

Aus dem
Department für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und
Pharmakogenomik der Universität Tübingen
Abteilung Pharmakogenomik

**Einfluss beta-adrenerger Rezeptoren auf die Knorpel-
und Knochenbildung während der
Embryonalentwicklung im Zebrafisch**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Lüdje, Friedrich Karl Dieter

2024

Dekan:

Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. M. Burkhalter

2. Berichterstatter:

Professorin Dr. D. Alexander-Friedrich

Tag der Disputation: 05.04.2024

Für Lea

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VII
1. Einleitung.....	1
1.1 G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (GPCR).....	1
1.1.1 Adrenozeptoren	1
1.2 Therapeutischer Nutzen von Adrenozeptorantagonisten und -agonisten..	3
1.3 Zebrafisch.....	5
1.4 Knochen- und Knorpelentwicklung.....	8
1.4.1 Arten der Knochenbildung	9
1.4.2 Längenwachstum von Knochen	10
1.5 Embryonale/angeborene Knochendefekte/-entwicklungsstörungen.....	14
2. Material und Methoden.....	15
2.1 Zebrafischhaltung	15
2.2 Dechorionisierung	15
2.3 Technische Daten zu den verwendeten Adrenorezeptorantagonisten und -agonisten	15
2.4 Behandlung	16
2.5 Fixierung	19
2.6 Färbung.....	19
2.6.1 Doppelfärbung	19
2.6.2 Knochenfärbung.....	21
2.7 Fotografieren.....	21
2.8 Auswertung	22

2.9 Statistik	23
2.10 Fischlinien	24
2.11 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen.....	24
2.12 Inhibitoren und Antagonisten	27
2.13 Geräte und Einwegartikel.....	28
3. Ergebnisse	29
3.1 Behandlung mit SR59230A.....	30
3.1.1 Branchiostegalstrahl	30
3.1.2 lateraler Winkel	30
3.1.3 Innenwinkel.....	30
3.1.4 Knorpelabstand.....	32
3.1.5 Herzfrequenz unter Einfluss von SR59230A.....	34
3.2 Behandlung mit L-748,337	35
3.2.1 Herzfrequenz unter Einfluss von L-748,337	36
3.3 Behandlung mit CL316243.....	37
3.3.1 Branchiostegalstrahl	37
3.3.2 Knorpelabstand.....	37
3.3.3 lateraler Winkel	39
3.3.4 Innenwinkel.....	40
3.3.5 Herzfrequenz unter Einfluss von CL316243	41
3.4 Behandlung mit Metoprolol	42
3.4.1 Herzfrequenz unter Einfluss von Metoprolol	42
3.4.2 Metoprolol bewirkt keine Knochen- oder Knorpelveränderung	43
3.5 Behandlung mit ICI118,551.....	45
3.5.1 Keine Veränderung durch ICI118,551.....	45
4. Diskussion	49

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	49
4.2 Diskussion der Ergebnisse.....	49
4.2.1 Einfluss auf das Längenwachstum.....	50
4.2.2 Einfluss auf die räumliche Anordnung.....	53
4.2.3 Vergleich zwischen Fisch und menschlichen Rezeptoren	55
4.3 Fazit und Ausblick.....	56
5. Zusammenfassung.....	58
6. Literaturverzeichnis	59
7. Erklärung zum Eigenanteil.....	66
8. Danksagung	67

Abkürzungsverzeichnis

μM	Mikromolar
μm	Mikrometer
μS	Mikrosiemens
A	anterior
Bb	Basibranchiale
Br	Branchiostegalstrahl
C	Cleithrum
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
COPD	engl.: chronic obstructiv pulmonary disease
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpf	engl.: days post fertilization (Tage nach der Befruchtung)
EP	Ethmoidale Platte
FDA	US-Food and Drug Administration
GLP-1	Glukagon-like-Peptid-1-Rezeptor
GPCR	engl.: G protein-coupled receptor
hpf	engl.: hours post fertilization (Stunden nach der Befruchtung)
K_D	Dissoziationskonstante
K_i	engl.: inhibitory constant (Hemmkonstante)
Kb	Keratobranchiale
Kh	Keratohyale
L	Liter
M	Meckel-Knorpel
ml	Milliliter
N	Anzahl der Durchführungen
n	Anzahl der Versuchsexemplare
NA	Noradrenalin
nM	Nanomolar

OI	Osteogenesis imperfecta
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
Op	Operculare
Ot	Otolithe
p	P-Wert: Irrtumswahrscheinlichkeit
P	posterior
PBS	engl.: Phosphate buffered saline
PCR	engl.: polymerase chain reaction
PNS	periphere Nervensystem
PQ	Palato-Quadratus
RPM	engl.: rounds per minute (Runden pro Minute)
u.a.	unter anderem
WTU	Water Trading Unit
ZNS	zentrales Nervensystem

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: KONZENTRATION DER VERWENDETEN WIRKSTOFFE	18
TABELLE 2: IN DIESER STUDIE VERWENDETE FISCHLINIEN	24
TABELLE 3: VERWENDETE CHEMIKALIEN UND KONFEKTIONIERTER LÖSUNGEN.....	25
TABELLE 4: FÜR DIESE STUDIE HERGESTELLTE LÖSUNGEN	27
TABELLE 5: VERWENDETE INHIBITOREN, ANTAGONISTEN UND AGONISTEN	27
TABELLE 6: VERWENDETE GERÄTE UND MATERIALIEN	28

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: A- UND B-REZEPTOREN IN EINER DOPPELLIPIDMEMBRAN	3
ABBILDUNG 2: ZEBRABÄRBLINGE IN PAARUNGSBECKEN	6
ABBILDUNG 3: VERSCHIEDENE ARTEN DER OSSIFIKATION	11
ABBILDUNG 4: ANATOMISCHE STRUKTUREN IM ZEBRABÄRBLING.....	13
ABBILDUNG 5: ÜBERSICHT DES WORKFLOWS	17
ABBILDUNG 6: GEMESSENE PARAMETER ANHAND EINES BEISPIELBILDES	22
ABBILDUNG 7: VERGLEICH VON DOPPELFÄRBUNG UND KNOCHENFÄRBUNG.....	29
ABBILDUNG 8: SR59230A OHNE EINFLUSS AUF BRANCHIOSTEGALSTRAHL UND LATERALEN WINKEL	31
ABBILDUNG 9: INNENWINKEL VERKLEINERT SICH MIT SR59230A	32
ABBILDUNG 10: KNORPELABSTAND VERGRÖßERT SICH MIT SR59230A.....	33
ABBILDUNG 11: HERZFREQUENZ LEICHT REDUZIERT MIT SR59230A	34
ABBILDUNG 12: KEIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED DURCH L-748,337.....	35
ABBILDUNG 13: L-748,337 OHNE MESSBARE WIRKUNG AUF DIE HERZFREQUENZ	36
ABBILDUNG 14: CL316243 VERKLEINERT DEN BRANCHIOSTEGALSTRAHL	38
ABBILDUNG 15: CL316243 VERGRÖßERT DEN LATERALEN WINKEL.....	39
ABBILDUNG 16: INNENWINKEL VERGRÖßERT SICH UNTER DEM EINFLUSS VON CL316243 .	40
ABBILDUNG 17: HERZFREQUENZ BLEIBT UNVERÄNDERT MIT CL316243	41
ABBILDUNG 18: METOPROLOL VERRINGERT DIE HERZFREQUENZ.....	43
ABBILDUNG 19: KEIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED MIT METOPROLOL	44
ABBILDUNG 20: KEINE SIGNIFIKANTE ÄNDERUNG DURCH ICI118,551 200 NM	46
ABBILDUNG 21: KEINE SIGNIFIKANTE ÄNDERUNG DURCH ICI118,551 500 NM	47
ABBILDUNG 22: ICI118,551 HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE HERZFREQUENZ.....	48

1. Einleitung

1.1 G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (GPCR)

Rezeptoren sind Proteine, die nach Aktivierung durch einen Agonisten eine Signalkaskade aktivieren, welche zur Folge hat, dass zelluläre Funktionen gehemmt oder initiiert werden. Man unterscheidet zwischen membranständigen und intrazellulären Rezeptoren. Eine Gruppe in der Rezeptorfamilie sind die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Sie bilden mit ihren über 800 verschiedenen Mitgliedern die umfangreichste Proteinsuperfamilie im menschlichen Genom [1,2]. GPCRs sind essenziell für die Regulation zahlreicher physiologischer Prozesse und durch ihre Membranständigkeit gut erreichbar. Dies macht sie zu beliebten Zielstrukturen für die pharmakologische Therapie.

GPCRs werden anhand ihrer Sequenzhomologie in sechs unterschiedliche Gruppen unterteilt:

Klasse A: Rhodopsin-ähnliche Rezeptoren

Klasse B: Sekretinrezeptor-Familie

Klasse C: Metabotrope Glutamate/Pheromone

Klasse D: Fungal-mating-Pheromonrezeptoren

Klasse E: Zyklische AMP-Rezeptoren (cAMP)

Klasse F: Frizzled/Smoothed (Wnt-Signalweg)

Nur vier dieser sechs Klassen kommen beim Menschen vor (A, B, C und F). Die umfangreichste Gruppe ist die Klasse A mit über 700 G-Protein-gekoppelten Rezeptoren [3]. Fast die Hälfte davon sind für den Geruch- und Sehsinn verantwortlich. Die andere Hälfte sind nicht-sensorische Rezeptoren.

1.1.1 Adrenozeptoren

Die Zielstrukturen, die für diese Arbeit relevant sind, sind die sogenannten Adrenozeptoren. Sie gehören der Rezeptorklasse A an. Es gibt zwei Arten von adrenergen Rezeptoren: die α -Adrenozeptoren sowie die β -Adrenozeptoren. Ihre

Einleitung

endogenen Liganden sind Adrenalin und Noradrenalin, die sie mit unterschiedlicher Affinität binden [4].

Adrenozeptoren werden häufig in Verbindung mit dem bekannten Merkspruch „fight or flight“ gebracht. Damit ist gemeint, dass Lebewesen, die über diese Rezeptorklasse verfügen, in einer Gefahren- oder Stresssituation Energiereserven freisetzen und dafür der Fokus von der allgemeinen Homöostase abnimmt. Alle in dem Moment nicht überlebensnotwendigen Funktionen, beispielsweise der Vorgang der Verdauung, wird auf ein Minimum zurückgefahren. Was früher noch der Anblick eines Säbelzähntigers für den Urmenschen war, ist heute der Moment vor einer Prüfung, einem Wettkampf oder der Besuch beim Zahnarzt. Dies geschieht über folgenden Mechanismus: die Amygdala sendet Signale an die beiden Nebennieren. Als Antwort darauf schüttet die Nebennierenrinde das Glukokortikoid Cortisol aus und die Nebennierenmark schüttet das Katecholamin Adrenalin sowie zu einem geringeren Anteil auch Noradrenalin aus. Der Hauptanteil von Noradrenalin wird im zentralen Nervensystem beziehungsweise in den postganglionären Neuronen des Sympathikus gebildet und wirkt als Neurotransmitter. Adrenalin und Noradrenalin aus dem Nebennierenmark werden direkt in den Blutkreislauf ausgeschüttet und wirken als Hormone. Sie dienen in Gefahrensituationen zur Aufrechterhaltung des Kreislaufs, indem sie unter anderem die Herzfrequenz und den Blutdruck steigern [5,6].

Je nach Lokalisation und Subtyp des Adrenozeptors kann es entgegengesetzte Wirkungen geben. Beispielsweise kommt es durch eine Aktivierung der α_1 -Rezeptoren zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur im Gastrointestinaltrakt und in der Haut und damit einhergehend auch eine Vasokonstriktion. Gleichzeitig kommt es durch Aktivierung von β_2 -Rezeptoren am Herzen und in der quergestreiften Muskulatur zu einer Vasodilatation der Gefäße. Dies hat den Effekt, dass das Blut aus der Peripherie zentralisiert wird. Die Ursache für die unterschiedlichen Wirkungen der Adrenozeptoren ist, dass sie mit verschiedenen G-Proteinen gekoppelt sind, welche die Induktion von unterschiedlichen ‚second messenger‘-Systemen kontrollieren [7].

Einleitung

Es wird grundsätzlich eingeteilt in α 1- und α 2-Adrenozeptoren sowie in β 1-, β 2- und β 3-Rezeptoren (Abbildung 1) [8].

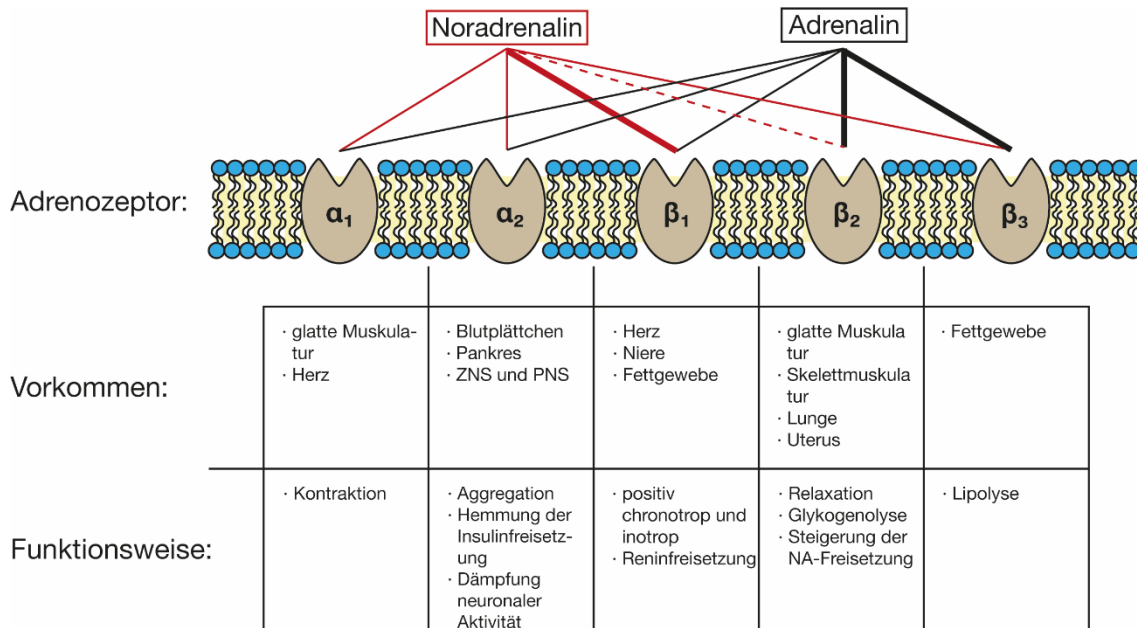


Abbildung 1: α - und β -Rezeptoren in einer Doppellipidmembran

Die zwei Hauptliganden der α - und β -Rezeptoren, Noradrenalin und Adrenalin, sind oberhalb einer Doppellipidmembran dargestellt, in welcher exemplarisch die fünf Adrenozeptoren α 1, α 2, β 1, β 2 und β 3 eingebettet sind. Die Farben der Liganden sind nur zur besseren Unterscheidung ausgewählt worden. Die Affinität der Agonisten zu den einzelnen Rezeptoren ist unterschiedlich und wird hier als schwache Affinität (gestrichelte Linie), moderate Affinität (dünne Linie) oder starke Affinität (breite Linie) dargestellt. Unterhalb der Doppellipidmembran zeigt die Tabelle das häufigste Vorkommen beziehungsweise die jeweilige Funktionsweise. ZNS = zentrales Nervensystem; PNS = peripheres Nervensystem; NA = Noradrenalin.

1.2 Therapeutischer Nutzen von Adrenozeptorantagonisten und -agonisten

In einem bisher unveröffentlichten Substanz-Screen der Arbeitsgruppe Philipp wurde herausgefunden, dass Antagonisten des β 3-Rezeptors Zilien-abhängige Prozesse modulieren können. Da die Knochen- und Knorpelentwicklung mindestens teilweise von Zilien abhängig ist [9–11], war das Ziel dieser Arbeit herauszufinden, ob die Aktivität von β -Adrenozeptoren Knorpel- und Knochenentwicklung beeinflussen könnte. Um diese Hypothese zu testen, wurde der Zebrafisch als Modellorganismus herangezogen, der im Folgenden

Einleitung

genauer beschrieben wird. Für die Modulation von β -adrenergen Rezeptoren stehen der Wissenschaft umfangreiche Substanzen zur Verfügung.

Die Pharmaindustrie hat GPCRs als wichtige Zielstrukturen bereits seit langer Zeit entdeckt. In der Tat wirken 34% aller auf dem Markt erhältlichen Medikamente, die durch die FDA (US Food and Drug Administration) bewilligt worden sind, über GPCRs [12]. Die wohl bekanntesten Vertreter sind die β -Rezeptorblocker, im allgemeinen Sprachgebrauch auch β -Blocker genannt. Dazu gehören beispielsweise *Atenolol*, *Bisoprolol* und *Metoprolol*. Alle drei wirken selektiv auf β_1 -Adrenozeptoren [7]. Diese Art von Arzneistoffen blockieren je nach ärztlich gestellter Indikation selektiv oder unselektiv β -Adrenozeptoren. Sie wirken als Antagonisten. Das bedeutet, dass sie an bestimmte Zielmoleküle binden, hier die β_1 -Adrenozeptoren, und die Effekte ihrer natürlichen Liganden aufheben.

β_1 -selektive Antagonisten haben eine hohe Kardioselektivität und sind daher bei koronaren Herzkrankheiten, arterieller Hypertonie oder Herzrhythmusstörungen indiziert [13]. β_2 -selektive Antagonisten haben keinen klinischen Nutzen und sind dementsprechend auch nur zu experimentellen Zwecken zugelassen [14]. β_3 -Antagonisten, wie das in dieser Arbeit benutzte *SR59230A* oder *L-748,337*, werden bisher nur experimentell verwendet. Jüngste Forschungen haben aber gezeigt, dass die Blockade von β_3 -adrenergen Rezeptoren einen negativen Einfluss auf das Tumorwachstum von Melanomen haben soll [15].

Auch α -Adrenozeptoren können medikamentös blockiert werden. Die α -Blocker werden ebenfalls bei Erkrankungen wie der benignen Prostatahyperplasie und der arteriellen Hypertension (α_1 -Adrenozeptor) und bei der erektilen Dysfunktion (α_2 -Adrenozeptor) verwendet [16].

Im Gegensatz können die Adrenozeptoren auch stimuliert werden mittels Sympathomimetika. Diese sogenannten Agonisten bewirken an ihren Zielmolekülen einen ähnlichen oder identischen Effekt wie die natürlichen Liganden.

β_1 -Sympathomimetika sind aus der Notfallmedizin bekannt. Sie werden bei akuten Herzinsuffizienzen eingesetzt und wirken positiv inotrop [17]. β_2 -Sympathomimetika sind Arzneistoffe, die auf β_2 -Adrenozeptoren eine stimulierende Wirkung haben. Diese zeigen vor allem Wirkung an der glatten Muskulatur der Bronchien und des Uterus, wodurch es zu einer Muskelrelaxation kommt [18]. Hauptindikationen für solche Substanzen wie *Formoterol* sind hier das Asthma bronchiale und die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD). Bei den β_3 -Adrenozeptor-Agonisten wurde bisher nur *Mirabegron* zugelassen, ein Arzneimittel, welches bei einer hyperaktiven Blase eingesetzt wird [19].

α -adrenerge Rezeptoren können ebenfalls mittels Agonisten manipuliert werden. α_1 -Sympathomimetika bewirken unter anderem eine lokale Vasokonstriktion, welche bei einer Rhinitis indiziert sein kann. α_2 -Sympathomimetika bewirken durch Stimulierung der Rezeptoren eine negative Feedbackschleife, wodurch Katecholamine vermindert sezerniert werden. Dies hat eine blutdrucksenkende Wirkung [20].

1.3 Zebrabärbling

Der Zebrabärbling (*Danio rerio*), umgangssprachlich häufig auch Zebrafisch genannt, ist ein seit den 1970er Jahren etablierter Modellorganismus in der Genetik und Erforschung pathologischer Entwicklungsprozesse. George Streisinger und sein Laborteam gelten zu den Ersten, die Zebrabärblinge für Forschungszwecke verwendet haben [21]. Er und seine Kollegin Charline Walker erforschten, wie genetische Mutationen Auswirkung auf das Nervensystem haben und setzten Standards in Haltung und Züchtung der Fische [22].

Der große Vorteil dieser Tiere für die Forschung sind die geringe Körpergröße von drei bis vier Zentimeter und der damit einhergehende geringe Platzbedarf (*Abbildung 2*), die kurze Generationszeit von zwei bis drei Monate [23] und die ausreichend hohe Anzahl an Eiern (100 – 200 Stück pro Weibchen). Besonders die schnelle, extra-uterine Entwicklung bietet Vorteile im Vergleich zu anderen Modellorganismen. Bereits 24 Stunden nach Fertilisation setzt der Herzschlag und somit die Blutzirkulation ein. Zebrabärblinge im Embryonen- und

Einleitung

Larvenstadium sind optisch transparent, bis die Pigmentierung nach einigen Tagen einsetzt. Dadurch lassen sich die Organ-, Gewebeentwicklung und Phänotypen *in vivo* und in Echtzeit mit Lichtmikroskopen beobachten.



Abbildung 2: Zebraabärblinge in Paarungsbecken

In der Abbildung sieht man Zebraabärblinge in einem Verpaarungsbecken. Viele männliche und einige wenige weibliche Exemplare befinden sich im Becken. Die Weibchen erkennt man an ihren ausgeprägten Bäuchen. Der ansteigende Boden imitiert den Uferbereich eines Gewässers, welches der bevorzugte Bereich zur Verpaarung von Zebraabärblingen in freier Wildbahn ist.

Außerdem besteht eine im Vergleich zu invertebraten Modellorganismen wie der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) oder dem Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*) große Ähnlichkeit von Entwicklung und Morphologie der Organe zum Menschen. 72 Stunden nach Fertilisation ist die Embryogenese beendet und bereits 96 Stunden nach Fertilisation sind die meisten Organe, einschließlich des kardiovaskulären Systems, der Leber und der Nieren, voll entwickelt [24]. Dieser Entwicklungsstand ist vergleichbar mit drei Monate alten menschlichen Embryonen [23]. Zebraabärblinge werden heutzutage auch zur Entwicklung und Erforschung von Arzneimittel angewendet [25]. Dabei werden die potenzielle Eignung sowie die mögliche Toxizität herausgestellt [26]. Die Fische nehmen die Substanzen anfangs direkt über die Haut, danach zusätzlich auch über die Kiemen auf und ab 72 Stunden nach Fertilisation ist auch eine perorale Aufnahme möglich [26].

Einleitung

Neben den bereits anfangs genannten Vorteilen der Zebrabärblinge als Modellorganismus existiert noch ein weiteres ausschlaggebendes Merkmal: die hohe Genomähnlichkeit zwischen Mensch und Zebrabärbling. Die gemeinsam Abstammungslinie von Zebrabärblingen und Säugetieren habe sich vor circa 420 Millionen Jahren getrennt [27]. Circa 71,4 % aller menschlichen Protein-codierenden Gene haben mindestens einen Ortholog beim Zebrabärbling [28]. Es wurden mehr als 26000 protein-codierende Gene analysiert und nachgewiesen [29]. Das ist die größte Anzahl aller bisher sequenzierter Wirbeltiere [28].

Durch gezielte Genstörungen und dadurch entstehende Genmutationen können Phänotypen hervorgerufen werden, wodurch einzelnen Genen eine Verbindung zu bestimmten Erkrankungen nachgewiesen werden kann. Dies ist bereits bei 38 % aller protein-codierenden Gene festgestellt worden, wie Kettleborough et al berichteten [30]. Diese Erkrankungen haben häufig große Ähnlichkeit zu menschlichen Erkrankungen. Howe et al haben 2013 die Liste der menschlichen Gene und ihrer Mutationen, welche in der ‚Online Mendelian Inheritance in Man‘ - Datenbank seit 1985 gesammelt wird [31], mit den menschlichen Genen, die mindestens einen Ortholog in Zebrabärblingen haben, verglichen. Von den damals 3176 gelisteten Genen in der OMIM – Datenbank hatten 2601 (82 %) mindestens einen Zebrabärbling – Ortholog [28]. Dies zeugt abermals von der passenden Wahl des Zebrabärblings als Modellorganismus zur Erforschung menschlicher Erkrankungen. Es ist bereits viel Forschung in Richtung kardialer Entwicklung und Regeneration [32], Krebs [33], Nozizeption [34] und Angiogenese [35] geschehen. Auch die Entwicklung von Knochen und Knorpel ist sehr ähnlich zwischen Menschen und Zebrabärblingen. Beispielsweise ist der menschliche Transkriptionsfaktor *Sox9* wichtig für die Osteo- und Chondrogenese [36]. Zebrabärblinge verfügen hingegen über die Co-Orthologe *sox9a* und *sox9b*. *Yan et al* haben in ihren Versuchen herausgefunden, dass eine Mutation beziehungsweise Deletion dieser Gene zu skelettalen Missbildungen und teilweise fehlenden Ohren führt [37].

1.4 Knochen- und Knorpelentwicklung

Der menschliche Körper hat einen aktiven und einen passiven Bewegungsapparat. Der aktive Teil besteht aus der Skelettmuskulatur, der passive Teil setzt sich zusammen aus Knochen und Bindegewebsstrukturen, wie zum Beispiel Knorpel und Bänder. Das harmonische Zusammenspiel beider Anteile ist essenziell für ein physiologisches Funktionieren des Körpers.

Der Mensch besitzt 213 Knochen [38], wobei die Angaben je nach Quelle zwischen 206 und 214 variieren können. Knochen bestehen zu 10 % ihres gesamten Volumens aus Knochenzellen [38]. 90 % davon machen Osteozyten aus [39]. Osteozyten sind Osteoblasten, die von Osteoid - das ist die organische Grundsubstanz, die von anderen Osteoblasten produziert worden ist und mineralisiert werden kann - bedeckt sind und damit inaktive Zellen sind. Neben diesen beiden Zellarten gibt es noch die multinukleären Osteoklasten, die für den Abbau der Knochensubstanz sorgen. Makroskopisch unterteilt man den Knochenaufbau in äußere Kompakta und innere Spongiosa. Beide Knochensubstanzen unterscheiden sich in Dichte, metabolischer Aktivität und Aufbau [40].

Knochen erfüllen verschiedene Aufgabenbereiche wie beispielsweise der Stützfunktion. Sie bilden das Gerüst des Körpers beziehungsweise das wortwörtliche Skelett des Menschen. Sie sind der Ansatz oder Ursprung für Muskeln und Sehnen. Knochen sind dabei nicht nur statisch, sondern passen sich dynamisch den äußeren Einflüssen an. Je nach Reiz bildet sich neue Knochenhartsubstanz oder sie wird abgebaut. Dabei ist die Art des Reizes ausschlaggebend: Zug- und moderate Druckkräfte sind physiologisch für den Knochen. Pathologisch für Knochen sind hingegen sehr hohe Druckkräfte oder gar keine Belastung (z.B. durch lange Bettlägerigkeit oder Immobilität im Alter) [41]. Diese führen auf Dauer zu Knochenabbau.

Zusätzlich bieten einige Knochen eine Schutzfunktion. Der knöcherne Thorax umschließt lebenswichtige Organe wie die beiden Lungenflügel und das Herz und sorgt dafür, dass durch äußere Einflüsse, wenn diese moderat sind, keine

direkten Traumata entstehen können. Das gleiche gilt für die Schädelknochen, die das Gehirn schützen.

Die dritte wichtige Funktion von Knochen ist der Mineralspeicher. 50 - 70 % eines Knochens sind anorganische Bestandteile, 20 – 40 % sind organischer Natur, 5 – 10 % bestehen aus Wasser und weniger als 3 % aus Lipiden [42]. Der Großteil des anorganischen Teils besteht aus Hydroxyapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), also Calcium und Phosphat, aber auch aus Natrium und Magnesium [39,43]. Dieser anorganische Teil des Knochens ist für seine hohe Festigkeit verantwortlich [44].

Die vierte Funktion ist die Blutbildung im Knochenmark. Knochenmark besteht aus den Spongiosabälkchen und der dazwischenliegenden Matrix, die sich aus pluripotenten hämatopoetische Stammzellen, unreifen und reifen Blutzellen, Adipozyten und retikulärem Bindegewebe zusammensetzt. Je nach Anteil der Zellen wird zwischen gelbem Knochenmark (hoher Fettanteil, inaktiv, keine Beteiligung an Blutbildung) und rotem Knochenmark (hoher Anteil an Blutzellen, aktiv an der Hämatopoese beteiligt) unterschieden [45].

1.4.1 Arten der Knochenbildung

Grundsätzlich gibt es zwei Arten, wie ein Knochen entstehen kann. Entweder durch die sogenannte desmale Ossifikation oder durch chondrale Ossifikation (*Abbildung 3*) [46]. Bei beiden Varianten entsteht am Ende des Prozesses Geflechtknochen. Zu Beginn sind undifferenzierte Mesenchymzellen vorhanden.

Bei der desmalen Ossifikation, auch direkte Ossifikation genannt, verdichten sich Mesenchymzellen und differenzieren dann direkt zu Osteoblasten, welche dann die Knochenmatrix (Osteoid) bilden. Desmale Ossifikation findet beim Menschen vor allem an den Schädelknochen statt aber auch in der Maxilla, Mandibula und Clavicula [47]. Das Knochenwachstum erfolgt dann über appositionelles Wachstum [48].

Die meisten Knochen des Menschen entstehen durch chondrale Ossifikation, auch indirekte Ossifikation genannt. Hier differenzieren die Mesenchymzellen, die sich bereits zu der Form des späteren Knochens verdichtet haben, zuerst zu

Chondrozyten [49]. Diese bilden das hyaline Primordialskelett. Im Laufe der Entwicklung werden die Chondrozyten hypertroph und gehen durch Apoptose unter und werden resorbiert. Osteoblastische Progenitorzellen, Osteoklasten und Endothelzellen wandern ein und bilden Kortikalis und Spongiosa. Es entsteht der primäre Knochen (=Geflechtknochen). Dabei handelt es sich um unreifen Knochen, der nur in der embryonalen Entwicklung oder bei einer Frakturheilung entsteht. Die Knochengrundsubstanz ist noch ungeordnet und die Kollagenfasern und Gefäße haben keine definierte Ausrichtung. Außerdem verfügt der Geflechtknochen nur über eine geringe mechanische Festigkeit im Vergleich zum späteren Lamellenknochen. Dieser entsteht sukzessiv durch Umbau und Reorganisation des primären Knochens nach der Geburt beziehungsweise nach einer Fraktur. Die chondrale Ossifikation wird beim Menschen unterschieden in peri- und endochondrale Ossifikation. Bei der perichondralen Ossifikation beginnt die Verknöcherung des Primordialskeletts von außen und bei der endochondralen Ossifikation beginnt sie aus dem Inneren heraus.

1.4.2 Längenwachstum von Knochen

Während der Kindheit und des frühen Erwachsenseins wächst Knochen in longitudinaler und radialer Richtung [42]. Das Wachstum der langen Röhrenknochen in radiale Richtung sowie der kurzen und platten Knochen erfolgt durch periostale Apposition. Osteoblasten bilden Osteoid auf dem Periost, welches später mineralisiert wird [48]. Das Längenwachstum der Röhrenknochen hingegen erfolgt über eine sogenannte Wachstumsplatte. Diese befindet sich zwischen dem mittleren Stück (Diaphyse) und dem Endstück (Epiphyse). Die Wachstumsplatte besteht aus Chondrozyten, die sich in verschiedenen Abschnitten dieses Bereichs in unterschiedlichen Differenzierungsgraden befinden. Auf der Seite der Epiphyse ist die Reservezone, die aus undifferenzierten Chondrozyten besteht. Auf der Seite der Diaphyse ist die Öffnungszone. Hier gehen die bereits hypertrophen Chondrozyten durch Apoptose unter. Anschließend wandern Osteoblasten in die entstandenen Hohlräume ein und ossifizieren [48].

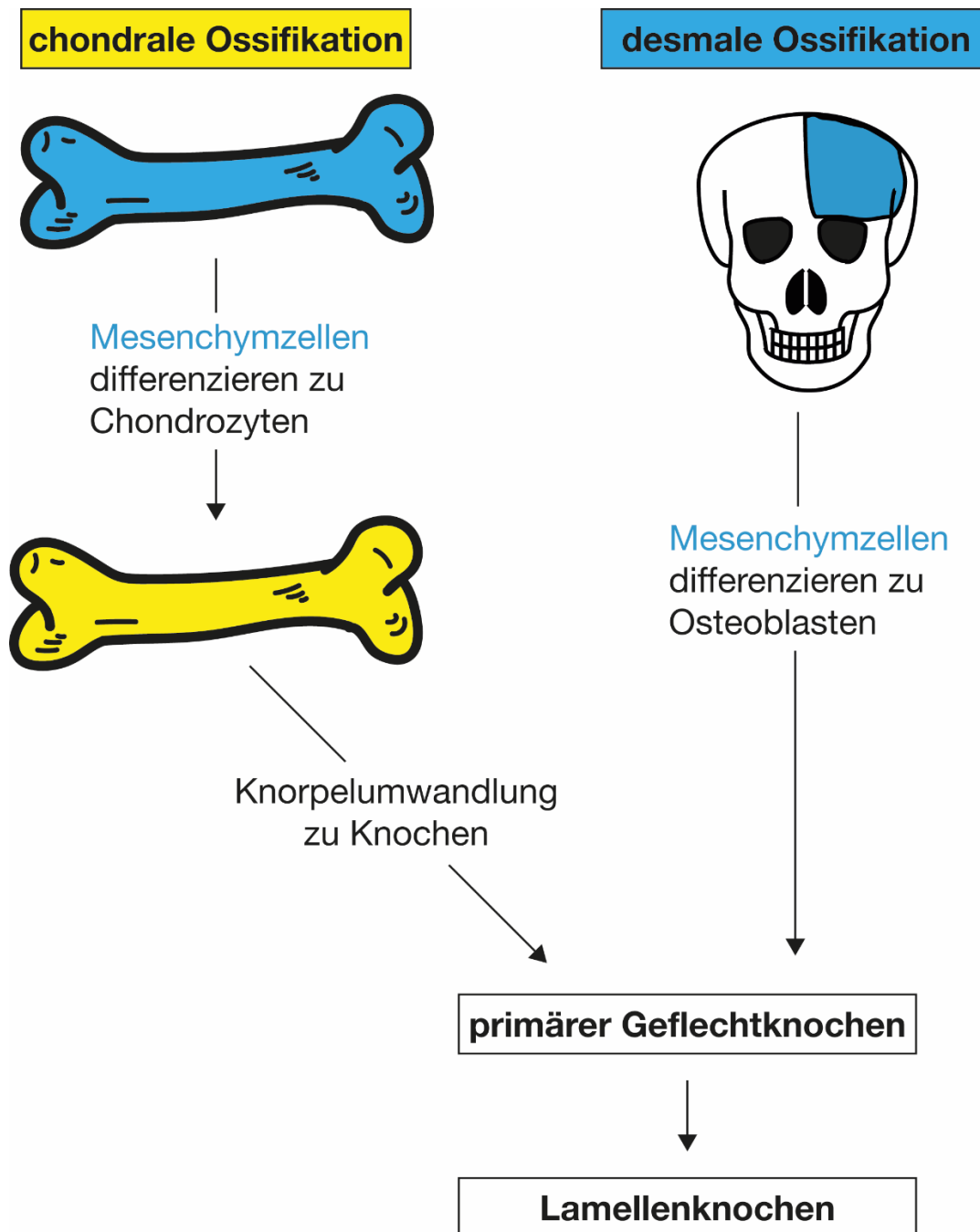


Abbildung 3: Verschiedene Arten der Ossifikation

Anhand der Grafik soll veranschaulicht werden, welche Möglichkeiten der Ossifikation vorhanden sind. Exemplarisch dafür ist auf der linken Seite eine Skizze eines langen Röhrenknochens, die in der Regel chondral ossifizieren, und auf der rechten Seite eine Skizze eines Schädels mit blau gekennzeichnetem Os frontale sinistrum abgebildet. Die meisten Knochen des Neurokraniums ossifizieren desmal. Es wird deutlich, dass bei beiden Varianten anfangs ein Grundgerüst aus Mesenchymzellen besteht (hier in blauer Farbe dargestellt). Diese wandeln sich bei der chondralen Ossifikation in Chondrozyten (hier in gelber Farbe) und später in Osteoblasten und -klasten. Bei der desmalen Ossifikation wandeln sich die Mesenchymzellen ohne

Einleitung

Zwischenstufe in Knochenzellen um. Bei beiden Varianten entsteht so am Ende primärer Geflechtknochen, der sich durch Umbauvorgänge später in lamellären Knochen umwandelt.

Die Ossifikation bei Zebrabärbling ist grundsätzlich ähnlich. Die erste Ossifikation beginnt 72 bis 96 Stunden nach Fertilisation und ist mit zwei bis vier Monaten beendet [50]. Knochen können ebenfalls über desmale Ossifikation entstehen. Bei Zebrabärblingen macht diese Art jedoch den Hauptanteil aller ossifizierenden Strukturen aus [50]. Die chondrale Ossifikation macht den kleineren Anteil aus. Ähnliche Knochen können unterschiedlich ossifizieren bei Zebrabärblingen und Säugetieren [51].

In *Abbildung 4* ist ein fixierter Zebrabärbling zu sehen, bei dem Knorpel- und Knochenstrukturen angefärbt wurden. Die für diese Arbeit wichtigsten Knorpel und Knochen sind der Branchiostegalstrahl, die Keratohyale, das Palato-Quadratus und der Meckel Knorpel. All diese anatomischen Strukturen befinden sich im Bereich des Unterkiefers.

Einleitung

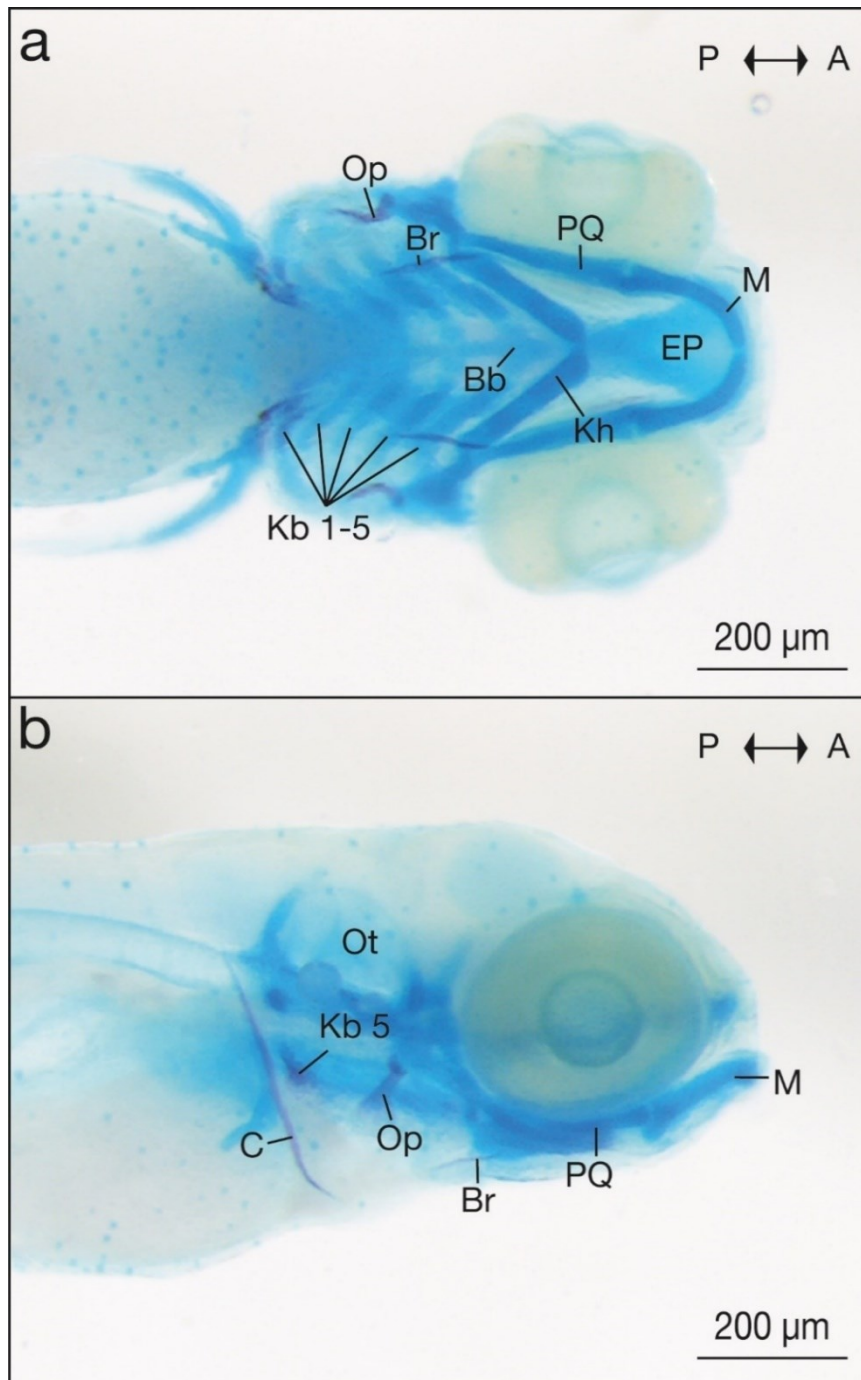


Abbildung 4: Anatomische Strukturen im Zebrafärbling

Es handelt sich in a) und b) um denselben Zebrafärbling im Alter von 5 dpf in ventraler (a) und lateraler (b) Ansicht. Er ist bereits mit der Doppelfärbung nach Walker und Kimmel fixiert und gefärbt worden. Folgende Strukturen sind beschriftet: Bb = Basibranchiale, Br = Branchiostegalstrahl; C = Cleithrum; EP = Ethmoidale Platte; Kb 1 - 5 = Keratobranchiale 1 - 5; Kh = Keratohyale; M = Meckel Knorpel; Op = Operculare; Ot = Otolithe; PQ = Palato-Quadratus. Legende: P = posterior; A = anterior.

1.5 Embryonale/angeborene Knochendefekte/- entwicklungsstörungen

Skeletterkrankungen zählen zu den seltenen Erkrankungen. Nichtsdestotrotz betreffen sie knapp 1,5 % aller Geburten [52]. Die neueste und zehnte Auflage über genetisch skelettale Störungen des *Nosology Committee of the International Skeletal Dysplasia Society* benennt 461 unterschiedliche Erkrankungen, eingeteilt in 42 Gruppen [53]. Bei 425 der 461 Erkrankungen ist bekannt durch welche Genvariation sie ausgelöst werden. Gruppe 9 ist die Gruppe der „Ziliopathien mit großen skelettalen Auswirkungen“, welche 13 menschliche Erkrankungen umfasst. Sechs davon wurden bereits bei Zebraabärlingsmodellen nachgewiesen [52]. Dazu gehören unter anderem die kranioektodermale Dysplasie (u.a. Zahnfehlbildungen, verminderter Haarwuchs, Skelettdysplasien), das orofaziodigitale Syndrom Typ 2 und Typ 4 (Typ 2: Kleinwuchs, Hypoplasie des Mittelgesichtes, Gaumenspalte; Typ 4: Verkürzung der Beine, hypoplastische Mandibula, Gaumenspalte), das Kurzripp-Polydaktylie-Syndrom (verkürzte Rippenbögen, unterentwickelte Lunge, Vielfingerigkeit) und das Ellis-van-Creveld-Syndrom (Thoraxdeformität, Herzfehler und ektodermale Defekte) [53]. Der Grund all dieser Erkrankungen liegt in der fehlerhaften Funktionsweise der primären Zilien. Dies zeigt erneut die Bedeutung der primären Zilien in der Knochen- und Knorpelentwicklung.

Bekanntere genetisch bedingte Knochenerkrankungen sind die Osteopetrose und die Osteogenesis imperfecta (OI). Bei der OI ist am häufigsten die Synthese des Kollagen Typ I gestört, welches ein wichtiger Bestandteil der Knochenmatrix ist. Symptomatisch sind gehäufte Anzahl an Knochenfrakturen, weshalb die Erkrankung häufig auch Glasknochenkrankheit genannt wird. Menschen mit Osteopetrose, auch bekannt als die Marmorknochenkrankheit, leiden ebenfalls an höherer Frakturanfälligkeit. Die Ursache hierfür liegt aber an einer pathologischen Anhäufung von Knochenmatrix aufgrund einer Fehlfunktion der Osteoklasten.

2. Material und Methoden

2.1 Zebrabärblingshaltung

Für die Experimente wurden die Wildtyp Zebrabärblings-Linien EK und AB verwendet. Zebrabärblinge werden in Aquarien mit 3.5 oder 8 l Volumen in einer automatisierten Anlage gehalten (TECNIPLAST, IT). Wassertemperatur (28 °C), pH (7.0) sowie Leitfähigkeit (500 µS) werden dabei konstant überwacht und nach Bedarf von der Anlage automatisch eingestellt. Die Beleuchtung im Labor ist in einem Rhythmus geregelt, der 14 Stunden Tages- und 10 Stunden Nachtzeit darstellt. Die Zebrabärblinge werden mit Lebendfutter (Great Salt Lake Artemia Cysts, SANDERS), sowie zusätzlich mit Trockenfutter gefüttert (Zebra Feed, SPAROS). Zur Verpaarung werden Zebrabärblinge eines Haltungstankes am Nachmittag des Vortages in einen Verpaarungstank (1.7 l Slope Breeding Tank, TECNIPLAST, IT) überführt (*Abbildung 2*). Abgelegte Eier werden am nächsten Morgen gesammelt, mit E3-Embryo-Medium gespült und in ebensolchem in 5 cm Petrischalen bei 28.5 °C weiter inkubiert (RI150 Refrigerated Incubator, Thermo Fisher Scientific, USA). Die unbefruchteten und toten Eier werden aussortiert. Haltung der Zebrabärblinge ist von den lokalen Behörden bewilligt und erfolgt gemäß der einschlägigen nationalen sowie EU-Richtlinien.

2.2 Dechorionisierung

Sobald die Embryonen ein Alter von 24 Stunden nach Befruchtung (hpf) haben, werden sie unter Verwendung eines Mikroskops (M125C, LEICA) dechorionisiert. Dabei wird das Chorion mittels scharfer Pinzetten eröffnet und entfernt, um eine gleichmäßige Aufnahme der später verwendeten Wirkstoffe in die Organismen der Embryonen zu gewährleisten.

2.3 Technische Daten zu den verwendeten Adrenorezeptorantagonisten und -agonisten

Für diese Forschung haben wir für die Untersuchung der β_1 -Rezeptoren *Metoprolol* verwendet. *Metoprolol* hat K_D -Werte von 47 nM für β_1 , 2960 nM für β_2

und 10100 nM für β_3 [54]. Der K_D -Wert ist die Dissoziationskonstante und besagt wie hoch die Bindungsaffinität eines Wirkstoffes zu seinem Ziel (Rezeptor, Ionenkanal, Enzyme, etc.) ist. Je geringer der Wert ist, desto höher ist die Affinität.

Die Untersuchung der β_2 -Rezeptoren erfolgte mit *ICI118,551*. Es handelt sich hierbei um einen hoch-selektiven inversen Agonisten für β_2 -Rezeptoren. Inverse Agonisten binden an spontanaktiven Rezeptoren und senken deren Aktivität. Sie wirken also ähnlich wie Antagonisten. Die K_i -Werte sind 120 nM für β_1 , 1,2 nM für β_2 und 257 nM für β_3 [55]. Der K_i -Wert (Hemmkonstante) ist ebenfalls eine Dissoziationskonstante, die sich aber auf die Bindung von Inhibitoren an Enzymen bezieht.

Die Untersuchung der β_3 -Rezeptoren erfolgte mit *CL316243*, *L-748,337* und *SR59230A*.

CL316243 ist ein β_3 -Agonist. Agonisten bewirken an ihren Zielmolekülen einen ähnlichen oder identischen Effekt wie die natürlichen Liganden. Der EC_{50} -Wert für β_3 -Rezeptoren beträgt 3 nM und ist damit um das 10000 fache selektiver als für β_1 - oder β_2 -Rezeptoren [56]. Der EC_{50} -Wert gibt die effektive Konzentration an, die eine halbmaximale Wirkung hervorruft. *CL316243* erhöht die Thermogenese im braunen Fettgewebe und senkt die Blutkonzentration von Glucose und Insulin [56].

L-748,337 ist ein kompetitiver β_3 -Antagonist. *L-748,337* hat Dissoziationskonstanten (K_D -Wert) von 4 nM für β_3 -Rezeptoren, 204 nM für β_2 -Rezeptoren und 390 nM β_1 -Rezeptoren.

SR59230A ist ein weiterer β_3 -Antagonist. *SR59230A* hat einen EC_{50} -Wert von 40 nM für β_3 -Rezeptoren, 408 nM für β_1 -Rezeptoren und 648 nM β_2 -Rezeptoren.

2.4 Behandlung

Die Zebrafisch-Embryonen werden 48 Stunden nach der Befruchtung nach dem Zufallsprinzip in zwei gleich große Gruppen (circa 30 Exemplare pro Gruppe) aufgeteilt und in Six-Well-Platten (SARSTEDT, GER) mit einem Volumen von

Material und Methoden

jeweils zwei ml überführt. Die Behandlung mit dem jeweiligen Wirkstoff erfolgt in der Regel einmalig und chronisch. Das bedeutet, dass das Aufbewahrungsmedium inklusive des Wirkstoffes nicht ausgetauscht wird (Abbildung 5).

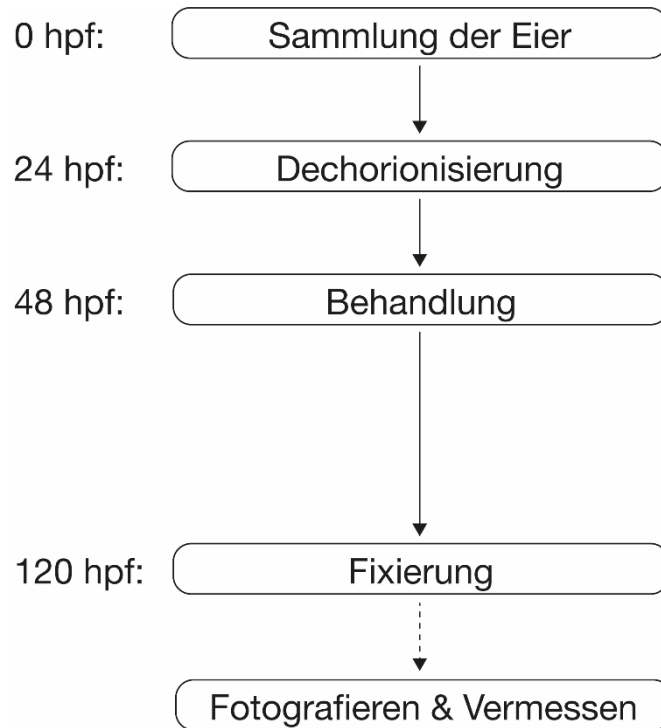


Abbildung 5: Übersicht des Workflows

Direkt nach der Befruchtung werden die Eier eingesammelt. Die unbefruchteten Eier werden hier bereits entfernt. 24 Stunden nach der Befruchtung werden die Eier von ihrem schützenden Chorion vorsichtig befreit, sowie tote Embryonen entfernt. 48 Stunden nach der Befruchtung werden die Zebrafärblinge in gleichgroße Gruppen aufgeteilt und je nach Gruppe mit einer pharmakologisch wirksamen Substanz behandelt. 120 Stunden nach der Befruchtung werden die Zebrafärblinge fixiert und gefärbt. Im Anschluss werden sie dann fotografiert und vermessen.

Die Kontrollgruppe wurde jeweils mit E3-Embryo-Medium behandelt oder mit E3-Embryo-Medium, welches zusätzlich 0,1% Dimethylsulfoxid (DMSO) enthielt. Es gibt gewöhnlich keine seiner Protonen ab [57]. Daher können polare sowie apolare Stoffe sich gut in DMSO lösen. Der Grund für die Verwendung von DMSO ist, dass zwei der verwendeten Substanzen, SR59230A sowie L-748,331, nicht in Wasser löslich sind und deshalb in DMSO gelöst werden müssen. Damit

Material und Methoden

entstehende Effekte nicht auf DMSO zurückgeführt werden, wird der Kontrollgruppe auch die gleiche DMSO-Konzentration zugeführt.

Die Arbeitsgruppe um Harry Bartfeld stellte in ihren Studien fest, dass eine Konzentration von 0,5 % nicht zytotoxisch ist. Erst eine Konzentration ab 1 % verursachte Toxizität [58,59]. Die Arbeitsgruppe um Te-Hao Chen stellte keine Entwicklungsstörungen bei Konzentrationen von 0,01 % und 0,1 % fest. Eine Tendenz zu Deformitäten wurde erst ab 1 % beobachtet [60]. Auch die Food and Drug Administration hat in ihrer jüngsten Veröffentlichung ihrer Leitlinie für die Industrie von 2018 DMSO in die dritte, sicherste Kategorie der Lösemittel eingeteilt [61] und somit in dieselbe Klasse wie Ethanol [62].

Im Gegensatz zu SR59230A sowie L-748,331 sind Metoprolol, ICI118,551 oder CL316243 gut in Wasser löslich, sodass die Kontrollgruppen nicht einer Vehikel-Kontrolle unterworfen werden mussten.

Die gewählte Konzentration des Wirkstoffes der Behandlungsgruppe richtet sich dabei nach der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}), die vom Hersteller genannt wird.

Folgende Konzentrationen werden verwendet:

Metoprolol	1 μ M
ICI118,551	200 nM & 500 nM
SR59230A	10 μ M
L-748,337	1 μ M
CL316243	1 μ M
Dimethylsulfoxid	0,1 %

Tabelle 1: Konzentration der verwendeten Wirkstoffe

Die Embryonen werden nach Applikation des Wirkstoffes weiter bei 28,5 °C inkubiert. Die Herzfrequenz der Embryonen wird für jedes verwendete Medium einmalig 24 Stunden nach der Gabe gemessen und protokolliert.

2.5 Fixierung

Fünf Tage nach der Befruchtung (120 hpf) werden die Embryonen fixiert. Die Fixierung folgt dabei dem Fixierungs- und Färbeprotokoll von Walker und Kimmel [63]. Die Embryos werden dabei mit Tricaine anästhesiert und anschließend mit Paraformaldehyd (4 %) fixiert und nach dem oben genannten Protokoll gefärbt.

2.6 Färbung

Das Färbeprotokoll von Walker und Kimmel [63] sieht *Alizarin Red S* als Knochenfärbung und *Alcian Blue* als Knorpelfärbung vor. *Alcian Blue* ist eine kationische Färbung, die vor allem an negativ geladenen Glykosaminoglykanen bindet [64]. Diese sauren Polysaccharide befinden sich unter anderem in Mastzellen (Heparin), in Basallaminae (Heparansulfat) sowie in Knorpelgewebe (Chondroitinsulfat) [65]. *Alizarin Red S* ist eine anionische Färbung, die an Calcium bindet [66]. Es benötigt also mineralisierte Strukturen. Die Besonderheit dieses Protokolls liegt darin, dass es eine säurefreie Doppelfärbung ist, die sowohl Knochen als auch Knorpel in unterschiedlichen Farben anfärbt. Gewöhnliche Knorpelfärbungen mit *Alcian Blue* sind säurehaltig. Die Säure wird benötigt, um verschiedene Blautöne zu erhalten, damit unterschiedliche Knorpelstrukturen differenziert werden können. Das Hydroxylapatit von Knochen und Zähnen wird durch Säuren gelöst, wodurch diese demineralisieren. Walker und Kimmel verwenden $MgCl_2$ anstelle der Säuren.

2.6.1 Doppelfärbung

Im Detail wurde folgendermaßen vorgegangen: nach der Fixierung werden die Embryonen mit PBS (Zusammensetzung siehe „2.9 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen“) gewaschen. Das PBS wird entnommen und anschließend werden die Embryonen für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit 50 % Ethanol (in PBS) dehydriert. Das Ethanol wird entnommen und die Färbelösung hinzugefügt. Diese besteht aus zwei Teilen (siehe auch: „2.9 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen“):

Material und Methoden

- Färbelösung Teil A:
 - o 0,02 % *Alcian Blue* Stammlösung
 - o 70 % EtOH
 - o 50 mM MgCl₂
- Färbelösung Teil B:
 - o 0,5 % *Alizarin Red S* (AppliChem, GER) in H₂O

Die *Alcian Blue* Stammlösung besteht aus 0,4 % Alcian blue 8GX, welches in 70 % Ethanol gelöst ist. Die *Alizarin Red* Färbung wird unverdünnt angewendet. Beide Färbelösungen werden miteinander vermischt und es wird 1 ml in ein Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf, GER) pipettiert, in dem sich bereits die fixierten Embryonen befinden. Die Gefäße verbleiben über Nacht bei Raumtemperatur in horizontaler Position auf einem Schüttler (40 RPM). Am nächsten Vormittag wird die Färbelösung entnommen und die Embryonen mit 1 ml H₂O (dest.) gewaschen. Danach wird das Wasser entnommen und die Embryonen werden gebleicht, damit die Pigmentierung entfernt wird. Dafür verwendet man 1 ml Bleichlösung bestehend aus 3 % H₂O₂ und 2 % KOH, um eine endgültige Konzentration von 1,5 % H₂O₂ und 1 % KOH zu erhalten. Die Mikroreaktionsgefäße werden mit geöffnetem Deckel für 20 Minuten stehengelassen. Dann wird die Bleichlösung entnommen und es wird 1 ml bestehend aus 20 % Glycerol und 0,25 % KOH hinzugegeben und für mindestens 30 Minuten auf einem Schüttler stehengelassen. Die Möglichkeit besteht auch es über Nacht stehen zu lassen, was in diesen Versuchen aber nicht gemacht worden ist. Anschließend wird die Lösung entnommen und es wird 1 ml bestehend aus 50 % Glycerol und 0,25 % KOH zu den Embryonen hinzugegeben. Die Gefäße verbleiben nun für mindestens zwei Stunden auf einem Schüttler (40 RPM) in horizontaler Position. Auch hier besteht die Möglichkeit, die Lösung über Nacht im Gefäß zu belassen. Die Lösung wird dann entnommen und es wird 1 ml bestehend aus 50 % Glycerol und 0,1 % KOH

hinzugegeben. Die Lagerung der Proben erfolgt bei 4 °C in der zuletzt genannten Lösung.

2.6.2 Knochenfärbung

Die soeben erläuterte Färbung wird verwendet, um Knochen und Knorpelstrukturen gleichzeitig sichtbar zu machen. Um nur Knochenstrukturen darzustellen, haben wir das Färbeprotokoll von Walker und Kimmel modifiziert. Im Folgenden wird das Procedere für eine reine Knochenfärbung erläutert:

Nach der Fixierung werden die Embryonen mit PBS (Zusammensetzung siehe „2.9 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen“) gewaschen. Das PBS wird entnommen und anschließend werden die Embryonen für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit 50 % Ethanol (in PBS) dehydriert. Das Ethanol wird entnommen und die Färbelösung hinzugefügt. Diese besteht nur aus 50 mM MgCl₂, 70 % Ethanol sowie 0,5 % *Alizarin Red S* (AppliChem, GER) in H₂O. Es wird 1 ml in ein Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf, GER) pipettiert, in dem sich bereits die fixierten Embryonen befinden. Die Gefäße werden über Nacht bei Raumtemperatur in horizontaler Position auf einem Schüttler bei 40 RPM inkubiert. Am nächsten Tag werden die Proben wie für die Doppelfärbung weiterverarbeitet (siehe vorheriger Abschnitt).

2.7 Fotografieren

Die fixierten und gefärbten Embryonen werden auf einen Objektträger mit Vertiefungen überführt, auf dem Methylcellulose (3 %) vorgelegt wurde. Die Embryonen werden dann so ausgerichtet, dass eine ventrale und danach eine laterale (rechte Seite) Aufnahme möglich ist. Alle Aufnahmen werden mit einem Mikroskop (M125C) mit MC190-HD-Kamera (beides LEICA) in vierfacher Vergrößerung erstellt.

2.8 Auswertung

Die erstellten Aufnahmen werden mittels einer Bildanalysesoftware (FIJI-Software, Version: 2.1.0/1.53c) ausgemessen. Gemessen und ausgewertet wurden vier Parameter (siehe *Abbildung 6*):

- Branchiostegalstrahl (*Abbildung 6a*)
- der Abstand zwischen der Dorsalseite des Verbindungspunkt zwischen beiden Meckel-Knorpeln und der Anteriorseite des Verbindungspunkts zwischen beiden Keratohyalknorpeln (im Folgenden bezeichnet als „Knorpelabstand“) (*Abbildung 6b*)
- die beidseitigen Winkel zwischen Keratohyalknorpel und Palato-Quadratus (im Folgenden bezeichnet als „lateraler Winkel“) (*Abbildung 6c*)
- der Winkel zwischen den Dorsalflächen beider Keratohyalknorpel (im Folgenden bezeichnet als „Innenwinkel“) (*Abbildung 6d*)

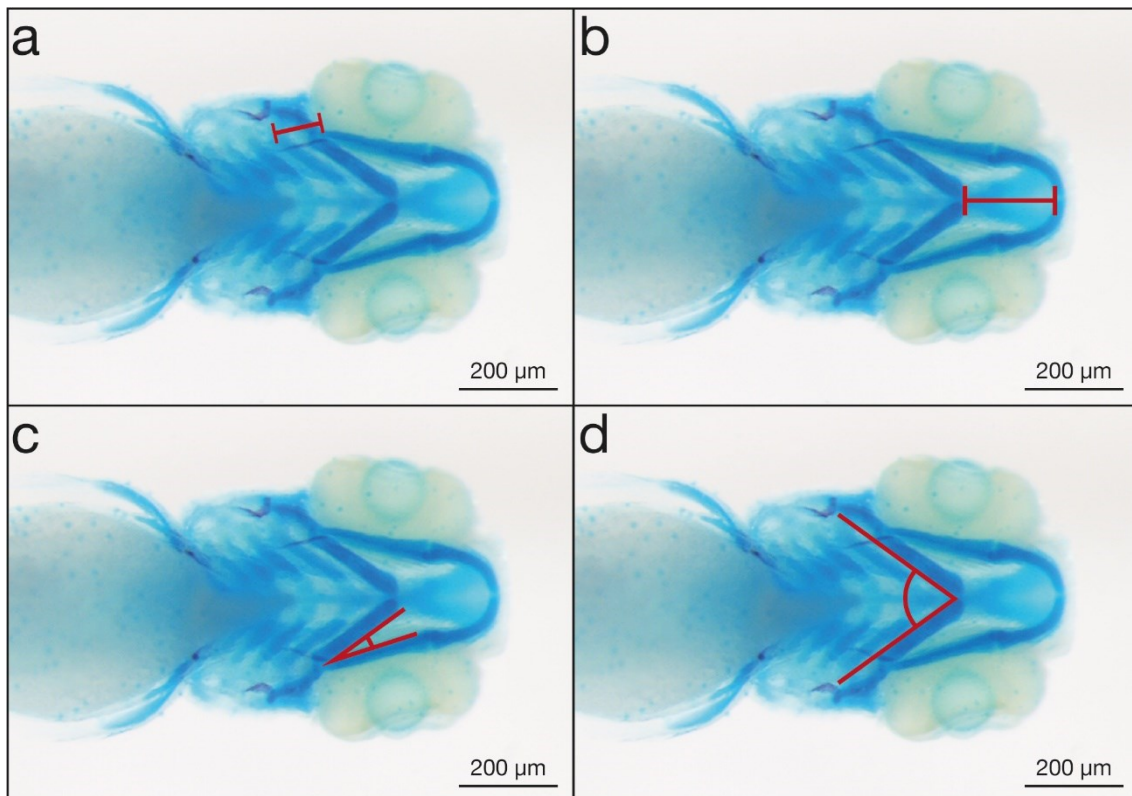


Abbildung 6: Gemessene Parameter anhand eines Beispielbildes

Anhand eines Beispielbildes werden die vier verschiedenen Parameter dargestellt. Der in der Abbildung sichtbare Fisch wurde mit L-748,337 (1 µM) behandelt. Das Bild wurde aufgrund der sauberen Färbung ausgewählt. (a) zeigt den rechten Branchiostegalstrahl. (b) zeigt den Knorpelabstand. (c) zeigt den linken lateralen Winkel. (d) zeigt den Innenwinkel. Die Messung der Augen erfolgte an der breitesten Stelle (hier nicht eingezeichnet).

Die Längenmessungen für Branchiostegalstrahl und Knorpelabstand werden in Relation zum Augendurchmesser gewertet. Dazu wird die Länge des rechten Branchiostegalstrahls (*Abbildung 6a*) durch die Breite des rechten Auges (gemessen am größten Durchmesser) dividiert. Das gleiche Verfahren erfolgt auf der linken Seite. Aus beiden Quotienten wird schließlich der Mittelwert gebildet. Durch dieses System wird die Bedeutung einzelner Messfehler minimiert. Der Knorpelabstand (*Abbildung 6b*) wird durch den Quotienten aus dem gemessenen Abstand zwischen Keratohyalknorpel und Meckel-Knorpel (genaues Verfahren siehe oben) und dem Mittelwert beider Augendurchmesser dargestellt. Der sogenannte laterale Winkel ist der Mittelwert der beidseits gemessenen Winkel zwischen der Innenseite des Keratohyalknorpels und der Innenseite des Palato-Quadratus (*Abbildung 6c*). Der Innenwinkel ist wie oben bereits beschrieben der Winkel zwischen den Dorsalflächen beider Keratohyalknorpel (*Abbildung 6d*).

2.9 Statistik

Die gemessenen Daten werden mit Hilfe einer Statistiksoftware (GraphPad PRISM, Version 8.4.3 (471)) ausgewertet. Dazu werden alle Daten zuerst mittels eines Shapiro-Wilk-Test auf Normalenverteilung untersucht. Normal verteilte Daten werden jeweils mit einem ungepaarten, zwei-seitigen t-Test mit Welch-Korrektur untersucht. Bei nicht normal verteilten Daten wird ein ungepaarter, zwei-seitiger Mann-Whitney-Test angewandt. Mit dem Welch's-Test und dem Mann-Whitney-Test soll herausgefunden werden, ob es einen signifikanten Unterschied der Daten beider Gruppen (Kontrollgruppe und behandelte Gruppe) gibt. Unterschiede mit einem p-Wert $<0,05$ werden als signifikant gewertet.

2.10 Fischlinien

Fischlinie	Genotyp
AB-Linie	Wildtyp
EK-Linie	Wildtyp

Tabelle 2: In dieser Studie verwendete Fischlinien

2.11 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen

Lösungen/Substanzen	Hersteller	Katalognummer
Alcian blue 8GX	MERCK, GER	1.05234
Alizarin Red S	AppliChem, GER	A2290,0100
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄)	MERCK, GER	1.06580
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, USA	20-139
Ethanol abs. 99%	SAV Liquid Production GmbH, GER	ETO-5000-99-1
Glycerin wasserfrei (Glycerol)	AppliChem, GER	A3552,1000
Kaliumchlorid (KCl)	MERCK, GER	1.04936
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	MERCK, GER	1.04873
Kaliumhydroxid	MERCK, GER	105033

Material und Methoden

Kalziumchlorid (CaCl ₂)	MERCK, GER	102391
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, USA	M2670-100G
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich, USA	M7506
Methylcellulose	Sigma-Aldrich, USA	M0387
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich, USA	S6014
Natriumchlorid (NaCl)	MERCK, GER	1.06404
Natronlauge	MERCK, GER	1.09137
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, USA	P6148-500G
Tricaine	PHARMAQ, NOR	352018
Wasserstoffperoxid-Lösung 30%	Fischar, GER	PZN7284650

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und konfektionierte Lösungen

Lösung	Mischungsverhältnis
<i>Alcian Blue</i> Stammlösung	<ul style="list-style-type: none"> - 200 mg Alcian blue 8GX - 20 ml Ethanol abs. - 20 ml H₂O - Auf 50 ml mit Ethanol abs. auffüllen
Bleichmittel	<ul style="list-style-type: none"> - 50 % Wasserstoffperoxid-Lösung (3 % F.C.) - 50 % Kaliumhydroxid (2 %)

Material und Methoden

E3-Medium 50x	<ul style="list-style-type: none"> - 29,2 g Natriumchlorid - 1,26 g Kaliumchlorid - 4,86 g Kalziumchlorid - 8,14 g Magnesiumchlorid - auf 2000 ml mit H₂O auffüllen
Embryo Medium	<ul style="list-style-type: none"> - 1 ml Hank`s solution 1 - 0,1 ml Hank`s solution 2 - 1 ml Hank`s solution 4 - 1 ml Hank`s solution 5 - 1 ml Hank`s solution 6 (frisch hergestellt) - 95,9 ml H₂O - Mit 1 M NaOH auf pH 7,2 einstellen
Färbelösung Teil A	<ul style="list-style-type: none"> - 5 ml Magnesiumchlorid - 70 ml Ethanol abs. - 5 ml <i>Alcian Blue</i> Stammlösung - 20 ml H₂O
Hank`s solution 1	<ul style="list-style-type: none"> - 8 g NaCl - 0,4 g KCl - 100 ml H₂O
Hank`s solution 2	<ul style="list-style-type: none"> - 0,358 g Na₂HPO₄ - 0,6 g KH₂PO₄ - 100 ml H₂O
Hank`s solution 4	<ul style="list-style-type: none"> - 0,72 g CaCl₂ - 50 ml H₂O
Hank`s solution 5	<ul style="list-style-type: none"> - 0,601 g MgSO₄ - 50 ml H₂O
Hank`s solution 6	<ul style="list-style-type: none"> - 0,35 g NaHCO₃ - 10 ml H₂O
Methylcellulose (3%)	<ul style="list-style-type: none"> - 1,5 g Methylcellulose portionsweise in 50 ml Embryo-

Material und Methoden

	Medium auflösen und auf Rüttler für eine Woche fixieren
PBS 10x	<ul style="list-style-type: none"> - 2 g Kaliumchlorid - 2 g Kaliumhydrogenphosphat - 80 g Natriumchlorid - 14,35 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
PFA 4%	<ul style="list-style-type: none"> - 2 g Paraformaldehyd (PFA) - 45 ml H₂O - 75 µL 1N NaOH - 5 ml PBS 10x
Tricaine, pH 7.05	<ul style="list-style-type: none"> - 400 mg Tricaine - 90 ml H₂O - ~2 ml 1M Tris

Tabelle 4: Für diese Studie hergestellte Lösungen

2.12 Inhibitoren und Antagonisten

Antagonisten/Agonisten	Hersteller	Katalognummer
CL 316243	Tocris Bioscience, GB	1499
ICI 118,551	Sigma-Aldrich, USA	I127-5MG
L-748,337	Tocris Bioscience, GB	2760
Metoprolol tartrate	Tocris Bioscience, GB	3256
SR59230A	CaymanChemical, USA	21407

Tabelle 5: Verwendete Inhibitoren, Antagonisten und Agonisten

2.13 Geräte und Einwegartikel

Geräte/Materialien	Hersteller
Aquariengestelle `Zebtec`	TECNIPLAST, IT
Inkubator `RI150 Refrigerated Incubator`	Thermo Fisher Scientific, USA
Mikroskop M125C mit MC190 HD-Kamera	LEICA, GER
Milli-Q Synergy (für H ₂ O)	MERCK MILLIPORE, GER
Pipetten	Eppendorf, GER
Pipettenspitzen 10 µL	Greiner BIO-ONE, AUS
Pipettenspitzen 200 µL	STARLAB, GER
Pipettenspitzen 1000 µL	STARLAB, GER
Six-Well Platten `6-Well, Standard F`	SARSTEDT, GER
Transferpipetten 3,5ml	SARSTEDT, GER
Vortex	STARLAB, GER
Waage CP622 und A1205	SARTORIUS, GER

Tabelle 6: Verwendete Geräte und Materialien

3. Ergebnisse

Die im Abschnitt 2.6.1 beschriebene Doppelfärbung von Knochen und Knorpel nach Walker und Kimmel führte zu sehr gut erkennbaren Ergebnissen. Auch die durch uns entworfene Modifikation zur Einzelfärbung von Knochen (Abschnitt 2.6.2) führte zu erstaunlich detailreichen Abbildungen, die das Erkennen vom Branchiostegalstrahl weiter verbesserten. In *Abbildung 7* ist der Unterschied zwischen Doppel- und Einzelfärbung dargestellt.

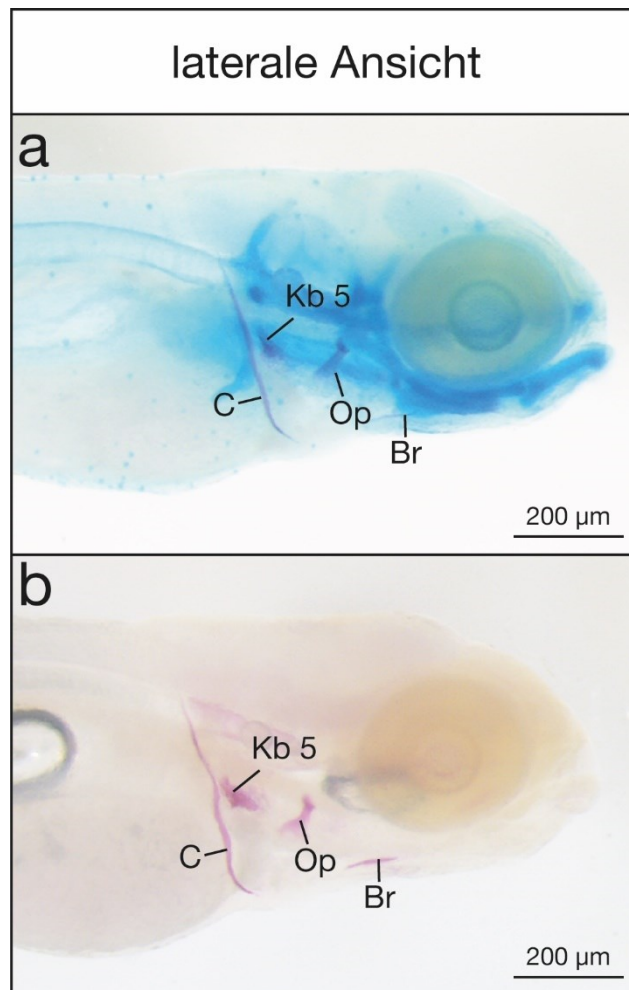


Abbildung 7: Vergleich von Doppelfärbung und Knochenfärbung

Hier wird der Unterschied zwischen der Doppelfärbung nach Kimmel und Walker (Abbildung 7 (a)) und der reinen Knochenfärbung (Abbildung 7 (b)) deutlich. In (a) dominiert der hellblaue bis tiefblaue Farbton durch den bei Zebrafischembryonen im Frühstadium hohen Knorpelanteil. Knöcherner Strukturen (rötlich/lila) sind aber noch gut erkennbar. In (b) dominiert hingegen der Rotanteil. Die bereits entwickelten Knochen sind sehr gut erkennbar. Folgende Knochen sind beschriftet: Br = Branchiostegalstrahl; C = Cleithrum; Kb5 = Keratobranchiale 5; Op = Operculare.

3.1 Behandlung mit SR59230A

Der eingangs beschriebene im Philipp Labor durchgeführte Screen hatte gezeigt, dass der β_3 -Antagonist SR59230A Zilien-abhängige Prozesse im Zebrafisch beeinflusst. Deshalb wurden die ersten Experimente dieser Studie mit dieser Substanz durchgeführt, um einen direkten Einfluss von β_3 -Adrenozeptoren auf Knorpel- und Knochenentwicklung zu testen. Diese Experimente zeigen, dass die frühe Embryonalentwicklung des Zebrafisches nicht grundsätzlich gestört wird, wenn die Fische mit 10 μM SR59230A behandelt werden. Um feine Unterschiede in der Knorpel- und Knochenentwicklung zu detektieren, wurden einige Strukturen genauer untersucht, die im Folgenden beschrieben werden.

3.1.1 Branchiostegalstrahl

Es ist zu erkennen, dass nach fünf Tagen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe mit DMSO und der behandelten Gruppe mit SR59230A mit einer Konzentration von 10 μM messbar sind (*Abbildung 8e*).

3.1.2 lateraler Winkel

Die lateralen Winkel haben sich nicht signifikant verändert unter Einfluss von 10 μM SR59230A (*Abbildung 8f*).

3.1.3 Innenwinkel

Die Analyse des Winkels zwischen den beiden Keratohyalen zeigte eine deutliche Verkleinerung nach Behandlung mit SR59230A (*Abbildung 9*). Dies bedeutet, dass dieser Winkel spitzer wird. Der Unterschied wird durch den Median am deutlichsten. Dieser betrug bei der Kontrollgruppe $73,57^\circ$, während der Median der behandelten Gruppe $70,46^\circ$ betrug. Die Differenz ist größer als 3° .

Ergebnisse

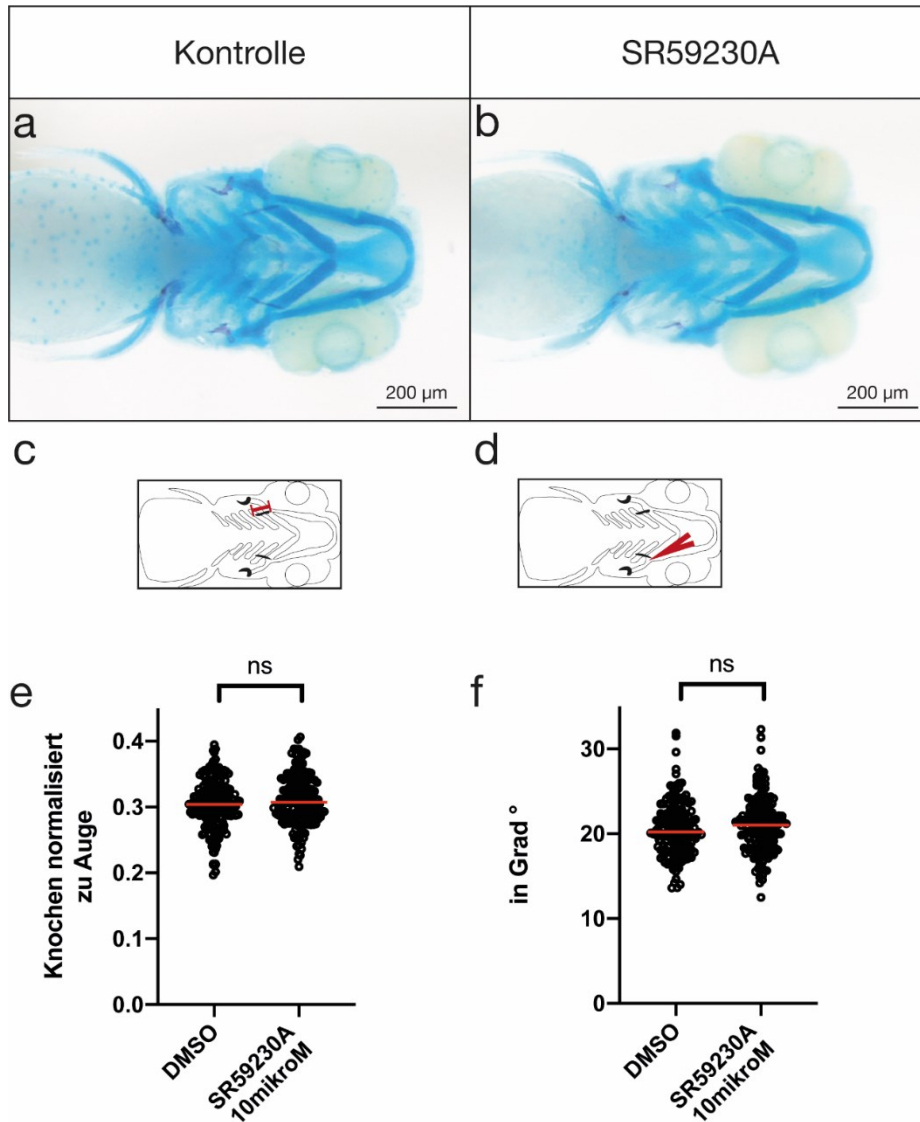


Abbildung 8: SR59230A ohne Einfluss auf Branchiostegalstrahl und lateralen Winkel

a), b) Zebrafishlarven (5 dpf) wurden mit DMSO (a) oder 10 μ M SR59230A (b) behandelt und einer Knochen- & Knorpelfärbung unterworfen. Ein Größenstandart ist angegeben.

c), d) Graphische Darstellung der gemessenen Strukturen. Gezeigt wird der rechte Branchiostegalstrahl (c) sowie der linke laterale Winkel (d)

(e) Kein signifikanter Unterschied bei der Längenmessung des Branchiostegalstrahls. $N=5$, Kontrollgruppe: $n = 184$; SR59230A: $n = 187$. Zwei-seitiger Mann-Whitney-Test, $p = 0,2767$.

(f) Auch beim lateralen Winkel ist kein signifikanter Unterschied messbar. $N=5$ Kontrollgruppe: $n = 169$; SR59230A: $n = 164$. Zwei-seitiger Mann-Whitney-Test, $p = 0,1875$.

Die rote Linie entspricht dem Median. Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum

Ergebnisse

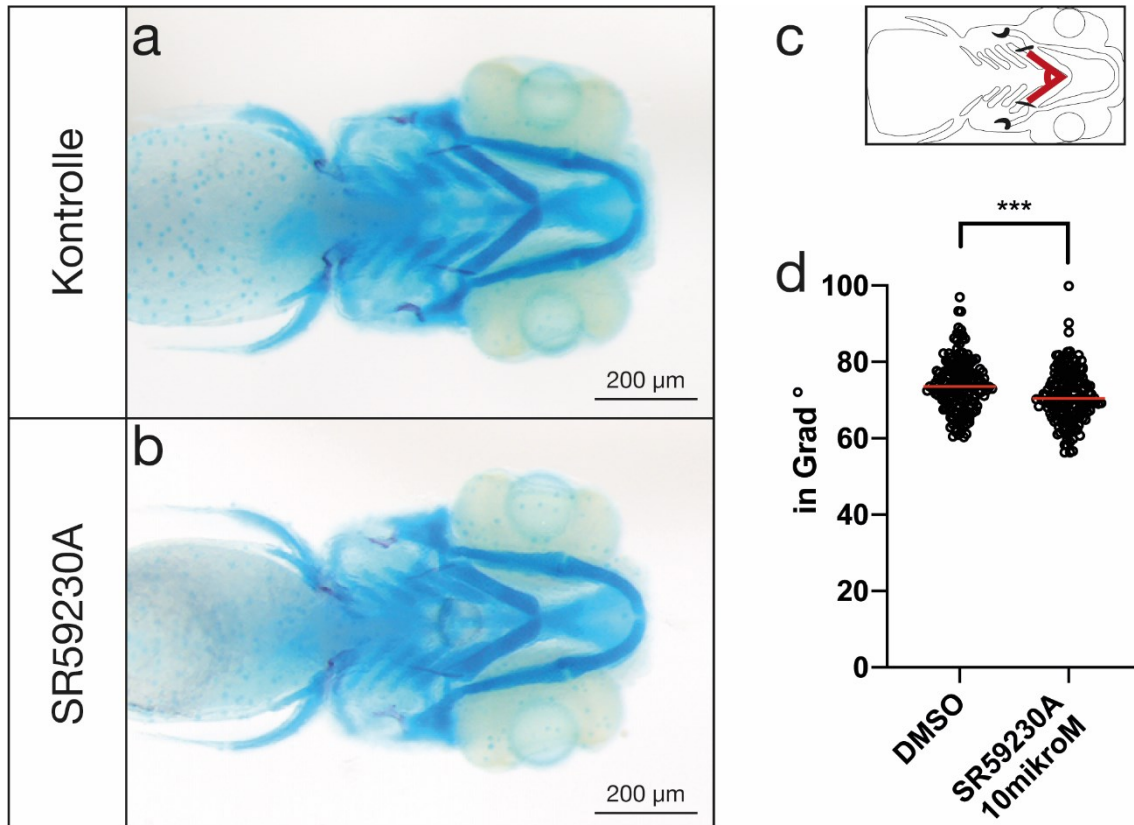


Abbildung 9: Innenwinkel verkleinert sich mit SR59230A

a), b) Zebrafischlarven (5 dpf) wurden mit DMSO (a) oder 10 μM SR59230A (b) behandelt und einer Knochen- & Knorpelfärbung unterworfen. Ein Größenstandart ist angegeben.

c) Graphische Darstellung der gemessenen Struktur. In rot angezeichnet ist der Innenwinkel zwischen den beiden Keratohyalen gemessen.

d) Es ist ein signifikanter Unterschied messbar. $N = 6$, Kontrollgruppe: $n = 169$; SR59230A: $n = 163$. Zwei-seitiger Mann-Whitney-Test, $p = 0,0002$. Die rote Linie entspricht dem Median. Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum.

3.1.4 Knorpelabstand

Nachdem bereits ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und behandelter Gruppe in Bezug auf den Innenwinkel feststellbar war, galt es nun herauszufinden, ob es auch einen Unterschied beim Knorpelabstand zu messen gab, da dieser direkt von der Position der Keratohyalen sowie vom Meckelknorpel abhängt. Die Analyse ergab eine signifikante Vergrößerung des Abstandes zwischen beiden Knorpelanteilen (Abbildung 10).

Ergebnisse

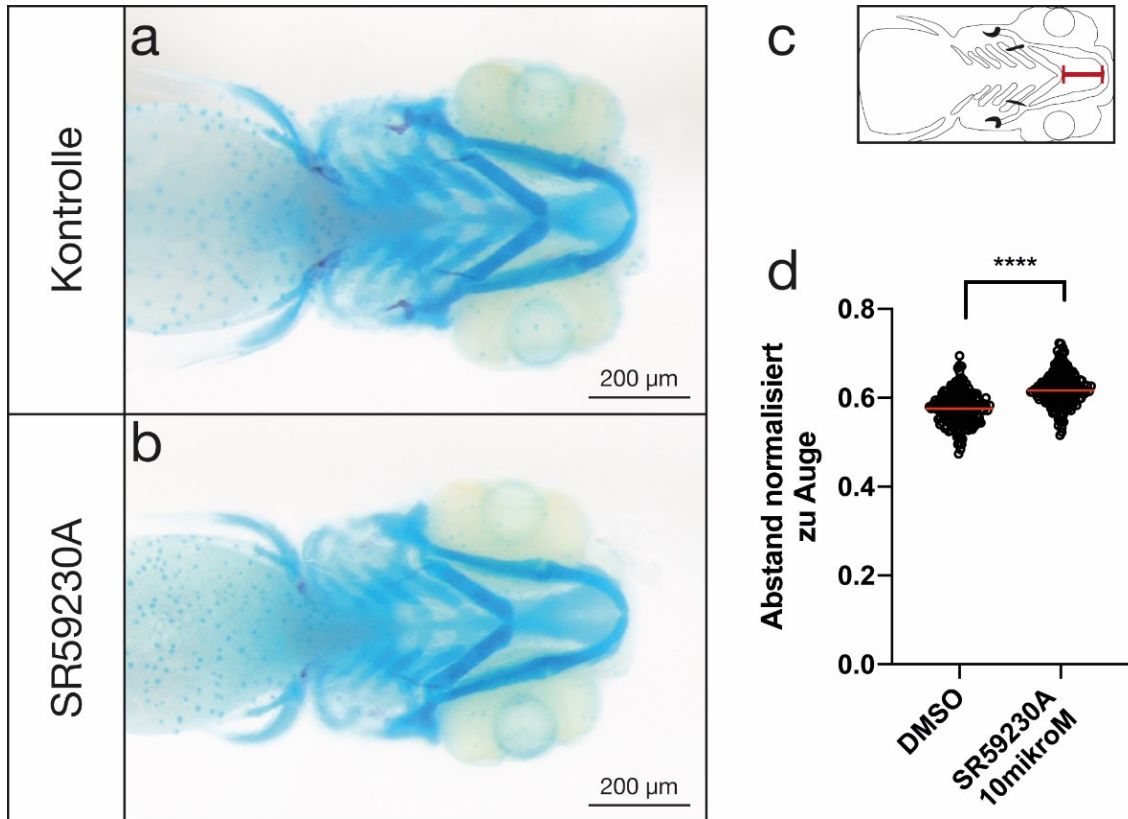


Abbildung 10: Knorpelabstand vergrößert sich mit SR59230A

a), b) Zebrafärbungen (5 dpf) wurden mit DMSO (a) oder 10 µM SR59230A (b) behandelt und einer Knochen- & Knorpelfärbung unterworfen. Ein Größenstandart ist angegeben.

c) Graphische Darstellung des gemessenen Knorpelabstands zwischen dem anterior befindlichen Meckelknorpel und den posterioren Keratohyalen.

d) Ein signifikanter Unterschied zwischen den Messungen der Kontroll- und der behandelten Gruppe. $N = 6$; Kontrollgruppe: $n = 168$, Median = 0,5759; SR59230A: $n = 164$, Median = 0,6161. Zwei-seitiger Welch`s-Test, $p < 0,0001$. Die rote Linie entspricht dem Median. Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum.

Ergebnisse

3.1.5 Herzfrequenz unter Einfluss von SR59230A

Die Herzfrequenz wurde wie bei allen anderen Wirkstoffen auch bei dieser Versuchsreihe gemessen. Der eigentliche Sinn dahinter bestand darin, die Wirksamkeit von Metoprolol nachzuweisen. Die folgende Grafik (Abbildung 11) zeigt, dass die Herzfrequenz sich reduzierte in der Gruppe der behandelten Fische im Vergleich zur Kontrollgruppe.

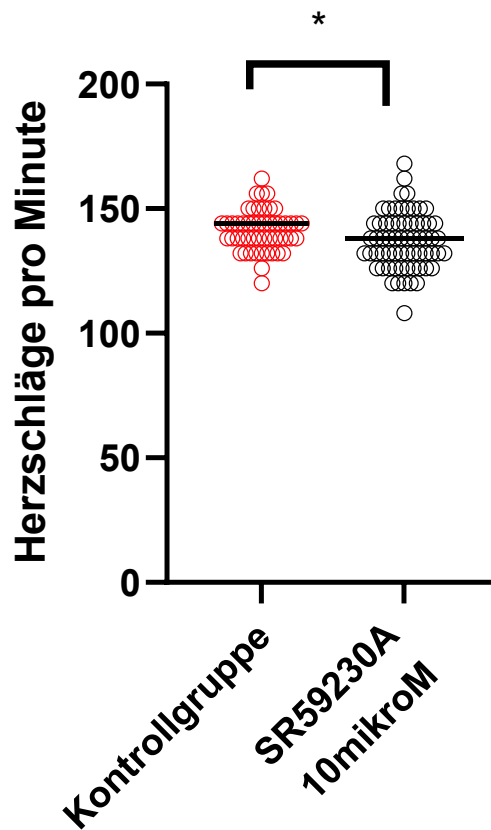


Abbildung 11: Herzfrequenz leicht reduziert mit SR59230A

Die Herzfrequenz sank in der behandelten Gruppe auf durchschnittlich 136,9 Schläge pro Minute (im Vergleich: Kontrollgruppe: 141,2 Schläge pro Minute). Zweiseitiger Mann-Whitney-Test, $p = 0,0172$. Kontrollgruppe: $n = 51$, Median = 144; SR59230A: $n = 65$; Median = 138. Der Median ist als schwarzer Balken eingezeichnet. Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum.

Ergebnisse

3.2 Behandlung mit L-748,337

Ein weiterer β_3 -Adrenozeptorantagonist, den wir verwendet haben, ist L-748,337 gewesen. Mit dieser Behandlung sollten die zuvor vorgestellten Ergebnisse von SR59230A untermauert werden. Wir haben für diese Versuche eine Konzentration von 1 μM gewählt.

Eine signifikante Veränderung durch die Behandlung mit SR59230A beim Innenwinkel und Knorpelabstand konnten mit L-748,337 nicht nachgewiesen werden. Alle untersuchten Strukturen ergaben keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 12)

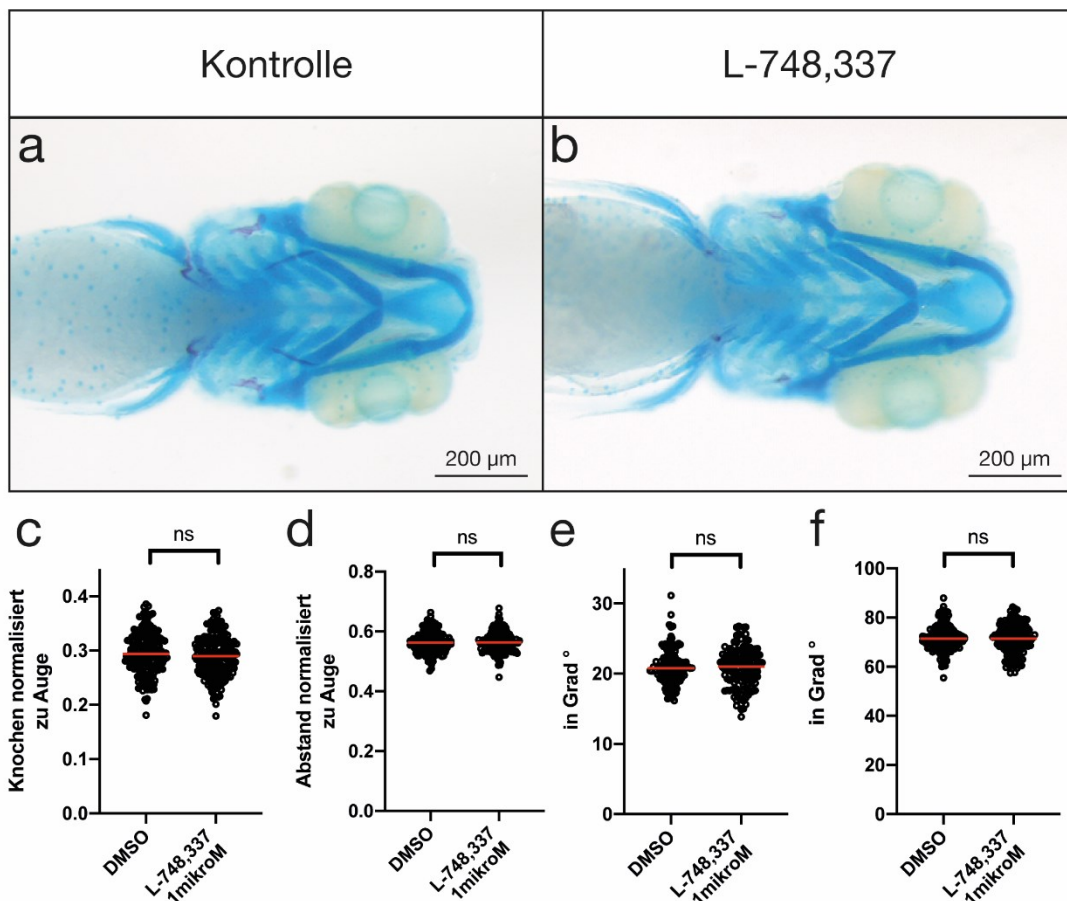


Abbildung 12: Kein signifikanter Unterschied durch L-748,337

a), b) Zebrafishlarven (5 dpf) wurden mit DMSO (a) oder L-748,337 (1 μM) (b) behandelt und einer Knochen- & Knorpelfärbung unterworfen. Ein Größenstandart ist angegeben.

c) Branchiostegalstrahl ohne signifikante Veränderung. $N = 7$; Kontrollgruppe: $n = 196$, Median = 0,2933. L-748,337: $n = 188$, Median: 0,2898.

d) Knorpelabstand ohne signifikante Veränderung. $N = 5$. Kontrollgruppe: $n = 146$, Median = 0,5626. L-748,337: $n = 141$, Median = 0,5634. Zweiseitiger Welch's-Test, $p = 0,9865$.

Ergebnisse

e) Laterale Winkel ohne signifikante Veränderung. $N = 5$. Kontrollgruppe: $n = 147$, Median = $20,78^\circ$. L-748,337: $n = 142$, Median = $21,01^\circ$. Zwei-seitiger Mann-Whitney-Test, $p = 0,9416$.

f) Innenwinkel ohne signifikante Veränderung. $N = 5$. Kontrollgruppe: $n = 146$, Median = $71,42^\circ$. L-748,337: $n = 142$, Median = $71,46^\circ$. Zwei-seitiger Welch`s-Test, $p = 0,3907$.

Die rote Linie entspricht dem Median. Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum.

3.2.1 Herzfrequenz unter Einfluss von L-748,337

Die Herzfrequenz wurde in dieser Versuchsreihe, genau wie in den vorherigen Versuchsreihen, 24 Stunden nach der Gabe der Substanz mithilfe eines Mikroskops gemessen. Es stellte sich heraus, dass L-748,337 keinen signifikanten Einfluss auf die Herzrate hat (Abbildung 13).

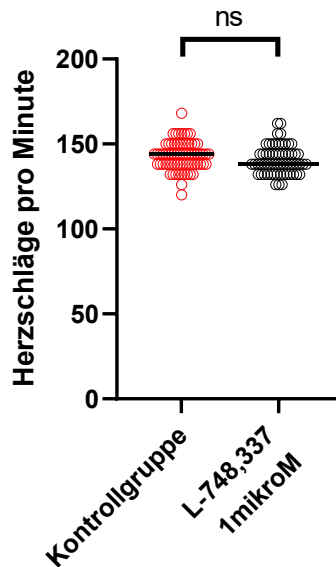


Abbildung 13: L-748,337 ohne messbare Wirkung auf die Herzfrequenz

Die Auswertung der Herzschläge pro Minute ergab, dass es keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,0679$) zwischen der Kontrollgruppe mit DMSO und der behandelten Gruppe mit L-748,337 gibt. DMSO: $n = 69$, Median = 144. L-748,337: $n = 61$, Median = 138. Zweiseitiger Mann-Whitney-Test, $p = 0,0711$. Die schwarzen Balken entsprechen den Medianen. Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum.

3.3 Behandlung mit CL316243

Bei CL316243 handelt es sich um einen β_3 -Rezeptoragonisten. Agonisten bewirken ähnliche oder gleiche Wirkungen wie die eigentlichen Liganden. Die Erwartungshaltung war dementsprechend, dass entgegengesetzte Ergebnisse im Vergleich zum Antagonisten SR59230A beobachtet werden würden.

3.3.1 Branchiostegalstrahl

Die Länge des Branchiostegalstrahl wurde sowohl mit der klassischen Doppelfärbung als auch mit der reinen Knochenfärbung untersucht. Weder bei SR59230A noch bei L-748,337 konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Jedoch wurde bei der Behandlung mit CL316243 beobachtet, dass sich die Länge des Branchiostegalstrahls signifikant verringert (*Abbildung 14g*).

3.3.2 Knorpelabstand

Der Abstand zwischen Meckel-Knorpel und Keratohyale in der Gruppe der mit CL316243 behandelten Zebraabärblinge veränderte sich nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe (*Abbildung 14h*). Im Vergleich dazu vergrößerte sich der Knorpelabstand bei der Behandlung mit SR59230A signifikant, während eine Behandlung mit L-748,337 keine Veränderung hervorgerufen hat.

Ergebnisse

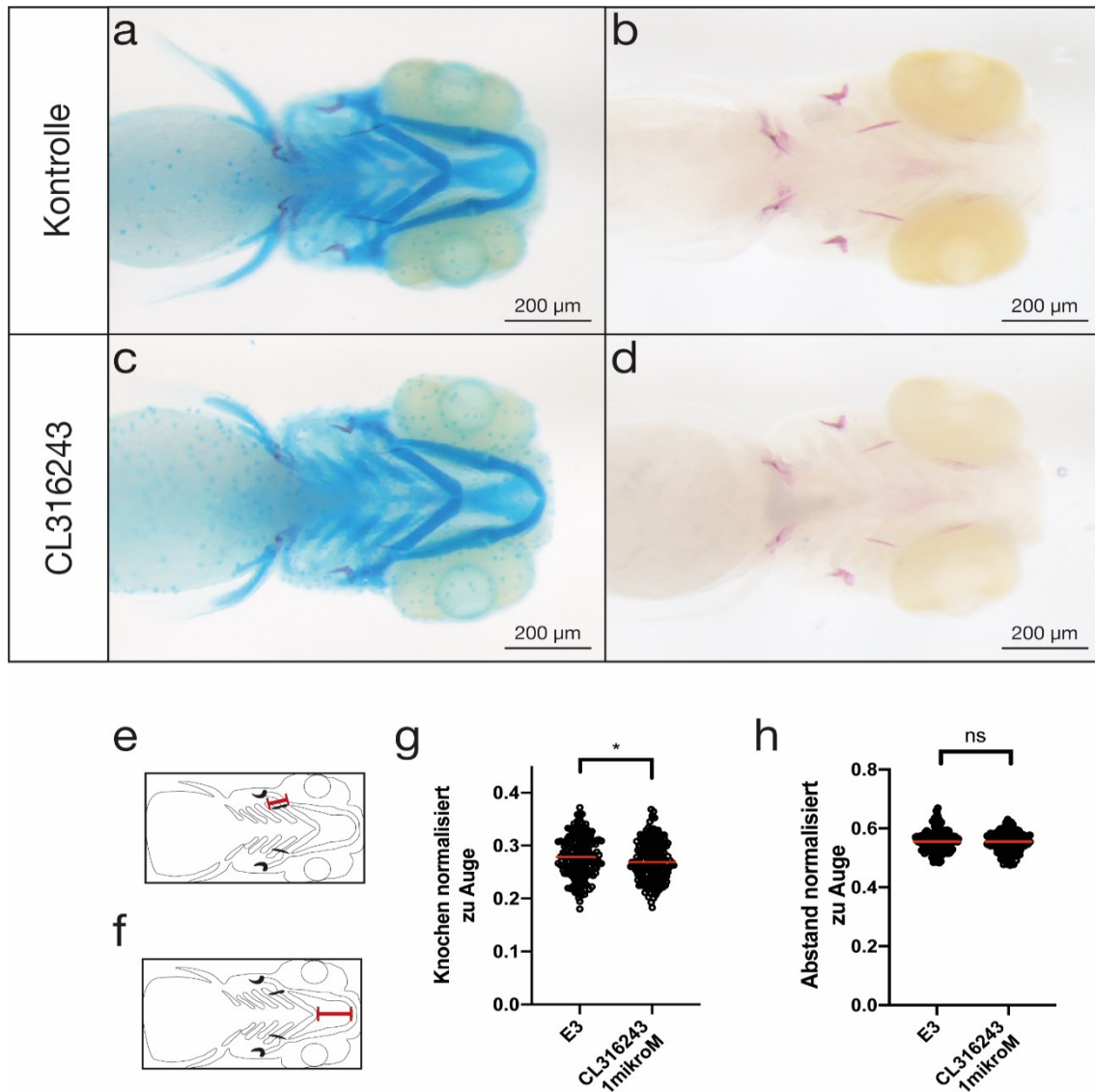


Abbildung 14: CL316243 verkleinert den Branchiostegalstrahl

a), b) Zebraabärblinge (5dpf) verblieben unbehandelt. In (a) wurden sie einer Knochen- und Knorpelfärbung unterworfen. In (b) wurden sie der reinen Knochenfärbung unterworfen. Ein Größenstandart ist angegeben.

c), d) Diese Zebraabärblinge (5dpf) wurden ebenfalls einer Knochen- und Knorpelfärbung (c) beziehungsweise der reinen Knochenfärbung (d) unterworfen. Diese Zebraabärblinge wurden jedoch mit CL316243 behandelt. Ein Größenstandart ist angegeben.

e), f) Graphische Darstellung des rechten Branchiostegalstrahls (e) und des gemessenen Knorpelabstands zwischen dem anterior befindlichen Meckelknorpel und den posterioren Keratohyalen (f).

g) Branchiostegalstrahl mit signifikanter Verkürzung der Länge in der Gruppe der behandelten Fische. $N = 7$; Kontrollgruppe: $n = 189$, Median = 0,2784; CL316243: $n = 188$, Median: 0,2686. Zwei-seitiger Welch`s-Test, $p = 0,0377$

h) Knorpelabstand bleibt gleich. $N = 5$; Kontrollgruppe: $n = 150$, Median = 0,5550; CL316243: $n = 145$, Median: 0,5548. Zwei-seitiger Welch`s-Test, $p = 0,0377$. Die rote Linie entspricht dem Median. Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum.

Ergebnisse

3.3.3 lateraler Winkel

Die Untersuchung der lateralen Winkel ergab, dass CL316243 - und damit einhergehend die Aktivierung des β_3 -Adrenozeptors - einen Einfluss auf die Größe des Winkels zu haben scheint. Der Winkel war durchschnittlich 1° größer in der behandelten Gruppe (Kontrollgruppe: $\bar{\theta} = 20,55^\circ$; CL316243: $\bar{\theta} = 21,46^\circ$, siehe *Abbildung 15d*). Inhibierung durch Behandlung mit SR59230A und L-748,337 hingegen hatten keinen signifikanten Einfluss auf den lateralen Winkel.

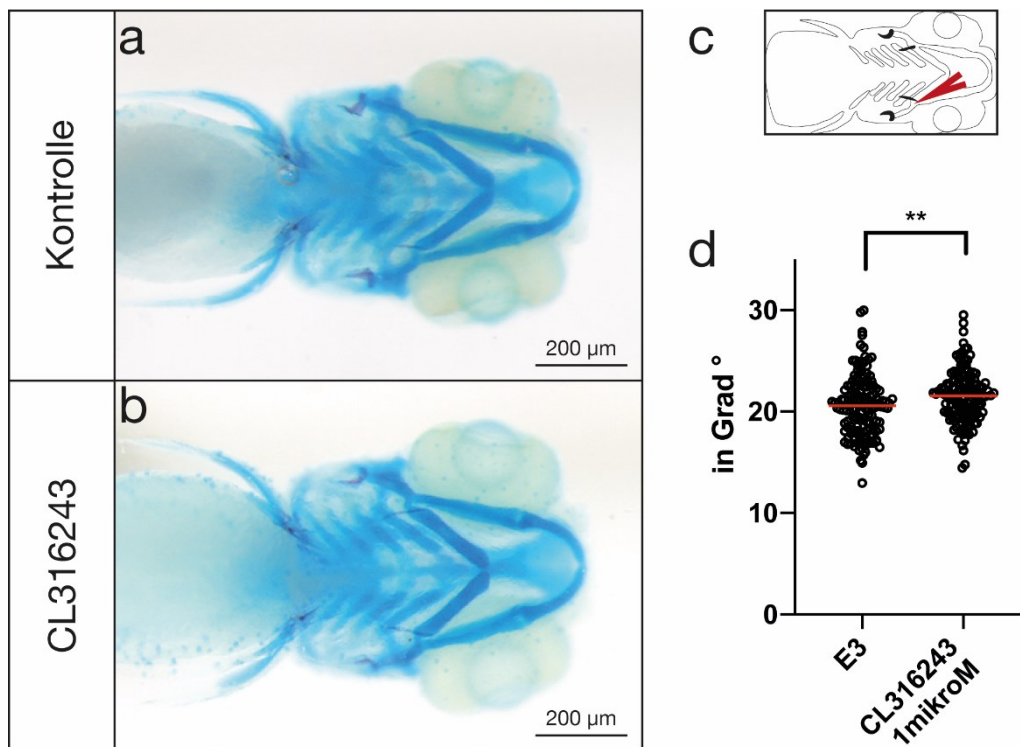


Abbildung 15: CL316243 vergrößert den lateralen Winkel

a), b) Zebrafärblinge (5dpf) wurden nicht behandelt (a) oder mit $1 \mu\text{M}$ CL316243 (b) behandelt und einer Knochen- & Knorpelfärbung unterworfen. Ein Größenstandart ist angegeben.

c) Graphische Darstellung der gemessenen Struktur. Gezeigt ist der linke laterale Winkel.

d) Ein signifikanter Unterschied ist messbar. $N = 5$. Kontrollgruppe: $n = 147$, Median = $20,57^\circ$; CL316243: $n = 146$, Median = $21,55^\circ$. Zwei-seitiger Mann-Whitney-Test, $p = 0,0021$. Die rote Linie entspricht dem Median. Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum.

Ergebnisse

3.3.4 Innenwinkel

Der Innenwinkel zwischen den beiden Keratohyalen-Knorpel erfährt ebenso wie der eben beschriebene laterale Winkel eine signifikante Veränderung durch die Behandlung mit CL316243. Es lässt sich feststellen, dass der Innenwinkel in der Gruppe der behandelten Fische verglichen mit der Kontrollgruppe sich vergrößert. Die Vergrößerung betrug durchschnittlich $1,88^\circ$ (Abbildung 16d).

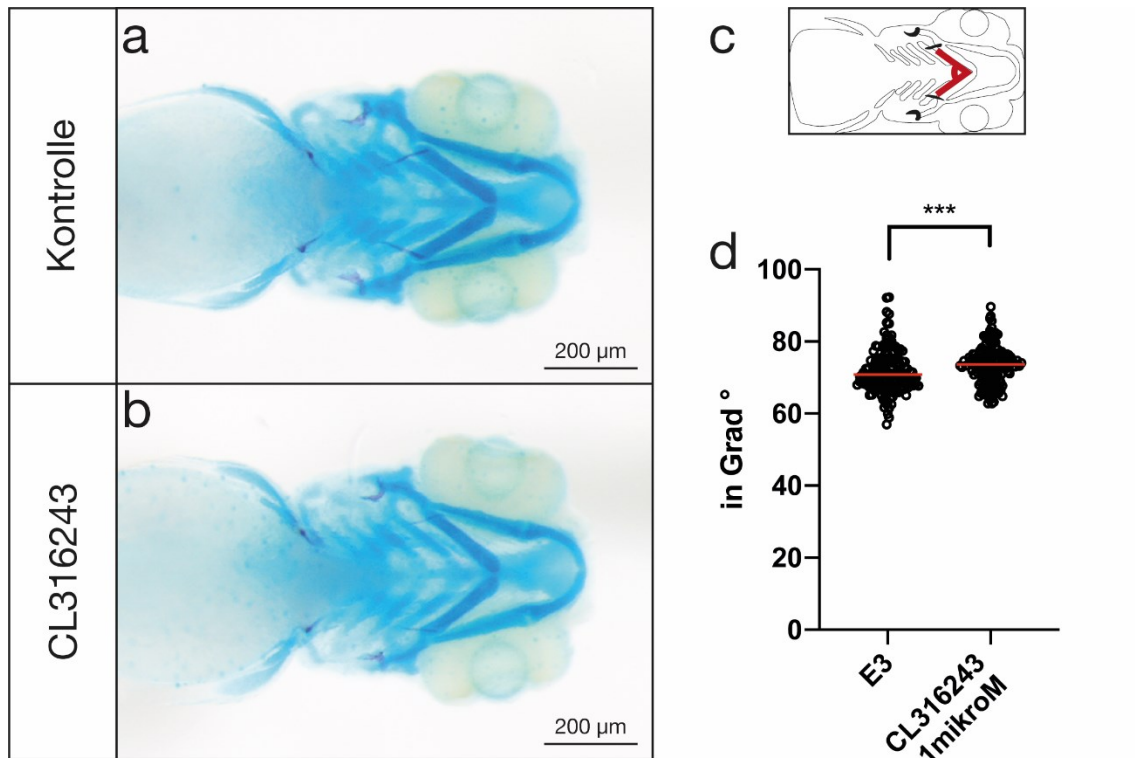


Abbildung 16: Innenwinkel vergrößert sich unter dem Einfluss von CL316243

a), b) Zebrafischblinde (5dpf) wurden nicht behandelt (a) oder mit $1 \mu\text{M}$ CL316243 (b) behandelt und einer Knochen- & Knorpelfärbung unterworfen. Ein Größenstandart ist angegeben.

c) Graphische Darstellung der gemessenen Struktur. Gezeigt ist der Innenwinkel zwischen den beiden Keratohyalen.

d) Ein signifikanter Unterschied ist messbar. $N = 5$. Kontrollgruppe: $n = 150$, Median = $70,82^\circ$; CL316243: $n = 147$, Median = $73,52^\circ$. Zwei-seitiger Mann-Whitney-Test, $p = 0,0006$. Die rote Linie entspricht dem Median. Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum.

Ergebnisse

3.3.5 Herzfrequenz unter Einfluss von CL316243

Eine Behandlung mit der verwendeten Konzentration von CL316243 hat keinen ersichtlichen Einfluss auf die Herzfrequenz der Zebrabärblinge (Abbildung 17). Dies ergab die Untersuchung von 65 Fischen in der Kontrollgruppe und 64 Fischen in der behandelten Gruppe. Gemessen wurde die Frequenz, wie bereits zuvor beschrieben, mithilfe eines Mikroskops 24 Stunden nach Beginn der Behandlung mit CL316243.

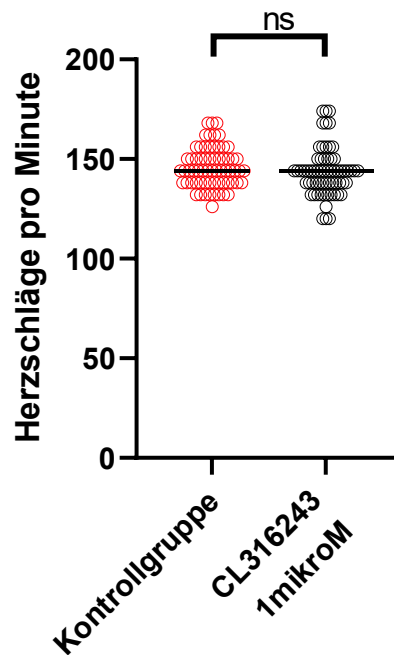


Abbildung 17: Herzfrequenz bleibt unverändert mit CL316243

Die Herzfrequenz blieb ohne signifikante Veränderung während der Behandlung mit CL316243. Mann-Whitney-Test, $p = 0,1622$. Kontrollgruppe: $n = 65$, Median = 144. CL316243: $n = 64$, Median = 144. Die schwarze Linie entspricht dem Median. Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum.

3.4 Behandlung mit Metoprolol

Metoprolol ist ein β_1 -Rezeptorantagonisten. Mit der Verwendung von Metoprolol sollte überprüft werden, ob die bisher festgestellten Effekte von β_3 -Rezeptorantagonisten durch die Modulation von β_3 -Rezeptoren entstanden sind oder ob es möglicherweise Off-Target-Effekte auf β_1 -Rezeptoren geben könnte.

3.4.1 Herzfrequenz unter Einfluss von Metoprolol

Um nachzuweisen, dass der Wirkstoff Metoprolol auch bei Zebrabärblingen wirkt, haben wir die Herzfrequenz nach 24-stündiger Behandlung gemessen. Metoprolol wirkt als β_1 -Adrenozeptor-Antagonist vorwiegend am Herzen, da die zugehörigen Rezeptoren vor allem im Myokard exprimiert sind. Es verringert die Schlagkraft (negativ inotrop) und damit das Herzzeitvolumen, es senkt die Herzfrequenz (negativ chronotrop) und es verlangsamt die Geschwindigkeit der Erregungsbildung (negativ dromotrop).

Die Herzfrequenz ist bei jungen Zebrabärblingen, wie in der Einleitung bereits erwähnt, messbar, weil diese noch nicht sehr stark pigmentiert sind und daher das Herz und der Herzschlag unter einem Mikroskop sichtbar sind.

In diesen Messungen war ein signifikanter Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrollgruppe und der mit Metoprolol behandelten Gruppe feststellbar: die Herzfrequenz sank deutlich (*Abbildung 18*). Dies deutet darauf hin, dass durch Metoprolol auch im Zebrabärbling die Aktivität von β_1 -Adrenozeptoren moduliert werden kann.

Ergebnisse

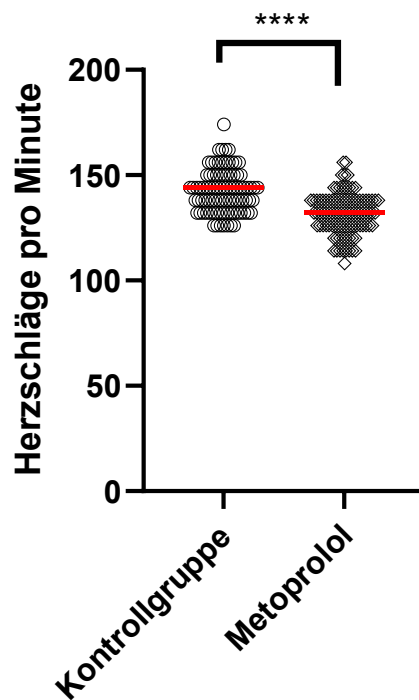


Abbildung 18: Metoprolol verringert die Herzfrequenz

Metoprolol wirkt eindeutig negativ chronotrop auf die Herzen der Zebraabärblinge. Kontrollgruppe: $n = 89$, Median = 144; Metoprolol: $n = 93$, Median = 132. Zwei-seitiger Mann-Whitney-Test, $p < 0,0001$. Die rote Linie entspricht dem Median. Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum.

3.4.2 Metoprolol bewirkt keine Knochen- oder Knorpelveränderung

10 μM Metoprolol hat keinen messbaren Einfluss auf die Länge des Branchiostegalstrahls oder die gemessenen Abstände oder Winkel in den analysierten Knorpelstrukturen (Abbildung 19).

Ergebnisse

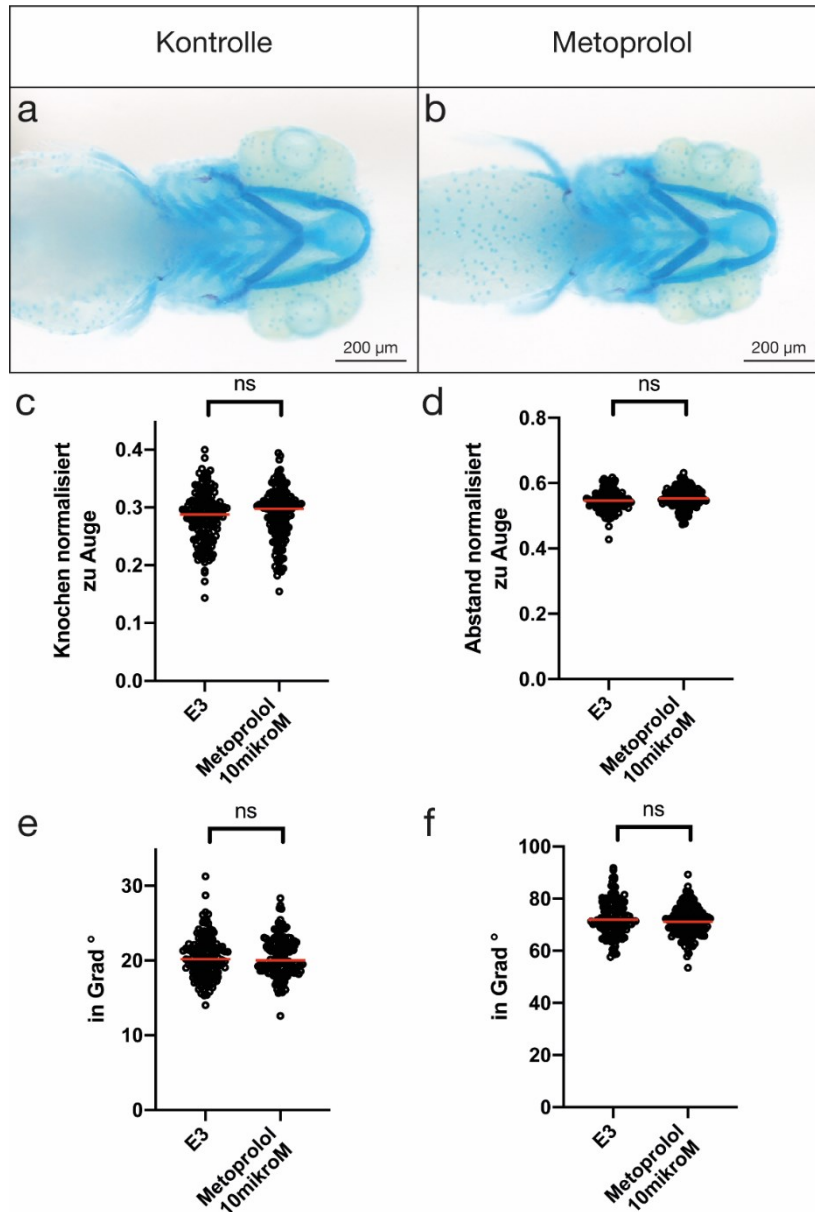


Abbildung 19: Kein signifikanter Unterschied mit Metoprolol

a), b) Zebrafärbungen (5dpf) wurden mit E3 (a) oder 10 µM Metoprolol (b) behandelt und einer Knochen- & Knorpelfärbung unterworfen. Ein Größenstandard ist angegeben.

c) Branchiostegalstrahl ohne signifikanten Unterschied. $N = 6$. Kontrollgruppe: $n = 156$, Median = 0,2877; Metoprolol: $n = 165$, Median = 0,2979. Zwei-seitiger Mann-Whitney-Test, $p=0,1977$.

d) Knorpelabstand auch ohne signifikanten Unterschied. $N = 5$. Kontrollgruppe: $n = 141$, Median = 0,5466; Metoprolol: $n = 149$, Median = 0,5538. Zwei-seitiger Welch's-Test, $p = 0,0525$.

e) Lateraler Winkel ebenfalls ohne signifikanten Unterschied. $N = 5$. Kontrollgruppe: $n = 141$, Median = 0,2016°; Metoprolol: $n = 149$, Median = 0,2002°. Zwei-seitiger Mann-Whitney-Test, $p = 0,6494$.

f) Innenwinkel ohne signifikanten Unterschied. $N = 5$. Kontrollgruppe: $n = 141$, Median = 0,7194°; Metoprolol: $n = 149$, Median = 0,7111°. Zwei-seitiger Mann-Whitney-Test, $p = 0,0635$.

3.5 Behandlung mit ICI118,551

ICI118,551 ist ein inverser Agonist für β_2 -Adrenozeptoren. Die Verwendung dieser Substanz soll ebenfalls mögliche Off-Target-Effekte der β_3 -Rezeptorantagonisten ausschließen und vervollständigt sogleich die Familie der drei β -Adrenozeptoren.

3.5.1 Keine Veränderung durch ICI118,551

ICI118,551 wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen verwendet: 200 nM (*Abbildung 20*) und 500 nM (*Abbildung 21*). Weder die Längenmessung des Branchiostegalstrahls noch die verschiedenen Winkel und Abstände ergaben einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe. Dies gilt für beide Konzentrationen. Daraus lässt sich schließen, dass der β_2 -Adrenozeptor keinen Einfluss auf die räumliche Entwicklung von Knochen und Knorpel hat.

Ergebnisse

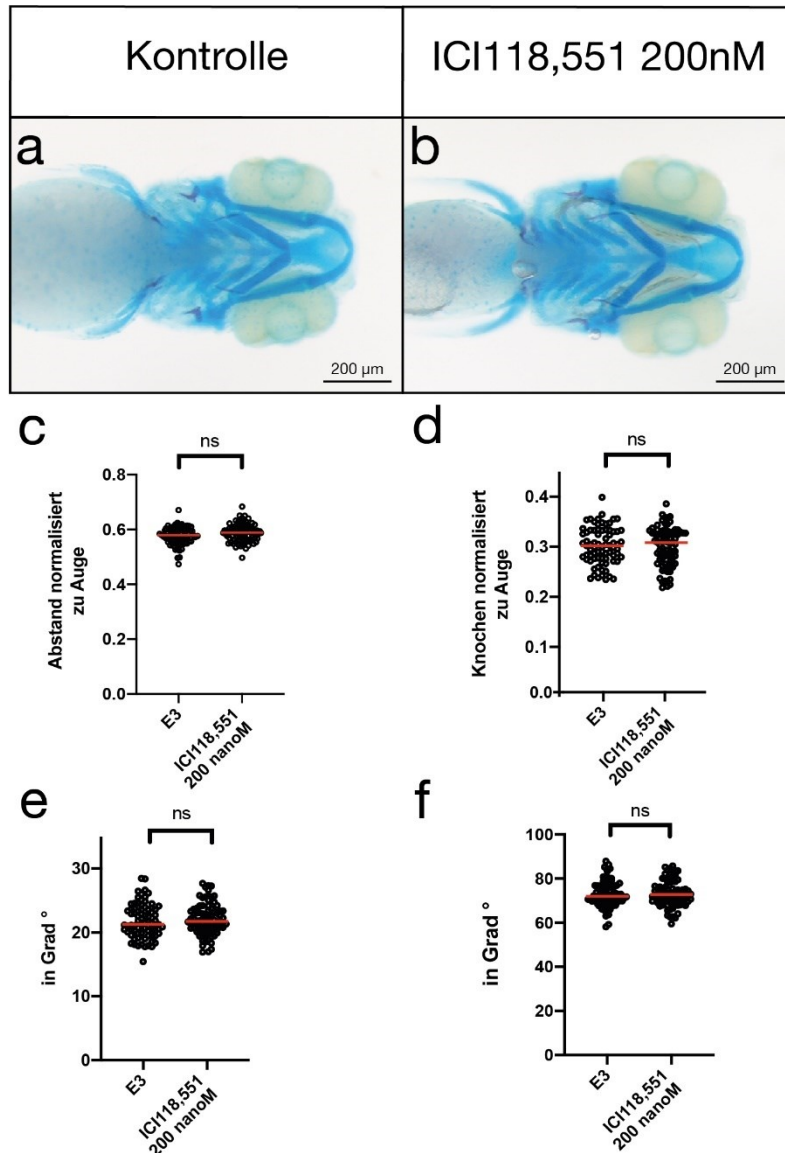


Abbildung 20: Keine signifikante Änderung durch ICI118,551 200 nM

a), b) Zebrafärblinge (5dpf) wurden nicht behandelt (a) oder mit 200 nM ICI118,551 (b) behandelt und einer Knochen- & Knorpelfärbung unterworfen. Ein Größenstandart ist angegeben.

c) Knorpelabstand ohne signifikanten Unterschied mit 200 nM ICI118,551. $N = 3$. Kontrollgruppe: $n = 80$, Median = 0,5787; ICI118,551: $n = 84$, Median = 0,5886. Zwei-seitiger Mann-Whitney-Test, $p = 0,096$.

d) Branchiostegalstrahl ohne signifikanten Unterschied mit 200 nM ICI118,551. $N = 3$. Kontrollgruppe: $n = 75$, Median = 0,3022; ICI118,551: $n = 82$, Median = 0,3081. Zwei-seitiger Welch's-Test, $p = 0,7702$.

e) Lateraler Winkel ohne signifikanten Unterschied mit 200 nM ICI118,551. $N = 3$. Kontrollgruppe: $n = 79$, Median = 21,29°; ICI118,551: $n = 84$, Median = 21,76°. Zwei-seitiger Welch's-Test, $p = 0,5415$.

f) Innenwinkel ohne signifikanten Unterschied mit 200 nM ICI118,551. $N = 3$. Kontrollgruppe: $n = 81$, Median = 71,99°; ICI118,551: $n = 84$, Median = 72,79°. Zwei-seitiger Welch's-Test, $p = 0,7197$.

Ergebnisse

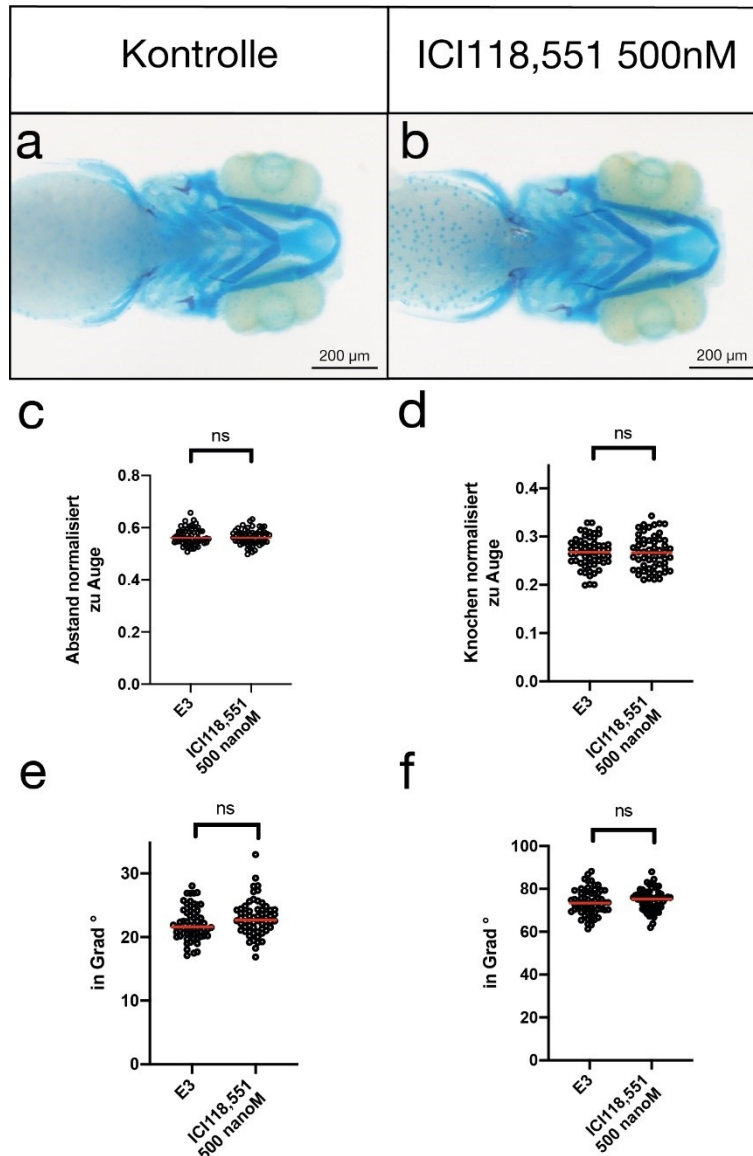


Abbildung 21: Keine signifikante Änderung durch ICI118,551 500 nM

a), b) Zebrafärblinge (5dpf) wurden nicht behandelt (a) oder mit 500 nM ICI118,551 (b) behandelt und einer Knochen- & Knorpelfärbung unterworfen. Ein Größenstandart ist angegeben.

c) Knorpelabstand ohne signifikanten Unterschied mit 500 nM ICI118,551. $N = 2$. Kontrollgruppe: $n = 61$, Median = 0,5607; ICI118,551: $n = 59$, Median = 0,5615. Zwei-seitiger Welch´s-Test, $p = 0,6522$.

d) Branchiostegalstrahl ohne signifikanten Unterschied mit 500 nM ICI118,551. $N = 2$. Kontrollgruppe: $n = 58$, Median = 0,2676; ICI118,551: $n = 57$, Median = 0,2667. Zwei-seitiger Welch´s-Test, $p = 0,9173$.

e) Lateraler Winkel ohne signifikanten Unterschied mit 500 nM ICI118,551. $N = 2$. Kontrollgruppe: $n = 62$, Median = 21,63°; ICI118,551: $n = 60$, Median = 22,68°. Zwei-seitiger Mann-Whitney-Test, $p = 0,0625$.

f) Innenwinkel ohne signifikanten Unterschied mit 500 nM ICI118,551. $N = 2$. Kontrollgruppe: $n = 62$, Median = 73,41°; ICI118,551: $n = 60$, Median = 75,20°. Zwei-seitiger Welch´s-Test, $p = 0,3677$.

Ergebnisse

3.5.2 Herzfrequenz unter Einfluss von ICI118,551

Zur Überprüfung, dass es keine Off-Target-Effekte auf β_1 -Adrenozeptoren gibt, wurde die Herzfrequenz 24 Stunden nach der Gabe von ICI118,551 (sowohl 200 nM als auch 500 nM) durchgeführt. In *Abbildung 22* erkennt man, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe gibt.

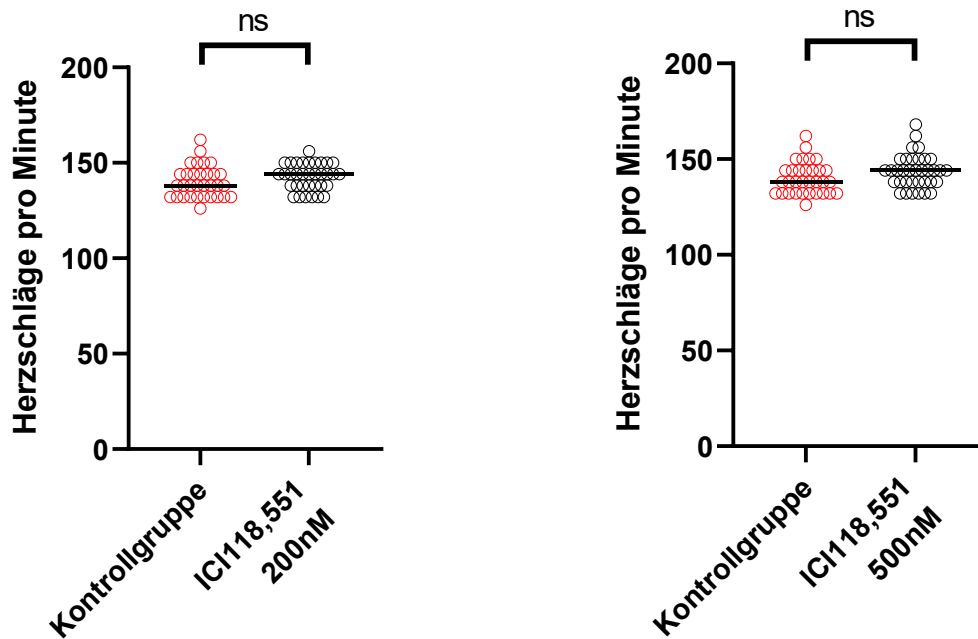


Abbildung 22: ICI118,551 hat keinen Einfluss auf die Herzfrequenz

Die linke Grafik zeigt die Herzfrequenz der mit 200 nM ICI118,551 ($n = 34$; eingezeichneter Median: 144) behandelten Zebrafische im Vergleich zur Kontrollgruppe ($n = 32$; eingezeichneter Median: 138). Der Shapiro-Wilk-Test ergab keine Normalen-Verteilung. Der anschließend durchgeführte Mann-Whitney-Test zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied gibt ($p = 0,0976$). Die rechte Grafik zeigt ebenfalls, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe ($n = 32$; eingezeichneter Median: 138) und der mit 500 nM ICI118,551 ($n = 35$; eingezeichneter Median: 144) behandelten Gruppe gibt. Keine Normalen-Verteilung nach Shapiro-Wilk-Test. Mann-Whitney-Test ergibt keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,0803$).

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Manipulation der Aktivität von β -Adrenozeptoren während der frühen Zebrafischentwicklung zeigte keinen massiven Einfluss auf die Entwicklung von Knorpel- oder Knochengewebe in anterioren Körperregionen der behandelten Fischlarven. Wir konnten jedoch feine, signifikante Veränderungen anhand der gemessenen Parameter feststellen. Der β_3 -Antagonist SR59230A führte zu einer Verkleinerung des Innenwinkels und einer Vergrößerung des Knorpelabstands. Diese Veränderung konnte nach Behandlung mit dem zweiten β_3 -Antagonisten L-748,337 nicht beobachtet werden.

Der β_3 -Agonist CL316243 bewirkte eine Verkleinerung des Branchiostegalstrahls. Der laterale Winkel und der Innenwinkel vergrößerten sich durch diese Behandlung signifikant.

Metoprolol und ICI118,551 bewirkten keine Veränderungen an den vier gemessenen Strukturen.

Die Herzfrequenz veränderte sich nur mit SR59230A und Metoprolol. Bei beiden verringerte sich die Herzrate.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Der Großteil der gemessenen Werte ergab, dass die Manipulation von β -Adrenozeptoren oberflächlich gesehen keine großen Veränderungen hervorruft. Bei genauer Betrachtung stellte sich jedoch heraus, dass bei Manipulation von β_3 -Adrenozeptoren geringe aber statistisch relevante Veränderungen von Strukturen gemessen werden können. Diese Veränderungen wurden bei β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren nicht beobachtet. Ergo scheinen diese Rezeptoren höchstens eine untergeordnete Rolle bezüglich Knochen- und Knorpelentwicklung zu spielen und ihre Manipulation dieser Adrenozeptoren in der Entwicklungsphase wahrscheinlich als sicher in Bezug auf Knochen und Knorpel zu bewerten. Es sollte jedoch bei möglichen zukünftigen Anwendungen am Menschen von Wirkstoffen, die β_3 -Adrenozeptoren manipulieren, Vorsicht geboten sein, da die

beobachteten Veränderungen in diesen Experimenten auf mögliche Gefahren hindeuten könnten.

4.2.1 Einfluss auf das Längenwachstum

In dieser Studie wurde als einziger bereits teilweise ossifizierter Knochen der Branchiostegalstrahl genauer untersucht. Hierfür wurde die Länge gemessen. Diese verkürzte sich nur unter Einfluss von CL316243. Zusätzliche Untersuchungen mit weiteren β_3 -Agonisten sollten hierfür noch erfolgen, um die Ergebnisse zu bestätigen.

Das Längenwachstum von Röhrenknochen erfolgt hauptsächlich in der proliferativen und hypertrophen Zone der Metaphyse mittels Chondrozyten (siehe **1.4.2 Längenwachstum von Knochen**). Desmale Knochen wachsen mittels appositionellen Wachstums. Dazu gehören auch die Branchiostegalstrahlen [67]. Das Wachstum ist abhängig von systemischen, lokal parakrinen und mechanischen Faktoren [48]. Parakrine Faktoren wie Indian-hedgehog-Signalwege, parathormonverwandte Peptide, Fibroblasten Wachstumsfaktoren oder vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren gehören zu der lokalen Kontrolle des Wachstums. Die mechanischen Faktoren wurden bereits in **1.4 Knochen- und Knorpelentwicklung** angedeutet: Druck verringert das Wachstum, Zugkräfte vergrößern das Wachstum. Wenn es sich jedoch bei dem Druck nur um eine milde Form handelt, fördert auch dies das Wachstum [48]. Da in diesen Experimenten keine physikalischen Veränderungen wie Strömungsapplikationen angewandt worden sind, können äußere physikalische Einwirkungen als Ursache für die beobachteten Veränderungen der Knochenlänge ausgeschlossen werden.

In dieser Studie wurde Einfluss auf die β -Adrenozeptoren genommen. Diese gehören zu den systemischen Faktoren, werden also durch das zentrale Nervensystem gesteuert. Die Expression der drei β -Adrenozeptoren auf Knochenzellen ist nicht ganz eindeutig nachgewiesen und in der Literatur teilweise widersprüchlich. Togari et al kamen in ihren Versuchen zu dem Schluss, dass weder β_1 - noch β_3 -Adrenozeptoren in menschlichen Osteoblasten

Diskussion

vorhanden seien, β_2 -Adrenozeptoren konnten sie jedoch mittels PCR-Testung nachweisen [68]. Kondo et al haben wiederum in vitro und in vivo mittels PCR-Testung herausgefunden, dass Transkripte von allen drei β -Adrenozeptoren im humanen Knochengewebe vorhanden sind [69]. Auch wurden in Osteoprogenitorzellen β_3 -Adrenozeptoren nachgewiesen, eventuell weil sie die gleichen Stammzell-Vorläuferzellen wie Adipozyten, die im Knochenmark vorkommen, haben [70].

In den hier durchgeführten Experimenten konnten keine messbaren Veränderungen durch die Blockierung von β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren festgestellt werden. Daher kann zum jetzigen Zeitpunkt eruiert werden, dass die Blockierung dieser Adrenozeptoren keinen negativen Effekt mindestens in Bezug auf die Länge des Branchiostegalstrahls und womöglich weiterer desmaler Knochen beziehungsweise Knochenvorstufen im frühen Larvenstadium von Zebrabärblingen haben.

Veränderungen des Längenwachstums wurden ausschließlich nach Behandlung mit dem β_3 -Agonisten CL316243 gemessen. Trotz der eventuell bestehenden Diskrepanz zwischen menschlichen und tierischen Rezeptoren müsste bei Anwendung an humanen Probanden auch mit möglichen Änderungen der Knochenstruktur gerechnet werden. Dass ausschließlich Stimulation der β_3 -Adrenozeptoren zu einer Längenveränderung des Branchiostegalstrahls geführt hat, impliziert, dass eine Aktivität dieses Rezeptors Längenwachstum von direkt ossifizierten Knochen im Zebrabärbling unterdrückt. Ein solches Signal könnte durch β_3 -Adrenozeptoren auf Osteoprogenitorzellen hervorgerufen werden, deren Anwesenheit in menschlichem Gewebe postuliert wurden [70]. Eine verringerte Proliferation dieser Zellen wäre jedoch experimentell nachzuweisen und aufgrund der nur subtilen Längenveränderung nicht als sehr ausgeprägt zu erwarten. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass eine Aktivierung von β_3 -Adrenozeptoren zu einer Modulation von Signalwegen wie beispielsweise dem Hedgehog Weg [48] führen könnte. Dies würde die Aktivierung oder Abschwächung von Signalen bewirken, die ihrerseits das Längenwachstum der gemessenen Struktur beeinflussen könnte.

Diskussion

β -Adrenozeptoren sind ebenfalls auf der Oberfläche von humanen Chondrozyten exprimiert [71]. Die Forschungsgruppe um Hwang aus Südkorea untersuchte, ob die katabolischen Prozesse von Knorpel, die für gewöhnlich im entzündlichen Milieu ablaufen (z.B. bei Osteoarthritis), durch Noradrenalin beeinflusst werden. Sie fanden heraus, dass die Stimulierung von β -Adrenozeptoren durch Noradrenalin zu einer anabolischen Reaktion führte, indem die katabolischen Prozesse unterdrückt wurden [71]. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass eine Blockierung der β -Adrenozeptoren, wodurch weniger körpereigenes Noradrenalin die Rezeptoren erreichen kann, den Abbauvorgang im Knorpelgewebe begünstigt. Allerdings stammen die untersuchten Chondrozyten aus menschlichen Geweben und die Vorgänge wurden im Zusammenhang mit Arthritis analysiert. In einer weiteren Studie aus Regensburg mit Chondrozyten, welche aus neugeborenen Mäusen entnommen wurden, konnte beobachtet werden, dass durch die Verwendung von ICI118,551 und SR59230A ein apoptotischer Prozess in Chondrozyten eingeleitet wird [72]. Dieser Effekt wurde bei Verwendung von β_1 -Adrenozeptor-Antagonisten nicht beobachtet. Es ergab sich ein antiapoptotischer Effekt in Chondrozyten bei Stimulierung der Adrenozeptoren durch Noradrenalin. Jedoch wurde kein Effekt auf die Proliferation festgestellt. Die Forschungsgruppe kam aber zu dem Schluss, dass eine Stimulation von β -Adrenozeptoren allein durch die antiapoptotische Wirkung bereits einen positiven Effekt auf das Knochenwachstum haben könnte.

In dieser Studie wurden die Längen der knorpeligen Strukturen nicht gemessen. Ob sich hier eine Veränderung vollzogen hat, kann nur durch weitere Untersuchungen oder weiteren Analysen der bestehenden Aufnahmen herausgefunden werden. Aufgrund der beobachteten Variation der räumlichen Anordnungen – sowohl der laterale Winkel als auch der Innenwinkel vergrößerten und verkleinerten sich signifikant nach Aktivität von β_3 -Adrenozeptoren – können wir aber zumindest vermuten, dass sich die Länge von Palatoquadratus, Meckelknorpel und den anderen knorpeligen Anteilen verändert hat.

Eine signifikante Verkürzung des Branchiostegalstrahls beobachteten wir bei Verwendung des β_3 -Adrenozeptor-Agonisten CL316243. Auf den ersten Blick widersprechen diese Ergebnisse früheren Daten aus der Literatur [71,72].

Allerdings lässt sich diese anscheinende Diskrepanz damit erklären, dass sich die erwähnten Studien auf eine Wirkung von β -Adrenozeptoren auf Chondrozyten konzentriert haben. Die in dieser Studie beobachtete Verkürzung des Branchiostegalstrahls wurde jedoch in einer direkt-ossifizierenden Struktur detektiert. Außerdem forschten die Kollegen an isolierten Zellkulturen (in vitro) von Menschen und Mäusen und unsere Ergebnisse stammen von Zebrafärblingen (in vivo).

4.2.2 Einfluss auf die räumliche Anordnung

Die räumliche Anordnung ist nicht unabhängig vom Längenwachstum der Knochen oder Knorpel zu beurteilen. Wenn sich die Länge der Knorpel zum Zeitpunkt der Messung (5 dpf) verändert hat, dann muss sich auch zwangsweise die Größe der gemessenen Winkel beziehungsweise des Knorpelabstandes verändern. Die genannten Strukturen sind nämlich gelenkig miteinander verbunden (*Abbildung 4*).

Wenn sich beispielsweise beide Keratohyalen durch Modulation von β -Adrenozeptoren verlängern und alle anderen Strukturen unverändert bleiben, dann gibt es verschiedene Möglichkeiten wie sich das phänotypisch bemerkbar macht:

1. Die Keratohyalen verlängern sich nur in anteriore Richtung. Der Innenwinkel wird kleiner. Der posteriore Bezugspunkt (Verbindungsstelle mit Palatoquadratus = laterale Winkel) bleibt an gleicher Stelle wie bei den Kontrolltieren. Gleichzeitig würde der Knorpelabstand sich verkleinern.
2. Die Keratohyalen verlängern sich nur in posteriore Richtung. Der laterale Winkel wird kleiner. Der anteriore Bezugspunkt (Verbindungsstelle beider Keratohyalen) bleibt gleich und der Innenwinkel würde wahrscheinlich etwas größer werden, da die Keratohyalen durch ihre Verbindung zum Palatoquadratus nicht frei in posteriore Richtung wachsen können, sondern eher in laterale Richtung ausweichen müssen.
3. Die Keratohyalen verlängern sich in Richtung beider Enden, welches das wahrscheinlichste Szenario ist. Wie sich das auf die Winkel auswirkt, ist

Diskussion

sehr schwierig vorherzusagen. Mit Gewissheit lässt sich jedoch festhalten, dass sie sich ändern werden.

Diese drei Beispiele verdeutlichen die Komplexität der räumlichen Anordnung durch Veränderung von Längen in einem System, wo jede Variable in Verbindung mit anderen Variablen steht. Außerdem ist davon auszugehen, dass die Modulation von β -Adrenozeptoren Auswirkungen auf viele oder alle Knorpelanteile hat. Bereits die Längenveränderung von Keratohyale sowie Palatoquadratus in jeweils beide Richtungen lässt Raum für mehrere unterschiedliche Ergebnisse.

Außerdem ist die räumliche Anordnung, wie in der lateralen Ansicht in der Einleitung dargestellt, nicht direkt visualisierbar in ventraler Ansicht. Eine Veränderung des Winkels zwischen Meckel und Palatoquadratus würde nur in lateral aufgenommenen Bildern analysierbar, jedoch in ventraler Sicht als verkürzte Distanz zu messen. Es bedarf daher noch weiterer Analysen, um die Konsequenz der durchgeführten Behandlungen abschließend beurteilen zu können.

Der laterale Winkel und der Innenwinkel vergrößerten sich unter Einfluss des β_3 -Agonisten CL316243. Hingegen verkleinerte sich der Innenwinkel bei Zugabe vom β_3 -Antagonisten SR59230A. Gleichzeitig vergrößerte sich der Knorpelabstand. Die Größen der Knorpelstrukturen müssen sich also durch die Behandlung geändert haben. Wenn man sich auf die Ergebnisse aus Regensburg [72] und Korea [71] bezieht, dann könnte die Behandlung mit CL316243 einen anabolen und antiapoptotischen Effekt auf die Chondrozyten haben, also eine Vergrößerung der Knorpelstrukturen. während SR59230A einen gegenteiligen Effekt ausgeübt hätte, welcher auch nachgewiesen worden war [72], also eine Verkleinerung der Knorpelstrukturen.

Die räumliche Anordnung ist aber auch abhängig von bestimmten Signalwegen. Dafür ist es wichtig zu verstehen, wie Knorpel entsteht. Es beginnt damit, dass mesenchymale skelettale Osteoprogenitorzellen sich zu Klustern anhäufen (sogenannte prächondrale Kondensation), die sich in Feldern von locker angeordneten Zellen befinden [73]. Die prächondrale Kondensation – im

Englischen *precartilagenous condensations (PCC)* – wird definiert als „Region mit einer erhöhten Zelldichte in einem Feld von mesenchymalen Progenitorzellen“ [74]. Die Kluster bestimmen später die Wachstumsrichtung und die Form der Knorpel beziehungsweise späterer Knochen [73]. Die Position dieser Kluster wird bestimmt durch Signalwege, unter anderem Sox9/Sox9a (vergleiche **1.3 Zebrafisch**). Ob diese Signalwege durch Modulation von β -Adrenozeptoren beeinflusst werden können, ist nach Erkenntnis dieses Autors bisher nicht Thema der Forschung gewesen. Ein vollständiges Unterdrücken der Sox9/Sox9a-Signalwege kann aber mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden, da Akiyama et al bereits nachgewiesen haben, dass das zu einer ausgeprägten Form der Chondrodysplasie führen würde [36].

4.2.3 Vergleich zwischen Fisch und menschlichen Rezeptoren

Offensichtlich haben die eben dargestellten Ergebnisse eine höhere Aussagekraft bei der potentiellen Anwendung am Menschen je verwandter die Rezeptoren vom Zebrafisch zu humanen Rezeptoren sind. Dieser Frage ist eine Forschungsgruppe aus Leiden, Niederlanden, nachgegangen. Ihre Ergebnisse basieren aber rein auf der Erforschung von Glukokortikoid-Rezeptoren. Sie fanden heraus, dass es eine hohe genetische Ähnlichkeit zwischen den Rezeptoren beider Spezies gibt und befanden daher, dass Zebrafische ein adäquates Modell zur Glukokortikoid-Rezeptor-Forschung sind [75].

In einer anderen Arbeit wurden die Gensequenzen von nikotinergen-cholinergen-Rezeptoren, Opioidrezeptoren und cannabinoiden Rezeptoren von Menschen und den Homologen von Zebrafischen verglichen und auch hier kam eine sehr hohe Kongruenz zum Vorschein [76].

Einen Unterschied bemerkten Oren et al bei ihren Forschungen an Glukagon-Rezeptoren und Glukagon-like-Peptid-1-Rezeptoren. Beide Rezeptorarten gehören auch zu den GPCR und binden beim Menschen auch nur spezifisch entweder Glukagon oder GLP-1. Beide Liganden haben physiologisch entgegengesetzte Wirkungen. Der dazugehörige orthologe Rezeptor beim

Zebrabärbling hingegen bindet sowohl Glukagon als auch GLP-1 und wird damit von den Verfassern als dualer Rezeptor bezeichnet [77]. Damit unterscheiden sie sich in ihrer biochemischen Struktur als auch in ihrer Funktion.

Dadurch, dass Adrenozeptoren zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören, haben sie sieben Transmembrandomänen, also integrale Membranproteine, die die Doppellipidschicht durchspannen [78]. Die heutzutage fünf bekannten β -Adrenozeptorgene beim Zebrabärbling (*adrb1*, *adrb2a*, *adrb2b*, *adrb3a* und *adrb3b*) [79] haben eine Aminosäure-Sequenz Identität in den sieben Transmembrandomänen zu den menschlichen Orthologen von 77,3 % bis 62,3 % (abhängig vom β -Adrenozeptor) [80]. Dies ist ein sehr hoher Wert. Die von uns erzielten Ergebnisse lassen daher Rückschlüsse zu, wie sich die Gabe von β -Rezeptoragonisten und -antagonisten beim Menschen auswirken würden.

Andererseits sind es doch weiterhin leicht unterschiedliche Rezeptoren. Dieser Unterschied zwischen den orthologen Rezeptoren kann als ein Interpretationsversuch genommen werden, warum die hier erzielten Ergebnisse der β_3 -Antagonisten widersprüchlich sind. SR59230A bewirkte eine Verkleinerung des Innenwinkels und eine Vergrößerung des Knorpelabstands. L-748,337 hingegen bewirkte keinen signifikanten Unterschied, obwohl es ebenfalls ein β_3 -Antagonist ist. Die Gründe dafür können daran liegen, dass beide Substanzen für die menschlichen Rezeptoren entwickelt worden sind. Daher wirken sie eventuell unterschiedlich beim Zebrabärbling. Eine weitere Ursache könnte sein, dass beide Substanzen eventuell unterschiedliche Verfügbarkeiten im Zebrabärbling haben.

4.3 Fazit und Ausblick

In dieser Studie sollte der Zusammenhang zwischen der Modulation von β -adrenergen Rezeptoren und der Entwicklung beziehungsweise dem Wachstum von Knochen und Knorpel beim Zebrabärbling im Larvenalter aufgedeckt werden.

Ein direkt messbarer Zusammenhang zwischen der Knochen- und Knorpelentwicklung und β -Adrenozeptoren konnte nur bei Modulation von β_3 -

Diskussion

Adrenozeptoren festgestellt werden. β_1 - sowie β_2 -Adrenozeptoren scheinen keinen Einfluss bei der Entwicklung der beschriebenen Strukturen zu haben.

Die Anwendung von β_3 -Adrenozeptorantagonisten beziehungsweise -agonisten hingegen haben signifikante Auswirkungen auf die Entwicklung der Hartgewebe. Der hier genutzte Agonist CL316243 verkürzt den Branchiostegalstrahl und verändert auch die räumliche Anordnung der knorpeligen Anteile. Um die Veränderung der Winkel zu erläutern, sind weitere Forschungen beziehungsweise Messungen notwendig. Zum Beispiel ist es wichtig herauszufinden, ob die Länge der genannten knorpeligen Anteile sich ändert oder ob die Länge gleichbleibt und tatsächlich die räumliche Anordnung im dreidimensionalen Raum sich ändert. Der verwendete Antagonist SR59230A verändert zwar nicht die Länge des Knochens signifikant, aber dafür bewirkt er ebenfalls Veränderungen der Winkel. CL316243 verändert den Innenwinkel genau gegensätzlich.

Das bedeutet, dass die Aktivität von β_3 -Adrenozeptoren direkten Einfluss auf den Innenwinkel beziehungsweise die Keratohyalen hat. Auch hier ist wichtig zukünftig herauszufinden, ob die Länge der Knorpel sich verändern. Der zweite β_3 -Adrenozeptorantagonist L-748,337 bewirkt keine messbaren Unterschiede. Dies irritiert im ersten Moment im Hinblick auf die beobachteten Veränderungen durch SR59230A. Ursachen dafür könnten, wie bereits beschrieben, die ursprüngliche Herstellung für die Anwendung beim Menschen sein oder eine zu geringe Verfügbarkeit beim Zebrafisch.

Die zukünftigen Schritte sollten sein, weitere Parameter wie die Längen von Palatoquadratus, Keratohyale und Meckel-Knorpel zu messen und weitere Substanzen mit Einfluss auf β_3 -Adrenozeptoren zu verwenden (beispielsweise Mirabegron (β_3 -Adrenozeptoragonist) [81] oder L-748328 (β_3 -Adrenozeptorantagonist) [82]).

5. Zusammenfassung

Neuere Studien aus unserem Labor haben einen Zusammenhang zwischen β_3 -Adrenozeptoren und primären Zilien herausgefunden. Da bekannt ist, dass primäre Zilien für die Entwicklung von Knorpel und Knochen ein wichtiger Bestandteil sind, war das Ziel dieser Arbeit festzustellen, ob die Modulation von β_3 -Adrenozeptoren auch direkten Einfluss auf Knochen und Knorpel hat.

Dafür nutzten wir das Zebrabärblingsmodell. Die Fische erhielten am zweiten Tag nach der Befruchtung eine Behandlung mit einem β -Adrenozeptorantagonist oder -agonist. Am fünften Tag nach der Befruchtung wurden die Zebrabärblinge fixiert und einem Färbeprotokoll nach Walker und Kimmel [63] unterzogen. Die Färbung stellt Knochen und Knorpel anschaulich dar. Im Anschluss wurden verschiedene Strukturen im Kopf-Hals-Bereich auf Länge und Winkel untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Behandlung mit SR59230A und CL316243 Veränderungen bewirkten. Der β_3 -Rezeptoragonist CL316243 verkürzt den Branchiostegalstrahl. Auch sind Änderungen in der räumlichen Anordnung anhand von vergrößerten beziehungsweise verkleinerten Winkeln messbar gewesen.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Modulation von β_3 -Rezeptoren subtile Veränderungen der räumlichen Anordnung von Knorpelstrukturen hervorruft und die Länge von direkt ossifizierenden Knochen verkürzen kann.

6. Literaturverzeichnis

1. Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*. 2003;63(6):1256-1272. doi:10.1124/mol.63.6.1256
2. Weis WI, Kobilka BK. The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annu Rev Biochem*. 2018;87:897-919. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-033910
3. Congreve M, de Graaf C, Swain NA, Tate CG. Impact of GPCR Structures on Drug Discovery. *Cell*. 2020;181(1):81-91. doi:10.1016/j.cell.2020.03.003
4. Guimarães S, Moura D. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev*. 2001;53(2):319-356.
5. Hoffmann VH, Kiesewetter R, Krohs G, Schmitz C. [Dependence on age of the effects of catecholamines in man I. Effect of noradrenaline, adrenaline and isoprenaline on blood pressure and heart rate]. *Z Gesamte Inn Med*. 1975;30(3):89-95.
6. Han JY, Kim CS, Lim KH, et al. Increases in blood pressure and heart rate induced by caffeine are inhibited by (-)-epigallocatechin-3-O-gallate: involvement of catecholamines. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011;58(4):446-449. doi:10.1097/FJC.0B013E31822D93CB
7. Griffin PP, Schubert-Zsilavec M, Stark H. Hemmstoffe von Beta-Adrenozeptoren: Gemeinsamkeiten und Unterschiede. *Pharmazie in unserer Zeit*. 2004;33(6):442-449. doi:10.1002/pauz.200400091
8. Philipson LH. beta-Agonists and metabolism. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110(6 Suppl):S313-317. doi:10.1067/mai.2002.129702
9. McGlashan SR, Haycraft CJ, Jensen CG, Yoder BK, Poole CA. Articular cartilage and growth plate defects are associated with chondrocyte cytoskeletal abnormalities in Tg737orpk mice lacking the primary cilia protein polaris. *Matrix Biol*. 2007;26(4):234-246. doi:10.1016/j.matbio.2006.12.003
10. Tao F, Jiang T, Tao H, Cao H, Xiang W. Primary cilia: Versatile regulator in cartilage development. *Cell Prolif*. 2020;53(3):e12765. doi:10.1111/cpr.12765
11. Lu W, Shen X, Pavlova A, et al. Comparison of Pkd1-targeted mutants reveals that loss of polycystin-1 causes cystogenesis and bone defects. *Hum Mol Genet*. 2001;10(21):2385-2396. doi:10.1093/hmg/10.21.2385

Literaturverzeichnis

12. Hauser AS, Attwood MM, Rask-Andersen M, Schiöth HB, Gloriam DE. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(12):829-842. doi:10.1038/nrd.2017.178
13. Wong GWK, Boyda HN, Wright JM. Blood pressure lowering efficacy of beta-1 selective beta blockers for primary hypertension. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;3(3):CD007451. doi:10.1002/14651858.CD007451.pub2
14. Abosamak NR, Shahin MH. Beta 2 Receptor Agonists/Antagonists. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2022. Accessed January 27, 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559069/>
15. Calvani M, Bruno G, Dabraio A, et al. β 3-Adrenoreceptor Blockade Induces Stem Cells Differentiation in Melanoma Microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4):1420. doi:10.3390/ijms21041420
16. Nachawati D, Patel JB. Alpha Blockers. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2022. Accessed January 27, 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556066/>
17. Russell JA, Gordon AC, Williams MD, Boyd JH, Walley KR, Kissoon N. Vasopressor Therapy in the Intensive Care Unit. *Semin Respir Crit Care Med.* 2021;42(1):59-77. doi:10.1055/s-0040-1710320
18. Amrani Y, Bradding P. β 2-Adrenoceptor Function in Asthma. *Adv Immunol.* 2017;136:1-28. doi:10.1016/bs.ai.2017.06.003
19. Bridgeman MB, Friia NJ, Taft C, Shah M. Mirabegron: β 3-adrenergic receptor agonist for the treatment of overactive bladder. *Ann Pharmacother.* 2013;47(7-8):1029-1038. doi:10.1345/aph.1S054
20. Norman K, Nappe TM. Alpha Receptor Agonist Toxicity. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2022. Accessed January 27, 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500023/>
21. Li HH, Huang P, Dong W, Zhu ZY, Liu D. [A brief history of zebrafish research--toward biomedicine]. *Yi Chuan.* 2013;35(4):410-420. doi:10.3724/sp.j.1005.2013.00410
22. Varga M. The Doctor of Delayed Publications: The Remarkable Life of George Streisinger (1927-1984). *Zebrafish.* 2018;15(3):314-319. doi:10.1089/zeb.2017.1531
23. Parnig C, Seng WL, Semino C, McGrath P. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay Drug Dev Technol.* 2002;1(1 Pt 1):41-48. doi:10.1089/154065802761001293

24. Stainier DY, Fishman MC. The zebrafish as a model system to study cardiovascular development. *Trends Cardiovasc Med*. 1994;4(5):207-212. doi:10.1016/1050-1738(94)90036-1
25. Peterson RT, Shaw SY, Peterson TA, et al. Chemical suppression of a genetic mutation in a zebrafish model of aortic coarctation. *Nat Biotechnol*. 2004;22(5):595-599. doi:10.1038/nbt963
26. McGrath P, Li CQ. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. *Drug Discov Today*. 2008;13(9-10):394-401. doi:10.1016/j.drudis.2008.03.002
27. Huang P, Xiao A, Zhou M, Zhu Z, Lin S, Zhang B. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat Biotechnol*. 2011;29(8):699-700. doi:10.1038/nbt.1939
28. Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2013;496(7446):498-503. doi:10.1038/nature12111
29. Collins JE, White S, Searle SMJ, Stemple DL. Incorporating RNA-seq data into the zebrafish Ensembl genebuild. *Genome Res*. 2012;22(10):2067-2078. doi:10.1101/gr.137901.112
30. Kettleborough RNW, Busch-Nentwich EM, Harvey SA, et al. A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function. *Nature*. 2013;496(7446):494-497. doi:10.1038/nature11992
31. Home - OMIM. Accessed January 27, 2023. <https://www.omim.org/>
32. Kikuchi K, Poss KD. Cardiac regenerative capacity and mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012;28:719-741. doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155739
33. Yen J, White RM, Stemple DL. Zebrafish models of cancer: progress and future challenges. *Curr Opin Genet Dev*. 2014;24(100):38-45. doi:10.1016/j.gde.2013.11.003
34. Malafoglia V, Bryant B, Raffaelli W, Giordano A, Bellipanni G. The zebrafish as a model for nociception studies. *J Cell Physiol*. 2013;228(10):1956-1966. doi:10.1002/jcp.24379
35. Siekmann AF, Lawson ND. Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. *Nature*. 2007;445(7129):781-784. doi:10.1038/nature05577
36. Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev*. 2002;16(21):2813-2828. doi:10.1101/gad.1017802

Literaturverzeichnis

37. Yan YL, Willoughby J, Liu D, et al. A pair of Sox: distinct and overlapping functions of zebrafish sox9 co-orthologs in craniofacial and pectoral fin development. *Development*. 2005;132(5):1069-1083. doi:10.1242/dev.01674
38. Buck DW, Dumanian GA. Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. *Plast Reconstr Surg*. 2012;129(6):1314-1320. doi:10.1097/PRS.0b013e31824eca94
39. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect*. 1996;45:371-386.
40. Safadi FF, Barbe MF, Abdelmagid SM, et al. Bone Structure, Development and Bone Biology. In: Khurana JS, ed. *Bone Pathology*. Humana Press; 2009:1-50. doi:10.1007/978-1-59745-347-9_1
41. Fricke O, Schoenau E. The "Functional Muscle-Bone Unit": probing the relevance of mechanical signals for bone development in children and adolescents. *Growth Horm IGF Res*. 2007;17(1):1-9. doi:10.1016/j.ghir.2006.10.004
42. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3 Suppl 3(Suppl 3):S131-139. doi:10.2215/CJN.04151206
43. Murshed M. Mechanism of Bone Mineralization. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(12):a031229. doi:10.1101/cshperspect.a031229
44. Hart NH, Newton RU, Tan J, et al. Biological basis of bone strength: anatomy, physiology and measurement. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2020;20(3):347-371.
45. Travlos GS. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol Pathol*. 2006;34(5):548-565. doi:10.1080/01926230600939856
46. Hall BK. Chapter 2 - Bone. In: Hall BK, ed. *Bones and Cartilage (Second Edition)*. Academic Press; 2015:17-42. doi:10.1016/B978-0-12-416678-3.00002-1
47. Sommerfeldt DW, Rubin CT. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J*. 2001;10 Suppl 2(Suppl 2):S86-95. doi:10.1007/s005860100283
48. Rauch F. Bone growth in length and width: the Yin and Yang of bone stability. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2005;5(3):194-201.
49. Berendsen AD, Olsen BR. Bone development. *Bone*. 2015;80:14-18. doi:10.1016/j.bone.2015.04.035

Literaturverzeichnis

50. Dietrich K, Fiedler IA, Kurzyukova A, et al. Skeletal Biology and Disease Modeling in Zebrafish. *J Bone Miner Res.* 2021;36(3):436-458. doi:10.1002/jbmr.4256
51. Busse B, Galloway JL, Gray RS, Harris MP, Kwon RY. Zebrafish: An Emerging Model for Orthopedic Research. *J Orthop Res.* 2020;38(5):925-936. doi:10.1002/jor.24539
52. Marí-Beffa M, Mesa-Román AB, Duran I. Zebrafish Models for Human Skeletal Disorders. *Front Genet.* 2021;12:675331. doi:10.3389/fgene.2021.675331
53. Mortier GR, Cohn DH, Cormier-Daire V, et al. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2019 revision. *Am J Med Genet A.* 2019;179(12):2393-2419. doi:10.1002/ajmg.a.61366
54. Metoprolol tartrate Supplier | CAS 56392-17-7. Tocris Bioscience. Accessed January 27, 2023. https://www.tocris.com/products/metoprolol-tartrate_3256
55. ICI 118,551 hydrochloride Supplier | CAS 72795-01-8 | ICI118551. Tocris Bioscience. Accessed January 27, 2023. https://www.tocris.com/products/ici-118-551-hydrochloride_0821
56. CL 316243 disodium salt ≥98% (HPLC) | 1499. Tocris Bioscience. Accessed January 27, 2023. https://www.tocris.com/products/cl-316243-disodium-salt_1499
57. Brayton CF. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet.* 1986;76(1):61-90.
58. Bartfeld H, Goldstein A. Cell-mediated immunity: its modulation by dimethyl sulfoxide. *Ann N Y Acad Sci.* 1975;243:81-90. doi:10.1111/j.1749-6632.1975.tb25346.x
59. Hoyberghs J, Bars C, Ayuso M, Van Ginneken C, Foubert K, Van Cruchten S. DMSO Concentrations up to 1% are Safe to be Used in the Zebrafish Embryo Developmental Toxicity Assay. *Front Toxicol.* 2021;3:804033. doi:10.3389/ftox.2021.804033
60. Chen TH, Wang YH, Wu YH. Developmental exposures to ethanol or dimethylsulfoxide at low concentrations alter locomotor activity in larval zebrafish: implications for behavioral toxicity bioassays. *Aquat Toxicol.* 2011;102(3-4):162-166. doi:10.1016/j.aquatox.2011.01.010
61. download.pdf. Accessed January 29, 2023. <https://www.fda.gov/media/133650/download>

62. Verheijen M, Lienhard M, Schrooders Y, et al. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-12. doi:10.1038/s41598-019-40660-0
63. Walker MB, Kimmel CB. A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae. *Biotech Histochem*. 2007;82(1):23-28. doi:10.1080/10520290701333558
64. Tas J. The Alcian blue and combined Alcian blue--Safranin O staining of glycosaminoglycans studied in a model system and in mast cells. *Histochem J*. 1977;9(2):205-230. doi:10.1007/BF01003632
65. Prydz K. Determinants of Glycosaminoglycan (GAG) Structure. *Biomolecules*. 2015;5(3):2003-2022. doi:10.3390/biom5032003
66. Civantos Calzada B, Aleixandre de Artiñano A. Alpha-adrenoceptor subtypes. *Pharmacol Res*. 2001;44(3):195-208. doi:10.1006/phrs.2001.0857
67. Cabbage CC, Mabee PM. Development of the cranium and paired fins in the zebrafish *Danio rerio* (Ostariophysi, Cyprinidae). *J Morphol*. 1996;229(2):121-160. doi:10.1002/(SICI)1097-4687(199608)229:2<121::AID-JMOR1>3.0.CO;2-4
68. Togari A, Arai M, Mizutani S, Mizutani S, Koshihara Y, Nagatsu T. Expression of mRNAs for neuropeptide receptors and beta-adrenergic receptors in human osteoblasts and human osteogenic sarcoma cells. *Neurosci Lett*. 1997;233(2-3):125-128. doi:10.1016/s0304-3940(97)00649-6
69. Kondo H, Takeuchi S, Togari A. β -Adrenergic signaling stimulates osteoclastogenesis via reactive oxygen species. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;304(5):E507-515. doi:10.1152/ajpendo.00191.2012
70. Kellenberger S, Muller K, Richener H, Bilbe G. Formoterol and isoproterenol induce c-fos gene expression in osteoblast-like cells by activating beta2-adrenergic receptors. *Bone*. 1998;22(5):471-478. doi:10.1016/s8756-3282(98)00026-x
71. Hwang HS, Lee MH, Go DJ, Kim HA. Norepinephrine modulates IL-1 β -induced catabolic response of human chondrocytes. *BMC Musculoskelet Disord*. 2021;22(1):724. doi:10.1186/s12891-021-04598-7
72. Opolka A, Straub RH, Pasoldt A, Grifka J, Grassel S. Substance P and norepinephrine modulate murine chondrocyte proliferation and apoptosis. *Arthritis Rheum*. 2012;64(3):729-739. doi:10.1002/art.33449
73. Paudel S, Gjorcheska S, Bump P, Barske L. Patterning of cartilaginous condensations in the developing facial skeleton. *Dev Biol*. 2022;486:44-55. doi:10.1016/j.ydbio.2022.03.010

74. Fell HB. The histogenesis of cartilage and bone in the long bones of the embryonic fowl. *Journal of Morphology*. 1925;40(3):417-459. doi:10.1002/jmor.1050400302
75. Schaaf MJM, Chatzopoulou A, Spaink HP. The zebrafish as a model system for glucocorticoid receptor research. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2009;153(1):75-82. doi:10.1016/j.cbpa.2008.12.014
76. Klee EW, Schneider H, Clark KJ, et al. Zebrafish: a model for the study of addiction genetics. *Hum Genet*. 2012;131(6):977-1008. doi:10.1007/s00439-011-1128-0
77. Oren DA, Wei Y, Skrabanek L, Chow BKC, Mommsen T, Mojsov S. Structural Mapping and Functional Characterization of Zebrafish Class B G-Protein Coupled Receptor (GPCR) with Dual Ligand Selectivity towards GLP-1 and Glucagon. *PLoS One*. 2016;11(12):e0167718. doi:10.1371/journal.pone.0167718
78. Johnson M. The beta-adrenoceptor. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158(5 Pt 3):S146-153. doi:10.1164/ajrccm.158.supplement_2.13tac110
79. Wang X, Wang S, Meng Z, Zhao C. Adrb1 and Adrb2b are the major β -adrenergic receptors regulating body axis straightening in zebrafish. *J Genet Genomics*. 2020;47(12):781-784. doi:10.1016/j.jgg.2020.10.009
80. Wang Z, Nishimura Y, Shimada Y, et al. Zebrafish beta-adrenergic receptor mRNA expression and control of pigmentation. *Gene*. 2009;446(1):18-27. doi:10.1016/j.gene.2009.06.005
81. Cero C, Lea HJ, Zhu KY, Shamsi F, Tseng YH, Cypess AM. β 3-Adrenergic receptors regulate human brown/beige adipocyte lipolysis and thermogenesis. *JCI Insight*. 2021;6(11):e139160. doi:10.1172/jci.insight.139160
82. Candelore MR, Deng L, Tota L, et al. Potent and selective human beta(3)-adrenergic receptor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;290(2):649-655.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Hiermit erkläre ich, Friedrich Lüdje, geb. am 06.11.1992, die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Einfluss beta-adrenerger Rezeptoren auf die Knorpel- und Knochenbildung während der Embryonalentwicklung im Zebrafisch“

selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt zu haben. Es wurden keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde in der Abteilung für Pharmakogenomik der Universität Tübingen unter Betreuung von Herrn PD Dr. Martin Burkhalter durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau Prof. Dr. Melanie Philipp und Herrn PD Dr. Martin Burkhalter. Der verwendete Datensatz wurde vollständig und eigenständig durch mich erschaffen und ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig unter ständigem Austausch mit Herrn PD Dr. Martin Burkhalter.

8. Danksagung

Zuerst möchte ich mich hier ausdrücklich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Martin Burkhalter bedanken. Die kompetente Unterstützung und kollegiale Zusammenarbeit entsprachen dem höchsten Standard, den es in der wissenschaftlichen Betreuung zu erreichen gilt. Danke, Martin!

Frau Prof. Dr. Melanie Philipp möchte ich danken, dass sie mir durch Aufnahme in die Forschungsgruppe die Möglichkeit gegeben hat in diesem außerordentlich spannenden Fachgebiet zu promovieren.

Stefan, Max, Julian, Oliver, Melanie, Steffen sowie allen Mitarbeitern dieser Forschungsgruppe: ihr habt die Zeit im Labor besonders wertvoll für mich gemacht. Danke für jegliche Unterstützung.

Lea: Du bereicherst und inspirierst mich und mein Leben jeden Tag. Du unterstützt mich bei allem, was ich tue. Du bist stets für mich da, wenn ich Dich am meisten brauche. Du hast mir geholfen, mein Studium und alles, was danach kam und noch kommen wird in perfekter Weise zu bewältigen. Unendliche Liebe und Dankbarkeit verspüre ich, wenn ich an Dich denke.

Meinen Eltern gilt großer Dank, der unabhängig von dieser Dissertation gilt. Ihr habt mir alles gegeben und gelehrt, um dieses Leben zu meistern. Und ihr habt mich stets in allen meinen Entscheidungen unterstützt, auch wenn sie euch anfangs nicht immer gefielen.

Mein Zahnmedizinstudium gehört zur schönsten Zeit meines Lebens und das habe ich meine ehemaligen Kommilitonen und jetzigen Freunden fürs Leben Adrian, Fabian und Philipp zu verdanken.