

Untersuchungen zur Pathogenese COMP-assoziiierter Chondrodysplasien

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fachbereiches
der Justus-Liebig-Universität Gießen

aus dem
Lehrstuhl für Innere Medizin
mit Schwerpunkt Rheumatologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Christian Weirich

aus Neunkirchen im Saarland

Gießen, 2007

Promotionsgesuch eingereicht am: 25.06.2007

Erstgutachter: Professor Dr. rer. nat. Michael Martin

Zweitgutachter: Professor Dr. med. Ulf Müller-Ladner

Prüfer: Professor Dr. med. Andreas Schulz

Prüfer: Professor Dr. rer.nat. Jürgen Steinmeyer

Inhalt

1 Einleitung	1
1.1 COMP-assoziierte Chondrodysplasien: Pseudoachondroplasie (PSACH) und Multiple Epiphysäre Dysplasie Typ 1 (MED 1)	1
1.2 Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP)	4
1.3 Mutationen des COMP	7
1.4 Matrixproteine	8
1.4.1 Die Extrazellulärmatrix der Sehne	9
1.4.2 Die Extrazellulärmatrix des Knorpels	11
1.5 Zielsetzung	13
2 Material und Methodik	14
2.1 Material	14
2.1.1 Chemikalien	14
2.1.1.1 Chemikalien (Abkürzungen)	14
2.1.1.2 Radioaktive Chemikalien	15
2.1.2 Lösungen und Puffer	16
2.1.3 Zellkulturmedien	21
2.1.4 Antikörper	23
2.1.5 Kits	24
2.1.6 Enzyme	24
2.1.7 Reagenzien für RT-PCR	25
2.1.8 Zellmaterial	26
2.1.9 Auflistung der untersuchten COMP-Varianten	26
2.1.10 Genutzte Software	26
2.2 Methodik	27
2.2.1 Isolation primärer Zellen	27
2.2.1.1 Bovine Tenozyten	27
2.2.1.2 Bovine Chondrozyten	28
2.2.1.3 Humane Chondrozyten	29
2.2.2 Zellkultur	30
2.2.2.1 Zellkulturarbeiten	30
2.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	30
2.2.2.3 Transfektion primärer boviner Tenozyten und Chondrozyten	31
2.2.2.4 Infektion primärer boviner Tenozyten und Chondrozyten	32
2.2.3 Herstellung adenoviraler Vektoren	33
2.2.3.1 Allgemeine Vorgehensweise	33
2.2.3.2 Generierung adenoviraler Konstrukte	35
2.2.3.3 Aufreinigung und Titerbestimmung	40
2.2.4 Proteinchemische Methoden	43
2.2.4.1 Proteinfällung mit Trichloressigsäure	43
2.2.4.2 Immunpräzipitation	43

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
2.2.4.4 Autoradiographie	45
2.2.4.5 Sekretionskinetik (Pulse-Chase-Experiment)	46
2.2.5 DNA- und RNA-Analytik	48
2.2.5.1 DNA-Isolierung und Probenaufbereitung	48
2.2.5.2 DNA-Quantifizierung	48
2.2.5.3 Agarosegelelektrophorese	49
2.2.5.4 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	49
2.2.5.5 DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen	51
2.2.6 Zellvitalität und Apoptose	52
2.2.6.1 Apoptoseinduktion	52
2.2.6.2 Messung der Proliferation mit ³ H-Thymidin	52
2.2.6.3 Nachweis des Zellzerfalls mit Lactatdehydrogenase (LDH)	53
2.2.6.4 Terminal Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL)	53
2.2.6.5 Annexin-V-FITC	54
2.2.7 Mikroskopie	55
2.2.7.1 Doppel-Immunfluoreszenz	55
2.2.7.2 Histochemie	56
2.2.7.3 Elektronenmikroskopie und Immunogoldfärbung	57
2.2.8 Durchflußzytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)	58
3 Ergebnisse	59
3.1 Herstellung adenoviraler Vektoren	59
3.1.1 Dokumentation der Kontrollverdaue der einzelnen Konstrukte	59
3.1.2 Dokumentation der Virusproduktion	61
3.1.3 Titerbestimmung	62
3.1.4 Testinfektion von bovinen Chondrozyten	64
3.1.5 Ausschluss der Replikationsfähigkeit des verwendeten Adenovirus	66
3.2 Untersuchungen an bovinen Tenozyten	68
3.2.1 Zellisolation und Charakterisierung	68
3.2.2 Optimierung des Gentransfers	70
3.2.3 Sekretionsverhalten von COMP	74
3.2.3.1 Pulse-Chase	74
3.2.3.2 Ausmaß der adenoviralen Überexpression	76
3.2.3.3 Zelluläre Lokalisation von COMP	77
3.2.4 Einfluß von COMP auf die Zellaktivität	79
3.2.4.1 Proliferation	79
3.2.4.2 Zellzerfall	80
3.2.4.3 Apoptose	81

3.2.5 Extrazellulärmatrix	83
3.2.5.1 Immunfluoreszenz	83
3.2.5.2 Langzeitkulturen von bovinen Tenozyten	85
3.3 Untersuchungen an COS-7 A2-Zellen	91
3.3.1 Sekretionsverhalten von COMP	91
3.3.2 Zellproliferation unter COMP-Expression	92
3.4 Vitalitätsuntersuchungen an bovinen Chondrozyten	93
3.4.1. Vorversuche	93
3.4.1.1 DNA-Fragmentierung	93
3.4.1.2 TUNEL-Assay	94
3.4.1.3 Annexin V-Markierung	95
3.4.2 Charakterisierung der Einschränkung der Zellvitalität unter COMP-Expression	96
3.4.2.1 Zytopathische Effekte	96
3.4.2.2 Proliferationsverhalten	98
3.4.2.3 Zellzerfall	99
3.4.2.4. Apoptose	100
3.5 Untersuchungen zur Proliferation bei humanen Chondrozyten	105
3.5.1 Isolation	105
3.5.2 Proliferation	106
4 Diskussion	108
5 Zusammenfassung	117
6 Anhang	119
7 Literatur	122
8 Danksagung	139

1. Einleitung

1.1 COMP-assoziierte Chondrodysplasien: Pseudoachondroplasie (PSACH) und Multiple Epiphysäre Dysplasie Typ 1 (MED 1)

PSACH und MED 1 sind autosomal dominant vererbte Erkrankungen (International Working Group on Constitutional Diseases of Bone, 1992, 1998), die in einer Krankheitsfamilie zusammengefaßt werden (Superti-Furga et al., 2001; Hall, 2002). Beide Erkrankungen sind mit Mutationen im Cartilage Oligomeric Matrix Protein assoziiert. MED 1 zeichnet sich durch eine mildere Ausprägung der charakteristischen klinischen Merkmale aus (Briggs et al., 1995, 1998; Lachman et al., 2005; Hecht et al., 1995). Die betroffenen Patienten weisen Fehlbildungen des Binde- und Stützgewebes auf. Die Extremitäten sind verkürzt, deformiert und es liegt ein disproportionierter Zwergwuchs vor. Die Schädelgröße liegt im Normbereich (siehe Abbildung 1.1), ebenso die geistigen Fähigkeiten, der allgemeine Gesundheitszustand und die Lebenserwartung (Heselson et al., 1977; Unger et al., 2001).

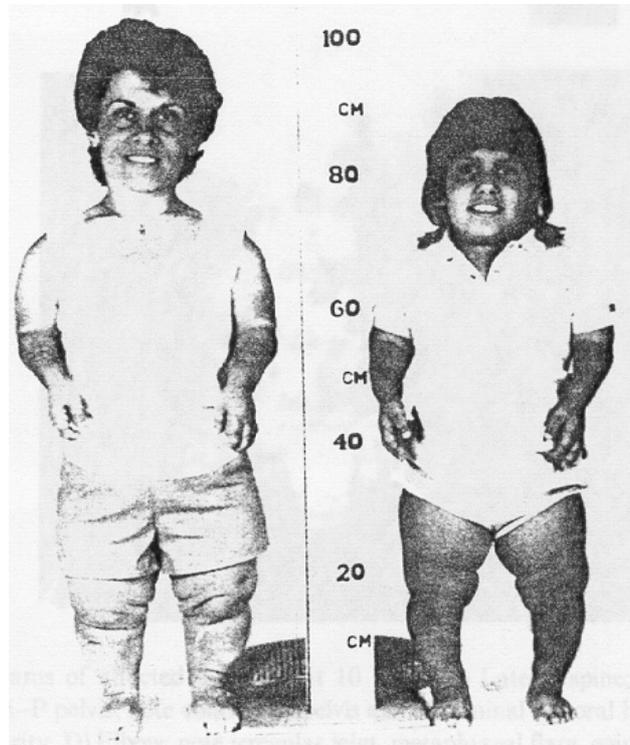


Abb. 1.1: Typische Fehlbildungen bei PSACH und MED 1

PSACH und MED 1 verursachen Deformationen des Binde- und Stützgewebeapparates, wie verkürzte, deformierte Extremitäten und disproportionierten Zwergwuchs. Die Abbildung zeigt PSACH-Patienten mit der typischen Ausprägung (Photo: Hall et al., 1987).

Bänder und Sehnen weisen nicht die Beschaffenheit derer gesunder Personen auf. Ihre Laxheit führt zur Hypermobilität der Gelenke, wodurch der watschelnde Gang teilweise erklärt werden kann. Die Erkrankung schließt eine früh beginnende Arthrose vor allem der tragenden Gelenke mit ein. Ein frühzeitiger Gelenkersatz innerhalb der ersten drei Lebensjahrzehnte ist oft unumgänglich. Röntgenuntersuchungen zeigten bei PSACH verbreiterte Metaphysen sowie verkleinerte, deformierte und teils fragmentierte Epiphysen. Verkürzte Röhrenknochen mit erweitertem Gelenkspalt und Deformationen der Wirbel sind ebenfalls typische Kennzeichen (Briggs et al., 1993). Die verkürzten Röhrenknochen ergeben sich aus einer verlangsamten Verknöcherung durch abnormales Wachstum der Chondrozyten, welche große Vakuolen (Maynard et al., 1972), exzentrisch angeordnete Zellkerne und eine veränderte Extrazellulärmatrix aufweisen (Lotz et al., 1999). Ebenso weisen die proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten in der Wachstumszone des Knorpels Unterbrechungen sowie Störungen ihrer ansonsten charakteristischen säulenartigen Anordnung und eine verminderte Zelldichte auf (Stanescu et al., 1993; Stevens, 1999). Zugleich läßt das raue endoplasmatische Retikulum (rER) der Chondrozyten eine starke Erweiterung (siehe Abbildung 1.2) sowie eine granuläre oder lamelläre Struktur erkennen (Cohn et al., 1996; Cooper et al., 1973; Délot et al., 1998, 1999; Hecht et al., 1998 a, b; Maddox et al., 1997; Maynard et al., 1972; Stanescu et al., 1982 a, b). Diese Einschlüsse enthalten verschiedene Matrixbildende Proteine, wie beispielsweise COMP, Kollagen IX (Maddox et al., 1997; Délot et al., 1998), Aggrecan (Stanescu et al., 1982), Fibromodulin, Decorin, Kollagen XI und Kollagen XII (Vranka et al., 2001). Eine Konzentration von Proteinen des sekretorischen Signalweges in diesen Inklusionen wurde ebenfalls beobachtet. Im Einzelnen handelt es sich um die Chaperone BiP, Grp94, HSP 47, PDI, Calreticulin und Calnexin (Hecht et al., 2001; Vranka et al., 2001). Mit den Akkumulationen innerhalb des rER sind mutierte COMP-Varianten assoziiert (Briggs et al., 1995; Hecht et al., 1995; Chapman et al., 2001), wobei bei MED noch andere mutierte Proteine wie Kollagen IX oder auch Matrilin-3 eine Rolle spielen können (Briggs et al., 1994; Budde et al., 2005; Muragaki et al., 1996; Otten et al., 2005; Spayde et al., 2000; Wilson et al., 2005).

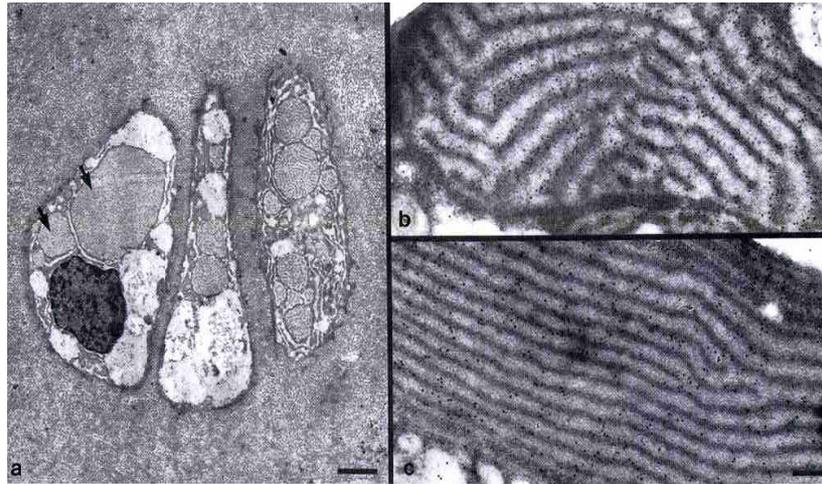


Abb. 1.2: Raues Endoplasmatisches Retikulum von PSACH-Patienten

Raues ER von PSACH-Patienten mit Einschlüssen: (a) Die lamellären Einschlüsse im rER von Chondrozyten der Wachstumsfuge sind durch die schwarzen Pfeile markiert. (b) Darstellung von COMP mittels Immunogoldfärbung. (c) Immunogoldmarkierung von Kollagen IX. Der Balken entspricht 200 nm (aus Maddox et al., 1997).

MED 1 weist einen ähnlichen, aber geringer ausgeprägten Befund auf. Normalerweise sind Metaphysen und Wirbel nicht betroffen, so dass die Kleinwüchsigkeit weniger deutlich ausgeprägt ist (International Working Group, 1998). Die Epiphysen weisen eine verbreiterte Form und verzögerte Verknöcherung auf (Rimoin et al., 1994; Weaver et al., 1993). PSACH und MED 1 erscheinen klinisch heterogen; bei PSACH wird eine schwere und milde Form unterschieden (Maroteaux et al., 1959; Maroteaux et al., 1980; Rimoin et al., 1994). Die MED 1 wird in einen schweren Fairbank- und einen milden Ribbing-Typ eingeteilt (Fairbank, 1947; Ribbing, 1937), wobei zu bemerken ist, dass einerseits die milden Fälle von PSACH mit den schweren der MED 1 überlappen und andererseits die leichten MED 1-Fälle klinisch oft nicht bemerkt werden.

1.2 Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP)

Das Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) ist, wie durch Sequenzvergleiche ermittelt wurde, ein homopentamerer Mitglied der Familie der Thrombospondine (TSP). Daher wird es auch als TSP-5 bezeichnet. COMP ist ein multimeres, kalziumbindendes Glykoprotein der extrazellulären Matrix von Knorpel (Hedbom et al., 1992; Mörgelin et al., 1992; Oldberg et al. 1992), Sehnen (Di Cesare et al., 1994) und Bändern (Hecht et al., 1998). Die COMP-Verteilung differiert zwischen den verschiedenen Geweben und ist altersabhängig (DiCesare et al., 1995; Murphy et al., 1999; Smith et al., 1997). Letzteres weist darauf hin, dass COMP eine Rolle bei Aufbau und Entwicklung der Extrazellulärmatrix spielt (Haberhauer et al., 2003; Murphy et al., 1999). COMP ist durch einen modularen Domänenbau gekennzeichnet und besitzt eine Oligomerisierungsdomäne, vier EGF (Epidermal Growth Factor) -Domänen, acht Ca²⁺-bindende Typ 3-Motive und carboxyterminal eine globuläre Domäne. Diese Domäne stellt ein Kennzeichen der Thrombospondine dar (siehe Abbildung 1.3 a).

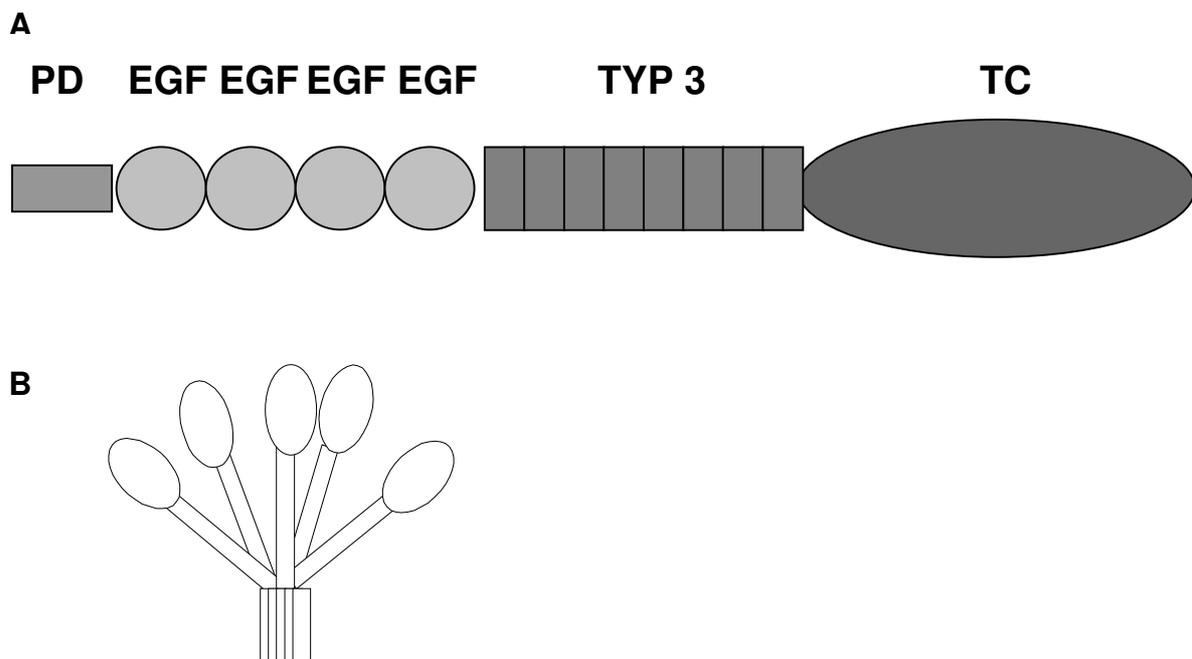


Abb. 1.3: Domänenstruktur von COMP

(a) Darstellung der verschiedenen Domänen von COMP von N- nach C-terminal. PD = Pentamerisierungsdomäne, EGF = Epidermal Growth Factor-ähnliche Domäne, Typ 3 = Typ 3-Motive (Aufbau aus acht einzelnen Sequenzen), TC = C-terminale Domäne; (b) Skizze der blumenstraußförmigen Struktur des COMP-Pentamers

Das Molekulargewicht des COMP-Pentamers beträgt 524 kDa (Hedbom et al., 1992), das der monomeren COMP-Untereinheit etwa 82 kDa und umfaßt 757 Aminosäuren. Endprozessiertes COMP (siehe Abbildung 1.3 B) zeichnet sich aminoterminal durch eine 46 Aminosäuren (AS) lange α -helikale Pentamerisierungsdomäne (PD) aus, in deren Sequenz sich Strukturwiederholungen in Siebenerreihe befinden. An jeder dritten bis vierten Stelle der Sequenz befindet sich eine hydrophobe Seitengruppe, in der fünften bis siebten Position polare Aminosäuren. Jeweils fünf dieser α -Helices bilden eine linksgängig superspiralisierte α -Helix, wobei die hydrophoben Seitenketten zur helikalen Achse nach innen hin und etwas versetzt übereinander angeordnet sind. Die Wechselwirkungen der hydrophoben Seitenketten und der polaren Aminosäuren sind maßgeblich an der Ausformung der superspiralisierten Helix beteiligt. Die Pentamerisierungsdomäne wird durch einen Ring von Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert, welcher von den Glutaminen an der vierten Stelle der vierten Siebenerreihe ausgebildet wird. Nach Abschluß der Pentamerisierung trägt ein Ring aus Disulfidbrücken zur Stabilität der Helix bei (Efimov et al., 1994; Efimov et al., 1996; Malashkevich et al., 1996). Ein kurzes Zwischenstück von 16 AS verbindet die Pentamerisierungsdomäne mit den vier EGF-ähnlichen Domänen (zusammen etwa 180 AS). Die EGF-Domänen weisen eine stabförmige Gestalt von einem Durchmesser von circa 3 nm auf und bestehen aus fünf kurzen β -Faltblättern, welche von drei Disulfidbrücken stabilisiert werden. Sie besitzen Ca^{2+} -bindende Eigenschaften und erfüllen wahrscheinlich strukturelle Aufgaben. Die EGF-Domänen sind nach dem epidermalen Wachstumsfaktor benannt, bei welchem diese Strukturen erstmals beschrieben wurden.

Die an die EGF-Domänen unmittelbar anschließende, ebenfalls stabförmige Typ 3-Domäne besteht aus etwa 260 AS und hat aufgrund ihres Reichtums an Asparagin, Aspartat, Glutamin und Glutamat einen sauren Charakter (Maddox et al., 2000). 13 putative Ca^{2+} -Bindungsmotive sind in acht Typ 3-Motiven angeordnet (Lawler et al., 1986; Misenheimer et al., 1995). Eine Kalziumbindungsfähigkeit wurde aufgrund der Homologie zur Ca^{2+} -Bindungsstelle der EF-Hand vermutet. Durch Gleichgewichtsdialyse wurde die Zahl der Kalziumionen pro COMP-Monomer auf 11 ± 1 (Chen et al., 2000) sowie 12 ± 1 (Thur, 2000, Dissertation) bestimmt. COMP wird in seiner Konformation durch die Bindung von Kalziumionen verändert (Chen et al., 2000; Hou et al., 2000; Maddox et al., 2000; Thur et al., 2001). Es gibt wegen der Konformationsänderung Hinweise auf eine Bindung an andere Bestandteile der

extrazellulären Matrix (DiCesare et al., 1995). Ebenso wird eine Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderung für die Retention verschiedener COMP-Mutanten verantwortlich gemacht (Kleerekoper et al., 2002).

Die aus circa 240 AS bestehende, ca. 4,8 nm im Durchmesser betragende, globuläre TC-Domäne bindet in vitro an tripelhelikales Kollagen, wobei die mutmaßliche Kollagenbindungsstelle zwischen den Aminosäuren 579 und 595 liegt (Rosenberg et al., 1998; Holden et al., 2001; Mann et al., 2004; Pihlajamaa et al., 2004; Thur et al., 2001). Diese Kollagenbindungsstelle spielt möglicherweise auch bei Zellkontakten eine Rolle (Briggs et al., 1998).

COMP weist zwei N-Glykosylierungsstellen auf, aber keine O-Glykosylierung. Die N-Glykosylierungsstellen befinden sich an Asn101 (erste EGF-Domäne), mit einem Oligosaccharid von ~1847 Da und an Asn721 (TC-Domäne), mit ~1724 Da (Hedbom et al., 1992). Auch die Glykosylierung scheint altersabhängigen Veränderungen unterworfen zu sein, wie das Beispiel des Asn101 zeigt. Asn101 weist in der fötalen Form ein heterogeneres N-Glykosid auf als in der adulten Form (Zaia et al., 1997).

COMP besitzt im endprozessierten Zustand eine blumenstraußähnliche Struktur (Abb. 1.3 b). Die TC-Domänen befinden sich peripher an den Armen, welche in zylindrischer Form an den Pentamerisierungsdomänen vereinigt sind (Mörgelin et al., 1992). Die physiologische Funktion von COMP in der Extrazellulärmatrix ist nicht genau bekannt; ein Fehlen desselben führt offenbar nicht zu pathologischen Effekten (Svensson et al., 2002).

COMP unterstützt jedoch offensichtlich die Anhaftung von Chondrozyten an die Extrazellulärmatrix durch Vermittlung über die Integrine $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$ (Di Cesare et al., 1994; Chen et al., 2005). Eine Speicherfunktion für Vitamin D oder andere Signalmoleküle wurde ebenfalls vermutet (Guo et al., 1998; Özbek et al., 2002). COMP wurde in Verbindung mit rheumatoider Arthritis (Forslind et al., 1992), Osteoarthritis und kardiovaskulären Krankheiten gebracht (Jordan et al., 2003; Kullich et al., 2002; Oldberg et al., 1992; Vilim et al., 2002).

COMP ist auf der pericentromerischen Region in Bande 13.1 von Chromosom 19 lokalisiert (Briggs et al., 1993; Hecht et al., 1993; Hecht et al., 1995; Newton et al., 1994). Es setzt sich aus 2271 Nukleotiden zusammen (Newton et al. 1994), welche für 757 Aminosäuren kodieren und umfaßt 19 Exons (Briggs et al., 1995). Die vier ersten Exons kodieren die cysteinreiche Pentamerisierungsdomäne am N-Terminus, die Exons vier bis acht die vier EGF-ähnlichen Domänen. Die Typ 3-Motive werden

von den Exons 8-14 und die C-terminale Domäne von den Exons 14-19 kodiert (Cohn et al., 1996).

1.3 Mutationen des COMP

Alle bisher bekannten, mit PSACH oder MED 1 assoziierten Mutationen sind Basenaustausche oder führen zur Deletion oder Insertion einer bzw. mehrerer Aminosäuren (Briggs et al., 1998; Deere et al., 1999; Délot et al., 1999). Mutationen, die eine Deletion oder Insertion von mehr als vier Aminosäuren zur Folge hätten, sind nicht bekannt, ebensowenig solche, die ein vorzeitiges Stopcodon erzeugen. 92% der Mutationen betreffen die Typ 3-Motive (siehe Abbildung 1.4, Ballo et al., 1997; Briggs et al., 1995; Briggs et al., 1998; Cohn et al., 1996; Deere et al., 1998; Deere et al., 1999; Délot et al., 1999; Ferguson et al., 1997; Hecht et al., 1995; Ikegawa et al., 1998; Loughlin et al., 1998; Maddox et al., 1997; Susic et al., 1997; Susic et al., 1998).

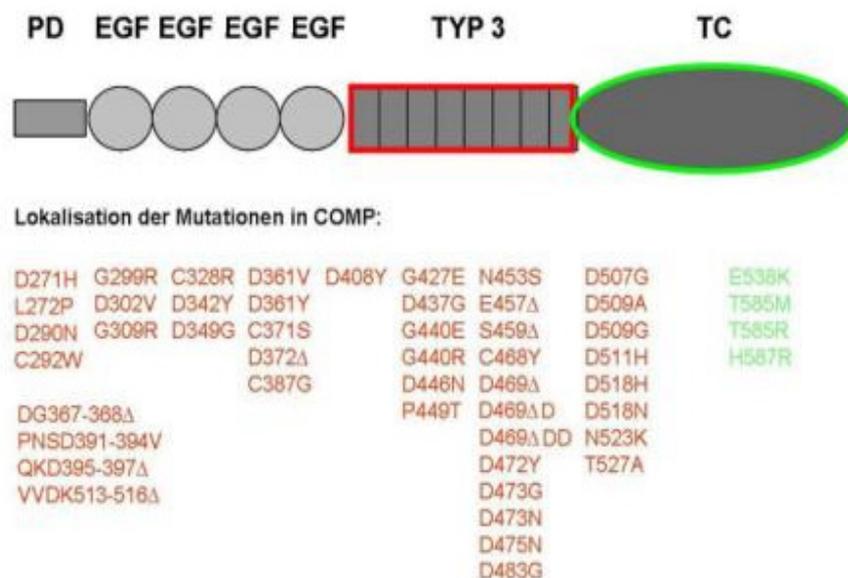


Abb. 1.4: Übersicht über die Lokalisation einiger COMP-Mutationen

Die in roter Schrift dargestellten Mutationen befinden sich in den Typ 3-Motiven, während in grüner Schrift dargestellte Mutationen in der globulären TC-Domäne lokalisiert sind.

Zwölf bekannte Mutationen betreffen die C-terminale Domäne. Bei den die Typ 3-Motive betreffenden Mutationen sind häufig Aspartate involviert (etwa 60%), die Kalziumionen binden (Chen et al., 2000; Deere et al., 1998). Fünf Mutationen betreffen Cysteine, was einen Einfluß auf die Ausbildung von Disulfidbrücken und somit letztendlich die Proteinstruktur hat. Den gleichen Effekt können nicht-physiologische Disulfide hervorrufen. Deletionen oder Insertionen von mindestens zwei Aminosäuren sind in fünf weiteren Fällen der Auslöser von Mutationen, welche die Sekundär- oder Tertiärstruktur verändern.

Bisher sind über 80 Mutationen in COMP bekannt, die mit PSACH oder MED 1 assoziiert sind (siehe Tabelle 6.1). Nicht vollständig geklärt ist die Frage, ob Wildtyp-COMP und COMP-Mutanten in gleichem Ausmaß sezerniert werden. Aufgrund der dominanten Vererbungsweise sind sowohl homopentamere Wildtyp- als auch mutierte Proteine sowie gemischte Pentamere zu erwarten, da die Monomere vor der Pentamerisierung nicht räumlich voneinander getrennt vorliegen. Es wird vermutet, dass bei Patienten mit PSACH oder MED 1 physiologisch gemischte Pentamere dominieren. Bei gleicher Transkriptions- und Translationseffizienz beider Allele sollten $0,5^5 = 3,1\%$ Wildtyp-Pentamere und 96,9% Pentamere mit mindestens einer mutierten Einheit entstehen.

1.4 Matrixproteine

Die extrazelluläre Matrix besteht aus vielerlei Komponenten, deren Anteil und Zusammensetzung von Gewebe zu Gewebe differieren. Binde- und Stützgewebe war für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse, so dass die Zusammensetzung derselben genauer betrachtet wurde. Die Proteine der Kollagenfamilie stellen den mengenmäßig größten Teil der Extrazellulärmatrix des Binde- und Stützgewebes. Die extrazelluläre Matrix besteht desweiteren aus der Grundsubstanz, die Glykosaminoglykane, Proteoglykane, Glykoproteine, anorganische Komponenten und bei Sehnen Elastin enthält.

1.4.1 Die Extrazellulärmatrix der Sehne

Die Extrazellulärmatrix der Sehne setzt sich aus Kollagenfibrillen (65-80% der Trockenmasse), elastischen Fasern (1-2%), der Grundsubstanz (insgesamt etwa 4,5% der Trockenmasse), sowie anorganischen Komponenten (weniger als 0,2% der Trockenmasse) zusammen (Curwin, 1997; Hess et al., 1989; Josza et al., 1989; Kirkendall et al., 1997; O'Brien, 1997; Tipton et al., 1975).

Die Sehne enthält tripelhelikales Typ I-Kollagen (~ 60% der Trockenmasse), welches sich aus zwei α 1-Ketten und einer α 2-Kette zusammensetzt und in zugorientierten Fasern angeordnet ist. Im helicalen Anteil der α 1- und α 2-Kollagene ist an jeder dritten Position ein Glycin eingebaut, was die Kollagenstruktur wesentlich bestimmt. Die Kollagene III (zwischen 0 und 10% Trockenmasse), IV (~ 2% Trockenmasse, formt Netzwerke), V und VI sind weitere Bestandteile (Alberts et al., 1994; Kannus, 2000; Kjaer, 2004; Wagget et al., 1998). Kollagen XII lagert sich lateral an Kollagen I-Fibrillen an und besteht aus drei α 1-Proteinketten.

Die elastischen Fasern bestehen aus Elastin, einem sehr hydrophoben Protein. Sie haben einen Durchmesser von etwa 0,3-2,0 μ m und setzen sich aus zwei deutlich unterscheidbaren morphologischen Komponenten zusammen, einem eher amorphen Zentralstrang und elektronendichten Filamenten (Josza et al., 1979). Die elastischen Fasern tragen zur Rekonfiguration des Kollagenfasengerüsts nach Belastung bei (Butler et al., 1978).

Die Grundsubstanz stellt ein hydrophiles Gel dar, dessen Konsistenz in Abhängigkeit der Verteilung von Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat variiert. Es besitzt eine gewisse Wasserbindungskapazität, welche zur biomechanischen Stabilität beiträgt. Dies ist von Wichtigkeit für die Gesamtstabilität sowie die Aufrechterhaltung der Homöostase der Sehne. Die Grundsubstanz enthält Proteoglykane, Glykosaminoglykane, Strukturglykoproteine und andere kleine Moleküle.

Die Proteoglykane bestehen aus einem Proteinkern, an den ein oder mehrere Glykosaminoglykane kovalent gebunden sind. Sie weisen Molekülmassen von etwa 1×10^6 Da auf und stellen etwa 3% der Trockenmasse. Die Proteoglykane besitzen eine hohe negative Gesamtladung, sind hydrophil und können das 50fache ihrer Molekülmasse an Wasser aufnehmen. Diese Eigenschaften und ihre Lokalisation zwischen den Kollagenfibrillen tragen sowohl zur Ausformung der Kollagenfibrillen (Amiel et al., 1984; Finnis et al., 1997; Hey et al., 1990) als auch zur Biomechanik der

Sehne bei. Sie ermöglichen eine schnelle Diffusion wasserlöslicher Moleküle und ziehen aufgrund ihrer negativen Ladung positiv geladene Ionen an, was einen osmotischen Gradienten entstehen lässt (Kannus, 2000). Decorin stellt hier den größten Anteil mit 1%. Die Proteoglykanfamilie besteht noch aus anderen Molekülen, wie Aggrecan (hochkonzentriert in der druckbelasteten Zone), Biglycan (0,5%), Fibromodulin, Lumican, Osteoadherin, Tenascin-C, Optican, Keratocan, Epiphycan, Syndican, Perlecan, Agrin, Undulin, Laminin und Versican (Hey et al., 1990; Ilic et al., 2004; Kannus, 2000; Kjaer, 2004; Piecha et al., 1999).

Glykosaminoglykane kommen in Sehnengewebe seltener als in Knorpel vor und stellen in der zugbelasteten Zone etwa 0,2% der Trockenmasse. Diese enthält 60% Dermatansulfat, während in der druckbelasteten Zone und der Insertionszone die Trockenmasse aus 65% Chondroitinsulfat besteht (Merrilees et al., 1980). Hyaluronsäure stellt 6% des Gesamtgehaltes an Glykosaminoglykanen. Heparansulfat wurde ebenfalls in Sehnengewebe gefunden (Järvinen et al., 1991; Kvist et al., 1991). Keratansulfat und Heparinsulfat konnten in der Sehne nicht nachgewiesen werden (Jozsa et al., 1991).

Glykoproteine wie die Thrombospondine sind hauptsächlich aus Proteinen zusammengesetzt, weisen eine kleine Zuckerkomponente auf und haben ein Molekulargewicht von 50-100 kDa (Kannus, 2000). Sie unterscheiden sich von den Proteoglykanen vor allem durch ein anderes Protein-Kohlenhydrat-Verhältnis. COMP stellt hier den größten Anteil mit etwa 1% der Trockenmasse.

Die anorganischen Komponenten der Extrazellulärmatrix der Sehne setzen sich aus einer Vielzahl von Stoffen zusammen. Kalzium ist mit 0,001-0,01% der Trockenmasse vertreten (Jozsa et al., 1989). Magnesium, Mangan, Kadmium, Kobalt, Kupfer, Zink, Nickel, Lithium, Blei, Fluor, Phosphor und Silizium wurden ebenfalls detektiert und liegen normalerweise in Konzentrationen von 0,02-120 ppm vor (Sparado et al. 1970).

1.4.2 Die Extrazellulärmatrix des Knorpels

Die extrazelluläre Matrix des Knorpels wird zum größten Teil von fibrillärem Kollagen unterschiedlichen Typs gebildet (Kollagen Typ II, VI, IX und XI). Sie enthält Glykosaminoglykane, Proteoglykane (Aggrecan, Biglycan, Decorin, Fibromodulin) sowie andere Strukturproteine (COMP, Thrombospondin I, Matrilin 1 und 3).

Den mengenmäßig größten Anteil der Kollagene stellt das Kollagen II. Dieses ist durch drei α 1-Ketten charakterisiert und besitzt durch vermehrte Glykosylierung der Hydroxylysine einen hydrophilen Charakter. Zusammen mit den Kollagenen IX und XI baut Kollagen II das fibrilläre Grundgerüst der Extrazellulärmatrix auf. Dies geschieht unter anderem durch Ausbildung von intermolekularen Quervernetzungen, welche aus Lysin- und Hydroxylysinresten bestehen. Auch binden Liganden der helikalen COL2-Domäne von Kollagen IX kovalent an Telopeptide von Kollagen II. Somit werden zusätzliche Querverbindungen ausgebildet, wobei die beiden Kollagene den Kern der Kollagenfibrillen darstellen (Bruckner et al., 1994). Der Aminoterminus von Kollagen XI ist gewinkelt und steht je nach Fibrillenkonformation mehr oder weniger weit von der Fibrille ab. Dies läßt möglicherweise eine Interaktion mit anderen Makromolekülen der Extrazellulärmatrix zu. Kollagen IX besitzt drei unterschiedliche Ketten, nämlich α 1, α 2 und α 3. Es ist vor allem mit dünnen (ca. 20 nm Durchmesser) Kollagenfibrillen assoziiert, welche sich im fötalen, unreifen Knorpel finden und zu 80% aus Kollagen II, und je 10% aus Kollagen IX und XI bestehen. Der adulte Knorpel besteht aus dickeren Fibrillen (30-40 nm), wobei Kollagen IX nur zu 1-2% vertreten ist (Eyre et al., 2006; Hagg et al., 1998). Die dünnen Fibrillen (17-20 nm) bestehen hauptsächlich aus Kollagen II, IX und XI. Decorin ist nicht mit den Fibrillen assoziiert. Die intermediären Fibrillen (bis 26 nm) bestehen ebenfalls aus den oben erwähnten Kollagenen, allerdings ist Decorin in geringer Menge nichtkovalent an sie gebunden. Die dicken Fibrillen (26 nm bis über 50 nm) enthalten kein Kollagen IX und XI, dafür aber große Mengen an Decorin (Hagg et al., 1998).

Kollagen VI ist fast ausschließlich im Perizellulärraum von Chondrozyten lokalisiert. Es zeichnet sich durch eine kurze tripelhelikale Domäne und große, nichtkollagene Domänen an beiden Enden aus. Kollagen VI bildet ein eigenes Netzwerk aus perlschnurartigen Fibrillen, welches durch Disulfidbrücken quervernetzt ist.

Die Glykosaminoglykane sind in das Kollagen Grundgerüst des Knorpels eingelagert. Es sind unverzweigte Polymere aus repetitiven Disaccharideinheiten, die aus einem Aminozucker (Glukosamin oder Galaktosamin) und einer Zuckersäure (z.B. Galaktose) bestehen. Diese können sulfatiert oder acetyliert sein, oder auch beides zugleich. Aus diesem Aufbau ergibt sich eine hohe negative Ladungsdichte, die auch für elektrostatische Wechselwirkungen mit anderen Proteinen verantwortlich ist. Die Glykosaminoglykane werden, sobald sie an ein Protein gebunden sind, als Proteoglykan bezeichnet. Bei ihnen liegen die Glykosaminoglykanketten O-glykosidisch über ein Trisaccharid (Xyl-Gal-Gal) an Serin gebunden vor, was ebenfalls zur oben erwähnten hohen negativen Ladungsdichte beiträgt. Die Länge und Eigenschaften der Glykosaminoglykane unterscheiden sich in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien. Zu den Glykosaminoglykanen gehören Heparin, Heparansulfat, Dermatan-sulfat (DS), Keratansulfat, Chondroitinsulfat (CS) und Hyaluronsäure. Zu den Proteoglykanen zu rechnen sind Aggrecan, Biglycan, Decorin sowie Fibromodulin (Ruoslahti, 1988).

Aggrecan kommt von allen Proteoglykanen im Knorpel mit einem Anteil am Trockengewicht von 10% am häufigsten vor und tritt mit Hyaluronsäure in Wechselwirkung. Es binden etwa 100 Aggrecanmoleküle unter Bildung charakteristischer Komplexe an ein Hyaluronsäuremolekül, wobei die Bindung durch das Link-Protein der Hyaluronsäure stabilisiert wird. 7% der Masse von Aggrecan bestehen aus dem 220 kDa-Protein, 87% aus Chondroitinsulfat und 6% aus Keratansulfat.

Sehr nahe stehen sich Biglycan, Decorin und Fibromodulin, welche die Gruppe der kleinen CS/DS-substituierten Proteoglykane bilden, die leucinreiche Wiederholungen im Proteinteil aufweisen. Biglycan ist das mengenmäßig am stärksten vertretene kleine Proteoglykan im Knorpelgewebe und besteht aus zwei Glykosaminoglykanen. Decorin setzt sich aus nur einer CS/DS-Kette zusammen, während Fibromodulin Keratansulfat-substituiert ist und sulfatierte Tyrosinreste aufweist. Decorin und Fibromodulin können an Kollagen I- und II-Fibrillen binden und beeinflussen deren Entwicklung (Danielson et al., 1997; Svensson et al., 1999).

1.5 Zielsetzung

Über die Auswirkungen von COMP-Mutationen auf Tenozyten war zu Beginn dieser Arbeit wenig bekannt. Es gab einzelne deskriptive Untersuchungen mit widersprüchlichen Ergebnissen zu diesem Thema (Délot et al., 1998 und 1999). Beispielsweise war ungeklärt, ob mutiertes COMP normalerweise im rER von Tenozyten akkumuliert, eine Beobachtung welche bei Chondrozyten über lange Zeit als Krankheits-definierend angesehen wurde. Da bei PSACH und MED 1, wie zuvor beschrieben, die Sehnen und Bänder ebenso von Veränderungen betroffen sind wie Knochen und Knorpel, lag eine Untersuchung dieses Gewebstypus nahe. Mittels Überexpression in Tenozyten in Primärkultur sollte der Einfluß verschiedener COMP-Mutationen auf die Zellfunktion untersucht werden, um die folgenden Fragen zu beantworten:

1. Wie ist die Isolation von primären bovinen Tenozyten zu bewerkstelligen?
2. Durch welche Zellkulturbedingungen wird die Dedifferenzierung des Phänotyps über einen längeren Zeitraum vermieden?
3. Welche Techniken des Gentransfers sind für Tenozyten geeignet? Lassen sich die transgenen Proteine über längere Zeit exprimieren?
4. Wie wirken die verschiedenen COMP-Mutationen auf die intrazelluläre Lokalisation, die Zellvitalität, die Proliferationsrate und die Sekretionskinetik von Tenozyten?
5. Wie wirken sich die COMP-Mutationen auf die Extrazellulärmatrix von Tenozyten aus?
6. Rufen die zu untersuchenden COMP-Mutationen unterschiedliche Apoptoseraten bei Tenozyten sowie Chondrozyten hervor?
7. Welche Folgerungen ergeben sich aus den Ergebnissen der Untersuchungen für das bisherige Modell der Pathogenese?

2. Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Biomol (Hamburg, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Nottingham, England), Roche (Mannheim, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), VWR (Darmstadt, Deutschland), die Zellkulturmedien von PAA Laboratories (Wien, Österreich) und Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Radioaktive Chemikalien wurden über die Firma Hartmann Analytic (Braunschweig, Deutschland) bezogen.

2.1.1.1 Chemikalien (Abkürzungen)

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
CsCl	Cäsiumchlorid
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	Fetal Calf Serum
GAPDH	D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HCl	Salzsäure
Imidazol	1,3-Diaza-2,4-cyclopentadien

Isopropanol	2-Propanol
Luminol	3-Aminophtalhydrazin
MeOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumdichlorid
MOPS	3-(N-Morpholin)-propansulfonsäure
NaOH	Natriumhydroxid
NP 40	Nonidet NP 40 Substitute
PAA	Protein-A-Agarose
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCS	p-Cumarsäure
PFA	Paraformaldehyd
P/S	Penicillin/Streptomycin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	Natriumnitroprussid
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Tris-HCl	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol-Hydrochlorid
Trypanblau	3,3'-Dimethyl 1-4,4'-bis(5-amino-4-hydroxy-2,7-disulfonaphthyl-3-azo)- [1,1'-biphenyl]-Tetranatriumsalz
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat

2.1.1.2 Radioaktive Chemikalien

³H-Thymidin, 1 mCi

³⁵S-Methionin, 5 mCi

2.1.2 Lösungen und Puffer

Lösungen wurden in der Regel mit Wasser aus einer Reinstwasseranlage (MilliQ biocell, Millipore, Schwalbach, Deutschland) angesetzt. Die Sterilfiltration einiger Lösungen erfolgte mittels 0,22 µm-Filtern.

Es wurden folgende Lösungen und Puffer verwendet:

AEC-Färbelösung

1 AEC-Tablette in 10 ml N'N'-Dimethylformamid (DMF) lösen

10 ml Imidazolpuffer

80 ml MilliQ-Wasser

20 µl 30% H₂O₂

10 M Ammoniumacetat

38,54 g Ammoniumacetat

ad 50 ml mit Aqua dest.

Ascorbat

40 mg Ascorbat

10 ml PBS

bis zur vollständigen Auflösung schütteln

sterilfiltrieren

10% (V/V) BSA in PBS (Stocklösung)

5 ml BSA

45 ml PBS

sterilfiltrieren

Coomassie-Lösungen

Färbelösung: 225 ml Methanol
225 ml Aqua dest.
50 ml konzentrierte Essigsäure
2 bis 3 Färbetabletten Coomassie Brilliant Blue R 250

Entfärbelösung: wie Färbelösung, nur ohne Coomassie Brilliant Blue R 250

Essigsäure 10%: konzentrierte Essigsäure 1:10 in Aqua dest.

DEPC-H₂O 0,1 %

1 ml DEPC in 1 l Aqua dest.

sterilisieren

Dialyse-Puffer zur Virusaufbereitung

5 mM Tris

50 mM NaCl

pH 8,0 einstellen

sterilisieren, dann Hinzugabe von

10% Glycerin

0,1% BSA

ad 1 l mit Aqua dest.

6 x DNA Loading Dye

30% (V/V) Glycerin in Aqua dest.

je 1 Spatelspitze Bromphenolblau und Xylencyanolblau

Eosin (1%)

20 g Eosin

2 l Aqua bidest.

vor Gebrauch filtriert und einige Tropfen 96% Essigsäure hinzugefügt

Ethidiumbromid-Stock

1% EtBr-Lösung: 1:20 verdünnen mit Aqua dest. auf 0,05%
im Agarose-Gel 1:1000 verdünnen (1 µl Stock pro ml Agarose)

Glutaraldehydpuffer

2% Glutaraldehyd
0,5% Paraformaldehyd
0,1 M Cacodylat pH 7,4
0,1 M Sukrose
0,003 M CaCl₂

Hämatoxylin (Hämalaun-Lösung 0,1%)

1 g Hämatoxylin
1 l Aqua bidest.
0,1 g Natriumjodat
50 g Kalialaun
vollständig lösen
50 g Chloralhydrat
1 g Zitronensäure
filtriert

Imidazolpuffer

14,6 g NaCl
17 g Imidazol
ad 250 ml mit: 200 mM Tris pH 7,0
5 mM CaCl₂

5 x Lämmli

144,0 g Glycin
30,34 g Tris
10 g SDS
ad 2 l mit Aqua dest.

10 M LiCl-Stocklösung

21,2 g LiCl auf 50 ml Aqua dest.

LoTE-Puffer

3 mM Tris HCl pH 7,5

0,2 mM EDTA pH 7,5

ad 1 l mit Aqua dest.

Lysepuffer

50 mM Tris-HCl pH 7,4

1% NP 40 (alternativ 0,5% SDS)

1 M Natriumnitroprussid

6,775 g SNP

20 ml PBS

bei 4 °C unter Lichtausschluß stabil

1 M Natriumsalicylat in Aqua dest. (unmittelbar vor Gebrauch)

2% (W/V) Paraformaldehyd

1 g PFA

ad 50 ml mit Aqua dest.

Lösen im alkalischen Bereich, nach Auflösen einstellen von pH 7,4

Paraformaldehydpuffer

3% Paraformaldehyd

0,1% Glutaraldehyd

0,1 M Cacodylat pH 7,4

0,003 M CaCl₂

1 x SDS-Gelladepuffer

50 mM Tris-HCl pH 6,8

100 mM Dithiothreitol

2% SDS

0,1% Bromphenolblau

10% (V/V) Glycerin

gegebenenfalls 1 % β -Mercaptoethanol (bei reduzierenden Bedingungen)

Sea-Plaque-Agarose

5% (V/V) in PBS, 10 ml

5% (V/V) FCS in DMEM, 30 ml

Endkonzentration: 1,25%

50 x TAE (pH 8)

242 g Tris

57,1 ml Essigsäure p.a.

100 ml 0,5 M EDTA

ad 1 l mit Aqua dest.

10 x TBS

87,8 g NaCl

60,5 g Tris HCl

11,0 g Tris

ad 1 l mit Aqua dest.

TELT-Puffer (LiCl-Mini-Präp)

50 mM Tris pH 8,0

62,5 mM EDTA

2,5 M LiCl

0,4% Triton X-100

RNAse, Lysozym

ad 1l mit Aqua dest.

1,0 M Tris (pH 6,8)

121,14 g Tris

ad 1 l mit Aqua dest.

1,5 M Tris (pH 8,8)

182,12 g Tris

ad 1 l mit Aqua dest.

1 M Tris-HCl

157,59 g Tris-HCl

ad 1 l mit Aqua dest.

VLB (Virion Lysis Buffer, QBiogene)

0,1% SDS

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

pH 7,4

2.1.3 Zellkulturmedien

Tenozyten-Komplettmedium (Teno-Komplett)

-DMEM F12 /HAM

-P/S 0,1% (Ausgangskonzentration in 100 ml 100 x P/S: Penicillin: 10 000 U/ml;
Streptomycin: 10 mg/ml)

-100 µM Ascorbat

-10% FCS

Tenozytenmedium Serumfrei (Teno-SF)

- entspricht Teno-Komplett, nur ohne FCS

Chondrozyten-Komplettmedium (Chondro-Komplett)

- DMEM F12/HAM
- Gentamycin 50 µg/ml
- 100 µM Ascorbat
- 10% FCS

Chondrozytenmedium Serumfrei (Chondro-SF)

- entspricht Chondro-Komplett, allerdings ohne FCS

QBI-293-Medium

- DMEM High Glucose
- P/S 100 U /ml
- 2% FCS

G418-Medium (Geneticin-Medium)

- DMEM High Glucose
- G418 200 µg/ml
- 10% FCS

Medium für COS 7-A2

- RPMI
- 2 mM L-Glutamin
- 10% FCS

Nährmedium für Bakterien

Luria-Bertani Medium (LB Medium):

- 10 g Trypton
- 5 g Hefe-Extrakt
- 10 g NaCl
- ad 1 l mit H₂O, pH 7,0
- sterilisieren

2.1.4 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2.1 aufgeführt und wurden in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt.

Tabelle 2.1 Liste der verwendeten Antikörper

Antikörper gegen	Spezies	Bezug	Konzentration für Immunfluoreszenz	Konzentration für Immunhistochemie	Konzentration für Western Blot
COMP	rabbit	Biochemie II, Uni Köln (Thur et al.)	1:500	1:100	
c-myc	rabbit, mouse	Santa Cruz (A-14; Heidelberg, Deutschland) Sigma-Aldrich (9E10; München, Deutschland)	1:500	1:100	1:2500
Golgi, 58 kDa-Protein	mouse	Biomol (Hamburg, Deutschland)	1:200		
Protein-Disulfid Isomerase (PDI)	rabbit	Biomol	1:500		
Collagen I	rabbit	Quartett (Berlin, Deutschland)	1:100		
α-rabbit IgG Cy3	goat	Molecular Probes (Leiden, Niederlande)	1:600		
α-mouse IgG Alexa 488	goat	Molecular Probes	1:600		
α-mouse/rabbit HRP	goat	DakoCytomation (Glostrup, Dänemark)		1:100	1:3000

2.1.5 Kits

Die verwendeten kommerziellen Kits sind in Tabelle 2.2 gelistet. Diese wurden nach Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 2.2 Liste der verwendeten kommerziellen Kits

Bezeichnung	Hersteller
Ad Easy Kit	QBioGene (Illkirch, Frankreich)
GfX PCR Kit	AGE Healthcare (Freiberg, Deutschland)
Human Annexin-V-FITC Kit	Bender MedSystems (Wien, Österreich)
In Situ Cell Death Detection Kit AP	Roche (Mannheim, Deutschland)
LDH	Roche (Mannheim, Deutschland)
Maxi Präp	QbioGene (Illkirch, Frankreich)

2.1.6 Enzyme

Tabelle 2.3: Liste der verwendeten Enzyme

Reagenz	Herkunft	Inhalt
BamH I	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)	4000 Units
Bst 1107 I (Sna I)	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)	500 Units
BstX I	Fermentas	500 Units
Hind III	Fermentas	5000 Units
Kpn I	Fermentas	500 Units
Mssl (PmeI)	Fermentas	250 Units
Nhe I	Fermentas	500 Units
Not I	Fermentas	300 Units
Pac I	BioLabs (Frankfurt, Deutschland)	1250 Units
Pae I (Sph I)	Fermentas	500 Units
Psp 1406 I	Fermentas	500 Units
Xho I	Fermentas	2000 Units
Calf Alk. Phosphatase	Fermentas	200 Units
T 4 DNA-Ligase	Fermentas	1000 Units
Hyaluronidase	Roche (Mannheim, Deutschland)	100 mg
Collagenase P, C. Histolyticum, Lyo.	Roche	500 mg
Pronase Protease, Streptomyces	Calbiochem (San Diego, USA)	250 KU
Proteinase K	Roche	5 ml; 14-22 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
RNase A	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)	10 mg/ml in 1 ml 50 mM Tris-HCL, pH 7,4; 50% (v/v) Glycerin
Trypsin	PAA Laboratories (Wien, Österreich)	100 ml; 0,05% in D-PBS

2.1.7 Reagenzien für RT-PCR

Tabelle 2.4 Liste der für die RT-PCR verwendeten Reagenzien

Reagenz	Bezeichnung	Herkunft	Inhalt
dT	Oligo-dT	Sigma	69 µM
First-Strand-Puffer	First-Strand-Puffer 5 x	Invitrogen	250 mM Tris-HCL 375 mM KCl 15 mM MgCl ₂
dATP, dGTP, dCTP, dTTP	NTP	Invitrogen	10 mM je Nukleotid
Reverse Transkriptase	Superscript II	Invitrogen	200 U/µl in Storage-Puffer
RNAse-Inhibitor	Protector RNAse-Inhibitor	Roche	40U/µl
Polymerase-Puffer	Polymerase-Puffer 10 x	Invitrogen	100 mM Tris.HCl 500 mM KCl
Polymerase	Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen	5 U/µl in Storage-Puffer
Primer	siehe Tabelle 2.5	siehe Tabelle 2.5	100 µM

Tabelle 2.5 Liste der für die RT-PCR verwendeten Primer

Gen	Primer in 5' - 3'-Orientierung	Annealing-Temperatur [°C]	Länge des amplifizierten Fragments [bp]	Herkunft
Kollagen I	ACC AAC TTC TCT CAG ACC C CCG TTG ATA GTT TCT CCT AAC	48	220	Xu et al., 1996
Kollagen II	ATC AAC GGT GGC TTC CAC TTC TGC AAT GTC AAT GAT GGG CAG	48	272	Xu et al., 1996
Scleraxis	CGG TCT TTG CTC AAC TTT CTC TGG T AAC AGG GTG AAC ACG GCC TTC	49	322	Cserjesi et al., 1995
COMP	TAC GGA TGG CGA CAA GTC G CGC TGT CAC AAG CAT CTC C	48	292	Zaucke et al., 2001
GAPDH	AAA GGC CAT CAC CAT CTT CC TGG ACA GTC ATA AGT CC	48	293	Hargus, 2000

2.1.8 Zellmaterial

Die primären bovinen Zellen wurden durch Präparation eines Rinderschultergelenks gewonnen, welches von Globus Handelshof in Homburg-Einöd (Saarland) bzw. der Metzgerei Herold in Friedberg-Fauerbach (Hessen) bezogen wurde. Die Methodik wird in Abschnitt 2.2.1 beschrieben. Die geschlachteten Tiere hatten jeweils ein Alter von zwei bis drei Jahren.

Die Zelllinie COS-7 A2 (Gluzman, 1981; Polack et al., 1984), eine Zelllinie aus der Niere von Grünen Meerkatzen, wurde von ATCC (Best.-Nr. CRL-1651) bezogen.

2.1.9 Auflistung der untersuchten COMP-Varianten

Tab. 2.5 Auflistung und Erklärung der verwendeten COMP-Varianten

Bezeichnung	Abkürzung	Erklärung
D469 Δ	Δ D	Deletion Aspartat an AS-Position 469
D475N	DN	Austausch Aspartat→Asparagin an AS-Position 475
D361Y	DY	Austausch Aspartat→Tyrosin an AS-Position 361
H587R	HR	Austausch Histidin→Arginin an AS-Position 587
Wildtyp	wt	Wildtyp-Protein

2.1.10 genutzte Software

Die in vorliegender Arbeit verwendeten Programme sind in Tabelle 2.6 aufgelistet.

Tabelle 2.6 Liste der verwendeten Programme

Programm	Hersteller
Cell Quest Pro	BD Systems (San Jose, USA)
Excel	Microsoft (Redmond, USA)
Image Quant	Amersham Biosciences (St. Giles, UK)
IM 1000	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Photoshop	Adobe (San Jose, USA)
Power Point	Microsoft (Redmond, USA)
Word	Microsoft (Redmond, USA)

2.2 Methodik

2.2.1 Isolation primärer Zellen

Das für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente notwendige bovine Zellmaterial wurde durch Präparation boviner Schultergelenke gewonnen. Tenozyten wurden aus der langen Bizepssehne des Schultergelenks wie in Abschnitt 2.2.1.1 erläutert isoliert. Das Verfahren bestand aus einer abgewandelten Explant-Culture-Methode nach Wong et al., 2003, wobei die Präparation nach Becker, 2002 vorgenommen wurde. Chondrozyten wurden durch Abpräparation der Knorpelschicht des Humeruskopfes wie in Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben isoliert. Die Methodik wurde in Variation der Präparation nach Häuselmann et al., 1994 sowie Kuettner et al, 1982 durchgeführt.

Humane Chondrozyten wurden aus Gelenkersatz-Operationen am Universitätsklinikum Gießen erhalten, was der Vermittlung von Herrn Professor Steinmeyer zu verdanken war. Die Entnahme wurde durch die Ethikkommission genehmigt (Universität Gießen, AZ 13/07).

2.2.1.1 Bovine Tenozyten

Die lange Bizepssehne des Schultergelenks wurde mittels eines Skalpell abgetrennt und in Ethanol 70% gewaschen. Die weitere Präparation wurde steril durchgeführt. Die Faszien sowie noch vorhandene Gewebereste wurden abpräpariert, die Sehne in kleine Stücke geschnitten (etwa 10 x 10 x 5 mm) und in 1x Trypsin für 3 bis 5 Minuten verdaut, um eventuell noch anhaftende Fibroblasten abzulösen. Danach wurden die Sehnenstücke dreimal mit PBS gewaschen und parallele Schnitte auf ihrer Oberfläche angebracht. Jeweils 5 bis 6 Stücke wurden auf einer mittleren Petrischale platziert und diese dann mit 12 ml Komplettmedium mit Amphotericin B (125 µg/l) aufgefüllt. Nach zwei Tagen fand ein Mediumwechsel auf Komplettmedium ohne Amphotericin statt. Weitere Medienwechsel wurden alle drei Tage vorgenommen, bis genügend Zellen zur Ernte ausgewachsen waren, was bis zu vier Wochen dauern konnte. Bei Konfluenz der ausgewachsenen Zellen wurden die

Sehnenstücke zur Fortsetzung der Kultur in neue Petrischalen mit Tenozyten-Komplettmedium verbracht. Die ausgewachsenen Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS mit Trypsin behandelt, zentrifugiert, einmal mit PBS und einmal in Komplettmedium (zum Inaktivieren von Trypsin) gewaschen. Das Pellet wurde in 10 ml Komplettmedium resuspendiert und in einer 1:10-Verdünnung mittels einer Neubauer-Zählkammer (Neubauer improved, LO Laboroptik, Friedrichsdorf, Deutschland) gezählt. Danach wurden die Zellen in Komplettmedium ausplattiert.

2.2.1.2 Bovine Chondrozyten

Die Präparation des bovinen Schultergelenkes erfolgte im Labor unter semisterilen Bedingungen. Zuerst wurde die Gelenkkapsel eröffnet, die Knorpelschicht des Humeruskopfes mit 70%igem Ethanol abgespült und die Knorpelschicht mit einem sterilen Skalpell mehrmals senkrecht/waagrecht eingeritzt. Danach wurden die einzelnen Knorpelquadranten mittels Skalpell und Pinzette (vorher fünf Minuten in Ethanol 70% sterilisiert) abpräpariert. Pro Gramm Knorpel wurden 12 ml Verdaulösung verwendet, welche 0,4% Pronase zum Vorverdau sowie beim zweiten Ansatz 0,025% Kollagenase zum eigentlichen Verdau enthielt.

Die Vorverdaulösung mit 0,4% Pronase wurde angesetzt, indem die benötigte Menge an Pronase im höchstens halben berechneten Volumen mit serumfreiem Medium gelöst und mittels 0,2 µm-Filter sterilfiltriert wurde. Danach wurden die Knorpelstücke sowie die Vorverdaulösung mit Komplettmedium (FCS-Endgehalt: 5%) versetzt und bei 37°C bei 125/min für 90 Minuten auf einem Schüttler (Certomat H, B. Braun Biotech int., Göttingen, Deutschland) geschüttelt. Anschließend wurden die Knorpelstücke fünfmal für jeweils fünf Minuten mit PBS gewaschen. Die benötigte Menge an Kollagenase wurde in höchstens dem halben berechneten Volumen gelöst und ebenfalls sterilfiltriert (0,2 µm-Filter). Der Verdaulösung mit einem FCS-Endgehalt von 5% wurde Amphothericin B (125 µg/l) hinzugefügt. Der Verdau lief über 15 Stunden bei 37°C auf dem Schüttler(125/min).

Die trübe Verdaulösung wurde in 50 ml-Röhrchen verteilt und bei 1250 U/min 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert (Multifuge 3 SR, Heraeus, Hanau, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen, die Pellets in je 10 ml serumfreiem Medium resuspendiert und vereinigt. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 1250 U/min für

10 Minuten bei 4°C. Das Pellet wurde in 15 ml serumfreiem Medium aufgenommen und durch ein 100 µm Zellsieb (BD, Franklin, USA) gegeben. Dann wurde mit 5 ml Medium nachgespült, filtriert und bei 1250 U/min für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 8 ml Komplettmedium resuspendiert, durch ein 40 µm Zellsieb (BD, Franklin, USA) filtriert und mit 2 ml Komplettmedium nachgespült. Die in den 10 ml Suspension enthaltenen Zellen wurden dann in einer Neubauerkammer gezählt. Zusätzlich wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt, um deren Vitalität zu überprüfen. Trypanblau (Benzaminblau) ist ein anionischer Azofarbstoff, der an Proteine bindet. Durch defekte Zellmembranen kann Trypanblau in die Zelle eindringen und die Zellproteine tiefblau anfärben. Unter dem Mikroskop erscheinen deshalb tote Zellen intensiv blau, lebende Zellen jedoch leuchtend hell. Die Auszählung muß zügig vonstatten gehen, da Trypanblau bei zu langer Einwirkzeit zytotoxisch wirkt. Die Zellen wurden nach dem Zählen in Komplettmedium ausplattiert.

2.2.1.3 Humane Chondrozyten

Die Isolierung humaner Chondrozyten folgte exakt dem Protokoll zur Isolation boviner Chondrozyten. Einzig der präparative Teil wich etwas davon ab, da die Humanproben aus abgesägten Knochenteilen mit noch anhaftendem Knorpelgewebe bestanden. Die Präparation wurde vollständig unter sterilen Bedingungen vorgenommen.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Zellkulturarbeiten

Die Zellen wurden in Monolayerkultur bei 37°C und 5% CO₂ in befeuchteter Atmosphäre gehalten.

Alle Zellpopulationen wurden bei Erreichen von etwa 75% Konfluenz passagiert. Die Monolayer-Kulturen wurden hierzu zwei Mal mit PBS gewaschen und dann für 5 bis 10 Minuten trypsiniert. Anschließend wurde die Suspension in 50 ml-Röhrchen pipettiert und 5 Minuten bei 1250 U/min, 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit PBS und einmal mit Kompletmedium gewaschen, um durch das darin enthaltene FCS die Aktivität des Trypsins zu hemmen. Danach wurde das Pellet in 10 ml des jeweils notwendigen Kompletmediums resuspendiert und mittels einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

2.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellmaterial unabhängig von der Präparation bovinen Materials bereit zu haben, wurde ein Teil der Zellen eingefroren. Dazu wurden in Monolayerkulturen gehaltene Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und trypsiniert. Danach wurde jeweils ein Mal mit PBS und Kompletmedium gewaschen und in 10 ml Kompletmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in Kompletmedium, welches 20% FCS sowie 10% DMSO enthielt, resuspendiert. Dabei befanden sich in 1 ml der Zellsuspension 5×10^6 Zellen. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in ein Einfriergefäß (Cellstar Cryo.S, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Deutschland) gegeben, welche wiederum in einen Kryobehälter (Cryo 1°C Freezing Container, Nalgene, Rochester, USA) gestellt wurden. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Zum Auftauen der eingefrorenen Zellen wurde Kompletmedium in einem 50 ml-Röhrchen auf eine Temperatur von 37°C gebracht. Die Einfriergefäße mit der Zellsuspension wurden aus dem Kryobehälter entnommen und angetaut. Sobald sich die gefrorene Schicht an der Gefäßwand verflüssigt hatte, wurde der Inhalt des

Gefäßes in das vorbereitete 50 ml-Röhrchen gegeben und gemischt. Sofort danach wurde abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dann mit warmem Komplettmedium einmal gewaschen und in 10 ml Komplettmedium resuspendiert. Darauf folgte die Auszählung der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer und die Ausplattierung.

2.2.2.3 Transfektion primärer boviner Tenozyten und Chondrozyten

Um die Auswirkungen der verschiedenen COMP-Varianten im Zellkulturmodell beobachten zu können, mußte genetisches Material transduziert werden, wozu Plasmide mit den entsprechenden Vektoren verwendet wurden. Die Vorgehensweise entsprach der in Dinser et al., 2001 beschriebenen Methode. Dazu wurde 12 Stunden vor der eigentlichen Transfektion ein Matrixverdau mit Hyaluronidase (lyophilisiert, Roche, Mannheim, Deutschland) in der Konzentration 4 U/ml (1 mg Hyaluronidase entspricht 1000 U) in Komplettmedium durchgeführt (Madry et al., 2000). Damit konnten bessere Transfektionsraten erreicht werden, da sich die Zellmatrix hemmend auf die Plasmidaufnahme auswirkte. Unmittelbar vor Durchführung der eigentlichen Transfektion wurde die Verdauung nochmals gewechselt. Zur Transfektion von Zellen in Petrischalen wurden 1,5-ml-Reaktionsgefäße mit je 400 µl serumfreiem Medium befüllt und 40 µl FuGene (Roche, Mannheim, Deutschland) zur Permeabilisierung der Zellmembran tropfenweise direkt auf das Medium pipettiert. Danach wurde vorsichtig durchmischt und für 5 Minuten inkubiert. Währenddessen wurden in ein neues Reaktionsgefäß jeweils 7 µg DNA gegeben und die Mischung aus Medium und FuGene aus dem ersten Gefäß vorsichtig hinzupipettiert und durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurde die Lösung tropfenweise auf die Zellen im Kulturgefäß verbracht. 24 Stunden später erfolgte ein Mediumwechsel auf Komplettmedium.

2.2.2.4 Infektion primärer boviner Tenozyten und Chondrozyten

Bei der Transduktion genetischen Materials per Plasmid wurden bei Chondrozyten etwa 25% der Zellen transduziert, bei Tenozyten in keinem Fall mehr als 5%. Daher wurde die Transduktion mittels Adenoviren verwendet (Dinser et al., 2001).

Die Zellen wurden hierzu in Kompletmedium kultiviert, welches auch zur Transduktion benutzt wurde. Die Vorbereitungen schlossen das Berechnen des benötigten Volumens an Virus-Stocklösung (in Glycerol) ein, wobei zu beachten war, dass jedes Virus und jede Charge einen anderen Gehalt an infektiösen Partikeln pro Volumeneinheit (Moiety Of Infection, MOI) aufwies. Je nach Zellzahl mußte dann eine Verdünnung des Virus-Stocks erfolgen.

Die viralen Partikel wurden auf eine definierte MOI pro ml in Medium verdünnt. Danach wurde das vorbereitete Medium mit den infektiösen Partikeln auf die Zellen verbracht. Die Zellen wurden auf einem Schüttler für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ geschüttelt, um durch die Bewegung des Mediums die Infektion zu unterstützen. Danach wurde das Kulturmedium auf die üblicherweise benutzte Menge aufgefüllt und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel auf Kompletmedium durchgeführt.

2.2.3 Herstellung Adenoviraler Vektoren

2.2.3.1 Allgemeine Vorgehensweise

Alle in dieser Arbeit benutzten COMP-Konstrukte wurden in einem Vektor exprimiert, der aus dem Cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter, welcher die Expression eines fusionierten Proteins aus BM-40 Signalpeptid, einem N-terminalen His c-myc-factor X tag (Klatt et al., 2001) und der aus Ratte klonierten COMP-cDNA steuerte. Die Mutationen D469 Δ , D475N und H587R waren durch Mutagenese, wie schon zuvor beschrieben, eingeführt worden (Spitznagel et al., 2004; Thur et al., 2001, siehe Abbildung 2.1).

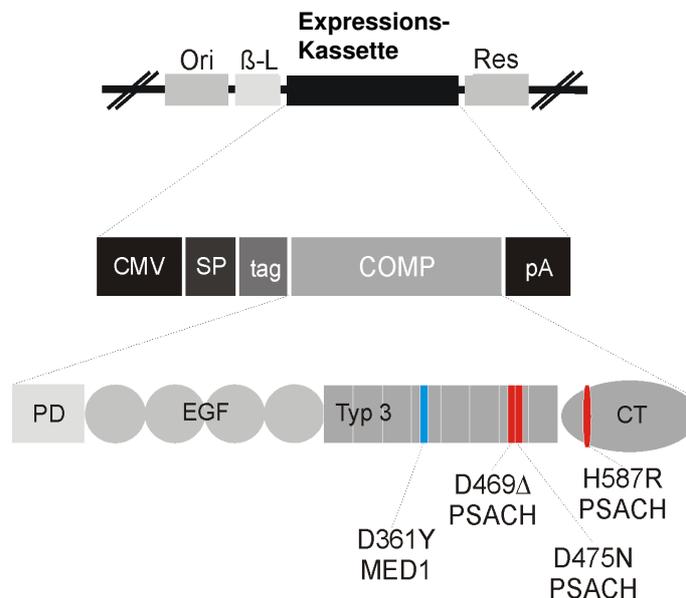


Abb. 2.1: Expressionskassette und Domänenstruktur von COMP mit Angabe der Lokalisation der hier verwendeten Mutationen

CMV = Cytomegalie-Virus immediate early Promotor, SP = BM-40 Signalpeptid, tag = his c-myc factor X tag, pA = SV40 Polyadenylationssignal, PD = Pentamerisationsdomäne, EGF = Epidermal Growth Factor-ähnliche Domäne, Typ 3 = Thrombospondin Typ-3-Wiederholungen, CT = C-terminale globuläre Domäne. Die klinische Krankheitsassoziation der Mutationen ist ebenfalls markiert: Die mit PSACH assoziierten Mutationen (rote Striche) D469 Δ , D475N und H587R sind sowohl in den Typ 3-Motiven als auch in der c-terminalen Domäne lokalisiert. Die mit MED 1 assoziierte Mutation (blauer Strich) D361Y befindet sich innerhalb der Typ 3-Motive.

Das AdEasy-Vektorsystem von QBiogene (Illkirch, Frankreich) wurde benutzt, um adenovirale Konstrukte zu generieren (siehe Abbildung 2.2).

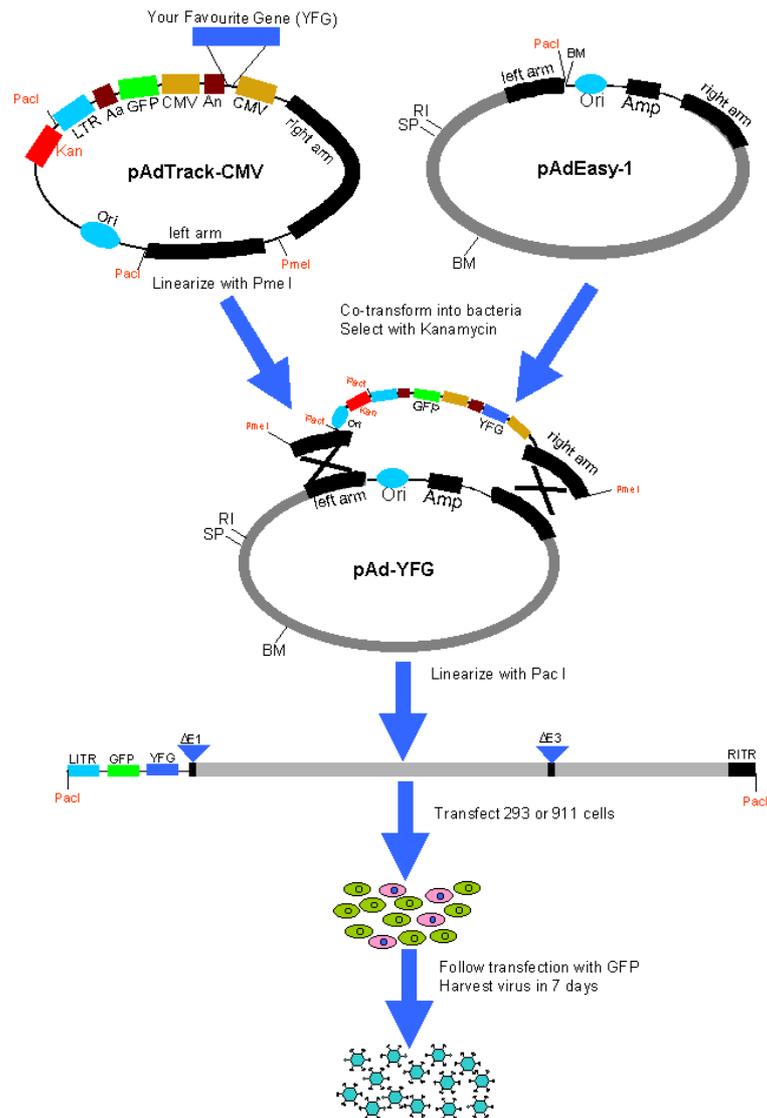


Abb. 2.2: Überblick über die Vorgehensweise (aus AdEasy-Kit, QBiogene)

Die His-myc-getaggten COMP-Konstrukte sowie das für Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) codierende Konstrukt wurden vom vorhandenen pCEP-Pu-Plasmid in den pShuttleCMV-Transfervektor kloniert. Der Vektor pAdEasy-1 wurde mit dem linearisierten pShuttleCMV in elektrokompetente BJ1583-Bakterienzellen (QBiogene) kotransformiert, in welchen dann die Rekombination zwischen beiden Plasmiden stattfand. Die entstehenden Klone wurden durch BamHI-Verdau nach Rekombination durchmustert, wonach die DNA positiver Klone in ultrakompetenten XL-10Gold Bakterienzellen (Stratagene, La Jolla, USA) amplifiziert wurde. Mehrere Kontrollverdaue wurden durchgeführt, um die Anwesenheit des Inserts und der Stabilität der rekombinanten DNA zu überprüfen. Die Rekombinanten wurden mit Pac I linearisiert und in QBI-293-Zellen transfiziert, wobei FuGene (Roche, 5 µg DNA mit 15 µl FuGene für $1,5 \times 10^9$ Zellen) als Transfektionsreagenz

verwendet wurde. Die Adenoviren wurden seriell amplifiziert, bis 10^{12} virale Partikel vorlagen. Die Partikel wurden dann über Cäsiumchlorid-Ultrazentrifugation aufgereinigt und das Cäsiumchlorid mittels Dialyse entfernt, bevor die Adenoviren bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Glycerin gelagert wurden. Die Infektionstiter wurden durch Plaque-Assay und Tissue Culture Infectious Dose 50 (TCID₅₀) jeweils in Triplikaten bestimmt.

2.2.3.2 Generierung adenoviraler Konstrukte

Zur Generierung der adenoviralen COMP-Konstrukte wurde das AdEasy-Vektorsystem von QBiogene (Illkirch, Frankreich) benutzt. Die Vorgehensweise erfolgte nach Angaben des Herstellers und angelehnt an He et al., 1998. Für diese Arbeit wurde auf die bereits vorliegenden COMP-Konstrukte sowie EGFP, jeweils als Insert im pCEP-Pu Plasmidvektor (Spitznagel 2004, Thur 2000, Dinser 2001) zurückgegriffen. Für vorliegende Arbeit wurde das EGFP-Gen vom pCEP-Pu Plasmidvektor in den adenoviralen Vektor kloniert. Die COMP-Konstrukte wurden aus dem pCEP-Pu-Vektor durch die MTA Katja Kirsch in den adenoviralen Vektor kloniert. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Überprüfung der Konstruktidentität durch Restriktionsverdau sowie die Transfektion der DNA in die virusproduzierende Zelllinie, die Virusaufzucht und –aufreinigung.

Klonierung der DNA in den Transfervektor

Das EGFP-pCEP-Pu-Plasmid wurde zuerst mit Kpn I und Xho I verdaut, um dann nach Auftrennung in einem 0,8%igen Agarosegel und anschließender Aufreinigung in den pShuttle-CMV-Vektor ligiert zu werden.

Verdauansatz:

1 µg DNA in 8,5 µl

2,0 µl Kpn I

2,0 µl Xho I

2,0 µl Y-TANGO-Puffer

5,5 µl H₂O

Die Aufreinigung der im Agarosegel aufgetrennten DNA, wobei das EGFP-Fragment bei etwa 800 bp lief, erfolgte nach Ausschneiden der entsprechenden Bande aus dem Gel mittels des GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers. Die isolierte DNA wurde in 50 µl Elutionspuffer aufgenommen und enthielt etwa 1 µg DNA. Nun erfolgte die Ligation mit dem pShuttle-CMV-Vektor, wobei sich der Ligationsansatz für das EGFP-Plasmid wie folgt zusammensetzte:

2 µl pShuttle-CMV-Vektor, geschnitten

3 µl EGFP-pCEP-Pu-Insert

2 µl Ligase-Puffer

1 µl Ligase

12 µl H₂O

Die Ligation erfolgte bei 16 °C über Nacht.

Die Berechnung der eingesetzten Mengen erfolgte nach der Formel:

$$x \text{ ng Insert} = (40 \text{ ng Vektor} : \frac{\text{Vektorgröße [bp]}}{\text{Insertgröße [bp]}}) * 3$$

Die Linearisierung des Transfervektor-Plasmids wurde durch einen Verdau mit Pme I durchgeführt. Die Verdauprodukte wurden abermals auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen, zur Verifizierung elektrophoretisch aufgetrennt und abermals mittels des GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit gereinigt.

Rekombination der adenoviralen DNA und des Transfervektor- Plasmids in die bakterielle Zelllinie (BJ1583)

Um das linearisierte Plasmid zur Rekombination in Zellen einzuschleusen, muß die Zellmembran für kurze Zeit durchlässig gemacht werden. Dies geschah durch Elektroporation.

Die BJ1583-Zellen wurden auf zwei vorgekühlte Reaktionsgefäße zu je 40 µl Zellsuspension verteilt. Dann wurden 6 µl DNA-Lösung in H₂O zu den 40 µl

Zellsuspension pipettiert und die Suspension luftblasenfrei in zwei vorgekühlte Elektroporationsküvetten verbracht. Darauf erfolgte die Elektroporation in einem Elektroporator (Bio-Rad, München, Deutschland) bei 200 Ω , 25 μF und 2500 V. Nach Resuspension des Transformationsansatzes in 1 ml LB-Medium wurde dieser in ein 50 ml-Röhrchen verbracht und für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Die rekombinanten Klone wurden durch Selektion auf LB-Agar mit Kanamycin identifiziert, da die viralen Plasmide eine Kanamycinresistenz induzierten.

Die durch Elektroporation hergestellten plasmidtragenden Zellen wurden auf LB-Agar mit Kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ausplattiert und 24 Stunden bei 37°C kultiviert. Danach wurden die Kolonien in 2 ml LB-Medium mit Kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bei 37°C für 10 bis 15 Stunden kultiviert. Anschließend erfolgten LiCl-Minipräparationen zur Identifikation der rekombinanten Klone. Diese wurden durch die MTA Katja Kirsch durchgeführt. Die Zellen wurden lysiert, die DNA gefällt und auf ein 0,7%-Agarosegel pipettiert, wo die rekombinante Plasmid-DNA bei 40 kb lief. Danach wurden Restriktionsverdauungen mit Bam HI (siehe 2.2.5.5) am halben Minipräparationsmaterial (50 μl) zur Sicherung der stattgefundenen Rekombination ausgeführt, wobei der Verdauungsansatz aus 2 μl DNA sowie 1 μl Enzym, 2 μl Puffer und 15 μl Aqua dest. bestand.

DNA-Amplifikation und Maxipräparation

Nach Verifizierung der Rekombination folgte die Transformation der DNA zur Amplifikation. Die chemisch kompetenten Zellen und der Ligationsansatz (welcher aus der zweiten Hälfte des Minipräparationsansatzes bestand) wurden während des Auftauvorganges auf Eis gehalten. Nach Beendigung der Auftauphase wurden 50 μl der Zellsuspension sowie 10 μl Ligationsansatz zusammengegeben, gemischt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine Inkubation bei 42°C für eine Minute und eine Inkubation auf Eis für zwei Minuten. Nun wurde 1 ml LB-Medium hinzugegeben, wobei die Mischung eine Stunde bei 37°C auf 220 U/min geschüttelt wurde. Daraufhin wurde die Zellsuspension zu je 2 x 50 μl und 2 x 250 μl auf Platten mit LB-Agar mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin ausplattiert und für 24 Stunden bei 37°C kultiviert. Die isolierten Klone wurden in 5 ml LB-Medium aufgenommen und für die nachfolgende Maxipräparation kultiviert, welche mit einem Maxi Pröp-Kit von QBiogen nach

Angaben des Herstellers ausgeführt wurde. Nach der Trocknung des Pellet erfolgte die Resuspension mit 2 x 250 µl H₂O. Die so erhaltene DNA wurde mit mehreren Enzymen auf einerseits fehlende Strangbrüche des Virusgenoms sowie korrekten Einbau des Konstruktes hin untersucht. Hierbei wurden die folgenden Enzyme verwendet (die Verdauansätze bestanden aus je 2 µl DNA, 1 µl Enzym, 2 µl Puffer und 15 µl Aqua dest.):

Enzyme, die außerhalb des Inserts schneiden:

Bam HI (Puffer: Bam)

Xho I (Puffer: R)

Enzyme, die innerhalb des Inserts schneiden (jeweils zum Vergleich mit Wildtyp-COMP):

D469Δ/Wildtyp Pae I (Puffer: B⁺)

GFP/Wildtyp Bam HI (Puffer: Bam)

D475N/Wildtyp Kpn I (Puffer: Kpn I)

D361Y/Wildtyp Sna I (Puffer: Orange)

H587R/Wildtyp Acl I (Puffer: Tango Yellow)

Die Verdauansätze bestanden aus je 2 µl DNA, 1 µl Enzym, 2 µl Puffer und 15 µl Aqua dest.

Virusherstellung und Amplifikation

Der Verdau rekombinanter adenoviraler Konstrukte mit Pac I wurde durchgeführt, um die Exposition der terminalen Repeat-Sequenzen zu ermöglichen und somit den Vektor zu linearisieren. Das Plasmid wurde mit Phenol / Chloroform extrahiert. Dazu wurde eine 1:1-Lösung von Phenol und Chloroform angesetzt und diese wiederum 1:1 mit der DNA-Lösung vermischt und für eine Minute zentrifugiert. Die obere Phase wurde zur Weiterverarbeitung abgezogen und 0,2 Volumen einer 6-molaren Ammoniumacetatlösung (pH 5,2) sowie 2 Volumen 100% EtOH, 4°C hinzupipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurde der Ansatz für weitere 20 Minuten

bei 12000 x g zentrifugiert und die DNA mit 70% EtOH gewaschen. Danach wurde das DNA-Pellet in 50 µl LoTE-Puffer resuspendiert.

Nach der Linearisierung konnte die Transfektion mittels FuGene in QBI-293-Zellen erfolgen, welche in Abschnitt 2.2.2.3 beschrieben ist.

Die Überprüfung der Proteinsynthese wurde mittels metabolischer Markierung (siehe Abschnitt 2.2.4.5) vorgenommen.

Amplifikation viraler DNA

Die Amplifikation in mit viraler DNA transfizierten QBI 293-Zellen lief nach folgendem Schema ab (He et al., 1998):

- **Transfektion**

5 µg DNA wurden mit Pac I verdaut und in Phenol / Chloroform aufgereinigt. Der Transfektionsansatz bestand aus 15 µl FuGene pro Ansatz in 100 µl serumfreiem DMEM-High Glucose-Medium und der gesamten Pac I-verdauten DNA. Auf $1,5 \times 10^6$ QBI 293-Zellen, die mit frischem Medium versetzt waren (5% FCS), wurde der Transfektionsansatz gegeben und die Zellen zwei Tage im Brutschrank inkubiert.

- **Herstellung von Charge 1**

Durch Abpipettieren und mit Hilfe eines Zellschabers wurden die virusproduzierenden Zellen, die zum Teil zytopathischen Effekt zeigten, geerntet und 10 Minuten bei 3500 U/min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 250 µl PBS resuspendiert und vier Mal abwechselnd in -80°C MeOH eingefroren und wieder bei 37°C im Heizblock aufgetaut. Die entstandenen Zelltrümmer wurden 6 Minuten bei 10000 x g abzentrifugiert und der die viralen Partikel enthaltende Überstand bei -80°C gelagert.

- **Herstellung von Charge 2**

Pro Konstrukt wurde eine Gewebekulturschale (175 cm^2) mit 2×10^6 Zellen ausplattiert (5% FCS) und diese mit 125 µl Virus der ersten Charge infiziert.

Die Ernte, inklusive des Gefrier-Tau-Zyklus wie im Schritt 2 beschrieben, erfolgte 4 Tage später, wobei das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert wurde.

- **Herstellung von Charge 3**

Pro Konstrukt wurden fünf Gewebekulturschalen mit je 2×10^6 Zellen ausplattiert (5% FCS) und mit 150 µl der Charge 2 infiziert. Dabei wurden auf jede Schale 10 ml mit darin gelöstem Virus gegeben und etwa zwei Stunden später 10 ml Medium hinzugefügt. Die Ernte mit Gefrier-Tau-Zyklen erfolgte drei Tage später, das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert.

- **Herstellung von Charge 4**

30 Kulturflaschen wurden bei einer Konfluenz von 80-90% mit 400 µl Virus aus Charge 3 (gelöst in 1,5 l 5% FCS-Medium, 50 ml pro Flasche) infiziert. Nach drei Tagen wurde wie zuvor beschrieben geerntet.

2.2.3.3 Aufreinigung und Titerbestimmung

Aufreinigung mit Cäsiumchlorid

Um die geernteten viralen Partikel aufzureinigen, wurden diese in Cäsiumchlorid zentrifugiert. Dabei sammeln sich die Viruspartikel dichteabhängig an.

Die CsCl-Zentrifugation erfolgt in einer auf 4°C vorgekühlten Ultrazentrifuge. Es wurden 13,2 g CsCl pro 50 ml-Röhrchen abgewogen und auf genau 24 ml mit 50 mM Tris pH 8 (Dichte 1,35 g/ml) sowie der zugesetzten Virus-Lösung aufgefüllt und gemischt. Die aufzureinigenden Proben wurden nun in Zentrifugenröhrchen gefüllt. Die Zentrifugation erfolgte über Nacht bei 4°C und 100 000 x g. Nach Beendigung der Zentrifugation wurden die Röhrchen in ein Stativ gespannt und die Bande durch Einstechen mittels einer 5 ml-Spritze etwas unterhalb abgezogen. Das Volumen der in der Spritze befindlichen Lösung wurde bestimmt und 1:1 mit 2 x Storage Buffer zur Dialyse versetzt. Die zugeschnittenen Dialysemembranen wurden in Aqua dest. in einem Mikrowellengerät kurz aufgeköcht und mit Aqua dest. wieder abgespült. Die Membranen wurden auf die Reaktionsgefäße gelegt und mittels eines vorbereiteten

Lochdeckels befestigt. Die Reaktionsgefäße wurden in einem Styroporschwimmer befestigt, auf die Membran ein Tropfen Dialysepuffer aufpipettiert und mit dem Lochdeckel nach oben in das Gefäß mit dem Dialysepuffer eingebracht, so dass die Membran vollständig im Puffer eingetaucht war. Danach wurde der Schwimmer kopfüber gedreht. Die Dialyse erfolgte im Eisbad unter Verwendung eines Magnetrührers. Nach zwei und vier Stunden wurde der Dialysepuffer gewechselt. Bei Beendigung der Dialyse wurden die Virus-Stocks aliquotiert (25 µl pro Aliquot) und bei -80 °C aufbewahrt.

Da zur Infektion von Zellen die Kenntnis der genauen Virusmenge der dazu verwendeten Lösung essentiell ist, muß diese zuvor bestimmt werden. Zur Virustiterbestimmung wurden zwei Tests angewandt, ein Test auf Plaque Forming Units (PFU) und ein Test auf Tissue Culture Infectious Dose 50 (TCID 50).

Test auf Plaque Forming Units (PFU)

Mit dem PFU-Test können Virustiter quantifiziert werden. Die Titration mittels des PFU-Tests beinhaltet die Infektion von QBI 293-Zellen und nachfolgender Überlagerung der Zellen mit Agarose. Dabei wird ein kompletter Infektionszyklus durchlaufen und eine erneute Infektion der Nachbarzellen erreicht, wobei es zur Zellyse kommt und infolgedessen „Plaques“ als Löcher im Zellrasen entstehen. Pro zu testendem Konstrukt wurden zwei 6-Well-Platten mit 5×10^5 QBI 293-Zellen pro Well in je 2 ml Medium mit 5% FCS ausplattiert und über Nacht inkubiert. Sodann wurden jeweils 1 ml serielle Verdünnungen in Medium angesetzt (10^{-5} - 10^{-9} , ausgehend von $10^{-3} = 1 \mu\text{l/ml}$), das Medium von den Zellen abgezogen und die Verdünnungen aufgebracht. Darauf folgte eine Inkubationszeit von zwei Stunden bei 37 °C, nach der das Medium wieder entfernt und 2 bis 3 ml Sea-Plaque-Agarose 1,25% (FMC Bioproducts, Philadelphia, USA) in DMEM 5% FCS pro Well zugegeben wurde. Die 6-Well-Platten wurden mit Folie oder Parafilm umwickelt und unter gegebener Auffüllung von Agarose 12 bis 24 Tage inkubiert. Zur Auswertung wurden die Anzahl der Plaques ausgezählt. Um die PFU/ml zu erhalten, wurden die Ergebnisse der Auszählung mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

Test auf Tissue Culture Infectious Dose 50 (TCID 50)

Pro zu testendem Konstrukt wurde eine 96-Well-Platte mit 1×10^4 QBI-Zellen pro Well in 150 μ l Medium, welches 2% FCS enthielt, ausplattiert und über Nacht inkubiert. Danach wurden die 10fach-Bestimmung der Virus-Verdünnungsreihe (von 10^{-3} bis 10^{-10} oder bei höherem Titer von 10^{-7} bis 10^{-14}) sowie zwei Negativkontrollreihen vorgenommen. Die seriellen Verdünnungsreihen wurden separat in einer 96-Well-Platte in Medium mit 2% FCS, jeweils 100 μ l, angesetzt. Dann wurde das Medium abgenommen und die Verdünnungen aufpipettiert. Die Platte wurde mit Folie umwickelt und 10 bis 21 Tage inkubiert. Die aufgetretenen zytopathischen Effekte pro Platte wurden ausgezählt, wobei ein Well als CPE-positiv gilt, wenn auch nur einzelne Zellen mit zytopathischem Effekt oder ein einzelner Plaque vorhanden ist. Auf dieser Basis kann die Rate der positiven Wells pro Platte bestimmt werden.

Mittels der Kärber-Formel erfolgt die Auswertung des Tests:

$$T = 10^{1+d(S-0,5)}$$

Hierbei ist d der dekadische Logarithmus der Verdünnungsstufe (also 1 für eine zehnfache Verdünnung) und S die Summe der Verhältnisse CPE zu kein CPE darstellt (beginnend von der ersten Verdünnungsstufe an). Das Ergebnis muß dann mit 10 multipliziert werden, um den TCID 50 pro Milliliter zu erhalten, da sich die Formel auf ein Volumen von 100 μ l bezieht.

Der Test ist valide, wenn die Negativkontrollen keinen CPE aufweisen und die niedrigste Verdünnungsrate 100% sowie die höchste Verdünnungsrate 0% CPE aufweisen.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Die Zellen für die Proteinfällung wurden geerntet, indem das Kulturgefäß vor der Ernte auf Eis gehalten wurde. Der Überstand wurde in Reaktionsgefäße pipettiert und auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 1 bis 2 ml Lysepuffer aufgebracht. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurden die Zellen mittels Zellschaber geerntet und in ein Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Die Fällung wurde mit 250 µl TCA 50% und 10 µl Triton X-100 10% auf 1 ml Lösung durchgeführt, welche gut durchmischt und für 30 Minuten auf Eis gestellt wurde. Danach erfolgte die Zentrifugation der Proben bei 4°C und 15000 U/min für 15 Minuten, worauf die Proben zweimal in eiskaltem Aceton gewaschen wurden. Darauf schloß sich die Lufttrocknung des Pellets an, welches in 20 µl SDS-Gel-Ladepuffer (bei reduzierenden Bedingungen versetzt mit 1 µl β-Mercaptoethanol) resuspendiert wurde.

2.2.4.2 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation erfolgte im Anschluß an ein Pulse/Chase-Experiment (siehe auch Abschnitt 2.2.4.5) zur Analyse der Sekretionskinetik, um bestimmte Proteine aus den Medium- bzw. Lysatproben auszufällen. Es wurden Antikörper gegen c-myc sowie COMP benutzt. Zur Antikörperkopplung wurden 20 µl Protein-A-Agarose (PAA) pro Ansatz verwendet, wobei die für alle Ansätze notwendige Menge errechnet und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert wurde. Die Agarose wurde zweimal mit TBS gewaschen, das Pellet mit 5 µl Antikörperlösung (1:4) pro Ansatz versehen und 3 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler geschüttelt. Danach wurde zwei Mal mit TBS gewaschen, das Agarosepellet mit 10%iger BSA-Lösung (angesetzt mit TBS) auf ein Volumen von 30 µl pro Ansatz gebracht und anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde bei 3000 U/min für eine Minute zentrifugiert (Centrifuge 5417 C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und das Pellet in 10% BSA in TBS resuspendiert (30 µl pro Ansatz).

Parallel dazu erfolgte das unspezifische Ausfällen von Proteinen. Hierbei werden 10 µl PAA pro Ansatz verwendet. Die Proben wurden zwei Mal in TBS gewaschen und das Pellet auf 30 µl pro Ansatz mit TBS aufgefüllt. Die vorher aliquotierten Medium- und Lysatproben wurden dann mit je 30 µl PAA in TBS versetzt, eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt, zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben.

Dann erfolgte die eigentliche Immunpräzipitation. Zu den vorbehandelten Proben wurden je 30 µl der antikörpergekoppelten PAA-Suspension gegeben und anschließend bei 4°C über Nacht im Kühlraum geschüttelt. Danach wurden die Proben dreimal in Triton X-100 0,5% in TBS gewaschen. Nun wurde das Pellet in 1 x SDS-Gelladepuffer (je 50 µl), welcher bei reduzierenden Gelen zusätzlich noch 1 µl β-Mercaptoethanol enthielt, resuspendiert. Proben für Gele mit reduzierenden Bedingungen wurden über 5 Minuten auf 95°C, Proben für Gele unter nicht reduzierenden Bedingungen dagegen über 20 Minuten auf 80°C erhitzt und anschließend noch einmal zentrifugiert. Die fertigen Proben wurden dann auf ein Gel aufgetragen oder zur späteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE dient zur Auftrennung von Kulturmedium, Zellysaten oder auch gefällten Proteinen. Hierbei werden Proteine durch den Siebeffekt des Gels im konstanten elektrischen Feld nach molarer Masse getrennt. Dabei lagern sich negativ geladene SDS-Moleküle im konstanten Verhältnis von 1,4 g SDS zu 1 g Protein an die Proteine an. Die Beweglichkeit der Proteine im Gel hängt nicht von ihrer Konformation oder der Nettoladung ab. Die Proteine durchwandern größenabhängig zunächst ein weitmaschiges Sammelgel, worauf sich ein engmaschigeres Trenngel anschließt. Die Trennmatrix besteht aus einer Lösung aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid im Verhältnis 37,5:1, die durch radikalische Polymerisation nach Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin (TEMED) entsteht. Die Trenngele wurden zuerst gegossen und mit Isopropanol 70% überschichtet, wobei die Acrylamidkonzentration unter reduzierenden Bedingungen 6% und unter nicht reduzierenden Bedingungen 4% betrug. Sobald die Gele auspolymerisiert waren, wurde das Isopropanol abgegossen und das Sammelgel

gegossen. Die Taschen für die Proben wurden mittels eines ins Sammelgel eingelassenen Teflonkamms erzeugt. Die Elektrophorese wurde mit 1 x Lämmli-Laufpuffer bei 120 V und 40 mA (konstant) durchgeführt. Als Marker wurde die Page Ruler Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) benutzt. Die Vorrichtungen, einschließlich der Gelkammer sowie der Glasplatten, stammten von Bio-Rad (München, Deutschland).

2.2.4.4 Autoradiographie

Die Autoradiographie ist ein Verfahren, das den Nachweis radioaktiv markierter Proteine möglich macht. Dabei wird die Strahlung der radioaktiven Substanzen zur Detektion direkt mittels Röntgenfilm oder indirekt mittels Fluorographie genutzt. Die quantitative Analyse eines SDS-Proteingels erfolgte densitometrisch mittels Fluorographie am Phospho Imager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA).

Coomassie Brilliant Blue wurde benutzt, um die auf den Gelen befindlichen Markerbanden zum späteren Abgleich mit den Proteinbanden sichtbar zu machen. Der Farbstoff lagert sich an die basischen Seitenketten der Proteine an und färbt diese somit unspezifisch an. Coomassie Brilliant Blue wird in einem Methanol/Aqua dest.-Gemisch gelöst, welches zur Fixierung der Proteine im Gel 10% Essigsäure enthält. Mit dieser Methode lassen sich Proteinmengen von etwa 0,5 µg pro Bande detektieren. Nach Durchführung der SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteingele für eine Stunde in saurer methanolischer Coomassie-Lösung denaturiert, fixiert und gefärbt. Danach wurden die Gele in Entfärbelösung verbracht und bis zur Entwicklung des Bandenmusters entfärbt.

Die Gele wurden anschließend für 30 Minuten in 10% Essigsäure inkubiert und dann mit PBS dreimal gewaschen. Darauf erfolgte eine 30 minütige Behandlung in 1 M Natriumsalicylat und dreimaliges Waschen mit Aqua dest. Nun konnten die Gele auf eine Filtermembran gelegt und in den Geltrockner (Gel Dryer Model 583, Bio-Rad, München, Deutschland) verbracht werden (60°C, 2 Stunden), worauf eine Photodokumentation erfolgte. Anschließend konnte die Auswertung von SDS-Gelen mit radioaktiv markierten Proteinen im Phospho Imager erfolgen.

Auswertung radioaktiver SDS-PAGE-Gele mittels Phospho Imager

Die getrockneten SDS-Gele mit ^{35}S -markierten Proteinen wurden mittels Phospho Imager (Johnston et al., 1990) fluorographisch ausgewertet. Das zugrunde liegende Prinzip ist eine mit BaFBr-Eu-Kristallen beschichtete Membran. Die Kristalle werden durch den radioaktiven Zerfall des Schwefels in einen stabilen angeregten Zustand überführt ($\text{Eu} \bullet \text{Eu}^{2+}$). Beim Scannen der Membran wird diese durch einen Laser abgetastet, wobei die Kristalle einen erhöhten angeregten Zustand einnehmen ($\text{Eu}^{2+} \bullet \text{Eu}^{3+}$). Da dieser Zustand instabil ist, nehmen die Kristalle wieder den Grundzustand ein ($\text{Eu}^{3+} \bullet \text{Eu}$), wobei eine bestimmte Menge Licht abgegeben wird. Dieses Licht wird im Storm Phosphor Imager detektiert und kann danach mit der Image Quant-Software (Amersham Biosciences, St. Giles, UK) densitometrisch ausgewertet werden. Über dieses Verfahren konnte die Radioaktivität COMP-spezifischer Banden im SDS-PAGE Gel quantifiziert werden. Die mit radioaktiv markierten Proteinen beladenen SDS-Gele mußten dazu mit Natriumsalicylat behandelt werden. Dieses Reagenz wandelt die radioaktive Strahlung in Fluoreszenz um, welche dann mittels Phospho Imager detektiert werden kann. Ebenso wurde die Auftrennung radioaktiv markierter Proteine im Gel sichtbar gemacht.

2.2.4.5 Sekretionskinetik (Pulse-Chase-Experiment)

Um den Einfluß der verschiedenen COMP-Varianten auf das Sekretionsverhalten der Zelle zu untersuchen, wurden Pulse-Chase-Experimente durchgeführt. Hierbei wurden Zellen einige Zeit in einem Methionin- und Cystein-freien Medium gehalten. Anschließend wurde dem Zellkulturmedium ^{35}S -markiertes Methionin zugesetzt. Die Zellen nehmen die zur Verfügung stehende radioaktiv markierte Aminosäure auf und bauen sie in zelleigene Proteine ein (Pulse). Danach wird das Medium durch Komplettmedium ohne radioaktiv markierte Aminosäure, aber mit einem Überangebot an nicht-markierten Aminosäuren ersetzt, so dass ab diesem Zeitpunkt kein radioaktiv markiertes Protein mehr neu synthetisiert wird (Chase). Mit dieser Methode läßt sich die Sekretionskinetik von neu synthetisierten Proteinen über die Zeit bestimmen, indem man zu unterschiedlichen Zeitpunkten sowohl Zellysat- als

auch Mediumproben erntet und die radioaktiven Zerfallsereignisse in den aufbereiteten Proben mißt (Dinser et al., 2002).

Zellen in Monolayer-Kultur (6-Wells, $3-4 \times 10^5$ Zellen pro Well) wurden mit adenoviralen Konstrukten zur Expression verschiedener COMP-Varianten infiziert. Drei Tage nach Transduktion wurde das Pulse-Chase-Experiment durchgeführt. Um Rückstände von FCS und Aminosäuren aus dem ursprünglichen Kulturmedium weitgehend zu beseitigen, wurden die Zellen zweimal in warmem PBS gewaschen. Darauf erfolgte ein Mediumwechsel auf 2 ml/Well Methionin-/Cysteinfreies Medium, welches mit Ascorbat, Glutamin 1:100 sowie Pyruvat 1:100 versetzt war. Die Zellen wurden für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte der Wechsel auf Methionin-/Cysteinfreies Medium mit $50 \mu\text{Ci/ml } ^{35}\text{S}$ -Methionin für eine weitere Stunde bei 37°C (Pulse). Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte nach zweimaligem Waschen mit warmem PBS ein Wechsel auf Komplettmedium (Chase). Die erste Ernte von Medium- sowie Zellysatproben erfolgte nach drei Stunden, die zweite Ernte nach 16 Stunden. Zur Ernte wurde das Medium abgenommen, in 2 ml-Reaktionsgefäße gefüllt und sofort auf Eis verbracht. Nun wurden die Zellen zweimal mit warmem PBS gewaschen und 2 ml Lysepuffer hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurden die Zellen mittels Schaber geerntet und in jeweils ein 2 ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Die Lysatproben wurden dreimal durch eine ultradünne Nadel in eine Spritze aufgezogen, was eine Scherung der DNA bewirkt. Dabei ist ein Aufschäumen der Suspension zu vermeiden, um eine Proteindenaturierung zu verhindern. Danach wurden die Proben zentrifugiert (1500 U/min, 5 Minuten) und der Überstand bei -80°C asserviert oder sofort mittels Immunpräzipitation und anschließender SDS-Gelelektrophorese weiterbehandelt.

2.2.5 DNA- und RNA-Analytik

2.2.5.1 DNA-Isolierung und Probenaufbereitung

Zum Apoptosenachweis erfolgte nach Induktion eine DNA-Gelelektrophorese zum Nachweis der Fragmentierung. Zur Isolierung der Gesamt-DNA wurden Zellen in Monolayerkultur mit Trypsin geerntet. Diese wurden zweimal in PBS gewaschen und in 300 µl Lysepuffer pro Ansatz resuspendiert. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei 4°C erfolgte eine Inkubation mit RNase 40 µg pro Probe über eine Stunde bei 37°C. Darauf folgte eine Zugabe von Proteinase K 40 µg pro Ansatz und eine anschließende Inkubation für eine Stunde bei 50°C. Die Fällung erfolgte nach Zugabe von Isopropanol 1:1 und Natriumacetat 3 M 0,1:1 durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 3000 x g, wonach der Überstand verworfen und das Pellet mit Ethanol 100% gewaschen wurde. Danach wurde das Pellet in 16 µl 1 x TAE resuspendiert, mit 4 µl 6 x Blaumarker versetzt und auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.2.5.2 DNA-Quantifizierung

Die DNA-Quantifizierung erfolgte mittels Absorptionsmessung im Photometer bei 260, 280 und 320 nm. Das Probenvolumen betrug 100 µl 1:10 verdünnte DNA-Lösung in LoTE-Puffer (siehe 2.1.2), als Referenz dienten 100 µl LoTE-Puffer.

Quantifizierung: (Wert 260 nm – Wert 320 nm) x DNA-Faktor x Verdünnung
(DNA-Faktor = 50)

Sauberkeit: $\frac{(\text{Wert } 260\text{nm} - \text{Wert } 320\text{nm})}{(\text{Wert } 280\text{nm} - \text{Wert } 320\text{nm})} \sim 1,8 - 2,0$

Die nach absorptionsphotometrischer Methode quantifizierten DNA-Proben wurden zusätzlich auf einem Agarosegel analysiert (1 µg DNA pro Probe) und die Ergebnisse verglichen.

2.2.5.3 Agarosegelelektrophorese

DNA-Moleküle können mittels Agarosegelelektrophorese in einem elektrischen Feld nach ihrer Molekülgröße getrennt werden, da die Zucker-Phosphat-Ketten des Molekülgerüsts eine negative Ladung aufweisen. Die Länge der zurückgelegten Strecke im Gel ergibt sich aus dem umgekehrten Verhältnis zum Logarithmus ihrer Länge. Die Fähigkeit zur Trennung unterschiedlicher Nukleinsäurefragmente ist in der Agarosekonzentration des Gels festgelegt. Es wurden 1%ige Agarosegele zur Elektrophorese eingesetzt.

Zum gelösten 1%-Agarosegel in 1 x TAE-Puffer wurden 130 µl Ethidiumbromid 1% hinzupipettiert, gut durchmischt und in die dafür vorgesehene Vorrichtung gegossen, wobei die Taschen durch einen Kamm ausgespart wurden. Nach Polymerisation wurde das Gel in die Gelkammer verbracht und diese mit 1 x TAE gefüllt. Die vorbereiteten Proben wurden aufgebracht und bei 90 V über etwa 30 – 60 Minuten aufgetrennt.

2.2.5.4 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die Methode der RT-PCR wurde eingesetzt, um die Expression verschiedener Proteine zu untersuchen. Der Expression geht der Vorgang der Translation von chromosomaler DNA in RNA voraus. Diese für jedes Protein spezifische RNA kann aus den Zellen isoliert und mit Hilfe der Reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) übersetzt werden, welche in der PCR weiterverarbeitet werden kann.

RNA-Isolierung mittels TRIZOL

RNA wurde aus kultivierten Zellen mittels TRIZOL-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) isoliert. Die Zellen wurden hierzu in 6-Well-Platten als Monolayer kultiviert. Die Ernte erfolgte in 1 ml TRIZOL pro Well. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Pipettieren homogenisiert und in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, was eine Dissoziation der RNA bewirkte. Zur

Phasentrennung wurde 0,2 ml Chloroform pro 1 ml TRIZOL zugegeben, 15 Sekunden geschüttelt und 2 bis 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden bei 12000 x g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert, wobei sich nach Ende der Zentrifugation die Proben in die obere wäßrige Phase, eine weißliche Interphase (Proteine) und die rote untere Phase getrennt haben. Die obere klare Phase enthält die RNA, welche vorsichtig abgezogen und zur Präzipitation zusammen mit 0,5 ml Isopropanol pro 1 ml TRIZOL in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert wurde. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10 Minuten bei 12000 x g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 70%igem EtOH (1 ml EtOH pro 1 ml TRIZOL) gewaschen und wiederum 5 Minuten bei 7500 x g und 4°C zentrifugiert. Nach Trocknung wurde das Pellet in 100 µl DEPC-Wasser gelöst und in einer 1:100-Verdünnung im Photometer quantifiziert. Als Leerprobe dienten 100 µl DEPC-Wasser.

DEPC-behandeltes Wasser dient zur Hemmung von RNAsen, was erreicht wird, indem DEPC eine kovalente Bindung zu primären und sekundären Aminen ausbildet (Alkylierung). Es bindet daher auch an viele Histidin-Seitenketten in aktiven Zentren von RNAsen, die daher irreversibel gehemmt werden.

Reverse Transkription

Zur Reversen Transkription wurde quantifizierte RNA eingesetzt. Jeder Ansatz bestand aus 2 µg RNA und 0,4 µl Oligo-dT, wobei mit DEPC-Wasser auf 12 µl aufgefüllt wurde. Zur Streckung der RNA wurde dieser Ansatz für 10 Minuten bei 70°C inkubiert (Thermostat Plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland), dann zwei Minuten auf Eis gestellt und kurz zentrifugiert. Nach Zugabe von 4 µl First-Strand-Puffer, 2 µl DTT, 1 µl NTP sowie 0,5 µl RNase-Inhibitor (siehe 2.1.7) pro Ansatz wurde zwei Minuten bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde daraufhin durch Zugabe von 0,5 µl Reverser Transkriptase (siehe 2.1.7) pro Ansatz gestartet und bei 42°C 50 Minuten inkubiert. Beendet wurde die Reaktion durch Inkubation bei 72°C für 15 Minuten. Die durch die Reverse Transkription entstandene komplementäre DNA konnte nun bei -20°C aufbewahrt oder direkt weiterverarbeitet werden.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Der Reaktionsansatz für die PCR bestand pro Ansatz aus 1 µl cDNA-Lösung, 5 µl Polymerase-Puffer 10 x, 1 µl NTP, 3 µl MgCl₂ 10%, je 0,2 µl Sense- und Antisense-Primer, 0,4 µl Polymerase, 2,5 µl DMSO und Aqua dest. bis zu einem Gesamtvolumen von 50 µl. Die Amplifikation erfolgte dann in einem Gene Amp PCR System von Applied Biosystems (Foster City, USA).

Amplifikationsbedingungen für PCR:

Denaturieren: 95°C, 3 Minuten

35 Zyklen: 95°C, 30 Sekunden (Denaturierung)

48°C, 30 Sekunden (Primerbindung)

72°C, 60 Sekunden (Verlängerung)

72°C, 10 Minuten

4°C, ●

2.2.5.5 DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen

Für die Überprüfung der Rekombination sowie der Sicherung der Identität der adenoviralen Konstrukte wurde DNA zwecks Verdau mit Restriktionsenzymen behandelt. Der Verdau wurde mit 2 µl DNA-Lösung, 1 µl Enzym und 2 µl passendem Puffer in einem Volumen von 20 µl ausgeführt. Die Verdauansätze wurden dann jeweils für drei Stunden bei 37°C inkubiert, mit 5 µl Bromphenolblau pro Ansatz versetzt und zur Analyse auf einem 0,8%igen Agarosegel bei 55 V aufgetrennt.

2.2.6 Zellvitalität und Apoptose

2.2.6.1 Apoptoseinduktion

Als Positivkontrolle für Experimente zur Beurteilung einer pro-apoptotischen Wirkung von COMP-Mutanten wurde Natriumnitroprussid (SNP) verwendet (Battinelli et al., 2000; Fehsel et al., 1995; Kaneto et al., 1995; Taimor et al., 2000; von Knethen et al., 1999). Dabei handelt es sich um einen Stickstoffmonoxid-Donor, der durch CD95-Aktivierung die Mitochondrienatmung sowie den Energiestoffwechsel stört oder unterbindet (Brown, 1999; Brookes et al., 2000; Kühn et al., 2003; Li et al., 1997). Apoptose wurde induziert, indem Monolayerkulturen von bovinen Tenozyten und Chondrozyten über Nacht mit SNP 2 mM in Kompletmedium inkubiert wurden. Die Zellernte erfolgte parallel mit den übrigen Proben.

2.2.6.2 Messung der Proliferation mit ³H-Thymidin

Zur Untersuchung der Zellvitalität wurde ein Proliferationstest durchgeführt. Grundlage dieses Tests ist die Tatsache, dass gesunde Zellen normalerweise eine höhere Proliferationsrate aufweisen als beeinträchtigte Zellen. Zur Darstellung der Proliferation wurde ein Test mit Tritium-markiertem Thymidin durchgeführt, dessen Einbau in die zelluläre DNA ein Maß für die Proliferationsfähigkeit von Zellen darstellt. Die Messung der radioaktiven Zerfallsereignisse in Kulturen mit verschiedenen COMP-Mutanten ermöglicht einen quantitativen Vergleich der Proliferationsfähigkeit von mit verschiedenen COMP-Varianten transduzierten Zellpopulationen (Naito et al., 1987; Naito et al., 1989).

Transduzierte Zellen wurden drei Tage lang in 96-Well-Platten in Kultur gehalten. Nach einem Waschschrift mit warmem PBS erfolgte ein Mediumwechsel auf serumfreies Medium, welches 10 µCi/ml ³H-Thymidin enthielt. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die 96-Well-Platten bei -80°C tiefgefroren und zur Messung wieder aufgetaut, wodurch die Zellen lysiert wurden. Daraufhin erfolgte eine Übertragung der Zellysate auf Filtermatten mit Hilfe eines Zellwaschers (Omnifilter, PerkinElmer, Rodgau, Deutschland). Nach Trocknung der Filtermatten erfolgte eine

Aufschmelzung von Wachsplatten (MeltiLex, PerkinElmer) und eine Auszählung der radioaktiven Zerfallsereignisse im Counter (Wallac MicroBeta TriLux-Counter, PerkinElmer).

2.2.6.3 Nachweis des Zellzerfalls anhand von Lactatdehydrogenase (LDH)

Um das Ausmaß an Nekrose in einer Zellkultur anhand eines einzelnen Parameters bestimmen zu können, wurde ein LDH-Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) zum Nachweis von Laktat-Dehydrogenase (LDH) im Zellkulturüberstand verwendet (siehe Abschnitt 2.1.4). LDH ist ein cytoplasmatisches Enzym, das die Oxidation von Laktat zu Pyruvat (und gleichzeitig von NAD^+ zu NADH) katalysiert. Es tritt bei Zellzerfall aus der Zelle aus und ist somit ein geeigneter Indikator für Nekrose (Decker et al., 1988). Die Messung der LDH-Aktivität erfolgt photometrisch (Hitachi U-3210, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) bei 340 nm als Funktion der Konzentrationsabnahme von Nikotinadenin-dinukleotid (NADH).

In 24-Well-Platten ausplattierte Zellen wurden bei Erreichen von 70-80% Konfluenz mit den COMP-Varianten transduziert. Nach Ablauf von fünf Tagen wurden mindestens 200 μl vom Zellkulturüberstand in spezielle Hitachi-Probengefäße überführt und im Zentrallabor der Universitätskliniken des Saarlandes zur Untersuchung abgegeben.

2.2.6.4 Terminal Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL)

Der TUNEL-Test erlaubt die Detektion von apoptotischen Zellen in einer Zellpopulation. Der Test macht die bei der Apoptose ausgelöste Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen durch Markierung freier 3'-OH-Enden von Einzelsträngen genomischer DNA sichtbar. Hierbei hängt das Enzym terminale Desoxyribosyl-Transferase (TdT) fluoreszenzmarkierte dNTP-Nukleotide an die freien 3'-Enden an, welche dann mikroskopisch detektiert werden können (Heatwole, 1999).

Zellen in Monolayerkultur in 96-Well-Platten (3×10^4 /Well) wurden hierfür mit 100 MOI des jeweiligen adenoviralen COMP-Konstrukts infiziert und fünf Tage lang bei

37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Versuchsdurchführung erfolgte mittels eines In Situ Cell Death Detection Kit AP (Roche, Mannheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Die Analyse wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Die Excitationswellenlänge betrug 450-500 nm und die Detektion erfolgte bei 515-565 nm. Die fluoreszierenden Markierungen der DNA-Stränge wurden für alle Wells ausgezählt. Ergänzend wurden sowohl im Hellfeld als auch im UV-Bereich digitale Photographien angefertigt, auf denen ebenfalls die markierten Stränge ausgezählt wurden. Bei beiden Auswertungsmethoden wurde auf eine weitgehend gleiche Zelldichte des betrachteten Ausschnittes geachtet, um vergleichbare Resultate zu erhalten.

2.2.6.5 Annexin-V-FITC

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie (siehe Abschnitt 2.2.8) wurde mittels eines Annexin-V-Assays die Apoptoserate von Zellpopulationen bestimmt. Annexin V ist ein Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-gekoppelter, Ca²⁺-abhängiger Antikörper gegen Phosphatidylserin, welches im Normalzustande der Zelle auf der Innenseite der Zellmembran lokalisiert ist. Wird nun der apoptotische Prozeß initiiert, werden Phosphatidylserinmoleküle auf die Außenseite der Zellmembran transloziert, so dass Annexin V an sie binden kann (Vermees et al., 1995). Im Gegensatz zur Anfärbung apoptotischer Zellen durch Annexin-FITC können nekrotische Zellen durch Propidiumiodid (PI) angefärbt werden, welches leicht durch die bei Nekrose durchlässig werdende Zellmembran in den Zellkern hinein gelangen kann. Im FACS sind FITC-positive, also apoptotische, Zellen von nekrotischen durch deren Propidiumiodid (PI)-Positivität abgrenzbar. Dieses Prinzip wurde zur Detektion und Quantifizierung von apoptotischen Zellen in einer Population benutzt.

Nicht behandelte und mit 50 MOI des jeweiligen adenoviralen COMP-Vektors infizierte Zellen wurden mit dem Human Annexin-V-FITC Kit (Bender MedSystems, Wien, Österreich) nach Angaben des Herstellers gefärbt und im FACS gemessen. Als Positivkontrolle wurden mit SNP 2 mM für Apoptose sowie 5 mM für Nekrose über Nacht behandelte Zellen eingesetzt (Kim et al. 2002; Kühn et al., 2003; Relic et al., 2001; Relic et al., 2002). Unmittelbar vor der Messung am FACS (BD Biosciences, San Jose, USA) wurden 10 µl (1 mg/ml) Propidiumiodid hinzupipettiert.

Die Proben wurden dann bei 488 nm sowie 635 nm gemessen und mit Hilfe der Cell Quest Pro-Software (BD Biosciences) ausgewertet.

2.2.7 Mikroskopie

2.2.7.1 Doppel-Immunfluoreszenz

Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen an Zellen in Monolayerkulturen wurden zur Lokalisation bestimmter Zellbestandteile und Proteine durchgeführt. Eine positive Doppelfärbung, welche als gelbes Signal bei Überlagerung der roten (Cy2) und grünen (Alexa 488) Einzelsignale der Sekundärantikörper sichtbar wurde, ließ auf eine Co-Lokalisation schließen. Die Färbungen wurden mit spezifischen Primärantikörpern und entsprechenden sekundären Detektionsantikörpern durchgeführt. Die eingesetzten Verdünnungen sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Zur Analyse der Doppel-Immunfluoreszenzen wurde ein Mikroskop mit UV-Laser benutzt (Leica DM IRB Fluoreszenzmikroskop, Leica, Wetzlar, Deutschland). Zur Detektion der Fluorochrome Alexa 488 (Absorption bei 495 nm, Emission bei 520 nm) und Cy 3 (Absorption bei 553 nm, Emission bei 575 nm) wurden entsprechende Filter verwendet.

Die Zellen wurden in 8-Kammer-Chamberslides ausplattiert ($2-3 \times 10^4$ Zellen pro Kammer) und nach Adhärenz transduziert. Je nach Fragestellung wurde die Immunfluoreszenzfärbung nach fünf oder sieben Tagen vorgenommen. Die Zellen wurden hierzu zweimal mit PBS gewaschen und für 10 Minuten in 2% Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Danach wurden sie drei Mal mit PBS gewaschen und, wenn für intrazelluläre Färbungen zur Permeabilisierung der Zellmembran erforderlich, für 5 Minuten mit Triton X-100 0,2% in PBS behandelt. Es folgten erneut drei Waschschriffe mit PBS, worauf mit 5% BSA in PBS eine Stunde lang inkubiert wurde, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Primärantikörper (siehe Tabelle 2.1, Abschnitt 2.1.4) wurden in 5% BSA in PBS verdünnt und über 90 Minuten bei Raumtemperatur mit den Zellen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die ebenfalls in 5% BSA in PBS verdünnten Sekundärantikörper aufgebracht und für eine Stunde unter Lichtausschluss inkubiert.

Anschließend wurde erneut zweimal mit PBS gewaschen und eine Kernfärbung mit DAPI 1:5000 in Methanol vorgenommen. Danach wurden die Kammern vom Objektträger abgenommen, die Silikondichtungen entfernt, ein Tropfen DAKO Mounting Medium (15 mM NaN₃) pro Kammer aufgebracht und ein Deckglas 24 x 50 mm (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgelegt. Nach Trocknung des Mounting Medium in einer lichtdichten Schachtel erfolgte die Auswertung an einem Leica DM IRB Fluoreszenzmikroskop und mittels der Leica IM 1000-Software (Leica, Wetzlar, Deutschland).

2.2.7.2 Histochemie

Kryoeinbettung und Gefrierschnitttechnik

Der aus bovinen Tenozyten bestehende Zellrasen in 6-Well-Platten wurde zweimal mit PBS gewaschen, in Tissue-Tek-Einbettmedium (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande) verbracht und auf flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Die in Tissue-Tek eingebetteten bovinen Tenozyten wurden mittels eines Kryostats (CM 3050 S, Leica, Wetzlar, Deutschland) bei -20 °C geschnitten, wobei die Schnittdicke 15 µm betrug. Nach Lufttrocknung erfolgte die Fixierung für 10 Minuten in eiskaltem Aceton (bei -20 °C).

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die HE-Färbung wurde als histologische Standardfärbung zur Beurteilung der Zell- und Gewebemorphologie verwendet. Hämatoxylin ist ein bei niedrigem pH positiv geladener Farbstoff, der negativ geladene Zellbestandteile blau anfärbt (DNA oder RNA). Eosin als negativ geladene Substanz wird zur Gegenfärbung verwendet, welche die übrigen Zellbestandteile in verschiedenen Intensitäten rot färbt.

Die Kryoschnitte wurden zuerst für zehn Minuten in Hämatoxylin getaucht, dann kurz in deionisiertem Wasser gewaschen, für weitere zehn Minuten in Eosin inkubiert und erneut in deionisiertem Wasser gewaschen. Die Entwässerung erfolgte mittels Ethanol-Reihe, bei der die Schnitte nacheinander für jeweils fünf Minuten in 50%,

70%, 96% und 100% Ethanol getaucht wurden. Anschließend wurden die Schnitte in Xylol getaucht und mittels Entellan Neu (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckelt.

Immunohistochemische AEC-Färbung

Die Präparate wurden in PBS hydriert und zum Blockieren der Gewebe-eigenen Peroxidase-Aktivität über 30 min in 1% H₂O₂ in Methanol inkubiert. Es folgte die Blockade unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation in 1% BSA in PBS bei Raumtemperatur für eine Stunde. Danach wurde der Primärantikörper in 1% BSA in PBS verdünnt aufpipettiert und 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (siehe Tabelle 2.1, Abschnitt 2.1.4). Nach dreimaligem Waschen in PBS schloß sich eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur des Sekundärantikörpers, verdünnt in 1% BSA in PBS, an. Nach der Inkubation wurde wiederum dreimal in PBS gewaschen und die AEC-Färbelösung (siehe Abschnitt 2.1.2) für 30 Minuten bei Raumtemperatur zugegeben. Danach folgten zwei weitere Waschschrte in PBS und die Eindeckelung in Aqua Tex (Merck).

2.2.7.3 Elektronenmikroskopie und Immunogoldfärbung

Elektronenmikroskopie und Immunogoldfärbung

$3,5 \times 10^5$ bovine Tenozyten wurden acht Wochen nach Gentransfer mit 20 MOI Wildtyp-COMP, D475N-COMP und H587R-COMP ohne Passagierung kultiviert. Die Zellen wurden zur Ernte zweimal mit PBS gewaschen und dann in Glutaraldehydpuffer aufgenommen. Die Proben wurden dann zur Dr. Douglas Keene, Shriners Hospital for Children in Portland, Ohio, USA, gesandt, der freundlicherweise die Immunogoldfärbung sowie die elektronenmikroskopischen Untersuchungen durchführte.

2.2.8 Durchflußzytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)

Bei der Durchflußzytometrie werden fluoreszenzmarkierte Zellen hydrodynamisch fokussiert und an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Nach Anregung durch den monochromatischen Laser emittiert der Fluoreszenzfarbstoff Licht einer bestimmten Wellenlänge, welches durch einen entsprechenden Photodetektor gemessen wird. Über die Lichtbeugung und -streuung werden zusätzliche Informationen über die Zellgröße und die Granularität der Zelle erhalten.

Die Durchflußzytometrie wurde zur Überprüfung der Transduktionseffizienz bei Plasmid-Transfektion und Infektion mit Adenoviren sowie zur Detektion von Apoptose angewandt. Bei Überprüfung der Transduktionseffizienz wurden mit EGFP transduzierte Zellen eingesetzt; bei der Bestimmung der Apoptoserate von Zellpopulationen wurde Annexin-V, ein FITC-gekoppelter Antikörper, verwendet.

3. Ergebnisse

Da die Transduktion genetischen Materials in Form der Plasmid-Transfektion sehr heterogene Transduktionsraten erbrachte, wurde die adenovirale Infektion aufgrund besserer Transduktionseffizienz verwendet (siehe Abschnitt 3.1.4). Die Generierung adenoviraler COMP-Konstrukte wurde in Abschnitt 2.2.3 beschrieben.

3.1. Herstellung der adenoviralen Vektoren

3.1.1 Dokumentation der Kontrollverdaue der einzelnen Konstrukte

Da die Sequenzierung des Adenovirus aufgrund seiner Größe nicht zu bewerkstelligen ist, wurde die Identität der erhaltenen Konstrukte durch mehrere Kontrollverdaue überprüft. Diese Methode ermöglicht auch einen Ausschluß von Rekombinationen innerhalb des Virusgenoms. Bei Verdau mit den Enzymen Bam HI, Hind III und Xho I ergaben sich die in Abbildung 3.1 gezeigten Bandenmuster. Wie erwartet wiesen die verschiedenen COMP-Konstrukte ein identisches Bandenmuster auf. Das 1015 bp-Fragment nach Hind III-Verdau liegt innerhalb des COMP-Gens und dient somit als Nachweis des COMP-Gens im Konstrukt.

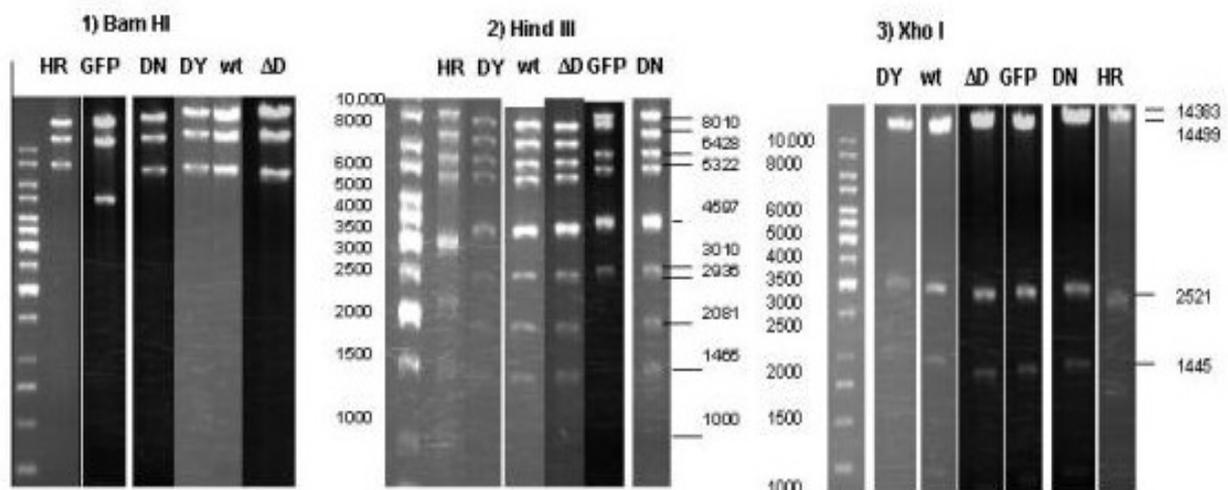


Abbildung 3.1 **Kontrollverdaue der einzelnen adenoviralen Konstrukte mit Bam HI, Hind III und Xho I**

Die einzelnen adenoviralen Konstrukte wurden mit Bam HI, Hind III und Xho I verdaut. Das Bandenmuster ist für die verschiedenen COMP-Konstrukte gleich. Für das EGFP-Konstrukt ergaben sich ebenfalls die erwarteten Fragmente.

Abbildung 3.2 zeigt mutationsspezifische Schnitte innerhalb des Inserts, wobei das Wildtyp-COMP-Konstrukt jeweils mit den anderen Konstrukten wurde und hierbei die erwarteten Unterschiede zu erkennen sind. Die Mutations-spezifische Schnittstelle wurde bei der Klonierung der Konstrukte eingefügt (Spitznagel et al., 2004; Thur et al., 2001).

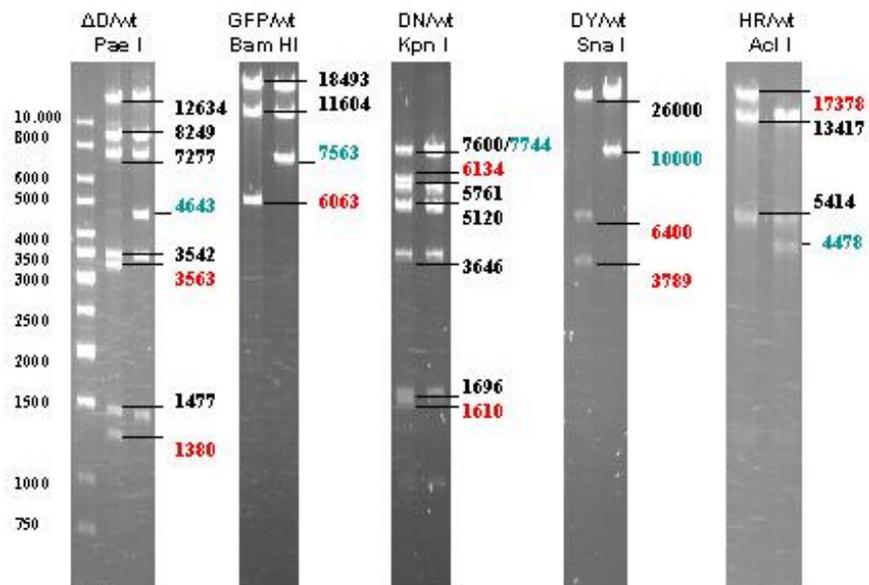


Abbildung 3.2 **Kontrollverdau der einzelnen adenoviralen Konstrukte im Vergleich mit Wildtyp-COMP**

Mit den einzelnen adenoviralen Konstrukten wurden Kontrollverdau durchgeführt, um deren Identität zu gewährleisten. Hierbei kamen Enzyme gegen Schnittstellen zum Einsatz, die anlässlich der Mutagenese eingefügt oder zerstört worden waren. Gemeinsame Banden sind mit schwarzen Zahlen zur Laufhöhenangabe bezeichnet, Wildtyp-charakteristische mit blauen Zahlen. Die für das jeweilige Konstrukt charakteristischen Banden sind mit roten Zahlen gekennzeichnet.

Beim Verdau mit Pae I (Wildtyp- gegen D469Δ-COMP) zeigen sich unterschiedliche Fragmente bei 4643 bp (nur Wildtyp) und 3563 bp sowie 1380 bp (nur D469Δ). Der Verdau mit Kpn I (Wildtyp- gegen D475N-COMP) zeigt eine Wildtyp-spezifische Bande bei 7744 bp und D475N-spezifische Banden bei 6134 bp sowie 1610 bp. Die COMP-Konstrukte D361Y und Wildtyp wurden mit Sna I verdaut. Die für Wildtyp-COMP spezifische Bande läuft bei 10000 bp, die für D361Y-COMP charakteristische Banden bei 6400 bp bzw. 3789 bp. Der Verdau der COMP-Konstrukte H587R gegen Wildtyp erbrachte eine für H587R spezifische Bande bei 17378 bp und eine für Wildtyp spezifische Bande bei 4478 bp. Die übrigen Fragmente waren wie erwartet

gleicher Größe. Die für EGFP charakteristische Bande nach Verdau mit Bam H I liegt bei 6063 bp, die für Wildtyp-COMP spezifische bei 7563 bp.

3.1.2 Dokumentation der Virusproduktion

Die Virusproduktion in der Verpackungszelllinie QBI 293 wurde durch Beobachtung der EGFP-Produktion nach Transfektion des entsprechenden adenoviralen Plasmids nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop bei 450 nm. Am zweiten Tag nach Infektion sind vereinzelt EGFP-positive Zellen zu erkennen, welche im weiteren Verlauf an Zahl zunehmen. Nach neun Tagen ist ein großer Teil der Gesamtpopulation EGFP-positiv (siehe Abb. 3.3).

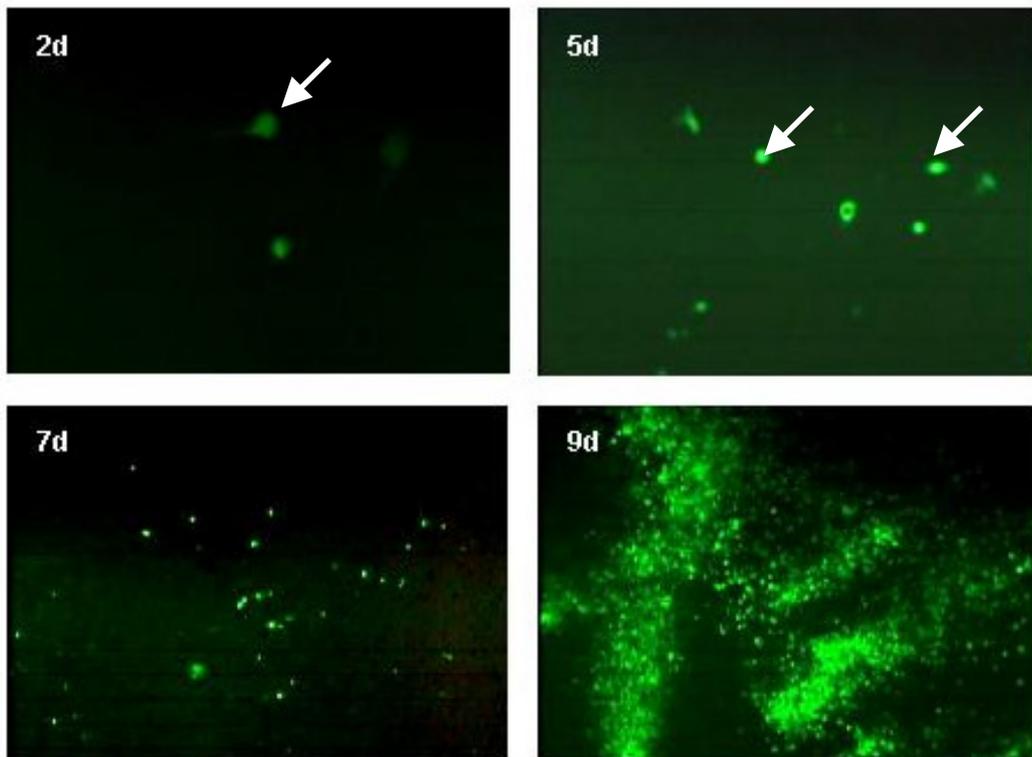


Abbildung 3.3 **Dokumentation der Virusproduktion in QBI 293-Zellen nach Transduktion mit pAD/EGFP**

QBI 293-Zellen wurden mit pAd-EGFP transfiziert und die Virusproduktion über einen Zeitraum von neun Tagen dokumentiert. Die Dokumentation erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie bei 450 nm und 20facher (oben) bzw. 10facher (unten) Vergrößerung. Am zweiten Tag nach Infektion sind vereinzelt EGFP-positive Zellen zu erkennen (weiße Pfeile). Bis zum siebten Tag steigt deren Zahl langsam an und am neunten Tag ist ein beträchtlicher Teil der Population EGFP-positiv.

3.1.3 Titerbestimmung

Um mit den adenoviralen COMP-Konstrukten arbeiten zu können, wurde die Menge an viralen Partikeln pro Volumeneinheit bestimmt. Dieser Parameter ist von zentraler Bedeutung, da die Durchführung der Experimente eine genaue Kenntnis der zur Infektion eingesetzten viralen Mengen voraussetzt, ohne die eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht gewährleistet ist. Zur Bestimmung des viralen Titers werden zwei verschiedene Methoden verwendet: Der Test auf Plaque Forming Units (PFU) und der Tissue Culture Infectious Dose 50-Test (TCID 50).

TCID 50-Test

Der TCID 50-Test arbeitet mit Verdünnungen des Virus-Stocks. Hierfür werden meist Verdünnungen von 10^{-3} bis 10^{-10} oder - bei höherem Titer - von 10^{-7} bis 10^{-14} verwendet. Abbildung 3.4 zeigt die Auswertung eines auf CPE untersuchten TCID 50 des Konstruktes D469Δ.

TCID 50 Konstrukt: ΔD Titer: 6×10^{11} / ml

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
-7 A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
-8 B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
-9 C	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
-10 D	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
-11 E	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
-12 F	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
-13 G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
-14 H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbildung 3.4 **Ergebnisse eines TCID 50-Tests**

Zur Bestimmung des viralen Titers wurden QBI 293-Zellen in 96-Well-Platten in einer Dichte von 1×10^4 Zellen pro Well ausplattiert. Danach wurden die Zellen mit Virus-Verdünnungen von 10^{-7} bis 10^{-14} (linke Spalte) infiziert. Die Kulturdauer betrug zehn Tage, worauf sich die Untersuchung der Platten auf CPE anschloß. Hier ist die Auswertung zweier Versuchsansätze dokumentiert. „+“ steht für Anwesenheit eines CPE, „-“ für Abwesenheit von CPE. Der gezeigte Test ist valide, da die nicht

infizierten Zellen (rechte beiden Reihen) keinen CPE, die niedrigste Verdünnungsstufe kompletten CPE und die nächste Verdünnungsstufe keinen CPE aufweist. Der virale Titer wurde aus der Verdünnungsstufe sowie den Summen der Verhältnisse CPE/keinCPE jeder Verdünnungsstufe berechnet.

Test auf plaque forming units (PFU)

Mit adenoviraler DNA transduzierte QBI 293 Zellen setzen durch zytopathischen Effekt adenovirale Partikel frei. Durch Abdeckung des Zellrasens mit Agarose wird die freie Diffusion der Viren verhindert, welche somit nur die Nachbarzelle infizieren können. Dadurch kommt die Plaquebildung zustande, die für die Titerberechnung genutzt wird. Abbildung 3.5 zeigt ein Beispiel einer solchen Plaquebildung.

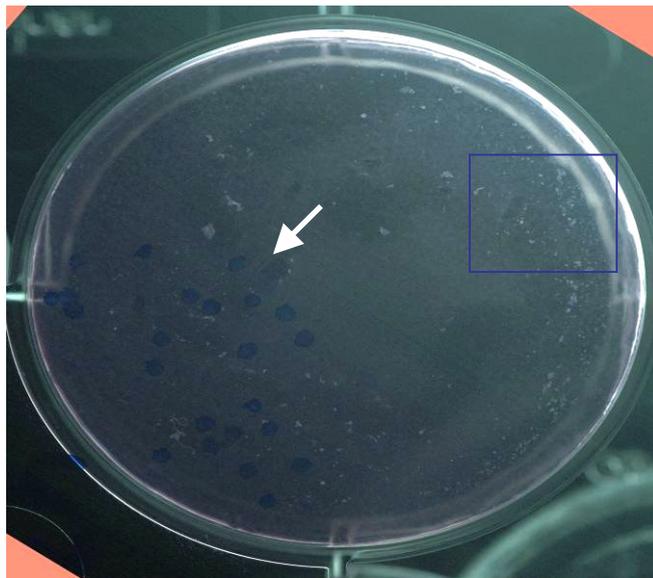


Abbildung 3.5 **Test auf Plaque Forming Units (PFU)**

Je $2,5 \times 10^6$ QBI 293-Zellen wurden in Petrischalen ausplattiert und nach 24 Stunden mit verschiedenen Verdünnungen der viralen Stammlösung infiziert. Zwei Stunden nach Infektion wurden die Kulturen mit Agarose überschichtet und zwei Wochen kultiviert. Nach Ablauf dieser Zeit waren, abhängig von der Verdünnungsstufe, Löcher im Zellrasen sichtbar (blaues Rechteck, weißer Pfeil), die gezählt werden konnten und in Verbindung mit der Verdünnungsstufe den viralen Titer des jeweiligen Konstruktes ergaben.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Titerbestimmung

Die Tabelle 3.1 faßt die Ergebnisse der Titerbestimmung mittels PFU als auch des TCID 50 für alle Konstrukte zusammen. Danach wurde eine weitere Anpassung durch Southern Blotting vorgenommen, welche von Dr. Robert Dinser durchgeführt wurde (Dinser et al., 2002; Kreppel et al., 2002). Die schließlich für die Versuche genutzten Titer wurden über die Proteinexpression nach Markierung mit ³⁵S-Methionin überprüft.

Konstrukt	TCID50 (VP/ml)	Pfu (pfu/ml)	TCID50 /pfu	Genutzter Titer (VP/ml)
wt	~10 ¹² 8*10 ¹⁰ 1,5*10 ¹¹	2,5*10 ¹⁰ 10 ¹⁰	7	2*10 ¹⁰
AD	>10 ¹² 6*10 ¹¹ 6*10 ¹¹	2*10 ⁹ 5,5*10 ⁹	160	1*10 ¹⁰
DN	2*10 ⁹ 2,5*10 ⁹ 1,5*10 ⁹ 4*10 ⁹	3*10 ⁸ 2*10 ⁸ 3*10 ⁸	8	1,5*10 ⁹ Neue Charge
HR	>10 ¹² 8*10 ¹³ 5*10 ¹³	2*10 ¹¹ 10 ¹¹	382	2*10 ¹¹
DY	1,5*10 ¹⁰ 4*10 ¹⁰ 1,5*10 ¹⁰	3,5*10 ⁹ 10 ⁹	12	2*10 ⁹
GFP	~10 ¹² 2*10 ¹¹ 5*10 ¹⁰	10 ⁹ 2*10 ⁹	83	2*10 ⁹

Tab. 3.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Virustiterbestimmung

Die Ergebnisse der Virustiterbestimmung mit unterschiedlichen Methoden sind in dieser Tabelle zusammengefaßt. Es wurden mehrere Versuche zur Titerbestimmung mittels TCID 50-Test und PFU-Test durchgeführt. Der genutzte Titer ergibt sich aus den Ergebnissen dieser Berechnungen und nach Anpassung durch Southern Blotting.

3.1.4 Testinfektion von bovinen Chondrozyten

Überprüfung der COMP-Produktion

Um die Expression der verschiedenen COMP-Konstrukte in bovinen Chondrozyten zu überprüfen, wurden jeweils 5 x 10⁵ Zellen mit je 20 MOI des adenoviralen Konstruktes infiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen mit (³⁵S) Methionin markiert.

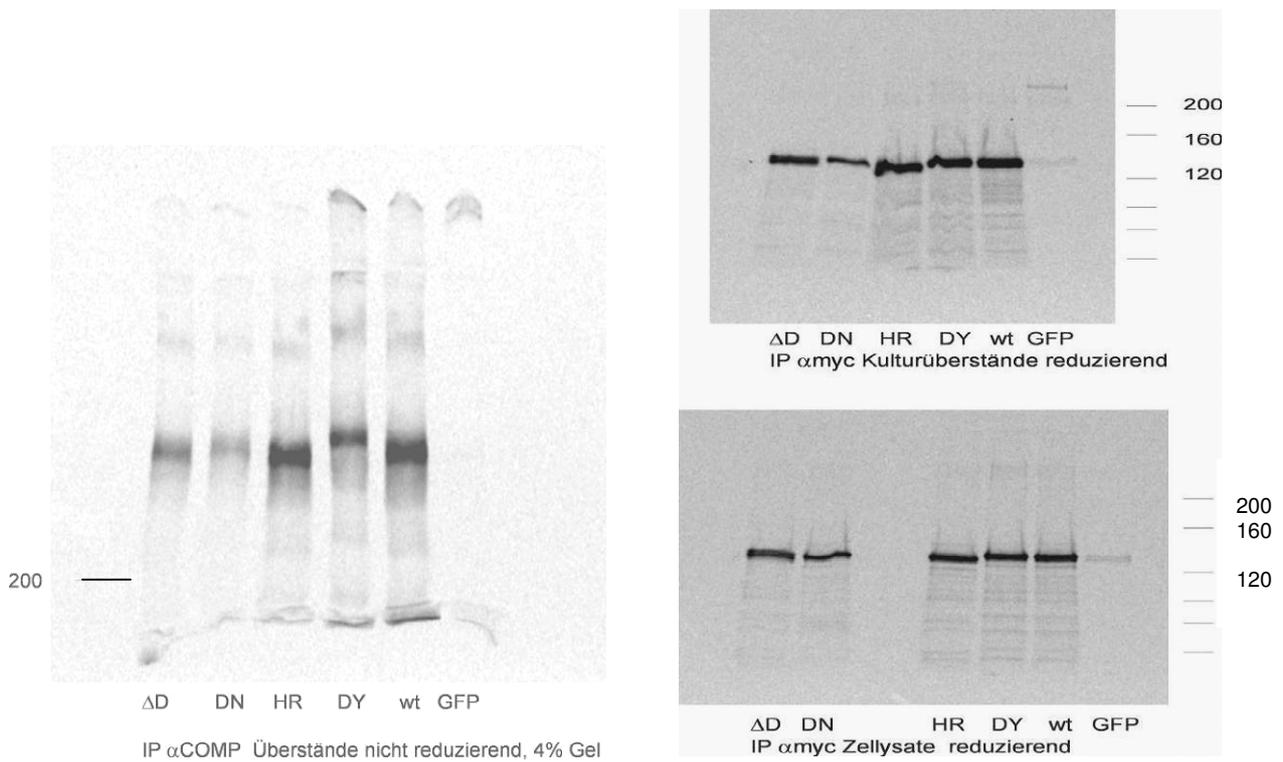


Abbildung 3.6 **Bovine Chondrozyten exprimieren c-myc-getaggte adenvirale COMP-Konstrukte nach Infektion**

Um die Expression von COMP nach Transduktion mit 20 MOI adenviraler COMP-Konstrukte zu überprüfen, wurde ein Pulse-Chase-Experiment durchgeführt. Die Ernte erfolgte 72 Stunden nach Infektion drei Stunden nach einer einstündigen Inkubation mit ^{35}S -Methionin. Eine Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen c-myc wurde mit Zellysaten sowie Zellkulturüberständen durchgeführt und die Proben unter nicht-reduzierenden sowie reduzierenden Bedingungen einer SDS-Gelelektrophorese und anschließenden Auswertung im Phospho Imager unterzogen. Alle Proben zeigen eine deutliche c-myc-COMP-Expression. Der genutzte Titer des D475N-Konstruktes wurde danach nochmals korrigiert, um die gleiche Transduktionseffizienz zu erreichen.

Es erfolgte eine Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen c-myc. Die Proben wurden einer SDS-Gelelektrophorese unter reduzierenden sowie nicht reduzierenden Bedingungen unterworfen. Die Auswertung der Gele mittels Phospho Imager ergab eine deutliche c-myc-Expression bei allen infizierten Populationen (siehe Abb. 3.6). Das bei etwa 130 kD im reduzierenden 6%igen Gel laufende COMP-Protein wurde bei allen Populationen identifiziert. Mittels Elektrophorese unter nicht-reduzierenden Bedingungen konnte die Pentamerisierung der COMP-Proteine nachgewiesen werden.

Vergleich der Effektivität von Plasmid-Transfektion und Virus-Infektion von bovinen Chondrozyten

Um die Effizienz von Plasmidtransfektion und Virusinfektion miteinander zu vergleichen, wurden je $2,5 \times 10^5$ bovine Chondrozyten mit EGFP-Plasmidvektoren transfiziert und parallel mit EGFP-Adenoviren transduziert. Abbildung 3.7 zeigt die Resultate dieses Versuchs, wobei zu erkennen ist, dass die Effizienz der Transduktion bei Verwendung des Virus sehr viel höher ist als bei Transfektion mittels eines Plasmids.

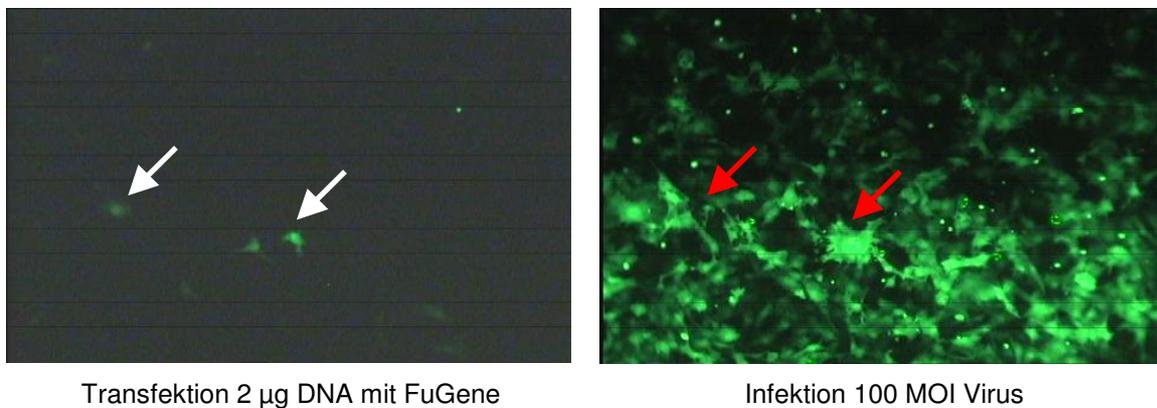


Abbildung 3.7 **Vergleich der Effektivität von Plasmid-Transfektion und Virus-Infektion in bovinen Chondrozyten**

Die Effektivität der beiden Transduktionsmethoden wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie verglichen. Bei Transfektion mit FuGene und 2 µg Plasmid-DNA sind bei UV-Belichtung nur wenige EGFP-exprimierende Zellen zu erkennen (weiße Pfeile), während bei Transduktion mit 100 MOI Virus zahlreiche EGFP-positive Zellen beobachtbar sind (rote Pfeile).

3.1.5 Ausschluss der Replikationsfähigkeit des verwendeten Adenovirus

Die Replikationsfähigkeit der adenoviralen Konstrukte durfte nur in der Verpackungszelllinie QBI 293 gegeben sein. Sie sollte nicht bei bovinen Chondrozyten auftreten. Daher wurden bovine Chondrozyten mit 20 MOI des EGFP-Virus sowie der COMP-kodierenden Adenoviren infiziert und vier Wochen lang in Kultur gehalten. Die Auswertung erfolgte am konventionellen Mikroskop. In Abbildung 3.8 ist eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung bei 450 nm zur Detektion der

EGFP-Expression sowie im Phasenkontrast zur Sichtbarmachung der Primärzellen dargestellt.

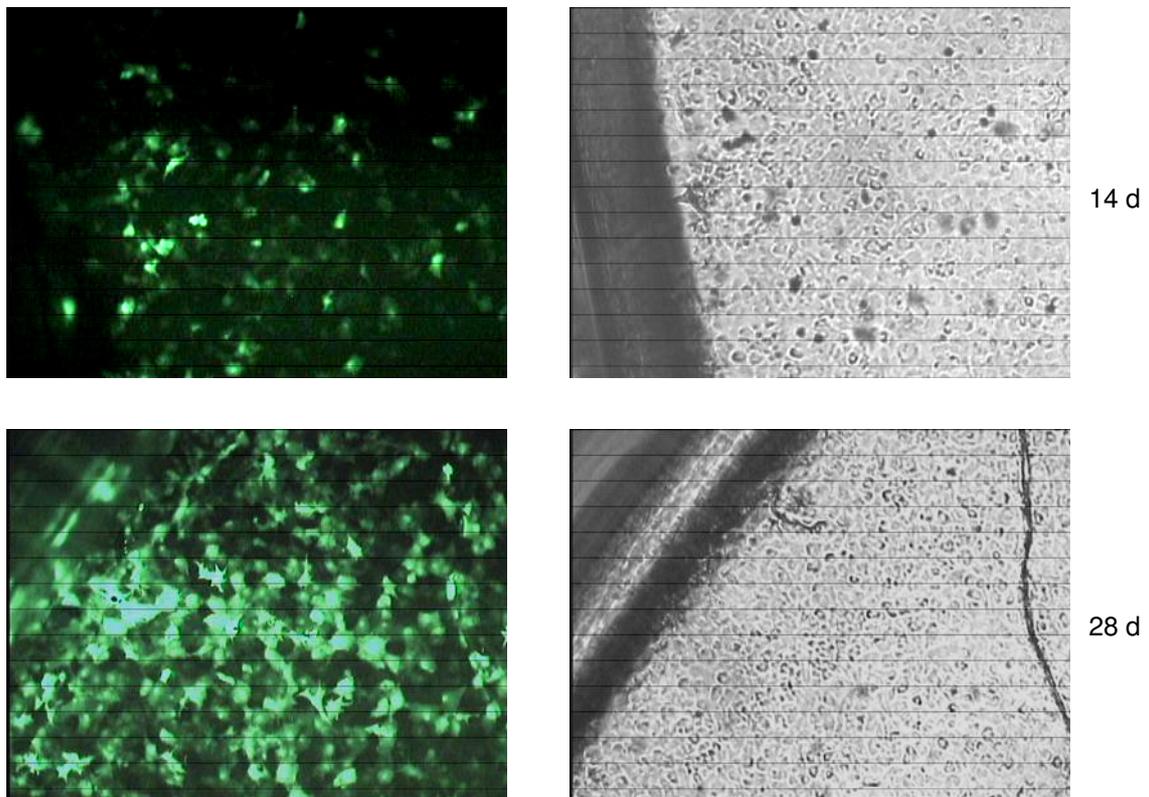


Abbildung 3.8 Die generierten viralen Konstrukte sind nicht replikationsfähig

Zum Ausschluß der Replikationsfähigkeit des Virus in anderen Zellen als QBI 293 wurden 3×10^5 bovine Chondrozyten mit einem adenoviralen EGFP-Konstrukt mit einer Menge von 20 MOI infiziert und vier Wochen lang in Kultur gehalten. Es waren nach diesem Zeitraum keine zytopathischen Effekte sichtbar bei gleichzeitiger deutlicher Proteinexpression (Vergrößerung 10fach).

Die Untersuchung ergab eine deutliche EGFP-Expression (linke Seite, grün) nach zwei Wochen und keine zytopathischen Effekte im Phasenkontrast (rechte Seite). Nach vier Wochen fiel das EGFP-Signal über Akkumulation wesentlich stärker als nach zwei Wochen aus, aber auch hier ließ sich definitiv kein zytopathischer Effekt ausmachen. Nach Infektion von Chondrozyten mit den COMP-kodierenden Adenoviren ließ sich ebenfalls kein CPE beobachten. Somit konnte die Feststellung getroffen werden, dass die hier hergestellten Viren keine eigenständige Replikationsfähigkeit aufweisen.

3.2 Untersuchungen an bovinen Tenozyten

3.2.1 Zellisolation und Charakterisierung

Bovine Tenozyten wurden aus Sehnen des Schultergelenkes mittels einer Variation der Explant-Culture-Methode von Wong et al., 2003 isoliert (siehe Abschnitt 2.2.1.1). Bis genügend Zellen ausgewachsen waren, vergingen bis zu vier Wochen (siehe Abbildung 3.9). Die bis zu einer Konfluenz von 70% ausgewachsenen Zellen wurden trypsinisiert und in Kultur genommen. Die Tenozyten wurden in Monolayer-Kultur gehalten und bei Erreichen von 75% Konfluenz gesplittet. Alle Experimente wurden innerhalb der ersten fünf Passagen durchgeführt.

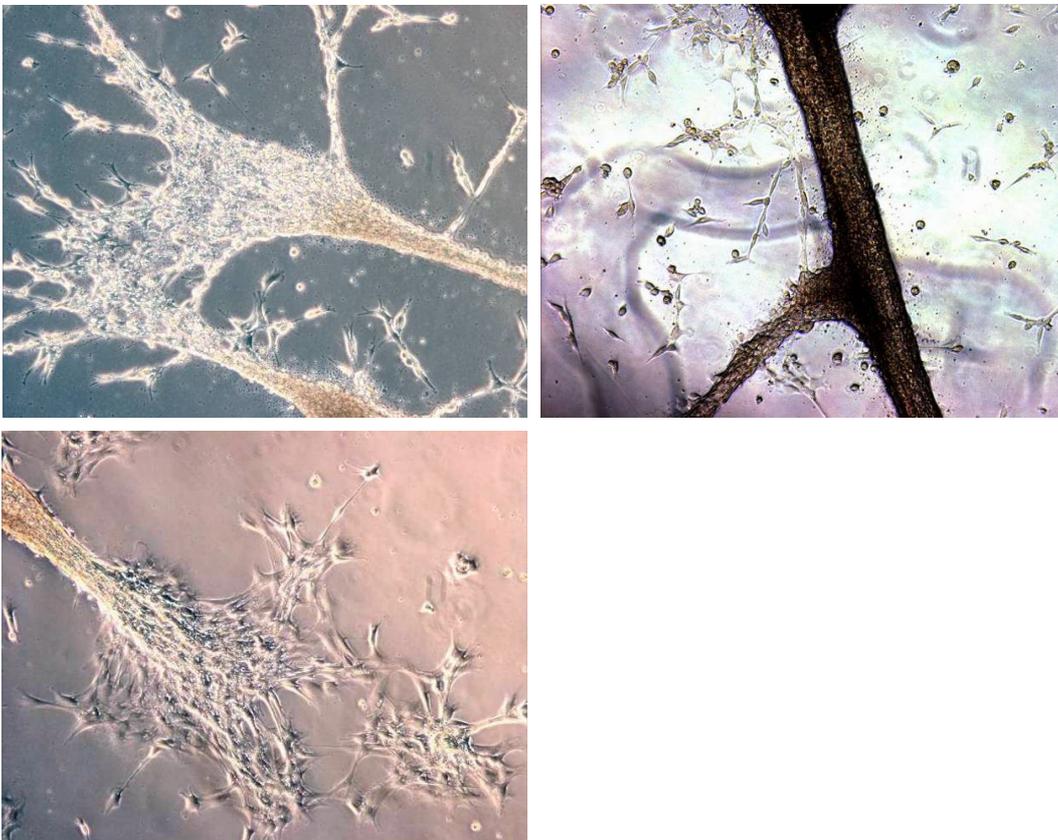


Abbildung 3.9 **Isolation von bovinen Tenozyten mittels Explant-Kultur**

Die bovinen Tenozyten wurden isoliert, indem vom Schultergelenk abpräparierte Sehnenstücke in Ethanol gewaschen und auf einer Petrischale in Kompletmedium platziert wurden. Nach etwa 4 Wochen waren genügend Zellen für die entsprechenden Versuche ausgewachsen. Die Abbildungen zeigen auswachsende Zellen in 10facher Vergrößerung.

Die Charakterisierung des Sehnen-Phänotyps der ausgewachsenen Zellen erfolgte mittels PCR-Nachweis von Scleraxis, Kollagen II, Kollagen I und COMP. Scleraxis

wird wie COMP schwächer exprimiert als Kollagen I oder GAPDH; eine Expression von Kollagen II dient als Negativkontrolle (siehe Abb. 3.10 a).

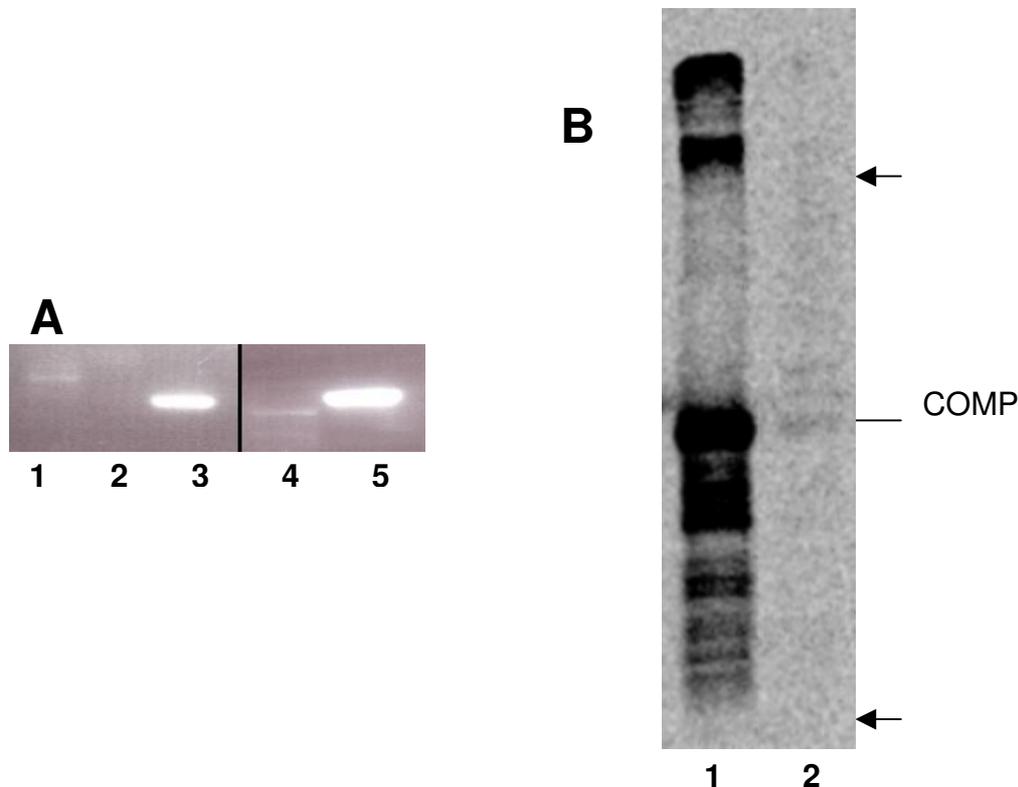


Abbildung 3.10 Charakterisierung des Phänotyps boviner Tenozyten

(a) Expression von Markergenen mittels RT-PCR: Scleraxis (1), Kollagen II (Negativkontrolle, 2), Kollagen I (3), COMP (4) und GAPDH (5).

(b) COMP-Expression bei bovinen Tenozyten: Die Expression von COMP wurde bei Zellen, welche mit 20 MOI des Wildtyp-COMP-Adenovirus transduziert wurden (1) sowie unbehandelten Kontrollzellen (2) mittels Pulse-Chase-Experimenten untersucht. Danach erfolgte eine Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen COMP und die Auftragung auf ein SDS-Gel zur Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen. Die Pfeile zeigen den Ursprung und die Lauffront des Trenngeles, die Linie markiert die Position von COMP. Man sieht eine deutliche Überexpression von exogenem versus endogenem COMP.

Die COMP-Expression wurde durch Pulse-Chase-Experimente mit ^{35}S -markiertem Methionin überprüft. Dazu wurden Tenozyten nach Transduktion mit 20 MOI des Wildtyp-COMP Virus (1) und unbehandelte Tenozyten (2) verwendet. COMP ist in beiden Proben nachweisbar, wobei zu beobachten ist, dass native Tenozyten COMP nur in schwachem Ausmaß exprimieren, deutlich geringer als in Chondrozyten zu beobachten ist (siehe Abb. 3.10 b). Das Ausmaß der Überexpression wird in Abschnitt 3.2.3.2 näher betrachtet. Nach Quantifikation der Signalintensität der COMP-Bande mittels Phospho Imager lag die Expression von exogenem, mittels

adenoviraler Transduktion induziertem COMP in diesem Fall um den Faktor 60 über der Expression von endogenem COMP.

3.2.2 Optimierung des Gentransfers

Um Versuche mit den unterschiedlichen COMP-Varianten durchführen zu können, mußte genetisches Material in die bovinen Tenozyten eingebracht werden. Eine anfangs verwendete Plasmidtransfektion der einzelnen COMP-Varianten erbrachte jedoch sehr geringe Transfektionsraten von höchstens 5% der Zellen (siehe Abb. 3.11).

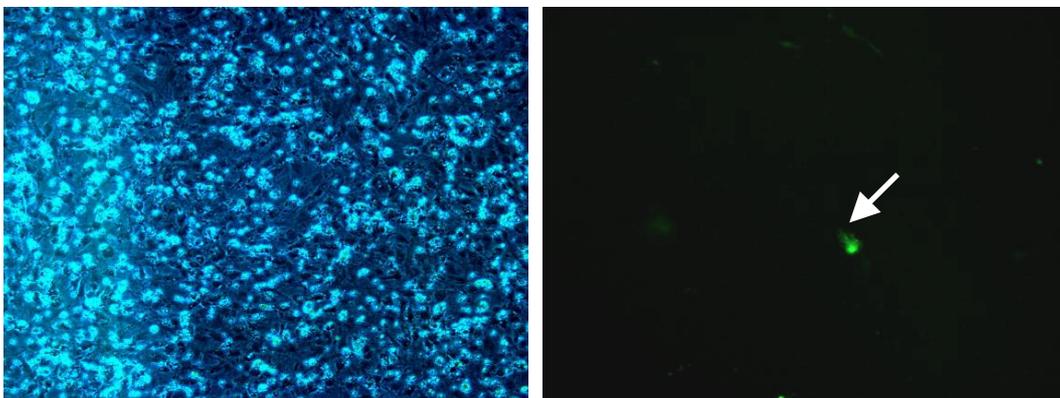


Abbildung 3.11 **Transfektionseffizienz mit Plasmid-GFP bei bovinen Tenozyten**

Bovine Tenozyten wurden mit dem pRc/CMV-EGFP Plasmid und FuGene mit geringem Erfolg transfiziert (nicht über 5% der Zellen). Die Fotos zeigen Tenozyten zwei Tage nach Transfektion, wobei im rechten Bild zu erkennen ist, dass bei Anregung im UV-Licht von 450 nm Wellenlänge nur sehr wenige Zellen leuchten. Dies was bedeutet, dass die Anzahl an Zellen, welche das transfizierte Plasmid für EGFP tragen (weißer Pfeil), sehr gering im Vergleich zur Gesamtzellzahl (dargestellt durch die Kernfärbung mit DAPI) im linken Bild ist (Vergrößerung 10fach).

Da die Effizienz von 5% nach Gentransfer bei weitem nicht genügte, um die beabsichtigten Untersuchungen durchzuführen, wurde ein adenoviraler Vektor für jedes COMP-Konstrukt benötigt, mit Hilfe dessen die Transduktionseffizienz gesteigert werden konnte. Diese Vektoren wurden mittels des AdEasy-Vektorsystems von QBiogene generiert. Nachdem diese zu Verfügung standen, wurde im Vorfeld der Versuche die Infektionseffizienz mit dem EGFP-Vektor überprüft. Dazu wurden zwei Populationen von bovinen Tenozyten mit unterschiedlichen Mengen an infektiösen Partikeln infiziert und die Genexpression mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Expression von EGFP läßt sich

dadurch visuell verdeutlichen (Abbildung 3.12). Nach drei Tagen führt eine Infektion mit 10 MOI zu einer schwächeren Expressierung von EGFP als eine Infektion mit 100 MOI bei gleicher Überlebensrate der Zellen.

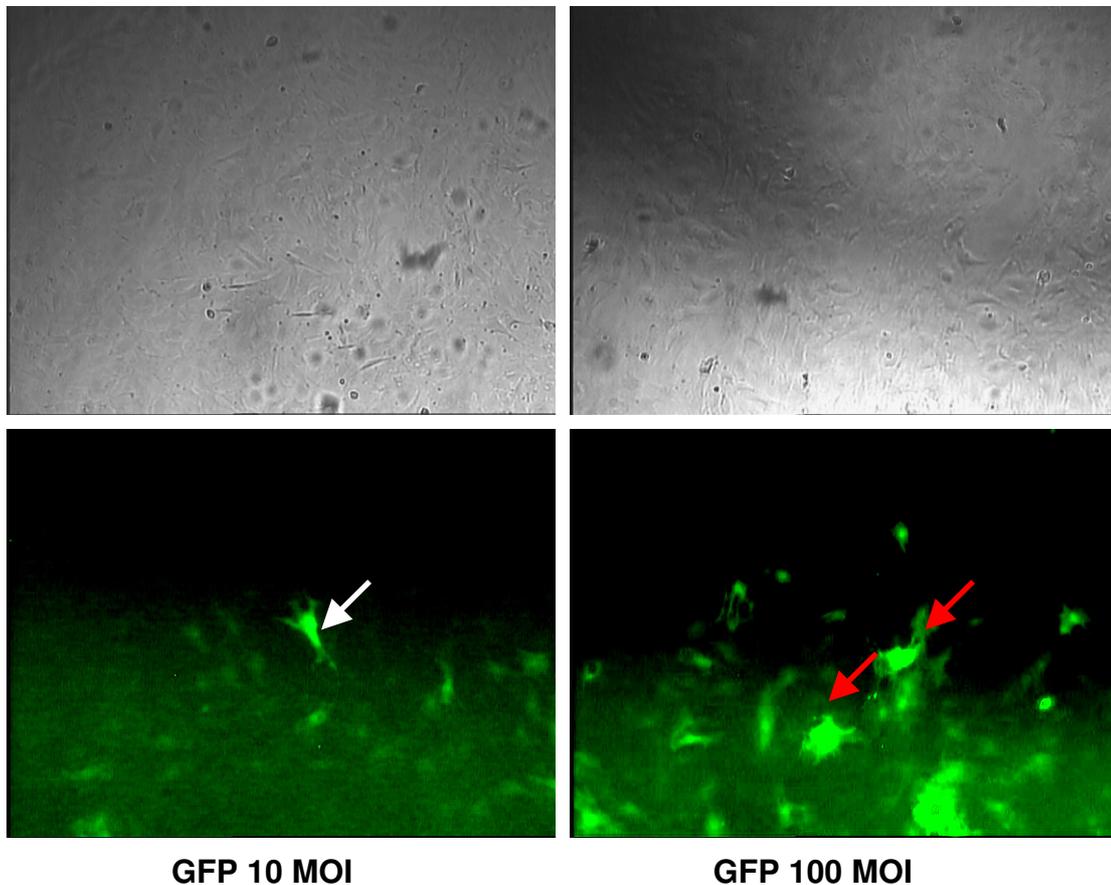


Abbildung 3.12 **Expressionsintensität von EGFP in Abhängigkeit zur Viruspartikelmenge**

Bovine Tenozyten wurden zur Überprüfung der Transduktionseffizienz mit einem adenoviralen GFP-Konstrukt in unterschiedlichen Mengen infiziert, jeweils mit 10 und 100 MOI. Nach drei Tagen weist die mit 100 MOI infizierte Zellpopulation eine deutlich höhere Anzahl an EGFP-positiven Zellen (rote Pfeile) auf als die mit 10 MOI (weißer Pfeil) infizierte Vergleichspopulation. Die unteren Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop bei 40-facher Vergrößerung und einer Anregung bei 450 nm gemacht, die oberen Aufnahmen im Phasenkontrast.

Zur quantitativen Überprüfung der Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie wurden mit unterschiedlichen Mengen an EGFP-Konstrukt infizierte Tenozyten durchflußzytometrisch untersucht. Die erhaltenen Werte lagen weit über den mit Plasmidtransfektion erreichten transduzierten Zellzahlen. Abbildung 3.13a zeigt die Effektivität der Transduktion mit EGFP mit steigenden infektiösen Einheiten (Moiety of Infection, MOI). Bei 5 MOI EGFP-Konstrukt wurde eine Transduktionseffizienz von fast 30% erreicht, das bedeutet, dass nahezu 30% der untersuchten Zellpopulation EGFP exprimierten. 20 MOI EGFP-Konstrukt führten zu etwa 60% Effizienz, während

100 MOI weit über 90% Transduktionseffizienz erreichten bei gleicher Überlebensrate der Zellen.

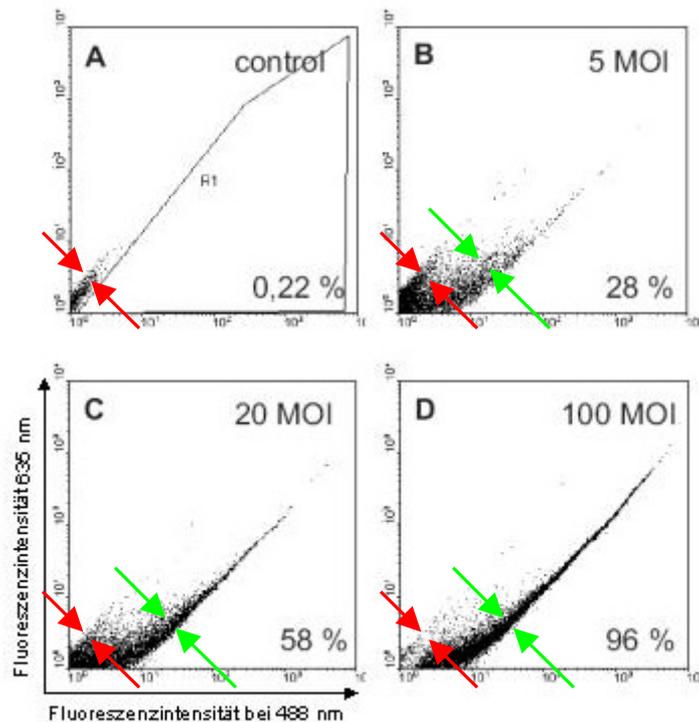


Abbildung 3.13a **Bestimmung der Transduktionseffizienz von bovinen Tenozyten mit steigenden infektiösen Einheiten (Moiety of Infection)**

Die Zellen wurden per Durchflußzytometrie untersucht, um eine Aussage über den Erfolg der Transduktion treffen zu können. Dazu wurden die jeweiligen Zellen adenoviral mit steigenden MOI EGFP-Konstrukt transduziert und im FACS analysiert. Jeder Punkt bezeichnet eine gemessene Zelle nach auf der x-Achse Fluoreszenz bei 488 nm (EGFP) und auf der y-Achse bei 635 nm (nicht markierter Kontrollbereich). (A) zeigt die unbehandelte Kontrolle (rote Pfeile); die Abbildungen (B-D) verdeutlichen, dass die Menge an exprimiertem Transgen je Zelle mit der Menge der infektiösen Partikel ansteigt (grüne Pfeile), was an der Verschiebung der Population im Diagramm nach rechts zu erkennen ist.

Die Effizienz der Transduktion mit steigenden infektiösen Einheiten ist anhand des Kurvendiagramms beobachtbar, die in Abbildung 3.13b dargestellt ist. Die Verschiebung der Kurven bei Infektion mit höheren Virusmengen zeigt, dass bei Infektion mit 500 MOI wie erwartet eine stärkere Expression pro Zelle an EGFP stattfindet als bei Infektion mit 20 MOI. Native Tenozyten stellen die Referenz ohne EGFP-Expression dar (rote Kurve). Die Kurve flacht mit steigenden MOI ab und verschiebt sich zur rechten Seite des Diagrammes, wie bei Infektion mit 5 MOI (schwarze Kurve), 20 MOI (grüne Kurve) und 100 MOI (blaue Kurve) erkennbar ist.

Bei Infektion mit 500 MOI (violette Kurve) ändert sich die Form der Kurve, welche nun kaum mehr Zellen aufweist, die nicht EGFP-positiv sind.

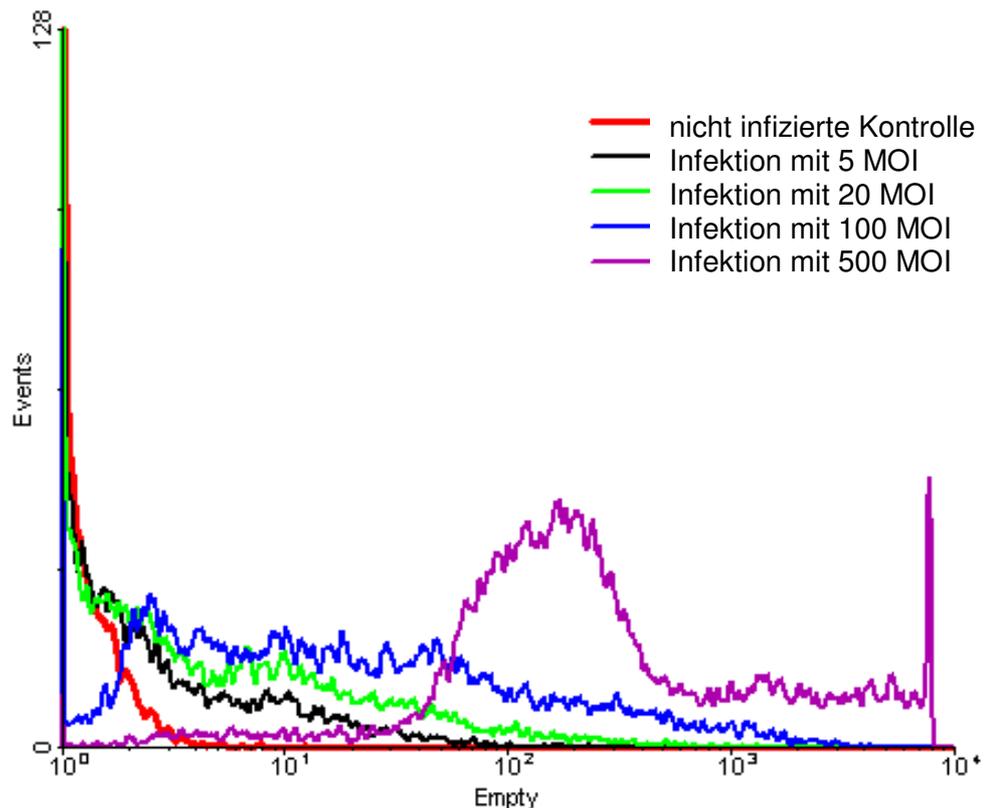


Abbildung 3.13b **Bestimmung der Expressionsintensität von EGFP in Abhängigkeit von der Viruspartikelmenge**

Alternative Darstellung des Ergebnisses von Abbildung 3.16a durch Auftragung der Zahl der Ereignisse (y-Achse) in Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von EGFP. Die Kurven verdeutlichen, dass die Menge an exprimiertem Transgen je einzelne Zelle mit der Menge der infektiösen Partikel ansteigt. Dies kommt durch die Verschiebung der Kurven zur rechten Seite des Diagramms zum Ausdruck. Gleichbedeutend ist dies mit einer Intensitätserhöhung des detektierten Signales.

3.2.3 Sekretionsverhalten von COMP

3.2.3.1 Pulse-Chase

Um einen Einblick in das Sekretionsverhalten von mit adenoviralen Konstrukten unterschiedlicher COMP-Varianten transduzierten Tenozyten zu gewinnen, wurden Pulse-Chase Versuche zur Sekretionskinetik durchgeführt. Nach der Ernte wurden die Proben mit Antikörpern gegen c-myc oder COMP gefällt und mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Abbildung 3.14 zeigt Gele, auf denen für jedes Konstrukt von links nach rechts Medium- und Lysatproben, jeweils nach 3 bzw. 16 Stunden aufgetragen sind.

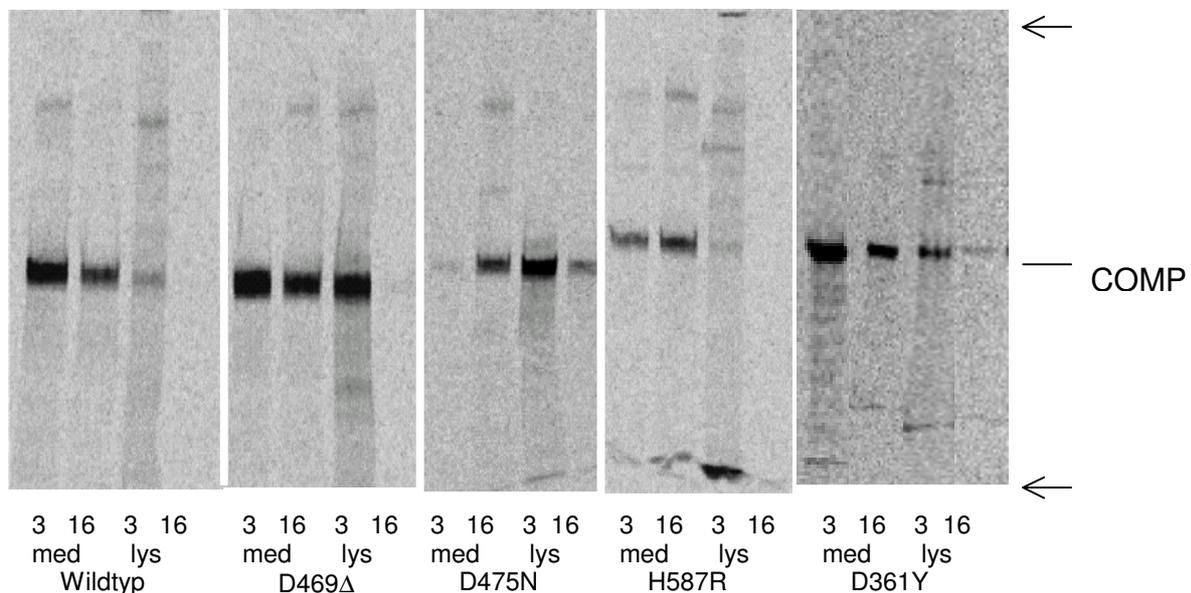


Abbildung 3.14 **Sekretionskinetik von Wildtyp-COMP und den COMP-Mutationen**

Pulse-Chase Experiment von mit 20 MOI transduzierten bovinen Tenozyten nach 3 und 16 h Chase. Die Proben wurden mit einem Anti-c-myc Antikörper präzipitiert und anschließend unter reduzierten Bedingungen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Wildtyp-COMP ist wenig konzentriert im Lysat, aber in hoher Menge im Medium zu finden. Die gleiche Verteilung ist bei den COMP-Mutationen H587R und D361Y zu erkennen. Die Mutation D469Δ läßt zu Anfang eine Anhäufung sowohl in Lysat als auch im Medium erkennen, die sich im Falle des Lysates über die Zeit allerdings verliert. D475N-COMP zeigt eine ausgeprägte COMP-Konzentration im Lysat und gleichzeitig eine Anreicherung im Medium. Die Pfeile zeigen Ursprung und Ende der Lauffront, der Strich repräsentiert die Lauffhöhe der ~ 120 kDa-Bande des COMP-Monomers.

Wildtyp-COMP wurde nach 16 h vollständig sezerniert, ebenso die PSACH-assoziierte Mutation H587R. Die Mutationen D475N, geringer auch D469 Δ werden hingegen verzögert sezerniert.

Diese Beobachtung wird durch die quantitative Auswertung mehrerer Versuche am Phospho Imager bestätigt (siehe Abbildung 3.15). Aufgetragen ist im Diagramm der prozentuale COMP-Anteil im Zelllysate über die Zeit. Hier ergibt sich dasselbe Bild. Der Anteil an myc-COMP nimmt bei Wildtyp-COMP sowie der Mutation H587R schnell, langsamer bei D469 Δ und am langsamsten bei der Variante D475N ab. Somit wird zwar jede COMP-Mutation sezerniert, jedoch findet vor allem die Sekretion von D475N deutlich verzögert statt, wohingegen das H587R-Protein annähernd wie Wildtyp sezerniert wird.

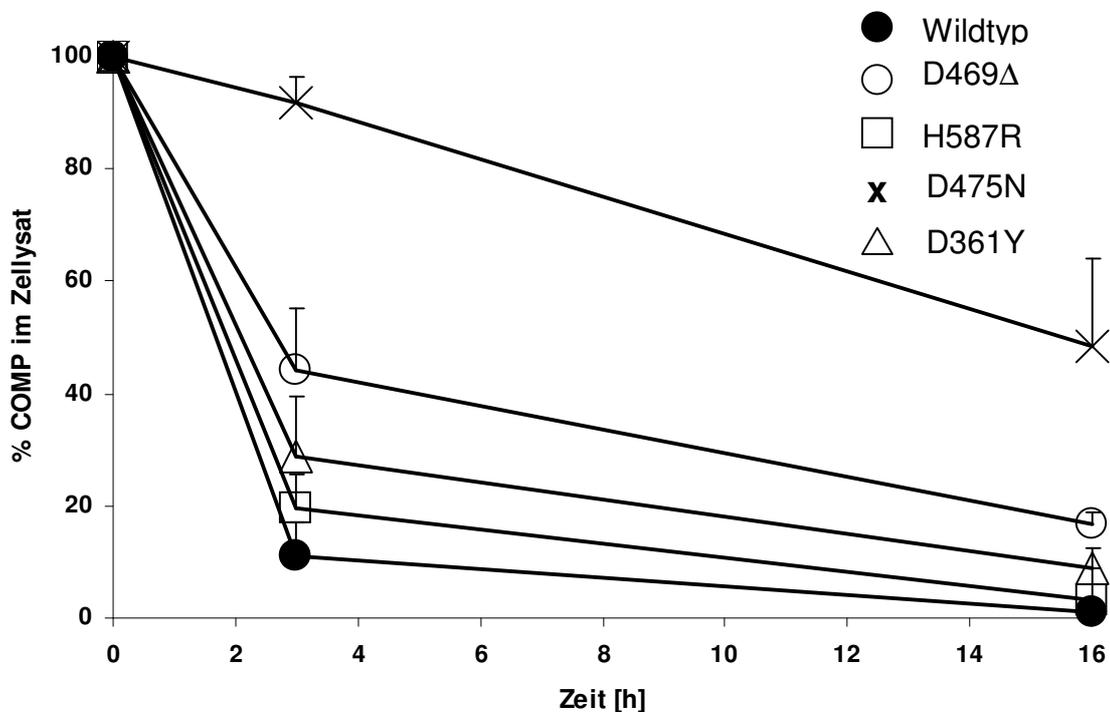


Abbildung 3.15 **Quantitative Auswertung der Sekretionskinetik**

Graphische Auswertung von analog zur Abbildung 3.15 durchgeführten Pulse-Chase Experimenten. Die Radioaktivität der COMP-spezifischen Bande wurde mittels Phospho Imager quantifiziert und der Anteil des gesamten COMP im Zelllysate aufgetragen. Hier sind die Werte im Zelllysate nach 3 und 16 h von fünf verschiedenen Versuchen mit Mittelwert und Standardabweichung graphisch aufgetragen. $p < 0,01$ für den Vergleich von D475N mit Wildtyp-COMP; $p < 0,05$ für den Vergleich von D475N mit den anderen Konstrukten; ausgewertet wurden mehrere Versuche, $p < 0,05$ für den Vergleich von D469 Δ mit Wildtyp-COMP.

3.2.3.2 Ausmaß der adenoviralen Überexpression

Das Ausmaß der Überexpression ließ sich im Rahmen der Pulse-Chase-Experimente bestimmen. Die Vorgehensweise ist in Abschnitt 3.2.3.1 beschrieben, wobei COMP mit einem Antikörper gegen COMP präzipitiert wurde. Die Überexpression berechnet sich aus dem Verhältnis des Mittelwertes des Gesamt-COMP-Gehaltes von infizierten Zellen zu demjenigen von unbehandelten Zellen (in die Auswertung einbezogen wurden mehrere Experimente, siehe Abb. 3.16). Die mit 20 MOI infizierten bovinen Tenozyten exprimieren demnach eine etwa 100-fache Menge an COMP.

Da Tenozyten eine niedrige endogene COMP-Bildung aufweisen, wurde in Anbetracht der Infektionseffizienz (siehe Abschnitt 3.2.2) mit einer geringen Virusmenge von 20 MOI gearbeitet. Diese Menge entspricht bei Chondrozyten einer Relation von endogenem zu exogenem COMP von 1:1 (Dinser, nicht veröffentlichte Daten). Bei Tenozyten ergibt diese Menge ein Verhältnis von 1:100 (siehe Abb. 3.16).

	Mittelwert	Standardabweichung
Mittelwert COMP-Konstrukte	417031	172195
Mittelwert untransduzierte Tenozyten	3254	523
Überexpression [x-fach Kontrolle]	128	

Abbildung 3.16 **Ausmaß der COMP-Überexpression durch virale Transduktion**

In drei Ansätzen wurden jeweils bovine Tenozyten mit 20 MOI des jeweiligen adenoviralen COMP-Konstruktes transduziert, drei Tage in Kultur gehalten und im Vergleich zu untransduzierten Zellen einem Pulse-Chase-Experiment unterzogen. Anschließend wurden die Proben mit einem Antikörper gegen COMP gefällt und unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte mittels Phospho Imager. Ausgewertet wurden drei Experimente.

3.2.3.3 Zelluläre Lokalisation von COMP

Um die intrazelluläre COMP-Verteilung darzustellen und die Ergebnisse der Sekretionskinetik zu kontrollieren, wurden bovine Tenozyten mittels Doppel-Immunfluoreszenz untersucht. Hierbei wurden die Zellen mit Antikörpern gegen c-myc sowie gegen das 58 kDa-Golgi-Protein (Marker für den Golgi-Apparat) bzw. Proteindisulfid-Isomerase (PDI, Marker für das endoplasmatische Retikulum) gefärbt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.17 dargestellt.

Die COMP Mutationen D469 Δ und D475N akkumulieren im ER von Tenozyten (gelbe Bereiche um die blauen Zellkerne). Bei der COMP-Mutation D361Y ist diese Häufung weniger ausgeprägt. Die Färbung der Zellen nach Transduktion mit Wildtyp-COMP sowie H587R-COMP weisen keine Kolokalisation des Markers für das ER und COMP auf. Dafür ist in diesen Zellen exogenes COMP im Golgi-Apparat zu finden, wie die Kolokalisation des 58kDa Proteins und COMP für Wildtyp-COMP, H587R- und geringer auch D361Y-COMP, zeigt. Dies entspricht den Ergebnissen der Sekretionskinetik aus Abschnitt 3.2.3.1.

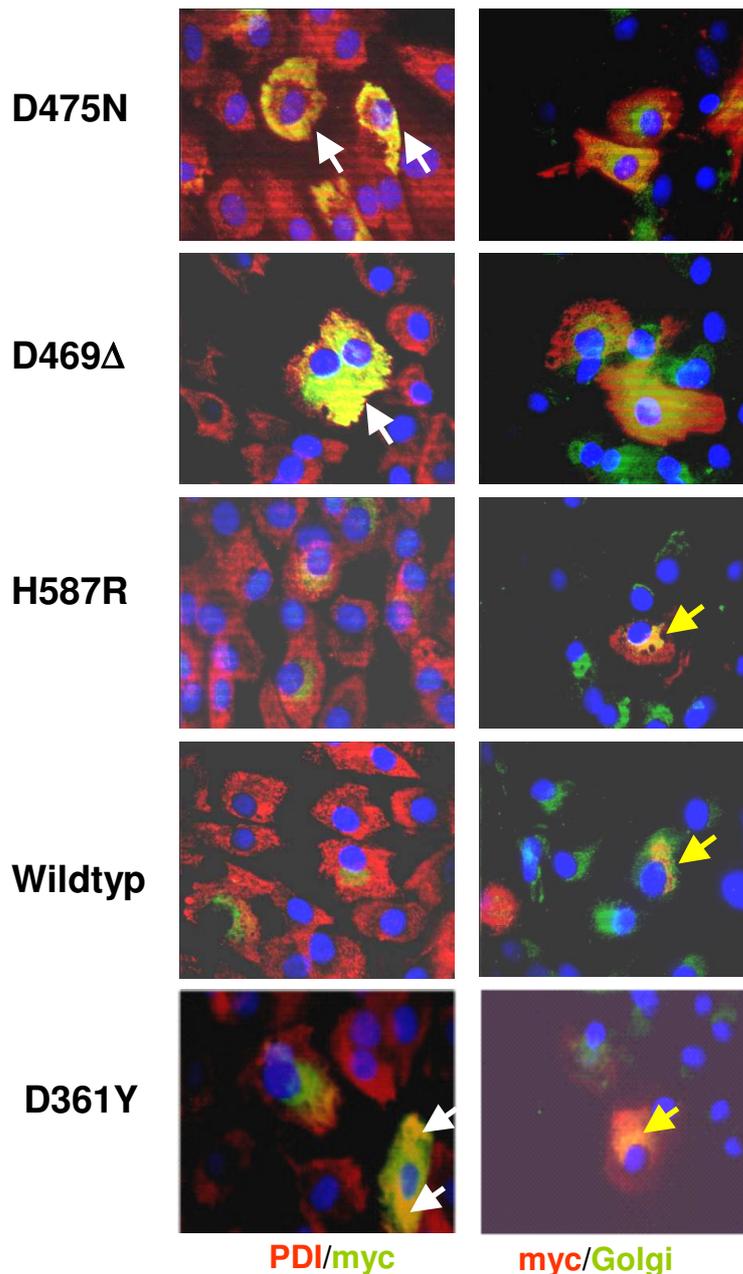


Abbildung 3.17 **Intrazelluläre Lokalisation von COMP**

Die Lokalisation von Wildtyp-COMP und COMP-Mutanten bei mit 20 MOI des jeweiligen adenoviralen COMP-Konstrukts infizierten bovinen Tenozyten wurden mittels Immunfluoreszenz-Experimenten untersucht. Die Färbungen wurden jeweils mit einem Antikörper gegen c-myc (links grün, rechts rot gefärbt) sowie gegen PDI (endoplasmatisches Retikulum, rot in der linken Reihe) bzw. das 58 kDa-Protein des Golgi-Apparates (grün in der rechten Reihe) ausgeführt (Vergrößerung 40fach).

COMP akkumuliert im ER bei Expression der Mutationen D469Δ und D475N, weniger deutlich bei D361Y (gelbe Bildbereiche links, siehe weiße Pfeile), jedoch nicht bei Wildtyp- und H587R-Expression. Letztere, geringer auch D361Y, sind mit dem Marker für den Golgi-Apparat kolokalisiert (gelbe Bildbereiche rechts, gelbe Pfeile).

3.2.4 Einfluß von COMP auf die Zellaktivität

3.2.4.1 Proliferation

Das Proliferationsverhalten von bovinen Tenozyten mit unterschiedlichen COMP-Varianten wurde mittels ^3H -Thymidin-Versuchen untersucht. Dazu wurden die Zellen mit unterschiedlichen Mengen an infektiösen Partikeln infiziert, mit ^3H -Thymidin-haltigem Medium 24 Stunden inkubiert, tiefgefroren und später zwecks Zellyse wieder aufgetaut. Dann wurden die Zellen in einem Zellwascher gewaschen, auf eine Filterplatte verbracht und die Zerfallsereignisse mittels eines Detektors gezählt. Je mehr Zerfallsereignisse detektiert wurden, desto mehr tritiummarkiertes Thymidin wurde in Zellen aufgenommen, was ein Maß für die Zellvermehrung darstellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.18 zusammengefaßt.

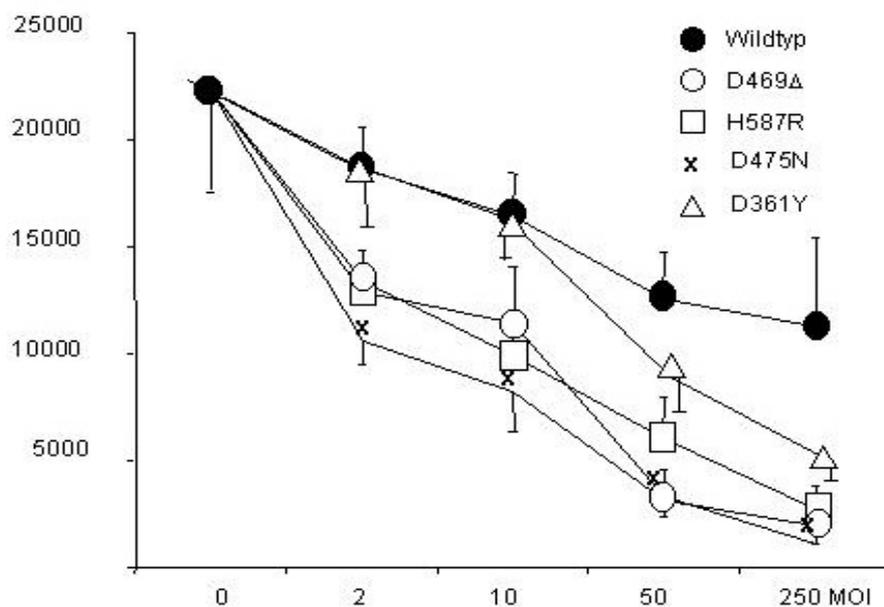


Abbildung 3.18 **Proliferationsrate nach Transduktion von COMP**

Das Proliferationsverhalten von Wildtyp-COMP und COMP-Mutanten infiziert mit verschiedenen Virusmengen wurden mittels ^3H -Thymidin-Experimenten untersucht. Die Proliferationsrate der mit Wildtyp-COMP transduzierten Zellen ist höher als bei Transduktion mit den mutierten Konstrukten. D475N weist die niedrigste Proliferationsrate von allen untersuchten COMP-Varianten auf. Allen Varianten von COMP ist eine Verminderung der Proliferationsrate bei Erhöhung der bei Infektion eingesetzten Virusmengen gemein ($p < 0,05$ für den Vergleich von Wildtyp gegen D475N; $p < 0,05$ für Wildtyp gegen D475N und H587R; $p < 0,05$ für Wildtyp gegen alle anderen COMP-Mutanten).

Die Proliferationsrate von mit Wildtyp-COMP transduzierten Kulturen ist bei jeder der eingesetzten Virusmengen höher als nach Transduktion der anderen COMP-

Varianten. Auch bei Expression von Wildtyp-COMP ist eine dosisabhängige Reduktion der Proliferation zu beobachten. Die COMP-Mutationen D469 Δ und H587R weisen dagegen eine niedrigere Proliferationsrate auf, wobei D469 Δ bei Virusmengen von 50 bzw. 250 MOI noch etwas unter dem Niveau von H587R liegt. D475N zeigt die niedrigste Proliferationsrate von allen COMP- Mutationen.

3.2.4.2 Zellzerfall

Zur Erfassung des Zellzerfalls wurden die LDH-Gehalte des Zellkulturüberstandes gemessen, um so eine Aussage über das Vorkommen von Nekrose in einer Population treffen zu können. Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein Enzym, welches bei einer gesunden Zelle nur innerhalb derselben zu finden ist, bei einer nekrotischen Zelle infolge Lyse jedoch ins Außenmedium abgegeben wird. Ein hoher LDH-Gehalt im Überstand im Vergleich zur Kontrolle ist deshalb ein Zeichen für eine erhöhte Nekroserate. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 3.19 dargestellt.

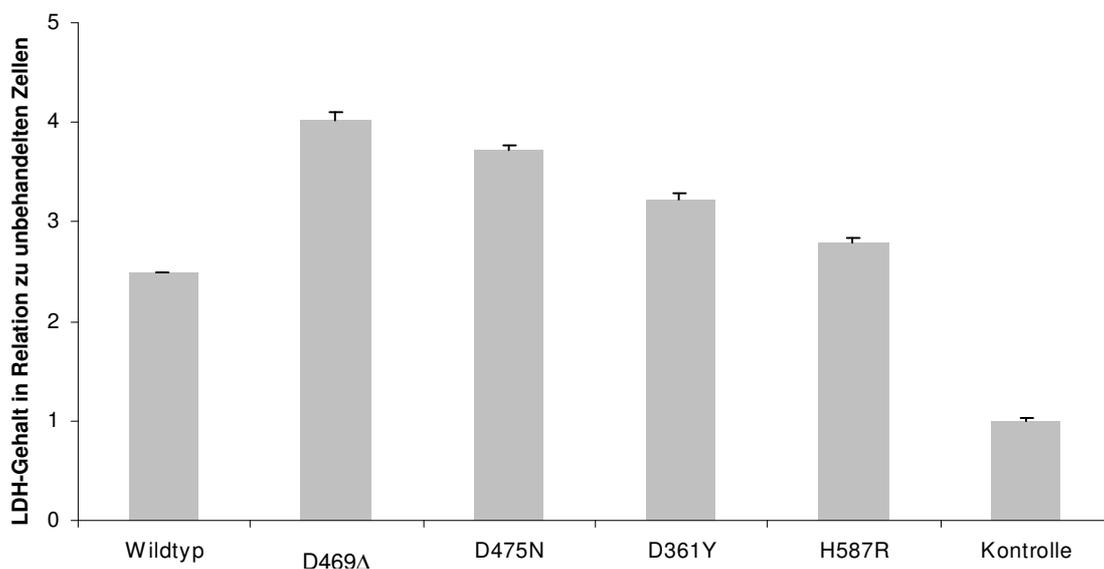


Abbildung 3.19 **Zellzerfall nach Transduktion mit COMP-Varianten**

Die Aktivität des normalerweise intrazellulären Enzyms Lactatdehydrogenase wurde im Kulturüberstand von transduzierten Zellen bestimmt. Hierbei weisen die Kulturüberstände der mit den COMP-Mutationen H587R und D361Y infizierten Tenozyten eine niedrige LDH-Aktivität im Vergleich zu den Mutationen D475N und D469 Δ auf. Mit Wildtyp-COMP infizierte sowie unbehandelte Zellen weisen einen niedrigen Anteil an nekrotischen Zellen in der Gesamtpopulation auf ($p < 0,01$ für den Vergleich von Wildtyp gegen D475N; $p < 0,01$ für Wildtyp gegen D469 Δ und D475N; $p < 0,05$ für Wildtyp gegen die anderen COMP-Mutanten).

Die unbehandelte Kontrollpopulation diene als Bezug für die gemessenen LDH-Gehalte und zeigte den geringsten LDH-Wert. Die mit 100 MOI der jeweiligen COMP-Variante infizierten Zellpopulationen lassen deutliche Unterschiede erkennen. So fällt auf, dass Wildtyp-COMP den niedrigsten Wert für LDH im Kulturüberstand zeigt, der höher als derjenige der unbehandelten Kontrolle ist. Die höchsten LDH-Gehalte im Medium zeigten die Proben der mit den COMP-Mutationen D469 Δ und D475N infizierten Zellen. Die Werte für die Mutationen D361Y sowie H587R liegen zwischen denen des COMP-Wildtyps und den COMP-Varianten D469 Δ sowie D475N. Die Werte für D361Y liegen noch über denen von H587R. Dies korreliert mit der Retention bzw. Sekretion der jeweiligen COMP-Konstrukte, nicht jedoch mit der Minderung der Proliferationsrate.

3.2.4.3 Apoptose

Zur Untersuchung eines eventuell apoptoseauslösenden Effektes der COMP-Mutanten wurden Annexin-V-Färbungen durchgeführt, welche die durchflußzytometrische Erfassung der apoptotischen Zellen ermöglichen. Die Zellpopulationen wurden hierzu mit den entsprechenden viralen Konstrukten der COMP-Varianten transduziert und nach Anfärbung mit FITC-markiertem Annexin V (Nachweis von Apoptose) und einer Propidiumjodid-Färbung (Nachweis von Nekrose) durchflusszytometrisch gemessen (Abbildung 3.21). Negativkontrolle war eine nicht infizierte Zellpopulation. Als Apoptose-Positivkontrolle diene jeweils eine mit SNP in den Konzentrationen 2 mM sowie 5 mM behandelte Kontrollpopulation.

Die in Abbildung 3.20a dargestellten Ergebnisse zeigen, dass alle PSACH-assoziierten Mutationen unabhängig von ihrem Sekretionsverhalten Apoptose induzieren. Den stärksten Effekt hat die Expression der Mutation D475N, aber auch die Mutationen D469 Δ und H587R sind signifikant mit apoptotischem Zelltod vergesellschaftet. Dies steht in Übereinstimmung mit den Daten zum Proliferationsverhalten.

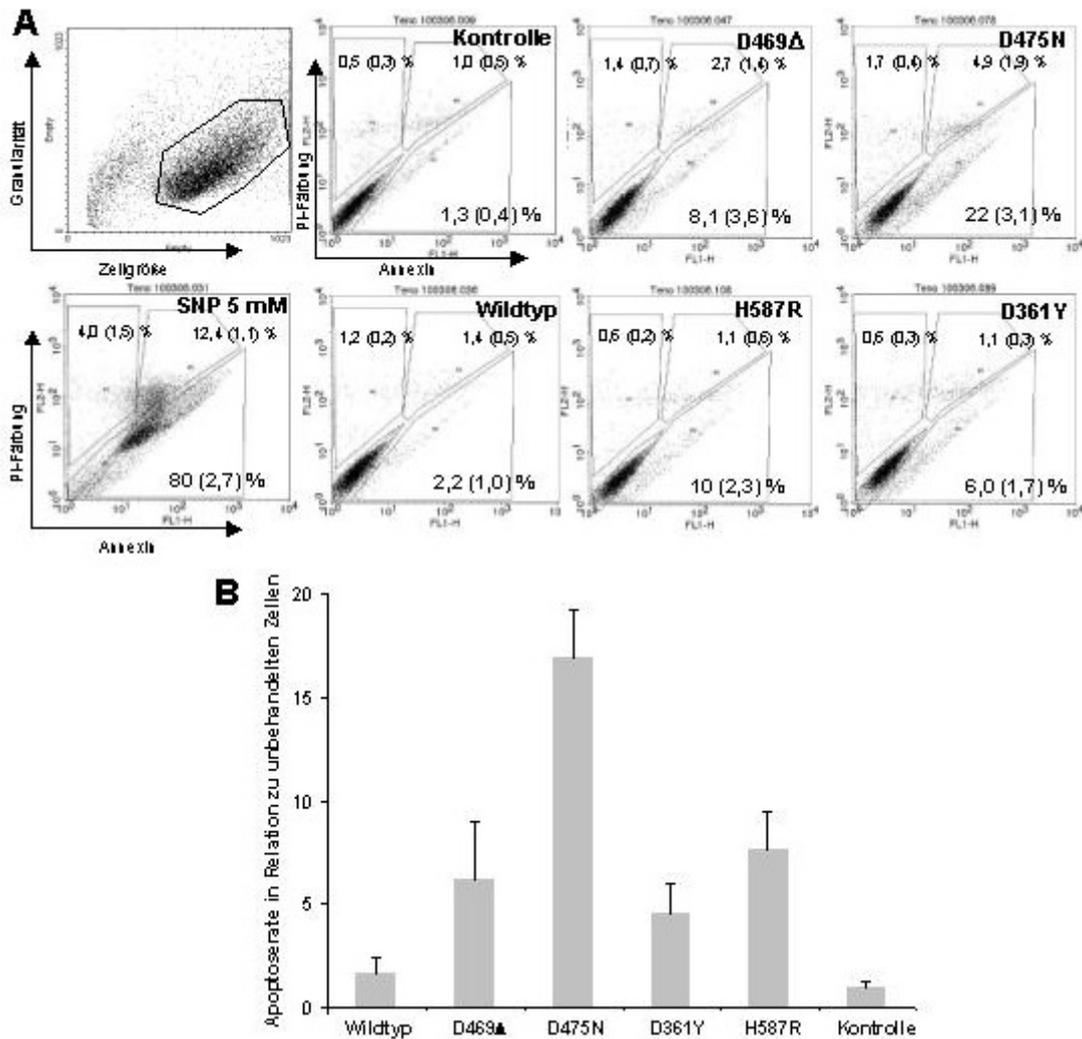


Abbildung 3.20 **Annexin V-Markierung nach Transduktion von COMP**

Die Apoptoserate von unbehandelten Tenozyten und SNP-behandelten Positivkontrollen sowie von mit 50 MOI des jeweiligen adenoviralen COMP-Konstruktes infizierten Zellen wurden fünf Tage nach Infektion mittels Annexin V-Assay durchflusszytometrisch untersucht.

(a) Darstellung eines Beispiles für eine durchflusszytometrische Messung. Region 1 in der Messung oben links definiert anhand des Forward- und Sideward-Scatter (erfassen Zellgröße und Granularität) die intakte Zellpopulation für die Fluoreszenzmessungen. In Region 2 der übrigen Darstellungen finden sich Annexin V- und PI-negative Zellen, in Region 3 ausschließlich Annexin V-markierte Zellen, in Region 4 ausschließlich PI-markierte Zellen sowie in Region 5 doppelmarkierte Zellen. Die Zahlen bezeichnen den Mittelwert aus jeweils drei Messungen für die entsprechende Region, die eingeklammerten Zahlen bezeichnen die Standardabweichung.

(b) Graphische Auswertung der Apoptoseraten der COMP-Konstrukte in Relation zur Apoptoserate von unbehandelten Zellen. Die mit Wildtyp-COMP infizierten Zellen zeigen eine um den Faktor 1,7 erhöhte Apoptoserate, mit D361Y-COMP transduzierte einen Faktor von 4,6. Die übrigen COMP-Mutationen weisen folgende Relationen auf: D475N Faktor 16,9, D469Δ Faktor 6,2 und H587R Faktor 7,7. Die Unterschiede der Apoptoseraten zwischen den nicht-transduzierten Kulturen und den mit Wildtyp-COMP transduzierten Zellen einerseits und den Kulturen, die mutiertes COMP exprimieren

andererseits ist mit $p < 0,01$ hoch signifikant. Ebenso sind die Differenzen zwischen den die COMP-Mutation D475N exprimierenden Zellen und denjenigen, welche die anderen COMP-Mutationen exprimieren, signifikant ($p < 0,01$).

Ein ausgeprägter nekrotischer Zelltod war nicht festzustellen, wobei die verwendete Virusmenge geringer als bei den Versuchen zum Zellzerfall war. Abbildung 3.20b stellt die Apoptoseraten der COMP-Varianten in Relation zu derjenigen von unbehandelten Zellen dar. So weisen die mit Wildtyp-COMP infizierten Zellen eine um den Faktor 1,7 gegenüber unbehandelten Zellen erhöhte Apoptoserate auf. Die relativen Apoptoseraten der COMP-Mutationen lassen sich wie folgt angeben: D469 Δ 4,17fach, D475N 8,23fach, D361Y 3fach und H587R 4,11fach erhöht gegenüber unbehandelten Zellen.

3.2.5 Extrazellulärmatrix

3.2.5.1 Immunfluoreszenz

Kollagen Typ 1 bildet bei gesunden Tenozyten eine fibrilläre Anordnung aus, was die Zugfestigkeit der Sehne bestimmt. Nun ist bei PSACH sowie MED 1 nicht nur der Knorpel betroffen, sondern auch die Sehnen, die an Festigkeit verlieren, was ein Hinweis auf eine gestörte Matrixbildung oder andere negative Matrixeffekte wäre. Daher wurde mittels Immunfluoreszenzfärbungen die Matrixbeschaffenheit im Hinblick auf die Verteilung und Vernetzung von COMP sowie Kollagen I untersucht. Hierzu wurden Tenozyten ausplattiert und mit den entsprechenden adenoviralen COMP-Konstrukten infiziert (jeweils 20 MOI). Nach sieben Tagen wurden die Zellen mit je einem Antikörper gegen Kollagen-I sowie auch COMP gefärbt (siehe Abb. 3.21).

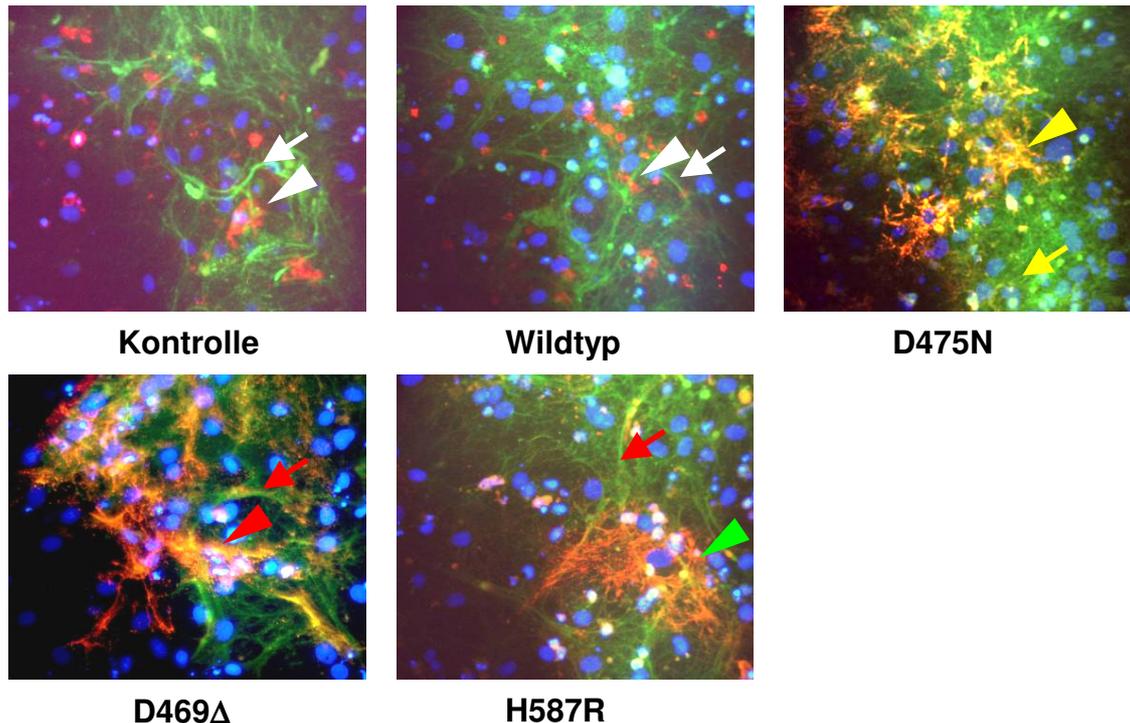


Abbildung 3.21 **Matrixbildung nach Transduktion der verschiedenen COMP-Konstrukte**

Immunfluoreszenzmarkierung von COMP (rot) sowie Kollagen I (grün) bei nach Transduktion mit 20 MOI der entsprechenden Konstrukte. Die Zellen wurden nach Infektion sieben Tage in Kultur gehalten und dann mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt (Vergrößerung 20fach). Zu erkennen ist die netzartige fibrilläre Struktur des Kollagen I (weiße Pfeile) bei unbehandelten Tenozyten sowie mit Wildtyp-COMP infizierten Zellen. Bei der Mutante D475N sind diese fibrillären Strukturen weniger zu beobachten, es bilden sich als Aggregate zu bezeichnende Formationen heraus (gelber Pfeil). H587R weist eine mehr netzartige Anordnung auf, ähnlich D469 Δ , nur dichter ausgebildet (rote Pfeile). Die Verteilung von COMP zeigt bei unbehandelten Zellen sowie mit Wildtyp-COMP infizierten Zellen lokal begrenzte Häufungen, die teilweise mit Kollagen I kolokalisiert sind (gelbe Bereiche, weiße Dreiecke). Die Mutationen D469 Δ und D475N lassen diffuse COMP-Aggregationen beobachten, die ebenfalls mit Kollagen I kolokalisiert sind (rotes sowie gelbes Dreieck). H587R zeigt dichte, flächige Zusammenlagerungen, die nur zum Teil mit Kollagen I kolokalisiert sind (grünes Dreieck).

Abbildung 3.21 zeigt die Immunfluoreszenzfärbungen der mit verschiedenen COMP-Varianten infizierten Tenozyten. Die nicht infizierte Kontrolle sowie die mit dem Wildtyp-COMP-Konstrukt infizierten Zellen haben eine fibrilläre Kollagen-I-Struktur gemeinsam (grün), die ein Netzwerk ausbildet, das an einigen Stellen dichter als an anderen ausfällt und lokal einige Knoten bildet. COMP (rot) bildet einzelne größere Agglomerate, die selten mit Kollagen-I kolokalisiert sind. Die Mutationen D469 Δ und D475N lassen zwar noch die von der Kontrolle und Wildtyp-COMP bekannte Struktur

erkennen, wobei diese etwas ausgedünnt und mehr netzartig erscheint. COMP bildet hier statt einzelner Agglomerate mehr diffuse netzartige Strukturen, welche einzelne kleinere Zusammenlagerungen enthalten; ebenso ist eine teilweise Kolo-kalisation mit Kollagen I zu erkennen (gelbe Bereiche). Die Mutation H587R unterscheidet sich wiederum von den zuerst betrachteten COMP-Varianten; das Kollagen-I-Netz weist sowohl dickere als auch feine Fibrillen sowie regionale Verdichtungen auf, allerdings in geringerem Umfang als D469Δ und D475N. Die COMP-Verteilung ist in einigen Bereichen ähnlich der Kontrolle bzw. des Wildtyps, aber hauptsächlich werden dichte flächige Zusammenlagerungen gebildet, die nur zum Teil mit Kollagen-I kolokalisiert sind.

Insgesamt ist festzustellen, dass die mit Wildtyp-COMP infizierten Zellen sowie die der Kontrollpopulation ein nahezu identisches Erscheinungsbild aufweisen. Dieses hebt sich grundsätzlich von den mit COMP-Mutationen infizierten Zellpopulationen ab.

3.2.5.2 Langzeitkulturen von bovinen Tenozyten

Um die Langzeitexpression von mit adenoviralen COMP-Konstrukten infizierten bovinen Tenozyten zu untersuchen, wurden je 3×10^5 Zellen mit 100 MOI des jeweiligen adenoviralen Konstruktes infiziert und für acht Wochen ohne Passagierung in Kultur gehalten. Das Medium wurde zwei Mal pro Woche gewechselt. Einige Zellen wurden nach der Ernte in Tissue Tek eingebettet und bei -80°C gelagert, andere in Paraformaldehyd und Glutaraldehydpuffer verbracht und zur elektronenmikroskopischen Analyse sowie zur Immunogoldfärbung an Dr. Douglas Keene vom Shriners Research Center in Portland, Oregon, geschickt.

Histochemische und immunhistochemische Färbung

Abbildung 3.22 zeigt die Resultate der Hämytoxylin/Eosin-Färbung boviner Tenozyten in der Langzeitkultur. Naturgemäß sind keine gewebeartigen Strukturen zu erkennen, da die Zellen in Monolayerkultur wuchsen und ihr Zusammenhalt untereinander einzig durch die während der langen Kulturdauer gebildete Matrix

bewerkstelligt wurde. Die Färbung färbt Zytoplasma sowie Matrix blaß-violett (blaue Pfeile) und Zellkerne intensiv violett (rote Pfeile).

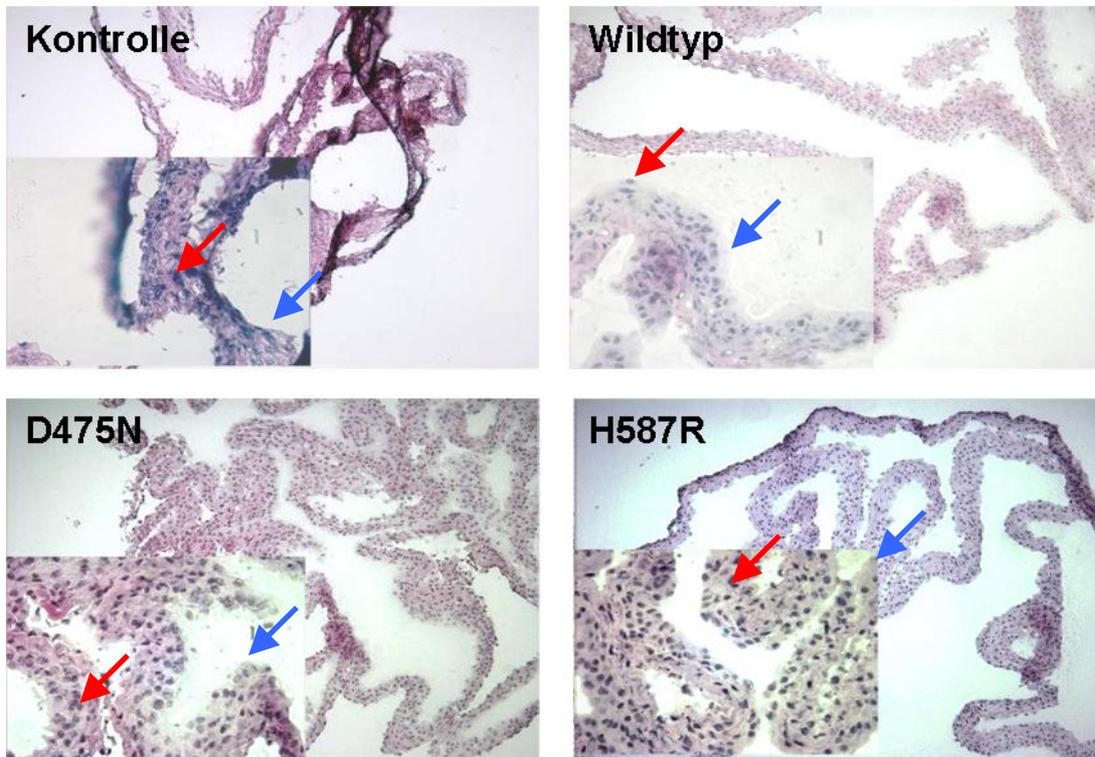


Abbildung 3.22 **Hämatoxylin/Eosin-Färbungen boviner Tenozyten in Langzeitkultur**

Bovine Tenozyten wurden acht Wochen nach Gentransfer mit 100 MOI in Kultur gehalten, wobei das Medium nach jeweils drei Tagen gewechselt wurde. Kryoschnitte der Kulturen wurden einer histochemischen Färbung mit Hämatoxylin/Eosin unterzogen, um Zellkerne und zytoplasmatisches Material sichtbar zu machen (große Photographie: Vergrößerung 10fach, kleine: 100fach).

Die immunhistochemische AEC-Färbung mit einem Antikörper gegen COMP ergab das in Abbildung 3.23 zu beobachtende Bild. Die Intensität der Färbung ist wie erwartet bei nativen Tenozyten im Vergleich zu Wildtyp-COMP und den die COMP-Mutationen exprimierenden Zellen geringer.

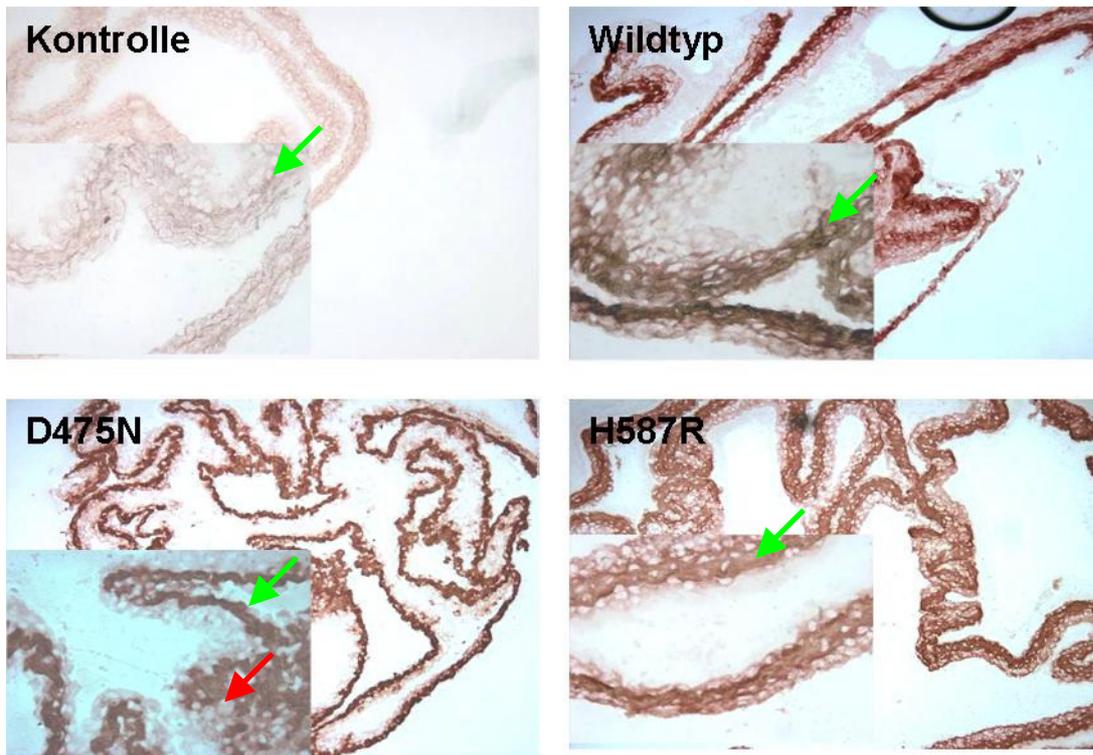


Abbildung 3.23 **COMP Expression von transduzierten Tenozyten und Kontrollen**

Immunhistochemische AEC-Färbung mit einem Antikörper gegen COMP in den Langzeitkulturen. Zu erkennen ist eine COMP-Expression (grüne Pfeile) bei der Kontrolle sowie den mit verschiedenen COMP-Varianten infizierten Zellen, wobei die mit den adenoviralen COMP-Konstrukten infizierten Zellen erwartungsgemäß die stärkste Färbung aufweisen. Teils kann in den D475N-exprimierenden Kulturen eine intrazelluläre COMP-Färbung dargestellt werden (roter Pfeil), wohingegen die Zellen (helle elliptische Bezirke) normalerweise nicht gefärbt werden (Vergrößerung 10fach, Ausschnitte 100fach).

In hoher Kulturdichte ist auch in den Kontroll-Zellen eine COMP Expression nach acht Wochen Kultur feststellbar. Selbst nach dieser langen Kulturzeit sind einige Zellen, welche D475N-COMP exprimieren, intrazellulär gefärbt.

Durch die Färbung mit einem Antikörper gegen c-myc sollte die durch die unterschiedlichen Färbeintensitäten der COMP-markierten Schnitte bereits vermutete exogene COMP-Expression nach Langzeitkultur bewiesen werden. Die nativen Tenozyten exprimieren kein c-myc-getaggtetes COMP, was sich in der Abwesenheit eines Signales niederschlägt (Abb. 3.24).

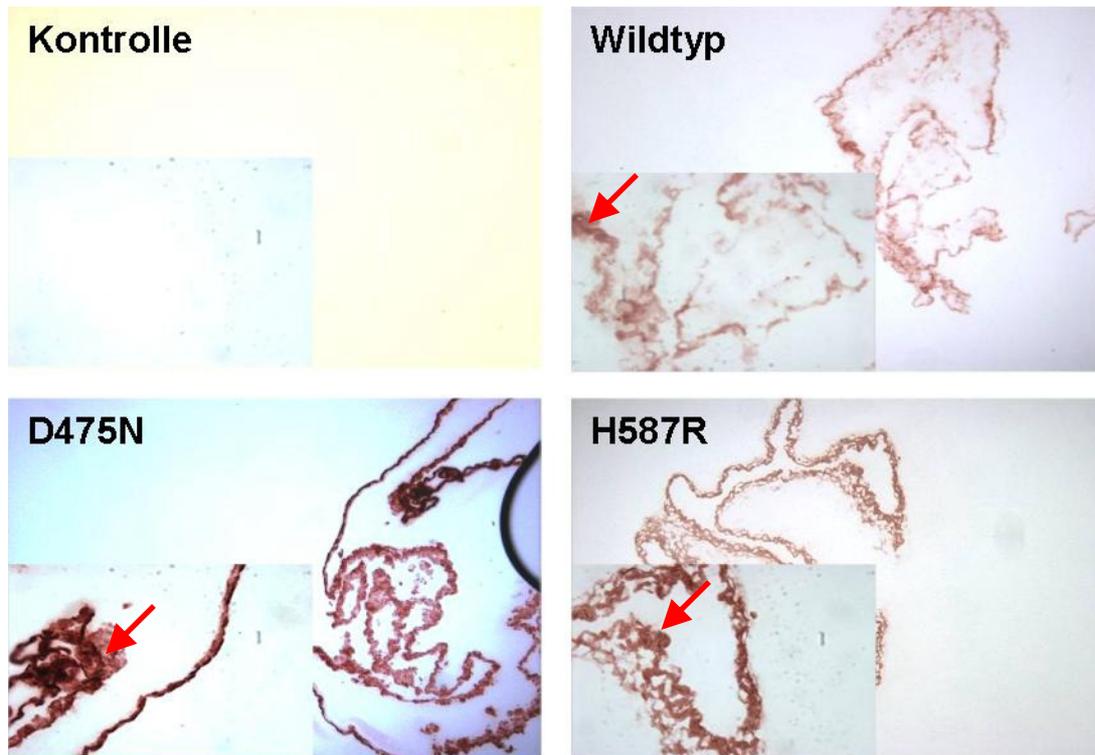


Abbildung 3.24 **c-myc-Expression von transduzierten Tenozyten und Kontrollen**

Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen c-myc. Damit kann die adenoviral induzierte COMP-Expression selektiv dargestellt werden, da alle viralen Konstrukte c-myc getaggt sind. Alle Mutationen sind eindeutig positiv für exogenes COMP bzw. c-myc (rote Pfeile). Die Kontrolle zeigt erwartungsgemäß keinerlei c-myc-Expression (Vergrößerung 10fach, Ausschnitte 100fach).

Die mit adenoviralen COMP-Konstrukten infizierten Tenozyten hingegen exprimieren die jeweilige c-myc-getaggte COMP-Variante auch über achtwöchige Kultur. Die COMP-Mutation D475N weist auch hier eine intensive, teils intrazelluläre Färbung auf (tiefbraun). Die höhere Färbungsintensität der D475N-exprimierenden Kulturen kann über die intrazelluläre Akkumulation erklärt werden, wohingegen in Langzeitkultur extrazelluläres COMP abgebaut oder in den Kulturüberstand abgegeben wird.

Elektronenmikroskopie und Immunogoldfärbung

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden am Shriners Research Center, Shriners Hospital for Children, 3101 SW Sam Jackson Park Road, Portland, OR 97201, USA von Dr. Douglas Keene durchgeführt.

In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist zu erkennen, dass die extrazelluläre Matrix der mit Wildtyp-COMP infizierten Zellen dichte, netzartige Anordnungen gebänderter Fibrillen aufweist, wobei diese oft parallel angeordnet sind (dünner Pfeil) und einen Durchmesser von etwa 25 nm zeigen (siehe Abb. 3.25). Die Fibrillenordnung bei den COMP- Mutationen D475N und H587R erscheint als ein weniger organisiertes, losereres Netz von Fibrillen heterogenen Durchmessers.

Die extrazelluläre Matrix der Wildtyp-COMP-exprimierenden Zellen zeigt bei Immunogoldmarkierung mit einem Antikörper gegen COMP eine Färbung zumeist an Mikrofibrillen in Zellnähe. Die COMP-Färbung an Kollagenfibrillen erscheint dagegen weniger ausgeprägt. Die Extrazellulärmatrix der COMP-Mutanten weist große, ungeordnete Aggregate mit positiver COMP-Färbung auf (dicke Pfeile in Abb. 3.25).

Das rER weist bei mit D475N-COMP infizierten Zellen eine starke Dilatation auf, die bei mit H587R-COMP sowie Wildtyp-COMP infizierten Zellen nicht zu beobachten ist (rote Pfeile in Abb. 3.25). Diese Ergebnisse bestätigen die Immunfluoreszenzfärbungen, sowohl was die Lokalisation der Mutation D475N intrazellulär im ER, als auch was die Störung der Feinstruktur der extrazellulären Kollagenmatrix betrifft (vgl. Abb. 3.21).

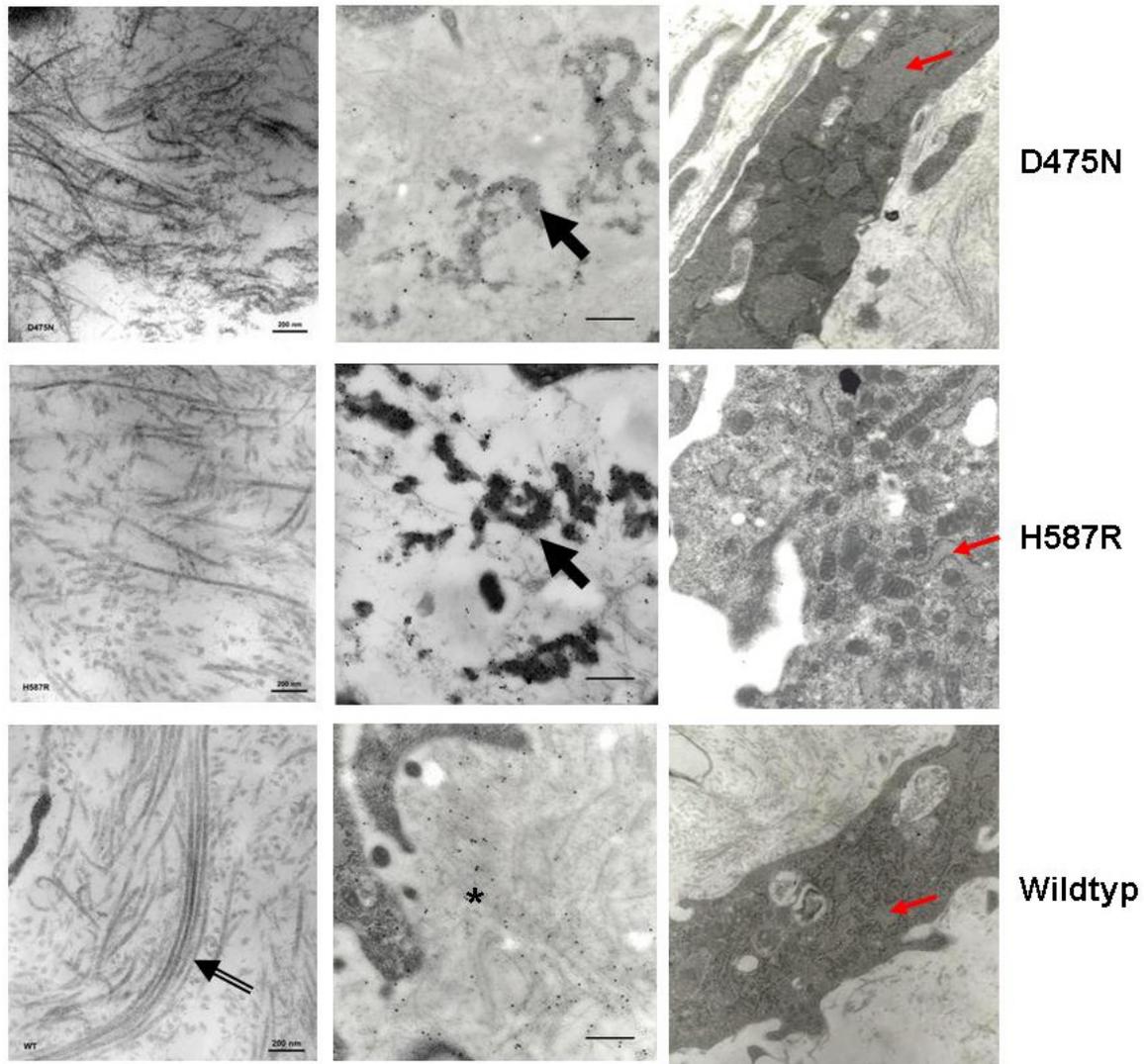


Abbildung 3.25 **Veränderte Matrixstruktur nach Transduktion mit mutiertem COMP**

Bovine Tenozyten wurden mit 20 MOI des jeweiligen Konstruktes infiziert und acht Wochen ohne Passagierung kultiviert. Danach erfolgte die Einbettung in Paraformaldehyd- und Glutaraldehydpuffer. Die linke Spalte zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen, die mittlere Spalte Immunogold-Markierungen mit einem Antikörper gegen COMP (Längenmaßstab 200 nm). Die Wildtyp-COMP-exprimierenden Zellen weisen ein dichtes Netz gebänderter, oft parallel angeordneter Kollagenfibrillen mit Durchmessern von etwa 25 nm auf (dünner Pfeil). Die Fibrillenordnung bei den Mutationen D475N und H587R ist weniger organisiert, erscheint als loses Netz angeordnet und die Fibrillen weisen einen heterogenen Durchmesser auf. An vielen Stellen der Extrazellulärmatrix der COMP-Mutationen sind Aggregate mit positiver COMP-Färbung zu beobachten (dicke Pfeile), während bei den Zellen, die Wildtyp-COMP exprimieren, COMP-Färbungen meist an Mikrofibrillen in der Nähe von Zellen zu finden ist. Die rechte Seite visualisiert das dilatierte rER von mit D475N transduzierten Zellen im Unterschied zu Wildtyp- und H587R-COMP-exprimierenden Zellen (rote Pfeile).

3.3 Untersuchungen an COS-7 A2-Zellen

Um die Ergebnisse der Versuche zur Sekretionskinetik sowie zur Proliferation von bovinen Tenozyten und primärer boviner Chondrozyten zu bestätigen, wurden dieselben Versuche mit der Zelllinie COS-7 A2 durchgeführt.

3.3.1. Sekretionsverhalten von COMP

Die Sekretionskinetik von mit verschiedenen adenoviralen COMP-Konstrukten infizierten COS-7 A2-Zellen wurde mittels Pulse Chase mit ^{35}S -markiertem Methionin untersucht (siehe Abb. 3.26).

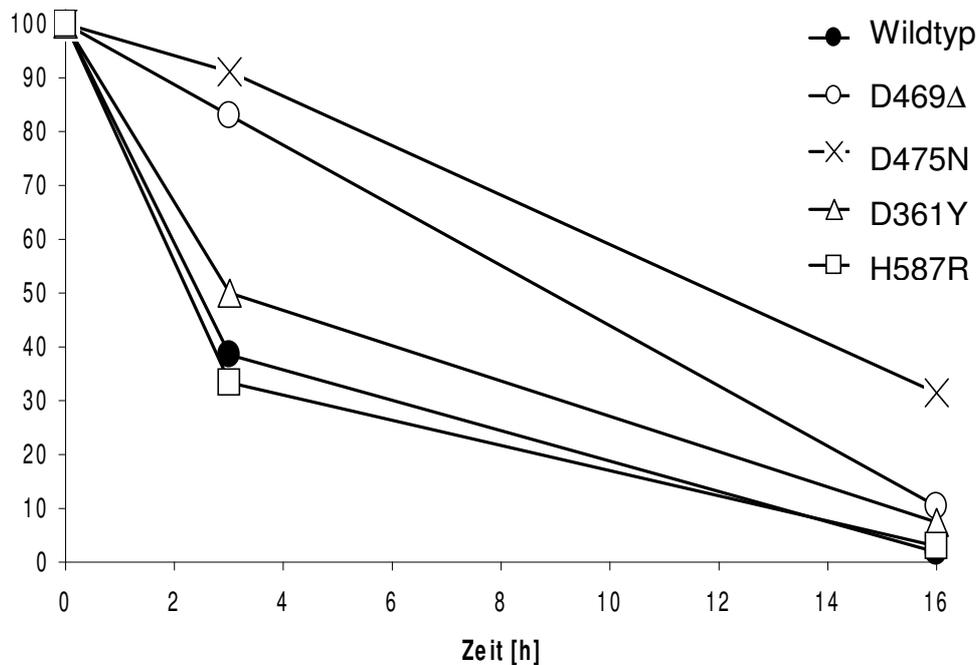


Abbildung 3.26 Sekretionskinetik von mutiertem COMP- in COS 7-A2-Zellen

COS-7 A2-Zellen wurden mit den COMP-Varianten Wildtyp, D469Δ, D475N, D361Y und H587R mit je 20 MOI infiziert. Die Sekretionskinetik wurde mittels Pulse-Chase-Experiment drei Tage nach Infektion untersucht und mittels Phospho Imager ausgewertet. Die Graphik zeigt den prozentualen Anteil des ^{35}S -markierten COMP im Zellysat nach 3 bzw. 16 Stunden.

D469Δ- und D475N-COMP wurden weit langsamer sezerniert als die COMP-Varianten D361Y, H587R sowie Wildtyp. Die Sekretionsgeschwindigkeit von H587R-COMP war beinahe identisch mit der von Wildtyp-COMP. Der Verlauf der zeitlichen Konzentrationsabnahme von markiertem COMP im Lysat ist bei der MED-

assoziierten COMP-Mutante D361Y langsamer als bei Wildtyp bzw. H587R, aber schneller als bei D475N oder D469 Δ . Insgesamt zeigt die Sekretionskinetik die gleichen Resultate wie bei gleichbehandelten bovinen Tenozyten, mit einer Einschränkung: Nach der ersten Probenahme ist der prozentuale Anteil an COMP im Zellysat von COS-7 A2-Zellen bei allen COMP-Varianten höher als bei den Versuchen mit bovinen Tenozyten.

3.3.2 Zellproliferation unter COMP-Expression

Zur Untersuchung der Proliferation wurden COS-7-Zellen in fünffachen Ansätzen mittels FuGene transfiziert, fünf Tage kultiviert und dann mit ^3H -Thymidin markiert. Die mit den COMP-Mutanten D469 Δ , D475N, D361Y und H587R transfizierten Zellen wiesen eine deutlich verringerte Proliferation im Vergleich zum Wildtyp bzw. der Kontrolle auf (siehe Abb. 3.27). Die Ergebnisse entsprechen qualitativ denjenigen nach adenoviralem Gentransfer bei bovinen Tenozyten, jedoch sind sie aufgrund der Plasmidtransfektion nur bedingt vergleichbar.

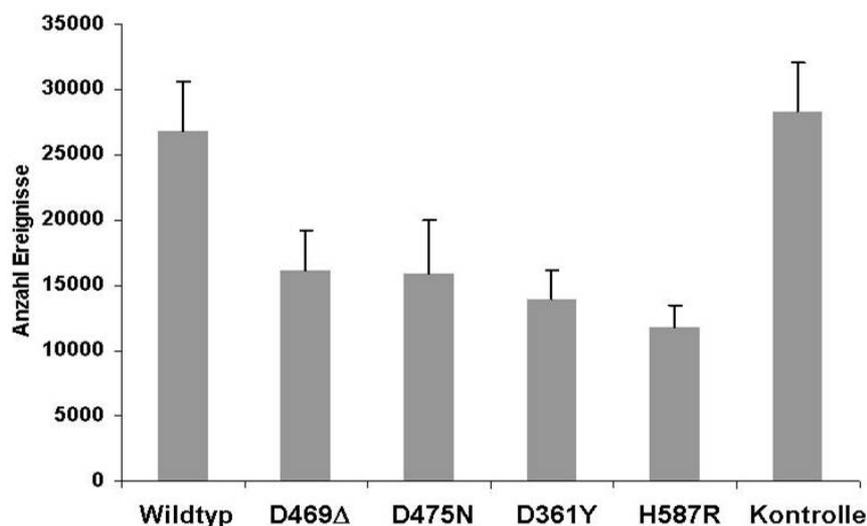


Abbildung 3.27 **Proliferationsraten von COS 7-A2-Zellen nach Transfektion mit mutiertem COMP**
 ^3H -Thymidin-Proliferationsassay nach Transfektion von COS-7 A2-Zellen mit FuGene. Mit Wildtyp-COMP transfizierte sowie unbehandelte Zellen proliferieren im Gegensatz zu den mit COMP-Mutationen transfizierten Zellen schneller ($p < 0,01$ für den Vergleich von Wildtyp-COMP zu den anderen Konstrukten, jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konstrukten).

3.4 Vitalitätsuntersuchungen an bovinen Chondrozyten

Um die bereits vorgenommenen Untersuchungen an Chondrozyten über das Verhalten verschiedener COMP-Varianten zu ergänzen, wurden weitere Versuche bezüglich der Vitalität unter COMP-Expression durchgeführt. Dazu wurden zunächst Vorversuche zur Methodikaustestung vor den eigentlichen Messungen durchgeführt.

3.4.1 Vorversuche

3.4.1.1 DNA-Fragmentierung

Die im späten Apoptosestadium entstehenden DNA-Strangbrüche können mittels einer Gelelektrophorese als Leiter-ähnliche Fragmentierung mittels Gelelektrophorese detektiert werden. Abbildung 3.28 zeigt Versuche zur Etablierung der Methodik. Hierzu wurden Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an SNP behandelt, um herauszufinden ab welcher Konzentration eine DNA-Fragmentierung einsetzt (a). Die erhaltenen Banden nach DNA-Isolierung zeigen zwar eine Veränderung gegenüber unbehandelten Zellen, aber die DNA-Fragmentierung ist im Schmier der jeweiligen Probe kaum zu erkennen. Ein Ansatz, Apoptose quantitativ erfassen zu können, bestand darin, unbehandelte Zellen und mit SNP 2 mM behandelte Zellen in verschiedenen Verhältnissen zu mischen. Dadurch hätten unterschiedliche Mengen an DNA-Fragmenten auf dem Gel zu erkennen sein sollen (b). Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurden jedoch alternative Methoden getestet.

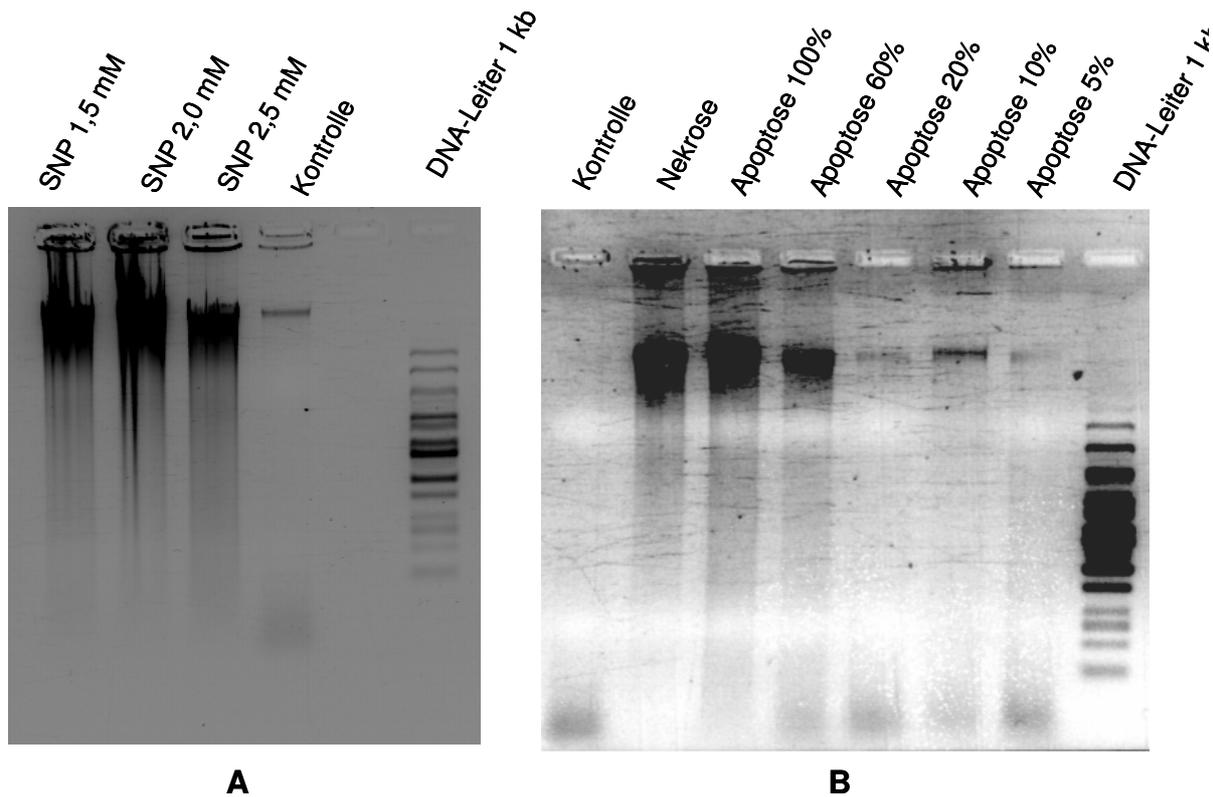


Abbildung 3.28 **Apoptosenachweis durch DNA-Fragmentierung**

(a) Bovine Chondrozyten wurden zur Apoptoseinduktion mit SNP in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Die mit SNP behandelten Zellpopulationen weisen gegenüber der Kontrolle mit unbehandelten Zellen eine Zunahme an Fragmenten auf. Leider war die Qualität der Darstellung für weitere Versuche nicht geeignet. (b) Mischung von unbehandelten und mit SNP behandelten Zellen in Verhältnissen von 5-100%. Es wurden unterschiedliche Mengen an fragmentierter DNA auf dem Gel erwartet, konnten aber nicht sichtbar gemacht werden.

3.4.1.2 TUNEL-Assay

Der Tunel-Test weist ein spätes Stadium der Apoptose nach, in welchem die DNA im Kern durch Nukleasen abgebaut wird. Diese DNA-Degradation wird durch Markierung der freien 3'-OH-Enden der DNA sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch, wie in Abbildung 3.29 dargestellt. In diesem Testversuch kann ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Apoptose-induzierenden SNP-Behandlung und der Markierung gesehen werden.

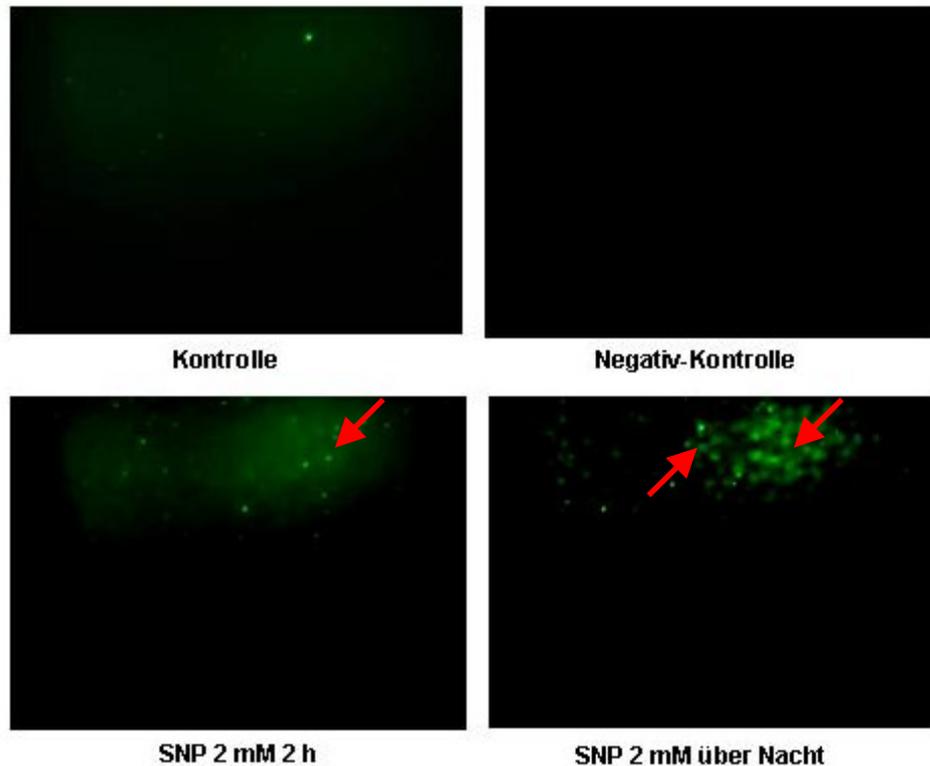


Abbildung 3.29 **Apoptose-Untersuchung mittels TUNEL-Markierung**

TUNEL-Auswertung von bovinen Chondrozyten nach Behandlung mit SNP über die angegebenen Zeiträume. Es kann eine dosisabhängige Zunahme der Markierung freier DNA-Fragmente (rote Pfeile) im Vergleich zu den Kontrollen gezeigt werden (Vergrößerung 10fach).

3.4.1.3 Annexin-V-Markierung

Die nächste Methode, sich der Fragestellung zur Apoptoseinduktion nach Überexpression der COMP-Varianten zu nähern, stellte die durchflußzytometrische Auswertung der Markierung apoptotischer Zellen mittels FITC-Annexin-V dar. Zur Gegenfärbung wurde Propidiumjodid eingesetzt. Zu erkennen war, dass sich die einzelnen Zellpopulationen unterschiedlich verhalten (siehe Abbildung 3.30). Die Kontrollpopulation wies nur einzelne apoptotische Zellen auf, während die Positivkontrollen mit 2 mM, 2,5 mM und 10 mM SNP behandelt eine deutliche Verschiebung der Populationen zu einer stärkeren Annexin-V-Färbung zeigt. Die mit der COMP-Mutante D475N transfizierten Zellen scheinen eine höhere Apoptoserate aufzuweisen als die mit den übrigen COMP-Varianten transfizierten Populationen.

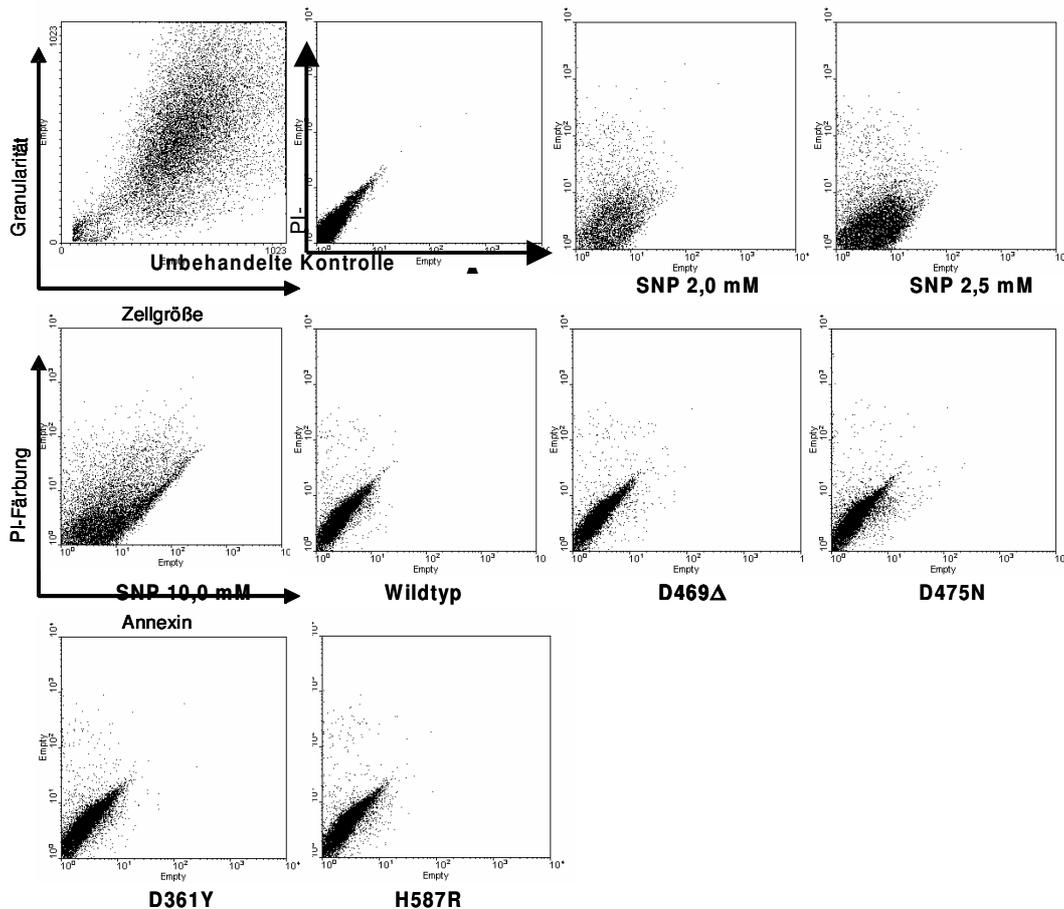


Abbildung 3.30 **Apoptoseuntersuchungen mittels Annexin-V**

Bovine Chondrozyten wurden mit FuGene Plasmid-transfiziert und nach drei Tagen mittels Annexin-V-Assay durchflußzytometrisch untersucht. Die Behandlung mit SNP zeigte eine eindeutige Apoptoseinduktion. Der Gentransfer von D475N-COMP schien ebenfalls eine Rechtsverschiebung zu vermehrter Annexin V-Markierung hervorzurufen und somit auf eine Apoptoseinduktion hinzuweisen.

3.4.2 Charakterisierung der Einschränkung der Zellvitalität unter COMP-Expression

3.4.2.1 Zytopathische Effekte

Die für die unten aufgeführten FACS-Untersuchungen ausplattierten und mit den adenoviralen COMP-Konstrukten infizierten Zellen wurden unmittelbar vor der durchflußzytometrischen Messung mittels Phasenkontrastmikroskopie in zehnfacher Vergrößerung photographiert. Dabei waren deutliche zytopathische Effekte der

Krankheits-assoziierten Mutationen im Vergleich zur Wildtyp-Expression oder zur Kontrolle zu beobachten (siehe Abb. 3.31). Diese Beobachtungen lassen sich mit den nach Annexin-V-Markierung erhaltenen Ergebnissen oder denjenigen des TUNEL-Assay vergleichen.

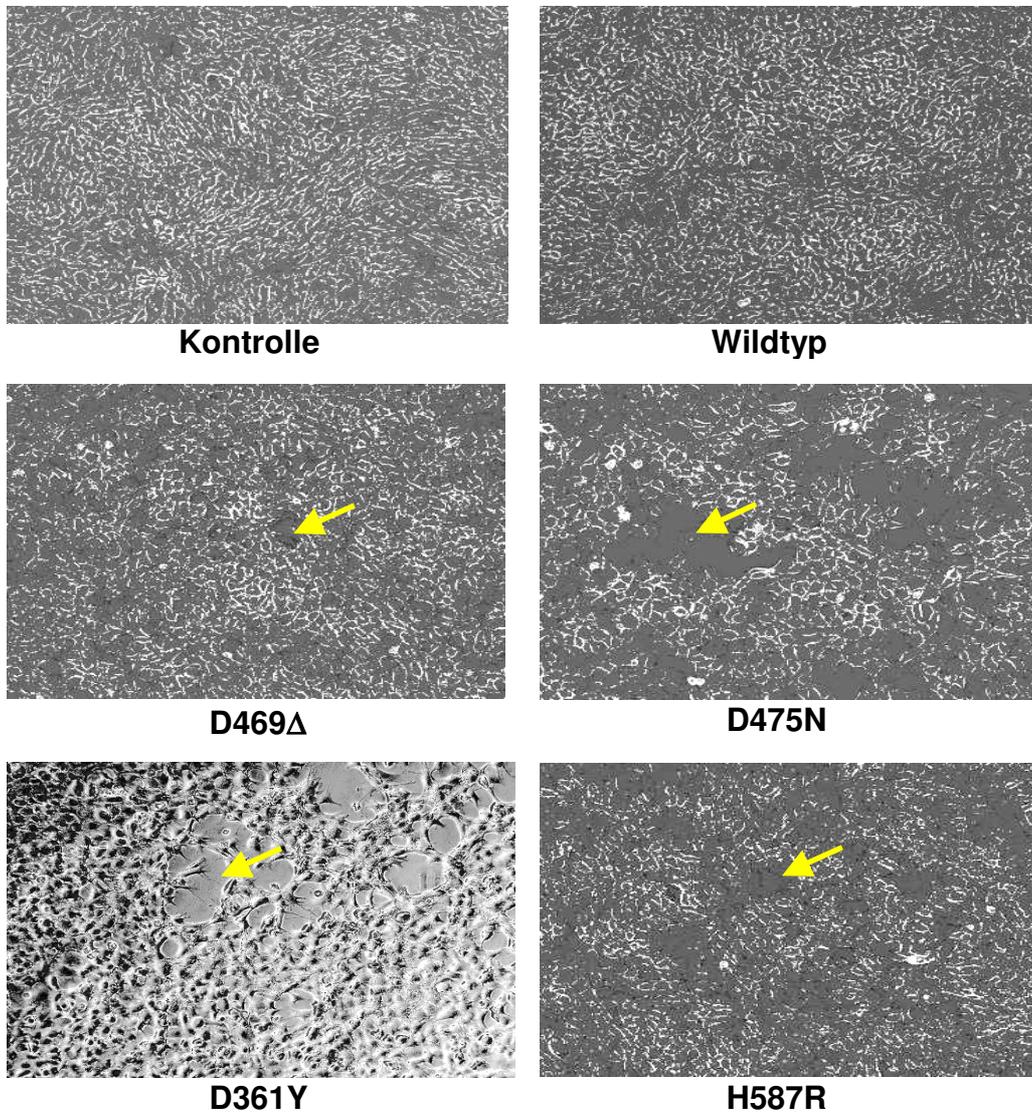


Abbildung 3.31 **Bovine Chondrozyten zeigen differierende zytopathische Effekte nach Infektion mit verschiedenen adenoviralen COMP-Konstrukten**

Je 3×10^5 bovine Chondrozyten wurden mit 100 MOI des jeweiligen adenoviralen COMP-Konstruktes infiziert und nach fünf Tagen kurz vor Beginn der Annexin-V-Untersuchung am FACS mittels Lichtmikroskop im Phasenkontrast photographiert (10fache Vergrößerung). Die unbehandelten Zellen der Kontrolle sowie die mit Wildtyp-COMP infizierten Zellen bilden einen dichten, zusammenhängenden Zellrasen. Die mit den COMP-Mutanten infizierten Zellen wiesen Löcher (gelbe Pfeile) unterschiedlichen Ausmaßes im Zellrasen auf, wobei die COMP-Mutante D475N die größten freien Stellen hervorrief. Die beiden Mutanten D361Y und H587R wiesen ähnlich viele zellfreie Areale auf, die Mutante D469Δ die meisten, allerdings mit der geringsten Ausdehnung.

3.4.2.2 Proliferationsverhalten

Das Proliferationsverhalten von bovinen Chondrozyten jeweils infiziert mit den unterschiedlichen COMP-Varianten wurde mittels ^3H -Thymidin-Versuchen untersucht (siehe Abbildung 3.32). Die mit Wildtyp-COMP transduzierten Zellen proliferieren mit einer höheren Rate als die mit viralen COMP-Mutanten infizierten Zellen, und dies bei jeder der eingesetzten Virusmengen. Die COMP-Mutanten D475N, D469 Δ und H587R weisen dagegen eine niedrigere Proliferationsrate als Wildtyp-COMP auf. D475N und H587R zeigen die niedrigste Proliferationsrate der COMP-Mutanten, D361Y die höchste. Allgemein kann eine Reduktion der Proliferationsrate bei Erhöhung der eingesetzten Virusmenge bei Transduktion beobachtet werden.

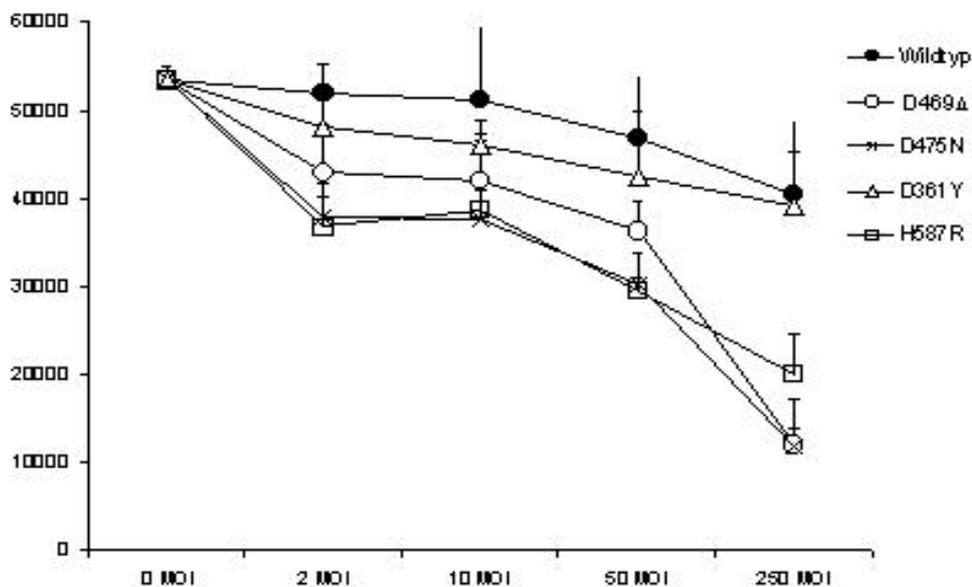


Abbildung 3.32 **Proliferationsrate nach Transduktion mit COMP**

Chondrozyten wurden in fünf parallelen Ansätzen mit verschiedenen infektiösen Einheiten der angegebenen COMP-Konstrukte transduziert und mit ^3H -Thymidin markiert. Mit Wildtyp-COMP infizierte Zellen proliferieren im Gegensatz zu den mit COMP-Mutationen infizierten Zellen mit einer höheren Rate. D475N weist die niedrigste Proliferationsrate aller untersuchten COMP-Varianten auf. Allen Varianten von COMP ist eine Verminderung der Proliferationsrate bei Erhöhung der eingesetzten Virusmengen gemein ($p < 0,05$ für den Vergleich Wildtyp gegen D475N; $p < 0,05$ Wildtyp gegen D475N und H587R; $p < 0,05$ für Wildtyp gegen alle anderen COMP-Mutanten).

3.4.2.3 Zellzerfall

Um die Auswirkungen der verschiedenen COMP-Mutanten auf die Nekroseinduktion bzw. die Lebensfähigkeit der Chondrozyten zu untersuchen, wurde, wie schon für die Tenozyten, eine Untersuchung des Zellkulturüberstandes auf Lactatdehydrogenase (LDH) durchgeführt.

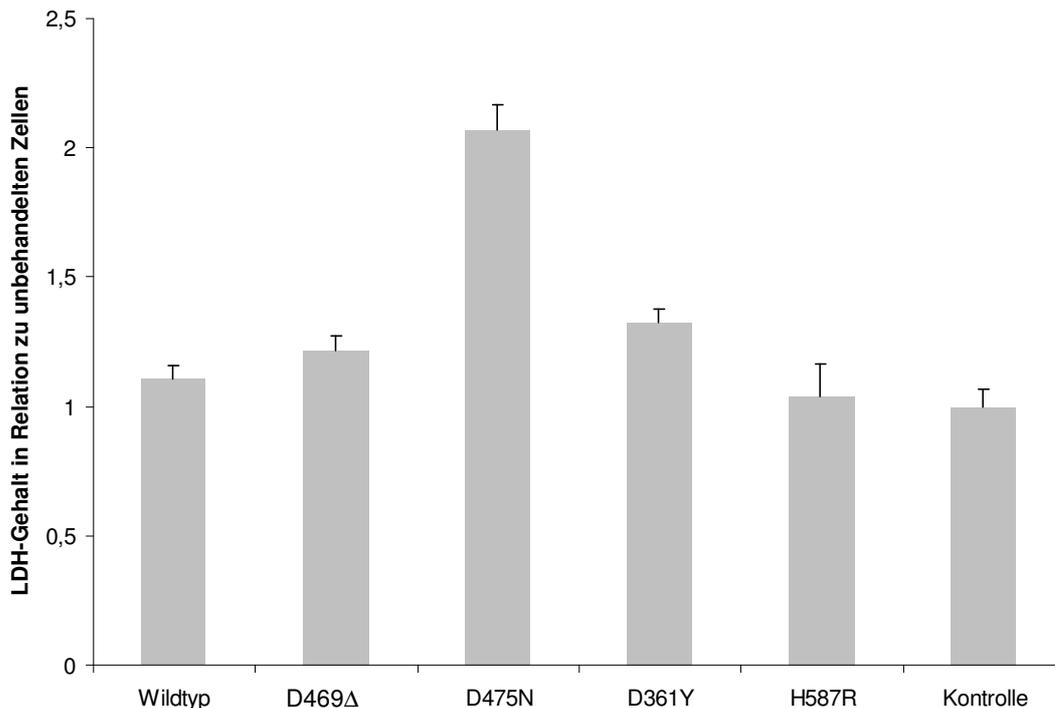


Abbildung 3.33 **LDH-Aktivität nach Transduktion mit COMP**

Chondrozyten wurden mit je 100 MOI der adenoviralen Konstrukte infiziert und fünf Tage kultiviert. Der Kulturüberstand wurde zur Messung von LDH herangezogen. Die gemessenen Werte wurden auf die Kontrollpopulation normiert. Den doppelten Wert gegenüber der Kontrolle zeigten die mit der COMP-Mutante D475N infizierten Zellen. Die Mutation H587R dagegen zeigten einen ähnlichen LDH-Gehalt wie die Kontrolle und Wildtyp-COMP ($p < 0,05$ für den Vergleich Wildtyp gegen D475N).

Der gemessene LDH-Gehalt der Zellkulturüberstandsproben wurde auf die Kontrollpopulation normiert. Die unbehandelte Kontrolle erhielt somit den Wert 1. Die mit Wildtyp-COMP infizierten Zellen zeigten zusammen mit den mit H587R infizierten Zellen den niedrigsten LDH-Gehalt der mit adenoviralen COMP-Varianten transduzierten Zellen auf. Die mit den Konstrukten D469Δ und D361Y infizierten Populationen lagen mit Werten von 1,2 und 1,3 geringfügig darüber. Von allen COMP-Varianten wiesen die mit dem Konstrukt D475N infizierten Zellen mit 2 den höchsten Wert und somit die geringste Überlebensrate auf.

3.4.2.4. Apoptose

Nach der Überprüfung der einzelnen Nachweismethoden für Apoptose wurden zwei der betrachteten Methoden für weitergehende Untersuchungen ausgewählt: Der TUNEL-Test und die Annexin-V-FACS-Analyse.

TUNEL-Assay

Der TUNEL-Test wurde eingesetzt, um Unterschiede in der Apoptoserate der verschiedenen COMP-Varianten nachzuweisen. Dazu wurden die Chondrozyten mit einem viralen Konstrukt der jeweiligen COMP-Variante mit je 50 MOI infiziert und der TUNEL-Test nach fünf Tagen ausgeführt. Die Analyse erfolgte lichtmikroskopisch mittels Photodokumentation und Auszählung der Fluoreszenzereignisse bei Einhaltung folgender Bedingungen: gleiche Vergrößerung und vergleichbare Zellzahl. Die Größe des betrachteten Abschnittes ergab sich aus dem sichtbaren Bereich bei eingestellter Vergrößerung. Abbildung 3.34 zeigt die aufgenommenen Photographien, während Abbildung 3.35 die ausgewerteten Photographien erfaßt.

Die Ergebnisse der beiden Abbildungen können folgendermaßen zusammenfaßt werden: Die nicht infizierte Kontroll- ebenso wie die mit Wildtyp-COMP infizierten Populationen weisen nur vereinzelt apoptotische Zellen auf, etwa 7 bzw. 9 Zellen pro Gesichtsfeld. Die Mutante D469 Δ kam auf durchschnittlich 18 Zellen pro Feld, eine ähnliche Anzahl wie D361Y mit 17 Zellen pro Feld. Die Mutante D475N mit 25 Zellen pro Feld und H587R mit 23 apoptotischen Zellen pro Feld wiesen die höchsten Apoptoseraten auf. Insgesamt kann festgestellt werden, dass Wildtyp-COMP sowie die nicht infizierte Kontrolle fast gleiche Apoptoseraten aufweisen. Vergleichbare Apoptoseraten zeigen auch die Mutanten D361Y und D469 Δ , während die Mutanten D475N und H587R deutlich höhere Werte aufzeigen.

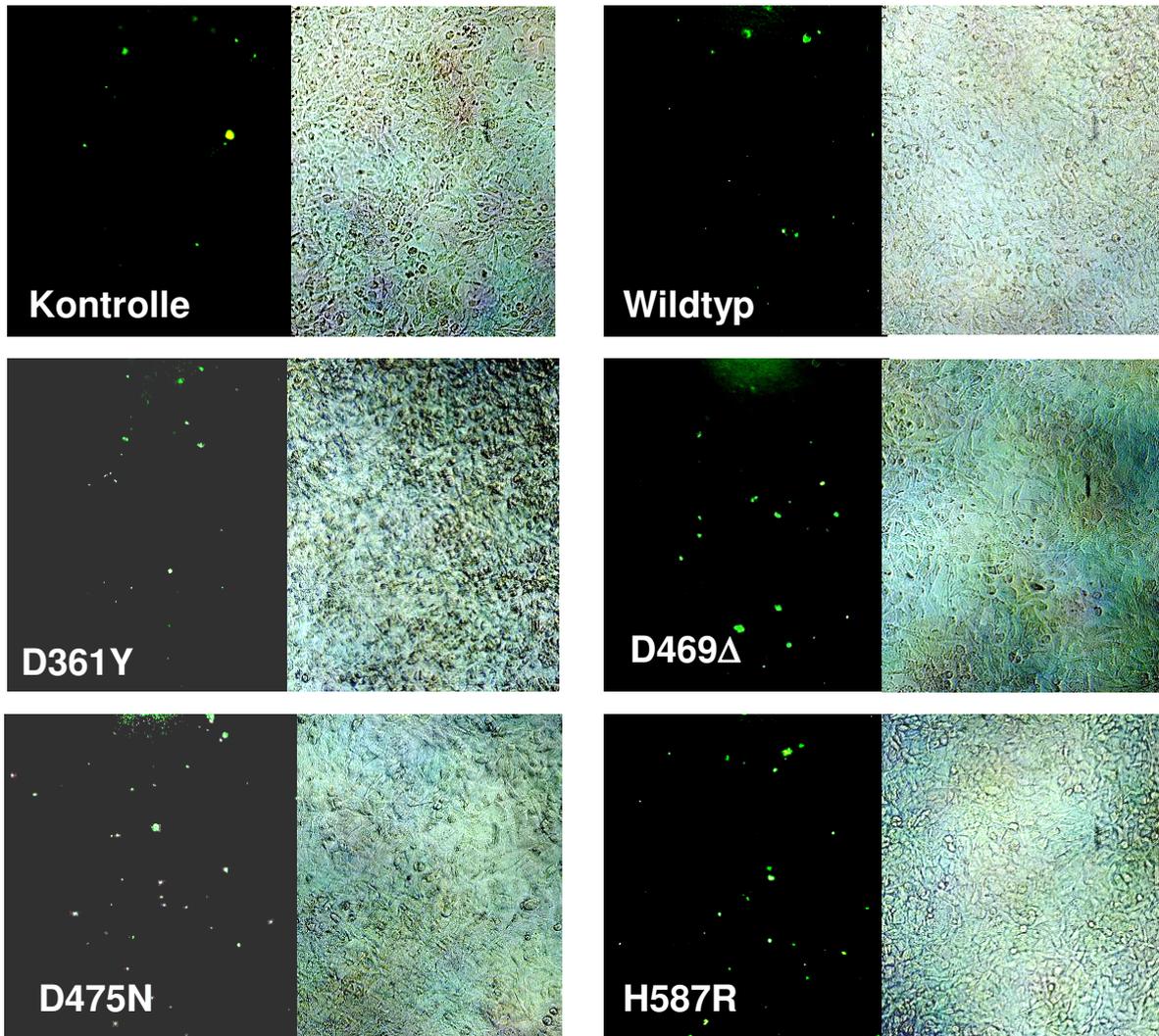


Abbildung 3.34 **TUNEL-Markierung von transduzierten Chondrozyten**

Bovine Chondrozyten wurden nach Transduktion mit 100 MOI fünf Tage lang kultiviert und anschließend TUNEL-markiert. Als Positivkontrolle diente eine mit SNP 2 mM über Nacht behandelte Population. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung ist jeweils links neben der Dokumentation im Hellfeld dargestellt (Vergrößerung 10fach).

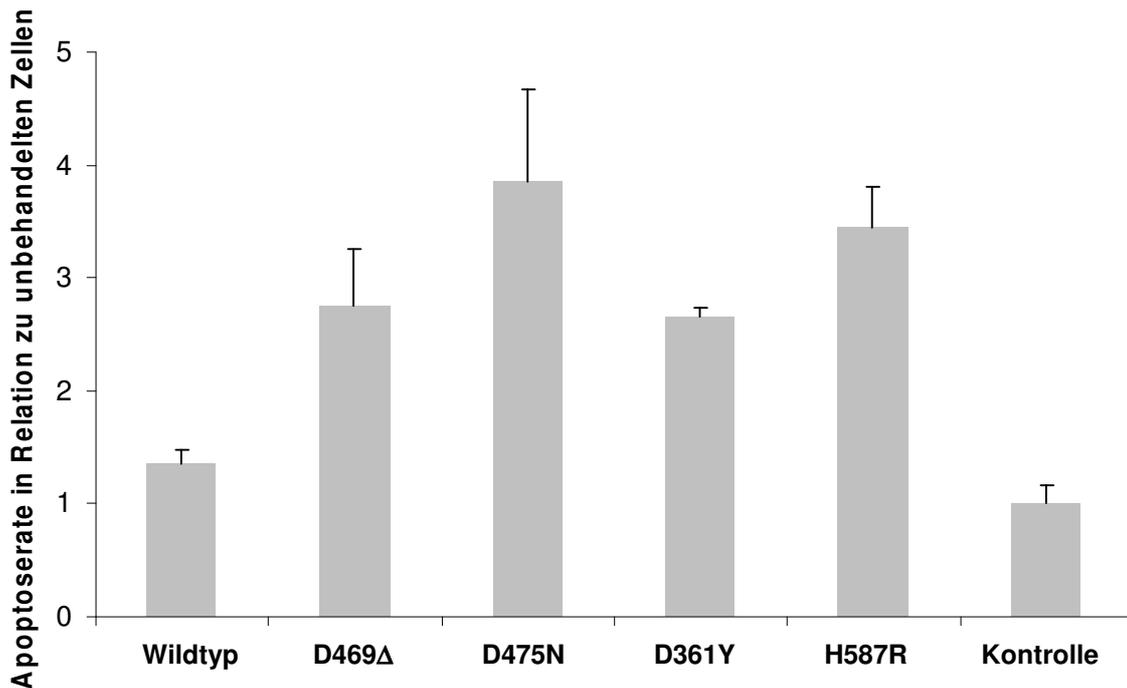


Abbildung 3.35 **Quantitative Auswertung der TUNEL-Markierung**

Die quantitative Auswertung der TUNEL-Tests verdeutlicht die unterschiedlichen Apoptoseraten bei Infektion mit diversen adenoviralen COMP-Konstrukten. Die Apoptoserate unbehandelter Zellen wurde auf 1 gesetzt und mit den übrigen Proben verglichen. Die Krankheits-assoziierten COMP-Mutationen gehen mit einer erhöhten Apoptoserate einher ($p < 0,01$ für Wildtyp-COMP gegen D475N; $p < 0,01$ für Wildtyp-COMP gegen D475N und H587R; $p < 0,05$ für Wildtyp-COMP gegen alle anderen Konstrukte).

Annexin V-Markierung

Bovine Chondrozyten wurden mit den entsprechenden viralen Konstrukten der COMP-Varianten infiziert, fünf Tage kultiviert und nach Anfärbung mit FITC-markiertem Annexin V (Apoptosenachweis) und einer Propidiumjodid-Färbung (Nekrosenachweis) im Durchflusszytometer gemessen (siehe Abbildung 3.36). Die Negativkontrolle bestand aus einer nicht infizierten Zellpopulation, die Apoptose-Positivkontrolle stellte eine mit SNP der Konzentration 2 mM behandelte Kontrollpopulation dar.

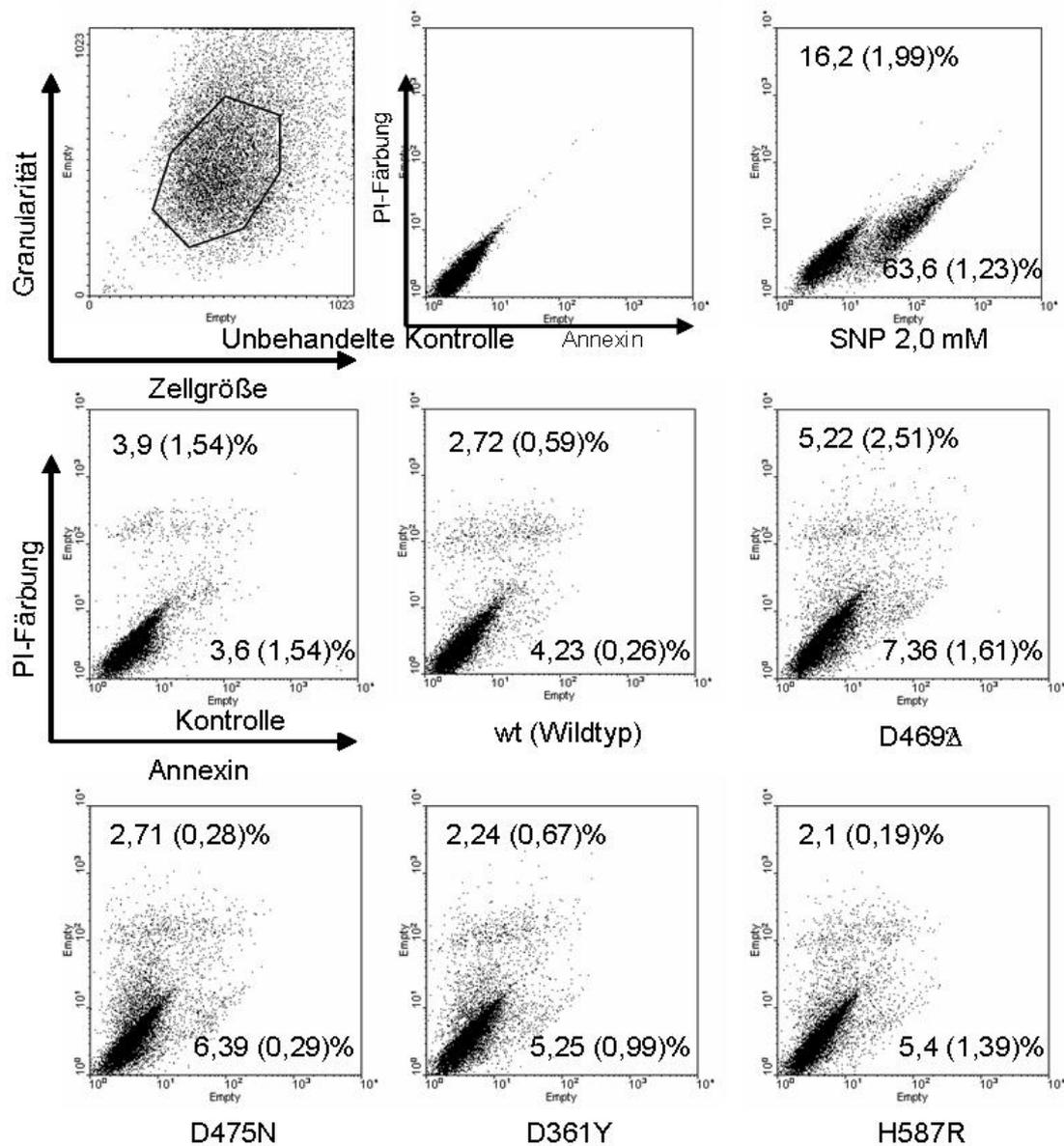


Abbildung 3.36a **Annexin V-Markierung transduzierter boviner Chondrozyten**

Fünf Tage nach Transduktion mit 50 MOI wurden bovine Chondrozyten nach Annexin V-Markierung und PI-Gegenmarkierung in drei parallelen Ansätzen durchflußzytometrisch untersucht. Gezeigt sind beispielhafte Diagramme, rechts unten ist der Anteil isoliert Annexin V-positiver Zellen als Mittelwert (Standardabweichung) in Prozent angegeben, oben links der Anteil isoliert PI-positiver Zellen.

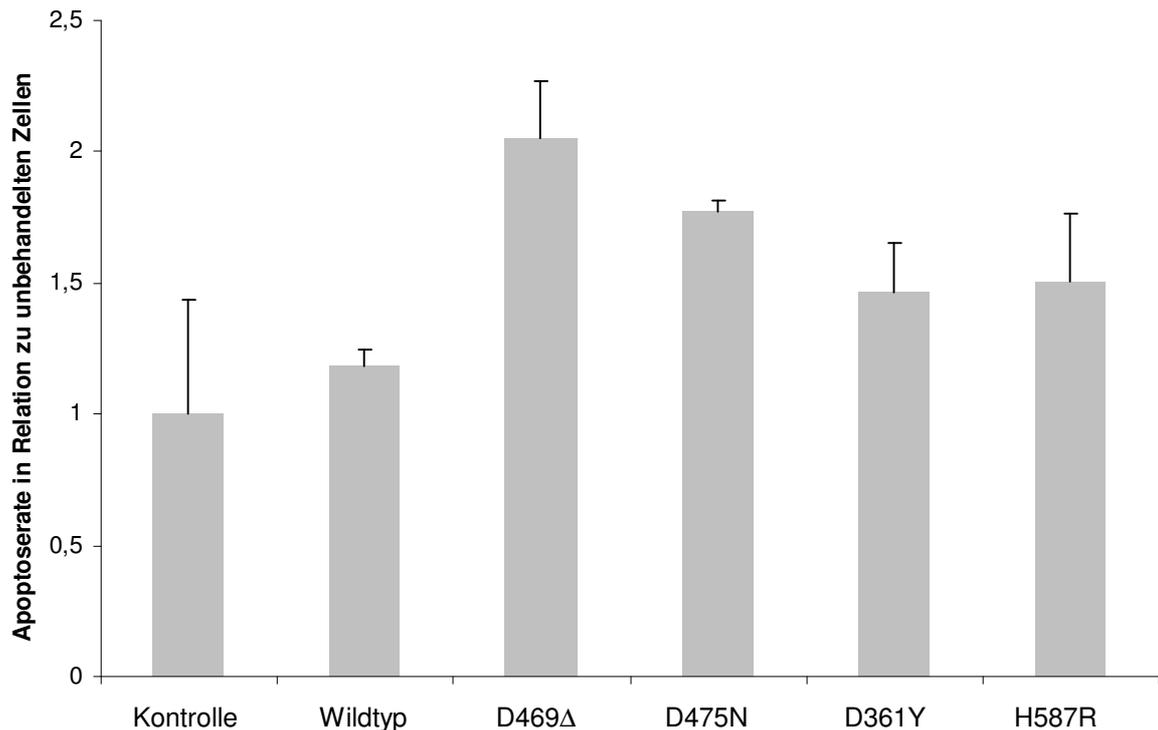


Abbildung 3.36b **Quantitative Auswertung der Annexin V-Markierung**

Die in der FACS-Auswertung des in Abbildung 3.36a durchgeführten Versuches erhaltenen numerischen Werte wurden in einem Diagramm zusammengefaßt, um die relativen Apoptoseraten deutlicher darstellen zu können. Die mit den Krankheits-assoziierten COMP-Mutationen transduzierten Zellen weisen eine deutlich erhöhte Apoptoserate auf. Die Normierung bezieht sich auf die Apoptoserate in Prozent der Gesamtzellzahl bei unbehandelten bovinen Chondrozyten. Die Unterschiede zwischen den unbehandelten und den mit Wildtyp-COMP infizierten Zellen sowie den mit COMP-Mutanten infizierten Zellen sind hoch signifikant ($p < 0,01$).

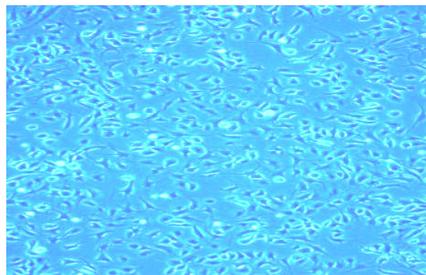
Die Apoptoseraten von unbehandelten Zellen sowie von mit adenoviralem Wildtyp-COMP transduzierten sind vergleichbar. Von den mit den adenoviralen COMP-Mutanten infizierten Chondrozyten wiesen D469Δ mit 7,36% (Faktor 2,05) und D475N mit 6,39% (Faktor 1,8) die höchsten Apoptoseraten auf, während H587R mit 5,4% (Faktor 1,73) und D361Y mit 5,25% (Faktor 1,47) eine niedrigere, aber ähnliche Anzahl an apoptotischen Zellen an der Gesamtzellzahl zeigen.

3.5 Untersuchungen zur Proliferation bei humanen Chondrozyten

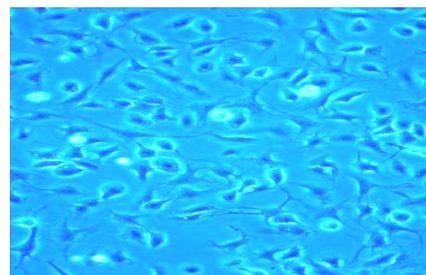
Da in unregelmäßigen Zeitabständen humane Knorpelproben bei Kniegelenkersatzoperationen von Patienten mit Osteoarthrose zur Verfügung standen, sollten daraus ebenfalls Chondrozyten isoliert werden, um mit diesen weitere Untersuchungen durchführen zu können.

3.5.1 Isolation

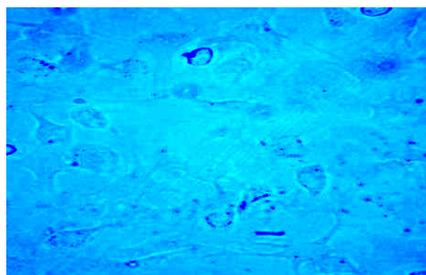
Die Isolation von primären humanen Chondrozyten ließ sich nach dem Protokoll zur Isolation von bovinen Chondrozyten durchführen. Die zur Verfügung stehenden Mengen an humanem Knorpelgewebe waren probenbedingt gering (maximal ein Gramm). Abbildung 3.37 zeigt humane Chondrozyten in Kultur, zwei Tage nach Isolation.



HC 1810 10x



HC 1810 20x



HC 1810 40x

Abbildung 3.37 **Humane Chondrozyten zwei Tage nach Isolation**

Die Isolation wurde nach dem Protokoll zur Isolation boviner Chondrozyten durchgeführt. Die Photographien zeigen humane Chondrozyten zwei Tage nach Isolation im Zustand der Adhärenz bei 10-, 20- sowie 40-facher Vergrößerung. Im Unterschied zu den primär gesunden bovinen Chondrozyten ist hier keine typische Pflasterstein-ähnliche Morphologie zu beobachten, sondern die üblicherweise bereits mit einer Dedifferenzierung einhergehende zipflige Fibroblasten-ähnliche Morphologie.

3.5.2 Proliferation

Nach der erfolgreichen Isolation der humanen Chondrozyten versuchten wir herauszufinden, wie sich die Zellen im Hinblick auf die Proliferation in Kultur verhalten. Dazu wurden die Zellen nach jeder Passage (also bei 70 – 90 % Konfluenz) vor dem Ausplattieren gezählt und die erhaltenen Zahlenwerte in Abhängigkeit von der Zeit in ein Diagramm eingetragen. Dies ergab die in Abbildung 3.38 dargestellte Kurve, welche die Ergebnisse aus zwei Versuchen darstellt.

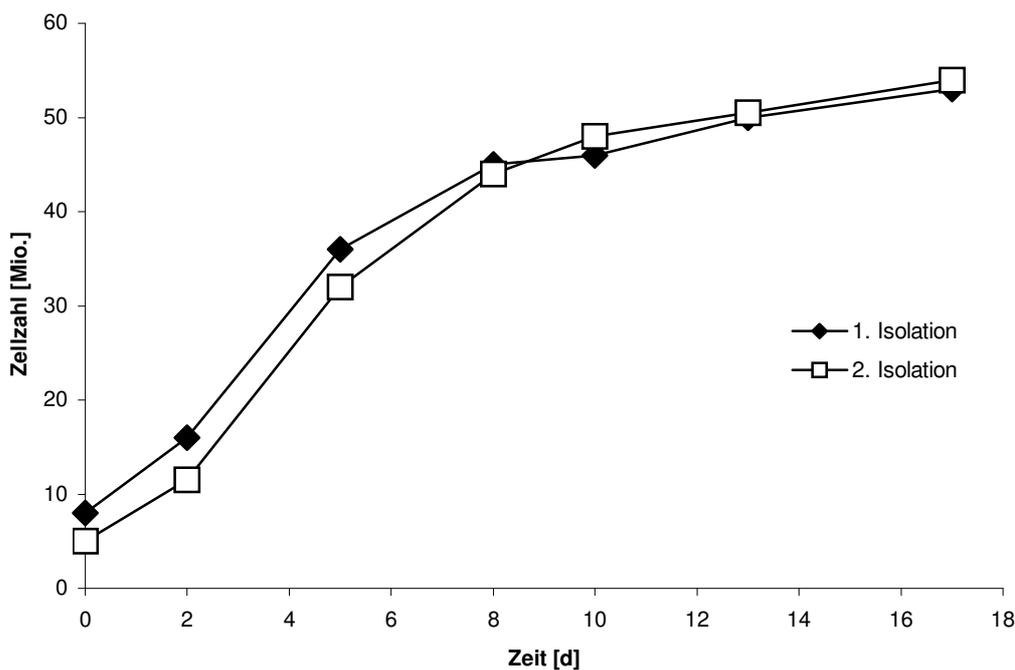


Abbildung 3.38 **Proliferation von humanen Chondrozyten**

Die primären humanen Chondrozyten wurden bei jeder Passage gezählt, um die Proliferationsrate zu ermitteln. Die Proliferation humaner Chondrozyten ab dem Zeitpunkt der Isolation zeigt eine Anlaufphase mit langsamem Wachstum zu Anfang, dann eine schnelle, exponentielle Wachstumsphase von etwa 6 Tagen. Diese Phase geht nach circa dem achten Tag in eine fast stationäre Phase langsamen Wachstums über. Die Anzahl der Zellen vervierfacht sich in den ersten acht Tagen, worauf sich dann eine langsamere Proliferation einstellt.

Die Anzahl der Zellen verdoppelt sich annähernd in den ersten zwei Tagen, worauf sie sich etwa vom zweiten bis zum achten Tag schneller teilen, was einer Vervielfachung der Zellzahl gleichkommt (auf etwa 45 Millionen Zellen). Ab circa dem achten Tag nimmt die Proliferationsrate ab, so dass sich die Zellzahl bis Tag 17 nur langsam auf knapp über 50 Millionen erhöht.

Es sollten zuerst Experimente zur Zellvitalität durchgeführt werden. Dies ließ sich jedoch nicht verwirklichen, da die Knorpelschicht oft fast völlig zerstört war. Die erhaltenen Zellzahlen waren aufgrund des geringen Umfangs der Proben sehr niedrig, so dass die Zellen für längere Zeit hätten kultiviert werden müssen, um ausreichende Zellzahlen zur Verfügung zu haben. Dies war wegen der nach wenigen Tagen eintretenden Zelldifferenzierung in Kultur nicht möglich. Daher wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

4. Diskussion

Die hier untersuchten PSACH-assoziierten COMP-Mutationen führen in Tenozyten und Chondrozyten trotz ähnlicher klinischer Ausprägung zu unterschiedlichen pathogenetischen Entstehungswegen. Die früher als zentrales Merkmal der PSACH aufgefasste Akkumulation von mutiertem COMP im endoplasmatischen Retikulum von Chondrozyten ist weder bei Chondrozyten noch bei Tenozyten für die Krankheitsentstehung notwendig. Die C-terminal gelegene Mutation H587R akkumuliert im Unterschied zu den in den Typ 3-Domänen befindlichen Mutationen D475N und D469 Δ nicht im endoplasmatischen Retikulum von Chondrozyten (Schmitz et al., 2006) und Tenozyten (Weirich et al., 2007), führt aber ebenfalls zu verringerter Vitalität der Zellen und zum apoptotischen Zelltod. Alle Mutationen führen unabhängig vom Sekretionsverhalten zu einer gestörten Kollagenfibrillenstruktur, was auf eine Interaktion von COMP mit Kollagen bei der Ausbildung der Kollagenfibrillen schließen läßt. Die Mutations-abhängigen Effekte sind im wesentlichen zwischen Chondrozyten und Tenozyten gleich. Die durch die mit MED1 assoziierte Mutation D361Y hervorgerufenen Veränderungen sind quantitativ geringer ausgeprägt, entsprechen aber qualitativ den durch die anderen in den Typ 3-Domänen befindlichen hier untersuchten Mutationen.

PSACH wurde bisher als Speicherkrankheit des ER aufgefaßt, da bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen lamelläre Einschlüsse im ER aufgefallen waren (siehe Abb. 4.1). Diese enthielten sowohl COMP als auch andere Proteine (Briggs et al., 1995; Chapman et al., 2001; Cohn et al., 1996; Cooper et al., 1973; Délot et al., 1998 und 1999; Hecht et al., 2001; Hecht et al., 1995; Maddox et al., 1997; Maynard et al., 1972; Spayde et al., 2000; Stanescu et al., 1982; Vranka et al., 2001). Zusätzlich bekannt war eine verzögerte Sekretion von verschiedenen COMP-Mutanten (Dinser et al., 2001).

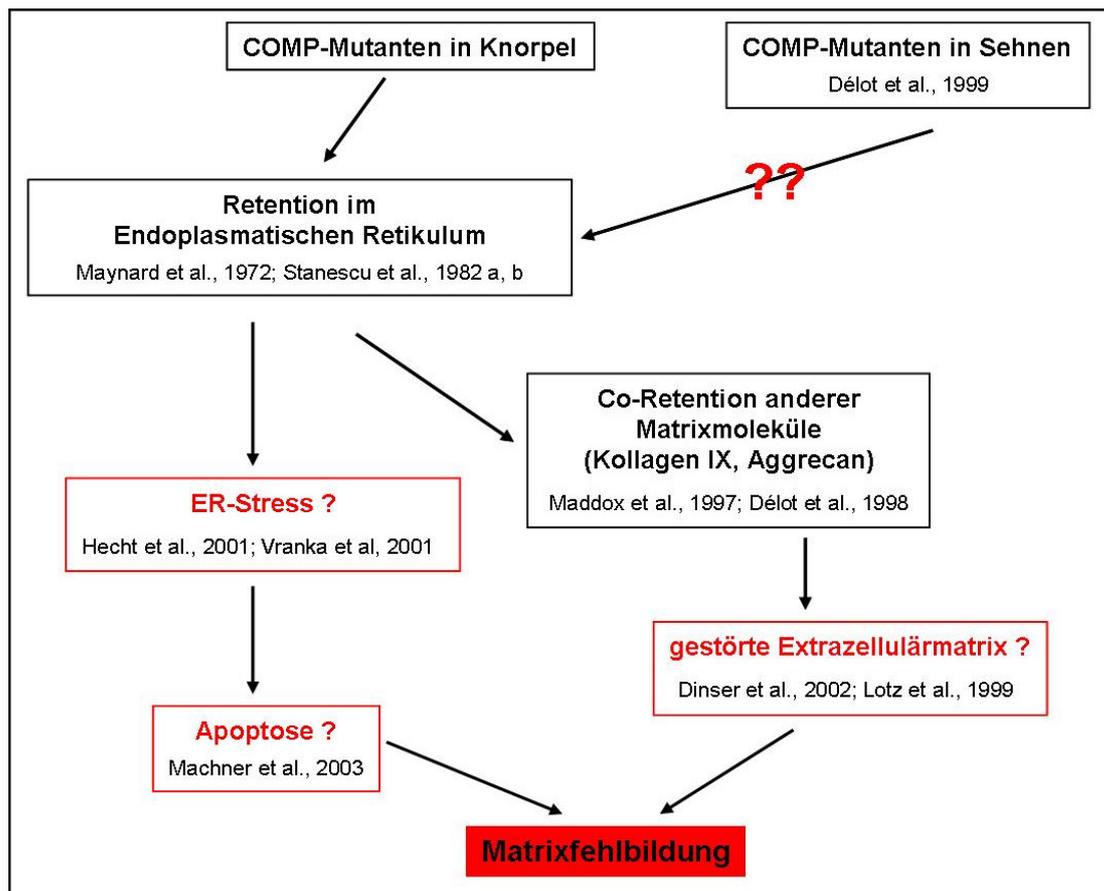


Abb. 4.1: **Übersicht zum Kenntnisstand über Krankheitsentstehung von PSACH / MED 1 zu Beginn dieser Arbeit**

COMP-Mutanten sind mit Einschlüssen im rER von Chondrozyten assoziiert. Ebenso ist eine Co-Retention von anderen Matrixmolekülen zu beobachten. Es konnten verschiedene Chaperone (BiP, Erp72, Grp94, PDI, Calreticulin) in den Einschlüssen nachgewiesen werden. In Knorpelzellen wurde eine veränderte Extrazellulärmatrix beobachtet. Eine durch die intrazelluläre Akkumulation ausgelöste Zellstressreaktion und Apoptoseinduktion wurde postuliert. Über die Pathologie in Sehnen waren widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht.

Ein zur Ausbildung des Krankheitsbildes beitragender Matrixdefekt könnte durch eine vollständige Abwesenheit von COMP oder, angesichts der vorhandenen Sekretion wahrscheinlicher, durch Interaktion von COMP mit Kollagenen hervorgerufen werden. Passend zu dieser Hypothese waren *in vitro* unterschiedliche Bindungsaffinitäten von mutiertem COMP an Kollagen I, II und IX beobachtet worden (Holden et al., 2001; Maddox et al., 2000; Rosenberg et al., 1999; Thur et al., 2001) Dazu lagen zu Beginn dieser Arbeit *in vivo* keine Daten vor. Apoptose war in Knorpelproben von PSACH-Patienten vermutet, jedoch bisher nicht in einen direkten kausalen Zusammenhang mit COMP gebracht worden (Aigner et al., 2002; Duke et al., 2003; Hashimoto et al., 2003; Machner et al., 2003), da sich bei

Patientenproben Reaktionen auf die Knorpeldegeneration mit primären COMP-abhängigen Effekten überlagern.

Über die von COMP-Mutanten hervorgerufenen Effekte in Tenozyten war bisher wenig bekannt. Maynard et al., 1972 und Délot et al., 1998 berichteten über Inklusionen im Zusammenhang mit PSACH. Dies konnte jedoch von anderen Gruppen (Maddox et al., 1997, Hecht et al., 1998) nicht bestätigt werden. Kontrollierte Untersuchungen waren bisher nicht erfolgt.

Die Sekretionskinetik der COMP-Mutanten D475N, D469 Δ , D361Y und H587R ist unterschiedlich (Abschnitt 3.2.3). Die mit der schweren Dysplasieform PSACH assoziierte COMP-Mutante H587R wird ähnlich effizient wie Wildtyp-COMP sezerniert. Die mit MED 1 assoziierte COMP-Mutante D361Y zeigt eine etwas geringere Effizienz bei der Sezernierung als Wildtyp-COMP. Die übrigen untersuchten COMP-Mutanten weisen eine Retention im ER auf. Die COMP-Mutationen D475N, D469 Δ und D361Y betreffen die Typ 3-Domänen. Die Mutationen wirken sich auf die Kalziumbindung (Chen et al., 2000; Hou et al., 2000; Kleerekoper et al., 2002; Maddox et al., 2000; Thur et al., 2001) und die dreidimensionale Struktur des Proteins aus (Thur et al., 2001). Die COMP-Mutante H587R befindet sich in der globulären TC-Domäne. Sie betrifft eine vermutete Kollagenbindungsstelle ohne Veränderung der Kalziumbindung (Rosenberg et al., 1998; Spitznagel et al., 2004). Vermutlich werden die Mutationen in den Typ 3-Domänen über die Deformierung der dreidimensionalen Proteinstruktur im ER zurückgehalten (Thur et al., 2001). Die Mutation in der TC-Domäne hat keine Änderung der Calciumbindung trotz diskreter Konformationsänderung zur Folge (Spitznagel et al., 2004). Sie wird vermutlich deswegen nicht intrazellulär zurückbehalten. Die Ergebnisse der Sekretionskinetik sowie der Proliferation konnten in COS-7 A2-Zellen bestätigt werden (Abschnitt 3.3). Somit ist die Sekretionskinetik entgegen Chen et al., 2004 anscheinend nicht zellspezifisch.

Die Extrazellulärmatrix der mit COMP-Mutanten infizierten Tenozyten zeigt eine gestörte Matrixausbildung (Abschnitt 3.2.5). Diese betrifft die Verteilung und Co-Lokalisation von COMP und Kollagen I. Die aus Kollagen I bestehenden Fibrillen sind bei den COMP-Mutanten unabhängig vom Sekretionsverhalten dünner und unregelmäßiger angeordnet als bei Wildtyp-COMP. Bei der Mutation H587R ist die mutmaßliche Kollagenbindungsstelle (Holden et al., 2001) durch die Mutation verändert (Spitznagel et al., 2004), was die Veränderung der Kollagenfibrillenstruktur

erklären könnte. Die in der Typ 3-Domäne lokalisierten COMP-Mutationen sind hier ebenfalls mit Kollagenfibrillenstörungen vergesellschaftet und in vitro auch mit veränderter Bindung an die Kollagene I, II und IX assoziiert (Holden et al., 2001; Thur et al., 2001). Hier ist die veränderte Bindungsfähigkeit vermutlich über die dreidimensionale Konformationsänderung erklärbar (Thur et al., 2001).

Alle COMP-Mutanten wirken toxisch auf die Zelle (Abschnitt 3.2.4), was in verringerter Proliferationsrate (Abschnitt 3.2.4.1), erhöhter Nekroserate (Abschnitt 3.2.4.2) und Induktion von Apoptose (Abschnitt 3.2.4.3) resultiert. Dieser Effekt ist bei bovinen Chondrozyten (Abschnitt 3.4.2) und Tenozyten (Abschnitt 3.2.4) gleichermaßen zu beobachten. Es ist gegenwärtig noch unklar, über welche Signalwege die verschiedenen COMP-Mutanten Apoptose vermitteln. Verschiedene Hypothesen sind denkbar:

- Angesichts der beobachteten Kolo-kalisation von Zellstressproteinen (Vranka et al., 2001; Chen et al., 2004; Hecht et al., 2001) könnten die retinierten COMP-Mutanten selbst und über die Co-Retention von Aggrecan, Decorin, Fibromodulin und Kollagenen (Délot et al., 1998; Maddox et al., 1997; Spayde et al., 2000; Stanescu et al., 1982) die Aktivierung der sogenannten „Unfolded Protein Response“ als Zellstressreaktion auslösen. Dazu passt die durch D475N, aber nicht durch H587R induzierte Hochregulation von Zellstressproteinen wie Grp78, Grp 94, HSP 47 und Calnexin (Kathrin Anna, unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe). Darüber könnte ein apoptotischer Reiz ausgelöst werden. Die beobachtete Apoptoseinduktion, die auch bei der Mutation H587R beobachtet wurde, muß allerdings andere Ursachen haben (Susin et al., 2000). Hier wäre eine gestörte Zell-Matrix-Interaktion als Auslöser denkbar.
- Die COMP-Mutanten induzieren in Chondrozyten eine verminderte Adhäsionsfähigkeit (Schmitz et al., 2006). Durch die veränderte Ausbildung der Kollagenfibrillen ist eine Veränderung der zellulären Integrin-vermittelten Matrixbindung denkbar (Cao et al., 1999; Chen et al., 2005; Hirsch et al., 1997; Lo et al., 2004; Terpstra et al., 2003). Integrine sind im Aktin-Zytoskelett verankerte Transmembranproteine (Buck et al., 1987; Burrige et al., 1988; Hynes, 1987; Ruoslahti, 1991) und binden Ca^{2+} - oder Mg^{2+} -abhängig an Proteine der Extrazellulärmatrix wie Kollagene, Laminin oder Fibronectin (Enomoto et al., 1993). Die Integrinaktivität kann durch die Zelle geregelt

werden. Integrine vermitteln die gegenseitige Beeinflussung von Zytoskelett und Extrazellulärmatrix (Burrige et al., 1988; Turner et al., 1991). Die Moleküle der extrazellulären Matrix wiederum sind in der Lage, intrazelluläre Signalkaskaden über Integrine zu beeinflussen (Cary et al., 1999; Damsky et al., 1992; Ginsberg et al., 1992; Hynes, 1992; Sastry et al., 1993; Schwartz, 1992). Die gestörte Extrazellulärmatrix könnte also durch Beeinflussung der Integrinbindung (z.B. $\alpha_5\beta_1$ - oder $\alpha_v\beta_3$ -Integrin) über die beobachtete Verringerung der Adhäsionsfähigkeit zur Apoptose führen (Bates et al., 1994; Frisch et al., 1994; Meredith et al., 1993; Mc Gillen et al., 1997; Ruoslahti et al., 1994). Es wurde bereits gezeigt, dass COMP die Anhaftung von Chondrozyten kalziumabhängig über diesen Weg unterstützt (Chen et al., 2005; Di Cesare et al., 1994). Matrixveränderungen hervorrufende COMP-Mutanten könnten daher eine Apoptoseauslösung in der Zelle bedingen.

Diese Fragestellung könnte mit Untersuchungen zum Vorkommen verschiedener Caspasen bearbeitet werden. Über die Unfolded Protein Response könnte eine Aktivierung von Caspase-9 zu beobachten sein. Diese wird über intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst, an denen das B-Zell-Lymphom-2 (Bcl-2) und Apoptotic Protein Associated Factor 1 (APAF-1) beteiligt sind. Caspase-9 löst dann über weitere Signalwege die Aktivierung der Effektorcaspase Caspase-3 aus (Cho et al., 2002; Kim et al., 2006). Die extrazelluläre Aktivierung des Rezeptors für Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α ; Lopez-Armada et al., 2006) führt zur Aktivierung der an den Rezeptor angelagerten Todesdomäne (TRADD). Die dadurch ausgelöste Signalkaskade resultiert in der Aktivierung von Caspase-8, welche über weitere Signalwege Caspase-3 aktiviert. Der Nachweis der Aktivierung von Initiator-Caspasen könnte also auf verschiedene Apoptosewege schließen lassen. Die Aktivierung der Caspase 8 steht für einen extrinsischen, Caspase 9 für einen intrinsischen Weg der Einleitung von Apoptose (D'Lima et al., 2001; Matsuo et al., 2001). Damit könnten die offenen Fragen zur zellexternen oder zellinternen Auslösung von Apoptose beantwortet werden.

Die Unterscheidung der pathogenetischen Apoptoseinduktion und die gestörte Extrazellulärmatrix haben potentielle therapeutische Bedeutung. Wenn PSACH, wie

bisher angenommen, eine Speicherkrankheit des ER wäre, könnte eine verbesserte Sekretion des retinierten Proteins durch Einsatz chemischer Chaperone eine Minderung der Erkrankungsschwere bewirken (Brown et al., 1996; Burrows et al., 2000; Fan et al., 1999; Futami et al., 2000; Mogk et al., 2001; Yam et al., 2005). Chaperone sind Proteine, die eine korrekte Proteinfaltung unterstützen und dabei eine Aggregation verhindern. So konnte durch Einsatz chemischer Chaperone wie Glycerol die korrekte Prozessierung des cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein (CFTR) in die CFTR-Mutante $\Delta F508$ exprimierenden Zellen erreicht werden (Brown et al., 1996). Diese CFTR-Mutante ist assoziiert mit der Cystischen Fibrose und akkumuliert im ER in Verbindung mit Calnexin und HSP73. Die CFTR-Mutante kann somit ihre Funktion als Ionenkanal für Chloridionen nicht ausüben. Die vorliegenden Daten dokumentieren jedoch einen schädlichen Effekt des extrazellulär anwesenden mutierten COMP unabhängig vom Sekretionsverhalten, so dass der obige Therapieansatz wirkungslos wäre. An aktuellen Daten kann als sinnvolle Therapiestrategie nur die Verminderung der extrazellulären COMP-Menge abgeleitet werden. Die fehlende Matrixstörung bei der COMP-Knockout-Maus (Svensson et al., 2002) spricht für eine Kompensationsmöglichkeit bei fehlendem COMP. In Kultur wären Ansätze wie vermehrte Degradation von COMP oder siRNA-Regulation denkbar, sie sind jedoch im Organismus bisher nicht anwendbar.

Bei den Alginkulturen mit bovinen Chondrozyten war bei Manipulation der Eindruck entstanden, dass die COMP-Mutanten enthaltenden Alginate geringer belastbar waren als die Alginkulturen von Wildtyp-COMP. Diese Beobachtung würde zur Theorie von COMP-Mutanten verursachten Matrixschwäche passen (Jenniskens et al., 2006, Poster; Williams et al., 2005). Die Messung von Tensions- bzw. Kompressionsmodulen (Ker, 1999; Kjaer, 2004; Thermopoulos et al., 2003) könnte möglicherweise Aufschlüsse über diese Frage geben.

Durch Gentransfer wurde in dieser Arbeit das transferierte COMP-Protein überexprimiert (Abschnitte 3.1.4 und 3.2.3.2). In Chondrozyten wird bei adenoviraler Transduktion mit 20 MOI ein Verhältnis von endogenem zu exogenem COMP von 1:1 erreicht. In Tenozyten wird aufgrund der niedrigeren endogenen COMP-Expression dabei eine etwa 100-fache Überexpression erreicht. Die fehlende Pathologie bei Überexpression des Wildtyp-Proteins beweist, dass die beobachteten

Effekte der COMP-Mutanten Mutations-spezifisch sind und nicht allein durch die Überexpression erklärt werden können. Zusätzlich kommt es in vivo physiologischerweise zur Hochregulation der COMP-Expression bei Belastung und im juvenilen Gewebe (Thomopoulos et al., 2003). Es ist daher denkbar, dass die hier erzielte Überexpression den Bedingungen in vivo unter bestimmten Umständen entspricht, die von den oben erwähnten Faktoren vorgegeben werden.

Ein anderes Problem stellt die Dedifferenzierung der Zellen in Monolayerkultur dar (Abbot et al., 1966; Benya et al., 1978; Bernard-Beaubois et al., 1997; Schulze-Tanzil et al., 2004; Von der Mark et al., 1977; Yao et al., 2006; Zaucke et al., 2001). Der Änderung des Phänotyps bei zu hoher Passagenanzahl kann durch entsprechende Kulturbedingungen entgegengewirkt werden (bei Chondrozyten durch Alginatekultur; Benya et al., 1982; Häuselmann et al., 1994). Ist dies nicht möglich, ist eine schnelle Verarbeitung notwendig. Bei Tenozyten sind diesbezüglich keine systematischen Untersuchungen bekannt. Die hier verwendeten Zellen wurden maximal fünfmal passagiert, um das Ausmaß der Dedifferenzierung zu minimieren. Unter den hier verwendeten Kulturbedingungen konnte eine Expression typischer Markerproteine für Sehnenzellen während des gesamten Kulturzeitraumes nachgewiesen werden.

Auch die Natur des Signalpeptides kann das Sekretionsverhalten beeinflussen (Holden et al., 2005). In COS 7-Zellen wurde unter Verwendung des BM 40-Signalpeptides im Vergleich zum endogenen COMP-Promotor gezeigt, dass die Retention der COMP-Mutation D469 Δ geringer ausgeprägt ist. Diese quantitativen Sekretionsunterschiede stellen die in dieser Arbeit gemachte qualitative Aussage jedoch nicht in Frage.

Das dieser Arbeit zugrunde liegende Modell ist dazu geeignet, in kurzer Zeit Aussagen über die Effekte zahlreicher Mutationen zu erhalten und therapeutische Hypothesen zu testen. Proben von Patienten mit PSACH erlauben nur deskriptive Untersuchungen, da die beobachteten Veränderungen über direkte COMP-assoziierte Effekte als auch über sekundäre Arthrose-bedingte Reaktionen entstehen können. Weiterhin sind Proben von Patienten ohne COMP-assoziierte Erkrankung in der Qualität sehr unterschiedlich, da die Knorpelschicht meist schwer degradiert und die Zellen entsprechend angegriffen sind. Reproduzierbare Aussagen können somit mit humanem Material nur schwer getroffen werden. Bovines Zellmaterial ist hingegen leicht zu beschaffen. Eine parallele Untersuchung vieler verschiedener

COMP-Mutanten kann mit diesem Material umgesetzt werden. Die Kultivierung primären bovinen Zellmaterials macht die Kultur von Zellpopulationen mit der damit einhergehenden Heterogenität der Eigenschaften überflüssig. Die Tiere sind bei Schlachtung nicht älter als drei Jahre und weisen gesundes Gewebe auf. Beobachtbare Veränderungen kommen nur selten vor und sind in Ausdehnung und Schwere der Knorpeldegradation in keiner Weise mit Patientenproben zu vergleichen. Das Modell kann zusätzlich auf die Untersuchung anderer Chondrodysplasien übertragen werden.

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit Isolation und Kultivierung boviner Tenozyten (Abschnitt 2.2.1.1) sowie der Gentransfer mittels adenoviraler Vektoren etabliert (Abschnitt 3.1), so dass eine dosisabhängige Manipulation der Sehnenzellen durchgeführt werden konnte (Abschnitt 3.1.3.4). Die Untersuchungen bei Tenozyten und Chondrozyten ergaben, dass alle COMP-Mutanten Apoptose induzieren, obwohl sie unterschiedliche Sekretionskinetiken aufweisen. Alle PSACH-assoziierten COMP-Mutanten führen zur Veränderung der Kollagenfibrillenstruktur und zwar unabhängig vom Sekretionsverhalten. Matrixveränderungen und Apoptose wurden somit als zentrale Mechanismen der Pathogenese COMP-assoziiierter Chondrodysplasien herausgearbeitet (siehe Abb. 4.2)

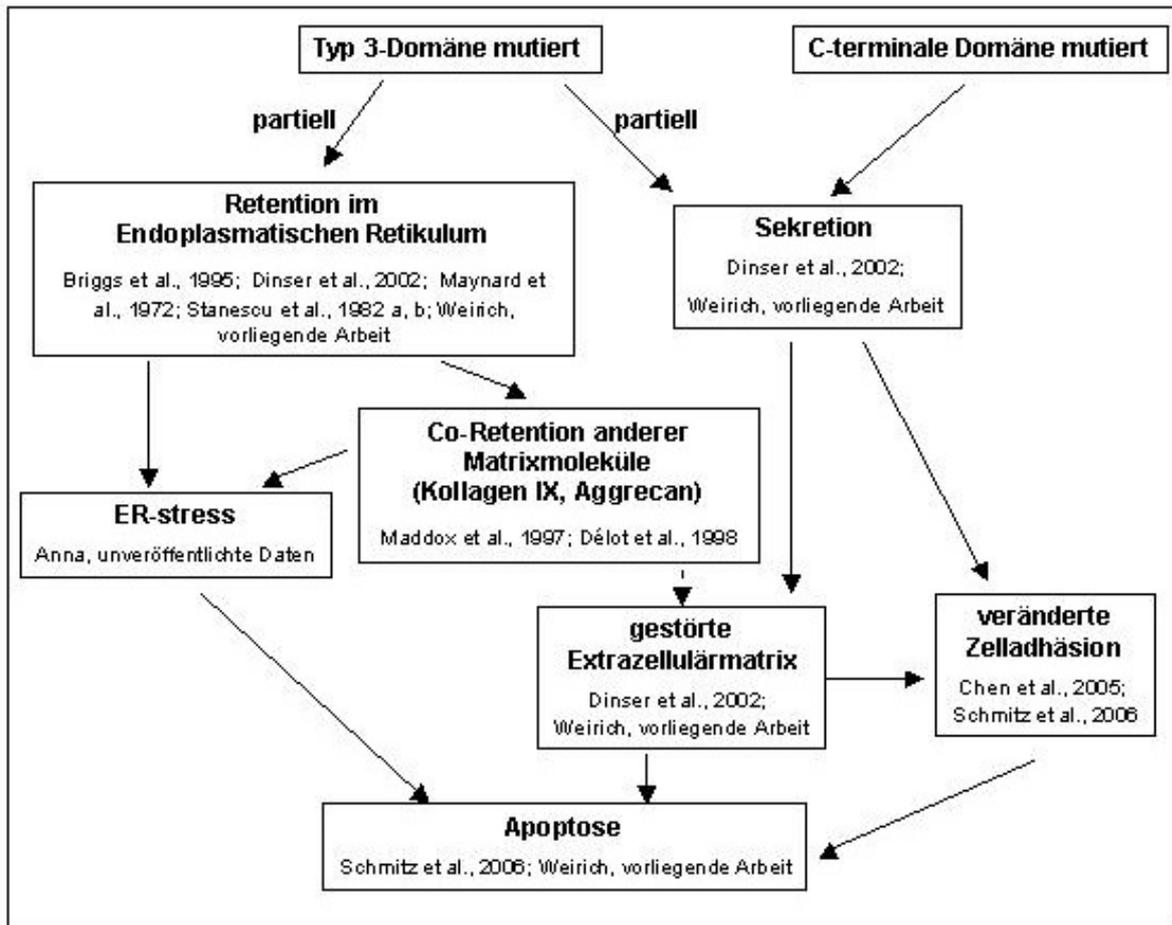


Abb. 4.2 **Übersicht zum aktuellen Kenntnisstand über die Krankheitsentstehung von PSACH / MED 1**

Die aktuelle Datenlage über die Auswirkungen der COMP-Mutanten sowohl im Knorpel als auch in der Sehne ist in dieser Abbildung zusammengefasst. Für Chondrozyten sowie Tenozyten wurden ähnlich geartete Mechanismen zur Pathogenese gezeigt. Die Expression von Zellstreßproteinen konnte nachgewiesen werden. Die COMP-Mutanten induzieren hierbei eine Störung der Kollagenfibrillenbildung und eine veränderte Zelladhäsion. Apoptose ist somit ein zentraler pathophysiologischer Mechanismus COMP-assoziiierter Dysplasien.

5. Zusammenfassung

PSACH und MED 1 sind autosomal dominant vererbte Krankheiten, die Minderwuchs, Fehlbildungen des Binde- und Stützgewebes sowie früh beginnende Arthrose auslösen. Die Ausprägung beider Krankheiten weist viele Abstufungen und Überschneidungen auf. Sie sind mit Mutationen in COMP, einem homopentameren Glykoprotein der Thrombospondinfamilie, assoziiert. COMP wird in Knorpel, Bändern und Sehnen gebildet. Die COMP-Mutationen sind meist in den Ca^{2+} -bindenden Typ 3-Motiven lokalisiert und wirken sich auf die Struktur der exprimierten Proteine aus; vereinzelt sind Mutationen auch in der globulären TC-Domäne zu finden. Die genaue Funktion von COMP ist bisher noch unklar.

Für die vorliegende Arbeit wurden die Eigenschaften von vier mit PSACH bzw. MED 1 assoziierten COMP-Mutationen (D361Y, D469 Δ , D475N und H587R) sowie Wildtyp-COMP im bovinen Zellkulturmodell untersucht. Die Isolation sowie die Kultivierung boviner Tenozyten wurde etabliert, ebenso der Gentransfer mittels adenoviraler Vektoren. Die COMP-Varianten wurden nach adenoviralem Gentransfer in Tenozyten und Chondrozyten mit dem Ziel, den pathogenetischen Weg darzustellen, exprimiert. Dazu wurden, basierend auf vorangegangenen Versuchen mit bovinen Chondrozyten, Experimente zur Zellvitalität, Sekretion, Apoptose sowie zur Beschaffenheit der Extrazellulärmatrix durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Effekte von mutiertem COMP auf die Sekretionskinetik und die zelluläre Proliferation zellartunabhängig sind, da diese Versuche bei bovinen Chondrozyten, Tenozyten und COS-7 A2-Zellen vergleichbare Resultate erbrachten. Die Sekretionskinetik der verschiedenen mit PSACH assoziierten COMP-Mutanten ist unterschiedlich. Teils weisen die Mutanten verzögerte (D475N, D469 Δ , D361Y), teils normale Sekretion auf (H587R). Die Proliferationsrate ist bei allen COMP-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp erniedrigt. Erhöht sind dagegen die Nekrose- sowie die Apoptoserate. Die Matrixorganisation aller mit adenoviralen COMP-Mutanten infizierten Zellen ist gestört, was sich in COMP-Verklumpungen, desorganisierten Kollagen I-Netzwerken sowie veränderten Kollagenfibrillen äußert.

Die zur Ausbildung der Krankheiten führenden Mechanismen sind bei den betrachteten COMP-Mutanten trotz unterschiedlichem Sekretionsverhalten ähnlich. Apoptose ist ein wichtiger pathogenetischer Aspekt, obgleich die Wege der Apoptoseinduktion bei den einzelnen COMP-Mutanten verschieden sein dürften. Ebenso ist die Organisation von COMP und Kollagen I in der Extrazellulärmatrix der COMP-Mutanten exprimierenden Zellen verändert. Insgesamt konnten Matrixveränderungen und Apoptose als zentrale Mechanismen der Pathogenese COMP-assoziiierter Chondrodysplasien herausgearbeitet werden.

6. Anhang

Abkürzungen

AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
rER	rauhes Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
LDH	Lactatdehydrogenase
MED 1	Multiple Epiphyseäre Dysplasie Typ 1
M	mol
mM	Millimol
μM	Mikromol
MOI	Moiety of infection
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFU	Plaque Forming Unit
ppm	parts per million
PSACH	Pseudoachondroplasie
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR
TCID 50	Tissue Culture Infectious Dose 50

Tabelle 6.1 Tabelle von bei PSACH und MED nachgewiesenen COMP-Mutationen

Aminosäure	Diagnose	Lokalisation	Referenz
E341 – D342Δ	PSACH	1. Typ 3-Motiv	Kennedy et al., 2005
D271H	PSACH	1. Typ 3-Motiv	Deere et al., 1999
L272P	PSACH	1. Typ 3-Motiv	Deere et al., 1999
P276R	MED	1. Typ 3-Motiv	Czamy-Ratajczak et al., 2001
D277 – P283Δ	PSACH	1. Typ 3-Motiv	Kennedy et al., 2005
D290N	PSACH (mild)	1. Typ 3-Motiv	Ikegawa et al., 1998
C292W	PSACH	1. Typ 3-Motiv	Deere et al., 1999
S298L	PSACH	2. Typ 3-Motiv	Kennedy et al., 2005
G299R	PSACH (mild)	2. Typ 3-Motiv	Ikegawa et al., 1998
D302V	MED	2. Typ 3-Motiv	Deere et al., 1999
G309R	PSACH	2. Typ 3-Motiv	Délot et al., 1999 ; Nakayama et al., 2003
D310V	MED	2. Typ 3-Motiv	Kennedy et al., 2005
C328R	PSACH	3. Typ 3-Motiv	Briggs et al., 1995
E341 – D342Δ	PSACH	3. Typ 3-Motiv	Kennedy et al., 2005
D342Y	MED Fairbank	3. Typ 3-Motiv	Briggs et al., 1995; Cohn et al. 1996
D349G	PSACH (mild)	3. Typ 3-Motiv	Ikegawa et al., 1998
C351Y	PSACH	3. Typ 3-Motiv	Mabuchi et al., 2003
D361V	MED Fairbank	4. Typ 3-Motiv	Ikegawa et al., 1998
D361Y	MED	4. Typ 3-Motiv	Loughlin et al., 1998
G366R	MED	4. Typ 3-Motiv	Kennedy et al., 2005
D367-G368Δ	MED	4. Typ 3-Motiv	Loughlin et al., 1998
G368R	MED	4. Typ 3-Motiv	Kennedy et al., 2005
C371S	MED Fairbank	4. Typ 3-Motiv	Susic et al., 1997
D372Δ	PSACH	4. Typ 3-Motiv	Briggs et al., 1995; Briggs et al., 1998; Cohn et al. 1996
D376V	PSACH	4. Typ 3-Motiv	Kennedy et al., 2005
D378Y	MED	4. Typ 3-Motiv	Kennedy et al., 2005
D385N	MED	4. Typ 3-Motiv	Kennedy et al., 2005; Mabuchi et al., 2003
N386Δ	MED	4. Typ 3-Motiv	Kennedy et al., 2005
C387G	PSACH (mild)	4. Typ 3-Motiv	Ikegawa et al., 1998
I P391-D394D I ∇V	PSACH	5. Typ 3-Motiv	Loughlin et al., 1998
Q395-D397Δ	PSACH	5. Typ 3-Motiv	Deere et al., 1999
D399N	MED	5. Typ 3-Motiv	Kennedy et al., 2005
D401N	MED	5. Typ 3-Motiv	Kennedy et al., 2005
C407F	MED	5. Typ 3-Motiv	Kennedy et al., 2005
D408Y	MED	5. Typ 3-Motiv	Loughlin et al., 1998
G427E	PSACH	6. Typ 3-Motiv	Deere et al., 1998 ; Délot et al., 1998 ; Loughlin et al., 1998
D437G	PSACH	6. Typ 3-Motiv	Deere et al., 1999
D439N	MED	6. Typ 3-Motiv	Kennedy et al., 2005
G440R	PSACH	6. Typ 3-Motiv	Briggs et al., 1998 ; Loughlin et al., 1998
G440E	PSACH	6. Typ 3-Motiv	Briggs et al., 1998 ; Cohn et al., 1996 #419
D446N	PSACH	6. Typ 3-Motiv	Délot et al., 1998; Maddox et al., 1997
P449T	PSACH	6. Typ 3-Motiv	Deere et al., 1998
N453S	MED Fairbank	7. Typ 3-Motiv	Briggs et al., 1998 ; Cohn et al., 1996
S454R	MED	7. Typ 3-Motiv	Kennedy et al., 2005
E457Δ	PSACH	7. Typ 3-Motiv	Ferguson et al., 1997
S459Δ	PSACH	7. Typ 3-Motiv	Hecht et al., 1995
G465R	PSACH	7. Typ 3-Motiv	Kennedy et al., 2005
D469Δ	PSACH	7. Typ 3-Motiv	Briggs et al., 1998 ; Cohn et al., 1996 ; Deere et al., 1998 ; Hecht et al., 1995 ; Hecht et al., 1998 ; Ikegawa et al., 1998
D469∇ D	MED	7. Typ 3-Motiv	Cohn et al., 1996; Délot et al., 1998
D469∇ DD	PSACH (schwer)	7. Typ 3-Motiv	Délot et al., 1998
DD469-473Δ	PSACH	7. Typ 3-Motiv	Song et al., 2003
D471G	PSACH	7. Typ 3-Motiv	Kennedy et al., 2005
D472Y	PSACH	7. Typ 3-Motiv	Hecht et al., 1995
D473G	PSACH (schwer)	7. Typ 3-Motiv	Ikegawa et al., 1998
D473Y	PSACH	7. Typ 3-Motiv	Song et al., 2003
D473N	PSACH	7. Typ 3-Motiv	Deere et al., 1998
D475N	PSACH	7. Typ 3-Motiv	Deere et al., 1998
D479H	MED	7. Typ 3-Motiv	Kennedy et al., 2005
D479T	PSACH	7. Typ 3-Motiv	Kennedy et al., 2005
D482G	PSACH	7. Typ 3-Motiv	Susic et al., 1998
D482H	PSACH	7. Typ 3-Motiv	Song et al., 2003
Q492P	MED	7. Typ 3-Motiv	Kennedy et al., 2005
C504S	PSACH	8. Typ 3-Motiv	Kennedy et al., 2005
D507G	PSACH	8. Typ 3-Motiv	Deere et al., 1998
D509A	PSACH	8. Typ 3-Motiv	Deere et al., 1998
D509G	PSACH	8. Typ 3-Motiv	Deere et al., 1998
A510 – 513V Δ	PSACH	8. Typ 3-Motiv	Kennedy et al., 2005
D511H	PSACH	8. Typ 3-Motiv	Deere et al., 1998

V513-K516Δ	PSACH (mild)	8. Typ 3-Motiv	Susic et al., 1997
D518N	PSACH	8. Typ 3-Motiv	Deere et al., 1998 ; Ikegawa et al., 1998
D518H	PSACH	8. Typ 3-Motiv	Deere et al., 1999
D518G	PSACH	8. Typ 3-Motiv	Kennedy et al., 2005
N523K	MED Ribbing	8. Typ 3-Motiv	Ballo et al., 1997
T527A	PSACH	8. Typ 3-Motiv	Hecht et al., 1998
T529I	PSACH	TC-Domäne	Kennedy et al., 2005
N555K	MED	TC-Domäne	Kennedy et al., 2005
N555L	MED	TC-Domäne	Kennedy et al., 2005
E583K	PSACH	TC-Domäne	Deere et al., 1999
T585M	PSACH (mild)	TC-Domäne	Briggs et al., 1998
T585R	MED	TC-Domäne	Briggs et al., 1998
H587R	PSACH	TC-Domäne	Deere et al., 1998
D605N	MED	TC-Domäne	Kennedy et al., 2005
S681C	MED	TC-Domäne	Kennedy et al., 2005
R718W	MED	TC-Domäne	Jakkula et al., 2003; Mabuchi et al., 2003
R718P	MED	TC-Domäne	Kennedy et al., 2005
G719S	PSACH	TC-Domäne	Kennedy et al., 2005

7. Literatur

- Aigner T, Kim AH. (2002) Apoptosis and cellular vitality. Issues in Osteoarthritic cartilage degeneration. *Arthritis Rheum.*, 46, 1986-1996
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson DW. (1994) *Molecular biology of the cell*. Garland Publishin Inc., New York, USA
- Amiel D, Frank C, Harwood F, Fronck J, Akeson W. (1984) Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison. *J. Orthop. Res.*, 1, 257-265
- Ballo R, Briggs MD, Cohn DH, Knowlton RG, Beighton PH, Ramesar RS. (1997) Multiple epiphyseal dysplasia, ribbing type: a novel point mutation in the COMP gene in a South African family. *Am. J. Med. Genet.*, 68, 396-400
- Bates RC, Buret A, van Helden DF, Horton MA, Burns GF. (1994) Apoptosis induced by inhibition of intercellular contact. *J. Cell Biol.*, 125, 403-415
- Battinelli E, Loscalzo J. (2000) Nitric oxide induces apoptosis in megakaryocytic cell lines. *Blood*, 95, 3451–3459
- Becker A. (2002) *Transgene Modelle zur Untersuchung von Chondrodysplasien*. Diplomarbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln, Deutschland
- Bernard-Beaubois K, Hecquet C, Houcine O, Hayem G, Adolphe M. (1997) Culture and characterization of juvenile rabbit tenocytes. *Cell Biol. Toxic.*, 13, 103-113
- Briggs MD, Rasmussen MI, Weber JL, Yuen J, Reinker K, Garber AP, Rimoin DL, Cohn DH. (1993) Genetic linkage of mild pseudoachondroplasia (PSACH) to markers in the pericentromeric region of chromosome 19. *Genomics*, 18, 656-660
- Briggs MD, Choi H-C, Warman ML, Loughlin JA, Wordsworth P, Sykes BC, Irvn CMM, Smith M, Wynne-Davies R, Lipsom MH, Biesecker LG, Garber AP, Lachmann R, Olsen BR, Rimoin DL, Cohn DH. (1994) Genetic mapping of a locus for multiple epiphyseal dysplasia (EDM2) to a region of chromosome 1 containing a type IX collagen gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 55, 678-684
- Briggs MD, Hoffmann SM, King LM, Olsen AS, Mohrenweiser H, Leroy JG, Mortier GR, Rimoin DL, Lachmann RS, Gaines ES, Cekleniak JA, Knowlton RG, Cohn DH. (1995) Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia due to mutations in the cartilage oligomeric matrix protein gene. *Nat. Genet.*, 10, 330-336
- Briggs MD, Mortier GR, Cole WG, King LM, Golik SS, Bonaventure J, Nuytinck L, De Paepe A, Leroy JG, Biesecker L, Lipson M, Wilcox WR, Lachmann RS, Rimoin DL, Knowlton RG, Cohn DH. (1998) Diverse mutations in the gene for cartilage oligomeric matrix protein in the pseudoachondroplasia-multiple epiphyseal dysplasia disease spectrum. *Am. J. Hum. Genet.*, 62, 311-319

- Brookes PS, Salinas EP, Darley-USmar K, Eiserich JP, Freeman BA, Darley-USmar VM, et al. (2000) Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. *J. Biol. Chem.*, 275, 20474–20479
- Brown CR, Hong-Brown LQ, Biwersi J, Verkman AS, Welch WJ. (1996) Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the $\Delta F508$ cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell Stress Chap.*, 1, 117-125
- Brown GC. Nitric oxide and mitochondrial respiration. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, 1411, 351–369
- Bruckner P, van der Rest M. (1994) Structure and function of cartilage collagens. *Microsc. Res. Tech.*, 28, 378-384
- Buck CA, Horwitz AF. (1987) Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 3, 179-205
- Budde B, Blumbach K, Ylöstalo J, Zaucke F, Ehlen HWA, Wagener R, Ala-Kokko L, Paulsson M, Bruckner P, Grässel S. (2005) Altered integration of matrilin-3 into cartilage extracellular matrix in the absence of collagen IX. *Mol. Cell Biol.*, 25, 10465-10478
- Burridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, Turner C. (1988) Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev., Cell Biol.*, 4, 487-526
- Burrows JAJ, Willis LK, Perlmutter DH. (2000) Chemical chaperones mediate increased secretion mutant $\alpha 1$ -antitrypsin ($\alpha 1$ -AT) Z: A potential pharmacological strategy for prevention of liver injury and emphysema in $\alpha 1$ -AT deficiency. *PNAS*, 97, 1796-1801
- Butler DL, Grood ES, Noyes FR, Zernicke RF. (1978) Biomechanics of ligaments and tendons. *Exerc. Sport Sci. Rev.*, 6, 125-181
- Cao L, Lee V, Adams ME, Kiani C, Zhang Y, Hu W, Yang BB. (1999) $\beta 1$ -Integrin-collagen interaction reduces chondrocyte apoptosis. *Matrix Biol.*, 18, 343-355
- Cary LA, Han DC, Guan JL. (1999) Integrin-mediated signal transduction pathways. *Histol. Histopathol.*, 14, 1001-1009
- Chapman KL, Mortier GR, Chapman K, Loughlin J, Grant ME, Briggs MD. (2001) Mutations in the region encoding the von Willebrand factor A domain of matrilin-3 are associated with multiple epiphyseal dysplasia. *Nat. Genet.*, 28, 393-396
- Chapman KL, Briggs MD, Mortier GR. (2003) Review: clinical variability and genetic heterogeneity in multiple epiphyseal dysplasia. *Pediatr. Pathol. Mol. Med.*, 22, 53-75
- Chen H, Deere M, Hecht JT, Lawler J. (2000) Cartilage oligomeric matrix protein is a calcium binding protein and a mutation in its type 3 repeats causes conformational changes. *J. Biol. Chem.*, 275, 26538-26544

- Chen TL, Stevens JW, Cole WG, Hecht JT, Vertel BM. (2004) Cell-type specific trafficking of expressed mutant COMP in a cell culture model for PSACH. *Matrix Biol.*, 23, 433-444
- Chen FH, Thomas AO, Hecht JT, Goldring MB, Lawler J. (2005) Cartilage oligomeric matrix protein/thrombospondin 5 supports chondrocyte attachment through interaction with integrins. *J. Biol. Chem.*, 280, 32655-32661
- Cho SG, Choi EJ. (1992) Apoptotic signalling pathways: caspases and stress-activated protein kinases. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 35, 24-27
- Cohn DH, Briggs MD, King LM, Rimoin DL, Wilcox WR, Lachmann RS, Knowlton RG. (1996) Mutations in the cartilage oligomeric matrix protein (COMP) gene in pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 785, 188-194
- Cooper RR, Ponseti IV, Maynard JA. (1973) Pseudoachondroplastic dwarfism. A rough-surfaced endoplasmatic reticulum storage disorder. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 55, 475-484
- Cserjesi P, Brown D, Ligon KL, Lyons GE, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Olson EN. (1995) Scleraxis: a basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. *Development* 121, 1099-1110
- Curwin S. (1997) Biomechanics of tendon and the effects of immobilization. *Foot Ankle Clin.*, 2, 371-389
- Czarny-Ratajczak M, Lohiniva J, Rogala P, Kozlowski K, Perala M, Carter L, Spector TD, Kolodziej L, Seppanen U, Glazar R, Krolewski J, Latos-Bielenska A, Ala-Kokko L. (2001) A mutation in COL9A1 causes multiple epiphyseal dysplasia: further evidence for locus heterogeneity. *Am. J. Hum. Genet.*, 69, 969-980
- Damsky CH, Werb Z. (1992) Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix: cooperative processing of extracellular information. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5, 772-781
- Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV. (1997) Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J. Cell Biol.*, 136, 729-743
- Decker T, Lohmann-Matthes ML. (1988) A quick and simple method for the quantification of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J. Immunol. Methods*, 115, 61-69
- Deere M, Sanford T, Francomano CA, Daniels K, Hecht JT. (1998) Identification of twelve mutations in cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in patients with pseudoachondroplasia. *Am. J. Med. Genet.*, 80, 510-513

- Deere M, Sanford T, Francomano CA, Daniels K, Hecht JT. (1999) Identification of nine novel mutations in cartilage oligomeric matrix protein in patients with pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia. *Am. J. Med. Genet.*, 85, 486-490
- Délot E, Brodie SG, King LM, Wilcox WR, Cohn DH. (1998) Physiological and pathological secretion of cartilage oligomeric matrix protein by cells in culture. *J. Biol. Chem.*, 273, 26692-26697
- Délot E, King LM, Briggs MD, Wilcox WR, Cohn DH. (1999) Trinucleotide expansion mutations in the cartilage oligomeric matrix protein (COMP) gene. *Hum. Mol. Genet.*, 8, 123-128
- DiCesare PE, Hauser N, Lehman D, Pasumarti S, Paulsson M. (1994) Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon. *FEBS Lett.*, 354, 237-240
- DiCesare PE, Mörgelin M, Carlson CS, Pasumarti S, Paulsson M. (1995) Cartilage oligomeric matrix protein: isolation and characterization from human articular cartilage. *J. Orthop. Res.*, 13, 422-428
- Dinser R, Kreppel F, Zaucke F, Blank C, Paulsson M, Kochanek S, Maurer P. (2001) Comparison of long-term transgene expression after non-viral and adenoviral gene transfer into primary articular chondrocytes. *Histochem. Cell Biol.*, 116, 69-77
- Dinser R, Zaucke F, Kreppel F, Hultenby K, Kochanek S, Paulsson M, Maurer P. (2002) Pseudoachondroplasia is caused through both intra- and extracellular pathogenic pathways. *J. Clin Invest.*, 110, 505-513
- D´Lima DD, Kuhn K, Lotz MK. (2001) Detection of apoptosis in cartilage in situ and in isolated chondrocytes. *Meth. Mol. Med.*, 100, 275-289
- Dodge GR, Hawkins D, Boesler E, Sakai L, Jimenez SA. (1998) Production of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) by cultured human dermal and synovial fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage*, 6, 435-440
- Duke J, Montufar-Solis D, Underwood S, Lalani Z, Hecht JT. (2003) Apoptosis staining in cultured pseudoachondrodisplasia chondrocytes. *Apoptosis*, 8, 191-197
- Efimov VP, Lustig A, Engel J. (1994) The thrombospondin-like chains of cartilage oligomeric matrix protein are assembled by a five-stranded alpha-helical bundle between residues 20 and 83. *FEBS Lett.*, 341, 54-58
- Efimov VP, Engel J, Malashkevich VN. (1996) Crystallization and preliminary crystallographic study of the pentamerizing domain from cartilage oligomeric matrix protein: a five-stranded alpha-helical bundle. *Proteins*, 24, 259-262
- Enomoto M, Leboy PS, Menko AS, Boettiger D. (1993) β_1 integrins mediate chondrocyte interaction with type I collagen, type II collagen and fibronectin. *Exp. Cell Res.*, 205, 276-285

- Eyre DR, Weis MA, Wu JJ. (2006) Articular cartilage collagen: An irreplaceable framework? *Europ. Cells Mat.*, 12, 57-63
- Fairbank T. (1947) Dysplasia epiphysealis multiplex. *Br. J. Surg.*, 34, 225-232
- Fan J-Q, Ishii S, Asano N, Suzuki Y. (1999) Accelerated transport and maturation of lysosomal α -galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nature Medicine*, 5, 112-115
- Fehsel K, Kroncke KD, Meyer KL, Huber H, Wahn V, Kolb-Bachofen V. (1995) Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *J. Immunol.*, 155, 2858–2865
- Ferguson HL, Deere M, Evans R, Rotta J, Hall JG, Hecht JT. (1997) Mosaicism in pseudoachondroplasia. *Am. Med. Genet.*, 70, 287-291
- Finnis ML, Gibson MA. (1997) Microfibril-associated glycoprotein-1 (MAGP-1) binds to the pepsin-resistant domain of the alpha3(VI) chain of type VI collagen. *J. Biol. Chem.*, 272, 22817-22823
- Forslind K, Eberhardt K, Jonsson A, Saxne T. (1992) Increased serum concentrations of cartilage oligomeric matrix protein. A prognostic marker in early rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.*, 31, 593-598
- Frisch SM, Francis H. (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.*, 124, 619-626
- Futami J, Tsushima Y, Tada H, Seno M, Yamada H. (2000) Convenient and efficient in vitro folding of disulfide-containing globular protein from crude bacterial inclusion bodies. *J. Biochem.*, 127, 435-441
- Ginsberg MH, Du X, Plow EF. (1992) Inside-out integrin signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 4, 766-771
- Gluzman Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, 23, 175-182
- Haberhauer G, Dunky A, Feyertag J. (2003) Knorpel-Stoffwechsel: Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) als "Prognostikum" der Gelenksknorpel-Destruktion. *Journal für Mineralstoffwechsel*, 10, 17-21
- Häuselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, Kuettner KE, Thonar EJ. (1994) Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J. Cell Sci.*, 107, 17-27
- Hagg R, Bruckner P, Hedbom E. (1998) Cartilage fibrils of mammals are biochemically heterogeneous: differential distribution of decorin and collagen IX. *J. Cell Biol.*, 142, 285-294
- Hall JG, Dorst JP, Rotta J, McKusick VA. (1987) Gonadal mosaicism in pseudoachondroplasia. *Am. J. Med. Genet.*, 28, 143-151

- Hall CM. (2002) International nosology and classification of constitutional disorders of bone. *Am. J. Med. Genet.*, 113, 65-77
- Han F, Kipnes JR, Li Y, Tuan RS, Hall DJ. (2002) The murine COMP (cartilage oligomeric matrix protein) promoter contains a potent transcriptional repressor region. *Osteoarthritis Cartilage*, 10, 638-645
- Hargus G. (2004) Die Funktion des Transkriptionsfaktors Sox9 während der Knorpeldifferenzierung – Analyse Sox9-defizienter embryonaler Stammzellen der Maus in vitro. Dissertation, Universität Lübeck, Lübeck, Deutschland
- Hashimoto Y, Tomiyama T, Yamano Y, Mori H. (2003) Mutation (D472Y) in the type 3 repeat domain of cartilage oligomeric matrix protein affects its early vesicle trafficking in endoplasmic reticulum and induces apoptosis. *Am. J. Pathol.*, 163, 101-110
- Hauser N, Paulsson M, Kale AA, DiCesare PE. (1995) Tendon extracellular matrix contains pentameric thrombospondin-4 (TSP-4). *FEBS Lett.*, 368, 307-310
- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler K, Vogelstein B. (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 2509-2514
- Heatwole VM. (1999) TUNEL assay for apoptotic cells. *Methods Mol. Biol.*, 115, 141-148
- Hecht JT, Francomano CA, Briggs MD, Deere M, Conner B, Horton WA, Warman M, Cohn DH, Blanton SH. (1993) Linkage of typical pseudoachondroplasia to chromosome 19. *Genomics*, 18, 661-666
- Hecht JT, Nelson LD, Crowder E, Wang Y, Elder FFB, Harrison WR, Francomano CA, Prange CK, Lennon GG, Deere M, Lawler J. (1995) Mutations in exon 17B of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) cause pseudoachondroplasia. *Nat. Genet.*, 10, 325-359
- Hecht JT, Deere M, Putnam E, Cole W, Vertel B, Chen H, Lawler J. (1998 a) Characterization of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in human normal and pseudoachondroplasia musculoskeletal tissues. *Matrix Biol.*, 17, 269-278
- Hecht JT, Montufar-Solis D, Decker G, Lawler J, Daniels K, Duke PJ. (1998 b) Retention of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and cell death in redifferentiated pseudoachondroplasia chondrocytes. *Matrix Biol.*, 17, 625-633
- Hecht JT, Hayes E, Snuggs M, Decker G, Montufar-Solis D, Doege K, Mwalli F, Poole R, Stevens J, Duke PJ. (2001) Calreticulin, PDI, Grp94 and BiP chaperone proteins are associated with retained COMP in pseudoachondroplasia chondrocytes. *Matrix Biol.*, 20, 251-262

Hecht JT, Makitie O, Hayes E, Haynes R, Susic M, Montufar-Solis D, Duke PJ, Cole WG. (2004) Chondrocyte cell death and intracellular distribution of COMP and type IX collagen in the pseudoachondrodysplasia growth plate. *J. Orthop. Res.*, 22, 759-767

Hecht JT, Hayes E, Haynes R, Cole WG. (2005) COMP mutations, chondrocyte function and cartilage matrix. *Matrix Biol.*, 23, 525-533

Hedbom E, Antonsson P, Hjerpe A, Aeschlimann D, Paulsson M, Rosa-Pimentel E, Sommarin Y, Wendel M, Oldberg Å, Heinegård D. (1992) Cartilage matrix proteins. An acidicoligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *J. Biol. Chem.*, 267, 6132-6136

Heselson NG, Cremin BJ, Beighton P. (1977) Pseudoachondroplasia, a report of 13 cases. *Br. J. Radiol.*, 50, 473-482

Hess GP, Cappiello WL, Poole RM, Hunter SC. (1989) Prevention and treatment of overuse tendon injuries. *Sports Med.*, 8, 371-384

Hey NJ, Handley CJ, Ng CK, Oakes BW. (1990) Characterization and synthesis of macromolecules by adult collateral ligament. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1034, 73-80

Hirsch MS, Lunsford LE, Trinkaus-Randall V, Svoboda KKH. (1997) Chondrocyte survival and differentiation in situ are integrin mediated. *Dev. Dyn.*, 210, 249-263

Holden P, Meadows RS, Chapman KL, Grant ME, Kadler KE, Briggs MD. (2001) Cartilage oligomeric matrix protein interacts with type IX collagen, and disruptions to these interactions identify a pathogenetic mechanism in a bone dysplasia family. *J. Biol. Chem.*, 276, 6046-6055

Holden P, Keene DR, Lunstrum GP, Bächinger HP, Horton WA. (2005) Secretion of Cartilage Oligomeric Matrix Protein is affected by the Signal Peptide. *J. Biol. Chem.*, 280, 17172-17179

Hou J, Putkey JA, Hecht JT. (2000) Delta 469 mutation in the type 3 repeat calcium binding domain of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) disrupts calcium binding. *Cell Calcium*, 27, 309-314

Hynes RO. (1987) Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*, 48, 549-554

Hynes RO. (1992) Integrins: versatility, modulation and signalling in cell adhesion. *Cell*, 69, 11-25

Ikegawa S., Ohashi H, Nishimura G, Kim KC, Sannhoe A, Kimizuka M, Fukushima Y, Nagai T, Nakamura Y. (1998) Novel and recurrent COMP (cartilage oligomeric matrix protein) mutations in pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia. *Hum. Genet.*, 103, 376-382

Ilic MZ, Carter P, Tyndall A, Dudhia J, Handley C. (2004) Proteoglycans and catabolic products of proteoglycans present in ligament. *Biochem. J.*, 385, 381-388

International Working Group on Constitutional Diseases of Bone. (1992) International classification of osteochondrodysplasias. *Am. J. Genet*, 44, 223-229

International Working Group on Constitutional Diseases of Bone. (1998) International nomenclature and classification of osteochondrodysplasias. *Am. J. Med. Genet.*, 79, 376-382

Järvinen M, Kannus P, Kvist M, Isola J, Lehto M, Jozsa L. Macromolecular composition of the myotendinous junction. *Exp. Mol. Pathol.*, 55, 230-237

Jakkula E, Lohiniva J, Capone A, Bonafe L, Marti M, Schuster V, Giedion A, Eich G, Boltshauser E, Ala-Kokko L, Superti-Furga A. (2003) A recurrent R718W mutation in COMP results in Multiple Epiphyseal Dysplasia with mild myopathy: clinical and pathogenetic overlap with collagen IX mutations. *J. Med. Genet.*, 40, 942-948

Jenniskens Y, Koevoet W, DeBart ACW, Verhaar JAN, Weinans H, van Osch GJVM, DeGroot J. (2006) Modulation of collagen network formation to improve cartilage regeneration. ACR-Poster, Erasmus University Medical Center, Leiden, Nederlande

Johnston RF, Pickett SC, Barker DL. (1990) Autoradiography using storage phosphor technology. *Electrophoresis*, 11, 355-360

Jordan JM, Luta G, Stabler T, Renner JB, Dragomir AD, Vilim V, Hochberg MC, Helmick CG, Kraus VB. (2003) Ethnic and sex differences in serum levels of cartilage oligomeric matrix protein: the Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis Rheum.*, 48, 675-681

Jozsa L, Lehto M, Kvist M, Balint BJ, Reffy A. (1989) Alterations in dry mass content of collagen fibers in degenerative tendinopathy and tendon rupture. *Matrix*, 9, 140-146

Jozsa L, Kvist M, Kannus P, Vieno T, Järvinen M, Lehto M. (1991) Structure and macromolecular composition of the myotendinous junction. *Acta Morphol. Hung.*, 39, 287-297

Juliano RL, Haskill S. (1993) Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.*, 120, 577-585

Kaneto H, Fujii J, Seo HG, Suzuki K, Matsuoka T, Nakamura M, et al. (1995) Apoptotic cell death triggered by nitric oxide in pancreatic beta-cells. *Diabetes*, 44,733–738

Kannus P. (2000) Structure of the tendon connective tissue. *Scand. J. Med. Sports*, 10, 312-320

Kennedy J, Jackson G, Ramsden S, Taylor J, Newman W, Wright MJ, Donnai D, Elles R, Briggs MD. (2005) COMP mutation screening as an aid for the clinical diagnosis and counselling of patients with a suspected diagnosis of pseudoachondroplasia or multiple epiphyseal dysplasia. *Europ. J. Hum. Genet.*, 13, 547-555

Kennedy J, Jackson GC, Barker FS, Nundlall S, Bella J, Wright MJ, Mortier GR, Neas K, Thompson E, Elles R, Briggs MD. (2005) Novel and recurrent mutations in the c-terminal domain of COMP cluster in two distinct regions and result in a spectrum of phenotypes within the Pseudoachondroplasia – Multiple Epiphyseal Dysplasia disease group. *Human Mutation*, 813, 1-11

Ker RF. (1999) The design of soft collagenous load-bearing tissues. *J. Exp. Biol.*, 202, 3315-3324

Kim S-A, Ju JW, Oh CD, Yoon YM, Song WK, Kim JH, Yoo YJ, Bang OS, Kang SS, Chun JS. (2001) ERK-1/2 and p38 Kinase oppositely regulate nitric oxide-induced apoptosis of chondrocytes in association with p53, caspase-3 and differentiation status. *J. Biol. Chem.*, 277, 1332-1339

Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S. (2006) Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis*, 11, 5-13

Kirkendall DT, Garrett WE. (1997) Function and biomechanics of tendons. *Scand. J. Med. Sci. Sports*, 7, 62-66

Kjaer M. (2004) Role of extracellular matrix in adaption of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol. Rev.*, 84, 649-698

Klatt AR, Nitsche DP, Kobbe B, Macht M, Paulsson M, Wagener R. (2001) Molecular structure, processing, and tissue distribution of matrilin-4. *J. Biol. Chem.* 276, 17267-17275

Kleerekoper Q, Hecht JT, Putkey JA. (2002) Disease-causing mutations in cartilage oligomeric matrix protein cause an unstructured Ca²⁺ binding domain. *J. Biol. Chem.*, 277, 10581-10589

Kreppel F, Biermann V, Kochanek S, Schiedner G. (2002) A DNA-based method to assay total and infectious particle contents and helper virus contamination in high-capacity adenoviral vector preparations. *Hum. Gene Ther.*, 13, 1151-1156

Kuettner KE, Pauli BU, Gall G, Memoli VA, Schenk RK. (1982) Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. I. Isolation, culture characteristics and morphology. *J. Cell Biol.*, 93, 743-750

Kühn K, Lotz M. (2003) Mechanisms of sodium nitroprusside-induced death in human chondrocytes. *Rheumatol. Int.*, 23, 241-247

Kulich WC, Niksic F, Klein G. (2002) Effekt of nimesulide on metalloproteinases and matrix degradation in osteoarthritis: a pilot clinical study. *Int. J. Clin. Pract.*, 128, 24-29

Kvist M, Jozsa L, Kannus P, Isola J, Vieno T, Järvinen M, Lehto M. (1991) Morphology and histochemistry of the myotendinous junction of the rat calf muscles. Histochemical, immunohistochemical and electron microscopy study. *Acta Anat.*, 141, 199-205

- Lachmann RS, Krakow D, Cohn DH, Rimoin DL. (2005) MED, COMP, multilayered and NEIN: an overview of multiple apiphyseal dysplasia. *Pediatr. Radiol.*, 35, 116-123
- Lawler J, Hynes RO. (1986) The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *J. Cell Biol.*, 103, 1635-1648
- Li P, Nijihawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.*, 91, 479–489
- Lopez-Armada MJ, Carames B, Lires-Dean M, Cillero-Pastor B, Ruiz-Romero C, Galdo F, Blanco FJ. (2006) Cytokines, tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1 beta differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes. *Osteoarthr. Cart.*, 14, 660-669
- Loughlin J, Irlen C, Mustafa Z, Briggs MD, Carr A, Lynch SA, Knowlton RG, Cohn DH, Sykes B. (1998) Identification of five novel mutations in cartilage oligomeric matrix protein gene in pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia. *Hum. Genet., Suppl.* 1, 10-17
- Lotz M, Hashimoto S, Kuhn K. (1999) Mechanisms of chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage*, 7, 389-391
- Mabuchi A, Manabe N, Haga N, Kitoh H, Ikeda T, Kawaji H, Tamai K, Hamada J, Nakamura S, Brunetti-Pierri N, Kimizuka M, Takatori Y, Nakamura K, Nishimura G, Ohashi H, Ikegawa S. (2003) Novel types of COMP mutations and genotype-phenotype association in pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia. *Hum Genet* 112, 84-90.
- Machner A, Baier A, Willie A, Drynda S, Pap G, Drynda A, Mawrin C, Bühling F, Gay S, Neumann W, Pap T. (2003) Higher susceptibility to FAS ligand induced apoptosis and altered modulation of cell death by tumor necrosis factor- α in periarticular tenocytes from patients with knee joint osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 5, 253-261
- Maddox BK, Keene DR, Sakai LY, Charbonneau NL, Morris NP, Ridgway CC, Boswell BA, Sussman MD, Horton WA, Bachinger HP, Hecht JT. (1997) The fate of cartilage oligomeric matrix protein is determined by the cell type in the case of a novel mutation in pseudoachondroplasia. *J. Biol. Chem.*, 272, 30993-30997
- Maddox BK, Mokashi A, Keene DR, Bächinger HP. (2000) A cartilage oligomeric matrix protein mutation associated with pseudoachondroplasia changes the structural and functional properties of the type 3 domain. *J. Biol. Chem.*, 275, 11412-11417
- Madry H, Trippel SB. (2000) Efficient lipid-mediated gene transfer to articular chondrocytes. *Gene Ther.*, 7, 286-291
- Malashkevich VN, Kammerer RA, Efimov VP, Schulthess T, Engel J. (1996) The crystal structure of a five-stranded coiled coil in COMP: a prototype ion channel? *Science*, 274, 761-765

- Mann HH, Özbek S, Engel J, Paulsson M, Wagener R. (2004) Interactions between COMP and matrilins: Implications for matrix assembly and the pathogenesis of chondrodysplasias. *J. Biol. Chem.*, 279, 25294-25298
- Maroteaux P, Lamy M. (1959) Les formes pseudoachondroplastiques des dysplasies spondylo-épiphyseaires. *Presse Med.*, 67, 383-386
- Maroteaux P, Stanescu R, Stanescu V, Fontaine G. (1980) The mild form of pseudoachondroplasia. *Eur. J. Pediatr.*, 133, 227-231
- Matsuo M, Nishida K, Yoshida A, Murakami T, Inoue H. (2001) Expression of caspase-3 and -9 relevant to cartilage destruction and chondrocyte apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Acta Med. Okayama*, 55, 333-340
- Maynard JA, Cooper RR, Ponseti IV. (1972) A unique rough surfaced endoplasmatic reticulum inclusion in pseudoachondrodisplasia. *Lab. Invest.* 26, 40-44
- McGill G, Shimamura A, Bates RC, Savage RE, Fisher DE. (1997) Loss of matrix adhesion triggers rapid transformation-selective apoptosis in fibroblasts. *J. Cell Biol.*, 138, 901-911
- Meredith Jr JE, Fazeli B, Schwartz MA. (1993) The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol. Biol. Cell*, 4, 953-961
- Merrilees MJ, Flint MH. (1980) Ultrastructural study of tension and pressure zones in a rabbit flexor tendon. *Am. J. Anat.*, 157, 87-106
- Misenheimer TM, Mosher DF. (1995) Calcium ion binding to thrombospondin 1. *J. Biol. Chem.*, 270, 1729-1733
- Mogk A, Mayer MP, Deuerling E. (2001) Mechanismen der Proteinfaltung: Molekulare Chaperone und ihr biotechnologisches Potential. *Biologie in unserer Zeit*, 31, 182-192
- Mörgelin M, Heinegård D, Engel J, Paulsson M. (1992) Electron microscopy of native cartilage oligomeric matrix protein purified from the swam rat chondrosarcoma reveals a five-armed structure. *J. Biol. Chem.*, 267, 6137-6141
- Muller G, Michel A, Altenburg E. (1998) COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is synthesized in ligament, tendon, meniscus, and articular cartilage. *Connect. Tissue Res.*, 39, 233-244
- Muragaki Y, Mariman EC, van Beersum SE, Perala M, van Mourik JB, Warman ML, Olsen BR, Hamel BC. (1996) A mutation in the gene encoding the alpha 2 chain of the fibril-associated collagen IX, COL9A2, causes multiple epiphyseal dysplasia (EDM2). *Nature Genet.*, 12, 103-105
- Murphy JM, Heinegård D, McIntosh A, Sterchi D, Barry FP. (1999) Distribution of cartilage molecules in the developing mouse joint. *Matrix Biol.*, 18, 487-497

- Naito K, Skog S, Tribukait B, Andersson L, Hisazumi H. (1987) Cell cycle related [3H]thymidine uptake and its significance for the incorporation into DNA. *Cell Tissue Kinet.*, 20, 447-457
- Naito K, He Q, Skog S, Tribukait B, Andersson L, Hisazumi H. (1989) Effects of adriamycin and hyperthermia on cellular uptake of [3H]thymidine and its significance for the incorporation into DNA. *Int. J. Hyperthermia*, 5, 329-340
- Nakayama H, Endo Y, Aota S, Sato M, Fujita T, Kikuchi S. (2003) Novel mutations of the cartilage oligomeric matrix protein (COMP) gene in two Japanese patients with pseudoachondroplasia. *Oncol. Rep.*, 10, 871-873
- Newton G, Weremowicz S, Morton CC, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA Lawler J. (1994) Characterization of human and mouse cartilage oligomeric matrix protein. *Genomics*, 24, 435-439
- O'Brien M. Structure and metabolism of tendons. *Scand. J. Med. Sci. Sports*, 7, 55-61
- Oldberg Å, Antonsson P, Lindblom K, Heinegård D. (1992) COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins. *J. Biol. Chem.*, 267, 22346-22350
- Otten C, Wagener R, Zaucke F, Paulsson M. (2005) Matrilin-3 mutations that cause chondrodysplasias interfere with protein trafficking while a mutation associated with hand osteoarthritis does not. *J. Med. Genet.*, 42, 774-779
- Özbek S, Engel J, Stetefeld J. (2002) Storage function of cartilage oligomeric matrix protein: the crystal structure of the coiled-coil domain in complex with vitamin D. *EMBO J.*, 21, 5960-5968
- Newton G, Weremowicz S, Morton CC, Copeland NG, Al AE. (1994) Characterization of human and mouse cartilage oligomeric matrix protein. *Genomics*, 24, 435-439
- Piecha D, Muratoglu S, Mörgelin M, Hauser N, Studer D, Kiss I, Pulsson M, Deák F. (1999) Matrilin-2, a large, oligomeric matrix protein, is expressed by a great variety of cells and forms fibrillar networks. *J. Biol. Chem.*, 274, 13353-13361
- Pihlajamaa T, Lankinen H, Ylostalo J, Valmu L, Jaalinoja J, Zaucke F, Spitznagel L, Gosling S, Puustinen A, Mörgelin M, Peranen J, Maurer P, Ala-Kokko L, Kilpeläinen I. (2004) Characterization of recombinant amino-terminal NC4 domain of human collagen IX: interaction with glucosaminoglycans and cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *J. Biol. Chem.*, 279, 24265-24273
- Polack A, Delius H, Zimmer U, Bornkamm GW. (1984) Two deletions in the Epstein-Barr virus genome of the Burkitt lymphoma nonproducer line Raji. *Virology*, 133, 146-157
- Relic B, Guicheux J, Mezin F, Lubberts E, Togninalli D, Garcia I, van den Berg WB, Guerne P-A. (2001) IL-4 and IL-3, but not IL-10, protect human synoviocytes from apoptosis. *J. Immunol.*, 166, 2775-2782

RelicαB, Bentires-Alj M, Ribbens C, Franchimont N, Guerne P-A, Benoît V, Merville M-P, Bours V, Malaise MG. (2002) TNF-α protects human primary articular chondrocytes from nitric oxide-induced apoptosis via nuclear factor-κB. *Lab. Invest.*, 82, 1661-1672

Ribbing S. (1937) Studien über hereditäre multiple Epiphysenstörungen. *Acta Radiol. Suppl.*, 34, 1-107

Rimoin DL, Rasmussen IM, Briggs MD, Roughly PJ, Gruber HE, Warman ML, Olsen BR. (1994) A large family with features of pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia: exclusion of seven candidate loci that encode proteins of the cartilage extracellular matrix. *Hum. Genet.*, 93, 236-242

Rosenberg K, Olsson H, Morgelin M, Heinegard D. (1998) Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. *J. Biol. Chem.*, 273, 20397-20403

Ruoslahti E. (1988) Structure and biology of proteoglycans. *Annual Rev. Cell Biol.*, 4, 229-255

Ruoslahti E. (1991) Integrins are receptors for extracellular matrix. In *Cell Biology of Extracellular Matrix* (E.D. Hay ed.), 2nd ed., Plenum Press, New York, 343-364

Ruoslahti E, Reed JC. (1994) Anchorage dependence, integrins and apoptosis. *Cell*, 77, 477-478

Sakai LY, Keene DR. (1994) Fibrilin: monomers and microfibrils. *Methods Enzymol.*, 245, 29-52

Salin CA, Paulsson M, Zaucke F. (2005) Point mutations in collagen type II causing dysplasias. First Joint Meeting of the French and German Connective Tissue Societies, Köln, 10. – 12. März 2005, Poster

Sastry SK, Horwitz AF. (1993) Integrin cytoplasmatic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5, 819-831

Sawamura S, May H, Finnegan M. (1992) The effects of solumedrol on tenocytes in culture. Annual Meeting of the Canadian Orthopaedic Research Society, Poster

Schmitz A. (2005) Charakterisierung verschiedener Mutationen des Cartilage Oligomeric Matrix Protein. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg, Deutschland

Schmitz M. (2005) Etablierung und Charakterisierung von transgenen Mauslinien zur Untersuchung der Pathogenese von Chondrodysplasien. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln, Deutschland

Schmitz M, Becker A, Dinser R, Paulsson M, Zaucke F. (2005) Consequences of an aspartate deletion in the cartilage oligomeric matrix protein. First Joint Meeting of the French and German Connective Tissue Societies, Köln, 10. – 12. März 2005, Poster

- Schmitz M, Becker A, Schmitz A, Weirich C, Paulsson M, Zaucke F, Dinser R. (2006) Disruption of extracellular matrix structure may cause Pseudoachondroplasia phenotypes in the absence of impaired COMP secretion. *J. Biol. Chem.*, 281, 32587-32595
- Schwartz MA. (1992) Transmembrane signalling by integrins. *Trends Cell Biol.*, 2, 304-308
- Schweitzer R, Chyung JH, Murtaugh LC, Brent AE, Rosen V, Olson EN, Lassar A, Tabin CJ. (2001) Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. *Development* 128, 3855-3866
- Schulze-Tanzil G, Mobasheri A, Clegg PD, Sendzik J, John T, Shakibaei M. (2004) Cultivation of human tenocytes in high-density culture. *Histochem. Cell Biol.*, 122, 219-228
- Smith RK, Gerard M, Dowling B, Dart AJ, Birch HL, Goodship AE. (2002) Correlation of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) levels in equine tendon with mechanical properties: a proposed role for COMP in determining function-specific mechanical characteristics of locomotor tendons. *Equine Vet. J. Suppl.*, 34, 241-244
- Smith RK, Zunino L, Webbon PM, Heinegard D. (1997) The distribution of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in tendon and its variation with tendon site, age and load. *Matrix Biol.*, 16, 255-271
- Sodersten F, Ekman S, Eloranta ML, Heinegard D, Dudhia J, Hulthenby K. (2005) Ultrastructural immunolocalization of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in relation to collagen fibrils in the equine tendon. *Matrix Biol.*, 24, 376-385
- Sodersten F, Ekman S, Schmitz M, Paulsson M, Zaucke F. (2006) Thrombospondin-4 and cartilage oligomeric matrix protein form heterooligomers in equine tendon. *Connect. Tissue Res.*, 47, 85-91
- Song HR, Lee KS, Li QW, Koo SK, Jung SC. (2003) Identification of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) gene mutations in patients with pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia. *J. Hum. Genet.*, 48, 222-225
- Sparado JA, Becker RO, Bachmann CH. (1970) The distribution of trace metal ions in bone and tendon. *Calcif. Tissue Res.*, 6, 49-54
- Spayde EC, Joshi AP, Wilcox WR, Briggs M, Cohn DH, Olsen BR. (2000) Exon skipping mutation in the COL9A2 gene in a family with multiple epiphyseal dysplasia. *Matrix Biol.*, 19, 121-128
- Spitznagel L. (2001) Einführung und Charakterisierung einer Pseudoachondroplasieverursachenden Punktmutation in das cartilage oligomeric matrix protein, Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln, Deutschland

Spitznagel L, Nitsche DP, Paulsson M, Maurer P, Zaucke F. (2004) Characterization of a pseudoachondroplasia-associated mutation (His587-->Arg) in the C-terminal, collagen-binding domain of cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *Biochem. J.* 377, 479-487

Spranger J. (1998) International Nomenclature and Classification of the Osteochondrodysplasias. International Working Group on Constitutional Diseases of Bone. *Am. J. Med. Genet.*, 79, 376-382

Stanescu R, Stanescu V, Muriel MP, Maroteaux P. (1993) Multiple epiphyseal dysplasia, Fairbank type : morphologic and biochemical study of cartilage. *Am. J. Med. Genet.*, 45, 501-507

Stanescu V, Maroteaux P, Stanescu R. (1982) The biochemical defect of pseudoachondrodysplasia. *Eur. J. Pediatr.* 138, 221-225

Stanescu V, Stanescu R, Maroteaux P. (1982) Pathogenesis of pseudoachondrodysplasia and diastrophic dysplasia. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 104, 385-394

Stevens JW. (1999) Pseudoachondroplastic dysplasia: an Iowa review from human to mouse. *Iowa Orthop. J.*, 19, 53-65

Stryer L. (1994) *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag

Superti-Furga A, Bonafe L, Rimoin DL. (2001) Molecular-pathogenetic classification of genetic disorders of the skeleton. *Am. J. Med. Genet.*, 106, 282-293

Susic S, Ahier J, Cole WG. (1998) Pseudoachondroplasia due to the substitution of the highly conserved Asp482 by Gly in the seventh calmodulin-like repeats of cartilage oligomeric matrix protein. *Hum. Mutat.*, Suppl. 1, 125-127

Susic S, McGrory J, Ahier J, Cole WG. (1997) Multiple epiphyseal dysplasia and pseudoachondroplasia due to novel mutations in the calmodulin-like repeats of cartilage oligomeric matrix protein. *Clin. Genet.*, 51, 219-224

Susin SA, Dausgs E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prévost M-C, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G. (2000) Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J. Exped. Med.*, 192, 571-579

Svensson L, Aszódi A, Heinegård D, Hunziker EB, Reinholt FP, Fässler R, Oldberg Å (2002) Cartilage Oligomeric Matrix Protein-deficient mice have normal skeletal development. *Mol. Cell. Biol.*, 22, 4366-4371

Taimor G, Hofstaetter B, Piper HM. (2000) Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after simulated ischemia. *Cardiovasc. Res.*, 45, 588-594

Terpstra L, Prud'homme J, Arabian A, Takeda S, Karsenty G, Dedhar S, St-Arnaud R. (2003) Reduced chondrocyte proliferation and chondrodysplasia in mice lacking the integrin-linked kinase in chondrocytes. *J. Cell Biol.*, 162, 139-148

Thomopoulos S, Williams GR, Gimbel JA, Favata M, Soslowsky LJ. (2003) Variation of biomechanical, structural and compositional properties along the tendon to bone insertion side. *J. Orthop. Res.*, 21, 413-419

Thur J. (2000) Die Auswirkungen von Chondrodysplasie-assoziierten Mutationen auf die Struktur und Funktion des Cartilage Oligomeric Matrix Proteins, Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln, Deutschland

Thur J, Rosenberg K, Nitsche DP, Pihlajamaa T, Ala-Kokko L, Heinegård D, Paulsson M, Maurer P. (2001) Mutations in cartilage oligomeric matrix protein (COMP) causing pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia affect binding of calcium and collagen I, II, and IX. *J. Biol. Chem.* 276, 6083-6092

Tipton CM, Matthes RD, Maynard JA, Carey RA. (1975) The influence of physical activity on ligaments and tendons. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 7, 165-175

Turner CE, Burrige K. (1991) Transmembrane molecular assembling in cell-extracellular matrix interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5, 849-853

Unger S and Hecht J. (2001) Pseudoachondroplasia and Multiple Epiphyseal Dysplasia: New etiologic developments. *Am. J. Med Genet.*, 106, 244-250

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutlingsperger C. (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometry detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods*, 184, 39-51

Vilim V, Olejarova M, Machacek S, Gatterova J, Kraus VB, Pavelka K. (2002) Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) correlate with radiographic progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.*, 10, 707-713

Vogel KG, Meyers AB. (1999) Proteins in the tensile region of adult bovine deep flexor tendon. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 367 Suppl., 344-355

Von Knethen A, Callsen D, Brune B. (1999) NF-kappaB and AP-1 activation by nitric oxide attenuated apoptotic cell death in RAW 264.7 macrophages. *Mol. Biol. Cell.*, 10, 361-372

Vranka J, Mokashi A, Keene DR, Tufa S, Corson G, Sussman M, Horton WA, Maddox K, Sakai L, Bachinger HP. (2001) Selective intracellular retention of extracellular matrix proteins and chaperones associated with pseudoachondrodysplasia. *Matrix Biol.*, 20, 439-450

Wagget AD, Ralphs JR, Kwan AP, Woodnutt D, Benjamin M. (1998) Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. *Matrix Biol.*, 16, 457-470

- Weaver EJ, Summerville GP, Yeh G, Hervada-Page M, Oehlmann R, Rothman R, Jimenez SA, Knowlton RG. (1993) Exclusion of type II and type IV procollagen gene mutations in a five-generation family with multiple epiphyseal dysplasia. *Am. J. Med. Genet.*, 45, 345-352
- Weirich C, Keene D, Kirsch K, Heil M, Neumann E, Dinser R. (2007) Expression of PSACH-associated mutant COMP in tendon fibroblasts leads to increased apoptotic cell death irrespective of the secretory characteristics of mutant COMP. *Matrix Biol.* 26, 314-323
- Williams GM, Klein TJ, Sah RL. (2005) Cell density alters matrix accumulation in two distinct fractions and the mechanical integrity of alginate-chondrocyte constructs. *Acta Biomater.*, 1, 625-633
- Wilson R, Freddi S, Chan D, Cheah KSE, Bateman JF. (2005) Misfolding of collagen X chains harboring Schmid metaphyseal chondrodysplasia mutations results in aberrant disulfide bond formation, intracellular retention and activation of the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.*, 280, 15544-15552
- Wong MWN, Tang YYN, Lee SKM, Fu BSC. (2003) Effect of Dexamethasone on cultured human tenocytes and its reversibility by platelet-derived growth factor. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 85, 1914-1920
- Xu C, Oyajobi BO, Frazer A, Kozaci LD, Russel GG, Hollander AP. (1996) Effects of growth factors and interleukin-1 α on proteoglycan and type II collagen turnover in bovine nasal and articular chondrocyte pellet cultures. *Endocrinology*, 137, 3557-3565
- Yam GH, Zuber C, Roth J. (2005) A synthetic chaperone corrects the trafficking defect and disease phenotype in a protein misfolding disorder. *FASEB J.*, 19, 12-18
- Yao L, Bestwick CS, Bestwick LA, Maffulli N, Aspden RM. (2006) Phenotypic shift in human tenocyte culture. *Tissue Eng.*, 12, 1-7
- Zaia J, Boynton RE, McIntosh A, Marshak DR, Olsson H, Heinegård D, Barry FP. (1997) Post-translational modifications in cartilage oligomeric matrix protein. Characterization of the N-linked oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Biol. Chem.*, 272, 14120-1426
- Zaucke F, Dinser R, Maurer P, Paulsson M. (2001) Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and collagen IX are sensitive markers for the differentiation state of articular primary chondrocytes. *Biochem. J.*, 358, 17-24

Danksagung

Ich danke im Besonderen Herrn Dr. Robert Dinser für das interessante Thema und die Betreuung meiner Arbeit. Ich habe während unserer Zusammenarbeit sowohl in fachlicher als auch in mancherlei anderer Hinsicht viel lernen können.

Herrn Professor Dr. Michael Martin danke ich für die Begutachtung meiner Arbeit.

Herrn Professor Dr. Ulf Müller-Ladner danke ich für die Möglichkeit zur Mitarbeit im rheumatologischen Labor.

Mein besonderer Dank gilt den drei Technischen Angestellten sowie der Promotionsstudentin der AG Dinser:

- Katja „The Brain“ Kirsch für Hilfestellung bei methodischen bzw. technischen Fragen sowie ihre Diskussionsbereitschaft
- Laborfrettchen Nadine Commercon und Sabrina Brückmann für Unterstützung in arbeitsreichen Zeiten
- Kathrin Anna für wertvolle Hinweise zur PCR
- allen vieren für ihren Humor, ohne den sie mich wohl nicht hätten ertragen können

Bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Rheumatologischen Labors in Bad Nauheim und des Onkologischen Labors in Homburg für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, ihre Hilfsbereitschaft und Diskussionsbereitschaft.

Bei Dr. Douglas Keene bedanke ich mich für die in seinem Labor durchgeführten elektronenmikroskopischen und immunbiologischen Arbeiten.

Den Mitarbeitern des Max-Planck-Institutes für Herz- und Lungenforschung / William G. Kerckhoff-Institut in Bad Nauheim danke ich für die Bereitstellung von Laborgeräten und ihre Mitarbeit. Insbesondere möchte ich danken Herrn Dr. Matthias Heil, seinen Technischen Assistentinnen Susanne und Sandra sowie Frau Kerstin Richter.

Ich danke den Mitarbeitern der Metzgerei Herold in Fauerbach sowie der Globus Handelshof GmbH Einöd für die Überlassung der Rinderschultergelenke, ihre Hilfsbereitschaft und ihr stets freundliches Entgegenkommen bei Sonderwünschen.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung und vor allem für die Vermittlung einer gesunden Lebenseinstellung.

Meiner Frau Sarah und meinen Töchtern Sophia, Emma und Hedda danke ich für Geduld, Verständnis, Unterstützung und vor allem für ihre Aufmunterung bei Laborkatastrophen.

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Bad Nauheim, den 25.06.2007

Im Rahmen der Promotionsarbeit veröffentlichte Ergebnisse:

a) in peer-reviewed journals

1. Christian Weirich, Douglas Keene, Katja Kirsch, Mathias Heil, Elena Neumann, Robert Dinser. (2007) Expression of PSACH-associated mutant COMP in tendon fibroblasts leads to increased apoptotic cell death irrespective of the secretory characteristics of mutant COMP. *Matrix Biology*, 26, 314-323
2. Markus Schmitz, Alexander Becker, Alexander Schmitz, Christian Weirich, Mats Paulsson, Frank Zaucke, Robert Dinser. (2006) Disruption of extracellular matrix structure may cause pseudoachondroplasia phenotypes in the absence of impaired COMP secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 32587-32595

b) als Postervorstellung

1. Weirich C, Pfreundschuh M, Dinser R. Expression of Pseudoachondroplasia-associated COMP mutants in cultured tenocytes. First Joint meeting of the French and German Connective Tissue Societies, Köln, 2005
2. Weirich C, Dinser R, Müller-Ladner U. COMP-associated chondrodysplasias are more than storage diseases of the endoplasmic reticulum. 34. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, Wiesbaden, 2006
3. Dinser R, Weirich C, Schmitz A, Keene D, Müller-Ladner U, Paulsson M, Zaucke F. Mutant COMP causes cartilage and tendon instability through disruption of collagen fibrillogenesis and apoptotic cell death. American College of Rheumatology/ARHP Scientific Meeting, Washington D.C., 2006
4. Dinser R, Anna K, Weirich C, Pfreundschuh M, Zaucke F. Influence of several chondrodysplasia-associated mutations of cartilage oligomeric matrix protein on the expression of molecular chaperones and cell survival. Annual European Congress of Rheumatology, Berlin, 2004

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name Christian Hans Albert Weirich
Geburtsdatum 10.08.1971
Geburtsort Neunkirchen (Saarland)
Nationalität deutsch
Familienstand verheiratet, 3 Töchter

Adresse Klausenstraße 18, 61169 Friedberg

Schulbildung

1978 – 1982 Grundschule in Oberbexbach (Saarland)
1982 – 1991 Besuch des Saarpfalz-Gymnasiums in Homburg/Saar
1991 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst

1991 – 1992 im Pflegedienst der Augenklinik im Universitätsklinikum des Saarlandes

Hochschulausbildung

1992 – 2003 Studium der Biologie an der Universität des Saarlandes
Ausbildungsschwerpunkt Technische Biologie und Bionik
2002 – 2003 Diplomarbeit am Zoologischen Institut der Universität des Saarlandes bei Professor Dr. Möhl, Titel der Arbeit: Dämpfungsanalyse am menschlichen Arm

Berufliche Laufbahn

1997 Studentische Hilfskraft am Zoologischen Institut der Universität des Saarlandes (Leiter: Professor Dr. Werner Nachtigall)
2002 Forensic Entomology Training am Zoologischen Institut der Universität zu Köln (Kursleiter: Dr. rer. medic. Mark Benecke)
1997 – 2003 Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Prozeßtechnik der Universität des Saarlandes/Gesellschaft für umweltkompatible Prozeßtechnik mbH (Leiter: Professor Dr. Horst Chmiel)
2003 – 2007 Dissertation unter Betreuung von Dr. med. Robert Dinser
2003 – 2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Medizinischen Klinik I der Universitätskliniken des Saarlandes (Leiter: Professor Dr. Michael Pfreundschuh)
2005 – 2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für Rheumatologie und klinische Immunologie am Franz-Groedel-Institut der Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim/ Lehrstuhl für Innere Medizin mit Schwerpunkt Rheumatologie der Justus-Liebig-Universität Gießen (Leiter: Professor Dr. Ulf Müller-Ladner)