und der Kopf zeigte Deformationen auf und war nur unzureichend ausgeprägt. Die gesamte hintere Körperachse war verkümmert und geknickt. Das Notochord war stets vorhanden, aber ebenfalls abgknickt. Die Schwanzspitze zeigte häufig wellenförmig verlaufende Bereiche. Alle aufgelisteten Merkmale waren bei den schweren Phänotypen stärker ausgeprägt. So zeigte sich bei 72 hpf, also während der späten Matn-1 Expression, dass die strukturelle Integrität der stark durch den „knockdown“ betroffenen Organe (Kopf, Schwanz, Notochord, Somiten) zerstört war. Die Somitengrenzen, die „floor plate“, das Hypochord, sowie das Notochord selbst, konnten morphologisch nicht mehr identifiziert werden (siehe Abb. 3.15 B, Pfeile). Erstaunlicherweise konnte bei 72 hpf in beiden Schweregraden an bestimmten Stellen eine Abschwächung der bereits bei 24 hpf identifizierten Veränderungen (s.u.) beobachtet werden. Einzelne Bereiche, wie z.B. der Rumpf direkt über dem Dottersack, waren häufig weniger stark betroffen als benachbarte Regionen oder derselbe Bereich zu einem früheren Zeitpunkt (siehe Abb. 3.15 A, B). Das Notochord war oft beinahe wildtypisch. Diese Beobachtungen können sowohl als Reparatur der Schäden durch wieder einsetzende Matn-1 Expression gedeutet werden, die aufgrund der Verringerung der „knockdown“ Effizienz wieder gesteigert wird (siehe 1.2.4), als auch eine

verzögerte Entwicklung der Gewebe aufgrund des Matn-1 Mangels darstellen. Vielleicht findet auch eine Matn-1 unabhängige Kompensation der Schäden, die zu früheren Zeitpunkten in den angelegten Organbereichen entstanden sind, durch später exprimierte Proteine mit ähnlichen Funktionen statt.

Die histochemische Analyse der Kraniofazialknorpel in 72 hpf alten Morphanten zeigte einen von der Morpholinodosis abhängigen Verlust der Alcianblau Knorpelfärbung. Die betroffenen Gewebe wurden zwar noch angelegt, es fehlen aber alle Knorpelcharakteristika, wie z. B. Zellanordnung und Proteoglykanfärbung der ECM (siehe Abb. 3.16). Der Verlust an Matn-1 schien somit keinen Einfluss auf die mesenchymale Kondensation zu haben, sondern nahm spezifisch Einfluss auf die Bildung des Knorpels per se. Die Zellen ordneten sich nicht mehr in ihre natürlichen Strukturen ein und waren nicht in der Lage funktionale Knorpel-ECM zu sekretieren. Dieser Effekt betraf die Kraniofazialknorpel stärker als die Knorpel des Neurokraniums, möglicherweise eine Konsequenz der Reihenfolge ihrer Entwicklung, denn die Knorpel des Neurokraniums werden früher gebildet als die Kraniofazialknorpel (Schilling, Kimmel, 1997; Kimmel u. a., 2001). Weiterführende Analysen der ECM des Kraniofazialknorpels zeigten, dass nicht nur das Proteoglykangel, sondern auch die Kollagene II und -IX in Matn-1 Morphanten nicht mehr detektierbar waren (siehe Abb. 3.17). Immunfluoreszenzfärbungen auf Serienschnitten von 72 hpf alten unbehandelten Zebrafischlarven sowie Morphanten zeigten, dass, obwohl Matn-3a noch nachweisbar war und die Strukturen damit zumindest ursprünglich einmal hätten Knorpel werden können, eben diese kein Matn-1, Kollagen II und -IX enthielten (siehe Abb. 3.14). Die sezernierenden Zellen schienen die Proteine überhaupt nicht mehr zu produzieren, da auch intrazellulär keine Signale für Kollagen II und -IX gefunden wurden. Dies bedeutet, dass der Verlust eines Proteins, das als Adapter zwischen diesen großen Netzwerken fungieren soll (siehe Abb. 1.6), dazu führt, dass beide Netzwerke, und damit die ECM des Knorpels, nicht mehr aufgebaut werden, ein Vorgang, der in dieser Art bereits auf Proteinebene beim „knockdown“ von *Ucmaa* beobachtet werden konnte (siehe 4.1 bis 4.3).

Ein Großteil der phänotypischen Veränderungen der Kopf- und Körperachsenentwicklung konnte jedoch lange vor der Bildung der ersten Knorpel, also während der frühen Expression von Matn-1 beobachtet werden. Im Gegensatz zu den „knockdowns“ anderer Proteine, die einen engeren Wirkungskreis haben und zum Teil nur einzelne Organe betreffen (vgl. z.B. „knockdown“ von Kollagen XI $\alpha$ 1, bei dem ausschließlich die Kraniofazialknorpel betroffen sind (Baas u. a., 2009)), ist es bei der Gewebeverteilung von Matn-1 während der ersten 24 hpf nicht verwunderlich, dass der „knockdown“ den Embryo in seiner gesamten

Morphologie stark beeinträchtigt (s. o. und Abb. 3.12 bzw. 3.13). Die durch den Verlust von Matn-1 verursachten Schäden sind ein Hinweis darauf, dass die frühe Expression von Matn-1 bei der Entwicklung der betroffenen Organe (Kopf, Schwanz, Notochord, Somiten) eine Rolle spielt. Die Veränderungen in der Notochordmorphologie könnten allerdings sekundäre Effekte der beschädigten umgebenden Gewebe sein, wie z.B. der Somiten (vgl. defekte Notochordentwicklung durch tetanisch kontrahierte Muskeln (Teraoka u. a., 2006)) oder ein „Einfalten“ des wachsenden Notochords in einer zu kurzen Körperachse.

Der Zusammenhang zwischen Matn-1 „knockdown“ und Verlust von Kollagen II spielt möglicherweise nicht nur bei den Veränderungen im Kraniofazialskelett eine Rolle, sondern könnte auch eine Erklärung für den Phänotypen während der frühen Expression von Matn-1 im Zebrafischembryo geben. Eine alternativ gespleißte Form von Kollagen II $\alpha$ 1 die eine von Willebrand Faktor C Domäne enthält, wird, genau wie Matn-1, in nicht knorpelbildenden embryonalen Geweben exprimiert (Leung u. a., 2010). Vom C-terminalen Fragment von Kollagen II, auch Chondrocalcin genannt (Van der Rest u. a., 1986), ist bekannt, dass es aus Knorpel mit Matn-1 koextrahiert wird (Nitsche, Dissertation Köln 2001) und dass es eine Rolle bei der Verknöcherung von Knorpel spielt (Hinek u. a., 1987). Interessanterweise führt der Verlust der von Willebrand Faktor C Domäne von Kollagen II $\alpha$ 1a in Mausembryonen zur Inaktivierung des „Sonic hedgehog“ (SHH) Signalweges und dadurch, ähnlich wie beim Matn-1 „knockdown“ Phänotyp, zum Verlust von Gehirnstrukturen, sowie von Bereichen des Kraniofazialen Knorpels (Leung u. a., 2010). Da gezeigt wurde, dass der Verlust von Matn-1 in seiner zweiten Expressionsphase einen Verlust von Kollagen II $\alpha$ 1 bedingt (s. o. und Abb. 3.17), könnte man einen solchen Effekt auch während der ersten Expressionsphase erwarten, zumal die Kollagen II $\alpha$ 1a Expression im Zebrafisch etwa zu der Zeit anfängt, bei der Matn-1 seinen Expressionshöhepunkt hat (Dale, Topczewski, 2011). Dies deutet darauf hin, dass Matn-1 für die korrekte Herstellung von Kollagen II $\alpha$ 1 wichtig ist.

#### **4.6. Matn-1 „knockdown“ löst Zellstress-Antworten aus**

Um einen genaueren Einblick in die zellulären Vorgänge während der Ausbildung der Entwicklungsdefekte zu bekommen, wurden TEM (transmissionselektronenmikroskopische) Aufnahmen von 24 hpf und 72 hpf alten unbehandelten Embryonen und Morphanten erstellt und analysiert (siehe Abb. 3.19 und 3.20).

Bei 72 hpf zeigten sich signifikante Veränderungen. Die Chondrozyten milder Phänotypen schwollen nach Matn-1 Verlust an, ihr ER verlor seine Integrität und die Mitochondrien

wurden hypertroph. In intermediären Phänotypen verstärkte sich der Phänotyp bis zu dem Punkt, dass die hypertrophen Mitochondrien den gesamten intrazellulären Raum ausfüllten. In den stärksten beobachteten Fällen wurde eine vollständige Lyse der Zellen festgestellt. Nur noch der Zellkern blieb in ECM eingehüllt erhalten (siehe Abb. 3.20). Solche morphologischen Veränderungen des Knorpels wurden in der Literatur bereits beschrieben und als „Chondroptose“ bezeichnet. Es wird vermutet, dass der Prozess eine an die besondere Umgebung der Chondrozyten angepasste Variante des programmierten Zelltodes darstellt (Roach u. a., 2004). Da Chondrozyten durch die Ummantelung mit ECM einen geringen Metabolitenaustausch und damit einen niedrigen Stoffwechsel aufweisen und ihre Überreste nur schwer von Makrophagen erreicht und abgebaut werden können, wird vermutet, dass die Autophagie, ein Prozess, bei dem sich eine Zelle schrittweise selbst verdaut (Klionsky u. a., 2007; Mizushima, 2004), eine größere Rolle einnimmt als die klassische Apoptose (Roach u. a., 2004). Da bereits Matriline mit degenerativen Knorpelerkrankungen wie MED in Verbindung gebracht wurden (Klatt u. a., 2009; Nundlall u. a., 2010; Otten u. a., 2010), blieb die Frage, was die knorpelbildenden Zellen, möglicherweise aufgrund des amorph erscheinenden ERs, in den programmierten Zelltod trieb.

Die Untersuchung von Zellstressmarkern bei 68 hpf, also einer Zeit bei der sich die Knorpelanlagen bilden (Kimmel u. a., 2001; Schilling, Kimmel, 1997), ergab, dass der Autophagiemarker LC3 nur in Morphanten in der für seine Aktivierung typischen Doppelbande gefunden werden konnte, ein eindeutiger Hinweis darauf, dass Autophagie in Matn-1 defizienten Larven, jedoch nicht in unbehandelten Fischen vorkam (siehe Abb. 3.24). Die Analyse von stabilisiertem und damit aktiviertem p53 (zusammengefasst in (Brady, Attardi, 2010)) bei 68 hpf zeigte ebenfalls nur ein Signal in Matn-1 Morphanten, ein Hinweis dafür, dass der p53 Signalweg in Morphanten aktiv war. Der p53 Signalweg verhindert Zellwachstum und Zellteilung so lange Zellstress vorhanden ist und leitet Prozesse wie z.B. DNA Reparatur oder Autophagie ein (Gump, Thorburn, 2011). Die Analyse der relativen Expressionsniveaus der ER-Stress Marker XBP1 und BIP bei 68 hpf ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Morphanten und unbehandelten Larven. Dies war überraschend, da man aufgrund der morphologischen Veränderungen des ERs in den Chondrozyten (siehe Abb. 3.20) eine Aktivierung des ER-Stress Signalwegs hätte erwarten können und eine Verbindung zwischen Autophagie, die nachweislich aktiviert war und ER-Stress bereits postuliert wurde (Ogata u. a., 2006). Allerdings lässt sich nicht ausschließen, dass das bei 68 hpf stark einseitige Verhältnis der geringen Anzahl der Matn-1 exprimierenden Zellen zur Gesamtzahl der Zellen in der Larve das Signal unter die Detektionsgrenze drückt. Versuche,

Chondrozyten zu isolieren und zu analysieren sind bisher gescheitert, vornehmlich aufgrund der geringen Überlebensrate der Zellen. Die relative Expression von Ubiquitin hingegen war bei 68 hpf in Morphanten signifikant erhöht. Dies war ein weiteres deutliches Zeichen dafür, dass Zellen in Matn-1 Morphanten zur Zeit der Knorpelbildung Schwierigkeiten mit dem Proteinabbau haben. Insgesamt ergaben die vorhandenen Daten ein interessantes Bild über die Etablierung des Matn-1 „knockdown“ Phänotyps während der zweiten Expressionsphase von Matn-1. Der Knockdown führte zum Verlust der Fähigkeit der Chondrozyten, das Proteoglykangel und die Kollagenmatrix aufzubauen (siehe 4.5). In den ECM produzierenden Zellen wird eine p53 vermittelte Zellstressantwort ausgelöst und der Proteinabbau erhöht, da möglicherweise bestimmte Komponenten nicht mehr sezerniert werden können und das ER gestört wird. Trotzdem scheinen die kompensatorischen Mechanismen nicht auszureichen und die Autophagie wird eingeleitet, um die eventuell beschädigten Organellen zu entsorgen. In letzter Instanz begehen die beschädigten Chondrozyten programmierten Selbstmord.

Die TEM Analyse der 24 hpf alten Morphanten offenbarte keine deutlichen Unterschiede zum Wildtypen. Lediglich die Haut zeigte stellenweise leichte Ablösungserscheinungen vom darunterliegenden Gewebe (siehe Abb. 3.19). Ein solcher Effekt ist nicht unerwartet, da Matn-1 bei 24 hpf am stärksten in der Haut exprimiert wird (siehe Abb. 3.13). Die bei 24 hpf auftretenden morphologischen Veränderungen gehen daher, im Gegensatz zu jenen bei 72 hpf, nicht mit eindeutigen zellmorphologischen Änderungen einher. Um trotzdem einen Einblick in zwei morphogenetisch wichtige Ereignisse während der frühen Zebrafiscentwicklung zu erhalten, wurde zum einen der Zelltod mittels TUNEL-Färbungen und zum anderen die Neuralleistenzellwanderungen in *sox10:egfp* transgenen Zebrafischlinien untersucht (siehe Abb. 3.21 und 3.22).

Die Ergebnisse der TUNEL-Färbungen verdeutlichten, dass 18 hpf alte Matn-1 Morphanten eine um den Faktor 8 größere Anzahl an DNA Fragmentierungsereignissen als die unbehandelten Embryonen aufwiesen. Die zusätzlichen Zelltode konnten in den sich entwickelnden Augen und im Rückenmark lokalisiert werden (siehe Abb. 3.21). Der Verlust von Matn-1 führte, wie bereits erwähnt, möglicherweise zusammen mit dem Verlust an Kollagen II $\alpha$ 1a, zu neurologischen Defekten (siehe 4.5). Durch die starke Zunahme an sterbenden Zellen im Rückenmark konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Vorläuferzellen der Kraniofazialknorpel („neural crest cells“, NCC), die seitlich am Neuralrohr entstehen und in den sich entwickelnden Kopf wandern (Knight, Schilling, 2006; McGonnell u. a., 2001; Vaglia, Hall, 1999), in Überleben, Differenzierung oder Wegfindung gestört sein könnten. Eine solche Unterbrechung würde bedeuten, dass die beobachteten

Defekte im Kraniofazialknorpel (siehe Abb. 3.16) sekundäre Effekte der gestörten Zellwanderung darstellen. *In vivo* Beobachtungen dieser Zellwanderungen ergaben keine signifikanten Unterschiede in Wanderungsgeschwindigkeit und -Richtung (siehe Abb. 3.22). Die Zellwanderungen wurden also durch den Matn-1 „knockdown“ nicht signifikant beeinflusst und die NCCs konnten zu den vorgesehenen Orten gelangen, um dort später während der Entwicklung die Knorpelbildung einzuleiten. Interessanterweise wurde berichtet, dass das entstehende Auge an der Regulation der NCC-Wanderungen beteiligt ist (Langenberg u. a., 2008). Der massive Zelltod in den Augen (s.o.) könnte vermuten lassen, dass besonders in diesem Bereich Veränderungen im Wanderungsverhalten zu beobachten gewesen wären, und tatsächlich, in seltenen Fällen ( $\leq 6\%$ ) konnte beobachtet werden, dass die NCCs direkt durch das Auge anstatt um das Auge herum wanderten.

Die Untersuchung der oben erwähnten Zellstressmarker ergab bei 15 hpf, dem ersten Höhepunkt der Matn-1 Expression, ein zu 68 hpf abweichendes Bild. p53 Stabilisierung konnte zwar in Morphanten festgestellt werden, jedoch kein aktiviertes LC3 (Abb. 3.24). Im Gegensatz zum zweiten Expressionshöhepunkt von Matn-1 bei 68 hpf, waren die ER-Stress Marker XBP1 und BIP stark hochreguliert (siehe Abb. 3.23), ein wichtiger Hinweis darauf, dass bereits zu diesem Zeitpunkt durch die Matn-1 Unterdrückung ER-Stress ausgelöst wird, obwohl dies morphologisch nicht sichtbar war (siehe Abb. 3.19). Auch Ubiquitin wurde in Morphanten stärker exprimiert, sogar um den Faktor 7500 stärker als bei 68 hpf (siehe Abb. 3.23). Dies ist ebenfalls ein Zeichen dafür, dass bei 68 hpf das Missverhältnis zwischen Chondrozyten und anderen Zellen die Messungen beeinflusst, da bei 24 hpf die meisten Zellen Matn-1 exprimieren und das Ergebnis dort eindeutiger ausfällt.

Zu beiden untersuchten Zeitpunkten wurde festgestellt, dass Ubiquitin und damit die Aktivität des Proteasoms, als Antwort auf den Matn-1 „knockdown“ heraufreguliert wurde. Um die Funktion des Proteasoms bei der Etablierung des frühen Matn-1 „knockdown“ Phänotypen zu untersuchen, wurden Matn-1 Morphanten mit dem Proteasominhibitor Bortezomib behandelt. Es zeigte sich, dass Bortezomib in der Lage war, spezifisch den Matn-1 „knockdown“ Phänotypen zu verstärken. Die Rate der Matn-1 Morphanten mit einem Phänotyp stieg von etwa 70% auf 100%, sobald das Proteasom inhibiert wurde. Die Verteilung der Phänotypen der unbehandelten Embryonen sowie der Mismatch- und Wasserkontrollen wurde durch die Verwendung von Bortezomib nicht beeinflusst (siehe Abb. 3.25). Auch in diesem Versuch konnte also bestätigt werden, dass das Proteasom eine wichtige, schützende Rolle in der Ausbildung des charakteristischen Matn-1 „knockdown“ Phänotyps spielt. Die Zellen waren offenbar in der Lage, die Schäden, die durch den Verlust

an Matn-1 entstehen, durch Proteinabbau zu kompensieren, ein wichtiger Hinweis darauf, dass möglicherweise ein Sekretionsdefekt und eine damit einhergehende Akkumulation von Proteinen stattfand.

Die Reaktion der Zellen, bei 15 hpf den ER-Stress Signalweg einzuschalten und den Proteinabbau zu verstärken, ähnelt der Reaktion bei 68 hpf, es sind aber unterschiedliche Mediatoren beteiligt (ER-Stress gegenüber Autophagie). Da bereits bekannt ist, dass ER-Stress Autophagie induzieren kann (Ogata u. a., 2006), könnte man die Vorgänge als eine Abfolge von Ereignissen betrachten. Zu den frühen Zeitpunkten wird der ER-Stress eingeleitet, dann folgt die Autophagie zwei Tage später.

Wie bereits auf morphologischer Ebene mittels TEM (siehe Abb. 3.20) und auf Proteinebene mittels „Western blot“ (siehe Abb. 3.11), wurden bei den mechanistischen Untersuchungen ebenfalls Unterschiede in der Zellantwort während der frühen Matn-1 Expression und der späten Matn-1 Expression festgestellt. Alle Ergebnisse deuten darauf hin, dass Matn-1 in der frühen Embryonalentwicklung eine andere Rolle spielt als in der später stattfindenden Larvalentwicklung. Insbesondere das Zusammenspiel mit Kollagen II $\alpha$ 1 zu frühen Zeitpunkten sowie die zur Stabilisierung von p53 führenden Mechanismen müssten daher eingehender untersucht werden, um ein vollständigeres Bild der molekularen Mechanismen des Matn-1 „knockdown“ Phänotyps zu erhalten.

In Anbetracht der in der vorliegenden Arbeit gewonnen Erkenntnisse über die Funktion von Matn-1 während der Zebrafischentwicklung stellt sich natürlich die Frage, wieso ein „knockdown“ in einem Organismus (Zebrafisch) einen Phänotypen erzeugt, ein kompletter „knockout“ in einem anderen (Maus) jedoch nicht. Darüber lässt sich nur spekulieren. Zuerst wären die methodologischen Unterschiede zu nennen: In der Maus wurden „knockouts“ untersucht, im Zebrafisch dagegen „knockdowns“. Möglicherweise führte der komplette Verlust zu einem Kompensationsmechanismus, der die Ausbildung eines Phänotyps verhinderte. Die wenigen Proteinmoleküle, die bei einem „knockdown“ noch hergestellt werden, könnten diesen Kompensationsmechanismus unterbinden und direkt die zellulären Stressantworten aktivieren. Wichtig ist auch die Betrachtung der Lebensumstände der Tiere. Die Mäuse leben an Land, möglicherweise werden in einer Umgebung, in der die Gravitation eine wichtige Rolle spielt und eine größere Belastung für das Skelett darstellt, höhere Anforderungen an die Redundanz wichtiger skelettaler Komponenten gestellt. Es kann also sein, dass andere Proteine in der Maus die Aufgaben von Matn-1 mit übernehmen können, allen voran Matn-2 oder COMP, welche im Zebrafisch nicht vorkommen (Ko u. a., 2005; McKenzie u. a., 2006). Andererseits sollten die Ergebnisse der frühen Phänotypen im

Zebrafisch zum Anlass genommen werden, die frühe Entwicklung der Maus Matn-1 „knockouts“ zu untersuchen. Solche Untersuchungen wurden bis jetzt nicht durchgeführt, da Matn-1 bisher nur als skelettales Strukturprotein angesehen wurde. Ein Einfluss von Matn-1 auf die neuronale Entwicklung der Maus bleibt daher offen.

#### **4.7. Der „knockdown“ von Matn-1 im Zebrafisch ist spezifisch**

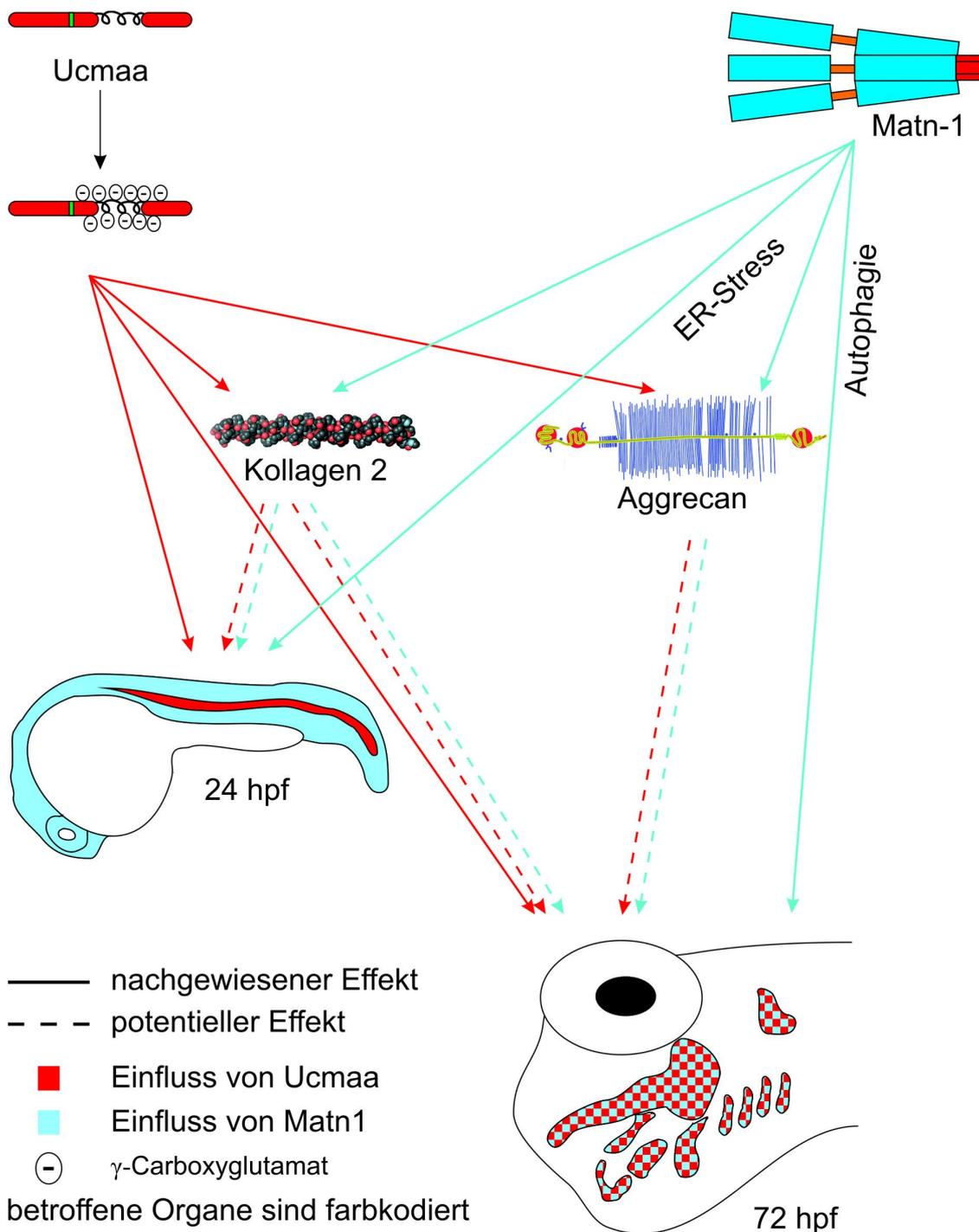
Morpholino „knockdown“ Studien haben sich aufgrund möglicher unspezifischer Nebeneffekte als schwer interpretierbar erwiesen (zusammengefasst in (Eisen, Smith, 2008)). Verschiedene Kontrollen wurden im Verlauf des letzten Jahrzehnts etabliert und auch in der vorliegenden Arbeit verwendet, um eine Abschätzung der Spezifität der verwendeten Morpholino-oligonukleotide zu ermöglichen (Eisen, Smith, 2008; Ekker, Larson, 2001; Heasman, 2002; Summerton, 2007a). Diese Kontrollen waren beim Matn-1 „knockdown“ besonders wichtig, da ein klarer Unterschied zwischen Zebrafisch „knockdown“ und Maus „knockout“ gefunden wurde. Schon die Injektion eines Morpholinos, dessen Basensequenz keine entsprechende Sequenz im Zebrafischgenom aufweist, führte unabhängig von seiner Sequenz zu etwa 10% phänotypisch veränderten Embryonen (siehe Abb. 3.18). Hier wird deutlich, dass der Einsatz von Morpholinos ohne weitere Kontrollen durchaus problematisch sein kann, wenn die Effektivität des Morpholinos so niedrig ist, dass die durch ihren Einsatz ausgelösten Veränderungen diesen möglicherweise unspezifischen Effekt nicht signifikant überschreiten.

Es wurden daher sowohl ein spleißstellenunterbindende als auch zwei translationsunterbindende Morpholinos verwendet, um die Auswirkungen des Verlustes von Matn-1 auf die Entwicklung des Zebrafisches während der ersten 72 hpf zu untersuchen. Beide „knockdown“ Strategien erzeugten vergleichbare Ergebnisse, ein erster Hinweis darauf, dass der erzielte Effekt nicht auf die Oligonukleotidsequenz oder toxische Nebeneffekte der Morpholinos im Allgemeinen zurückzuführen ist (exemplarisch dargestellt für das spleißstellenunterbindende Matn-1 Morpholino in Abb. 3.15, 3.16 und 3.18). Die Injektion von Matn-1 Morpholinos erzeugte in Abhängigkeit von der injizierten Morpholinomenge die phänotypischen Veränderungen. Je mehr Morpholino eingesetzt wurde, desto mehr phänotypische Embryonen konnten beobachtet werden. Die dazugehörigen Mismatchkontrollen verhielten sich ähnlich, wenn auch zu einem geringeren Grad (Abb. 3.18). Diese Beobachtung ist wichtig, denn sie zeigt, dass selbst die 5-Mismatchkontrollen noch eine geringe Affinität zur Matn-1 mRNA aufweisen. In der Tat wurde die Anzahl an

Fehlpaaren in einem Mismatchmorpholino seit Beginn der Verwendung der „knockdown“ Technik erhöht. Letztlich kann ein Mismatchkontrollmorpholino nur zeigen, dass die Bindungsaffinität zu einer Zielsequenz beeinflusst werden kann und stellt die schwächste der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kontrollen dar. mRNA „Rettungsexperimente“ in Verbindung mit Morpholinos, die Spleißstellen blockieren, erbringen schlüssigere Ergebnisse (Eisen, Smith, 2008). Da das Fehlspleißen der mRNA zu einem funktionalen Verlust des Transkripts führt (dieses Molekül kann nicht mehr korrekt translatiert werden), kann die Koinjektion von korrekt gespleißter mRNA den Phänotypen abmildern, da die Zellen wieder in der Lage sind, das Protein herzustellen. In der vorliegenden Arbeit wurden 3 pg Matn-1 mRNA mit 10 ng Morpholino koinjiziert und die relative Anzahl an Phänotypen konnte dadurch um 60% reduziert werden. Die interessanteste Beobachtung konnte allerdings durch ein anderes Kontrollexperiment gewonnen werden. Ein Teil der unspezifisch toxischen Effekte von Morpholinos beruht auf Apoptose in neuralen Geweben (Ekker, Larson, 2001; Eisen, Smith, 2008). Dies entspricht dem frühen, durch TUNEL-Färbung festgestellten Matn-1 „knockdown“ Phänotypen (siehe 4.6). Es bestand also die Notwendigkeit, nachzuweisen, dass die neurale Apoptose in den beschriebenen Experimenten nicht auf einem unspezifischen Effekt des Matn-1 Morpholinos basierte. Daher wurde ein Ko-„knockdown“ des Zellstressensors p53 durchgeführt, um die p53 vermittelte Apoptose zu verhindern (siehe (Eisen, Smith, 2008) und 4.6). Die Koinjektion von p53 Morpholino führte jedoch nicht zu einer Verminderung des Phänotyps. Ganz im Gegenteil, die koinjizierten Larven zeigten eine Verstärkung des Phänotyps gegenüber den Matn-1 Einzelmorphanten, ein deutlicher Hinweis darauf, dass der erzielte Effekt nicht unspezifisch ist. Zudem wurde dadurch die Vermutung bekräftigt, dass p53 bei den morphologischen Veränderungen nach der Unterdrückung der Matn-1 Expression eine Rolle spielt (siehe 4.6).

#### 4.8. Resümee

Für beide untersuchten Proteine, UCMA wie Matn-1, konnten im Zebrafischmodell wichtige Erkenntnisse über Expression und Funktion gewonnen werden. Die Unterdrückung der Expression beider Proteine führt zum Verlust des Proteoglykangels und des Kollagenetzwerks, der zwei großen Netzwerke der Knorpel-ECM. Der „knockdown“ beider



**Abb. 4.1: Modell der Funktion von Ucmaa und Matn-1 während der Zebrafisch Entwicklung**

Sowohl Glutamat  $\gamma$ -carboxyliertes Ucmaa als auch Matn-1 haben eine unterstützende Rolle bei der Bildung des Proteoglykannetzwerks und des Kollagenetzwerks. Beide Proteine beeinflussen sowohl die embryonale Morphogenese, Ucmaa das Notochord und Matn-1 im restlichen Embryo, als auch die Kraniofazialknorpelbildung (durchgehende Pfeile). Möglicherweise sind die frühen Phänotypen (24 hpf) vom Verlust des Kollagen II $\alpha$ 1a mitverursacht, wohingegen Autophagie in Chondrozyten, ausgelöst durch das Fehlen der Hauptkomponenten des Knorpels, für den Verlust der Kraniofazialkomponenten verantwortlich sein könnte (unterbrochene Pfeile). Teilabbildungen entnommen aus (Heinegård, 2009; Shoulders, Raines, 2009).

Proteine führt zu axialen und kranialen Missbildungen während der frühen Embryonalentwicklung sowie zum Verlust des später auftretenden Kraniofazialknorpels (siehe Abb. 4.1). Aufgrund der Unterschiede in den Expressionsprofilen der beiden Proteine ist anzunehmen, dass die Funktion beider Proteine unterschiedlich ist. Ucmaa fungiert wahrscheinlich als Signalmolekül (vgl. 4.2 und 4.3), Matn-1 hingegen hat möglicherweise eine Adapterfunktion, die bereits bei der Kollagensynthese wirksam wird (siehe 4.5).

Die beobachteten Phänotypen wurden nicht nur beim „knockdown“ von UCMA und Matn-1 gefunden, auch der Verlust anderer Knorpelproteine wie z.B. Decorin (Zoeller u. a., 2009) oder Kollagen XXVII (Christiansen u. a., 2009) führt zu vergleichbaren Phänotypen. Möglicherweise sind die zugrundeliegenden Mechanismen enger miteinander verwoben als bisher angenommen wird. Auffällig ist dabei die Beobachtung, dass die beschriebenen Proteine im Zebrafisch Funktionen abseits der Knorpelbildung aufweisen. Die sehr schnelle Entwicklung des Zebrafischembryonen könnte es nötig machen, etablierten Proteinen neue Kontrollfunktionen zuzuweisen.

## 5. Zusammenfassung

UCMA (im Zebrafisch *Ucma*) und Matrilin-1 sind zwei „nicht kollagene“ Proteine der Extrazellulärmatrix des Knorpels, deren Funktion bisher nur unzureichend aufgeklärt wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde der Zebrafisch als Modellorganismus herangezogen um Expression und Funktion beider Proteine während der Zebrafisch Embryonalentwicklung zu untersuchen.

UCMA, auch GRP genannt, ist ein vor kurzem entdecktes Mitglied der Familie der Glutamat  $\gamma$ -carboxylierten Proteine und wird hauptsächlich im Knorpel exprimiert. Im Zebrafisch sind aufgrund einer zusätzlichen Genomduplikation zwei Kopien des UCMA Gens vorhanden, *ucmaa* und *ucmab*, die sich jeweils auf den Chromosomen 25 und 4 befinden. Genstruktur, alternatives Spleißen und Proteinsequenz von UCMA sind zwischen Säugetieren und Zebrafisch stark konserviert und beide Formen von Zebrafisch *Ucma* sind in skelettalen Geweben exprimiert. *Ucmaa* wurde ab 18 hpf im sich entwickelnden Notochord detektiert. Außerdem wurde es in den sich entwickelnden Kraniofazialknorpeln gefunden. *Ucmab* Expression hingegen konnte nur schwach in spezifischen Knorpeln des Kraniofazialskeletts, jedoch nicht im Notochord und erst ab 96 hpf detektiert werden. Der „knockdown“ von *Ucmaa* führt zu schweren Wachstumsdefekten und Störungen der Skelettbildung. Im Knorpel von Morphanten findet sich weniger Aggrecan und Kollagen II. Vergleichbare Defekte konnten nach Unterdrückung der Glutamat  $\gamma$ -Carboxylierung durch Warfarin beobachtet werden, ein Hinweis darauf, dass die posttranslationale Modifikation essentiell für die Funktion von *Ucmaa* ist und die fehlende Glutamat  $\gamma$ -Carboxylierung an der Entstehung der sogenannten „Warfarin Embryopathien“ und ähnlichen skelettalen Krankheiten des Menschen beteiligt sein kann.

Matrilin-1 ist das prototypische Mitglied der Familie der Matriline und in Mensch und Maus hauptsächlich in Knorpel exprimiert. *Matn-1* weist während der Entwicklung des Zebrafisches eine mehrphasige Expression auf. Während der frühen Expression, die bei ca. 15 hpf ihren Höhepunkt erreicht, ist *Matn-1* im ganzen Zebrafischembryo mit Ausnahme des Notochords exprimiert. Während der späten Expression, die ab etwa 64 hpf beginnt, kann *Matn-1* hauptsächlich im Knorpel detektiert werden. Der „knockdown“ von *Matn-1* führt, ähnlich wie jener von *Ucmaa*, sowohl zu Wachstumsdefekten und Störungen bei der Bildung der Kraniofazialknorpel, als auch zum Verlust von Aggrecan und Kollagen II. Der Verlust von *Matn-1* hat während der frühen und der späten Expression unterschiedliche Auswirkungen. In der frühen Expressionsphase ändert sich die Zellmorphologie nicht, jedoch

können ER-Stress und Apoptose nachgewiesen werden. Während der zweiten Expressionsphase führt der Verlust von Matn-1 zu ausgeprägten morphologischen Veränderungen des endoplasmatischen Retikulums von Chondrozyten. Anzeichen für ER-Stress gibt es nicht, dagegen kann Autophagie nachgewiesen werden. Ein weiterer Hinweis auf eine Störung von Synthese und Sekretion durch den „knockdown“ von Matn-1 ergibt sich aus der Behandlung von Matn-1 Morphanten mit dem Proteasominhibitor Bortezomib. Diese Behandlung erhöhte die Phänotypenrate signifikant, so dass anzunehmen ist, dass die betroffenen Zellen in begrenztem Umfang in der Lage sind den Matn-1 „knockdown“ mit einem erhöhten Proteinabbau zu kompensieren.

## 6. Abstract

UCMA and Matrilin-1 are two non collagenous proteins of the cartilage extracellular matrix whose functions have not yet been fully elucidated. In this study, the zebrafish was used as a model organism to investigate the expression and function of the two proteins during zebrafish embryonic development.

UCMA, alternatively named GRP, is a recently discovered member of the family of the glutamate  $\gamma$ -carboxylated proteins and mainly expressed in cartilage. In zebrafish two copies of the UCMA gene are present due to an additional genome duplication, *ucmaa* and *ucmab*, which are located on chromosomes 25 and 4 respectively. Gene structure, alternative splicing and protein sequence of UCMA are strongly conserved between mammals and zebrafish, and both forms of zebrafish UCMA are expressed in skeletal tissues. *Ucmaa* expression was detected from 18 hpf on in the developing notochord. It was also found in the developing craniofacial cartilage. *Ucmab* expression, however, could only be weakly detected in specific parts of the craniofacial cartilage, but not in the notochord and only from 96 hpf on. The knockdown of *Ucmaa* leads to severe growth defects and disruption of skeletal formation and the cartilage of *Ucmaa* morphants contains decreased amounts of collagen II and aggrecan. Comparable defects could be observed after suppression of glutamate  $\gamma$ -carboxylation by warfarin, an indication that posttranslational modification is essential for the function of *Ucmaa* and that the lack of glutamate  $\gamma$ -carboxylation is involved in the etiology of "warfarin embryopathies" and similar skeletal diseases in humans.

Matrilin-1 is the prototypical member of the matrilin protein family. In human and mouse it is mainly expressed in cartilage. *Matn-1* shows a multiphasic expression during zebrafish development. During the early expression phase, which peaks at about 15 hpf, *Matn-1* is present throughout the zebrafish embryo with exception of the notochord. During the late phase, which begins around 64 hpf, *Matn-1* is detected mainly in cartilage. The "knock down" of *Matn-1* results, similar to that of *Ucmaa*, in both growth defects and disturbances in the formation of the craniofacial cartilage, as well as the loss of aggrecan and collagen II. The lack of *Matn-1* has different effects on the development of the zebrafish during the early and the late expression phases. The knockdown during the early phase has no effects on cell morphology, although ER stress and apoptosis can be detected. During the second phase, the loss of *Matn-1* leads to pronounced morphological changes of the ER of chondrocytes. ER stress does not occur, but autophagy can be detected. Another indication that protein synthesis and secretion is disturbed by the knockdown of *Matn-1* was obtained by the treatment of

Matn-1 morphants with the proteasome inhibitor Bortezomib. This significantly increases the phenotype frequency, suggesting that the affected cells are able to partially compensate for the loss of Matn-1 by increased protein degradation.

## 7. Literaturverzeichnis

- Achenbach, Tatjana V; Brunner, Bodo; Heermeier, Kathrin (2003): „Oligonucleotide - Based Knockdown Technologies: Antisense Versus RNA Interference“. In: *ChemBioChem*. 4 (10), S. 928-935, doi: 10.1002/cbic.200300708.
- Agou, Fabrice; Traincard, François; Vinolo, Emilie; u. a. (2004): „The Trimerization Domain of Nemo Is Composed of the Interacting C-terminal CC2 and LZ Coiled-coil Subdomains“. In: *Journal of Biological Chemistry*. 279 (27), S. 27861 -27869, doi: 10.1074/jbc.M314278200.
- Ariga, Toshio; Miyatake, Tadashi; Yu, Robert K (2010): „Role of proteoglycans and glycosaminoglycans in the pathogenesis of Alzheimer’s disease and related disorders: amyloidogenesis and therapeutic strategies--a review“. In: *Journal of Neuroscience Research*. 88 (11), S. 2303-2315, doi: 10.1002/jnr.22393.
- Aszódi, A; Módis, L; Páldi, A; u. a. (1994): „The zonal expression of chicken cartilage matrix protein gene in the developing skeleton of transgenic mice“. In: *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*. 14 (2), S. 181-190.
- Aszódi, Attila; Bateman, John F.; Hirsch, Emilio; u. a. (1999): „Normal Skeletal Development of Mice Lacking Matrilin 1: Redundant Function of Matrilins in Cartilage?“. In: *Molecular and Cellular Biology*. 19 (11), S. 7841-7845.
- Aszódi, Attila; Hauser, Nik; Studer, Daniel; u. a. (1996): „Cloning, Sequencing and Expression Analysis of Mouse Cartilage Matrix Protein cDNA“. In: *European Journal of Biochemistry*. 236 (3), S. 970-977, doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.00970.x.
- Baas, Dominique; Malbouyres, Maryline; Haftek-Terreau, Zofia; u. a. (2009): „Craniofacial cartilage morphogenesis requires zebrafish coll1a1 activity“. In: *Matrix Biology*. 28 (8), S. 490-502, doi: 10.1016/j.matbio.2009.07.004.
- Banerjee, Diya; Slack, Frank (2002): „Control of developmental timing by small temporal RNAs: a paradigm for RNA-mediated regulation of gene expression“. In: *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*. 24 (2), S. 119-129, doi: 10.1002/bies.10046.
- Barlow, D P; Green, N M; Kurkinen, M; u. a. (1984): „Sequencing of laminin B chain cDNAs reveals C-terminal regions of coiled-coil alpha-helix“. In: *The EMBO Journal*. 3 (10), S. 2355-2362.
- Becerra, José; Andrades, José A.; Guerado, Enrique; u. a. (2010): „Articular Cartilage: Structure and Regeneration“. In: *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 16 (6), S. 617-627, doi: 10.1089/ten.teb.2010.0191.
- Berkner, Kathleen L. (2000): „The Vitamin K–Dependent Carboxylase“. In: *The Journal of Nutrition*. 130 (8), S. 1877 -1880.

- Bertrand, Jessica; Cromme, Christoph; Umlauf, Daniel; u. a. (2010): „Molecular mechanisms of cartilage remodelling in osteoarthritis“. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 42 (10), S. 1594-1601, doi: 16/j.biocel.2010.06.022.
- Blair, Harry C; Zaidi, Mone; Schlesinger, Paul H (2002): „Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation.“. In: *Biochemical Journal*. 364 (Pt 2), S. 329-341, doi: 10.1042/BJ20020165.
- Blumer, Michael J.F.; Longato, Stefano; Fritsch, Helga (2008): „Structure, formation and role of cartilage canals in the developing bone“. In: *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*. 190 (4), S. 305-315, doi: 16/j.aanat.2008.02.004.
- Bonewald, Lynda F (2011): „The amazing osteocyte“. In: *Journal of Bone and Mineral Research*. 26 (2), S. 229-238, doi: 10.1002/jbmr.320.
- Borochowitz, Z; Scheffer, D; Adir, V; u. a. (2004): „Spondylo-epi-metaphyseal dysplasia (SEMD) matrilin 3 type: homozygote matrilin 3 mutation in a novel form of SEMD“. In: *Journal of Medical Genetics*. 41 (5), S. 366-372, doi: 10.1136/jmg.2003.013342.
- Boskey, A.L.; Coleman, R. (2010): „Aging and Bone“. In: *Journal of Dental Research*. 89 (12), S. 1333 -1348, doi: 10.1177/0022034510377791.
- Brady, Colleen A.; Attardi, Laura D. (2010): „p53 at a glance“. In: 123 (15), S. 2527-2532, doi: 10.1242/jcs.064501.
- Briggs, Michael D; Chapman, Kathryn L (2002): „Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia: Mutation review, molecular interactions, and genotype to phenotype correlations“. In: *Human Mutation*. 19 (5), S. 465-478, doi: 10.1002/humu.10066.
- Carney, Thomas J; Dutton, Kirsten A; Greenhill, Emma; u. a. (2006): „A direct role for Sox10 in specification of neural crest-derived sensory neurons“. In: *Development (Cambridge, England)*. 133 (23), S. 4619-4630, doi: 10.1242/dev.02668.
- Chakravarti, Ritu; Adams, Josephine C (2006): „Comparative genomics of the syndecans defines an ancestral genomic context associated with matrilins in vertebrates“. In: *BMC Genomics*. 7, S. 83, doi: 10.1186/1471-2164-7-83.
- Chapman, Kathryn L.; Mortier, Geert R.; Chapman, Kay; u. a. (2001): „Mutations in the region encoding the von Willebrand factor A domain of matrilin-3 are associated with multiple epiphyseal dysplasia“. In: *Nat Genet*. 28 (4), S. 393-396, doi: 10.1038/ng573.
- Chen, Zhijun; Tang, Nelson L S; Cao, Xingbin; u. a. (2009): „Promoter polymorphism of matrilin-1 gene predisposes to adolescent idiopathic scoliosis in a Chinese population“. In: *European Journal of Human Genetics: EJHG*. 17 (4), S. 525-532, doi: 10.1038/ejhg.2008.203.
- Christiansen, Helena E; Lang, Michael R; Pace, James M; u. a. (2009): „Critical early roles for col27a1a and col27a1b in zebrafish notochord morphogenesis, vertebral mineralization and post-embryonic axial growth“. In: *PloS One*. 4 (12), S. e8481, doi: 10.1371/journal.pone.0008481.

- Chun, Jang-Soo; Oh, Hwanhee; Yang, Siyoung; u. a. (2008): „Wnt signaling in cartilage development and degeneration“. In: *BMB Reports*. 41 (7), S. 485-494.
- Côte, Pierre; Sulea, Traian; Dignard, Daniel; u. a. (2011): „Evolutionary Reshaping of Fungal Mating Pathway Scaffold Proteins“. In: *mBio*. 2 (1), doi: 10.1128/mBio.00230-10.
- Cotterill, Sally L; Jackson, Gail C; Leighton, Matthew P; u. a. (2005): „Multiple epiphyseal dysplasia mutations in MATN3 cause misfolding of the A-domain and prevent secretion of mutant matrilin-3“. In: 26 (6), S. 557-565, doi: 10.1002/humu.20263.
- Dale, Rodney M; Topczewski, Jacek (2011): „Identification of an evolutionarily conserved regulatory element of the zebrafish col2a1a gene“. In: *Developmental Biology*. 357 (2), S. 518-531, doi: 10.1016/j.ydbio.2011.06.020.
- Dames, S A; Kammerer, R A; Wiltscheck, R; u. a. (1998): „NMR structure of a parallel homotrimeric coiled coil“. In: *Nature Structural Biology*. 5 (8), S. 687-691, doi: 10.1038/1382.
- Deák, Ferenc; Wagener, Raimund; Kiss, Ibolya; u. a. (1999): „The matrilins: a novel family of oligomeric extracellular matrix proteins“. In: *Matrix Biology*. 18 (1), S. 55-64, doi: 16/S0945-053X(98)00006-7.
- Demuth, Jeffery P; Hahn, Matthew W (2009): „The life and death of gene families“. In: *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*. 31 (1), S. 29-39, doi: 10.1002/bies.080085.
- Draper, Bruce W; Morcos, Paul A; Kimmel, Charles B (2001): „Inhibition of zebrafish fgf8 pre - mRNA splicing with morpholino oligos: A quantifiable method for gene knockdown“. In: *genesis*. 30 (3), S. 154-156, doi: 10.1002/gene.1053.
- Du, Shao Jun; Frenkel, Victor; Kindschi, Greg; u. a. (2001): „Visualizing Normal and Defective Bone Development in Zebrafish Embryos Using the Fluorescent Chromophore Calcein“. In: *Developmental Biology*. 238 (2), S. 239-246, doi: 06/dbio.2001.0390.
- Ducy, P; Desbois, C; Boyce, B; u. a. (1996): „Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice“. In: *Nature*. 382 (6590), S. 448-452, doi: 10.1038/382448a0.
- Dudek, J.; Benedix, J.; Cappel, S. u. a. (2009): „Functions and pathologies of BiP and its interaction partners“. In: *Cellular and Molecular Life Sciences*. 66 (9), S. 1556-1569, doi: 10.1007/s00018-009-8745-y.
- Ehlen, Harald W. A.; Sengle, Gerhard; Klatt, Andreas R. u. a. (2009): „Proteolytic Processing Causes Extensive Heterogeneity of Tissue Matrilin Forms“. In: *Journal of Biological Chemistry*. 284 (32), S. 21545 -21556, doi: 10.1074/jbc.M109.016568.
- Eisen, Judith S.; Smith, James C. (2008): „Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense“. In: *Development*. 135 (10), S. 1735 -1743, doi: 10.1242/dev.001115.
- Ekker, Stephen C; Larson, Jon D (2001): „Morphant technology in model developmental systems“. In: *genesis*. 30 (3), S. 89-93, doi: 10.1002/gene.1038.

- Fang, Ming; Adams, Jason S; McMahan, B Lane; u. a. (2010): „The expression patterns of minor fibrillar collagens during development in zebrafish“. In: *Gene Expression Patterns: GEP*. 10 (7-8), S. 315-322, doi: 10.1016/j.gep.2010.07.002.
- Force, A; Lynch, M; Pickett, F B; u. a. (1999): „Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations.“. In: *Genetics*. 151 (4), S. 1531-1545.
- Fresquet, Maryline; Jackson, Gail C; Loughlin, John; u. a. (2008): „Novel mutations in exon 2 of MATN3 affect residues within the  $\alpha$ -helices of the A - domain and can result in the intracellular retention of mutant matrilin - 3“. In: *Human Mutation*. 29 (2), S. 330-330, doi: 10.1002/humu.9518.
- Furie, Bruce; Furie, Barbara C (1991): „Molecular Basis of  $\gamma$  - Carboxylation“. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 614 (1), S. 1-10, doi: 10.1111/j.1749-6632.1991.tb43687.x.
- Gansner, John M.; Mendelsohn, Bryce A.; Hultman, Keith A. u. a. (2007): „Essential role of lysyl oxidases in notochord development“. In: *Developmental Biology*. 307 (2), S. 202-213, doi: 16/j.ydbio.2007.04.029.
- Gansner, John M; Gitlin, Jonathan D (2008): „Essential role for the alpha 1 chain of type VIII collagen in Zebrafish notochord formation“. In: *Developmental Dynamics*. 237 (12), S. 3715-3726, doi: 10.1002/dvdy.21779.
- Gavaia, Paulo J.; Simes, Dina C.; Ortiz-Delgado, J.B. u. a. (2006): „Osteocalcin and matrix Gla protein in zebrafish (*Danio rerio*) and Senegal sole (*Solea senegalensis*): Comparative gene and protein expression during larval development through adulthood“. In: *Gene Expression Patterns*. 6 (6), S. 637-652, doi: 16/j.modgep.2005.11.010.
- Glickman, Nathalia S; Kimmel, Charles B; Jones, Martha A; u. a. (2003): „Shaping the zebrafish notochord“. In: *Development (Cambridge, England)*. 130 (5), S. 873-887.
- Glimcher, L H (2009): „XBP1: the last two decades“. In: *Annals of the Rheumatic Diseases*. 69 (Suppl 1), S. i67-i71, doi: 10.1136/ard.2009.119388.
- Goldring, Mary B; Tsuchimochi, Kaneyuki; Ijiri, Kosei (2006): „The control of chondrogenesis“. In: *Journal of Cellular Biochemistry*. 97 (1), S. 33-44, doi: 10.1002/jcb.20652.
- Gottlieb, Josef (1942): „Der Epigenetische Gedanke in der Geschichte der Organischen Formbildung“. In: *Klinische Wochenschrift*. 21 (51), S. 1127-1130, doi: 10.1007/BF01769020.
- Grabowski, Peter (2009): „Physiology of bone“. In: *Endocrine Development*. 16 , S. 32-48, doi: 10.1159/000223687.
- Gump, Jacob M.; Thorburn, Andrew (2011): „Autophagy and apoptosis: what is the connection?“. In: *Trends in Cell Biology*. 21 (7), S. 387-392, doi: 16/j.tcb.2011.03.007.

- Hall, Judith G.; Pauli, Richard M.; Wilson, Kathleen M. (1980): „Maternal and fetal sequelae of anticoagulation during pregnancy“. In: *The American Journal of Medicine*. 68 (1), S. 122-140, doi: 16/0002-9343(80)90181-3.
- Hamilton, Francis (1822): *An Account of the Fishes found in the river ganges and its branches*.
- Hanumanthaiah, Ravikumar; Thankavel, Bharath; Day, Kenneth; u. a. (2001): „Developmental Expression of Vitamin K-Dependent Gamma-Carboxylase Activity in Zebrafish Embryos: Effect of Warfarin“. In: *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 27 (6), S. 992-999, doi: 10.1006/bcmd.2001.0472.
- Hauser, N; Paulsson, M (1994): „Native cartilage matrix protein (CMP). A compact trimer of subunits assembled via a coiled-coil alpha-helix.“. In: *Journal of Biological Chemistry*. 269 (41), S. 25747 -25753.
- Hauser, Nik; Paulsson, Mats; Heinegård, Dick; u. a. (1996): „Interaction of Cartilage Matrix Protein with Aggrecan“. In: *Journal of Biological Chemistry*. 271 (50), S. 32247 -32252, doi: 10.1074/jbc.271.50.32247.
- Heasman, Janet (2002): „Morpholino Oligos: Making Sense of Antisense?“. In: *Developmental Biology*. 243 (2), S. 209-214, doi: 06/dbio.2001.0565.
- Heinegård, Dick (2009): „Proteoglycans and more--from molecules to biology“. In: *International Journal of Experimental Pathology*. 90 (6), S. 575-586, doi: 10.1111/j.1365-2613.2009.00695.x.
- Hill, Adrian J.; Teraoka, Hiroki; Heideman, Warren; u. a. (2005): „Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity“. In: *Toxicological Sciences*. 86 (1), S. 6 -19, doi: 10.1093/toxsci/kfi110.
- Hinek, A; Reiner, A; Poole, A R (1987): „The calcification of cartilage matrix in chondrocyte culture: studies of the C-propeptide of type II collagen (chondrocalcin)“. In: *The Journal of Cell Biology*. 104 (5), S. 1435-1441.
- Huang, Cheng-chen; Wang, Tai-Chuan; Lin, Bo-Hung; u. a. (2009): „Collagen IX is required for the integrity of collagen II fibrils and the regulation of vascular plexus formation in Zebrafish caudal fins“. In: *Developmental Biology*. 332 (2), S. 360-370, doi: 16/j.ydbio.2009.06.003.
- Huang, X; Birk, D E; Goetinck, P F (1999): „Mice lacking matrilin-1 (cartilage matrix protein) have alterations in type II collagen fibrillogenesis and fibril organization“. In: *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*. 216 (4-5), S. 434-441, doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199912)216:4/5<434::AID-DVDY11>3.0.CO;2-X.
- Huxley - Jones, Julie; Pinney, John W; Archer, John; u. a. (2009): „Back to basics – how the evolution of the extracellular matrix underpinned vertebrate evolution“. In: *International Journal of Experimental Pathology*. 90 (2), S. 95-100, doi: 10.1111/j.1365-2613.2008.00637.x.
- Hwang, Eun Mi; Kim, Dong-Gyu; Lee, Byung Ju; u. a. (2007): „Alternative splicing generates a novel non-secretable cytosolic isoform of NELL2“. In: *Biochemical and*

- Biophysical Research Communications*. 353 (3), S. 805-811, doi: 16/j.bbrc.2006.12.115.
- Iozzo, R V (1998): „Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function“. In: *Annual Review of Biochemistry*. 67 , S. 609-652, doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.609.
- Iozzo, Renato V; Schaefer, Liliana (2010): „Proteoglycans in health and disease: novel regulatory signaling mechanisms evoked by the small leucine-rich proteoglycans“. In: *The FEBS Journal*. 277 (19), S. 3864-3875, doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07797.x.
- Iozzo, RV; Murdoch, AD (1996): „Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function“. In: *The FASEB Journal*. 10 (5), S. 598 -614.
- Jackson, G; Barker, F; Jakkula, E; u. a. (2004): „Missense mutations in the  $\beta$  strands of the single A-domain of matrilin-3 result in multiple epiphyseal dysplasia“. In: *Journal of Medical Genetics*. 41 (1), S. 52-59, doi: 10.1136/jmg.2003.011429.
- Le Jeune, Marion; Tomavo, Nathalie; Tian, Tian V. u. a. (2010): „Identification of four alternatively spliced transcripts of the Ucpa/GRP gene, encoding a new Gla-containing protein“. In: *Experimental Cell Research*. 316 (2), S. 203-215, doi: 10.1016/j.yexcr.2009.10.002.
- Jiang, Shibo; Debnath, Asim K. (2000): „Development of HIV Entry Inhibitors Targeted to the Coiled-Coil Regions of gp41“. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 269 (3), S. 641-646, doi: 06/bbrc.1999.1972.
- Kanbe, Katsuaki; Yang, Xu; Wei, Lei; u. a. (2007): „Pericellular Matrilins Regulate Activation of Chondrocytes by Cyclic Load - Induced Matrix Deformation“. In: *Journal of Bone and Mineral Research*. 22 (2), S. 318-328, doi: 10.1359/jbmr.061104.
- Kang, Jeong Suk; Kawakami, Yasuhiko; Bekku, Yoko; u. a. (2008): „Molecular cloning and developmental expression of a hyaluronan and proteoglycan link protein gene, crt11/hapl1, in zebrafish“. In: *Zoological Science*. 25 (9), S. 912-918, doi: 10.2108/zsj.25.912.
- Karsenty, Gerard (2006): „Convergence between bone and energy homeostases: Leptin regulation of bone mass“. In: *Cell Metabolism*. 4 (5), S. 341-348, doi: 16/j.cmet.2006.10.008.
- Kerr, J. F. R.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. (1972): „Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics“. In: *British Journal of Cancer*. 26 (4), S. 239-257.
- Kimmel, C B; Ballard, W W; Kimmel, S R; u. a. (1995): „Stages of embryonic development of the zebrafish“. In: *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*. 203 (3), S. 253-310, doi: 10.1002/aja.1002030302.
- Kimmel, Charles B.; Law, Robert D. (1985): „Cell lineage of zebrafish blastomeres : I. Cleavage pattern and cytoplasmic bridges between cells“. In: *Developmental Biology*. 108 (1), S. 78-85, doi: 16/0012-1606(85)90010-7.

- Kimmel, Charles B.; Miller, Craig T.; Moens, Cecilia B. (2001): „Specification and Morphogenesis of the Zebrafish Larval Head Skeleton“. In: *Developmental Biology*. 233 (2), S. 239-257, doi: 06/dbio.2001.0201.
- Klatt, Andreas R.; Becker, Ann-Kathrin A.; Neacsu, Cristian D. u. a. (2011): „The matrilins: Modulators of extracellular matrix assembly“. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 43 (3), S. 320-330, doi: 10.1016/j.biocel.2010.12.010.
- Klatt, Andreas R.; Nitsche, D. Patric; Kobbe, Birgit; u. a. (2001): „Molecular Structure, Processing, and Tissue Distribution of Matrilin-4“. In: *Journal of Biological Chemistry*. 276 (20), S. 17267 -17275, doi: 10.1074/jbc.M100587200.
- Klatt, Andreas R.; Nitsche, D. Patric; Kobbe, Birgit; u. a. (2000): „Molecular Structure and Tissue Distribution of Matrilin-3, a Filament-forming Extracellular Matrix Protein Expressed during Skeletal Development“. In: *Journal of Biological Chemistry*. 275 (6), S. 3999 -4006, doi: 10.1074/jbc.275.6.3999.
- Klatt, Andreas R.; Klinger, Gabriele; Paul-Klausch, Brigitte; u. a. (2009): „Matrilin-3 activates the expression of osteoarthritis-associated genes in primary human chondrocytes“. In: *FEBS Letters*. 583 (22), S. 3611-3617, doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.035.
- Kleemann-Fischer, D; Kleemann, G R; Engel, D; u. a. (2001): „Molecular properties of matrilin-3 isolated from human growth cartilage“. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 387 (2), S. 209-215, doi: 10.1006/abbi.2000.2256.
- Klionsky, Daniel J; Cuervo, Ana Maria; Seglen, Per O (2007): „Methods for monitoring autophagy from yeast to human“. In: *Autophagy*. 3 (3), S. 181-206.
- Knight, Robert D.; Schilling, Thomas F. (2006): „Cranial Neural Crest and Development of the Head Skeleton“. In: Saint-Jeannet, Jean-Pierre (Hrsg.) *Neural Crest Induction and Differentiation*. Boston, MA: Springer US S. 120-133. — ISBN: 978-0-387-35136-0
- Ko, Yaping; Kobbe, Birgit; Nicolae, Claudia; u. a. (2004): „Matrilin-3 Is Dispensable for Mouse Skeletal Growth and Development“. In: *Molecular and Cellular Biology*. 24 (4), S. 1691-1699, doi: 10.1128/MCB.24.4.1691-1699.2004.
- Ko, Ya-Ping; Kobbe, Birgit; Paulsson, Mats; u. a. (2005): „Zebrafish (*Danio rerio*) matrilins: shared and divergent characteristics with their mammalian counterparts“. In: *The Biochemical Journal*. 386 (Pt 2), S. 367-379, doi: 10.1042/BJ20041486.
- Krysko, Dmitri V.; Vanden Berghe, Tom; D'Herde, Katharina; u. a. (2008): „Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis“. In: *Methods*. 44 (3), S. 205-221, doi: 10.1016/j.ymeth.2007.12.001.
- Laemmli, U K (1970): „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4“. In: *Nature*. 227 (5259), S. 680-685.
- Langenberg, Tobias; Kahana, Alon; Wszalek, Joseph A; u. a. (2008): „The eye organizes neural crest cell migration“. In: *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*. 237 (6), S. 1645-1652, doi: 10.1002/dvdy.21577.

- Lee, Na Kyung; Sowa, Hideaki; Hinoi, Eiichi; u. a. (2007): „Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton“. In: *Cell*. 130 (3), S. 456-469, doi: 10.1016/j.cell.2007.05.047.
- Lefebvre, Véronique; Bhattaram, Pallavi (2010): „Vertebrate skeletogenesis“. In: 90 , S. 291-317, doi: 10.1016/S0070-2153(10)90008-2.
- Leighton, Matthew P.; Nundlall, Seema; Starborg, Tobias; u. a. (2007): „Decreased chondrocyte proliferation and dysregulated apoptosis in the cartilage growth plate are key features of a murine model of epiphyseal dysplasia caused by a *matn3* mutation“. In: *Human molecular genetics*. 16 (14), S. 1728-1741, doi: 10.1093/hmg/ddm121.
- Leung, Alan W L; Wong, Sandra Y Y; Chan, Danny; u. a. (2010): „Loss of procollagen IIA from the anterior mesendoderm disrupts the development of mouse embryonic forebrain“. In: *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*. 239 (9), S. 2319-2329, doi: 10.1002/dvdy.22366.
- Lewandoski, Mark; Mackem, Susan (2009): „Limb Development: The Rise and Fall of Retinoic Acid“. In: *Current Biology*. 19 (14), S. R558-R561, doi: 16/j.cub.2009.06.017.
- Lieschke, Graham J.; Trede, Nikolaus S. (2009): „Fish immunology“. In: *Current Biology*. 19 (16), S. R678-R682, doi: 16/j.cub.2009.06.068.
- Luo, G; Ducky, P; McKee, M D; u. a. (1997): „Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein“. In: *Nature*. 386 (6620), S. 78-81, doi: 10.1038/386078a0.
- Mabuchi, Akihiko; Haga, Nobuhiko; Maeda, Koichi; u. a. (2004): „Novel and recurrent mutations clustered in the von Willebrand factor A domain of *MATN3* in multiple epiphyseal dysplasia“. In: *Human Mutation*. 24 (5), S. 439-440, doi: 10.1002/humu.9286.
- Mackie, E.J.; Ahmed, Y.A.; Tatarczuch, L. u. a. (2008): „Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton“. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 40 (1), S. 46-62, doi: 16/j.biocel.2007.06.009.
- Makihira, Seicho; Yan, Weiqun; Ohno, Shigeru; u. a. (1999): „Enhancement of Cell Adhesion and Spreading by a Cartilage-specific Noncollagenous Protein, Cartilage Matrix Protein (CMP/Matrilin-1), via Integrin  $\alpha 1\beta 1$ “. In: *Journal of Biological Chemistry*. 274 (16), S. 11417 -11423, doi: 10.1074/jbc.274.16.11417.
- Mann, Henning H.; Özbek, Suat; Engel, Jürgen; u. a. (2004): „Interactions between the Cartilage Oligomeric Matrix Protein and Matrilins“. In: *Journal of Biological Chemistry*. 279 (24), S. 25294 -25298, doi: 10.1074/jbc.M403778200.
- Mann, Henning H.; Sengle, Gerhard; Gebauer, Jan M. u. a. (2007): „Matrilins mediate weak cell attachment without promoting focal adhesion formation“. In: *Matrix Biology*. 26 (3), S. 167-174, doi: 16/j.matbio.2006.10.010.

- Mátés, Lajos; Nicolae, Claudia; Mörgelin, Matthias; u. a. (2004): „Mice lacking the extracellular matrix adaptor protein matrilin-2 develop without obvious abnormalities“. In: *Matrix Biology*. 23 (3), S. 195-204, doi: 16/j.matbio.2004.05.003.
- McGonnell, I M; McKay, I J; Graham, A (2001): „A population of caudally migrating cranial neural crest cells: functional and evolutionary implications“. In: *Developmental Biology*. 236 (2), S. 354-363, doi: 10.1006/dbio.2001.0330.
- McKenzie, Patrick; Chandalavada, Seetharam C; Bohrer, Justin; u. a. (2006): „Phylogenomic analysis of vertebrate thrombospondins reveals fish-specific paralogues, ancestral gene relationships and a tetrapod innovation“. In: *BMC Evolutionary Biology*. 6 , S. 33, doi: 10.1186/1471-2148-6-33.
- Meissner, Petra; Pick, Horst; Kulangara, Alexandra; u. a. (2001): „Transient gene expression: Recombinant protein production with suspension - adapted HEK293 - EBNA cells“. In: *Biotechnology and Bioengineering*. 75 (2), S. 197-203, doi: 10.1002/bit.1179.
- Min, J L; Meulenbelt, I; Riyazi, N; u. a. (2006): „Association of matrilin-3 polymorphisms with spinal disc degeneration and osteoarthritis of the first carpometacarpal joint of the hand“. In: *Annals of the Rheumatic Diseases*. 65 (8), S. 1060-1066, doi: 10.1136/ard.2005.045153.
- Mizushima, Noboru (2004): „Methods for monitoring autophagy“. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 36 (12), S. 2491-2502, doi: 16/j.biocel.2004.02.005.
- Montanaro, Lucio; Parisini, Patrizio; Greggi, Tiziana; u. a. (2006): „Evidence of a linkage between matrilin-1 gene (MATN1) and idiopathic scoliosis“. In: *Scoliosis*. 1 , S. 21, doi: 10.1186/1748-7161-1-21.
- Mostert, A. K; Dijkstra, P. F; Jansen, B. R.H; u. a. (2003): „Familial multiple epiphyseal dysplasia due to a matrilin - 3 mutation: Further delineation of the phenotype including 40 years follow - up“. In: *American Journal of Medical Genetics Part A*. 120A (4), S. 490-497, doi: 10.1002/ajmg.a.20034.
- Moulton, Jon D.; Jiang, Shan (2009): „Gene Knockdowns in Adult Animals: PPMOs and Vivo-Morpholinos“. In: *Molecules*. 14 (3), S. 1304-1323, doi: 10.3390/molecules14031304.
- Mundlos, S.; Zabel, B. (1994): „Developmental expression of human cartilage matrix protein“. In: *Developmental Dynamics*. 199 (3), S. 241-252, doi: 10.1002/aja.1001990308.
- Myllyharju, Johanna; Kivirikko, Kari I. (2004): „Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms“. In: *Trends in Genetics*. 20 (1), S. 33-43, doi: 16/j.tig.2003.11.004.
- Nagata, K; Kohda, D; Hatanaka, H; u. a. (1994): „Solution structure of the epidermal growth factor-like domain of heregulin-alpha, a ligand for p180erbB-4.“. In: *The EMBO Journal*. 13 (15), S. 3517-3523.

- Nasevicius, Aidan; Ekker, Stephen C. (2000): „Effective targeted gene /'knockdown/' in zebrafish“. In: *Nat Genet.* 26 (2), S. 216-220, doi: 10.1038/79951.
- Nicolae, Claudia; Ko, Ya-Ping; Miosge, Nicolai; u. a. (2007): „Abnormal Collagen Fibrils in Cartilage of Matrilin-1/Matrilin-3-deficient Mice“. In: *Journal of Biological Chemistry.* 282 (30), S. 22163 -22175, doi: 10.1074/jbc.M610994200.
- Nundlall, Seema; Rajpar, M Helen; Bell, Peter A; u. a. (2010): „An unfolded protein response is the initial cellular response to the expression of mutant matrilin-3 in a mouse model of multiple epiphyseal dysplasia“. In: *Cell Stress & Chaperones.* 15 (6), S. 835-849, doi: 10.1007/s12192-010-0193-y.
- Nusslein-Volhard, Christiane; Dahm, Ralf (2002): *Zebrafish: A Practical Approach.* 1. Aufl. Oxford University Press, USA. — ISBN: 019963808X
- Ogata, Maiko; Hino, Shin-ichiro; Saito, Atsushi; u. a. (2006): „Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress“. In: *Molecular and Cellular Biology.* 26 (24), S. 9220-9231, doi: 10.1128/MCB.01453-06.
- Ohno, Susumu (1999): „Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes circa 1970-1999“. In: *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 10 (5), S. 517-522, doi: 06/scdb.1999.0332.
- Olney, Robert C (2009): „Mechanisms of impaired growth: effect of steroids on bone and cartilage“. In: *Hormone Research.* 72 Suppl 1 , S. 30-35, doi: 10.1159/000229761.
- Onyekwelu, Ikemefuna; Goldring, Mary B; Hidaka, Chisa (2009): „Chondrogenesis, joint formation, and articular cartilage regeneration“. In: *Journal of Cellular Biochemistry.* 107 (3), S. 383-392, doi: 10.1002/jcb.22149.
- Otten, C; Wagener, R; Paulsson, M; u. a. (2005): „Matrilin-3 mutations that cause chondrodysplasias interfere with protein trafficking while a mutation associated with hand osteoarthritis does not“. In: *Journal of Medical Genetics.* 42 (10), S. 774-779, doi: 10.1136/jmg.2004.029462.
- Otten, Christiane; Hansen, Uwe; Talke, Anja; u. a. (2010): „A matrilin - 3 mutation associated with osteoarthritis does not affect collagen affinity but promotes the formation of wider cartilage collagen fibrils“. In: *Human Mutation.* 31 (3), S. 254-263, doi: 10.1002/humu.21182.
- Pagnon-Minot, Aurélie; Malbouyres, Marilyne; Haftek-Terreau, Zofia; u. a. (2008): „Collagen XV, a novel factor in zebrafish notochord differentiation and muscle development“. In: *Developmental Biology.* 316 (1), S. 21-35, doi: 16/j.ydbio.2007.12.033.
- Pauli, R M; Lian, J B; Mosher, D F; u. a. (1987): „Association of congenital deficiency of multiple vitamin K-dependent coagulation factors and the phenotype of the warfarin embryopathy: clues to the mechanism of teratogenicity of coumarin derivatives.“. In: *American Journal of Human Genetics.* 41 (4), S. 566-583.
- Paulsson, M; Deutzmann, R; Timpl, R; u. a. (1985): „Evidence for coiled-coil alpha-helical regions in the long arm of laminin“. In: *The EMBO Journal.* 4 (2), S. 309-316.

- Paulsson, M; Heinegård, D (1979): „Matrix proteins bound to associatively prepared proteoglycans from bovine cartilage.“. In: *Biochemical Journal*. 183 (3), S. 539-545.
- Paulsson, M; Heinegård, D (1981): „Purification and structural characterization of a cartilage matrix protein.“. In: *Biochemical Journal*. 197 (2), S. 367-375.
- Piecha, Dorothea; Muratoglu, Selen; Mörgelin, Matthias; u. a. (1999): „Matrilin-2, a Large, Oligomeric Matrix Protein, Is Expressed by a Great Variety of Cells and Forms Fibrillar Networks“. In: *Journal of Biological Chemistry*. 274 (19), S. 13353 -13361, doi: 10.1074/jbc.274.19.13353.
- Piecha, Dorothea; Wiberg, Charlotte; Mörgelin, Matthias; u. a. (2002): „Matrilin-2 interacts with itself and with other extracellular matrix proteins.“. In: *Biochemical Journal*. 367 (Pt 3), S. 715-721, doi: 10.1042/BJ20021069.
- Plaster, N; Sonntag, C; Busse, C E; u. a. (2005): „p53 deficiency rescues apoptosis and differentiation of multiple cell types in zebrafish flathead mutants deficient for zygotic DNA polymerase [delta]1“. In: *Cell Death Differ*. 13 (2), S. 223-235.
- Pullig, O; Tagariello, A; Schweizer, A; u. a. (2007): „MATN3 (matrilin-3) sequence variation (pT303M) is a risk factor for osteoarthritis of the CMC1 joint of the hand, but not for knee osteoarthritis“. In: *Annals of the Rheumatic Diseases*. 66 (2), S. 279-280, doi: 10.1136/ard.2006.058263.
- Razzaque, Mohammed Shawkat (2011): „Osteocalcin: a pivotal mediator or an innocent bystander in energy metabolism?“. In: *Nephrology Dialysis Transplantation*. 26 (1), S. 42 -45, doi: 10.1093/ndt/gfq721.
- Reed, Charles C.; Iozzo, Renato V. (2002): „The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis“. In: *Glycoconjugate Journal*. 19 (4/5), S. 249-255, doi: 10.1023/A:1025383913444.
- Van der Rest, M; Rosenberg, L C; Olsen, B R; u. a. (1986): „Chondrocalcin is identical with the C-propeptide of type II procollagen“. In: *The Biochemical Journal*. 237 (3), S. 923-925.
- Reynolds, William W.; Karlotski, William J. (1977): „The Allometric Relationship of Skeleton Weight to Body Weight in Teleost Fishes: A Preliminary Comparison with Birds and Mammals“. In: *Copeia*. 1977 (1), S. 160-163, doi: 10.2307/1443520.
- Roach, H. I.; Aigner, T.; Kouri, J. B. (2004): „Chondroptosis: A variant of apoptotic cell death in chondrocytes?“. In: *Apoptosis*. 9 (3), S. 265-277, doi: 10.1023/B:APPT.0000025803.17498.26.
- Robu, Mara E; Larson, Jon D; Nasevicius, Aidas; u. a. (2007): „p53 activation by knockdown technologies“. In: *PLoS Genetics*. 3 (5), S. e78, doi: 10.1371/journal.pgen.0030078.
- Sachdev, Sherri Weiss; Dietz, Uwe H.; Oshima, Yusuke; u. a. (2001): „Sequence analysis of zebrafish chondromodulin-1 and expression profile in the notochord and chondrogenic regions during cartilage morphogenesis“. In: *Mechanisms of Development*. 105 (1-2), S. 157-162, doi: 16/S0925-4773(01)00417-8.

- Schaefer, Liliana; Schaefer, Roland M (2010): „Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules“. In: *Cell and Tissue Research*. 339 (1), S. 237-246, doi: 10.1007/s00441-009-0821-y.
- Schilling, T.F.; Kimmel, C.B. (1997): „Musculoskeletal patterning in the pharyngeal segments of the zebrafish embryo“. In: *Development*. 124 (15), S. 2945 -2960.
- Schmidt, Thomas G. M.; Koepke, Jürgen; Frank, Ronald; u. a. (1996): „Molecular Interaction Between the Strep-tag Affinity Peptide and its Cognate Target, Streptavidin“. In: *Journal of Molecular Biology*. 255 (5), S. 753-766, doi: 10.1006/jmbi.1996.0061.
- Schröder, Martin; Kaufman, Randal J. (2005): „ER stress and the unfolded protein response“. In: *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 569 (1-2), S. 29-63, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.06.056.
- Schwann, Thodor (1839): *Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstume der Tiere und Pflanzen*. 1. Aufl. Vdm Verlag Dr. Müller. — ISBN: 3836401266
- Segat, Daniela; Frie, Christian; Nitsche, Patric D. u. a. (2000): „Expression of matrilin-1, -2 and -3 in developing mouse limbs and heart“. In: *Matrix Biology*. 19 (7), S. 649-655, doi: 16/S0945-053X(00)00112-8.
- Shintani, S; Sato, A; Toyosawa, S; u. a. (2000): „Biglycan-like extracellular matrix genes of agnathans and teleosts“. In: *Journal of Molecular Evolution*. 51 (4), S. 363-373.
- Shoulders, Matthew D.; Raines, Ronald T. (2009): „Collagen Structure and Stability“. In: *Annual Review of Biochemistry*. 78 (1), S. 929-958, doi: 10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833.
- Stefánsson, Stefán Einar; Jónsson, Helgi; Ingvarsson, Thorvaldur; u. a. (2003): „Genomewide scan for hand osteoarthritis: a novel mutation in matrilin-3“. In: *American Journal of Human Genetics*. 72 (6), S. 1448-1459, doi: 10.1086/375556.
- Stemple, Derek L. (2005): „Structure and function of the notochord: an essential organ for chordate development“. In: *Development*. 132 (11), S. 2503 -2512, doi: 10.1242/dev.01812.
- Stenflo, J (1991): „Structure-function relationships of epidermal growth factor modules in vitamin K-dependent clotting factors“. In: *Blood*. 78 (7), S. 1637 -1651.
- St-Jacques, B; Hammerschmidt, M; McMahon, A P (1999): „Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation“. In: *Genes & Development*. 13 (16), S. 2072-2086.
- Streisinger, G; Walker, C; Dower, N; u. a. (1981): „Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*)“. In: *Nature*. 291 (5813), S. 293-296.
- Summerton, J; Weller, D (1997): „Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties“. In: *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*. 7 (3), S. 187-195.

- Summerton, James E (2007): „Morpholino, siRNA, and S-DNA compared: impact of structure and mechanism of action on off-target effects and sequence specificity“. In: *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 7 (7), S. 651-660.
- Surmann-Schmitt, Cordula; Dietz, Uwe; Kireva, Trayana; u. a. (2008): „Ucma, a Novel Secreted Cartilage-specific Protein with Implications in Osteogenesis“. In: *Journal of Biological Chemistry*. 283 (11), S. 7082 -7093, doi: 10.1074/jbc.M702792200.
- Tagariello, Andreas; Luther, Julia; Streiter, Melanie; u. a. (2008): „Ucma -- A novel secreted factor represents a highly specific marker for distal chondrocytes“. In: *Matrix Biology*. 27 (1), S. 3-11, doi: 16/j.matbio.2007.07.004.
- Takahashi, Yohei; Matsumoto, Morio; Karasugi, Tatsuki; u. a. (2011): „Lack of association between adolescent idiopathic scoliosis and previously reported single nucleotide polymorphisms in MATN1, MTNR1B, TPH1, and IGF1 in a Japanese population“. In: *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. 29 (7), S. 1055-1058, doi: 10.1002/jor.21347.
- Telfer, W.R.; Busta, A.S.; Bonnemann, C.G. u. a. (2010): „Zebrafish models of collagen VI-related myopathies“. In: 19 (12), S. 2433-2444, doi: 10.1093/hmg/ddq126.
- Teraoka, Hiroki; Urakawa, Satsuki; Nanba, Satomi; u. a. (2006): „Muscular contractions in the zebrafish embryo are necessary to reveal thiuram-induced notochord distortions“. In: *Toxicology and Applied Pharmacology*. 212 (1), S. 24-34, doi: 10.1016/j.taap.2005.06.016.
- Theocharis, Achilleas D; Skandalis, Spyridon S; Tzanakakis, George N; u. a. (2010): „Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting“. In: *The FEBS Journal*. 277 (19), S. 3904-3923, doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07800.x.
- Thisse, Christine; Thisse, Bernard (2008): „High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos“. In: *Nat. Protocols*. 3 (1), S. 59-69, doi: 10.1038/nprot.2007.514.
- Vaglia, J L; Hall, B K (1999): „Regulation of neural crest cell populations: occurrence, distribution and underlying mechanisms“. In: *The International Journal of Developmental Biology*. 43 (2), S. 95-110.
- Velleman, S G (2000): „The role of the extracellular matrix in skeletal development“. In: *Poultry Science*. 79 (7), S. 985-989.
- Venkatesh, Byrappa (2003): „Evolution and diversity of fish genomes“. In: *Current Opinion in Genetics & Development*. 13 (6), S. 588-592, doi: 16/j.gde.2003.09.001.
- Vermeer, Cees; Gijsbers, Birgit L. M. G.; Crăciun, Alexandra M. u. a. (1996): „Effects of Vitamin K on Bone Mass and Bone Metabolism“. In: *The Journal of Nutrition*. 126 (4 Suppl), S. 1187S -1191S.
- Viegas, Carla S. B.; Simes, Dina C.; Laizé, Vincent; u. a. (2008): „Gla-rich Protein (GRP), A New Vitamin K-dependent Protein Identified from Sturgeon Cartilage and Highly Conserved in Vertebrates“. In: *Journal of Biological Chemistry*. 283 (52), S. 36655 -36664, doi: 10.1074/jbc.M802761200.

- Viegas, Carla S.B.; Cavaco, Sofia; Neves, Pedro L. u. a. (2009): „Gla-Rich Protein Is a Novel Vitamin K-Dependent Protein Present in Serum That Accumulates at Sites of Pathological Calcifications“. In: *The American Journal of Pathology*. 175 (6), S. 2288-2298, doi: 10.2353/ajpath.2009.090474.
- Walder, R Y; Walder, J A (1988): „Role of RNase H in hybrid-arrested translation by antisense oligonucleotides“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85 (14), S. 5011-5015.
- Walker, Mb; Kimmel, Cb (2007): „A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae“. In: *Biotechnic & Histochemistry*. 82 (1), S. 23-28, doi: 10.1080/10520290701333558.
- Weismann, August (1892): *Das Keimplasma eine Theorie der Vererbung*. Jena: Fischer.
- Whittaker, Charles A.; Hynes, Richard O. (2002): „Distribution and Evolution of von Willebrand/Integrin A Domains: Widely Dispersed Domains with Roles in Cell Adhesion and Elsewhere“. In: *Mol. Biol. Cell*. 13 (10), S. 3369-3387, doi: <p>10.1091/mbc.E02-05-0259</p>.
- Wiberg, Charlotte; Klatt, Andreas R.; Wagener, Raimund; u. a. (2003): „Complexes of Matrilin-1 and Biglycan or Decorin Connect Collagen VI Microfibrils to Both Collagen II and Aggrecan“. In: *Journal of Biological Chemistry*. 278 (39), S. 37698 -37704, doi: 10.1074/jbc.M304638200.
- Wolf, George (2008): „Energy regulation by the skeleton“. In: *Nutrition Reviews*. 66 (4), S. 229-233, doi: 10.1111/j.1753-4887.2008.00027.x.
- Wouters, Merridee A.; Rigoutsos, Isidore; Chu, Carmen K. u. a. (2005): „Evolution of distinct EGF domains with specific functions“. In: *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. 14 (4), S. 1091-1103, doi: 10.1110/ps.041207005.
- Wu, Jiann-Jiu; Eyre, David R. (1998): „Matrilin-3 Forms Disulfide-linked Oligomers with Matrilin-1 in Bovine Epiphyseal Cartilage“. In: *Journal of Biological Chemistry*. 273 (28), S. 17433 -17438, doi: 10.1074/jbc.273.28.17433.
- Yan, Yi - Lin; Hatta, Kohei; Riggleman, Bob; u. a. (1995a): „Expression of a type II collagen gene in the zebrafish embryonic axis“. In: *Developmental Dynamics*. 203 (3), S. 363-376, doi: 10.1002/aja.1002030308.
- Yan, Yi - Lin; Hatta, Kohei; Riggleman, Bob; u. a. (1995b): „Expression of a type II collagen gene in the zebrafish embryonic axis“. In: *Developmental Dynamics*. 203 (3), S. 363-376, doi: 10.1002/aja.1002030308.
- Yoder, Jeffrey A.; Nielsen, Michael E.; Amemiya, Chris T. u. a. (2002): „Zebrafish as an immunological model system“. In: *Microbes and Infection*. 4 (14), S. 1469-1478, doi: 16/S1286-4579(02)00029-1.
- Zamecnik, P C; Stephenson, M L (1978): „Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 75 (1), S. 280-284.

Zoeller, Jason J.; Pimtong, Wittaya; Corby, Helen; u. a. (2009): „A Central Role for Decorin during Vertebrate Convergent Extension“. In: *The Journal of Biological Chemistry*. 284 (17), S. 11728-11737, doi: 10.1074/jbc.M808991200.

## **Danksagung**

Vom ganzen Herzen möchte ich mich bei Mats Paulsson und Raimund Wagener bedanken, für die Möglichkeit die Projekte durchzuführen, die Betreuung während dieser Zeit und die Geduld mit der sie mir begegnet sind.

Mein Dank gilt ausserdem meinen Kollegen aus der Biochemie II. Ich möchte mich aufrichtig für die technische Unterstützung und den freundschaftlichen Umgang bedanken. Ich hoffe, dass der Kontakt auch in den neuen Lebensabschnitten nicht abbrechen wird.

Timo Roth und Andreas Berger danke ich für die Korrekturen. Ich gelobe Besserung bei der Punctuation.

Meinen zu tiefst verbundenen Dank an Katerina, die seelisch und fachlich immer für mich da war. Diese Arbeit ist Dir gewidmet.

## Teilpublikationen

- Klatt, Andreas R.; Becker, Ann-Kathrin A.; Neacsu, Cristian D. u. a. (2011): „The matrilins: Modulators of extracellular matrix assembly“. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 43 (3), S. 320-330, doi: 10.1016/j.biocel.2010.12.010.
- Iorga, Bogdan; Neacsu, Cristian Dan; Neiss, Wolfram Friedrich; u. a. (2011): „Micromechanical function of myofibrils isolated from skeletal and cardiac muscles of the zebrafish“. In: *The Journal of General Physiology*. 137 (3), S. 255-270, doi: 10.1085/jgp.201010568.
- Neacsu, Cristian Dan; Grosch, Melanie; Tejada, Mercedes; u. a. (2011): „Ucmaa (Grp-2) is required for zebrafish skeletal development. Evidence for a functional role of its glutamate  $\gamma$ -carboxylation“. In: *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*. doi: 10.1016/j.matbio.2011.07.002.

## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von den oben angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. med. Mats Paulsson betreut worden.

Köln, den 19.09.2011

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

Name: Cristian Dan Neacsu

Anschrift: Zülpicher Str. 44, 50674 Köln

Geburtsdatum / -ort: 28.02.1981 / Bukarest (Rumänien)

Staatsangehörigkeit: rumänisch

Familienstand: ledig

## Schulbildung

1987.1990 Grundschule Rumänien

1990.1992 Grundschule Deutschland

1992-2001 Gymnasium Moltkestraße, Gummersbach

2001 Allg. Hochschulreife / Abitur

## Universitäre Ausbildung

2001-2007 Studium der Biologie mit den Fachrichtungen Biochemie, Genetik und Tierphysiologie an der Universität zu Köln

2006-2007 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Herrn PD. Dr. rer. nat. Frank Sprenger am Institut für Genetik (Math-Nat-Fak) in Köln. Thema der Arbeit: „The influence of Grapes on CyclinA turnover during early *Drosophila* cell cycles“

2007-02 Diplom Biologie

## Promotionsstudium

seit Februar 2007

Promotionsstudium in der Arbeitsgruppe von Prof.  
Dr. med. Mats Paulsson im Institut für Biochemie  
II der med. Fak. der Universität zu Köln.