

Funktionelle Analyse von in der Skelettentwicklung differentiell regulierten Genen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ulrich Wilkening

aus Hannover

Februar 2009

Diese Dissertation wurde in der Zeit vom 01.06.2004 bis zum 31.01.2009 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Mundlos am MPI für Molekulare Genetik in Berlin angefertigt.

1. Gutachter: **Prof. Dr. Stefan Mundlos**
Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik
Ihnestraße 73, 14195 Berlin
Tel.: 030/8413 1449
Email: mundlos@molgen.mpg.de

2. Gutachter: **Prof. Dr. Wolfgang Schuster**
Institut für Biologie
Freie Universität Berlin
Albrecht-Thaer-Weg 6 , 14195 Berlin
Tel.: 030/838 56797
Email: schuwowi@zedat.fu-berlin.de

Disputation am: **11.05.2009**

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	vii
1 Einleitung	1
1.1 Das Skelett	1
1.2 Die Knochenentwicklung	2
1.3 Die Regulation der enchondralen Ossifikation	4
1.3.1 Regulation durch Sox9	4
1.3.2 Ihh und PTH/PTHrP Signalwege	4
1.3.3 Runx2	6
1.4 Myocyte enhancer factor 2c (Mef2c)	8
1.4.1 Die Regulation der Aktivität von Mef2c	9
2 Material und Methoden	11
2.1 Material	11
2.1.1 Geräte	11
2.1.2 Chemikalien	12
2.1.3 Lösungen und Puffer	12
2.1.4 Enzyme	12
2.1.5 Bakterien	13
2.1.6 Kits	13
2.1.7 Primer	13
2.1.8 Vektoren	17
2.1.9 Software	19
2.2 Hühner	19
2.3 Verwendete Mausstämme	19
2.3.1 <i>Mef2c</i> ^{loxP} Mäuse	19
2.3.2 Cre Mäuse zur Generation konditioneller Knockouts	20
2.4 Allgemeine Molekularbiologische Methoden	20
2.4.1 Isolierung von Plasmid DNA	20

2.4.2	Isolierung von genomischer DNA	20
2.4.3	Isolierung von RNA	21
2.4.4	Herstellung von cDNA	21
2.4.5	PCR	22
2.4.6	Anhängen eines Nukleotids an ein DNA-Fragment (A/T-Tailing)	22
2.4.7	Klonierung von Expressionskonstrukten	22
2.4.8	Transformation von Bakterien	23
2.4.9	Sequenzierung	23
2.5	SDS-Polyacrylamidelektrophorese und Western Blot	23
2.5.1	anti-phospho Mef2c Blots	23
2.5.2	Allgemeine Western Blots	24
2.6	Histologie	24
2.6.1	Einbettung tierischen Gewebes in Paraffin	24
2.6.2	Kryo Einbettung tierischen Gewebes	25
2.6.3	Gewebefärbungen	25
2.6.4	Immunhistologie	26
2.7	<i>In situ</i> Hybridisierung (ISH)	26
2.7.1	Herstellung von DIG-markierten Hybridisierungssonden	26
2.7.2	<i>In situ</i> Hybridisierung auf Gefrierschnitten	27
2.7.3	<i>In situ</i> Hybridisierung auf Paraffinschnitten	27
2.8	Zellkultur	28
2.8.1	primäre Hühnerzellen	28
2.8.2	Zelllinien	29
2.8.3	Transfektionen	30
2.8.4	Immunzytologie	31
2.8.5	Luciferase Reporterexperimente	31
3	Ergebnisse	33
3.1	Identifikation von Kandidatengenomen mit einer Rolle in der Skelettentwicklung	33
3.1.1	Untersuchung der Expression potentieller Kandidatengene	33
3.2	Funktionelle Untersuchung der Kandidatengene	35
3.2.1	Primäre Knochenmarkzellen aus Hühnerembryonen als Modell für die Osteoblastendifferenzierung	35
3.2.2	Stimulierte chBM Kulturen produzieren eine mineralisierte extrazelluläre Matrix	36
3.2.3	Stimulierte chBM Kulturen exprimieren Markergene differenzierender Osteoblasten	37
3.2.4	Überexpression in mesenchymalen Knochenmarkzellen (chBM)	38
3.2.5	Überexpression in der Hühner Micromass-Kultur	40
3.2.6	Expression der MEF2 Transkriptionsfaktoren im Knochen	44
3.3	Konditionelle Knockouts mit der <i>Mef2c^{loxP}</i> Maus	46

3.3.1	Konditionelle Knockouts von <i>Mef2c</i> in Skelettelementen verursachen einen Phänotyp	46
3.3.2	Eine Deletion von <i>Mef2c</i> verursacht eine Verzögerung der Hypertrophie	48
3.3.3	Eine Deletion von <i>Mef2c</i> in hypertrophen Chondrozyten und Osteoblasten hat keine Auswirkungen	50
3.3.4	<i>Mef2c^{loxP/KO}</i> Mäuse entwickeln in älteren Stadien eine abnorme Wachstumsfuge	51
3.3.5	Die Expression von Markergenen ist in den <i>Mef2c^{Prx1Cre/KO}</i> Mäusen verzögert.	52
3.3.6	Die Expression von Differenzierungsmarkern ist in den Wachstumsfugen 4 Wochen alter mutanter Mäuse weiterhin reduziert	61
3.3.7	Die Wachstumsfugen von <i>Mef2c^{loxP/KO}</i> Mäusen zeigen weniger Proliferation	61
3.4	Einordnung von <i>Mef2c</i> in Signalwege der Skelettentwicklung	63
3.4.1	Chondrozyten aus der Hühnerchen Micromass als System für Promotoranalysen	64
3.4.2	<i>Kollagen Typ X (Col10a1)</i> Promotor	65
3.4.3	<i>Indian Hedgehog (Ihh)</i> Promotor	75
3.4.4	<i>Integrin binding sialoprotein (Ibsp)</i> und <i>Osteocalcin (Ocn)</i> Promotoren	76
3.4.5	<i>Parathyroid Hormon Rezeptor 1 (Pthr1)</i> Promotor	76
4	Diskussion	81
4.1	Identifikation und funktionelle Untersuchung von Kandidatengenen	81
4.1.1	Strategie des Kandidatengenscreenings	81
4.1.2	Zellsysteme und Vektoren	82
4.1.3	Etablierung eines Zellsystems zur Untersuchung der Osteoblastendifferenzierung	82
4.1.4	Überexpression bekannter Faktoren der Skelettentwicklung in der chBM Kultur	84
4.1.5	Kandidatengene	85
4.1.6	<i>Mef2c</i> reguliert die Hypertrophie von Chondrozyten <i>in vitro</i>	86
4.2	Skelettspezifische Deletion von <i>Mef2c</i>	87
4.2.1	Die Deletion von <i>Mef2c</i> verursacht Veränderungen in den Wachstumsfugen	87
4.2.2	Vergleich des Phänotyps mit humanen Erkrankungen	88
4.2.3	Vergleich des Phänotyps mit anderen Mausmodellen mit veränderten Wachstumsfugen	89
4.2.4	Molekularbiologische Untersuchung des Phänotyps	91
4.2.5	Zusammenfassung der <i>in vivo</i> Daten	96
4.3	Die Rolle von <i>Mef2c</i> in Signalwegen der Skelettentwicklung	97
4.3.1	<i>Mef2c</i> wird in Chondrozyten vermutlich durch p38 aktiviert	97
4.3.2	Regulation des <i>Col10a1</i> Promotors durch <i>Mef2c</i>	98

4.3.3	Regulation des <i>Ihh</i> Promotors durch Mefc	104
4.3.4	Regulation des <i>Ibsp</i> Promotors durch Mef2c	105
4.3.5	Regulation des <i>Ocn</i> Promotors durch Mef2c	105
4.3.6	Regulation des <i>Pthr1</i> Promotors durch Mef2c	106
4.4	Ausblick	106
5	Summary	109
6	Zusammenfassung	111
	Literaturverzeichnis	113
	Abkürzungen	133
	Danksagung	135
	Publikationsverzeichnis	137

Abbildungsverzeichnis

1.1	Knochenentwicklung	2
1.2	Mef2a Dimer im Komplex mit DNA	8
1.3	Die verschiedenen MEF2 Proteine im Vergleich	9
3.1	Unterschiedliche Zelltypen in der chBM Kultur	36
3.2	Osteoblastische Differenzierung mesenchymaler Knochenmarks-Stromazellen	37
3.3	Stimulierte chBM Zellen exprimieren Osteoblastenmarker	38
3.4	Kandidatenscreen	39
3.5	Retrovirale Überexpression in chBM Kulturen	40
3.6	Mef2c induziert die Expression von Markergenen differenzierender Chondro- zyten	41
3.7	Runx2 induziert Mef2c, beide induzieren Mef2b	41
3.8	Überexpression von Kandidatengenen in der Hühner Micromass-Kultur	42
3.9	HE und Alcian blue Färbung infizierter chMM	43
3.10	Mef2c induziert Differenzierungsmarker	44
3.11	Expression von <i>Mef2a</i> , <i>Mef2c</i> und <i>Mef2d</i> in Skelettelementen	45
3.12	Position der loxP Sequenzen	46
3.13	Gestörte enchondrale Ossifikation als Folge einer konditionellen Deletion von <i>Mef2c</i>	47
3.14	Verzögerte Hypertrophie	48
3.15	Verzögerte Mineralisation und Osteoklasteninvasion	49
3.16	Vergleich aller konditionellen KOs	50
3.17	Abnorme Morphologie der <i>Mef2c</i> ^{loxP/KO} Knochen im Alter von 4 Wochen	52
3.18	Die Wachstumsfuge in den <i>Mef2c</i> ^{Prx1Cre/KO} Mäusen bleibt weiterhin verändert	53
3.19	Verzögerte hypertrophe Differenzierung im KO	54
3.20	Expression von Markergenen bei Neugeborenen – Teil 1	57
3.21	Expression von Markergenen bei Neugeborenen – Teil 2	58
3.22	Expressionsmuster von Markergenen in 4W Tieren – Teil 1	59
3.23	Expressionsmuster von Markergenen in 4W Tieren – Teil 2	60
3.24	Expressionsstärken ausgesuchter Gene	61
3.25	Die Proliferation ist in zwei Wochen alten KO Tieren reduziert	62

3.26 Die Mef2c vermittelte Stimulation von Differenzierungsmarkern ist p38 abhängig	63
3.27 Ein Smad Reporter lässt sich in Micromass Chondrozyten aktivieren	64
3.28 Schematische Übersicht der <i>Col10a1</i> Reporterkonstrukte	65
3.29 Spleißvarianten von Mef2c und die Aktivierung des <i>Col10a1</i> Promotors	66
3.30 Unterschiedliche Aktivierung der <i>Col10a1</i> Reporter	67
3.31 Beteiligung weiterer Transkriptionsfaktoren	68
3.32 p38 reguliert den <i>Col10a1</i> Promotor	69
3.33 PTHrP hemmt den <i>Col10a1</i> Promotor	70
3.34 Übersicht über die Mutagenesevarianten vom Mef2c	71
3.35 Aktivierung des <i>Col10a1</i> Promotors durch verschiedene Mef2c Mutanten und ihre Regulierbarkeit durch PTHrP	72
3.36 PTHrP hemmt Mef2c nicht über die PKA vermittelte Phosphorylierung	73
3.37 PKA hemmt die Aktivierung des <i>Col10a1</i> -Promotors	74
3.38 Aktivierung eines <i>Ihh</i> Reporters durch Mef2c und Runx2	75
3.39 Regulation des <i>Ibsp</i> und des <i>Ocn</i> Promotors durch Mef2c	77
3.40 Aktivierung von <i>Pthr1</i> P2 Reporterkonstrukten	78
3.41 Regulation des <i>Pthr1</i> Promotors durch Mef2c, Runx2 und Sp1	79
3.42 Zusammenspiel von Mef2c, Sp1 und Runx2 bei der Regulation des <i>Pthr1</i> Promotors	80
4.1 Regulation von Mef2c in Chondrozyten	100

Tabellenverzeichnis

2.1	Sondenprimer für Kandidatengene	14
2.2	Primer zur Herstellung weiterer Sonden	15
2.3	Primer für die quantitative RT-PCR (Maus)	15
2.4	Primer für die quantitative RT-PCR (Huhn)	16
2.5	Mutageneseprimer	16
2.6	RCAS-T/A Konstrukte	17
2.7	Verwendete Cre Mäuse	20
3.1	Expression regulierter Gene	34

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Das Skelett

Mit seinen über 200 Knochen macht das menschliche Skelett durchschnittlich 12% des Körpergewichts aus und ist damit nach der Muskulatur das zweitschwerste Organ des Menschen. Es dient nicht nur als Stützapparat und als Widerlager für die Muskeln, sondern erfüllt auch eine Schutzfunktion für die inneren Organe und das Knochenmark. Durch letzteres ist es direkt an der Blutbildung und an der Aufrechterhaltung des Immunsystems beteiligt. Auch nach dem Abschluß des Längenwachstums unterliegen die Knochen einem kontrollierten Umbau durch ein Gleichgewicht zwischen knochenaufbauenden Osteoblasten und -abbauenden Osteoklasten, der sogenannten Homöostase. Dies ermöglicht eine dynamische Anpassung an äußere Einflüsse wie z.B. mechanische Belastung, die das Gleichgewicht zugunsten eines erhöhten Knochenaufbaus verschieben kann. Dementsprechend kann aber eine andauernde Entlastung der Knochen zu einer Verringerung der Knochensubstanz führen – dies ist z.B. in der Schwerelosigkeit der Fall [Wronski und Morey, 1983].

Erkrankungen des Skelettapparats spielen weltweit eine wichtige Rolle – so ist gerade die Osteoporose bei älteren Menschen eine weit verbreitete Erkrankung der Knochen, die zu einer Erhöhung des Frakturrisikos führt. Weiterhin gibt es eine Reihe von Krankheiten mit genetischer Ursache, bei denen Fehlbildungen von Skelettelementen auftreten [Kornak und Mundlos, 2003]. Neben Vererbung hat auch der individuelle Lebenswandel einen nicht unerheblichen Einfluß auf die Gesundheit der Knochen. So führen Bewegungsmangel, übermäßiger Alkoholkonsum, Nikotin und auch Koffein zu einer Verringerung der Knochendichte [Broulik und Jaráb, 1993; Deal, 1997]. Auch Mangelernährung zehrt an der Knochensubstanz.

In den letzten Jahren konnten grundlegende Mechanismen der Knochenentwicklung und Homöostase entschlüsselt werden [Karsenty und Wagner, 2002] – eine endgültige Aufklärung der Vorgänge im Skelett bedarf jedoch noch zusätzlicher Forschungsarbeit. So sind gerade aus medizinischer Sicht Faktoren interessant, die einen direkten Einfluß auf die

Ossifikation ausüben können, um neuartige Medikamente entwickeln zu können, mit Hilfe derer z.B. das Fortschreiten der Osteoporose aufgehalten oder gar gänzlich blockiert werden kann. Neben den knochenabbauenden Krankheiten gibt es auch solche, bei denen zu viel Knochen gebildet wird – z.B. *Fibrodysplasia ossificans progressiva* (FOP) oder Osteopetrose – bei denen eine Reduzierung der Aktivität der Osteoblasten Linderung bringen könnte. Entsprechend ist es von großem Interesse, sowohl knochenanabole als auch -katabole Faktoren zu identifizieren, die möglicherweise zur spezifischen Behandlung von Erkrankungen des Skelettsapparats genutzt werden können.

1.2 Die Knochenentwicklung

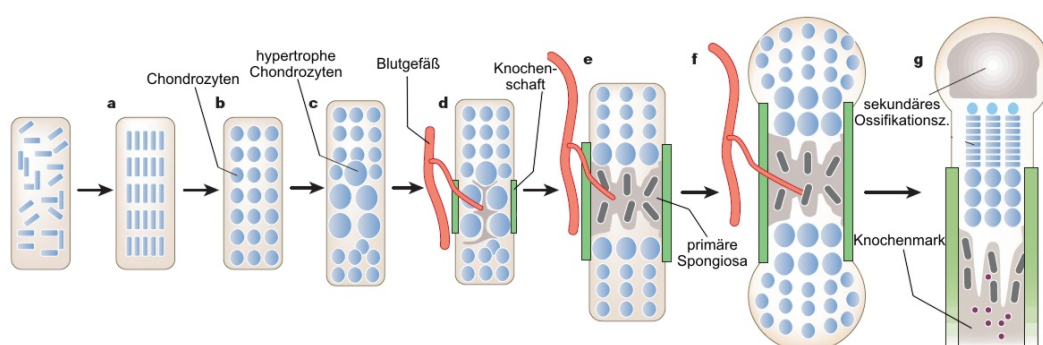


Abbildung 1.1: Enchondrale Knochenentwicklung. **a** Kondensation mesenchymaler Vorläuferzellen. **b** Die Zellen in den Kondensationen werden zu Chondrozyten. **c** Im Zentrum der Kondensation hören die Zellen auf zu proliferieren und werden hypertroph. **d** Zellen, die im Perichondrium unmittelbar neben den hypertrophen Chondrozyten liegen, werden zu Osteoblasten und formen den Knochenschaft. Die hypertrophen Chondrozyten mineralisieren die Matrix, locken Blutgefäße an und werden apoptotisch. Abbau der Knorpelmatrix durch Osteoklasten. **e** Osteoblasten wandern mit den Blutgefäßen ein und formen die primäre Spongiosa. Im Bereich des Knochenschafts wird kortikaler Knochen aufgebaut. **f** Die Chondrozyten verlängern durch andauernde Proliferation den Knochen. **g** Entstehung des sekundären Ossifikationszentrums und der Knochenmarkhöhle. Einwanderung hämatopoetischer Zellen in die Markhöhle. Verändert nach Kronenberg [2003].

An der Knochenentwicklung sind vielfältige Signalwege und Faktoren beteiligt [De Crombrugge et al., 2001]. Es gibt zwei unterschiedliche Arten der Knochenentwicklung: 1. die desmale und 2. die enchondrale Ossifikation. Bei der ersten bilden mesenchymale Osteoblastenvorläufer aus der Neuralleiste im Bindegewebe eine Struktur, die durch die differenzierenden Zellen direkt mineralisiert wird. Die Calvarien und Teile der Schlüsselbeine sind Beispiele für Knochen, die durch desmale Ossifikation gebildet werden. Außerdem wird diskutiert, daß die kortikalen Strukturen der Röhrenknochen durch eine Art desmale Ossifikation gebildet werden, da die Zellen im Perichondrium direkt zu Osteoblasten differenzieren [Kronenberg, 2007].

Bei der enchondralen Ossifikation (siehe Abbildung 1.1) aggregieren undifferenzierte mesenchymale Vorläuferzellen zu Kondensationen an den Orten und mit der Form der zukünftigen Skelettelemente. Diese Zellen differenzieren zu Chondrozyten, die Kollagen Typ II und

Aggrecan produzieren und in die Matrix sezernieren. Es bildet sich ein Netzwerk aus Kollagenfasern, die ein stark hydriertes Gel aus Proteoglykanen und Glykoproteinen umschließen. Die Chondrozyten lagern sich nach und nach säulenartig entlang der Längsachse des Knorpellements zusammen und verlängern dieses durch starke Proliferation. Zusätzlich werden weitere mesenchymale Zellen aus dem umliegenden Gewebe in die Knorpelanlage rekrutiert, die ebenfalls zum Wachstum dieser beitragen. Gleichzeitig bildet sich um die Knorpelanlage herum das Perichondrium – ein Bereich dicht gepackter Zellen, die in einem regen Austausch von Signalmolekülen mit den Chondrozyten stehen [Kronenberg, 2003].

Erreicht die Masse an Chondrozyten eine charakteristische Größe, die für jeden Knochen unterschiedlich ist, hören die Zellen im Zentrum der Knorpelanlage auf zu proliferieren und beginnen mit der hypertrophen Differenzierung. Diese postmitotischen Zellen produzieren nun Kollagen Typ X und sezernieren es in die Matrix, die sie auch gleichzeitig mineralisieren. Die Zellen im direkt an die hypertrophe Zone angrenzenden Perichondrium, differenzieren zu Osteoblasten und formen den Knochenschaft, der später zum kortikalen Knochen wird. Im terminal hypertrophen Zustand produzieren die Zellen die Matrix Metalloproteinase 13 (Mmp13), die die Matrix zersetzt und dadurch die Invasion von Blutgefäßen, die durch das von den Zellen sezernierte Signalmolekül *Vascular endothelial growth factor* (Vegf) in die Knorpelanlage dirigiert werden [Gerber et al., 1999; Zelzer et al., 2001], ermöglicht. Über die Blutgefäße wandern auch Osteoklasten ein, die ihrerseits über sezernierte Proteinase wie Mmp9 die Matrix weiter zersetzen und somit Raum für aus dem Perichondrium einwandernde Osteoblasten schaffen. Diese nutzen den verbliebenen Knorpel als Gerüst für die Ablagerung von Knochenmatrix, die hauptsächlich aus Kollagen Typ I, III und V besteht. Auf diese Weise bilden die Osteoblasten die primäre Spongiosa, den Vorläufer des trabekulären Knochens.

Durch den Aufbau knöcherner Strukturen in der Diaphyse werden die Chondrozyten getrennt und es entstehen zwei Wachstumsfugen, in denen die Chondrozyten bis zum Erreichen der endgültigen Größe des Knochens proliferieren. Die Osteoklasten bauen auch den trabekulären Knochen ab und schaffen dadurch die spätere Knochenmarkhöhle, in die hämatopoetische Zellen einwandern. Die Osteoblasten, die den trabekulären und kortikalen Knochen aufbauen, werden schließlich von diesem umschlossen und eingemauert – sie differenzieren zu Osteozyten, die nun im Zusammenspiel mit den Osteoklasten an der Homöostase der Knochen beteiligt sind. Osteozyten unterscheiden sich von Osteoblasten durch die verstärkte Expression von *Dentin matrix protein* (*Dmp1*) und *Sclerostin* (*Sost*) – beides sezernierte Faktoren, die an der Regulation der Matrixmineralisation beteiligt sind [Kamiya et al., 2008; Liu et al., 2008; O'Brien et al., 2008].

Erheblich später – bei Mäusen nach der Geburt – bilden sich an den Enden der Knochen die sekundären Ossifikationszentren. Dies verläuft über die Differenzierung von Chondrozyten im Zentrum der Epiphysen – auch hier findet eine Hypertrophie der Zellen mit anschließender Invasion durch Blutgefäße und Osteoblasten statt.

1.3 Die Regulation der enchondralen Ossifikation

Wie im vorherigen Abschnitt 1.2 beschrieben, durchlaufen die Zellen, die an der enchondralen Ossifikation beteiligt sind, mehrere Phasen: aus ruhenden Chondrozyten werden proliferierende, die daraufhin zu hypertrophen Chondrozyten differenzieren, bevor sie absterben. Diese Abläufe werden durch das geordnete Zusammenspiel vieler Signalwege und Faktoren reguliert [Kronenberg, 2003; Mackie et al., 2008]. Im Folgenden sollen nun die, für das Verständnis der vorliegenden Arbeit, wichtigen kurz vorgestellt werden.

1.3.1 Regulation durch Sox9

Der früheste Vorgang der enchondralen Ossifikation – die Kondensation mesenchymaler Vorläuferzellen – wird hauptsächlich durch den Transkriptionsfaktor Sox9 initiiert. Sox9 ist für diesen Schritt essentiell, Studien mit chimären Mäusen, die Sox9^{-/-} Zellen enthielten, konnten zeigen, daß nur Zellen, die Sox9 exprimierten, auch an der Chondrogenese beteiligt waren [Bi et al., 1999a]. Sox9 induziert die Expression von Sox5 und Sox6 und alle drei Faktoren interagieren bei der Expression chondrozytenspezifischer Gene wie *Col2a1* und *Aggrecan* [Lefebvre et al., 1997, 1998]. Die Proliferation der Chondrozyten wird ebenfalls durch Sox9 koordiniert, konditionelle Deletionen von Sox9 nach Ausbildung der mesenchymalen Kondensation, führten neben einer Blockade der Chondrogenese auch zu einer Hemmung der Proliferation [Akiyama et al., 2002]. Durch die direkte Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Runx2 (siehe Abschnitt 1.3.3) hemmt Sox9 diesen und verhindert eine vorzeitige hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten [Zhou et al., 2006].

Die frühe Regulation der Proliferation über Sox9 wird hauptsächlich über FGF- und Bmp-Signale gesteuert. Mit dem Aufkommen prähypertropher Chondrozyten erfolgt eine zusätzliche Regulation durch das Morphogen *Indian hedgehog* (Ihh), welches im folgenden Abschnitt erläutert wird [Minina et al., 2001; Sahni et al., 1999; St-Jacques et al., 1999].

1.3.2 Ihh und PTH/PTHrP Signalwege

Ihh wird von prähypertrophen Chondrozyten exprimiert und sezerniert – es diffundiert zu den Enden der Knorpelanlage und in das Perichondrium, wo es von seinem Rezeptor Patched (Ptch1) gebunden wird [Vortkamp et al., 1996]. Patched ohne gebundenes Hedgehog reprimiert den G-Protein gekoppelten Rezeptor Smoothed (Smo), der eine Signalkaskade auslöst, die u.a. durch Gli-Transkriptionsfaktoren vermittelt wird. So aktiviert Smoothed die Expression von *Ptch1* und *cyclin D1* und reguliert durch letzteres teilweise die Proliferation der Chondrozyten [Long et al., 2001; Marigo und Tabin, 1996]. Mäuse mit einer Deletion von *Ihh* zeigen einen Phänotyp mit extrem reduzierter Proliferation, zunächst verzögerter, dann abnormaler Differenzierung der Chondrozyten und Abwesenheit reifer Osteoblasten [St-Jacques et al., 1999]. Eine Deletion von *Smo* führt ebenfalls zu einer Reduktion der Proliferationsrate, aber eine Störung der Chondrozytendifferenzierung wie bei *Ihh*^{-/-} Mäusen wurde nicht beobachtet [Long et al., 2001].

Der negative Effekt auf die Chondrozytendifferenzierung wird durch die *Ihh*-abhängige Expression des *Parathyroid hormone related peptide (PTHrP)* im Perichondrium und in den Chondrozyten der Epiphysen vermittelt [Vortkamp et al., 1996]. Dies konnte durch eine *in vitro* Behandlung von Gliedmaßen von *PTHrP*^{-/-} Mäusen mit Hedgehog Proteinen gezeigt werden, die keine Effekte bezüglich der Chondrozytendifferenzierung zeigte. PTHrP ist ein sezerniertes Peptid und bildet durch Diffusion einen Gradienten in Richtung der Metaphysen der Knorpelanlage aus. In Zellen des Perichondriums, der prähypertrophen und der frühen hypertrophen Zone wird der PTH/PTHrP-Rezeptor *Pthr1* exprimiert – ein G-Protein gekoppelter Transmembranrezeptor.

Bindet PTHrP an seinen Rezeptor, so werden über zwei parallele Signalwege die Proteinkinasen A und C (PKA & PKC) aktiviert. Die durch cAMP aktivierte PKA gilt als der Haupteffektor des PTHrP Signals, da aktivierende Mutationen in *Pthr1* zu einer Anhäufung von cAMP führen [Schipani et al., 1997a]. Die PKA aktiviert durch Phosphorylierung sowohl Sox9 als auch das *cAMP response element-binding protein (CREB)* – ersteres kann Runx2 blockieren (vgl. Abschnitt 1.3.1), letzteres induziert *c-Fos*, welches direkt die Expression von *COL10A1* reprimieren kann [Rierner et al., 2002]. Zusätzlich induziert PTHrP noch die Expression von *Nkx3.2*, das wiederum als transkriptioneller Repressor das *Runx2*-Gen blockiert [Provot et al., 2006]. Da die PTHrP vermittelte Hemmung von *Runx2* über die PKA verläuft, dürfte die Expression von *Nkx3.2* ebenfalls PKA abhängig sein [Li et al., 2004]. Durch die Blockade von Runx2 auf DNA- und Proteinebene hemmt PTHrP die Expression von *Ihh* und anderer zur hypertrophen Differenzierung notwendiger Gene [Guo et al., 2006; Yoshida et al., 2004].

Zwischen *Ihh* und PTHrP bildet sich auf diese Weise eine negative Schleife aus, in der *Ihh* die Rate der Proliferation der Chondrozyten reguliert, während PTHrP die Differenzierung dieser verzögert und damit die Rate bestimmt, mit der die Zellen den proliferativen Pool verlassen [Lanske et al., 1996; Vortkamp et al., 1996; Weir et al., 1996]. Erst wenn durch die Ausdehnung der Knorpelanlage die Entfernung der prähypertrophen Chondrozyten zu den PTHrP-produzierenden Zellen zunimmt und damit die Konzentration an PTHrP einen Schwellenwert unterschreitet, können diese weiter differenzieren.

Mäuse, die transgen entweder PTHrP oder eine konstitutiv aktive Variante des Rezeptors exprimieren, zeigen eine Form des kurzgliedrigen Kleinwuchses mit verzögerter enchondraler Ossifikation und Störungen der Wachstumsfuge – sie entwickeln eine Metaphysäre Chondrodysplasie vom Typ Jansen [Schipani et al., 1997b; Weir et al., 1996]. Demgegenüber verursacht eine Deletion von *PTHrP* eine Verkürzung der proliferativen Zone mit verfrühter Differenzierung der Chondrozyten, was letztendlich letal ist. [Amizuka et al., 1994; Karaplis et al., 1994]. Die Deletion von *Pthr1* hingegen resultiert in einer Störung der Wachstumsfuge mit verzögerter Hypertrophie und Blutgefäßinvasion. Zusätzlich bildet sich noch eine Verdickung des kortikalen Knochens aufgrund einer verstärkten Ansammlung von Osteoblasten heraus [Lanske et al., 1999].

Ihh signalisiert auch unabhängig von PTHrP

Ein wichtiger Aspekt der Ihh/PTHrP Schleife ist die Tatsache, daß Ihh zwar für die Expression und Funktion von PTHrP notwendig ist, PTHrP aber in *Ihh*^{-/-} Mäusen den Phänotyp nicht aufheben kann [Karp et al., 2000]. Ihh scheint eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung einer an der Längsachse ausgerichteten Anordnung der Chondrozyten zu spielen – im Gegensatz zu PTHrP, dessen Deletion nicht zu dieser Störung der Wachstumsfuge führt. Pathi et al. [1999] konnten zeigen, daß Ihh die Expression von *Bmp2* und *Bmp4* in den die prähypertrophe und hypertrophe Zone flankierenden Bereichen des Perichondriums stimuliert. Interessant ist hierbei, daß eine Mißexpression von Ihh zu einer Expression der *Bmps* im gesamten, die heterologe *Ihh* Expressionsdomäne umgebenden Perichondrium, also auch entlang weniger differenzierter, proliferierender Zellen führte. Dies legte die Vermutung nah, daß Ihh direkt die Expression von *Bmp2* und *Bmp4* im Periochondrium stimuliert, unabhängig davon, wie differenziert die benachbarten Zellen sind.

Ein weiterer von Indian hedgehog abhängiger Vorgang ist die Ausbildung des primären Ossifikationszentrums [Chung et al., 2001; Long et al., 2004], vermutlich durch die Rekrutierung von Osteoblasten aus dem Bereich des Perichondriums.

1.3.3 Runx2

Der in differenzierenden Chondrozyten und Osteoblasten exprimierte Transkriptionsfaktor Runx2 gilt als Hauptregulator der Osteoblastenentwicklung. *Runx2*^{-/-} Mäuse entwickeln ein knorpeliges Skelett, welches aber nicht mineralisiert, da die Osteoblastendifferenzierung komplett blockiert ist [Komori et al., 1997]. Auch die Reifung der Chondrozyten ist in den *Runx2*^{-/-} Mäusen beeinträchtigt, so ist je nach Skelettelement die Anzahl hypertropher Chondrozyten reduziert oder sie fehlen vollständig [Inada et al., 1999]. Durch die Blockade der terminalen Hypertrophie wird die die Zellen umgebende Matrix nicht mineralisiert und die Expression von *Osteopontin* (*Opn*) und *Mmp13* ist stark reduziert. Die Beeinträchtigung der Chondrozytendifferenzierung nimmt dabei in den Gliedmaßen von proximal nach distal ab. Vermutlich übernimmt Runx3 in den distalen Knochen des appendikulären Skeletts die Regulation der Hypertrophie, da ein *Runx2/Runx3* Doppelknockout zu einem völligen Verlust prähypertropher und hypertropher Chondrozyten führt [Yoshida et al., 2004].

Heterozygote Mutationen im menschlichen *RUNX2* Gen sind die Ursache für die Cleidocraniale Dysplasie (CCD), eine Fehlbildung, die sich durch Kleinwuchs und eine unvollständige Verknöcherung der desmal gebildeten Strukturen auszeichnet [Kim et al., 1999; Mundlos et al., 1997]. Dieser Phänotyp wird auch von Mäusen mit nur einer funktionsfähigen Kopie des *Runx2* Gens ausgebildet, welches sich als Tiermodell für die CCD in der Forschung nutzen lässt [Otto et al., 1997].

Es existieren verschiedene transgene Mausmodelle, bei denen *Runx2* oder eine dominant-negative Variante entweder in Osteoblasten oder Chondrozyten überexprimiert wurde, um die Funktion von Runx2 weiter zu erforschen. Interessanterweise führt die Überexpression von *Runx2* in Osteoblasten zu einem Phänotyp mit Osteopenie und einer Häufung von

Frakturen [Geoffroy et al., 2002; Liu et al., 2001]. Auf molekularer Ebene finden sich viele Osteoblasten, die *Osteopontin* exprimieren, aber Osteoblasten, die *Osteocalcin* – einen Marker reifer Osteoblasten – exprimieren, sind in den *Runx2* transgenen Mäusen genauso reduziert wie Osteozyten. So scheint *Runx2* die späte Osteoblastenreifung zu hemmen. Experimente, bei denen *Runx2* retroviral in Gliedmaßen von Hühnern exprimiert wurde, zeigten keinen Einfluß auf die Osteoblastendifferenzierung, aber beeinflussten die Differenzierung der Chondrozyten [Stricker et al., 2002]. Damit konnte der Beweis erbracht werden, daß *Runx2* notwendig, aber nicht ausreichend für die Osteoblastendifferenzierung ist. Transgene Expression von *Runx2* in Chondrozyten beschleunigt deren hypertrophe Differenzierung und führt somit zu einer Verkürzung der Skelettelemente [Ueta et al., 2001] – die Differenzierung der Osteoblasten konnte aber in *Runx2*^{-/-} Mäusen nicht wiederhergestellt werden [Takeda et al., 2001]. Die transgene Überexpression einer dominant-negativen Variante von *Runx2* in Chondrozyten verursachte ebenfalls Kleinwuchs und Fehlbildungen des Skeletts, diesmal aber durch eine Blockade der hypertrophen Differenzierung der Chondrozyten [Stricker et al., 2002; Ueta et al., 2001].

Die Regulation von und durch *Runx2*

Die Expression von *Runx2* wird durch die sezernierten Morphogene TGF β ₁, Bmp2, Bmp4 und Bmp7, die zur TGF β -Superfamilie gehören, aktiviert [Lee et al., 2000; Tou et al., 2003]. Der positive Effekt dieser Faktoren wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren vermittelt – so induziert Bmp2 z.B. über Smad die Expression von *junB*, welches wiederum die Expression von *Runx2* stimuliert [Lee et al., 2002]. Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor ist Dlx5, der nach Bmp2-Stimulation durch die MAP-Kinase p38 aktiviert wird und die *Runx2* Expression *in vitro* und *in vivo* induzieren kann [Holleville et al., 2007; Lee et al., 2003a; Ulsamer et al., 2008].

Gemeinhin wird *Runx2* als Hauptregulator der Expression von *Osterix* (*Osx*) aufgeführt – ein Transkriptionsfaktor, der ebenfalls essentiell für die Knochenentwicklung ist, da eine Deletion desselben zu einer Blockade der Osteoblastendifferenzierung führt [Nakashima et al., 2002]. Lee et al. [2003b] konnten jedoch zeigen, daß auch in *Runx2*^{-/-} Zellen eine Behandlung mit Bmp2 zu einer Expression von *Osx* führt, und zwar durch die Induktion von Dlx5. Eine *siRNA* vermittelte Blockade von Dlx5 konnte im Gegensatz zu einer Blockade von *Runx2* die Expression von *Osx* unterdrücken. Dieser Mechanismus erklärt, daß eine Überexpression von *Runx2* allein nicht ausreichend für die Osteoblastendifferenzierung ist. Die DNA-Bindung von *Runx2* wird durch die Interaktion mit dem Koaktivator *Corebinding factor*- β (*Cbfb*) stabilisiert – eine Deletion desselben verursacht einen Phänotyp, der dem von *Runx2*^{-/-} Mäusen ähnelt [Yoshida et al., 2002]. *Runx2* ist an der Expression von einer Reihe, für die Differenzierung von Chondrozyten und Osteoblasten wichtiger Gene wie *Col1a1* und *X*, *Ihh*, *Mmp13*, *Osteopontin* und *Osteocalcin* beteiligt.

Durch die Interaktion mit Histondeacetylase (HDAC) wird *Runx2* in einen transkriptionellen Repressor transformiert [Vega et al., 2004; Westendorf et al., 2002]. Die sowohl positive als auch negative Autoregulation der eigenen Expression verdeutlicht die bifunktionelle Rolle

von Runx2 [Drissi et al., 2000; Tou et al., 2003].

Genexpressionsanalysen zwischen *Runx2*^{-/-} und Wildtyp Mäusen [Hecht, 2006; Hecht et al., 2007] waren die Grundlage für die vorliegende Arbeit, um neue Faktoren zu identifizieren, die an der Regulation der Skelettentwicklung beteiligt sind.

1.4 Myocyte enhancer factor 2c (Mef2c)

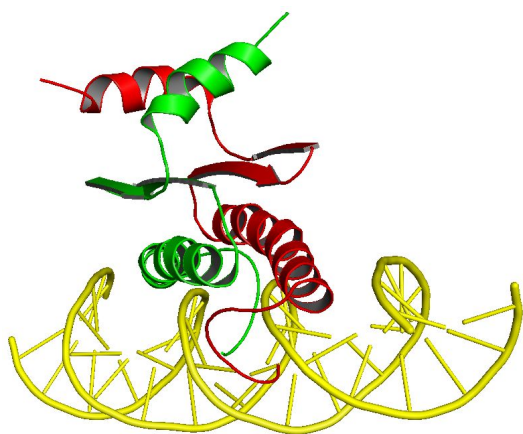


Abbildung 1.2: *Mef2a* Dimer (rot/grün) im Komplex mit DNA (gelb). Dargestellt mit PyMOL, basierend auf Huang et al. [2000]. Die MADS-Box bindet direkt an die DNA und dient zusätzlich der Dimerisierung, während die MEF2 Domäne (oben) einen Einfluß auf die Bindungsstärke hat und die Interaktion mit Cofaktoren vermittelt.

Mef2c gehört zur Familie der MEF2 (Myocyte enhancer factor 2) Transkriptionsfaktoren, die sich aus vier Mitgliedern zusammensetzt: Mef2a-d. Die MEF2 Familie ist eine von drei Gruppen der MADS-Box Transkriptionsfaktoren (MCM1, Agamous, Deficiens, Serum Response Factor (SRF)), die sich alle durch eine konservierte N-terminale MADS-Box auszeichnen. Die MADS-Box dient gleichzeitig zur Dimerisierung und zur DNA-Bindung an die Konsensussequenz TA(T/A)₄TA [Cserjesi und Olson, 1991; Gossett et al., 1989; McDermott et al., 1993]. Die MEF2 Proteine können Homo- und Heterodimere mit einer Reihe von Faktoren bilden, die entweder zur transkriptionellen Aktivierung oder auch zu einer Hemmung beitragen können,

wodurch alle MEF2 Proteine bifunktional sind. Bei den MEF2 Faktoren schließt sich unmittelbar C-terminal an die MADS-Box die MEF2-Domäne an, die einen Einfluß auf die Stärke der DNA-Bindung hat und für die Interaktion mit Cofaktoren notwendig ist. C-terminal von der Mef2-Domäne liegt die Transaktivierungsdomäne (TAD), die in allen MEF2 Proteinen komplexen Spleißvorgängen unterliegt. Nah am C-Terminus des Proteins liegen Signalsequenzen für die nukleare Lokalisation (NLS) und die nukleare Retention (NRS). Mef2b nimmt eine Sonderstellung ein, da es sich am stärksten von den anderen MEF2 Proteinen unterscheidet [Morisaki et al., 1997].

Die MEF2 Proteine werden in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert und sind dort an Vorgängen der Differenzierung beteiligt [McKinsey et al., 2002; Potthoff und Olson, 2007]. Ein Knockout von *Mef2c* resultiert aufgrund von Störungen in der Herzentwicklung in embryonaler Letalität zum Zeitpunkt E9,5 [Lin et al., 1997]. Gerade in Myozyten und Kardiomyozyten wurde die Funktion der MEF2 Proteine intensiv erforscht, in letzteren regulieren sie die Vorgänge, die zur Hypertrophie der Zellen führen [Passier et al., 2000]. Für die Entwicklung von Skelettmuskeln sind Mef2a und Mef2d nicht essentiell – eine jeweilige Deletion

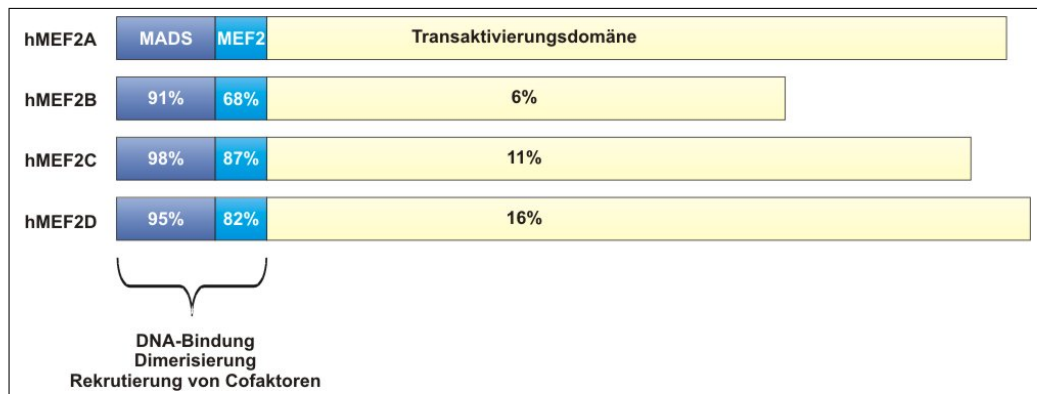


Abbildung 1.3: Die verschiedenen MEF2 Proteine im Vergleich. Prozentuale Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen in der MADS-Box, der MEF2-Domäne und der transkriptionellen Aktivierungsdomäne der humanen MEF2 Proteine relativ zu MEF2A. Abgebildet ist jeweils nur eine Isoform – die N-Termini sind links. Nach Potthoff und Olson [2007].

hat keine oder nur geringe Effekte [Potthoff et al., 2007a]. Mäuse mit einer skelettmuskel-spezifischen Deletion von *Mef2c* zeigen erst nach der Geburt einen Phänotyp, somit ist *Mef2c* für die postnatale Reifung der Zellen notwendig [Potthoff et al., 2007b]. *Mef2c* ist auch notwendig für die Entwicklung der Blutgefäße und reguliert im Zusammenspiel mit HDAC7 über die Expression von *Mmp10* die Integrität dieser [Chang et al., 2006; Lin et al., 1998]. Auch bei der Differenzierung und der Regulation der Apoptose von Neuronen und der Entwicklung von T-Zellen spielen die MEF2 Proteine eine wichtige Rolle [Potthoff und Olson, 2007].

1.4.1 Die Regulation der Aktivität von Mef2c

Posttranskriptionell können in unterschiedlichen Geweben durch alternatives Spleißen verschiedene *Mef2c* Isoformen entstehen, die sich aufgrund des Vorkommens von Aktivator- und Repressordomänen in ihrer Aktivität unterscheiden. So gibt es z.B. Muskel- und Gehirnisofomen [Janson et al., 2001].

Auch bezüglich der posttranslationalen Regulation der MEF2 Proteine wurden mittlerweile zahlreiche Arbeiten veröffentlicht. So wird *Mef2c* an drei Positionen (T293, T300 und S387) durch die MAP-Kinase p38 phosphoryliert und aktiviert [Han et al., 1997] – die Position S387 kann aber auch durch die MAP-Kinase Erk5 (Bmk1), die im Bereich der MEF2 und MADS Domäne bindet, phosphoryliert und aktiviert werden [Kato et al., 1997; Yang et al., 1998]. Erk5 dient auch als transkriptioneller Koaktivator, da es eine eigene Transaktivierungsdomäne besitzt [Kasler et al., 2000]. Es ist sogar wahrscheinlich, daß für diese Position eine Phosphorylierung durch ERK5 die wichtigere Regulation darstellt. Eine Dephosphorylierung von *Mef2c* an Position S412 im Bereich des nukleären Lokalisationssignals (NLS) durch die Phosphatase Calcineurin führt zu einer Translokation des Proteins in den Nukleus [Lynch et al., 2005]. Die Aminosäure S59 ist konstitutiv durch die Casein

Kinase II (CKII) phosphoryliert, was zu einer erhöhten Bindung an die DNA führt [Molkentin et al., 1996]. Eine weitere Phosphorylierungsstelle befindet sich innerhalb der MADS-Box an Position T20 – dort kann Mef2c durch die Proteinkinase PKA phosphoryliert werden, was ebenfalls in einer stärkeren DNA-Bindung resultiert [Wang et al., 2005]. Eine Phosphorylierung von Mef2d durch PKA hingegen führt zu einer verstärkten Rekrutierung von Klasse II Histon Deacetylasen (HDACs) an die DNA, wodurch das Mef2d zu einem transkriptionellen Repressor wird [Du et al., 2008; Miska et al., 1999].

Die Klasse II Histon Deacetylasen sind wichtige negative Regulatoren aller MEF2 Proteine. Sie interagieren mit diesen über den N-Terminus und werden auf diese Weise an die DNA rekrutiert, wo sie die Promotorbereiche durch die Kondensation des Chromatins reprimieren können. HDACs besitzen keine DNA-Bindedomäne und können deswegen ihre Funktion nur durch Komplexierung mit Transkriptionsfaktoren ausüben. Demgegenüber stehen Histonacetylasen (HAT) wie p300 und PCAF, die durch die Auflockerung des Chromatins als Aktivatoren der MEF2 Proteine dienen [McKinsey et al., 2001].

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit gab es keine konkreten Beweise für eine Rolle der MEF2 Proteine in der Skelettentwicklung – es gab nur Hinweise auf eine Regulation des *Col10a1* Promotors durch Mef2c [Harada et al., 1997; Stanton et al., 2004]. In diesen Arbeiten wurden aber keine ausreichenden Experimente durchgeführt, um einen endgültigen Beweis für eine Interaktion zu erbringen. In [Harada et al., 1997] wurde eine MEF2 Konsensussequenz im *Col10a1*-Promotor nachgewiesen, die für eine Bmp7 vermittelte Aktivierung notwendig war. Eine Beteiligung von MEF2 Proteinen an der Regulation konnte aber nicht nachgewiesen werden – sie wurde sogar ausgeschlossen. In [Stanton et al., 2004] wurde die Expression von *Mef2c* in differenzierenden Micromass Kulturen nachgewiesen. In darauffolgenden Reporterassays konnte ein MEF2-Reporterkonstrukt in Chondrozyten aktiviert werden und eine Überexpression einer dominant-negativen Variante von Mef2c hemmte ein *Col10a1* Reporterkonstrukt.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerätename	Hersteller
Zentrifugen und Rotoren	
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplattenzentrifuge 5416	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplattenzentrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg
L7-55 Ultracentrifuge	Beckman, Palo Alto, USA
Rotor SW 32 Ti	Beckman, Palo Alto, USA
Avanti J-E Centrifuge	Beckman Coulter, Palo Alto, USA
Rotor JLA 16250	Beckman Coulter, Palo Alto, USA
RC-5 Superspeed Centrifuge	Sorvall, Newton, USA
Rotor GSA	Sorvall, Newton, USA
Rotor SS34	Sorvall, Newton, USA
Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Rotor BS4402/A	Heraeus, Hanau
Minifuge RF	Heraeus, Hanau
Rotor BS4402/A	Heraeus, Hanau
Thermocycler	
Geneamp 2700 PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Geneamp 9700 PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
PCR-Express Gradient	Hybaid, Basingstoke, Großbritannien
PTC-200	MJ Research, Watertown, USA
ABIPrism HT 7900 Realtime Cycler	Applied Biosystems, Foster City, USA

Luminometer

MicroBeta TriLux 1450	Wallac, Turku, Finnland
-----------------------	-------------------------

Mikroskopie

Mikroskop DMR	Leica, Bensheim
Kamera AxioCam HRc	Zeiss, Göttingen
Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Göttingen
Kamera AxioCam MRm	Zeiss, Göttingen
Mikroskop DMIL	Leica, Bensheim
Stereomikroskop MZ6	Leica, Bensheim
Stereomikroskop MZ7-5	Leica, Bensheim
Kamera AxioCam MRc5	Zeiss, Göttingen
Kaltlichtquelle KL1500 LCD	Leica, Bensheim
Software Axiovision 4.x	Zeiss, Göttingen

Histologie

Microtom Cool Cut HM355S	Microm, Walldorf
Kryotom H560	Microm, Walldorf
Einbettstation EC 350-1 & 2	Microm, Walldorf
Färberoboter TP1020	Leica, Bensheim

2.1.2 Chemikalien

Alle Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt werden, wurden in dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ eingesetzt und von den Firmen Merck KgaA (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) und Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen.

2.1.3 Lösungen und Puffer

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden alle Lösungen und Puffer nach Sambrook und Russell [2001] angesetzt.

2.1.4 Enzyme

Die Enzyme zur Modifikation von DNA (Restriktionsenzyme, T4 DNA-Ligasen, Polynukleotidkinase etc.) wurden von Fermentas (St. Leon-Roth), New England Biolabs (Frankfurt) und Promega (Mannheim) bezogen.

2.1.5 Bakterien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

E. coli Top10 (Invitrogen)

E. coli XL1-Blue (Stratagene)

2.1.6 Kits

Folgende Kits wurden in dieser Arbeit verwendet:

Kit	Hersteller
omnipure-OLS	Omni Life Science, Hamburg
plasmiddna-OLS	Omni Life Science, Hamburg
Invisorb PCRapace	Invitek, Berlin
Gel-Out	A&A Biotechnology, Gdynia, Polen
Plasmid Mini	A&A Biotechnology, Gdynia, Polen
Plasmid Midi Nucleobond PC 100	Macherey-Nagel, Düren
Plasmid Maxi Nucleobond PC 500	Macherey-Nagel, Düren
TaqMan Reverse Transcription Reagents	Roche/Applied Biosystems, Branchburg, USA
BigDye Terminator v3.1 Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Dual-Glo Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
BCA Protein Assay Kit	Pierce/Thermo Fisher Scientific, Bonn

2.1.7 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der MWG Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert und per HPSF aufgereinigt.

Sondenprimer

Zur Untersuchung der Expressionsdomänen ausgewählter Gene wurden *in situ* Hybridisierungen (ISH) mit Digoxigenin (DIG) markierten RNA-Sonden auf Gewebeschnitten durchgeführt. Als Hybridisierungsbereich dieser Sonden wurden nach Möglichkeit 450–600 bp im 3' untranslatierten Bereich (3'-UTR) des zu untersuchenden Gens ausgewählt. Dies sollte eine Kreuzreaktion mit konservierten homologen Bereichen in anderen Genen verhindern. Die Vorlagen für die Sonden wurden aus cDNA mittels PCR amplifiziert. Im Folgenden sind die Primer für die Herstellung der in dieser Arbeit erstmalig verwendeten Sonden aufgeführt. Neben den aufgeführten gab es in der Arbeitsgruppe noch eine Vielzahl an Sonden zur Untersuchung von Markergenen der Skelettentwicklung, die in dieser Arbeit ebenfalls eingesetzt wurden. Diese Sonden und die Primer zu deren Herstellung sind hier nicht aufgeführt. Es wurden ausschließlich Sonden zur Detektion von Genen der Maus eingesetzt.

Tabelle 2.1: Sondenprimer für Kandidatengene. Diese Sonden dienen der Untersuchung von Kandidatengenen, die in der Runx2^{-/-}-Maus gegenüber dem WT reduziert waren.

Sondenprimer für Kandidatengene		
Gensymbol	5' Primer	3' Primer
Akp2	GCAACTTCCAGCAGGAACAG	GAGAGCCACTTCAGTGAAGG
Aldh1a3	TGCCTGGAGAGGAACTCTTA	ACCACCATGGCTACCACCAACGGG
Atbf1	CAGCGCGACTGTAGATGTCA	TCCGTACACCTCAGGAGGAA
Atp6v0d2	AGGAAGCAGGTTATACGCTTAGA	GTGAAGCAGAGCAAGCATAG
BG074158	ACGTGGATCTGAGAGTCAAG	ATGACCATCGACCACATAGG
BM120331	TGGAGGCTGCGAAGTCAGGA	CTCAGGCAGCTGGTACTGT
Car3	CTGCGAGGAGTGCATTGTGT	AGCGTGGTAAGGTCCGCATA
Cdkn1a	GTCGGCAGGAGGCATATCTA	CCTTCTCGTGAGACGCTTAC
Cfh	AGTGGTCTGAGCCACCAACA	CCTTTATCCACTGTAATCAGGACC
Col22a1	CTCCTTGCTGCCTTAATTG	CAGCACCAGCTTGTTTCATAG
Dmp1	GTGACTGAGGCTCTGGTACA	CTCATCATTGAGGCCAGGTT
Edg7	TCACCATCTTGCCACCATTG	TACCATAGTGCCTGCCTTGA
Fabp3	CCTTTGTGCGTACCTGG	GGTCTGCTTTATTGACC
Fosl2	CAGTGCCTGTGGTTACAGA	CTGGAGTTGGCCAGGAGAAT
Gadd45g	GACCTTGGTCTGATCGACTT	CTTCCACGATAGCGTCTTT
Gcnt2	CAGGATGGCCTTGAACCTT	TGCTGGAGATGGAACCTAAC
Gnas	GCAACAGCGATGGTGAGAAG	AGGCGGTTAGTCTGGTTGTC
Grb14	TAGAAGCGCTGCAATTCTC	ACAGCCATCCTAGCACAGTA
Hhip	AATGCCTGAGGAATGCAGAG	GCCAACATACATGCTGAGAG
Ifitm5	TAGGAAGACACGGCGCTGGA	GGACAGGCTCGGAACCTTA
Il2rg	AACATCAATCCTTTGATGGAACCT	ATCATAGGTAGAAAAAGGGAGGGAG
Irx5	ACTCTGGTGCGGTATCC	TCTAAGCGTATAACCTGCTTCCT
Jarid2	TTGGAAGCTGCCGTACTCT	CTCGAACGGATGCATAGTGA
Kremen1	TCTCTGCTGCCAACTACCAT	GCTCTTGATCGCTGAGTTAC
Loxl2	CATGATGGCTCATGCCTGTA	CTGTGCAGAGCACAGATGAT
Loxl4	GCAGGCCAGTCTCTTAGAAT	GTAACGGTGAAGCAGGTTAG
Lztlf1	GGTGCCTGTGATGGTATGA	ACTGAAGAGCGGTCCAACCTG
Mef2c	TATGTGCCGTGTGTGGAA	AGGTAGGTATGGTCTCTCT
NaCT/Slc13a5/Al615325	CCTGCTGTCAATACCTTGATCTT	GATCTTCTTGGGGTGTGACAT
Ninj2	CTCCTGCAAGTGGTCATTAG	GCCTTAACAGACCCGAGTTAC
Panx3	CCGCTCTAGAAGTCATGC	GGAGAATCGGTTCTATCC
Pde8a	GACCACATCTACACCATAGC	CTCTGAGAAGGCACCTGTAA
Phospho1	GCTCCTGCTTCGAGGTTATT	CACATCTTCAGCACCTGTTG
Ptp4a1	CCAATGTGTCGGCTTACTGA	ACAGAGTGAGCAGGCAGATA
Ptprz1/AW120652	ATTGTTTACTTCTTGACCTGAC	CAAGTACACTAGAAAACCTCACA
Rras2	AGGCTGCTTCAGACGTTATC	GACAGGAACCATCCACTCTT
Rrbp1	GCCTTGACCAAGGAGAATG	GGAGCCAGCAGTCAGTTCTA
Satb2	ATACCTGCGGCTCTACCGTC	CCAGCCTGTAGCCTCCACTT
Sdc2	CGTCTGCTCTCAGTGACTAT	CAACTCCTCCTCTGGCATT
Siah2	CCTGTCTGGCACTGATGAAT	GTCATCCGTACTATGGTGAG
Slc9a2	AGAGTCAAGCCACTGATTCC	AAGAGCAGCCTGAACCTCAT
SP7	CTTCCATCTGGCCTCACATC	CTCTCCAGCTCACTGTACTT
Sphingomyelinase	CCACTGTCTGTCCTCGGTTG	GGGCTAAAGGAGATGGTAAGGT
Tmem16a/Al121797	CAGACCTGGGGTCAGAAACA	CAAGTACACCACTAGAAAACCTCACA
Tnfaip2	AGCCAAGATCGCACAGATGA	CACCAACAGGAAGCCAGTAA
Unc5b	AGTAGGAGACGGTGAAGGA	CGCTGACTTCTGAGGCTCAT

Tabelle 2.2: Primer zur Herstellung von in-situ Sonden zur Detektion der Expression von Genen, die nicht als mögliche Kandidatengene geführt wurden. Es handelte sich hierbei um Gene, die entweder bekannte Markergene der Skelettentwicklung sind und für die es in der Arbeitsgruppe noch keine Sonden gab oder um Gene, die im Laufe der Arbeit bezüglich ihrer Expression näher untersucht werden sollten.

Primer für weitere ISH-Sonden			
Genname	Gensymbol	5' Primer	3' Primer
Acid phosphatase 5, tartrate resistant	Acp5	GCGCTGCCTTGTC AAGAACTT	GGATCAGTTGGTGTGGGCATAC
Calcineurin binding protein	Cabin1	AGGAGACCAAGCAGAAGCTG	GAGCTGGGCTCCTGATAATG
Calcineurin A α	Ppp3ca	GCCTCTGAAGGTAGCTTGTT	GCCATTGTCTGACAGGAGTA
Calcineurin A β	Ppp3cb	GGGTTGACCAAGGTGATGAT	ACACCAACTGGGTTTCTCAG
Calcineurin A γ	Ppp3cc	AGGAGCTACTACAGGTCGAA	CAGGGCTTTCTTTCCATGGT
Calcineurin B α	Ppp3r1	GCCTCATGAAGCCAATAAG	GCAACAGCACTGAACTAGAC
Calreticulin	CRT	GCAGGTTTCAGATCTGGGGTA	TCCTCCCAGAGAAGGAGACA
C-terminal binding protein 1	Ctbp1	ATGGACCCTGCTGTGGTGCA	TGACTTGCTGAATGCTCCCTCA
Distal-less homeobox 5	Dlx5	CAGCTTTCAGCTGGCCGCTT	CGGGGCTCTCTGAAATGCAATAAC
Histon deacetylase 4	Hdac4	CCCGAAGCTGCTGTTCTCTCCT	GGAGACTGTGGGATTGTGGGTAAG
Histon deacetylase 5	Hdac5	CATCGCTGAGAACGGCTTTACT	GAAGCGGCACTGCTATGAGC
Histon deacetylase 7	Hdac7	GGTTTCAGAACAGATCGCGCT	AATAGGGGACCCCTTGCTCCTC
Histon deacetylase 9	Hdac9	GCTGAGGTCTGTGAGTACAA	CCATACATCGCAGCATCTGA
Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	Hif1a	TGGTGGCTCAGCAGTCTATT	CGCTTCATGATCCAGGCTTA
Integrin binding sialoprotein	lbsp	CCCCATTCTGTCTTATCATCTGGC	CCTGCTCCTTAAACCCACACTCAT
Myocyte enhancer factor 2A	Mef2a	GCAGTGAAGTCCCTACATA	GCAATAGACCCATGCCAAGT
Myocyte enhancer factor 2B	Mef2b	CCTCTGTACTGGCGACTGA	GGCTGGAGGAACCTCTTGGA
Myocyte enhancer factor 2D	Mef2d	CCTCCTTACCAGCCTTCAGT	TATCCAGCCGCATCCTCTTC
Periostin	Postn	AAACCCAGAGGCCAGACCAC	CAGGAAACCCACATTGCATGAG
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a	Tnfrsf11a/Rank	GCGGGCAGGTGATGAACTTC	GCAGGACACCAACGTTGCAA

Primer für die quantitative RT-PCR

Tabelle 2.3: Primer für die quantitative RT-PCR (Maus). Diese Primer wurden mit der Online Software Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) generiert. Dabei wurden folgende Parameter als notwendig erachtet: die Überbrückung von Exongrenzen, eine Produktgröße von 80–150 Basenpaaren, Annealingtemperaturen von 60 °C, nicht mehr als 3 direkte Wiederholungen einer Base, Länge der Primer zwischen 19–25 Basen und nach Möglichkeit ein G oder C am 3'-Ende des Primers (G/C-Clamp)

qRT-PCR Primer (Maus)			
Genname	Symbol	5' Primer	3' Primer
Acid phosphatase 5, tartrate resistant	Acp5	TCCTCGGAGAAAATGCATCAT	GCAGTTAAGCTCCTGGACCAA
Alkaline phosphatase	Akp2	GCCATGACATCCCAGAAAGAC	AAGGGCTTCTTGCCGTGTC
Kollagen Typ I	Col1a2	CCCTACTCAGCCGTCTGTGC	GGGTTCCGGGCTGATGTACC
Distal-less homeobox 3	Dlx3	AGTATCTGGCCTTGCCTGAG	GCGGTTCTGGAACCAGATTT
Distal-less homeobox 5	Dlx5	CAAGGCTTATGCCGACTACG	CCATTACCATCCTCACCTC
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GapDH	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	TCTTCTGGGTGGCAGTGATG

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortgesetzt von der vorherigen Seite

qRT-PCR Primer (Maus)			
Genname	Symbol	5' Primer	3' Primer
Indian hedgehog	Ihh	GCCGACCGCCTCATGAC	CATGACAGAGATGGCCAGTGA
Myocyte enhancer factor 2A	Mef2a	AACGAGCCTCATGAAAGCAG	AGCATCAGGGCTCTCACAAAC
Myocyte enhancer factor 2B	Mef2b	TCTGGGTAGCTTTGCCCTTCT	GTCTACAGCGTCCCTCGTTG
Myocyte enhancer factor 2C	Mef2c	GGGACGAGAGAGAGAAGAAACAC	CGCTCAGCTCATAAGCCTTC
Myocyte enhancer factor 2D	Mef2d	CAGCGAATCACTGATGAACG	AGCACACTCAGCTCGTAGGC
Osterix	SP7/Osx	GAGGCCTTTCTGTGCAACT	TTCTTCTCCCGGTGTGAGT
Parathyroid hormone receptor 1	Pthr1	CGAGCATCTTCTGTGAAGGAC	AAGAAGGTCACGGCCACAC
Receptor activator of NF-kappa-B ligand	Rankl	CTGCAGCATCGCTCTGTTC	TGCAGGAGTCAGGTAGTGTGTC
Runt-related transcription factor 2	Runx2	TGGCCACTTACCACAGAGC	GCCCTAAATCACTGAGGCG
Sclerostin	Sost	AACAACAGACCATGAACCG	GTCAGGAAGCGGGTGTAGTG
Vascular endothelial growth factor	Vegf	GCAGACCAAGAAAGACAGAACA	ACCGCCTTGGCTTGTCCAC

Tabelle 2.4: Primer für die quantitative RT-PCR (Huhn). Die Primer wurden ebenfalls mit Primer 3 und den in Tabelle 2.3 angegebenen Bedingungen generiert.

qRT-PCR Primer (Huhn)			
Genname	Symbol	5' Primer	3' Primer
Alkaline phosphatase	Akp2	ACCAGAATGTGGCCAAGAAC	GGCAACGTATGGGAACCTGT
Bone morphogenetic protein 2	Bmp2	GGACCTCTATCGCCTGCAC	CCCCTTGTTTCTGGCAGTTC
Kollagen Typ II	Col2a1	CGACATCAAACCTCTGCCATC	TGGTTCGGGTCAATCCAG
Kollagen Typ X	Col10a1	GGGCCACCACACTTTCTACC	AGGACCTGGTTGCTCCTTTG
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GapDH	TGTCCTCTCTGGCAAAGTCC	ACAGTGCCTTGAAGTGTCC
Indian Hedgehog	Ihh	GGCTTTGACTGGGTCTACTACGA	CAGCCGAGTGCTCTGACTTG
Integrin binding sialoprotein	Ibsp	GTCCCATGCAGGTAAGTCAAG	CCTCATCACTGCTCCTCATCG
Matrix metalloproteinase 13	Mmp13	CCTGATGATGATGTGCAAGG	ACCAGCATTTCTCCACGAAG
Myocyte enhancer factor 2A	Mef2a	GTTGTGAGAGCCCTGATGCT	GAAGTTCTGAGCAGGCAAGC
Myocyte enhancer factor 2B	Mef2b	GGCCTATGCCAATGTTGC	GCTGTTGCTGCAGAGAAGG
Myocyte enhancer factor 2C	Mef2c	CACCTGGCAGCAAGAATACA	ATCCCTTGCCTGGTAGAGT
Osteocalcin	Ocn	CTGCTCACATTGAGCCTCTG	GGGAGATGAAGGCTTTAGCA
Osteopontin	Opn	GCATTTCTTTGCTTGTCTTATC	GGCATGCTGCCTGGATT
Parathyroid hormone receptor 1	Pthr1	AACTGAAGCACCTCCAGCAG	TGGTTGCCAGGAAGTAGAGG
Runt-related transcription factor 2	Runx2	GTGGCCAGATTCAATGACCT	CCATCCACCGTCACCTTTAT
Sclerostin	Sost	GTCTGCGTCCCTCATCAAAT	CCTGGTTCATCGTGTGTTG
SRY-box containing gene 9	Sox9	GTACCCGCATGTCACAAC	GACGCTTCTCGCTCTCATTC

Mutageneseprimer

Tabelle 2.5: Mutageneseprimer. Mutationen wurden mittels Fusions-PCR in die Zielsequenzen eingebracht. Die mutierte Sequenz ist in fetten Kleinbuchstaben notiert. *Die Primer Mef2cT293A und Mef2cT293E beinhalten 2 Mutationen, da sie zur weiteren Mutagenese bereits an Position T300 mutierter Varianten eingesetzt wurden. So konnten die Varianten Mef2cAA & Mef2cEE generiert werden.

Mutageneseprimer		
Mutation	Richtung	Sequenz (5' → 3')
Mef2cT20A	vorwärts	ATGAGCGTAACAGACAGGT ggct TTTACGAAGAGGAAATTTGG
	rückwärts	CCAAATTTCTCTTCGTA aaagc CACCTGTCTGTTACGCTCAT
Mef2cT293A*	vorwärts	AGTCGGCTCAGTCATTGGCT gca CCGGTGGTTTCCGTAG Agca
	rückwärts	tgc TGCTACGGAAACCACCG gtgc AGCCAATGACTGAGCCGACT

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortgesetzt von der vorherigen Seite

Mutageneseprimer		
Mutation	Richtung	Sequenz (5' -> 3')
Mef2cT293E*	vorwärts	AGTCGGCTCAGTCATTGGCT gag CCGGTGGTTTCCGTAGC agag
	rückwärts	ctc TGCTACGGAAACCACCGG ctc AGCCAATGACTGAGCCGACT
Mef2cT300A	vorwärts	CCCCGGTGGTTTCCGTAGC Agca CCTACTTTACCAGGACAAGG
	rückwärts	CCTTGTCCTGGTAAAGTAGG gct TGCTACGGAAACCACCGGGG
Mef2cT300E	vorwärts	CCCCGGTGGTTTCCGTAGC Agag CCTACTTTACCAGGACAAGG
	rückwärts	CCTTGTCCTGGTAAAGTAGG ctc TGCTACGGAAACCACCGGGG
Mef2cS387A	vorwärts	ACGCGCCACGAGGCGGGGAG Ggca CCTGTTGACAGCTTGAGCAG
	rückwärts	CTGCTCAAGCTGTCAACAG Gtgc CCTCCCCGCCTCGTGGCGCGT
Mef2cS387E	vorwärts	ACGCGCCACGAGGCGGGGAG Ggag CCTGTTGACAGCTTGAGCAG
	rückwärts	CTGCTCAAGCTGTCAACAG Gctc CCTCCCCGCCTCGTGGCGCGT
Mef2cS412A	vorwärts	CCATTGGACTCACCAGAC Tgcg CCGGACGAAAGGAAAAGTCC
	rückwärts	GGACTTTCCTTTTCGTCCG Ggca AGGCTGTTGAGTCCAATGG
<i>Pthr1</i> MefMuta	vorwärts	GTTGCCACTGCCGCGGAG ctaccagta ACAGCCTGGTCGCCCC
	rückwärts	GGGGCGACCAGGCTG tactggtag CTCCGCGGCAGTGGGCAAC
<i>Ihh1238</i> MefMuta	vorwärts	AAACAAACGGCGCG Gctcccgttg GCGCGCGGCAGCCGG
	rückwärts	CCGGCTCGCCGGCG Ccaacgggagc GCCGGCCCGTTTGT

2.1.8 Vektoren

RCAS Konstrukte

In Zusammenarbeit mit Jochen Hecht wurde in die *Clal*-Schnittstelle des RCASBP(A) Plasmids [Hughes et al., 1987] ein Oligomer mit der Sequenz

ATCGATTCTAGAGCGGCCGCACGTGCAGCCGATTAAATCGAT

kloniert. Dieses Oligomer trägt eine *Swal/Smil*-Schnittstelle (ATTTAAAT), die einen Verdau mit glatten Enden und anschließend das Anhängen eines Nucleotids (hier: Thymin, T) ermöglicht (siehe 2.4.6). Hierdurch kann man PCR-Produkte mit einem Adenosin (A)-Überhang, wie sie bei Amplifikationen mit der *Taq*-Polymerase entstehen, direkt in das Plasmid klonieren. Diese sogenannte T/A-Klonierung ist mit höherer Effizienz möglich als eine Klonierung über glatte (blunt) Enden. Falls nicht gesondert erwähnt, wurden alle RCAS-Konstrukte mit diesem RCASA-T/A Plasmid konstruiert. Die kodierenden Sequenzen, die in den RCAS kloniert werden sollten, wurden alle unter Verwendung der *Phusion*-Polymerase amplifiziert und anschließend durch die *Taq*-Polymerase mit einem Adenosin (A) Überhang versehen. In der Tabelle 2.6 sind alle im Zuge dieser Arbeit klonierten RCAS-T/A Konstrukte aufgeführt. Das RCAS-Runx2 Plasmid wurde von Sigmar Stricker, der RCAS-PKArab von Mateusz Kolanczyk und der RCAS-Sost von Kati Süring zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2.6: Im Lauf dieser Arbeit generierte RCAS-T/A Konstrukte mit nicht manipulierten Gensequenzen und hierzu benutzte Primer. Spezielle Mutanten oder Fusionsversionen sind gesondert aufgeführt. Alle 5'-Primer tragen ACC ACC als Standardkozaksequenz zur effizienteren Initiierung der Translation

RCAS-T/A Konstrukte				
RefSeq	Gen	Herkunft	5' Primer	3' Primer
NM_010174.1	Fabp3	Maus	ACCACC- ATGGCGGACGCCTTTGTCGG	TCACGCCTCCTTCTCATAAGTCC

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortgesetzt von der vorherigen Seite

RCAS-T/A Konstrukte				
RefSeq	Gen	Herkunft	5' Primer	3' Primer
	GFP	Qualle	ACCACCATGGTGAGCAAGGGCGA	TTACTTGACAGCTCGTCCATGCC
NM_053088.2	Ifitm5	Maus	ACCACC- ATGGACACTTCATATCCCGG	TTAGTTATAGTCCTCCTCAT
NM_018826.2	Irx5	Maus	ACCACC- ATGTCCTACCCGCAGGGCTA	TTAATGTCGGACATACCTTTCTTC
NM_025282.2	Mef2c	Maus	ACCACCA- TGGGGAGAAAAAAGATTGAGA	TCATGTTGCCCATCCTTCAGA
NM_016718.2	Ninj2	Maus	ACCACC- ATGGAGTCAGACCGAGAAAC	TCAAATAGGATTGCTGGAGG
NM_172454.2	Panx3	Maus	ACCACC- ATGTCGCTCGCACACTGC	CTATGCGTGTTTCATCATATGTATG
	PKA	Hamster	GCCACCATGGGCAACGCCGCCG	TCAAAACTCAGTAACTCCTTGC- CACACTTCTC
NM_008970.2	PTHrP	Maus	ACCACC- ATGCTGCGGAGGCTGGTTGAGC	TCAATGCGTCCCTTAAGCTGG
NM_139146.2	Satb2	Maus	ACCACC- ATGGAGCGGCGGAGCGAGA	TTATCTCTGGTCCGTTTCGGC
NM_021491.3	Smpd3	Maus	ACCACC- ATGGTTTTGTACACGACCCC	CTATGCCTCCTCTTCCCCTG
NM_205188.1	Sox2	Huhn	ACCACC- ATGTACAACATGATGGAAACCG	TCACATATGTATAGAGGGAGT- GTG
NM_204281.1	Sox9	Huhn	ACCACC- ATGAATCTCCTAGACCCCTT	TTAAGGCCGGGTGAGCTGCG

Eukaryotische Expressionsplasmide

pcDNA3.1 N-Flag mit N-terminalem Flag-Peptid, pcDNA3.1 N-HA mit N-terminalem HA-Peptid – beides laborinterne Modifikationen des pcDNA3.1 von Invitrogen, Karlsruhe; pRL-CMV (Promega, Mannheim); pCMV-Runx2 von Jochen Hecht; CMV-Sp1 (Addgene plasmid 12097) über Addgene von Robert Tjian; pMT3-p38 (Addgene plasmid 12658) von John Kyriakis über Addgene; MKK6EE von Mateusz Kolanczyk.

Die Klonierung der verschiedenen Mef2c Varianten in den pcDNA3.1 erfolgte, nachdem die MCS mitsamt Flag-Sequenz des pcDNA3.1 N-Flag durch Verdau mit *PmeI* herausgeschnitten wurde. Der Vektor wurde anschließend T-getailt gefolgt von einer T/A-Klonierung der jeweiligen Mef2c-CDS. Zur Amplifikation der Sequenzen wurden die in Tabelle 2.6 angegebenen Primer benutzt.

Reporterplasmide

pGL3 basic (Promega, Mannheim), pGL4600Intl und pGL1000Intl (mit 4,6 kb bzw. 1 kb Promotorbereich des murinen *Col10a1* Promotors in pGL2 basic) von Prof. Klaus von der Mark [Gebhard et al., 2004]; BSP-Luc (2,1 kb Promotorbereich des humanen *IBSP/BSP2*-Gens in pGL3 basic) von Marian F. Young [Barnes et al., 2003]; pGLOCN(mOG2) von Jochen Hecht; pGL3Ihh (0,2 kb–1,3 kb Fragmente des murinen *Ihh* Promotors) von Toshihisa Komori [Yoshida et al., 2004]; pGL4-SBE von Stephanie Renninger.

Der pGL3 Vektor enthält das modifizierte Luciferase Gen (*luc+*) des Nordamerikanischen Glühwürmchens (*Photinus pyralis*). Durch Modifikationen hat der pGL3 Vektor eine höhere

Expression der Luciferase bei geringerem Hintergrund, so daß auch schwierig zu transfizierende Zellen für einen Luciferase Assay einzusetzen sind.

sonstige Plasmide

pTA1 und pTAGfp von Jochen Hecht, pBluescript SK (-) (Promega, Mannheim), pCRII-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe)

2.1.9 Software

Zur Verwaltung, Darstellung und Modifikation von DNA- und Proteinsequenzen wurde das Softwarepaket Vector NTI in der Version 10.3.0 (Invitrogen) genutzt. Zur Identifikation potentieller Transkriptionsfaktorbindestellen wurde das online verfügbare Programm MAPPER [Marinescu et al., 2005, <http://bio.chip.org/mapper/>] benutzt. Primer wurden mit dem im Internet verfügbaren Programm Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) generiert.

2.2 Hühner

Befruchtete Hühnereier wurden von Lohmann Tierzucht GmbH (Cuxhaven) bezogen und in einem BSS300 Brutschrank (Ehret GmbH & Co. KG, Emmendingen) bei 36,5 °C und einer Luftfeuchte von 70 % für den angegebenen Zeitraum bebrütet.

2.3 Verwendete Mausstämme

Die Haltung und Zucht aller verwendeten Mäuse erfolgte in dem Tierhaus des MPI für Molekulare Genetik unter Leitung von Dr. Lutger Hartmann.

2.3.1 *Mef2c^{loxP}* Mäuse

Die *Mef2c^{loxP}* Mäuse [Vong et al., 2005] wurden freundlicherweise von John J. Schwarz (Center for Cardiovascular Sciences, Albany Medical College, Albany, USA) zur Verfügung gestellt. Die Genotypisierung erfolgte über PCR mit den Primern *Set3for* (GCTGCAACATGCTGGTTAC) und *Set3rev* (CAAGTGCATGGCACAGACTA) und folgendem PCR Programm:

$$\left. \begin{array}{l} 94\text{ °C} \quad 5' \quad \left. \vphantom{\begin{array}{l} 94\text{ °C} \quad 5' \end{array}} \right\} 1\times \\ 94\text{ °C} \quad 5' \quad \left. \vphantom{\begin{array}{l} 94\text{ °C} \quad 5' \end{array}} \right\} 1\times \end{array} \right\} 38\times \quad \left. \begin{array}{l} 94\text{ °C} \quad 30'' \\ 59\text{ °C} \quad 30'' \\ 72\text{ °C} \quad 3' \end{array} \right\} 38\times \quad \left. \begin{array}{l} 72\text{ °C} \quad 7' \\ 4\text{ °C} \quad \infty \end{array} \right\} 1\times$$

Ein Wildtyp Allel resultierte in einem PCR Produkt mit einer Länge von ca. 1000 bp, ein gefloxtes Allel ergab ein Produkt von 1200 bp Länge.

2.3.2 Cre Mäuse zur Generation konditioneller Knockouts

In Tabelle 2.7 sind die verwendeten Cre Mausstämme aufgeführt, die zur Generation konditioneller Knockouts durch Verpaarungen mit der *Mef2c^{loxP}* eingesetzt wurden. Die Detektion des *Cre*-Transgens zur Genotypisierung erfolgte bei allen Stämmen per PCR mit den Primern *CreF* (GAGTGATGAGGTTTCGCAAGA) und *CreR* (CTACACCAGAGACGG) und folgendem PCR Programm:

$$\left. \begin{array}{l} 94\text{ °C} \quad 3' \end{array} \right\} 1\times \quad \left. \begin{array}{l} 94\text{ °C} \quad 30'' \\ 55\text{ °C} \quad 30'' \\ 72\text{ °C} \quad 1' \end{array} \right\} 35\times \quad \left. \begin{array}{l} 72\text{ °C} \quad 5' \\ 4\text{ °C} \quad \infty \end{array} \right\} 1\times$$

Das Vorhandensein des *Cre*-Transgens resultierte in einer Produktbande mit einer Größe von ca. 650 bp.

Tabelle 2.7: In der Arbeit verwendete Cre Mäuse zur Generation konditioneller Knockouts von *Mef2c*

Mausstamm	Expressionsregion(en)	Herkunft/Referenz
<i>Prx1Cre</i>	Extremitätenknospe	Cliff Tabin, Logan et al. [2002]
<i>Col1Cre</i>	Osteoblasten und Osteozyten	Dacquin et al. [2002]
<i>Col2Cre</i>	ruhende und proliferierende Chondrozyten	Gerard Karsenty, Ovchinnikov et al. [2000]
<i>Col10Cre</i>	Hypertrophe Chondrozyten	Danny Chan, Hongkong

2.4 Allgemeine Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von Plasmid DNA

Plasmid DNA wurde mittels folgender Kits nach Anweisung der Hersteller isoliert: Minis mit dem Plasmid Mini Kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Polen), Midis und Maxis mit den entsprechenden Nucleobond Kits (Macherey & Nagel, Düren).

2.4.2 Isolierung von genomischer DNA

Genomische DNA zur Genotypisierung der verwendeten Mäuse wurde aus Biopsiematerial isoliert. Hierzu wurden die Biopsien in 0,5 ml Lysepuffer (0,85 % SDS; 17 mM EDTA; 170 mM NaCl; 17 mM Tris/HCl, pH 7,5; 200 µg/ml Proteinase K (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)) bei 55 °C für mindestens 2 Stunden unter Schütteln verdaut. Durch Zugabe von 0,5 Volumen 5 M Natriumchloridlösung und Zentrifugation (10 Minuten, 7000 RPM, 4 °C) wurden die Proteine ausgefällt und die DNA wurde mit eiskaltem 96–100 % Ethanol aus dem Überstand gefällt. Nach einem Waschschrift mit 70%igem Ethanol wurden die DNA Pellets getrocknet und in 100–200 µl bidest resuspendiert. Jeweils 1 µl dieser Lösung wurde in den Genotypisierungs PCR eingesetzt.

2.4.3 Isolierung von RNA

Isolierung von Gesamt RNA aus Zellen

Gesamt RNA aus Zellen wurde mittels PEQGold Trifast (Peqlabs, Erlangen) nach Anweisung des Herstellers isoliert. Die Zellen wurden nach einem Waschschrift mit DPBS in Trifast lysiert – pro 24well Well wurden 250 µl eingesetzt. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 0,2 ml Chloroform pro ml Trifast hinzugegeben, gemischt und 15 Minuten bei 4 °C und 13000 RPM zentrifugiert. Aus dem wässrigen Überstand wurde die RNA mit dem gleichen Volumen an Isopropanol gefällt und anschließend einmal mit 70 % Ethanol gewaschen. Das trockene RNA-Pellet wurde in DEPC-Wasser aufgenommen, die Konzentration bestimmt und bei -80 °C gelagert.

Isolierung von Gesamt RNA aus Geweben

Gewebe tierischen Ursprungs wurde zunächst in eiskaltem PBS isoliert und anschließend in RNAlater (Ambion/Applied Biosystems, Austin, USA) präpariert. Nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurde das Material bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Weiche Gewebe wurden mit einem Ultra Turrax T8 (IKA Labortechnik, Staufen) homogenisiert, mineralisiertes Gewebe wurde unter Stickstoffkühlung mit einem Metallmörser zu Pulver verarbeitet. Das aufgearbeitete Gewebe wurde anschließend in PEQGold Trifast aufgenommen und zur Lyse der Zellen 10 Minuten bei RT inkubiert, bevor 0,2 ml Chloroform pro ml Trifast hinzugegeben wurden. Nach Mischen wurden die Suspensionen 15 Minuten bei 4 °C und 13000 RPM zur Ausbildung von zwei Phasen zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die RNA wurde durch Zugabe des gleichen Volumens an Isopropanol und anschließender Zentrifugation für 10 Minuten bei 4 °C mit 13000 RPM gefällt. Der Überstand wurde verworfen und die RNA mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach Trocknung wurden die RNA-Pellets in DEPC-Wasser aufgenommen, die Konzentration bestimmt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.4.4 Herstellung von cDNA

Herstellung von cDNA für die nicht-quantitative RT-PCR

Die cDNA für alle nicht-quantitativen RT-PCRs wurde mit SuperScript II Reverser Transkriptase (Invitrogen) nach Anleitung des Herstellers je nach Verwendungszweck mit Oligo(dT) oder random Hexamer-Primern hergestellt. Hierbei wurden in der Regel 1 µg RNA eingesetzt.

Herstellung von cDNA für die quantitative RT-PCR

Für die quantitative RT-PCR wurde die cDNA unter Verwendung der 'TaqMan Reverse Transcription Reagents' (Applied Biosystems, Branchburg, USA) nach Anleitung des Herstellers synthetisiert.

2.4.5 PCR

PCR-Amplifikationen von Expressionskonstrukten erfolgten mit der Phusion Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland) nach den Angaben des Herstellers, Routine PCRs wurden mit der *Taq* Polymerase durchgeführt.

nicht-quantitative RT-PCR

Zur Generation von Expressionskonstrukten, aber auch zur Klonierung von Sondentemplates wurden aus cDNA die gewünschten Amplikons per PCR amplifiziert und anschließend kloniert.

quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR dient zur Detektion von Transkriptmengen und erlaubt einen direkten Vergleich der Expressionsstärken gewünschter Zielgene. Eingesetzt wurden cDNAs, die mit dem „TaqMan Reverse Transcription Reagents Kit“ synthetisiert wurden. Die Reaktion erfolgte im 384er Format in einem ABIPrism HT 7900 Realtime Cycloer (Applied Biosystems, Foster City, USA), wobei 6 μ l 1:10 verdünnter cDNA, 3 μ l Primermix und 9 μ l SYBR-Green 2 \times Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) eingesetzt wurden. Normalisiert wurde jeweils auf die Expressionsstärke von GapDH. Soweit nicht anders vermerkt, wurden jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten eines repräsentativen Experiments aus einer Gruppe von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

2.4.6 Anhängen eines Nukleotids an ein DNA-Fragment (A/T-Tailing)

Für die T/A-Klonierung von PCR Produkten in Plasmide (z.B. 2.1.8) wurden einerseits die Plasmide mit einem T-Überhang, andererseits die PCR-Produkte – falls nicht mit der *Taq*-Polymerase amplifiziert – mit einem A-Überhang versehen. Hierzu wurden 25 μ l geschnittenes und aufgereinigtes Plasmid oder PCR-Produkt mit 3 μ l 10 \times PCR Puffer, 1 μ l *Taq*-Polymerase und 1 μ l 12,5 mM dTTP oder dATP vermischt und 15 Minuten (A-tailing) bzw. 90 Minuten (T-tailing, weniger effizient) bei 72 °C in einem Thermocycler inkubiert.

2.4.7 Klonierung von Expressionskonstrukten

DNA-Fragmente wurde mittels T4-DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon Roth) in Plasmide ligiert. Dies geschah entweder über spezifische Schnittstellen, T/A-Klonierung oder direkt über glatte Enden. Hierbei wurden in Ansätzen von insgesamt 20 μ l Volumen die zu inserierenden Fragmente nach Möglichkeit in dreifachem molaren Überschuss gegenüber dem jeweiligen Plasmid (25 ng pro Ansatz) eingesetzt. Weiterhin enthielten die Ligationsansätze 2 μ l T4-DNA-Ligase (1 U/ μ l), 2 μ l 10 \times Ligasepuffer und 2 μ l PEG4000. Die Ligationsreaktion erfolgte entweder bei 16 °C über Nacht oder für 30–60 Minuten bei RT.

2.4.8 Transformation von Bakterien

Plasmid-DNA wurde über die Hitzeschock Methode in chemisch kompetente Bakterien eingebracht. Hierzu wurden zu den Ligationsansätzen 100 µl Bakteriensuspension gegeben, die vorher langsam auf Eis aufgetaut wurde. Nach 10minütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension für 2 Minuten bei 42 °C in einem Wasserbad inkubiert, um einen Hitzeschock mit gleichzeitiger Aufnahme der Plasmide zu induzieren. Anschließend wurden die Bakterien für 10 Minuten auf Eis inkubiert, mit 300 µl LB-Medium versehen und für 40 Minuten bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation (4000 RPM, 1,5 Minuten) wurden 300 µl Überstand verworfen und die Bakterienpellets in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert und komplett auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert. Erfolgreich transformierte Kulturen wuchsen über Nacht bei 37 °C.

2.4.9 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit BigDye v3.1 (Applied Biosystems, USA) nach Vorgaben des Herstellers. Für einzelne Sequenzen wurde die PCR-Reaktion von Hand ange-setzt und im eigenen Labor durchgeführt. Der automatisierte Lauf im Kapillarsequenzierer (3730xl DNA Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, USA) erfolgte am Institut für Medizinische Genetik der Charité Berlin.

2.5 SDS-Polyacrylamidelektrophorese und Western Blot

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden Lysate von Zellen über denaturierende SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer Größe aufgetrennt. Standardmässig erfolgte dies mit 12%igen Trenngelen – die Sammelgele waren 5%ig. 30–50 µg Gesamtprotein pro Spur wurden mit 4× Ladebuffer im Verhältnis 3:1 vermischt, 5 Minuten bei 95 °C denaturiert, geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine per Semi-Dry-Blot Apparatur (Bio-Rad, Hercules, USA) bei 20 Volt für 45 Minuten auf eine PVDF-Membran (Immobilon, Millipore, Schwalbach) transferiert, die zuvor mit Methanol aktiviert wurde. Der Transfer erfolgte mit Transferpuffer, dem vor Gebrauch Methanol in einer Endkonzentration von 10 % zugesetzt wurden.

2.5.1 anti-phospho Mef2c Blots

24 Stunden vor der Proteinextraktion wurden Zellen in einer Dichte von 6×10^5 Zellen pro ml im 6 well Format ausgesät. Die Lyse der Zellen erfolgte mit 250 µl RIPA-Puffer (1 mM PMSF + Complete Mini Protease Inhibitoren (Roche, Mannheim) und 1 mM Natriumorthovanadat) pro 6-Well für 30 Minuten auf Eis. Vor der Lagerung bei -80 °C wurden die Lysate in Stickstoff eingefroren. Nach dem Auftauen der Lysate auf Eis wurden die Zellen durch Ultraschall aufgebrochen. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation pelletiert und die Proteinkonzentration des Überstands mittels des BCA Protein Assays (Pierce/Thermo

Scientific, Bonn) bestimmt. Die Membranen wurden mindestens 1 Stunde mit 5 % BSA in TBST (TBS, 0,05 % Tween20) blockiert, alle Waschschriffe erfolgten in TBST, der erste Antikörper (rabbit α Mef2c (phospho T300 oder phospho T20, Abgent, San Diego, USA) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in TBST 5 % BSA entweder 1h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach drei Waschschriffen für 3–5 Minuten mit TBST folgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (goat α rabbit HRP konjugiert, 1:5000 in TBST 5 % BSA für eine Stunde bei RT. Eine Detektion der Signale erfolgte nach 3 Waschschriffen mit TBST per Rotilumin-Lösung (Roth) und Exposition eines Röntgenfilms (Fujifilm).

2.5.2 Allgemeine Western Blots

Bei Western Blots mit nicht phosphospezifischen Antikörpern wurden die Membranen mit 5 % Milch/PBST blockiert und die Antikörper ebenfalls in dieser Lösung inkubiert. Alle Waschschriffe erfolgten in PBST. Eingesetzt wurde ein goat α Maus Mef2c Antikörper (E17, Santa Cruz) – Sekundärantikörper war ein Rabbit α goat IgG Peroxidase Conjugate (Sigma-Aldrich, Taufkirchen).

2.6 Histologie

2.6.1 Einbettung tierischen Gewebes in Paraffin

Einzubettende Gewebe wurden auf Eis in PBS präpariert, in eiskaltes 4 % PFA/PBS überführt und über Nacht fixiert. Handelte es sich um Gewebe später embryonaler Stadien oder älterer Tiere, so wurde es nach Präparation in 4 % PFA/EDTA/PBS überführt und je nach Alter für 24h bis 14 Tage mit regelmässigem Erneuern der Lösung fixiert und gleichzeitig dekalzifiziert. Anschliessend wurde das PFA durch zwei Waschschriffe mit eiskaltem DEPC-PBS für jeweils 5 Minuten ausgespült. In einer aufsteigenden Ethanolreihe (25 %, 50 % und 70 %) wurde das Gewebe manuell entwässert, bevor es automatisiert über weitere Ethanolschritte (70 %, 95 %, 100 %) und Xylol mit Paraffin durchtränkt wurde. Schlußendlich wurden die Gewebe in Paraffin eingebettet und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Einbettung von Hühnchen Micromass-Kulturen (chMM) in Paraffin

Zur histologischen Untersuchung von Micromass-Kulturen wurden 12 Tage alte Kulturen einmal mit PBS gewaschen, in eiskaltes 4 % PFA/PBS überführt und über Nacht bei 4 °C fixiert. Um das PFA auszuwaschen, wurden die Kulturen zweimal für 5 Minuten in DEPC-PBS gewaschen, bevor sie – wie in 2.6.1 beschrieben – entwässert und in Paraffin eingebettet wurden.

2.6.2 Kryo Einbettung tierischen Gewebes

Gewebe wurden in kaltem PBS präpariert und sofort in eiskaltes TissueTek O.C.T. (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) überführt. Die Einbettung erfolgte dann in speziellen Kammern mit einem Kupferboden und Wänden aus Acrylglas. Die Kammern wurden mit TissueTek gefüllt und auf einem per Trockeneis/Ethanol gekühlten (-20 °C) Alublock platziert, um eine wenige Millimeter dicke, gefrorene Schicht TissueTek zu bekommen, auf der dann das Gewebe ausgerichtet wurde. Die Kammern wurden anschließend bei -20 °C im Gefrierfach belassen, bis sie komplett durchgefroren waren. Die gefrorenen Blöcke wurden aus den Kammern gelöst und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.6.3 Gewebefärbungen

Deparaffinisierung und Rehydrierung von Geweben

Gewebeschnitte wurden bei 60 °C für 15 Minuten angebacken und dann zwei mal 15 Minuten in Ultraclear Xylol (J.T. Baker, Deventer, Holland) und zweimal 10 Minuten in 100 % Ethanol deparaffinisiert. In einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils 5 Minuten 75 %, 50 % und 25 % Ethanol) und schließlich 10 Minuten in bidest wurde das Gewebe rehydriert. Rehydrierte Gewebe wurden anschließend nach folgenden Protokollen gefärbt.

Hämatoxylin-Eosin Alcian blue Färbung

Hämatoxylin ist ein saurer Farbstoff und färbt alle basische Strukturen (DNA, Zellkern, ER) blau. Eosin dagegen ist ein basischer Farbstoff und färbt alle sauren Strukturen rot. Rehydrierte Schnitte wurden 30 Minuten in Alcian blue Lösung (1 % in bidest, pH 2,5) gefärbt und danach 5–10 Minuten in bidest gewaschen. Es folgte eine Färbung für 3–7 Minuten in Hämatoxylinlösung und ein anschließendes kurzes Spülen in bidest, bevor die Gewebe für 10 Minuten unter Leitungswasser gespült wurden. Die Eosin Färbung erfolgte für 10–20 Sekunden, es folgten 3 Waschschrte in bidest, bevor die Gewebe in einer aufsteigenden Ethanolreihe und Xylol dehydriert und mit Entellan eingedeckelt wurden.

von Kossa Färbung

Durch die von Kossa Färbung werden Kalzium Einlagerungen schwarz gefärbt. Da Knorpelsubstanz aus Kalziumphosphat besteht, wird dieses gefärbt. Die Schnitte wurden 2–3 Minuten in einer 1%igen Silbernitratlösung inkubiert, nach 3 Waschschrten für 1 Minute in bidest wurden die Gewebe für 2 Minuten in 5 % Na_2CO_3 /10 % Formaldehyd inkubiert. Dabei färbten sich die gebundenen Silberionen schwarz. Anschließend wurden die Gewebe für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Zur Entfernung nicht reduzierten Silbers folgte eine 5minütige Inkubation in 5 % Dinatriumthiosulfatlösung. Anschließend wurden die Schnitte wieder 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült, bevor sie in einer aufsteigenden Ethanolreihe (jeweils 2 Minuten 30 %, 50 %, 70 %, 90 % und $2 \times 100\%$) und 2×3 Minuten in Xylol dehydriert und mit Entellan eingedeckelt wurden.

2.6.4 Immunhistologie

BrdU Markierung auf Gewebeschnitten

2 Wochen alten Mäusen wurden 10 μ l pro Gramm Körpergewicht einer 1000 fachen BrdU Labelling Lösung (Roche, Mannheim) injiziert. Nach 6–8 Stunden wurden die Mäuse getötet, das Gewebe präpariert, decalcifiziert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden histologische Schnitte mit einer Dicke von 7–10 μ m angefertigt und auf Glasobjektträgern aufgezogen. Zur Detektion wurden die Schnitte in Ultraclear entparaffinisiert, rehydriert, die Antigene durch einen Proteinase-K Verdau (30 μ g/ml in PBS) für 20 Minuten bei 37 °C freigelegt und anschließend die DNA durch eine Inkubation mit 2 N HCl für 30 Minuten bei 37 °C denaturiert. Nach Neutralisation für 5 Minuten in 0,1 M Borat Puffer (0,1 M Natriumborat, pH 8,5) wurde das Gewebe durch 15minütige Behandlung mit 0,1 % Triton X-100 und 0,1 % Saponin in PBS permeabilisiert. Die Blockierung erfolgte mit 5 % NGS und 3 % BSA in PBS für 1 Stunde bei RT. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (mouse α BrdU, Roche 1:20–1:50 in Blockierungslösung) erfolgte über Nacht bei 4 °C oder 1 Stunde bei RT. Nach drei Waschschrritten mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper in Blockierungslösung.

Immunhistologische Detektion von Sclerostin

Deparaffinisierte, rehydrierte Gewebe (siehe Abschnitt 2.6.3) wurden 15–20 Minuten bei RT mit einer Trypsin/ETDA Lösung (Zellkultur Trypsin/EDTA 1:2 oder 1:5 in PBS) inkubiert, um die Antigene zu demaskieren. Nach 2 Waschschrritten für jeweils 5 Minuten in PBS wurden die Gewebe mit 5 % BSA/PBS/0,1 % Triton X-100 für 30–60 Minuten bei RT blockiert. Der Primärantikörper (goat α -mouse Sost, R&D Systems, Wiesbaden) wurde 1:80 in der Blockierungslösung verdünnt und die Gewebe über Nacht bei 4 °C damit inkubiert. Der Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen in PBS entfernt und der Sekundärantikörper (Alexa Fluor 546, α -goat, Invitrogen) in Blockierungslösung für 1 h bei RT auf den Geweben inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschrritten für 5 Minuten in PBS wurden die Objektträger mit den Geweben eingedeckelt.

2.7 *In situ* Hybridisierung (ISH)

2.7.1 Herstellung von DIG-markierten Hybridisierungssonden

Zur Herstellung von Digoxigenin-UTP (DIG-UTP) markierten RNA Sonden wurde das DIG-RNA-Labeling Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) benutzt. Als Zielbereich für die Sonden wurden nach Möglichkeit 450–600 bp lange Bereiche aus dem 3'UTR benutzt, um Kreuzhybridisierungen zu vermeiden. Die Vorlagen für die Sonden wurden mittels PCR aus cDNA amplifiziert, in die Vektoren pTA1 oder pTAGfp kloniert und anschließend in Bakterien transformiert. Nach der Transformation wurden Plasmid-Mini-Präparationen angefertigt und die Korrektheit des klonierten Fragments durch Sequenzierung bestätigt. Von den positiven

Klonen wurden Glyzerinkulturen zur Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ angefertigt. Aus den Plasmiden wurde mittels PCR mit den Primern *SP6* und *T7* eine Transkriptionsvorlage hergestellt. 100–200 ng aufgereinigtes *SP6/T7* PCR-Produkt wurde jeweils mit *SP6* oder *T7* RNA Polymerase transkribiert, um eine Gegenstrang Sonde zur Expressionsanalyse herzustellen.

2.7.2 *In situ* Hybridisierung auf Gefrierschnitten

Die halbautomatisierte *in situ*-Hybridisierung erfolgte auf Kryoschnitten mit DIG-markierten Sonden nach dem GenePaint-Protokoll [Herzig et al., 2001]. Es wurde ein Amplifikations-schritt benutzt, der die Sensitivität etwa um einen Faktor 100 erhöht. Die Durchführung erfolgte mit einer Tecan Genesis Plattform mit 2×48 Hybridisierungskammern. Prähybridisierung, Hybridisierung, Wasch- und Farbdetektionsschritte wurden automatisch durchgeführt.

2.7.3 *In situ* Hybridisierung auf Paraffinschnitten

Die *in situ* Hybridisierungen wurden auf 5–10 μm (je nach Stadium) dicken Paraffinschnitten durchgeführt. Hierzu wurden die Schnitte zunächst bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ für eine Stunde angebacken und dann zwei mal 15 Minuten in Ultraclear Xylol (J.T. Baker, Deventer, Holland) und zweimal 10 Minuten in 100 % Ethanol deparaffinisiert. In einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils 5 Minuten 75 %, 50 % und 25 % Ethanol) und schließlich zwei mal 5 Minuten in PBS wurden die Gewebe rehydriert. Eine Fixierung erfolgte mit 4 % PFA in PBS in 10 Minuten, gefolgt von zwei Waschschritten in PBST (0,1 % Tween 20). Die Gewebe wurden mit Proteinase K (Roche) verdaut (je nach Alter unterschiedlich konzentriert und lang) und wiederum zwei mal 5 Minuten mit PBST gewaschen. Nach erneutem Fixieren für 5 Minuten in 4 % PFA/PBS und zwei Waschschritten mit PBST erfolgte eine zehnminütige Acetylierung der RNA mit 500 μl Essigsäure-A-Anhydrid in 200 ml 0,1 M Triethanolamin (TEA). Nach dreimaligem Waschen in PBST erfolgte die Prähybridisierung in einer feuchten Kammer bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 1–4 Stunden. Hierzu wurden 150–200 μl Hybridisierungsmix (10 mM Tris pH7,5; 600 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,25 % SDS; 10 % Dextran Sulfat; $1 \times$ Denhardt's; 200 $\mu\text{g/ml}$ Hefe tRNA; 50 % Formamid) pro Objektträger eingesetzt. Die Schnitte wurden vorsichtig mit Folie abgedeckt, um einen zusätzlichen Schutz gegen Austrocknung zu gewährleisten. Anschließend wurden 2–4 μl Sonde pro Objektträger in 150–200 μl Hybridisierungsmix verdünnt, für 5 Minuten auf $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt und auf die Objektträger gegeben. Die Hybridisierung der markierten Sonden erfolgte über Nacht bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer feuchten Kammer. Die Gewebe wurden kurz in $5 \times$ SSC gespült und dann für 30 Minuten bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $1 \times$ SSC/50 % Formamid inkubiert, bevor sie für 10 Minuten in RNase Puffer (10 mM Tris pH7,5; 5 mM EDTA pH8,0 und 400 mM NaCl) bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert wurden. Es folgte ein Verdau mit RNase (20 $\mu\text{g/ml}$) für 30 Minuten bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in RNase Puffer und danach noch eine zehnminütige Inkubation in RNase Puffer bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nach einer Reihe von Waschschritten in SSC (20 Minuten $2 \times$ SSC, zwei mal 20 Minuten $0,2 \times$ SSC) bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ und in MABT (100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; pH7,5 mit NaOH eingestellt; 0,05 % Tween-

20) bei RT, wurden die Gewebe für mindestens zwei Stunden mit 20 % Sheep HI Serum in MABT blockiert. Alldieweil wurde der Antikörper (α DIG-AP Fab Fragmente, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) 1:2500 in 5 % Sheep HI Serum in MABT für 2 Stunden presorbiert, um den Hintergrund zu reduzieren. Vor Gebrauch wurde noch Tween 20 zu einer Endkonzentration von 0,05 % hinzugegeben und die Antikörperlösung auf die Gewebe pipettiert. Insgesamt wurden 200 μ l Lösung pro Objektträger eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht. Nach einmaligem Spülen in MABT und drei fünfminütigen Waschschritten mit MABT wurden die Schnitte für 10 Minuten in ALP-Puffer (NTMT: 100 mM NaCl; 100 mM Tris pH9,5; 50 mM MgCl₂; 0,05 % Tween 20) inkubiert. Die Detektion des Signals erfolgte bei RT mit unverdünntem BM-Purple (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) mit 1 mM Levamisol und 0,05 % Tween 20. Alle 48 Stunden wurde die Lösung erneuert. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Schnitte in ALP-Puffer gespült, zwei mal mit PBS gewaschen, 30 Minuten in 4 % PFA/PBS fixiert, nochmals zwei mal mit PBS gewaschen und schließlich mit Hydromatrix eingedeckelt.

2.8 Zellkultur

Alle Zellkulturmedien enthielten 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin (Lonza, Verviers, Belgien). Je nach Zelltyp/-linie wurden unterschiedliche Typen fötalen Rinderserums und unterschiedliche Konzentrationen an L-Glutamin (Lonza, Verviers, Belgien) eingesetzt. Das Medium der Hühner Micromass Kulturen enthielt zusätzlich noch Hühnerserum. Die genauen Zusammensetzungen der Medien sind bei den jeweiligen Zelllinien vermerkt.

2.8.1 primäre Hühnerzellen

Primäre Hühnerzellen wurden eingesetzt, da diese mit einem replikationskompetenten Retrovirus (RCAS) infiziert und somit Kandidatengene in diesen Zellen überexprimiert werden können. Eine nahezu hundertprozentige Infektionseffizienz bei gleichzeitig niedriger und somit annähernd physiologischer Überexpression des Transgens ermöglicht eine gute Analyse des jeweiligen Kandidatengens auf die Differenzierung der Chondrozyten oder Osteoblasten.

Mesenchymale Stromazellen aus Hühnerknochenmark (chBM)

Zur Gewinnung von mesenchymalen Stammzellen aus Hühnerknochen wurden die Tibiaknochen 18 Tage alter Hühnerembryonen isoliert und das Knochenmark mit DPBS (Lonza, Verviers, Belgien) herausgespült. Durch Filtration durch ein Zellsieb (45 μ m, BD Biotec) wurde eine Einzelzellsuspension gewonnen, die zunächst 2 Stunden in Medium (α -MEM, Lonza, Verviers, Belgien; 10 % FBS, Gibco; 2 mM L-Glutamin, Pen Strep) kultiviert wurde, um ein Anheften der erwünschten Zellen zu ermöglichen. Durch einen Waschschriff mit DPBS wurden die nicht-adhärenenten Zellen im Überstand entfernt. Die so gewonnenen mesenchymalen Stromazellen wurden mit zwei Medienwechseln pro Woche bis zu einer

Dichte von 80 % kultiviert und anschließend in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen pro ml ausgesät und mit RCAS-Viren infiziert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen zur Stimulation der Osteoblastendifferenzierung mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Vitamin C und 10 mM β -Glycerolphosphat behandelt. Sofern nicht anders angegeben, wurden während der Differenzierungsreihe alle zwei Tage Proben genommen. Zur Bestimmung des Grades der Mineralisation wurden die Zellen mit 4 % PFA/PBS fixiert, gewaschen und mit Alizarin Red S (Sigma Chemical, St. Louis, USA) gefärbt. Alizarin Red S bildet Komplexe mit Kalzium und dient so der Detektion mineralisierten Gewebes.

Hühnchen Micromass-Kultur (chMM)

Die Hühnchen Micromass-Kultur dient als Modell für alle Stadien der Knorpeldifferenzierung. Ein Vorteil ist die Möglichkeit, die Hühnchenzellen mit einem replikationskompetenten Retrovirus zu infizieren, der ein Transgen der Wahl überexprimiert. So kann man den Einfluß bestimmter Faktoren auf die Differenzierung von Knorpelzellen *in vitro* untersuchen. Zellen für die Hühnchen Micromass-Kultur wurden wie unter Lehmann et al. [2003] beschrieben gewonnen. Extremitätenknospen von 20–40 Hühnerembryonen im Hamburger-Hamilton Stadium 22–24 wurden in PBS (Lonza, Verviers, Belgien) präpariert. Nach 3 Waschschritten mit warmem (37 °C) HBSS (Biochrom, Berlin) wurde das Ectoderm durch eine 15minütige Inkubation mit Dispase (3 mg/ml in HBSS) bei 37 °C und weiteren Waschschrritten mit HBSS entfernt. Durch einen 30minütigen Verdau in 1 ml Kollagenase Lösung (0,1 % Kollagenase Typ Ia (Sigma-Aldrich), 0,1 % Trypsin (Gibco), 5 % FBS (Biochrom, Berlin) in PBS) und anschließende Filtration durch ein Zellsieb (45 μm , BD Bioscience) wurde eine Einzelzellsuspension gewonnen, die auf eine Konzentration von 2×10^7 Zellen pro ml eingestellt wurde. Ausgesät wurden 10 μl von dieser Suspension in einem Tröpfchen in einem 24-Well. Nach 2 Stunden, die der Adhäsion der Zellen an die Oberfläche dienen, wurde 1 ml Medium zu den Zellen gegeben. Die Kulturen wurden für die angegebenen Zeiträume kultiviert und das Medium wurde alle 2 Tage erneuert.

Für Experimente bezüglich der Regulation von Mef2c wurden Hühnchen Micromass-Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten (d5, d7, d8) mit 1:5 in PBS verdünnter Kollagenase Lösung verdaut, um eine Einzelzellsuspension zu bekommen. Die Zellen wurden in einer Konzentration von $4\text{--}6 \times 10^5$ Zellen pro ml ausgesät und sofort mit Lipofectamin 2000 transfiziert, bzw. mit RCAS Viren infiziert.

2.8.2 Zelllinien

Cos7 Zellen

Cos7 Zellen sind fibroblastische Zellen aus Nierengewebe der Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*). Sie wurden in DMEM mit 4,5 g/l Glukose mit 10 % FBS (Biochrom, Berlin) in Gegenwart von 4 mM L-Glutamin mit Penicillin Streptomycin kultiviert.

DF1 Zellen

DF1 Zellen sind Hühnerfibroblasten [Himly et al., 1998], die zur Herstellung von RCAS-Viren eingesetzt wurden. Eine Kultivierung erfolgte in DMEM mit 4,5 g/l Glukose mit 10 % FBS, 2 % Hühnerserum (Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe), 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin.

NIH3T3

NIH3T3 Zellen wurden in DMEM mit 1 g/l Glukose mit 10 % FBS (Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe) in Gegenwart von 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg pro ml Streptomycin kultiviert.

2.8.3 Transfektionen

Transfektion von Zelllinien

DF1-Zellen wurden mit ExGen 500 (Fermentas), Cos7 und NIH3T3-Zellen mit Polyfect (Qiagen, Hilden) und primäre Hühnerzellen wurden mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers transfiziert.

Herstellung von RCAS-Viren

Zur Herstellung von RCAS-Viren wurden DF1 Zellen in 6 well Platten ausgesät und mit 1 µg Plasmid per ExGen 500 (Fermentas, St. Leon Roth) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen zunächst in eine 75 cm² Flasche übertragen. Nach erneutem Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen auf zwei 15 cm ø Schalen überführt und von diesen schlußendlich auf sechs 15 cm ø Schalen. Sobald die Zellen ein letztes Mal konfluent gewachsen waren, wurde das Wachstumsmedium durch Mangelmedium mit 1 % FBS und 0,2 % Hühnerserum ersetzt. Das Mangelmedium wurde dreimal nach jeweils 24 Stunden gesammelt und sofort in Stickstoff eingefroren. Zur weiteren Aufbereitung wurde das gesammelte Medium aufgetaut, 5 Minuten bei 4000 RPM zur Sedimentierung zellulärer Verunreinigungen zentrifugiert und anschließend filtriert (Stericup 0,45 µm HV Durapore + Fiberglass Prefilter (beides Millipore, Schwalbach). Zur Aufkonzentrierung des Virus wurden die Überstände in einer Ultrazentrifuge für 3 Stunden bei 4 °C und 21000 RPM (SW 32 Ti Ausschwingrotor, Beckman) in Portionen zu jeweils 35–38 ml pro Röhrchen zentrifugiert. Die Überstände wurden bis auf wenige 100 µl verworfen und die Viruspellets durch 1 stündiges Schütteln der Zentrifugationsröhrchen auf Eis und anschließendes Mischen mit einer Pipette resuspendiert. Aliquots von 25–50 µl der virus-haltigen Suspension wurden in Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Transfektion primärer Hühnerzellen

Durch Kollagenase-Verdau von Hühner Micromass-Kulturen wurden Einzelzellsuspensionen von primären Hühnerzellen gewonnen. Diese Zellen wurden mit Lipofectamine 2000 im 24well Format wie folgt transfiziert: 500 ng DNA und 1,5 µl Lipofectamine 2000 Reagenz wurden pro well in jeweils 50 µl Optimem (Gibco Invitrogen, Karlsruhe) aufgenommen und 5 Minuten bei RT inkubiert. Die beiden Lösungen wurden vereinigt und weitere 20 Minuten bei RT inkubiert, um die Bildung von DNA-Reagenz Komplexen zu ermöglichen. Anschließend wurden 100 µl des Ansatzes zu den Zellen pipettiert.

6 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen teilweise mit humanem, rekombinantem PTHrP (Peprtech, Hamburg) in einer Konzentration von 20 nM (1,96 µg/ml) für 18 Stunden behandelt. H89 (Alexis Biochemicals, Lausen Schweiz) wurde in einer Konzentration von 10 µM, Forskolin (FSK) in einer Konzentration von 5 µM und SB203580 (Invivogen, San Diego, USA) in einer Konzentration von 10–40 µM eingesetzt.

2.8.4 Immunzytologie

Zellen für die Immunzytologie wurden auf sterilen Glasplättchen in Zellkulturschalen ausgesät und kultiviert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen 15 Minuten bei 4 °C entweder mit 4 % PFA/PBS oder eiskaltem Methanol fixiert und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Wurde mit PFA fixiert, so wurden die Zellen noch 15 Minuten bei RT mit 0,1 % Triton X-100/1 % BSA in PBS permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS für jeweils 5 Minuten wurden die Zellen 1h bei RT mit 10 % FBS (Biochrom, Berlin) in PBS blockiert. Der primäre Antikörper wurde in der Blockierungslösung verdünnt und für 1h bei RT auf den Zellen inkubiert. Es folgten drei Waschschrte für jeweils 5 Minuten mit PBS, danach wurden die Zellen mit dem ebenfalls in Blockierungslösung verdünnten Sekundäantikörper plus DAPI (1:1000) für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach drei Waschschrten für jeweils 5 Minuten mit PBS wurden die Glasplättchen mit Fluoromount (Southern Biotech, USA) auf einem Objektträger eingedeckelt.

2.8.5 Luciferase Reporterexperimente

Luciferase Reporterexperimente wurden mit dem Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega, Mannheim) durchgeführt. 24 Stunden vor der Messung wurden die Zellen in Triplicaten mit den jeweiligen Plasmiden transfiziert (siehe Abschnitt 2.8.3). Transfizierte Zellen wurden in 100 µl Passive Lysis Buffer (Promega, Mannheim) pro 24well für 10 Minuten bei RT lysiert. 10 µl Lysat wurden dann mit 25 µl Dual Glo Reagenz versetzt, 10 Minuten inkubiert und anschließend die Lumineszenz in einem Microbeta Trilux 1450 Luminometer (Wallac, Turku, Finnland) gemessen. Zur Normalisierung wurden die Zellen mit pRL-CMV Plasmid transfiziert, welches eine Renilla-Luciferase unter dem CMV-Promotor exprimiert. Die Renilla Aktivität wurde im Anschluß an die Firefly Aktivität durch Zugabe von 25 µl Stop and Glo Substrat zum Reaktionsansatz und 10 minütiger Inkubation gemessen. Soweit

nicht anders angegeben, wurden jeweils die Mittelwerte und Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Identifikation von Kandidatengenem mit einer Rolle in der Skelettentwicklung

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation und funktionelle Charakterisierung neuer Gene mit einer Funktion in der Skelettentwicklung. Kandidatengene sollten anhand eines vorher durchgeführten Vergleichs der Genexpression in embryonalen Oberarmen von *Runx2*-KO Mäusen mit der von Wildtyp Mäusen [Hecht, 2006; Hecht et al., 2007] selektiert und weiter untersucht werden. Um als potentieller Kandidat auch funktionell untersucht zu werden, sollten folgende Bedingungen erfüllt sein:

1. eine Regulation in der Expressionsanalyse von mindestens 2-fach
2. eine bisher nicht beschriebene Rolle in der Skelettentwicklung oder eine gänzlich unbekannte Funktion
3. vorzugsweise Transkriptionsfaktoren, Rezeptoren, sezernierte Faktoren
4. eine Expression in embryonalen Skelettelementen (durch ISH nachgewiesen)

Für Gene, die die Bedingungen 1 und 2 erfüllt haben, wurden *in situ* Sonden konstruiert und mit embryonalen Gewebeschnitten von Mäusen hybridisiert, um die Expressionsdomänen dieser Gene zu identifizieren und die Liste der Kandidaten weiter zu verfeinern.

3.1.1 Untersuchung der Expression potentieller Kandidatengene

Die Expressionsdomänen von Genen, die in *Runx2*-KO Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen eine veränderte Expression zeigten und die noch nicht in Hecht [2006] oder Hecht et al. [2007] untersucht wurden, sollten bestimmt werden. Dies geschah mittels *in situ*-Hybridisierung von RNA-antisense Sonden auf embryonalen Gewebeschnitten. Es wurden die Oberarmknochen (Humeri) von Embryonen des Stadiums E15,5 benutzt, da diese bereits ossifizierte Bereiche besitzen und somit die Detektion von Expression in Osteoblasten

möglich war. In der folgenden Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse dieses Expressionscreens aufgeführt.

Tabelle 3.1: Expression regulierter Gene in der oberen Extremität zum Zeitpunkt E14,5. RNA antisense Sonden wurden auf Gefrierschnitten embryonaler Arme hybridisiert, um die Expression potentieller Kandidatengene in Skelettelementen zu untersuchen. Ein • markiert ein Signal. (Chon.: Chondrozyten, pht: prähypertropher Knorpel, ht: hypertropher Knorpel, TrK: trabekulärer Knochen, Pch: Perichondrium, Pos: Periosteum, OZ: Osteozyten, OK: Osteoklasten, n.d.: kein Signal detektierbar)

Expression potentieller Kandidaten (E14,5)						
Gensymbol/EST	Chon.		TrK	Pch	Pos	sonstiges
	pht	ht				
Al121797/Tmem16a	•			•		Gelenk
Al615325/Slc13a5	•		•	•	•	
Akp2			•	•	•	
Aldh1a3						Muskel
AW120352						n.d.
BM120331	•					
Cdkn1a			•		•	Muskel
Cfh					• OK	
Col22a1	•			•	•	Gelenk, Muskel
Dmp1			•		• OZ	
Edg7						n.d.
Fabp3			•	•	•	
Fosl2			•			Haut
Gadd45g				•		
Gcnt2						n.d.
Gnas	•					Gelenk, ubiquitär
Hhip	•			•		
Ifitm5				•	•	
Irx5			•	•	•	
Jarid2						n.d.
Kremen1	•			•		
Mef2c	•	•		•	•	Muskelansätze
Ninj2	•			•	•	Gelenk, Muskel
Phospho1	•			•	•	
Panx3			•	•	•	
Ptp4a1					•	
Ptprz1						n.d.

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortgesetzt von der vorherigen Seite

Expression potentieller Kandidaten (E14,5)						
Gensymbol/EST	Chondrozyten		TrK	Pch	Pos	sonstiges
	ph	ht				
Rras2						n.d.
Sdc2	•			•	•	Gelenk
Siah2						n.d.
Slc9a2	•			•		
Smpd3	•		•	•	•	
Sp7					•	
Unc5b			•	•		Gelenk

Nach Datenbankrecherche (Pubmed, Stand Juni/Juli 2004) und *in situ* Hybridisierungen wurden folgende Gene in die Liste der weiter zu untersuchenden Kandidaten aufgenommen: *Al121797/Tmem16a*, *Fabp3*, *Ifitm5*, *Irx5*, *Mef2c*, *Ninj2*, *Pannexin3*, *Satb2*, *Smpd3* und *Unc5b*. Von diesen Genen sollten nun die kodierenden Sequenzen in den RCAS kloniert werden, um zu analysieren, welchen Effekt eine Überexpression in primären Zellen erzielt. Für *Satb2* konnte keine aussagekräftige *in situ* Hybridisierung angefertigt werden. Dieser Transkriptionsfaktor wurde aufgrund der Regulation im *Runx2*-KO und der Tatsache, daß eine Haploinsuffizienz dieses Gens zur Ausbildung einer Gaumenspalte führt [FitzPatrick et al., 2003], in die Liste der Kandidaten aufgenommen.

3.2 Funktionelle Untersuchung der Kandidatengene

Um die möglichen Kandidatengene funktionell zu charakterisieren, wurden ihre kodierenden Sequenzen in ein modifiziertes RCAS-T/A Plasmid (2.1.8) kloniert. Der Vorteil des RCAS Systems ist die Eigenschaft, in Geflügelzellen replikationskompetent zu sein, so daß eine nahezu vollständige Infektion möglich ist. Zusätzlich wird das Transgen durch den viralen *LTR*-Promotor relativ mild überexprimiert, was einem physiologischen Zustand in der Zelle recht nahe kommt. So werden Effekte durch zu starke Expression und Anhäufung des heterolog exprimierten Proteins vermieden. Es wurden mesenchymale Osteoblastenvorläuferzellen aus Hühnerknochenmark mit den jeweiligen Konstrukten infiziert und der Einfluß der Kandidaten auf die Mineralisation dieser Zellen bestimmt. Zusätzlich wurden auch Hühner Micromass-Kulturen infiziert, um einen Einfluß auf die Knorpeldifferenzierung zu bestimmen.

3.2.1 Primäre Knochenmarkzellen aus Hühnerembryonen als Modell für die Osteoblastendifferenzierung

Zur funktionellen Untersuchung möglicher Kandidatengene war es notwendig, ein Zellsystem zu etablieren, anhand dessen der Einfluß dieser Gene auf die Differenzierung

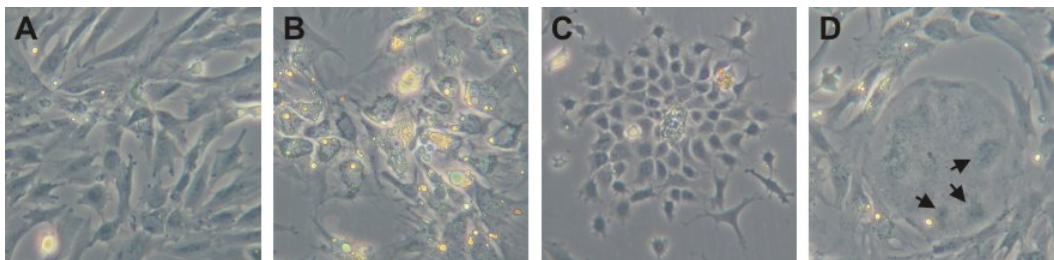


Abbildung 3.1: *Unterschiedliche Zelltypen in Kulturen mesenchymaler Knochenmarkszellen. Nach der Präparation mesenchymaler Zellen aus dem Knochenmark von Hühnerembryonen, erhält man 4 Haupttypen von adhärenenten Zellen. A: Fibroblastische Osteoblastenvorläufer, B: Adipozyten, C: Chondrozyten, D: Osteoklasten. Die Adipozyten zeichnen sich durch Fettbläschen aus, die unter dem Mikroskop gelblich erscheinen. Bei zunehmender Konfluenz der Zellen werden die Adipozyten durch die fibroblastischen Zellen verdrängt. Die Chondrozyten lagern sich zu charakteristischen Mustern ähnlich wie ein Kopfsteinpflaster zusammen. Osteoklasten sind sowohl durch ihre Größe als auch durch das Vorhandensein mehrerer Zellkerne (schwarze Pfeile) zu erkennen. Diese Zellen wurden 3 Tage nach der Präparation fotografiert.*

von Osteoblasten untersucht werden kann. Die Anforderungen an dieses System waren a) die Infizierbarkeit mit dem RCAS-Virus, die eine standardisierte Expressionsrate des Transgens ermöglicht und b) das Potential zur Differenzierung in reife Osteoblasten. Für eine Infizierbarkeit mit dem RCAS-Virus war es notwendig, Geflügelzellen zu kultivieren. Es bot sich an, Zellen von Hühnerembryonen einzusetzen, da das Huhn neben der Maus ein in der Entwicklungsbiologie etablierter Modellorganismus mit ähnlicher Knochenentwicklung ist. Mit RCAS infizierte Geflügelzellen bringen replikationskompetente Viren hervor, die dann wiederum weitere Zellen infizieren können, so daß eine nahezu 100%ige Infektion der Kulturen erreicht werden kann. Es wurde ebenfalls versucht, Osteoblastenvorläuferzellen aus den Calvarien von Hühnerembryonen zu isolieren und zu kultivieren, wie es bei der Maus üblich ist. Dies war aber nicht möglich, da sich diese Zellen spätestens nach Beginn der Stimulation mit β -Glycerolphosphat von der Oberfläche der Kulturplatten lösten und somit für Differenzierungsexperimente unbrauchbar waren. Als Alternative konnte die Kultur mesenchymaler Stromazellen aus dem Knochenmark der Tibiae von Hühnerembryonen etabliert werden (chBM Kulturen). Diese Zellen sind multipotent und können unter geeigneten Bedingungen zu Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten differenzieren (Abb. 3.1).

3.2.2 Stimulierte chBM Kulturen produzieren eine mineralisierte extrazelluläre Matrix

Eine wichtige Voraussetzung für eine Mineralisation und damit osteoblastische Differenzierung der chBM Kulturen ist neben der Stimulation mit β -Glycerolphosphat und Ascorbinsäure ein geeignetes Serum – so konnten große Unterschiede in Bezug auf die Differenzierung zwischen einzelnen Chargen verschiedener Hersteller festgestellt werden. Weiterhin ist es notwendig, die isolierten Zellen zunächst bis zur Konfluenz zu züchten, bevor man die Stimulation mit β -Glycerolphosphat einleitet. Da diese Zellen in Kultur sehr langsam

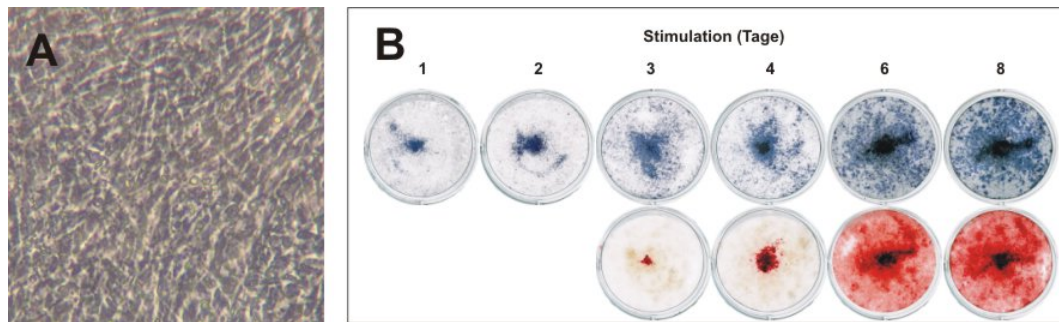


Abbildung 3.2: Osteoblastische Differenzierung mesenchymaler Knochenmarks-Stromazellen. Stromazellen aus dem Knochenmark 18 Tage alter Hühnerembryonen wurden in Kultur genommen und ab Beginn der Konfluenz durch Addition von 50 $\mu\text{g/ml}$ Ascorbinsäure und 10 mM β -Glycerolphosphat zum Medium stimuliert. **A:** Mesenchymale Knochenmarkszellen zum Zeitpunkt der Konfluenz. Es sind nur noch fibroblastenartige Zellen vorhanden, die sehr dicht gewachsen sind und stimuliert werden können. **B:** Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert und die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (oben) und der Grad der Mineralisation über Färbung mit Alizarin Red S (unten) bestimmt. Wie anhand der Färbung der extrazellulären Matrix zu erkennen ist, können diese Zellen zu Osteoblasten differenzieren.

wuchsen, war es von Vorteil, sie möglichst dicht auszusäen (4×10^5 Zellen pro ml), damit eine zügige Mineralisation erreicht wird. So konnte der Beginn der Mineralisation derartiger Zellen von einer ursprünglich 8–10 tägigen Stimulationsphase auf nur 3 Tage reduziert werden. Die Zellen wurden zu bestimmten Zeitpunkten mit PFA fixiert und mit *Alizarin Red S* gefärbt, welches Komplexe mit Kalzium bildet und so der Detektion von mineralisiertem Gewebe dient. In Abbildung 3.2 ist deutlich zu erkennen, daß diese Zellen nach Stimulation mit Ascorbinsäure und β -Glycerolphosphat zu Osteoblasten differenzieren konnten. Schon einen Tag nach Beginn der Stimulation lässt sich die Aktivität der Alkalischen Phosphatase nachweisen und nach 3 tägiger Stimulation waren erste mineralisierte Bereiche der Extrazellulären Matrix zu erkennen (Abb. 3.2). Zur Verlangsamung einer zu starken Differenzierung bei Überexpression eines stark aktivierenden Faktors (*Runx2*, *Bmp2*) bietet es sich an, die Konzentration von β -Glycerolphosphat von 10 mM auf 2,5 mM zu reduzieren. So stellen die chBM Zellen ein *in vitro* System dar, welches zur funktionellen Untersuchung von sowohl stimulierenden als auch hemmenden Faktoren der osteoblastischen Differenzierung geeignet ist.

3.2.3 Stimulierte chBM Kulturen exprimieren Markergene differenzierender Osteoblasten

Detailliertere Analysen des Differenzierungszustands, die über den Grad der Mineralisation oder die Aktivität der Alkalischen Phosphatase hinausgingen, ließen sich mit diesen Kulturen durch quantitative RT-PCR durchführen, so daß ein Expressionsprofil von Markergenen erstellt werden konnte (Abb. 3.3). Die qPCR Experimente zeigten, daß die chBM Zellen im Laufe der Kultivierung unterschiedliche Differenzierungsmarker exprimierten – so erreichte die Expression von *Bmp2*, *Ibsp* und *Runx2* bereits nach 2 tägiger Stimulation ihr Maximum.

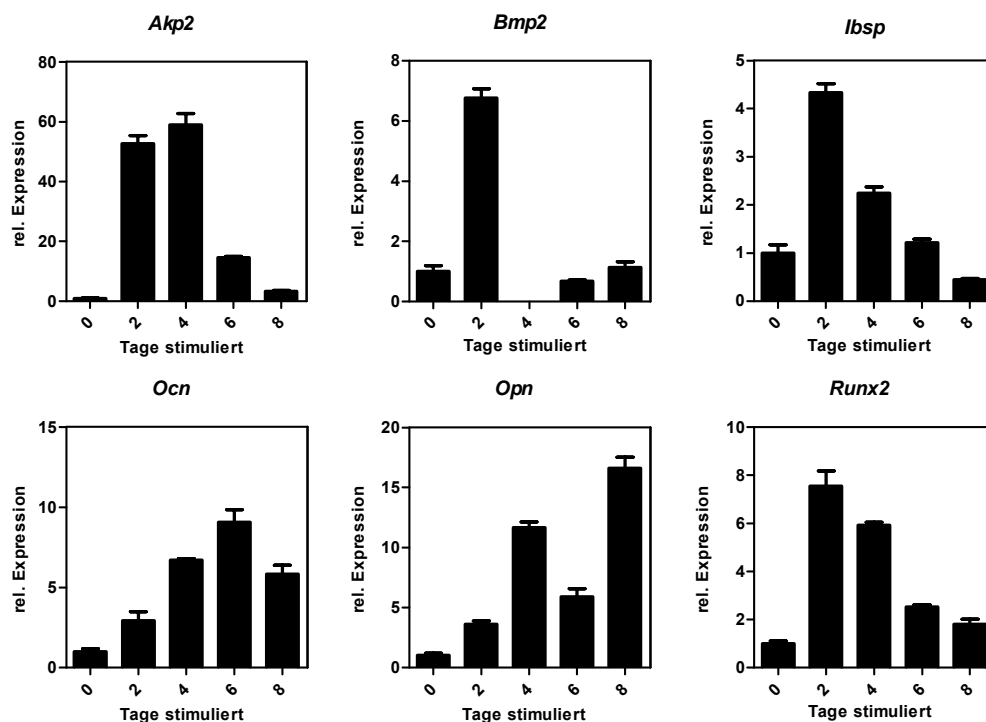


Abbildung 3.3: Stimulierte chBM Zellen exprimieren Osteoblastenmarker. Stimulierte und mit einem leeren RCAS Virus infizierte Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit Trifast lysiert, die RNA isoliert und die Expressionsstärken ausgewählter Osteoblastenmarker mittels qPCR ermittelt. Als interne Kontrolle diente *GapDH*, alle Expressionswerte sind auf die jeweilige Stärke zum Zeitpunkt 0, also unmittelbar vor Beginn der Stimulation bezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten eines repräsentativen Experiments. *Akp2*, *Bmp2*, *Ibsp* und *Runx2* werden schon nach kurzer Zeit induziert, *Ocn* und *Opn* erst im weiteren Verlauf der Differenzierung der Zellen.

Die Alkalische Phosphatase (*Akp2*) wurde nach 4 tägiger Stimulation maximal exprimiert, um dann stark abzunehmen. *Ocn* und *Opn* dagegen wurden im Verlauf der Differenzierung der Zellen zunehmend stärker exprimiert.

3.2.4 Überexpression in mesenchymalen Knochenmarkszellen (chBM)

Ausgewählte Kandidatengene wurden in chBM Kulturen retroviral überexprimiert. Um die Differenzierung und Mineralisation dieser Zellen zu stimulieren, wurden sie nach Erreichen der Konfluenz mit 10 mM β -Glycerolphosphat und 50 μ g/ml Vitamin C behandelt. Zur Bestimmung des Effekts der Überexpression eines Gens wurde alle 24–48 Stunden der Mineralisationsgrad der Zellen über eine Färbung mit *Alizarin Red S* bestimmt. Zusätzlich wurde noch die Aktivität der alkalischen Phosphatase bestimmt – entweder qualitativ direkt auf der Kulturplatte oder quantitativ in Lysaten der Zellen. Für weiterführende Analysen wurde

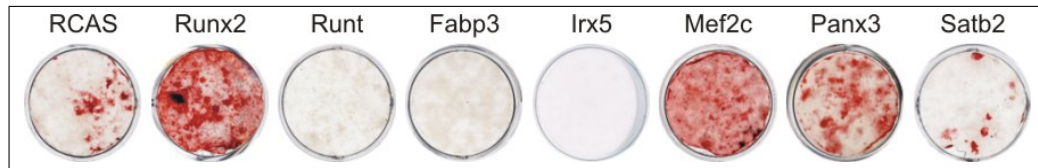


Abbildung 3.4: Kandidatenscreen. Ausgewählte Kandidatengene wurden mittels RCAS Virus in den chBM Zellen überexprimiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte noch nach dem anfänglichen Protokoll, so daß eine längere Stimulationsphase notwendig war. Nach 10tägiger Stimulation mit Vitamin C und β -Glycerolphosphat wurden die Zellen fixiert und mit Alizarin Red S gefärbt, um die Mineralisation der extrazellulären Matrix nachzuweisen. Eine Überexpression von Runx2 verstärkt die Mineralisation, eine Überexpression eines dominant negativen (Runt) hemmt diese. Mef2c und Panx3 überexprimierende Zellen zeigen gegenüber der Kontrolle (RCAS) eine leicht induzierte Differenzierung, während Fabp3, Irx5 und Satb2 die osteoblastische Differenzierung der Zellen zu hemmen scheinen.

zu bestimmten Zeitpunkten die RNA der Zellen isoliert, um mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR) die Expressionsstärken ausgesuchter Differenzierungsmarker zu bestimmen.

Wie in Abbildung 3.4 gezeigt, konnte eine Überexpression von Mef2c und Panx3 die Differenzierung der chBM Zellen leicht stimulieren, während Fabp3, Irx5 und Satb2 einen leicht inhibitorischen Effekt zu haben schienen. Im Laufe dieser Arbeit wurde Satb2 als essentiell wichtiger Transkriptionsfaktor in der Osteoblastenentwicklung identifiziert [Dobrev et al., 2006], so daß es als Kandidat ausfiel. Runx2 wurde als Positivkontrolle eingesetzt und verstärkt erwartungsgemäß die Mineralisation der chBM Kulturen. Eine Infektion der Zellen mit einem RCAS, der nur die DNA Bindedomäne (Runt) von Runx2 trägt, führt zu einer erwarteten Hemmung der Mineralisation und wirkt somit als dominant negatives Runx2.

Um nicht zu viele Faktoren parallel zu bearbeiten, musste eine weitere Selektion der Kandidatengene vorgenommen werden. Die Wahl fiel auf Mef2c als hauptsächlich zu untersuchenden Kandidaten, da es einerseits als Transkriptionsfaktor eine potenziell wichtige Rolle haben könnte und andererseits aufgrund der stimulierenden Effekte bei Überexpression in chBM Zellen. Zusätzlich war eine *Mef2c^{loxP}* Maus verfügbar, die für konditionelle Knockouts von Mef2c eingesetzt werden konnte [Vong et al., 2005].

Mef2c induzierte die Expression von chondrozytären Differenzierungsmarkern

Mit Mef2c-RCAS infizierte chBM Kulturen zeigten bezüglich in frühen Experimenten eine erhöhte Mineralisation, die aber in späteren Experimenten nicht mehr reproduziert werden konnte (Abb. 3.5). Eine Überexpression von zwei verschiedenen Spleißvarianten von Mef2c (V2 und V6) in chBM Zellen zeigte nach dem beschleunigten Differenzierungsprotokoll keine stimulierenden Effekte. Auch die Infektion der Zellen mit einem Mef2b-RCAS hatte keine Auswirkungen auf die Mineralisation. Einen hemmenden Effekt hatten hingegen PTHrP, Sclerostin (Sost) und Sox9, die als bekannte Faktoren zur weiteren Charakterisierung der chBM Kulturen eingesetzt wurden. Reproduzieren ließen sich hingegen die teilweise sehr starke Induktion der Expression einiger Markergene differenzierender Chondrozyten. So wurden vor allem *Col10a1*, *Ibsp* und *Sox9* in Mef2c-RCAS infizierten Kulturen gegenüber

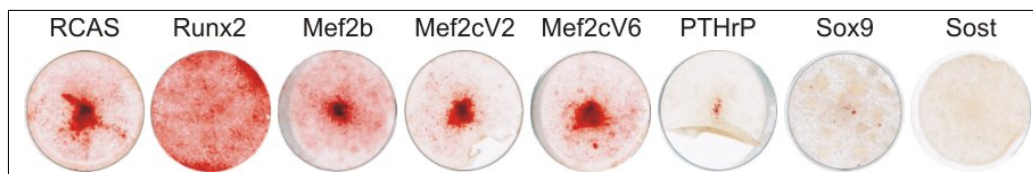


Abbildung 3.5: Retrovirale Überexpression verschiedener Markergene, *Mef2b* und *Mef2c* in chBM Kulturen. Gezeigt sind mit RCAS-Konstrukten infizierte Zellen, die 3 Tage stimuliert und dann mit Alizarin Red S gefärbt wurden. Aufgrund der dichten Aussaat (5×10^4 Zellen pro ml) und des verwendeten Serums differenzieren diese Zellen schnell. Ein *Runx2* RCAS wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Die Überexpression von *Mef2b* oder zwei unterschiedlichen Spleißvarianten von *Mef2c* zeigt keinen Einfluß auf die Mineralisation dieser Zellen. Eine Überexpression von *PTHrP*, *Sox9* oder *Sost* hemmt die Mineralisation der Zellen deutlich gegenüber der Kontrolle (RCAS).

den Kontrollkulturen hochreguliert (Abb. 3.6). Betrachtet man die Expression von Osteoblastenmarkern, so zeigt sich, daß *Mef2c* nur einen sehr geringen Einfluß auf die mRNA von *Osteocalcin* und keinen Einfluß auf die Expression von *Osteopontin* hatte. Beide Gene wurden durch eine Überexpression von *Runx2* um ein Vielfaches aktiviert.

Abbildung 3.7 verdeutlicht, daß *Runx2* in den chBM Kulturen zwar die Expression von *Mef2c* regulierte, aber *Mef2c* regulierte nicht die Expression von *Runx2*. Beiden Faktoren gemein war die Fähigkeit, die Transkriptmenge von *Mef2b* zu erhöhen. In mit einem leeren RCAS Virus infizierten Kulturen wurden sowohl *Mef2c* als auch *Mef2b* differenziell reguliert – dies könnte ein Hinweis auf eine „echte“ Rolle dieser beiden Faktoren in der Differenzierung der chBM Kulturen sein.

3.2.5 Überexpression in der Hühner Micromass-Kultur

Zwecks Untersuchung ihres Einflusses auf die Differenzierung von Chondrozyten wurden die Kandidatengene auch in der Hühner Micromass-Kultur (chMM) überexprimiert. Mittels *Alcian-blue* Färbung kann man die Knorpelmatrix dieser Kulturen bestimmen und somit Rückschlüsse auf den Differenzierungsgrad bzw. den Grad der Chondrogenese ziehen. Die Alkalische Phosphatase, deren Aktivität sich durch eine Farbreaktion nachweisen lässt, ist in chMM Kulturen ein Marker für den Differenzierungsvorgang, da differenzierende Chondrozyten eine hohe Aktivität dieses Enzyms zeigen. Wie in Abbildung 3.8 gezeigt, hatte eine Überexpression des Transkriptionsfaktors Iroquois related homeobox 5 (*Irx5*) eine Blockade der Matrixbildung zur Folge – *Irx5* hatte demnach eine anti-chondrogene Wirkung. Die retrovirale Überexpression der anderen Kandidaten hatte keinen signifikanten Effekt auf die Chondrogenese der Zellen. Eine Überexpression von *Mef2c*, *Pannexin3* oder *Smpd3* zeigte gegenüber der Kontrolle keinen signifikanten Effekt, was auch durch die Quantifizierung des gebundenen Farbstoffs verdeutlicht wird. Zu Vergleichszwecken wurden Viruskonstrukte mit den kodierenden Sequenzen von *PTHrP* und *Sox9* zur Infektion der Zellen genutzt. *PTHrP* hat einen leicht chondrogenen, *Sox9* hingegen einen sehr stark chondrogenen Effekt auf die chMM Kulturen. Beide Faktoren sind dafür bekannt, die späte, hypertrophe Differenzierung von Chondrozyten zu hemmen, aber *Sox9* ist notwendig für die frühen Sta-

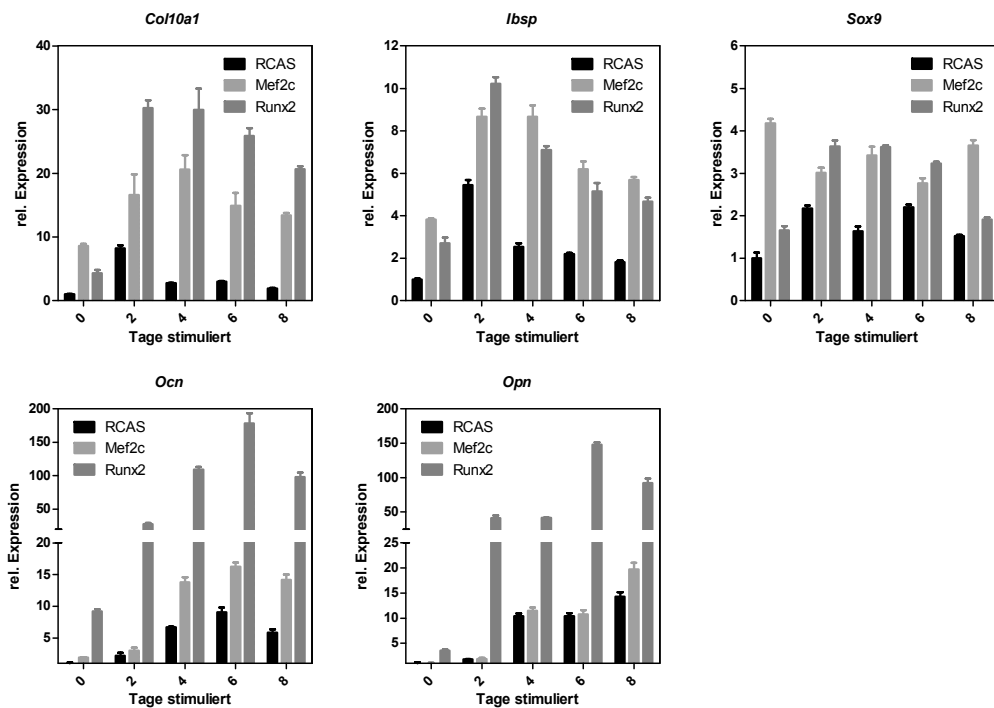


Abbildung 3.6: Mef2c induziert die Expression von Markergenen differenzierender Chondrozyten. chBM Kulturen wurden mit verschiedenen RCAS Viren infiziert, die entweder kein Transgen (RCAS) oder Mef2c bzw. Runx2 überexprimieren und ab Beginn der Konfluenz stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die RNA isoliert und die Expression verschiedener Gene untersucht. Eine Überexpression von Mef2c hatte vor allem einen stimulierenden Effekt auf die Expression von Col10a1, Ibsp und Sox9. Die Transkriptmenge von Ocn wird durch Mef2c nur gering erhöht, Opn nicht. Beide Gene werden erwartungsgemäß sehr stark durch Runx2 aktiviert.

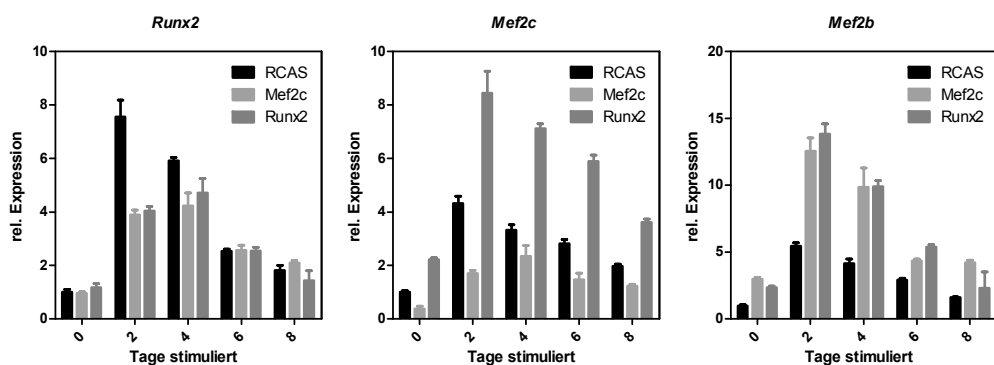


Abbildung 3.7: In chBM Kulturen induziert Runx2 die Expression von Mef2c, aber Mef2c hat keinen Einfluß auf Runx2. Die Expression von Mef2b wird aber durch beide Faktoren positiv beeinflusst. Sowohl Mef2c als auch Mef2b werden im Verlauf der Differenzierung der Kontrollkulturen zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedlich exprimiert, was auf eine Rolle bei der Reifung dieser Kulturen hinweisen könnte.

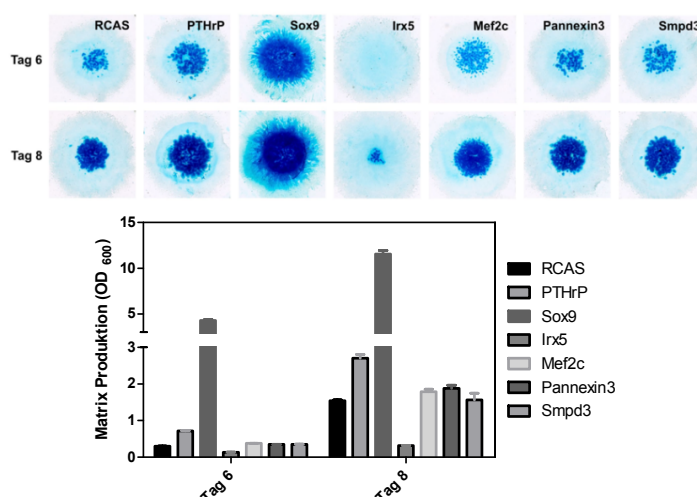


Abbildung 3.8: Überexpression von Kandidatengenen in der Hühner Micromass-Kultur. **Oben:** Alcian-blue gefärbte Hühner Micromass-Kulturen 6 und 8 Tage nach Infektion mit einem Leer-RCAS, einem PTHrP-RCAS oder einem RCAS Virus, das die kodierende Sequenz ausgewählter Kandidatengene trägt. Die Überexpression von *Irx5* hat einen anti-chondrogenen Effekt auf die Kulturen: 6 Tage nach Infektion ist noch keine gefärbte Matrix zu erkennen, während die Kontrollkulturen schon deutlich angefärbt sind. **Unten:** Anhand der Quantifizierung des gebundenen Farbstoffs wird deutlich, daß eine virale Überexpression von *Pannexin3* oder *Smpd3* keinen Effekt bezüglich der Matrixproduktion zeigt.

dien der Chondrozytendifferenzierung, während PTHrP die Chondrozyten eher in einem sehr frühen, proliferativen Zustand hält. Dies wird anhand der *Alcian-blue* Färbungen recht deutlich.

Mef2c induziert in Micromass-Kulturen die Expression von Differenzierungsmarkern, beeinflusst aber nicht deren Zusammensetzung

Wie schon in den chBM Kulturen, hatte Mef2c auch in den chMM Kulturen keinen nennenswerten Effekt auf die Matrixbildung (Abb. 3.8). Auch bezüglich der Zellmorphologie gab es keine Unterschiede zu den mit einem leeren Virus infizierten Zellen (Abb. 3.9). Im Gegensatz dazu führte eine Überexpression von *Runx2* neben einer beschleunigten Differenzierung der Chondrozyten auch zu einer verstärkten Bildung von Knorpelmatrix und zu einem veränderten Aufbau der Micromass Kulturen. In Abbildung 3.9 ist dieser Unterschied deutlich zu erkennen. So bildeten sich Bereiche mit hypertrophen Chondrozyten, die von einer Art Perichondrium – also dicht gepackten Zellen umgeben waren. Mef2c beschleunigte die Expression von chondrozytären Differenzierungsmarkern, konnte aber im Gegensatz zu *Runx2* kein Perichondrium induzieren. *Runx2* bewirkte ebenfalls eine stärkere Differenzierung der Chondrozyten, wie an den noch höheren Expressionsstärken bestimmter Markergene zu erkennen ist. Eine Überexpression von Mef2c *in vivo* durch Injektion in Extremitätenknospen von Hühnerembryonen hatte ebenfalls keinen erkennbaren Effekt (nicht gezeigt).

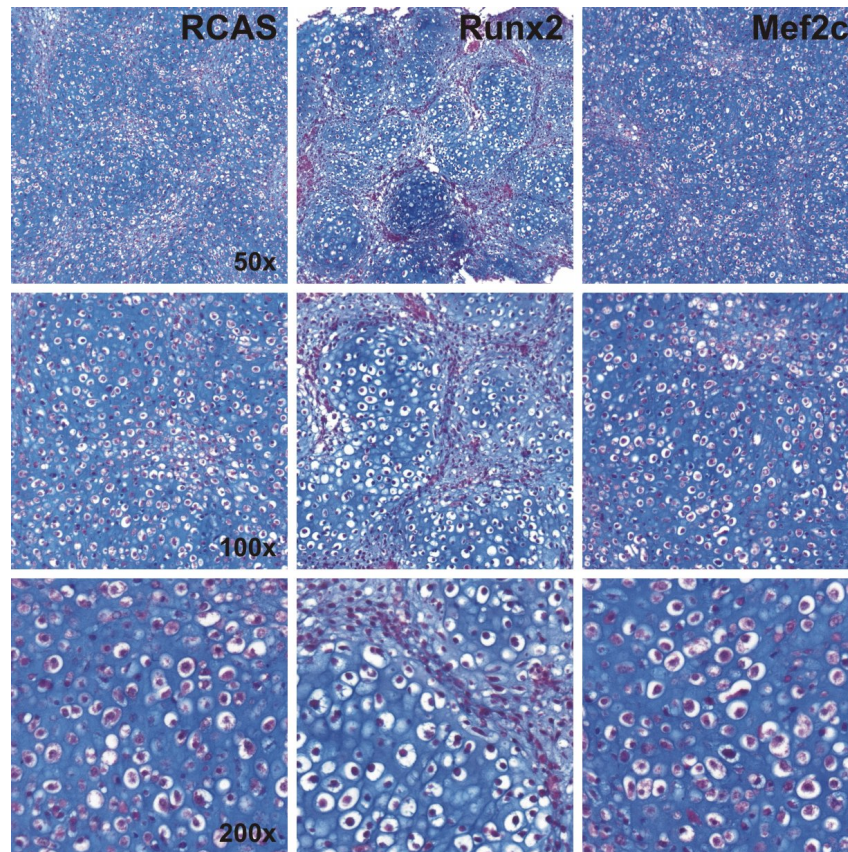


Abbildung 3.9: HE/Alcian blue Färbung histologischer Schnitte von 12 Tage alten Hühner Micromass Kulturen. Die Zellen waren entweder mit einem leeren RCAS Virus (RCAS), Runx2-RCAS (Runx2) oder Mef2c-RCAS (Mef2c) infiziert und für 12 Tage kultiviert worden. Nach Einbettung in Paraffin wurden 5 μm dicke Schnitte angefertigt und mit HE und Alcian blue gefärbt. Deutlich ist in allen Kulturen die blau gefärbte Knorpelmatrix zu erkennen. Zwischen den Mef2c-RCAS und den Leer-RCAS infizierten Kulturen ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen, während die Runx2-RCAS infizierten Kulturen eine höhere Dichte an hypertrophen Chondrozyten aufweisen. Zusätzlich bilden sich definierte Bereiche, die voneinander durch Zonen sehr dicht gelagerter Zellen, die keine Knorpelmatrix bilden, abgegrenzt sind. Diese dichten Zonen ähneln dem Perichondrium.

Untersuchungen Mef2c-RCAS infizierter Kulturen auf RNA Ebene hingegen eine verstärkte Expression von Markergenen differenzierender Chondrozyten. Die Expression der *Alkalischen Phosphatase (Akp2)*, *Kollagen Typ X (Col10a1)*, *Integrin binding Sialoprotein (Ibsp)*, *Indian Hedgehog (Ihh)* und des *Parathyroid Hormon Rezeptors (Pthr1)* war in den Mef2c überexprimierenden Kulturen deutlich stärker als in den mit einem Leervirus infizierten Kontrollen (Abb. 3.10). Diese Effekte traten bereits nach 4 tägiger Kultivierung ein.

Ein Vergleich der Effekte von Mef2c und Runx2 auf die Expressionsprofile in chMM Kulturen (Abb. 3.10) zeigte gewisse Unterschiede hinsichtlich der zeitlichen Verläufe der Genexpression. So wurde *Akp2* durch Mef2c und Runx2 an Tag 4 stark aktiviert, die Expression stieg aber in den Runx2-RCAS infizierten Kulturen immer weiter an, während sie in den Mef2c-RCAS Kulturen nach Erreichen eines Maximums an Tag 4 wieder abnahm. Dabei blieb sie aber immer deutlich stärker als in den Kontrollkulturen. *Col10a1* und *Ihh* wurden beide durch Mef2c schneller induziert, um in späteren Stadien deutlich stärker durch Runx2 re-

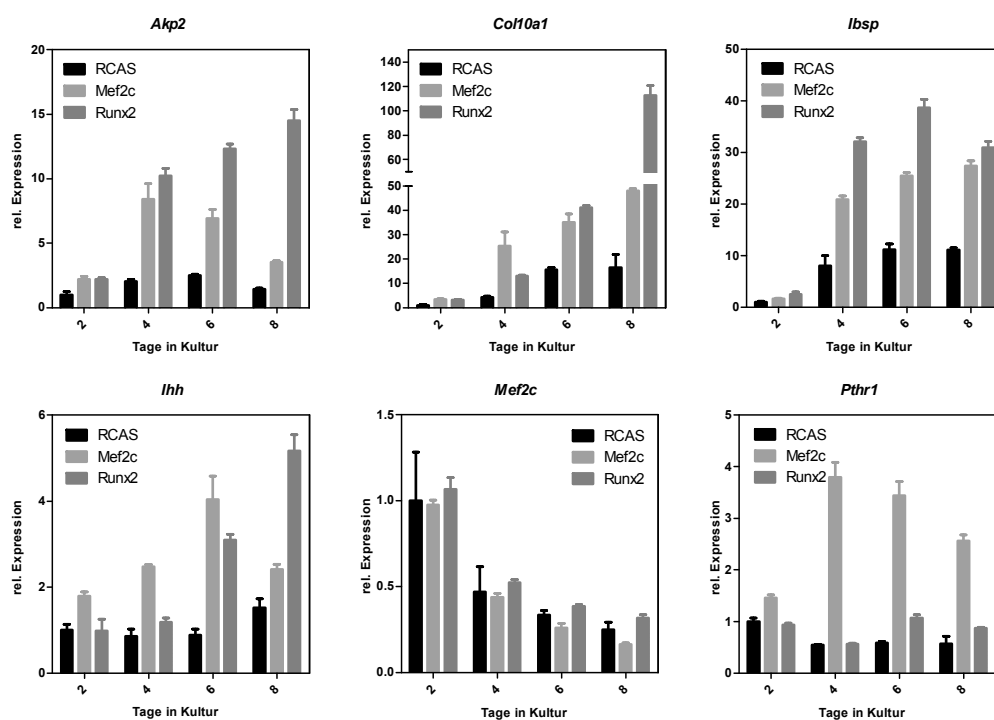


Abbildung 3.10: Überexpression von Mef2c oder Runx2 in chMM Kulturen induziert die Expression von Markergenen differenzierender Chondrozyten. Hühner Micromass Kulturen wurden mit Mef2c-RCAS, Runx2-RCAS oder einem Leervirus als Kontrolle infiziert und über den angegebenen Zeitraum kultiviert. Mef2c und Runx2 stimulieren die gleichen Gene – teilweise aber unterschiedlich schnell. Die Transkriptmenge ausgewählter Gene wurde mittels qPCR mit RNA aus chMM Kulturen bestimmt. Als interne Kontrolle diente die Expression von GapDH – alle Werte sind relativ zu der Expressionsstärke Leer-RCAS infizierter Kulturen an Tag 2. Mef2c stimuliert die Akp2-Expression nur temporär, während Runx2 diese im gesamten Verlauf der Kultur progressiv aktiviert. Col10a1 und Ihh werden in Frühstadien der Differenzierung stärker durch Mef2c, in späteren Stadien stärker durch Runx2 induziert. Integrin binding sialoprotein Ibsp wird durch Mef2c und Runx2 ähnlich schnell – durch Runx2 aber etwas stärker – induziert. Einzig das für den Parathyroid Hormon Rezeptor kodierende Gen Pthr1 wird nur durch Mef2c induziert. Die Expression des endogenen Mef2c nimmt im Verlauf der Differenzierung der Kulturen ab – unabhängig von einer Überexpression von Runx2 oder Mef2c.

gultiert zu werden. Runx2 aktivierte *Col10a1* bis zu $110\times$, während es durch Mef2c knapp $50\times$ aktiviert wurde. Mef2c und Runx2 induzierten die Expression des *Integrin binding Sialoproteins* (*Ibsp*) parallel – Runx2 hatte einen etwas stärkeren Effekt. Die Expression von endogenem Mef2c nahm während der Differenzierung der Kulturen ab – ein besonderer Einfluß durch Runx2 oder Mef2c ließ sich nicht nachweisen. Einzig das Gen des Parathyroid Hormon Rezeptors (*Pthr1*) wurde nur durch die Überexpression von Mef2c induziert.

3.2.6 Expression der MEF2 Transkriptionsfaktoren im Knochen

Zur weiteren Charakterisierung der Rolle von Mef2c in der Skelettentwicklung war es notwendig, die Expression in Skelettelementen zu untersuchen. In Abbildung 3.11 ist die Ex-

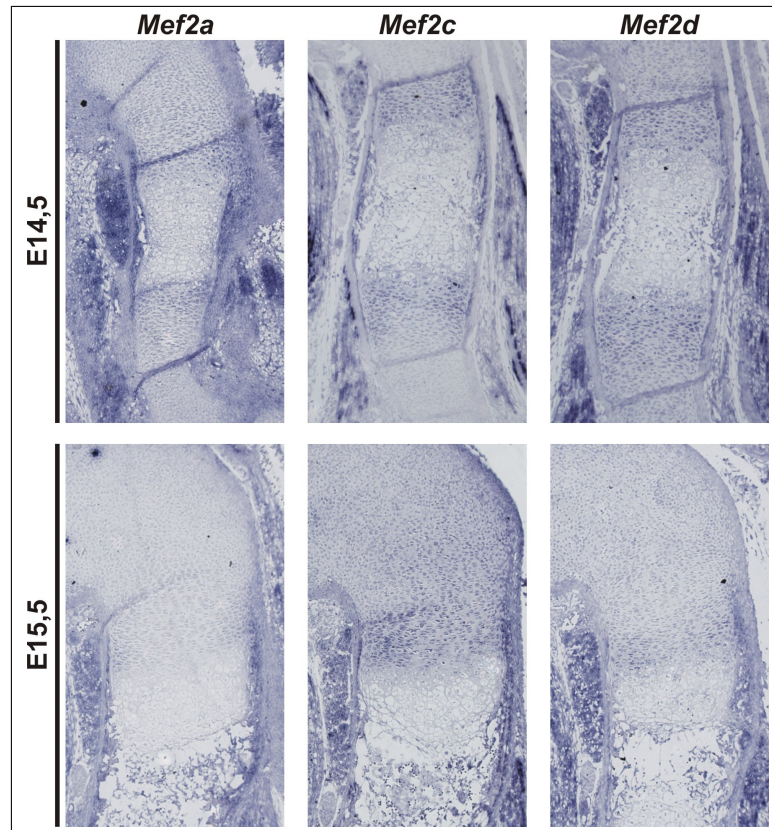


Abbildung 3.11: Expression von *Mef2a*, *Mef2c* und *Mef2d* in Skelettelementen. Gezeigt sind die Expressionsmuster von *Mef2a*, *Mef2c* und *Mef2d* Humeri von 14,5 und 15,5 Tage alten Mausembryonen. Eine Hybridisierung einer Sonde gegen *Mef2b* ergab keine reproduzierbaren Resultate. Eine Sonde gegen *Mef2a* gibt ein deutliches Signal im Muskelgewebe, während es im Bereich des Humerus eher schwach ist. Signal für *Mef2c* lässt sich im Perichondrium, in proliferierendem Säulenknorpel, prähypertrophen und frühen hypertrophen Chondrozyten detektieren. Außerdem gibt es eine starke Expression in an den Enden der Muskelfasern an den Übergängen zu den Sehnen und eine leichte Expression im gesamten Muskel. Die Bereiche mit einer Expression von *Mef2d* im Knochen decken sich mit denen der *Mef2c* Expression – im Muskel wird *Mef2d* in einem anderen Bereich exprimiert, und zwar entlang der Muskelfasern.

pression von *Mef2a*, *c* und *d* gezeigt. Eine *in situ* Hybridisierung gegen mRNA von *Mef2b* ergab keine reproduzierbaren Ergebnisse, so daß hierzu keine Abbildung aufgeführt ist. Alle drei Faktoren wurden in proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten sowie im Bereich des Perichondriums exprimiert. Die Expression von *Mef2a* in den Skelettelementen schien etwas schwächer als die der beiden anderen Faktoren zu sein. Betrachtet man das den Knochen umgebende Muskelgewebe, so zeigten sich deutlich Unterschiede bezüglich der Lokalisation der einzelnen Signale. So fand sich eine sehr starke Expression von *Mef2c* in den Übergangsbereichen zwischen Muskel und Sehnen, aber keine Transkripte von *Mef2a* und *Mef2d*. Letztere waren eher im ganzen Muskel exprimiert.

3.3 Konditionelle Knockouts mit der *Mef2c^{loxP}* Maus

Die Ergebnisse aus den *in vitro* Experimenten führten zu der Vermutung, daß ein Knockout von *Mef2c* einen Skelettphänotyp verursachen könnte. Ein Verlust von *Mef2c* im gesamten Organismus ist im embryonalen Stadium E9,5 letal, da die frühe Herzentwicklung gestört ist [Lin et al., 1997]. Diese KO-Mäuse haben noch keinerlei Skelettanlagen und lassen deswegen keine Rückschlüsse auf die Funktion von *Mef2c* während der Entwicklung des Skeletts zu. Aus diesem Grunde wurden *Mef2c^{loxP}* Mäuse [Vong et al., 2005] eingesetzt, die einen konditionellen Knockout von *Mef2c* erlauben. Diese Mauslinie wurde von John Schwarz (Albany, USA) zur Verfügung gestellt. Das zweite kodierende Exon von *Mef2c* ist bei diesen Mäusen von *loxP* Sequenzen flankiert, so daß das gesamte Exon bei Expression einer *Cre*-Rekombinase herausgeschnitten werden kann (Abb. 3.12). Dies führt zu einem Funktionsverlust, da das zweite Exon die MADS-Box und MEF2-Domäne kodiert. Zur Charakterisierung der Rolle von *Mef2c* in der Skelettentwicklung wurden *Mef2c^{loxP}* Mäuse mit unterschiedlichen Mauslinien verpaart, die jeweils eine *Cre*-Rekombinase unter der Kontrolle eines gliedmaßen- oder skelettspezifischen Promotors exprimieren. Auf diese Weise wurden konditionelle Knockouts von *Mef2c* generiert. Die eingesetzten *Cre*-Linien waren: *Prx1-Cre*, $\alpha(I)$ *Collagen-Cre*, *Col10a1-Cre* und $\alpha1(II)$ *Collagen-Cre*.

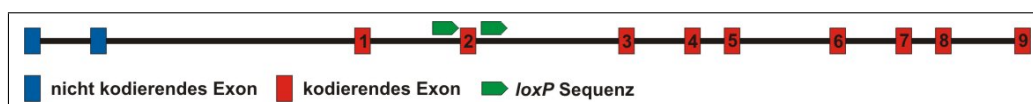


Abbildung 3.12: Position der *loxP*-Sequenzen um das kodierende Exon 2 des murinen *Mef2c*. Durch eine Verpaarung mit einer Maus, die transgen für eine *Cre*-Rekombinase ist, kann das Exon 2 in den Zellen mit der aktiven Rekombinase ausgeschnitten werden. Dies führt zu einem Funktionsverlust und entspricht einem Knockout in den betroffenen Zellen. Nach Vong et al. [2005].

3.3.1 Konditionelle Knockouts von *Mef2c* in Skelettelementen verursachen einen Phänotyp

Prx1Cre und *Col2Cre*

Eine Verkreuzung der *Mef2c^{loxP}* Maus mit einer *Prx1Cre* Maus führt zu einem Knockout in allen Zellen der Gliedmaßen, da der *Prx1* Promotor in allen Vorläuferzellen der Extremitätenknospen aktiv ist. Die homozygoten *Mef2c^{Prx1Cre/KO}* Mäuse zeigten einen Phänotyp mit verkürzten, gekrümmten Gliedmaßen und einen watschelnden Gang. Sie waren aber lebensfähig und zeigten auch mit zunehmendem Alter keine erhöhte Sterblichkeit. Die Böcke waren fertil, während aus Verpaarungen mit mutanten Weibchen kein Nachwuchs hervorging. Heterozygote Tiere zeigten keinen Phänotyp. Abbildung 3.13 verdeutlicht die Störungen in den Knochen der Gliedmaßen. Die Röhrenknochen waren in den homozygoten Mutanten teilweise gekrümmt und verdreht – vor allem Humerus und Ulna erschienen auch verdickt. Die Mineralisation der Knochen war gestört, wobei Unterarm und Unterschenkel

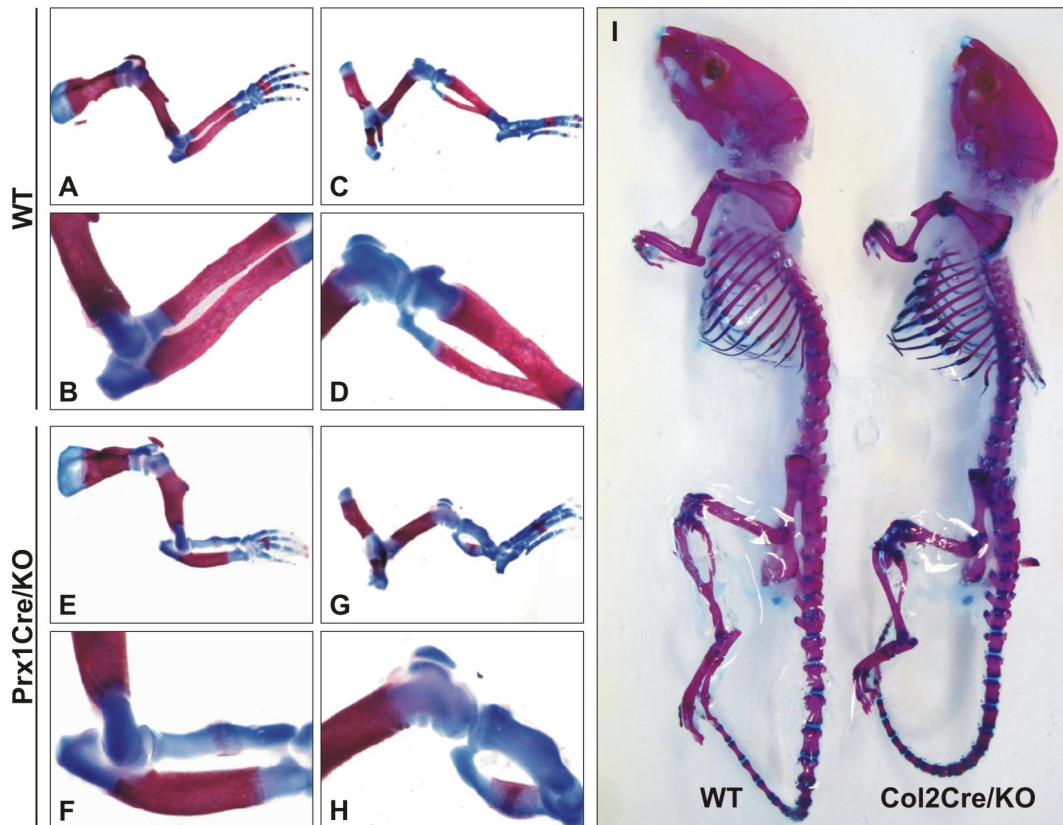


Abbildung 3.13: Gestörte enchondrale Ossifikation als Folge einer konditionellen Deletion von *Mef2c*. **A-H:** Alizarin Red S und Alcian blue Färbung von P0 Wildtyp (A-D) und $Mef2c^{Prx1Cre/KO}$ (E-H) Knochen. In den KO Mäusen sind die langen Knochen verkürzt und erscheinen teilweise verdickt. Unterarm und Unterschenkel scheinen stärker betroffen zu sein als Oberarm und Oberschenkel. Die Mineralisation der Knochen ist besonders in Radius und Tibia gestört. Die KO Knochen zeigen teilweise überschüssige Knorpelbereiche. **I:** Alizarin Red S und Alcian blue gefärbte Skelettpräparation einer 4 Wochen alten Wildtyp Maus im Vergleich zu einer $Mef2c^{Col2Cre/KO}$ Maus. Mit Ausnahme des Schädels sind alle Knorpelbereiche im KO deutlich größer. Die Röhrenknochen zeigen Mineralisation und erscheinen nicht mehr verdickt, sind jedoch kürzer – Radius und Ulna erscheinen verdreht. Die Rippen des KO sind am Übergang zwischen Knorpel und Knochen deutlich verdickt.

stärker betroffen waren – der Radius zeigte überhaupt keine Mineralisation, die Tibia nur sehr wenig. Es zeigten sich teilweise überschüssige Knorpelbereiche. Das axiale Skelett der $Mef2c^{Prx1Cre/KO}$ Mäuse war nicht betroffen, da dort keine Expression der *Cre* Rekombinase stattfand.

Eine Deletion von *Mef2c* in allen Chondrozyten durch Einsatz einer *Col2Cre* Maus führte bei homozygoten KO Mäusen zu einem Phänotyp in allen enchondral gebildeten Knochen. So waren die mutanten Mäuse insgesamt kleiner als ihre Geschwister und sie zeigten auch den gleichen watschelnden Gang wie die $Mef2c^{Prx1Cre/KO}$ Mäuse. Betrachtet man die Skelette dieser Mäuse (Abb. 3.13 I), so wird deutlich, daß alle Skelettelemente, die durch enchondrale Ossifikation gebildet werden, betroffen waren. Sehr auffällig ist, daß bei 4 Wochen alten Mäusen die Knorpelbereiche deutlich prominenter waren – dies zeigt sich besonders an den Wirbelkörpern der Wirbelsäule, an den Übergängen zwischen minerali-

sierten und knorpeligen Bereichen der Rippen und in den Gelenken der Extremitäten. Alle Knochen enchondralen Ursprungs waren im KO kürzer als im WT – sie wirkten aber nicht mehr so deformiert wie in den frühen Stadien. Es scheint, daß der Phänotyp nicht progressiv ist, sondern mit zunehmendem Alter milder wird. Die Verkürzung der Knochen, die schon in frühen Stadien angelegt war, wurde aber nicht mehr ausgeglichen.

3.3.2 Eine Deletion von *Mef2c* verursacht eine Verzögerung der Hypertrophie

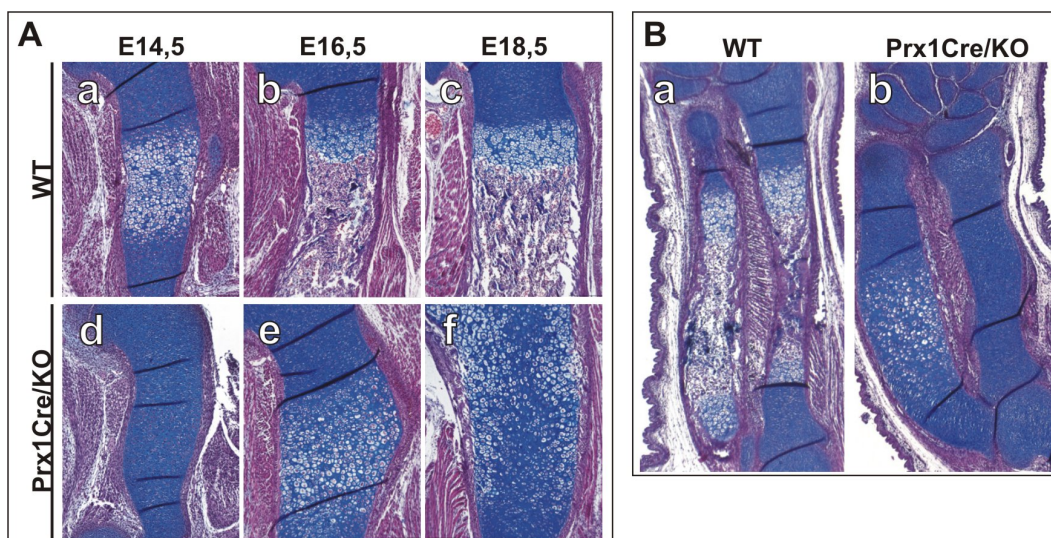


Abbildung 3.14: Verzögerte Hypertrophie in den *Mef2c*^{Prx1Cre/KO} Mäusen. **A:** HE/Alcian blue Färbungen von Paraffinschnitten der Humeri von WT und *Mef2c*^{Prx1Cre/KO} Mäusen zu verschiedenen embryonalen Zeitpunkten. Die Differenzierung der Chondrozyten in den Mutanten ist verzögert, so zeigen sich erst ab dem Stadium E16,5 hypertrophe Bereiche, die aber ungeordnet erscheinen. Zum Zeitpunkt E18,5 scheint die Wachstumsluge um 90° gedreht und zum Perichondrium hin ausgerichtet zu sein. **B:** HE/Alcian blue Färbungen von Radius und Ulna zum Zeitpunkt E16,5. Die mutante Ulna zeigt die gleiche Verzögerung in der Differenzierung der Chondrozyten wie der Humerus, der Radius ist sogar noch stärker beeinträchtigt – es gibt noch keinerlei hypertrophe Chondrozyten. Zwischen Radius und Ulna der Kontrolltiere lässt sich kein Entwicklungsunterschied feststellen.

Zur genaueren Analyse der Auswirkung des KO wurden histologische Färbungen der Humeri verschiedener embryonaler Stadien von *Mef2c*^{Prx1Cre/KO} und Wildtyp Mäusen angefertigt und miteinander verglichen (Abb. 3.14). Sie verdeutlichen, daß die gestörte enchondrale Ossifikation im KO durch eine Verzögerung und Störung der Hypertrophie der Chondrozyten bedingt war. Während in den Kontrolltieren bereits zum Zeitpunkt E14,5 hypertrophe Chondrozyten sichtbar waren, gab es in den Mutanten keinerlei Chondrozytendifferenzierung zu verzeichnen (Abb. 3.14 Aa & Ad). Gleichzeitig erschien die Knorpelanlage des mutanten Humerus kleiner und damit im Wachstum verzögert zu sein. Zum Zeitpunkt E16,5 war in den Kontrolltieren schon trabekulärer Knochen und eine Markhöhle nachweisbar – im mutanten Knochen waren nun über einen großen Bereich hypertrophe Chondrozyten zu erkennen, aber noch keinerlei Gefäßinvasion, die ein Einwandern von Osteoblasten er-

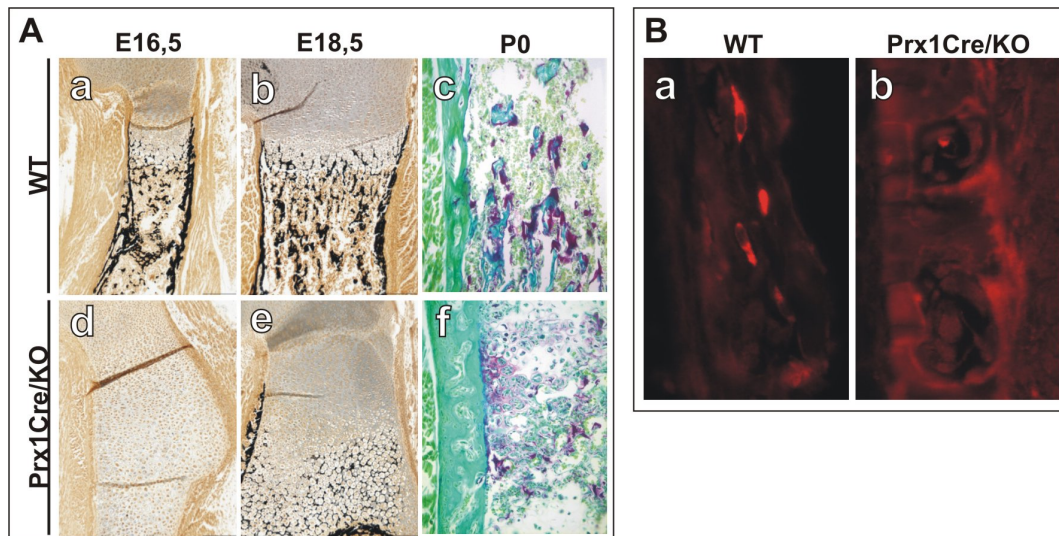


Abbildung 3.15: Verzögerte Mineralisation und Osteoklasteninvasion als Folge der Deletion von *Mefc*. **A:** von Kossa und TRAP (Ac & Af) Färbungen histologischer Schnitte der Humeri von WT und *Mef2c^{Prx1Cre/KO}* Mäusen zu verschiedenen Stadien. Im Humerus der Kontrolltiere lässt sich zum Zeitpunkt E16,5 bereits trabekulärer und kortikaler Knochen nachweisen, während in den Mutanten noch keinerlei Mineralisation stattgefunden hat. Zum Zeitpunkt E18,5 ist in den Mutanten immer noch kein trabekulärer Knochen vorhanden, der kortikale hingegen ist mineralisiert und deutlich dicker als im Wildtyp. Zusätzlich ist die Matrix, welche die hypertrophen Chondrozyten umgibt mineralisiert. *Mef2c* KO Humeri zeigen weniger Osteoklastenaktivität. TRAP/Lichtgrün Färbung von histologischen Schnitten der Humeri neugeborener Wildtyp (Ac) und *Mef2c^{Prx1Cre/KO}* (Af) Mäuse. Die Anzahl TRAP positiver Zellen (violett) ist im KO reduziert und auf einen Bereich in der Nähe der Kortikalis begrenzt. Im WT findet sich Signal im Bereich der Trabekel. Gut zu erkennen ist die im KO massiv verdickte Kortikalis und eine reduzierte TRAP-Aktivität. **B:** Immunhistochemie gegen Sclerostin zum Zeitpunkt E18,5. In der Kortikalis der mutanten Knochen ist kein Sclerostin nachweisbar, während es in den Osteozyten der Kontrolltiere im Cytoplasma vorliegt.

möglichen könnte. Anhand der von Kossa Färbungen, mit denen mineralisiertes Gewebe nachzuweisen ist, ist zu erkennen, daß im mutanten Knochen noch keinerlei Mineralisation stattgefunden hatte, während im Wildtyp das primäre Ossifikationszentrum und der kortikale Knochen angelegt waren (Abb. 3.15 Aa & Ad). Der mutante Knochen wirkte zudem deutlich verdickt. Erste mineralisierte Bereiche zeigten sich im mutanten Knochen im Stadium E18,5 – hier waren nun die hypertrophen Chondrozyten von mineralisierter Matrix umgeben – trabekulärer Knochen war aber noch nicht vorhanden. Der mineralisierte kortikale Knochen hingegen wirkte deutlich massiver, aber auch löchriger als im Wildtyp. Die Wachstumsfuge erschien weniger geordnet und die Chondrozyten zeigten eine um 90° gedrehte Anordnung in Richtung des kortikalen Knochens. Es waren noch keine Anzeichen einer beginnenden Gefäßinvasion oder eines Abbaus der hypertrophen Chondrozyten zu erkennen. Bei Betrachtung des distalen Bereichs (Radius und Ulna) wird deutlich, daß der Radius noch stärker verzögert war als die Ulna (Abbildungen 3.14 B. Während zum Zeitpunkt E16,5 in der mutanten Ulna schon hypertrophe Chondrozyten vorhanden waren, fehlten diese im Radius komplett. In Leupin et al. [2007] wurde gezeigt, daß *Mef2c* die Expression von *Sclerostin/Sost* über einen Enhancerbereich reguliert. Da *Sost* als negativer

Regulator der Mineralisation bekannt war [van Bezooijen et al., 2004], wurden die kortikalen Knochen auf Sclerostin untersucht. Wie in Abbildung 3.15 B zu erkennen ist, war in den mutanten Knochen kein Sclerostin nachzuweisen.

Um zu untersuchen, ob die Anhäufung der hypertrophen Chondrozyten in der Wachstumsfuge aufgrund verringerter Aktivität oder auch Anzahl der Osteoklasten geschieht, wurden TRAP-Färbungen auf den Humeri Neugeborener Wildtyp und KO Mäuse angefertigt. Dies geschah in Zusammenarbeit mit Jirko Kühnisch (Institut für Medizinische Genetik, Charité Berlin). Bei diesen Färbungen wird das Enzym Tartrat resistente saure Phosphatase (TRAP) – ein Marker für die Aktivität von Osteoklasten – durch eine Farbreaktion nachgewiesen. In Abbildung 3.15 Ac & Af ist zu erkennen, daß im KO deutlich weniger Zellen positiv für die TRAP waren. Die wenigen positiven Zellen befanden sich in einer eng begrenzten Zone in der Mitte des Humerus dicht am kortikalen Knochen, während sie im Wildtyp über die gesamte Breite des Knochens um die Trabekel herum lagen. Durch die Gegenfärbung mit Lichtgrün, welches Knochen und Bindegewebe färbt, wird auch der Unterschied in der Dicke des kortikalen Knochens zwischen WT und KO deutlich.

3.3.3 Eine Deletion von *Mef2c* in hypertrophen Chondrozyten und Osteoblasten hat keine Auswirkungen

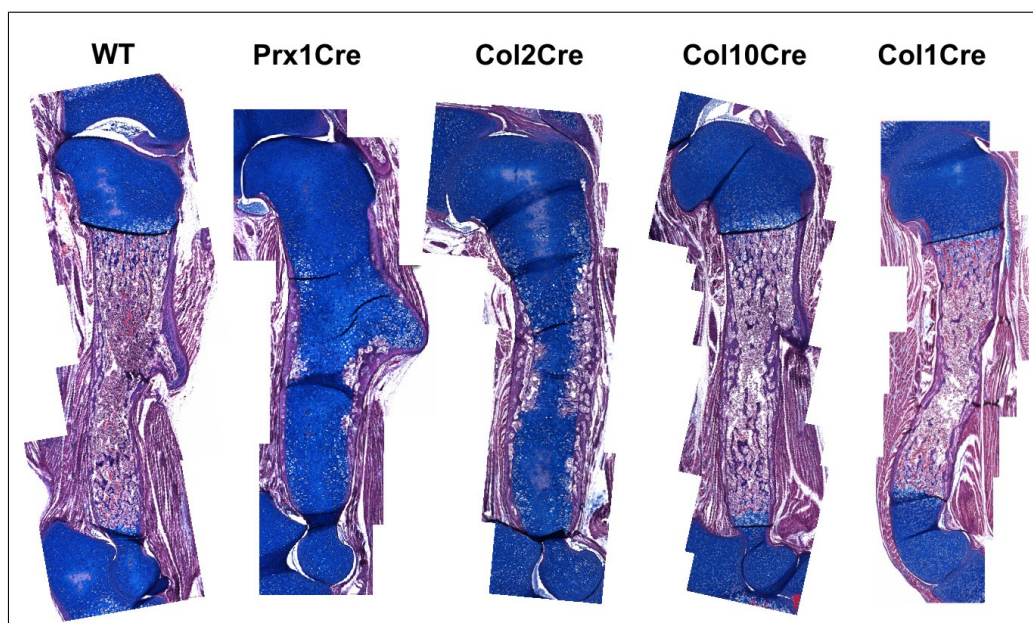


Abbildung 3.16: Vergleich aller konditionellen KOs. HE+Alcian Blue Färbungen von Humeri neugeborener Mäuse. Nur ein Knockout von *Mef2c* in der Extremitätenknospe (*Prx1Cre*) und in frühen Chondrozyten (*Col2Cre*) führt zu einem Phänotyp, Knockouts in hypertrophen Chondrozyten (*Col10Cre*) und Osteoblasten (*Col1Cre*) haben keine Auswirkungen auf die Entwicklung der Knochen. In den betroffenen Humeri sind die Drehung der Wachstumsfuge zum kortikalen Knochen und die Störung in der Gefäßinvasion und im Abbau der hypertrophen Knorpelmatrix gut zu erkennen.

Um einzugrenzen, in welchen Zelltypen die Deletion von *Mef2c* zu einem Effekt führt, wur-

den weitere konditionelle Knockouts durch Verkreuzung mit zusätzlichen *Cre*-Mauslinien generiert, die in unterschiedlichen Zelltypen zu einer Deletion führen. Abbildung 3.16 zeigt Histologien der Humeri neugeborener Wildtyp Mäuse im Vergleich zu denen aller konditionellen KOs. Nur *Mef2c^{Prx1Cre/KO}* und *Mef2c^{Col2Cre/KO}* zeigten einen Phänotyp. Auch hier ist die enorme Verbreiterung des kortikalen Knochens in den betroffenen Mutanten zu erkennen. Außerdem schienen der Abbau der hypertrophen Chondrozyten und die Gefäßinvasion sehr unregelmässig und vorerst nur in Randbereichen stattzufinden. *Mef2c^{Col1Cre/KO}* und *Mef2c^{Col10Cre/KO}* Mäuse waren nicht betroffen – eine Deletion in hypertrophen Chondrozyten oder Osteoblasten schien also ohne Folgen zu sein. Dadurch liegt die Vermutung nah, daß *Mef2c* eine Rolle in der Differenzierung der Chondrozyten bis hin zur Hypertrophie – nicht aber in reifen Chondrozyten oder Osteoblasten – egal welchen Stadiums – spielt.

3.3.4 *Mef2c^{loxP/KO}* Mäuse entwickeln in älteren Stadien eine abnorme Wachstumsfuge

Zur weiteren Charakterisierung der Auswirkungen einer Deletion von *Mef2c* wurden auch die Knochen von 4 und 8 Wochen alten Tieren untersucht. Die Knochendichte wurde in Zusammenarbeit mit Ina Kramer (Novartis, Basel) per μ CT analysiert. Zusätzlich fertigte Jirko Kühnisch histologische Färbungen von Schnitten nicht entkalkter Knochenproben nach Einbettung in Methacrylat an. Die Abbildung 3.17 veranschaulicht die Situation im Femur 4 Wochen alter Mäuse. Die von Kossa Färbungen der distalen Wachstumsfuge des Femurs verdeutlichen, daß die mutanten Knochen eine mehr als viermal breitere Wachstumsfuge besaßen, die hauptsächlich aus hypertrophen Chondrozyten gebildet wurde (Abb. 3.17 A-D). Das sekundäre Ossifikationszentrum war nur rudimentär angelegt – es bestand überwiegend aus hypertrophen Chondrozyten, die von einer mineralisierten Matrix umgeben waren. Die Diaphyse des mutanten Knochens hatte sich weitestgehend normalisiert – es waren trabekulärer Knochen und eine Markhöhle vorhanden. Trotz der enorm verbreiterten Wachstumsfuge waren die mutanten Knochen ca. 20 % kürzer als die der unbeeinträchtigten Mäuse. Die μ CT Bilder (Abb. 3.17 H-J) zeigen, daß die Verdickung der kortikalen Knochen in den *Mef2c^{Prx1Cre/KO}* und den *Mef2c^{Col2Cre/KO}* Mäusen nicht mehr so stark ausgeprägt war wie bei den Neugeborenen Mäusen.

Die Analyse der Femora von 8 Wochen alten Mäusen zeigt, daß die Wachstumsfuge in den *Mef2c^{Prx1Cre/KO}* Mäusen weiterhin abnorm verbreitert war (Abb. 3.18 A & B). Das sekundäre Ossifikationszentrum war nur zu einem Teil mit trabekulärem Knochen angelegt, der größere Teil bestand noch aus von mineralisierter Matrix umgebenen hypertrophen Chondrozyten. Insgesamt wirkte es unorganisiert. Anhand der 3D Rekonstruktionen wird deutlich, daß die mutanten Knochen weiterhin verkürzt und breiter waren (Abb. 3.18 C-F). Ein Querschnitt durch die Knochen zeigt, daß die Verdickung der Kortikalis in der Mutante weiter zurückgegangen war (Abb. 3.18 G & H).

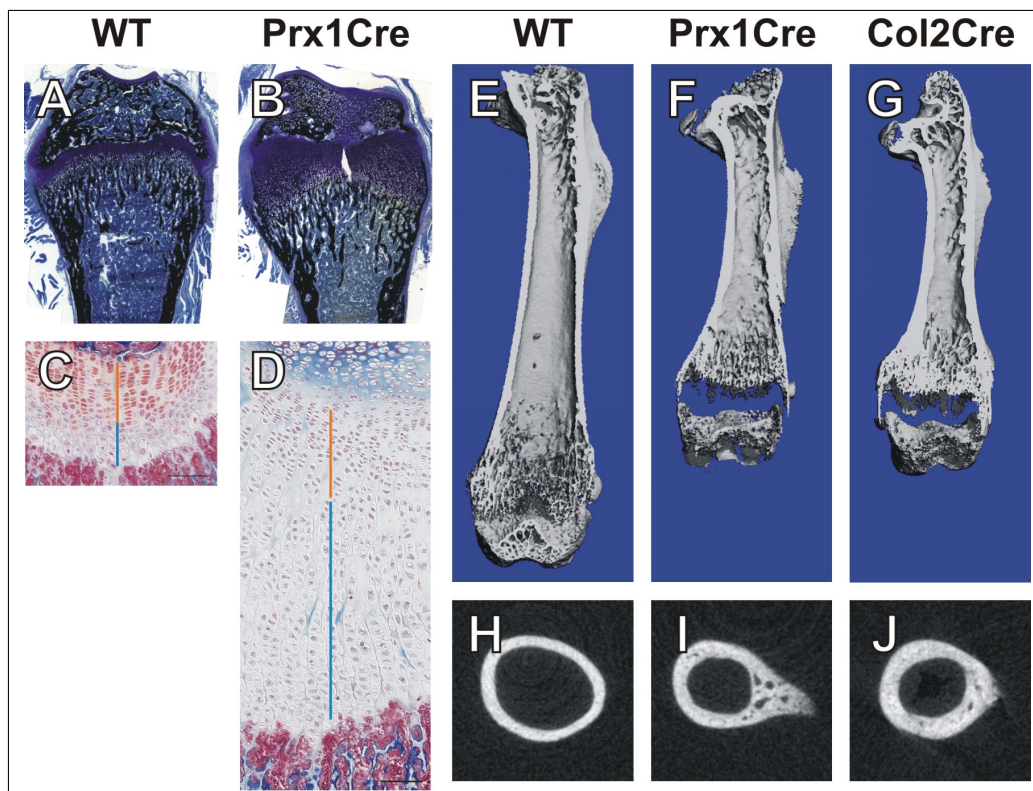


Abbildung 3.17: Abnorme Morphologie der *Mef2c*^{JoxP/KO} Knochen im Alter von 4 Wochen. **A & B:** von Kossa Färbungen der distalen Wachstumsfuge im Femur. In den Mutanten ist die Wachstumsfuge extrem verbreitert, ein sekundäres Ossifikationszentrum ist nur rudimentär angelegt und besteht hauptsächlich aus mineralisiertem hypertrophem Knorpel. **C & D:** direkter Vergleich der Wachstumsfugen. Orange: proliferierende Chondrozyten, blau: hypertrophe Chondrozyten. Im KO sind beide Zonen breiter als im WT, die hypertrophe Zone ist mehr als viermal so breit. **E-G:** μ CT Rekonstruktionen der Femora zeigen eine Verkürzung um 20 %, eine Verdickung des kortikalen Knochens und eine Verbreiterung der Wachstumsfugen in den *Mef2c*^{Prx1Cre/KO} (F) und *Mef2c*^{Col2Cre/KO} (G) Mäusen. Ein Querschnitt durch den Femur veranschaulicht zusätzlich die Verdickung der Kortikalis in den Mutanten (H-J), die aber nicht mehr so stark wie bei den Neugeborenen ist.

3.3.5 Die Expression von Markergenen ist in den *Mef2c*^{Prx1Cre/KO} Mäusen verzögert.

Zur Analyse der Vorgänge, die auf molekularer Ebene durch die Deletion von *Mef2c* beeinträchtigt werden, wurde die Expression verschiedener für die Skelettentwicklung relevanter Markergene untersucht. Hierzu wurden *in situ* Hybridisierungen (ISH) mit Sonden gegen Transkripte dieser Gene auf Paraffinschnitten der Arme verschiedener Entwicklungsstadien durchgeführt. Ein Teil dieser Arbeiten wurde von Ines Dabow im Zuge ihrer Diplomarbeit [Dabow, 2008] durchgeführt. Wie in den Abbildungen 3.19-3.23 zu sehen ist, war die Expression der untersuchten Markergene in den *Mef2c*^{Prx1Cre/KO} Mäusen während der untersuchten Stadien gegenüber den jeweiligen Kontrolltieren stark verändert.

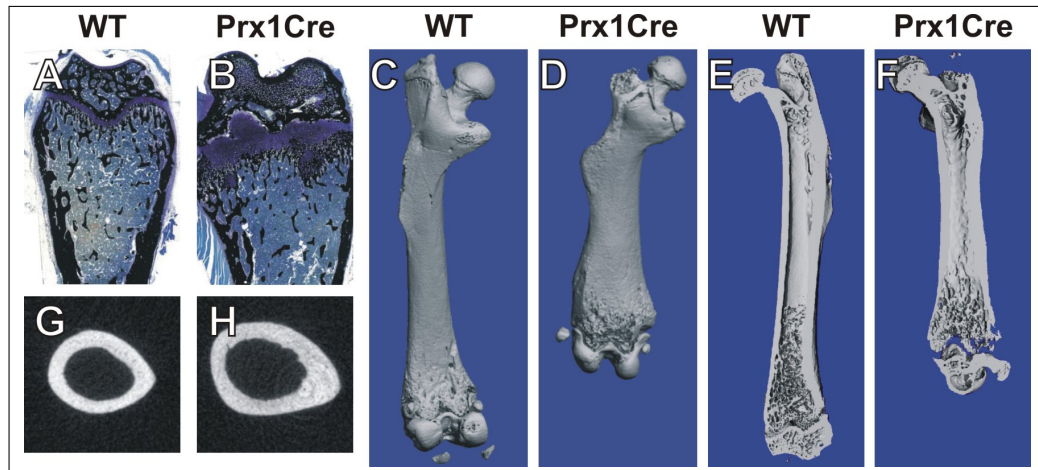


Abbildung 3.18: Die Wachstumsfuge in 8 Wochen alten *Mef2c^{Prx1Cre/KO}* Mäusen bleibt weiterhin verändert. **A & B:** die mutante Wachstumsfuge ist weiterhin verbreitert, wenn auch weniger stark als bei 4 Wochen alten Tieren. Sie wirkt weiterhin sehr unregelmässig und auch das sekundäre Ossifikationszentrum bleibt gestört. **C-F:** die 3D Rekonstruktionen zeigen, daß die Verkürzung des mutanten Knochens um 20 % bestehen bleibt – er wirkt insgesamt gedungen. Im Querschnitt ist der Schaft des mutanten Knochens nicht mehr so stark verdickt wie noch bei 4 Wochen alten Tieren (G & H).

Expression von Markergenen im embryonalen Stadium E14,5

Im embryonalen Stadium E14,5 (Abb. 3.19) zeigte sich eine deutliche Verzögerung aller Differenzierungsmarker – teilweise waren sie auch komplett abwesend. Der undifferenzierte Zustand der Knorpelanlage wird anhand der Expression von *Typ II Kollagen (Col2a1)* deutlich: im mutanten Humerus waren alle Zellen noch positiv, während im WT Humerus schon eine Differenzierung der Chondrozyten stattgefunden hatte und *Typ II Kollagen* nur noch in Zellen an den beiden Enden des Humerus exprimiert wurde. Dementsprechend war jegliches Transkript für *Typ X Kollagen* – einem Marker hypertropher Chondrozyten – in den Mutanten abwesend. Auch die Alkalische Phosphatase (*Akp2*), die einen Einfluß auf die Phosphatkonzentration hat [Fedde et al., 1999], wurde im Humerus der mutanten Mäuse nur sehr schwach im Perichondrium exprimiert, während sie in den Kontrollen im Bereich des gesamten Perichondriums sehr stark und in den prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten nachzuweisen war. *Runx2* als einer der Haupttranskriptionsfaktoren für die Differenzierung von Chondrozyten und Osteoblasten, war in den Mutanten insgesamt nur sehr schwach und in einem unregelmässigen Muster exprimiert. Es schien auch ein leicht stärkeres Signal an den Randbereichen der Knorpelanlage und im Perichondrium nachweisbar zu sein. Im Wildtyp war *Runx2* sehr stark im Perichondrium und in den prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten exprimiert. Entsprechend der schwachen Expression von *Runx2* ist auch *Osterix (Osx)* – ebenfalls ein für die Osteoblastendifferenzierung notwendiger Transkriptionsfaktor – sehr schwach exprimiert. Schwach positive Zellen finden sich ebenfalls an der Grenze zum Perichondrium. *Osterix* wird in seiner Expression direkt durch *Runx2* reguliert [Nakashima et al., 2002], was sich auch in den Expressionsmustern widerspiegelt. Etwas uneindeutiger verhält es sich mit der Expression von *Dlx5*,

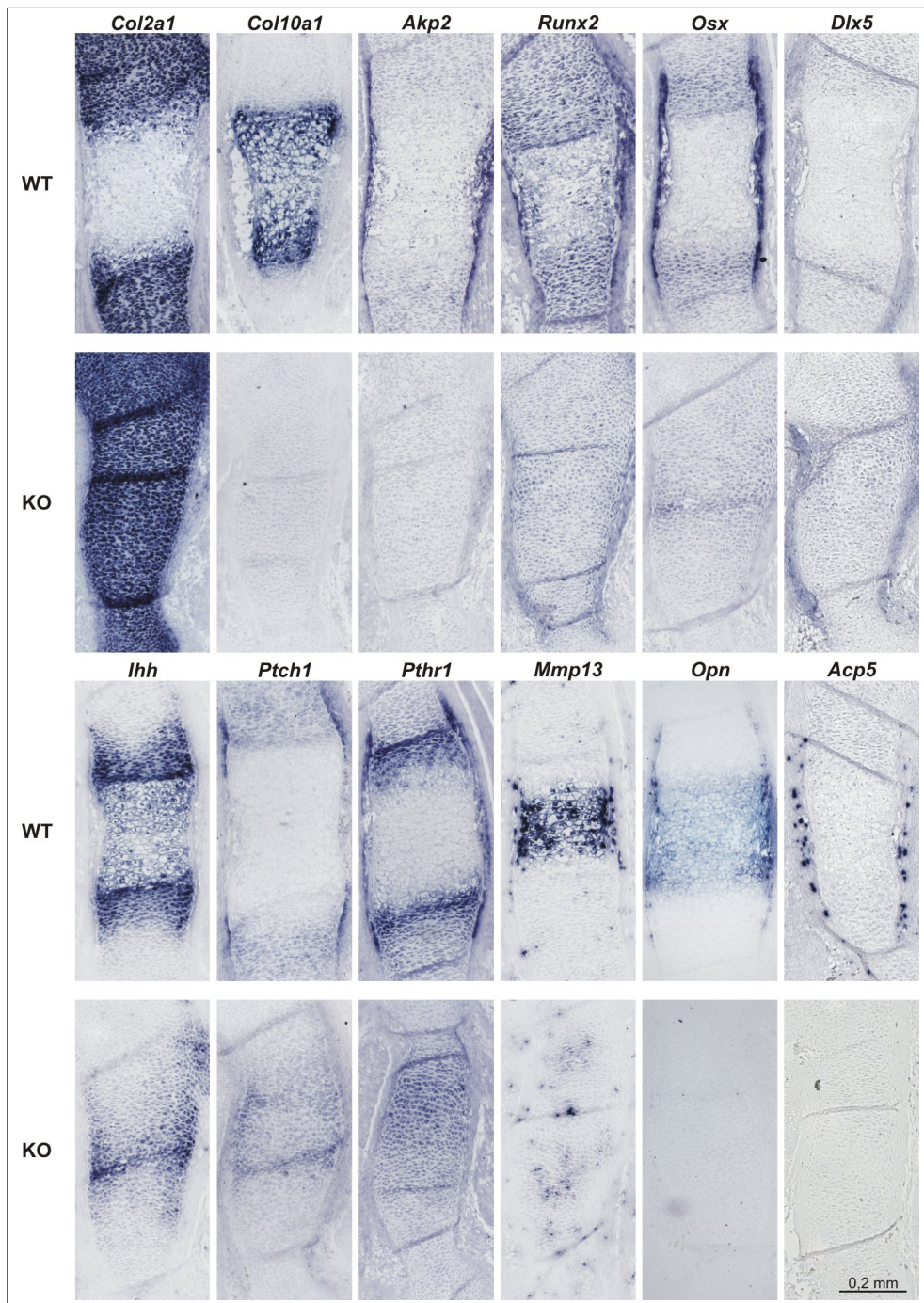


Abbildung 3.19: Verzögerte hypertrophe Differenzierung durch die Deletion von *Mef2c*. Die Expression der untersuchten Markergene ist in den *Mef2c^{Prx1Cre}/KO* Mäusen zum Zeitpunkt E14,5 verzögert, gestört oder fehlt völlig. Der undifferenzierte Zustand des mutanten Knorpels ist anhand der durchgängigen Expression von *Col2a1* und der Abwesenheit jeglichen *Col10a1* Transkripts zu erkennen. Auch die alkalische Phosphatase (*Akp2*) wird noch nicht exprimiert. Die Expression wichtiger Transkriptionsfaktoren wie *Runx2* und *Osterix (Osx)* ist sehr schwach und unregelmässig über den Knorpel verteilt – im Perichondrium fehlt sie ganz. Lediglich *Dlx5* scheint im KO stärker exprimiert zu sein. Indian Hedgehog (*Ihh*) als einer der frühesten Differenzierungsmarker wird in der Mitte des Knorpellements und seitlich zum Perichondrium hin exprimiert – die Expressionsdomäne erscheint gedreht. Eine Aufspaltung in zwei Zonen wie im WT hat noch nicht stattgefunden. Die Expression von *Patched (Ptch1)* zeigt ein ähnliches Muster wie *Ihh* – das Gen für den PTH-related-Peptid-Rezeptor (*Pthr1*) wird über einen breiten Bereich exprimiert. Beide Gene werden nicht im Perichondrium exprimiert. Osteopontin (*Opn*) und die Matrix Metalloproteinase 13 (*Mmp13*) als Marker terminal hypertropher Chondrozyten sind im KO noch nicht nachzuweisen. Das Fehlen von Signal für TRAP (*Acp5*) verdeutlicht die Abwesenheit von Osteoklasten.

einem weiteren wichtigen Transkriptionsfaktor während der Knochenentwicklung. *Dlx5* aktiviert nach Bmp2 Stimulus die Expression von *Runx2* und auch von *Osx* [Lee et al., 2003a,b] – eine Veränderung der Expression von *Dlx5* sollte also auch gleichzeitig mit Veränderungen in den Mustern von *Runx2* und *Osx* einhergehen. Im Humerus der Mutante war eine schwache Expression von *Dlx5* nachweisbar, die im Perichondrium sogar stärker als im WT zu sein schien. *Indian hedgehog (Ihh)* ist ein sezerniertes Morphogen, welches vornehmlich von prähypertrophen Chondrozyten exprimiert wird. Es diffundiert unter Bildung eines Konzentrationsgradienten in Richtung des artikulären Knorpels und des Perichondriums. Die Bindung an seinen Rezeptor Patched (*Ptch1*) [Chen und Struhl, 1996] löst eine Signalkaskade aus, die zu der Expression des *Parathyroid hormone related protein (PTHrP)* führt, welches wiederum ein sezernierter Faktor ist, der nun seinerseits unter Bildung eines Gradienten in das umliegende Gewebe diffundiert. PTHrP bindet an seinen Rezeptor *Pthr1*, der neben proliferierenden und frühen prähypertrophen Chondrozyten auch Zellen des Perichondriums exprimiert wird, was zu einer Hemmung der Differenzierung dieser Zellen führt. Es entsteht eine negative Rückkopplungsschleife, durch die die Rate gesteuert wird, mit der proliferierende Chondrozyten zu differenzieren beginnen [Vortkamp et al., 1996]. Betrachtet man nun die Expressionsmuster dieser Gene in der Mutante, so fällt auf, daß *Ihh* in einem scheinbar um 90° gedrehten Muster entlang der dem Perichondrium zugewandten Seiten der Knorpelanlage exprimiert wurde. Die Stärke des Signals nahm auch von der Mitte zum Perichondrium hin zu, so daß ein Konzentrationsgradient vorzuliegen schien. Ähnlich verhielt es sich mit *Ptch1* – auch hier war die Expressionsdomäne um 90° gedreht und am das Signal direkt neben dem Perichondrium am stärksten. Im Perichondrium selbst war so gut wie kein Transkript nachzuweisen – dort war die Signalstärke im WT am höchsten. Signal für das Transkript von *Pthr1* fand sich im gesamten mittleren Bereich der Knorpelanlage, aber einzelne Zellen stachen durch ein deutlich stärkeres Signal hervor, so daß das Expressionsmuster gestört wirkte. Auch bei *Pthr1* fehlte die Expression im Perichondrium völlig. *Osteopontin (Opn)*, ein Marker terminal hypertropher Chondrozyten und unreifer Osteoblasten, wurde im WT im Bereich des hypertrophen Knorpels und im Perichondrium in den Zonen einwandernder mesenchymaler Osteoblastenvorläufer exprimiert – in der Mutante fehlte jegliches Signal. Dies zeigt ebenfalls, daß zu diesem Zeitpunkt keine Reifung der Chondrozyten stattgefunden hat und daß auch noch keine mesenchymalen Osteoprogenitorzellen in das Perichondrium eingewandert sind. Die Hybridisierung einer Sonde gegen die mRNA der Matrix Metalloproteinase 13 (*Mmp13*), die von terminal hypertrophen Chondrozyten und Osteoblasten exprimiert wird, gab im mutanten Humerus schwache Signale in undifferenzierten Chondrozyten. Vergleicht man diese mit denen im Wildtyp Humerus und in den Humeri betroffener Neugeborener (Abb. 3.21), so erscheint es wahrscheinlich, daß es sich bei diesen Signalen um Artefakte handelt. Die Expression von *Mmp13* wird direkt durch *Runx2* und AP-1 Faktoren reguliert, welche wiederum durch TGF- β und das Parathormon (PTH) reguliert werden [Hess et al., 2001; Jiménez et al., 2001, 1999; Porte et al., 1999]. Das Fehlen der Expression von *Mmp13* war also in Übereinstimmung mit der schwachen und diffusen Expression von *Runx2*. *Mmp13* ist am Verdau der

Knorpelmatrix beteiligt und bereitet somit den Weg für die Einwanderung der Osteoklasten. Zusätzlich verstärkt die *Mmp13* die Aktivität der durch die Osteoklasten sezernierten *Mmp9* indem sie das Propeptid in seine aktive Form spaltet [Dreier et al., 2004]. Als Markergen für Osteoklasten wurde die Expression des Enzyms Tartrat resitente saure Phosphatase (TRAP, *Acp5*) untersucht. Im Wildtyp zeigte sich Signal im Bereich des Perichondriums, in das erste Osteoklasten eingewandert waren. In der Mutante war keinerlei Transkript nachzuweisen – ein Hinweis auf die Abwesenheit von Osteoklasten. Zusammenfassend lässt sich sagen, daß in den *Mef2c^{Prx1Cre/KO}* Mäusen zum Zeitpunkt E14,5 die Chondrozytendifferenzierung verzögert war. Ursächlich könnte die schwache und diffuse Expression von *Runx2* sein, welches durch die direkte Regulation der Transkription von *Ihh*, *Mmp13* und *VEGF* [Zelzer et al., 2001] neben der Hypertrophie der Chondrozyten ein Einwandern von Blutgefäßen und Osteoklasten steuert. *Mef2c* ist bekannt als transkriptioneller Regulator von *Vegf* und *Angiopoietin 1 (Ang1)* während der Herzentwicklung [Bi et al., 1999b] – dieser Zusammenhang könnte auch in der Skelettentwicklung bestehen, so daß eine Deletion von *Mef2c* ebenfalls zu einer Störung der *Vegf* Expression führen könnte.

Expression von Markergenen bei Neugeborenen

Zum Zeitpunkt der Geburt (P0) waren die mutanten Knochen in der Entwicklung immer noch verzögert, so daß vor allem kein trabekulärer Knochen angelegt und damit Osteoblasten hauptsächlich im kortikalen Knochen vorhanden waren. Wie in Abbildung 3.16 zu erkennen ist, gab es aber an den dem kortikalen Knochen zugewandten Rändern des Knorpels erste Zeichen eines Matrixabbaus und der Gefäßinvasion. Es waren schon hypertrophe Bereiche im Knorpel ausgebildet, die aber deutlich größer als im Wildtyp waren. *Runx2* war in den Kontrolltieren in den prähypertrophen sowie hypertrophen Chondrozyten und in den Osteoblasten im trabekulären Knochen exprimiert (Abb. 3.20). Im Perichondrium, in dem noch zum Zeitpunkt E14,5 Expression zu beobachten war, war nun kein Signal mehr zu detektieren. In der Mutante gab es nun eine deutlichere *Runx2* Expression, die sich über den prähypertrophen und hypertrophen Bereich des Knorpels sowie Teile des kortikalen Knochens erstreckte. Dadurch, daß die gesamte Diaphyse von hypertrophen Chondrozyten ausgefüllt war, war die *Runx2* positive Domäne sehr groß. Ähnliches gilt für das Transkript von *Col10a1* – im mutanten Humerus war es in den großen hypertrophen Bereichen sehr stark vorhanden, während es sich im Wildtyp auf den kleinen Streifen hypertropher Chondrozyten in der Wachstumsfuge beschränkte. Das Expressionsmuster von *Ihh* war in der Mutante sehr unregelmäßig – es erstreckte sich weiter in den Bereich der Hypertrophie hinein als im WT und schien in den Randbereichen zum kortikalen Knochen hin an Stärke zuzunehmen. In den Kontrolltieren war die Expression von *Ihh* sehr klar auf die prähypertrophen Chondrozyten und wenige hypertrophe Chondrozyten begrenzt. Die Expression von *Ptch1* war in den Mutanten weitestgehend normal. *Ptch1* ließ sich in einer sehr breiten Zone proliferierender und prähypertropher, aber auch in einigen hypertrophen Chondrozyten detektieren. Im Wildtyp war die *Ptch1* positive Zone sehr viel schmaler, aber es gab zusätzlich noch Expression in den Osteoblasten des trabekulären Knochens. Tran-

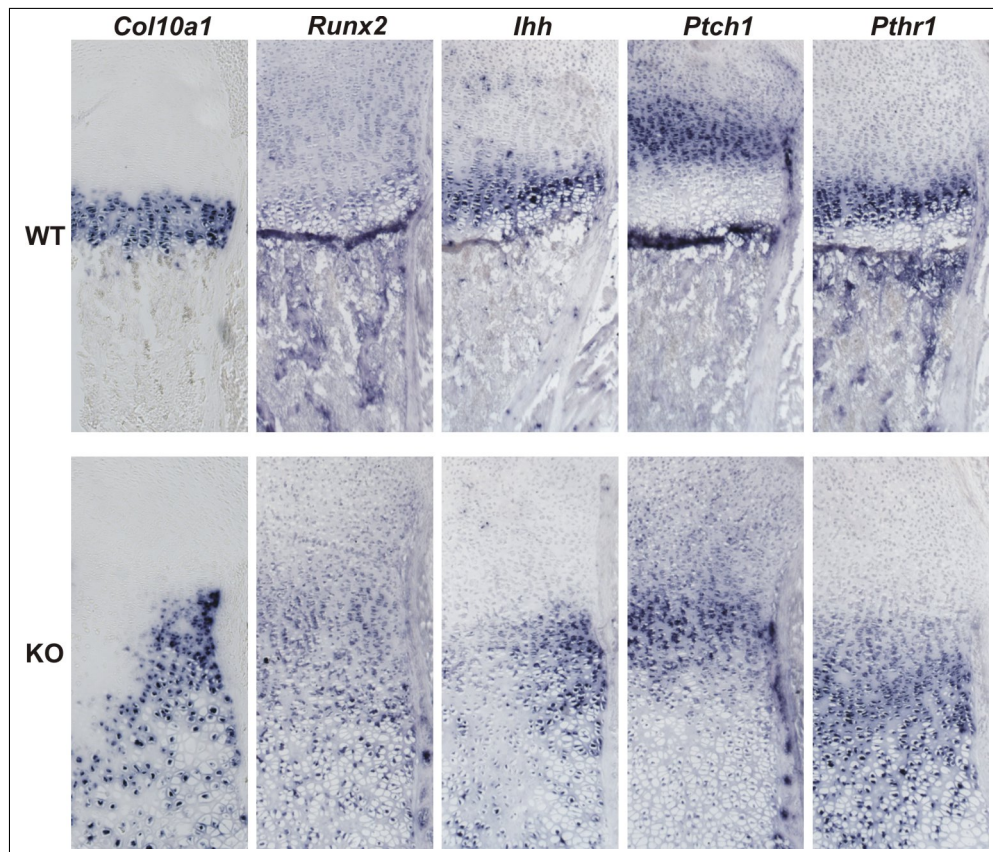


Abbildung 3.20: Expression von Markergenen in Humeri von neugeborenen Mäusen – Teil 1. Die Expressionsdomänen aller Gene außer Patched (*Ptch1*) sind in den Mutanten gegenüber dem Wildtyp verbreitert. Eine hypertrophe Differenzierung hat nun stattgefunden, wie an der Expression von *Col10a1* zu erkennen ist – allerdings wirkt das Expressionsmuster unorganisiert. *Runx2* wird nun ebenfalls exprimiert, aber in ähnlich gestörter Weise wie *Col10a1*. Indian Hedgehog (*Ihh*) exprimierende Zellen zeigen weiterhin eine Ausrichtung zum Perichondrium – zusätzlich lässt sich auch Signal in hypertrophen Chondrozyten nachweisen. Wenig betroffen scheint die Expression von Patched (*Ptch1*) zu sein – im Gegensatz zu *Pthr1*, welches in einem sehr breiten Bereich prähypertropher und hypertropher Chondrozyten nachzuweisen ist.

skript für *Typ I Kollagen (Col1a1)* war im mutanten Humerus im kortikalen Knochen und schwach in einer Zone beginnender Gefäßinvasion nachzuweisen (Abb. 3.21). In Übereinstimmung mit dem Fehlen trabekulären Knochens gab es in der Mutante *Opn* Expression hauptsächlich im mineralisierten kortikalen Knochen – in wenigen hypertrophen Zellen im Zentrum der Diaphyse ließ die Expression von *Opn* auf das Vorhandensein terminal hypertropher Chondrozyten schließen. Dementsprechend war auch die Expression von *Mmp13* im mutanten Humerus nur in sehr wenigen Zellen nachzuweisen: im kortikalen Knochen und in wenigen terminal hypertrophen Chondrozyten im Zentrum der Diaphyse. Ein Signal für *Mmp9* als von Osteoklasten sezernierte Kollagenase ließ sich im Wildtyp im Bereich des trabekulären Knochens und schwach im Periost nachweisen, in der Mutante fand sich Transkript im kortikalen Knochen und im Zentrum der hypertrophen Zone, wo vermutlich eine erste Gefäßinvasion stattgefunden hatte.

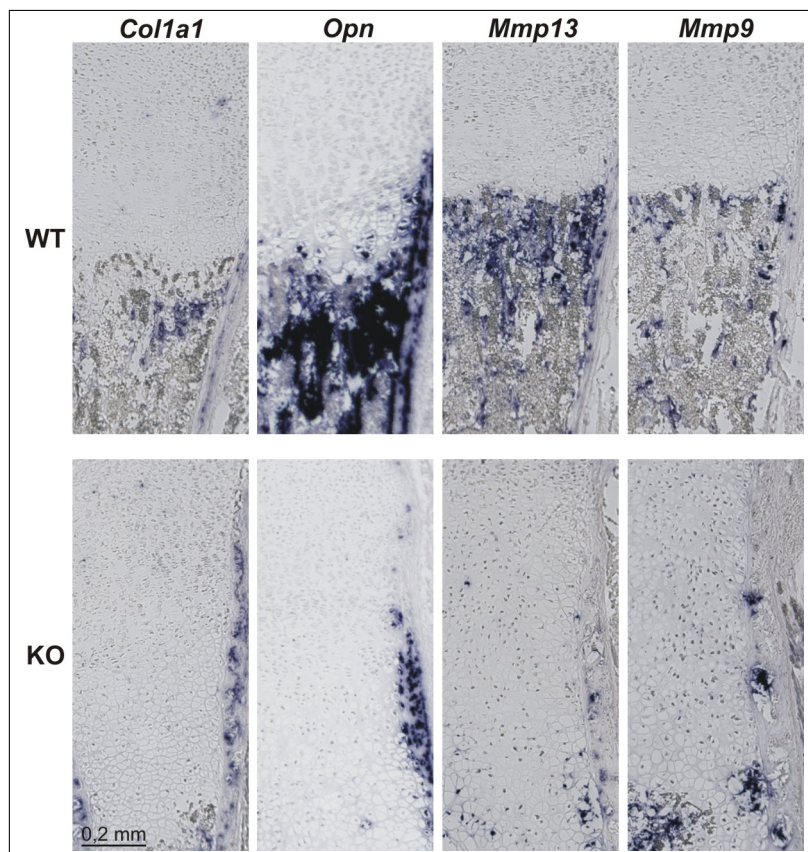


Abbildung 3.21: Expression von Markergenen in Humeri von neugeborenen Mäusen – Teil 2. Innerhalb der Diaphyse des mutanten Humerus lassen sich keine Osteoblasten nachweisen, wie anhand der fehlenden Expression von *Col1a1* deutlich wird. Im kortikalen Knochen findet sich Signal für *Col1a1* – ebenso wie für Osteopontin (*Opn*) – dort hat schon eine osteoblastische Differenzierung stattgefunden. Die Expression der Matrix Metalloproteinase 13 (*Mmp13*) ist im mutanten Humerus nur in sehr wenigen Zellen nachzuweisen – ein Zeichen dafür, daß die terminale Hypertrophie der Chondrozyten noch nicht eingetreten ist. Das Signal für die Matrix Metalloproteinase 9 (*Mmp9*) lässt darauf schließen, daß in der Diaphyse des mutanten Humerus eine erste Einwanderung von Osteoklasten stattgefunden hat – ebenso wie im Knochenschaft.

Expression von Markergenen bei 4 Wochen alten Tieren

Zur Analyse der Situation in älteren Tieren wurden die distalen Wachstumsfugen im Femur 4 Wochen alter Tiere untersucht. Die Wachstumsfugen in den mutanten Tieren waren zu diesem Zeitpunkt mehr als viermal so breit wie in den Kontrolltieren und beinhalteten hauptsächlich hypertrophe Chondrozyten, die sehr viel voluminöser als in den Kontrolltieren waren. Diese Chondrozyten waren größtenteils zu Säulen angeordnet, die durch große Matrixbereiche voneinander getrennt waren. In den mutanten Knochen war nun eine Markhöhle und trabekulärer Knochen angelegt. Während in den Kontrolltieren zusätzlich ein sekundäres Ossifikationszentrum ausgebildet war, befanden sich in den Mutanten in diesem Bereich hauptsächlich hypertrophe Chondrozyten, die von mineralisierter Matrix umgeben waren. Entsprechend der Unterschiede in Struktur und Zusammensetzung der Wachstumsfugen waren die Expressionsmuster der untersuchten Gene in den Mutanten

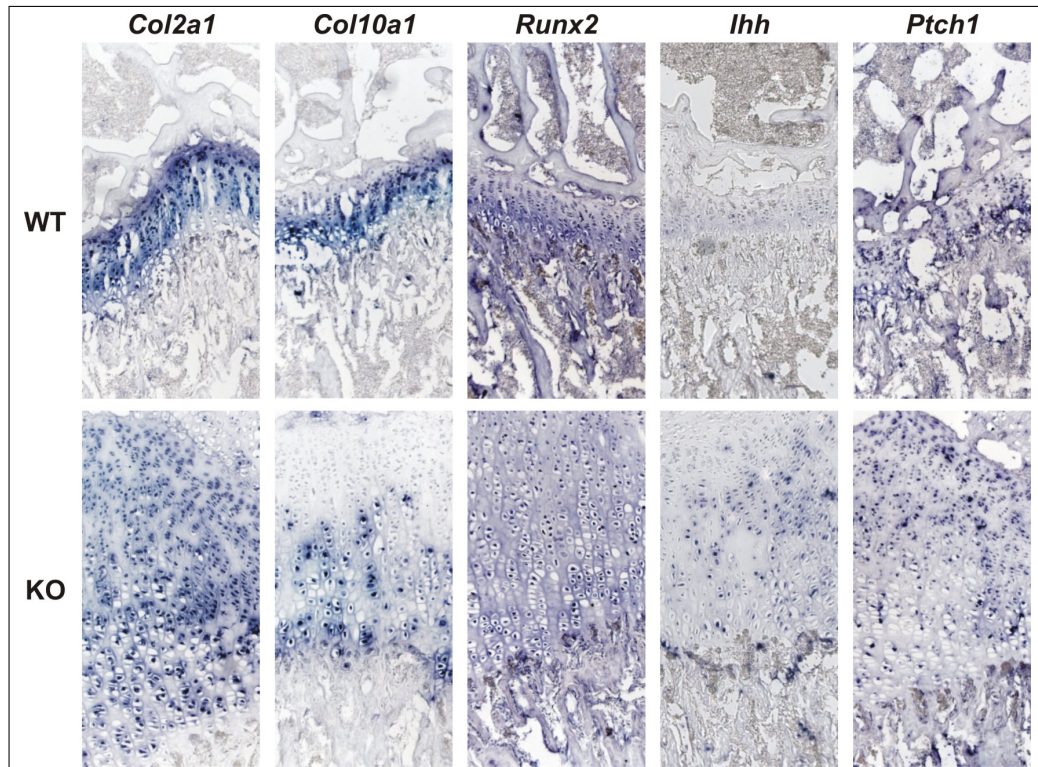


Abbildung 3.22: Expressionsmuster von Markergenen in 4W Tieren – Teil 1. Gezeigt sind die distalen Wachstumsfugen der Femora. Entsprechend der Verbreiterung der Wachstumsfuge und der Persistenz hypertropher Chondrozyten sind die Expressionsdomänen der untersuchten Gene im mutanten Knochen verbreitert. Abgesehen von der letzten Lage hypertropher Chondrozyten exprimieren alle Chondrozyten der mutanten Wachstumsfuge *Col2a1* – in den Kontrolltieren beschränkt sich die *Col2a1* Expression auf die weniger differenzierten Chondrozyten. *Col10a1* ist in den Mutanten unregelmässig nicht in allen hypertroph wirkenden Chondrozyten exprimiert. *Runx2* wird – wie in der Kontrolle – in den Osteoblasten, den prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten exprimiert. Einzig die Expression im Bereich der Epiphyse fehlt, da dort kein sekundäres Ossifikationszentrum ausgebildet ist. Indian Hedgehog (*Ihh*) wird in einem unregelmässigen Muster in den vermeintlich prähypertrophen Chondrozyten über fast die gesamte Breite der Wachstumsfuge exprimiert, während es im Wildtyp fast nicht mehr nachzuweisen ist. Die Expression von Patched (*Ptch1*) ist abgesehen von der Breite der Expressionsdomäne in den gleichen Zellen zu finden wie im Wildtyp.

gegenüber den Kontrolltieren verändert. Die Expressionsdomäne von *Col2a1* erstreckte sich im Wildtyp auf unreife Chondrozyten und war recht schmal (Abb. 3.22). In den Mutanten fand sich in der gesamten Wachstumsfuge Expression – nur die letzte Lage der hypertrophen Chondrozyten zeigte keine Signale für *Col2a1*. *Col10a1* war in den Kontrolltieren in den hypertrophen Chondrozyten nachzuweisen – ebenso wie in den mutanten Tieren – hier gab es aber Unterschiede bezüglich der Signalstärke zwischen einzelnen Zellen. Ungewöhnlich war, daß die Expression von Typ II und Typ X Kollagen überlappete. Das Expressionsmuster für *Col10a1* wirkte auch unorganisiert. In den Mutanten war *Runx2* jeweils in den prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten und in den Osteoblasten im trabekulären Knochen exprimiert. In der gesamten mutanten Wachstumsfuge war eine Expression von *Ihh* nachzuweisen – auch in den großen hypertrophen Chondro-

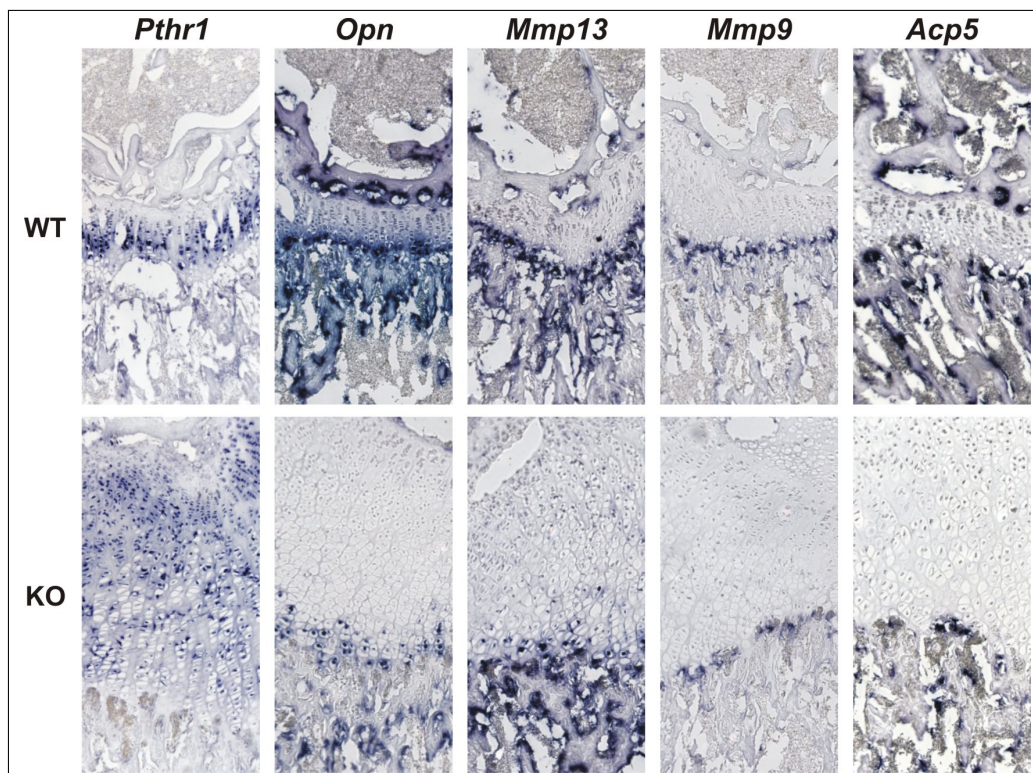


Abbildung 3.23: Expressionsmuster von Markergenen in 4W Tieren – Teil 2. Die Expression von *Pthr1* erstreckt sich in der Mutante über die gesamte Breite der Wachstumsfuge und die Osteoblasten im trabekulären Knochen. Anhand der schwachen Expression von Osteopontin in der mutanten Wachstumsfuge wird deutlich, daß nur ein sehr kleiner Teil der hypertroph wirkenden Chondrozyten die terminale Hypertrophie erreicht hat. Im trabekulären Knochen zeigt sich Expression in Osteoblasten – wenn auch schwächer als im Wildtyp. Analog zu der Expression von *Opn* ist auch *Mmp13* nur in einem kleinen Teil der hypertrophen Chondrozyten nachzuweisen, dort ist die Signalstärke aber auch wie im trabekulären Knochen vergleichbar mit der im Wildtyp. Die beiden Osteoklastenmarker *Mmp9* und TRAP (*Acp5*) sind im mutanten Knochen deutlich reduziert – auch im Alter von 4 Wochen zeigen die mutanten Knochen eine sehr geringe Aktivität der Osteoklasten.

zyten, während im Wildtyp dieses Morphogen nur sehr schwach in den prähypertrophen Chondrozyten exprimiert wurde.

In der Abbildung 3.23 sind weitere untersuchte Gene abgebildet. Das Expressionsmuster von *Opn* verdeutlicht, daß im mutanten Femur nur die letzten Reihen der Chondrozyten die terminale Hypertrophie erreicht haben. In Übereinstimmung mit dem Expressionsmuster von *Osteopontin* wurde *Mmp13* in den Mutanten ebenfalls nur in den letzten Reihen hypertropher Chondrozyten und in den Osteoblasten des trabekulären Knochens exprimiert. Betrachtet man nun die Expressionsmuster der beiden spezifisch von Osteoklasten exprimierten Gene *Mmp9* und *Acp5*, so wird deutlich, daß diese in der Mutante signifikant schwächer exprimiert wurden als in den Kontrolltieren. Im Wildtyp befanden sich Osteoklasten an den Knorpel/Knochengrenzen und im trabekulären Knochen. In den Mutanten war dort sehr viel schwächeres Signal detektierbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, daß auch in 4 Wochen alten Tieren die terminale Hypertrophie der Chondrozyten verzögert und damit die Anzahl und Aktivität der Osteoklasten

in den betroffenen Skelettelementen noch deutlich reduziert war. Dies könnte eine Erklärung für die extrem verbreiterten Wachstumsfugen sein, in denen kein geordneter Abbau der Knorpelmatrix stattfindet.

3.3.6 Die Expression von Differenzierungsmarkern ist in den Wachstumsfugen 4 Wochen alter mutanter Mäuse weiterhin reduziert

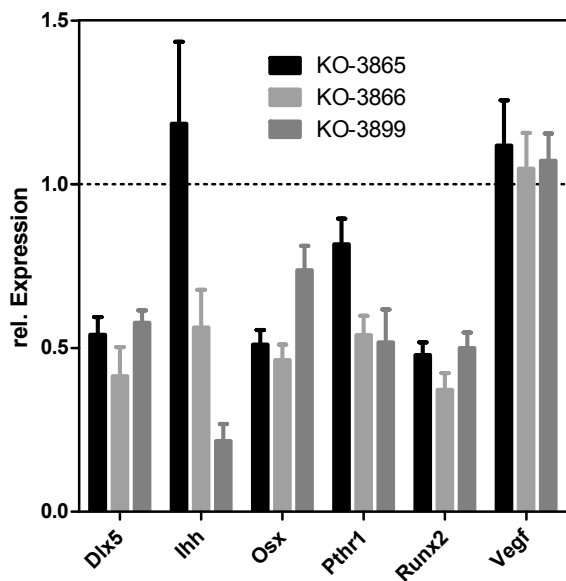


Abbildung 3.24: Expressionsstärken ausgesuchter Gene in den Wachstumsfugen 4 Wochen alter *Mef2c^{loxP/KO}* Mäuse. RNA aus den distalen Wachstumsfugen der Femora vier Wochen alter Mäuse wurde isoliert und per qRT-PCR ein Expressionsprofil erstellt. Die mutanten Mäuse zeigen eine Reduktion der Expression von *Dlx5*, *Osx* und *Runx2*. Die Transkriptmenge von *Pthr1* ist in zwei mutanten stark Tieren reduziert, während die Expression von *Vegf* unverändert ist. Die sehr variable Expression von *Ihh* erlaubt keine endgültige Aussage – sie scheint aber ebenfalls reduziert zu sein. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Transkriptmengen relativ zu den gemittelten Expressionsstärken in den Kontrolltieren 2876 und 3867. Als interne Kontrolle zur Normalisierung der Werte diente die Transkriptmenge von *GapDH*.

Für einen direkten Vergleich der Transkriptmengen wurde RNA aus den Wachstumsfugen vier Wochen alter Mäuse isoliert und per qRT-PCR die Expressionsstärke ausgewählter Gene ermittelt. Wie aus Abbildung 3.24 zu entnehmen ist, war die Expression der Transkriptionsfaktoren *Dlx5*, *Osx* und *Runx2* in den mutanten Tieren reduziert. *Pthr1* und *Ihh* schienen ebenfalls in ihrer Stärke reduziert zu sein, während *Vegf* unverändert war.

3.3.7 Die Wachstumsfugen von *Mef2c^{loxP/KO}* Mäusen zeigen weniger Proliferation

Abb. 3.25 zeigt BrdU-Färbungen der distalen Wachstumsfugen des Femurs 2 Wochen alter *Mef2c^{loxP/KO}* Mäuse im Vergleich zur Wildtyp Kontrolle. Der Aufbau der KO Wachstumsfugen war gegenüber dem Wildtyp gestört – so war die Wachstumsfuge extrem verbreitert. Die Zonen unterschiedlicher Chondrozyten waren im KO jeweils breiter als im Wildtyp, es gab proliferierende Säulenchondrozyten, aber es waren deutlich weniger BrdU positive Zellen zu identifizieren. Außerdem schienen die Säulen weniger gut organisiert zu sein und aus weniger Zellen zu bestehen. Die hypertrophen Chondrozyten wirkten im KO insgesamt voluminöser als im WT. Das Vorkommen proliferierender Chondrozyten war bei den

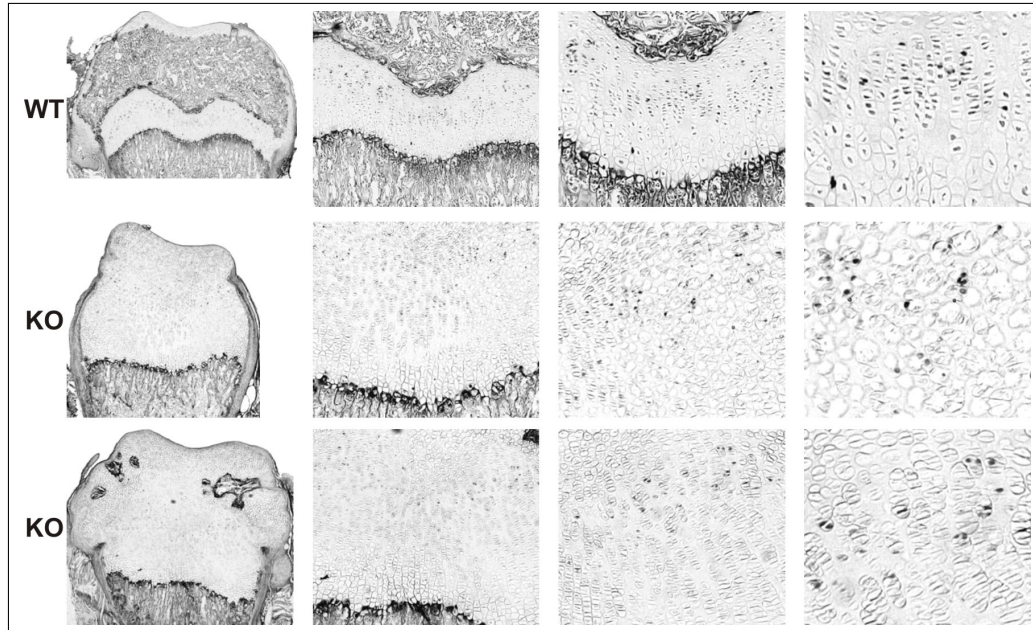


Abbildung 3.25: Die Proliferation ist in zwei Wochen alten $Mef2c^{loxP/KO}$ Tieren reduziert. Gezeigt sind BrdU Färbungen distaler Wachstumsfugen des Femurs. Die Verteilung proliferierender Chondrozyten ist gegenüber dem Wildtyp gestört – innerhalb der Zone der Hypertrophie ist keine Proliferation auszumachen. Insgesamt sind in den Wachstumsfugen der KO Mäuse weniger proliferierende Chondrozyten auszumachen und die Dichte positiver Zellen ist im Wildtyp deutlich höher.

$Mef2c^{loxP/KO}$ Tieren weniger organisiert, aber außerhalb der proliferativen Zone befanden sich keine positiven Zellen. Insgesamt zeigten die KO Tiere keine erhöhte Proliferation gegenüber den Kontrollen. Dies könnte, neben der räumlichen Disorganisation der Wachstumsfuge, auch zum verringerten Längenwachstum der Röhrenknochen in den Mutanten beitragen.

3.4 Einordnung von Mef2c in Signalwege der Skelettentwicklung

Wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt wurde, führt eine Deletion von *Mef2c* in frühen mesenchymalen Zellen oder undifferenzierten Chondrozyten zu einer Verzögerung der enchondralen Skelettentwicklung mit verkürzten Knochen, unvollständiger Resorption hypertropher Knorpels und abnormer Verdickung des kortikalen Knochens. Eine Überexpression von *Mef2c* hingegen aktiviert das genetische Programm der hypertrophen Chondrozyten-differenzierung. Zur Entschlüsselung der molekularen Zusammenhänge und der Einordnung von *Mef2c* in Signalwege wurden weitere *in vitro* Experimente durchgeführt.

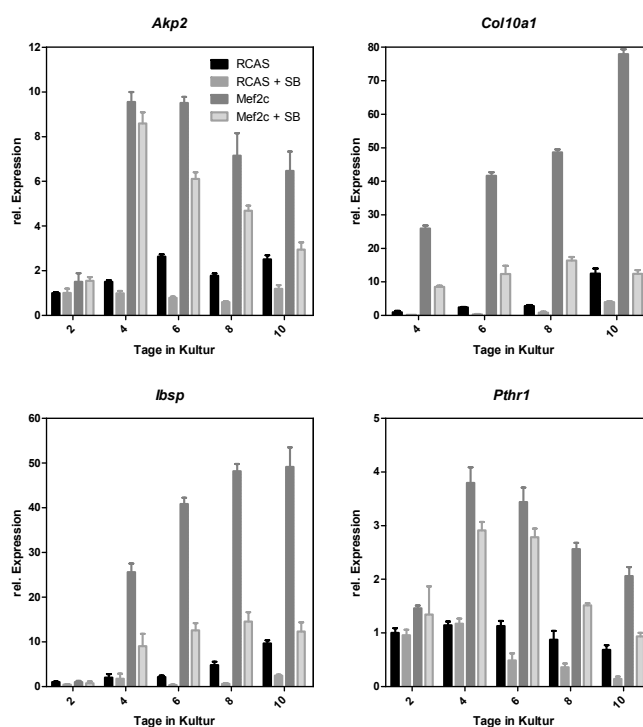


Abbildung 3.26: Die *Mef2c* vermittelte Stimulation von Differenzierungsmarkern ist *p38* abhängig. Hühner Micro-mass Kulturen wurden mit *Mef2c*-RCAS oder einem Leervirus als Kontrolle infiziert und über den angegebenen Zeitraum kultiviert. Eine gleichzeitige Behandlung mit SB203580 ($5 \mu\text{M}$) – einem Inhibitor der *p38* MAP-Kinase – reduziert die *Mef2c* vermittelte Stimulation der Markergene. Der Beginn der Behandlung mit SB203580 war nach 72 stündiger Kultivierung. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die RNA isoliert und mittels qPCR die Transkriptmengen untersucht. Als interne Kontrolle diente *GapDH* – alle Werte sind relativ zu den Tag 2 Werten der mit einem Leer-RCAS infizierten Kulturen. *Col10a1* und *Ibsp* werden durch Überexpression von *Mef2c* am stärksten aktiviert und durch SB203580 auch am stärksten gehemmt. *Akp2* und *Pthr1* werden ebenfalls durch *Mef2c* induziert und durch eine Hemmung von *p38* inhibiert.

Da aus der Literatur bekannt war, daß die MAP-Kinase *p38* einerseits für die Differenzierung von Chondrozyten notwendig ist [Stanton et al., 2004] und andererseits durch direkte Phosphorylierung die Aktivität von *Mef2c* positiv reguliert [Han et al., 1997], wurden Ex-

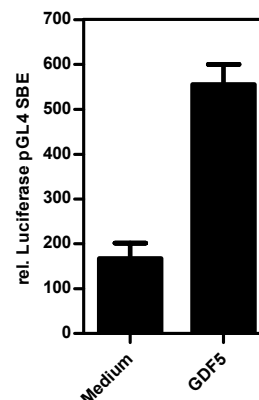
perimente mit chMM Kulturen durchgeführt, die teilweise mit dem p38 Inhibitor SB203580 behandelt wurden. Hierbei sollte die Auswirkung der Hemmung von p38 auf die Regulation ausgewählter Gene durch Mef2c untersucht werden. Abbildung 3.26 verdeutlicht, daß eine Hemmung von p38 die Expression ausgewählter Gene reduzierte. Besonders deutlich wurde die Transkriptmenge von *Col10a1* und *Ibsp* gehemmt, die beide sehr stark durch Mef2c aktiviert wurden.

Die Expression der Gene *Col10a1*, *Ibsp*, *Ihh*, *OCN* und *Pthr1* wurde entweder durch die Überexpression von Mef2c *in vitro* beeinflusst oder ihre mit *Mef2c* überlappenden Expressionsmuster waren in den Skelettelementen der *Mef2c^{Prx1Cre/KO}* Maus verändert. Mit Hilfe der online verfügbaren Software MAPPER [Marinescu et al., 2005] konnte in den Promotorbereichen mindestens eine MEF2 Konsensussequenz mit der Basenfolge TA(T/A)₄TA identifiziert werden. Dies führte zu der Vermutung, daß die Expression dieser Gene direkt durch Mef2c reguliert wird. Aus diesem Grund wurden Reporterkonstrukte mit Promotorbereichen aus diesen Genen bezüglich der Aktivierung durch Mef2c untersucht.

3.4.1 Chondrozyten aus der Hühnchen Micromass als System für Promotoranalysen

Speziell die Untersuchung des Einflusses von PTHrP auf die Regulation des *Col10a1* Promotors machte es notwendig, Chondrozyten einzusetzen, da diese im Gegensatz zu Cos7 Zellen durch PTHrP beeinflussbar sind. Hierzu konnte ein Ansatz etabliert werden, bei dem primäre Chondrozyten aus Hühnchen Micromass Kulturen durch einen Kollagenase Verdau freigesetzt und in Kultur genommen werden konnten. Um zu verhindern, daß die Zellen nach der erneuten Aussaat in ein fibroblastenartiges Stadium dedifferenzierten, musste die Transfektion unmittelbar nach der Aussaat mit einer Zelldichte von 6×10^5 Zellen pro ml erfolgen. Experimente mit verschiedenen Transfektionsmethoden zeigten, daß mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen) die höchsten Transfektionseffizienzen (30–50 % der Zellen) in diesen Zellen erreicht werden konnten. Fugene 6 (Roche) zeigte deutlich schlechtere Ergebnisse (<10 % der Zellen). Im Gegensatz zu den Empfehlungen des Herstellers war es

Abbildung 3.27: Ein Smad Reporterkonstrukt lässt sich in Micromass Chondrozyten durch GDF5 stimulieren. Chondrozyten aus Micromass Kulturen wurden mit einem pGL4-SBE Reporterplasmid transfiziert, welches mehrere Kopien eines Smad-binding-elements (SBE) enthält. Zur Kontrolle wurde ein leeres pGL4 Plasmid benutzt. Der pGL4-SBE Reporter wird in den Zellen ca. 170× gegenüber dem Kontrollplasmid aktiviert. Behandelt man die Zellen zusätzlich mit GDF5 (10 nM, Biopharm), so wird der pGL4-SBE Reporter sogar über 550× aktiviert.



nicht notwendig, die Transfektion in Abwesenheit von Serum und Antibiotika durchzuführen – es konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Um den Einfluß des Serums auf die Aktivierung der Promotoren so gering wie möglich zu halten, wurden die Zellen mit dem Transfektionsansatz in Gegenwart von Serum für 6 Stunden inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit Serum-freiem Medium. Die Messungen der Luciferaseaktivität erfolgten immer 24 Stunden nach Transfektion.

Zusätzlich zu den durchgeführten Experimenten mit *Col10a1* Reporterkonstrukten wurden diese Zellen mit einem Smad Reporterplasmid (pGL4-SBE) transfiziert und mit GDF5 (10 nM) behandelt, um zu testen, ob neben dem PTH/PTHrP Signalweg ein weiterer, wichtiger Signalweg der Chondrozyten beeinflussbar war. Wie in Abbildung 3.27 gezeigt ist, lassen sich in diesen Zellen auch Untersuchungen bezüglich der BMP/GDF Signalkaskade durchführen. So wurde das Smad Reporterplasmid gegenüber dem leeren Reporterplasmid 170fach – bei Behandlung mit GDF5 sogar 550fach aktiviert. Die Zellen bieten sich also als *in vitro* System zur Analyse chondrozytenspezifischer Genregulation an.

3.4.2 Kollagen Typ X (*Col10a1*) Promotor

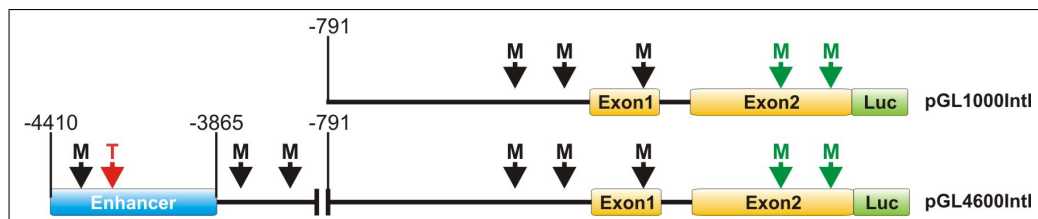


Abbildung 3.28: Schematische Übersicht der beiden eingesetzten Maus *Col10a1* Reporterkonstrukte. Beide enthalten neben unterschiedlich langen Promotorbereichen noch das erste Exon und Intron und einen Teil des zweiten Exons bis unmittelbar vor dem Translationsstart. pGL4600Intl enthält 4410 Basen des Promotors inklusive eines Enhancerbereichs, pGL1000Intl 791 bp. Die Positionen der Mef2c Konsensussequenzen sind durch ein M markiert, die Position eines konservierten PTH responsiven Elements (TRE) ist durch ein rotes T markiert. Dieses Element kann entweder aktiverend oder reprimierend wirken, je nachdem welcher AP-1 Komplex bindet. Im gesamten Promotorbereich befinden sich 8 Mef2c Konsensussequenzen. Innerhalb des Exons 2 befinden sich 2 potentielle Bindestellen für Mef2c, die bisher noch nicht durch Mutagenese untersucht wurden (grün).

Kollagen Typ X ist ein kurzes, netzbildendes Kollagen, welches während der enchondralen Ossifikation exklusiv in hypertrophem Knorpel der Wachstumsfugen exprimiert wird [Schmid und Linsenmayer, 1985b]. Die Funktion von Kollagen Typ X ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt, aber es gilt bisher als einziger Marker, der spezifisch in hypertrophen Chondrozyten vorkommt. *COL10A1*-Haploinsuffizienz oder dominant-negative Mutationen im humanen *COL10A1* Gen, die die Bildung von Kollagen-Trimeren verhindern, führen zu metaphysärer Chondrodysplasie vom Typ Schmid (MCDS) [Chan et al., 1998; Jacenko et al., 1993b; Warman et al., 1993], während ein Knockout in Mäusen zu kontroversen Ergebnissen führt. Einerseits zeigen die KO Mäuse eine normale Knochenentwicklung [Rosati et al., 1994], in einer anderen Arbeit zeigen *Col10a1*^{-/-} Mäuse einen Phänotyp, der dem der MCDS teilweise ähnelt [Kwan et al., 1997].

Die Entschlüsselung der Regulation des *Col10a1* Gens ist wichtig für das Verständnis der molekularbiologischen Abläufe, die zur Hypertrophie von Chondrozyten und der späteren Entwicklung des trabekulären Knochens führen. Bisher wurden direkte positive Regulationen des *Col10a1* Promotors durch Bmp7 [Harada et al., 1997] und durch die Transkriptionsfaktoren Runx2 [Zheng et al., 2003], FosB [Gebhard et al., 2004], Sp3 und Dlx5 [Magee et al., 2005] beschrieben. Eine negative Regulation wird durch die Transkriptionsfaktoren c-Fos [Rierner et al., 2002] und Sp1 [Magee et al., 2005] ausgeübt.

PTHrP hemmt die Expression von *Col10a1*, indem die Proteinkinase A (PKA) aktiviert wird, die über Phosphorylierung des cAMP response element binding protein (CREB) die Expression von *c-Fos* induziert [Rierner et al., 2002]. Die Tatsache, daß mit RCAS-Mef2c infizierte Hühnchen Micromass Kulturen eine sehr starke Expression von *Col10a1* zeigten und die Abwesenheit der Expression von *Col10a1* in den *Mef2c^{Prx1Cre/KO}* Mäusen liessen eine direkte Regulation durch Mef2c vermuten. Innerhalb des murinen 4,6 kb Promotorbereichs befinden sich zahlreiche Mef2c Konsensus Sequenzen, von denen ein Teil eine Konservierung über mehrere Spezies zeigt (Abb. 3.28).

Verschiedene Spleißvarianten von Mef2c aktivieren den *Col10a1* Promotor

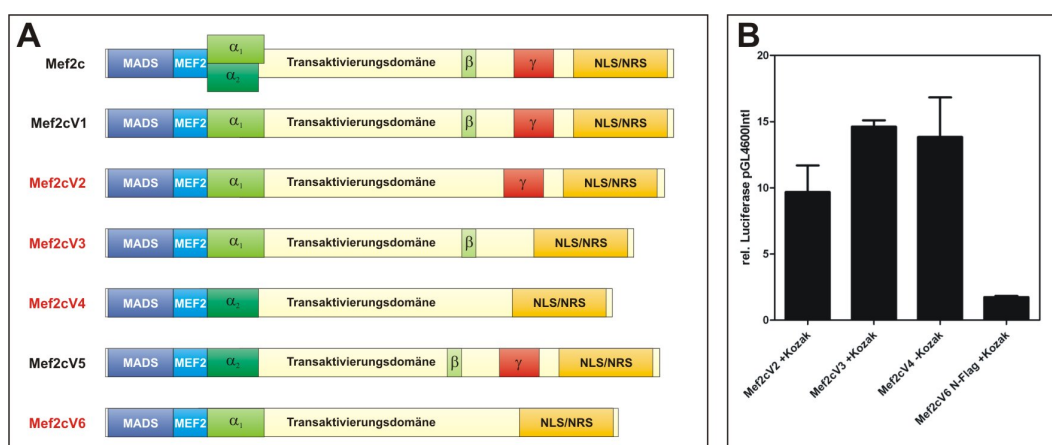


Abbildung 3.29: Spleißvarianten von Mef2c und die Aktivierung des *Col10a1* Promotors durch diese. **A:** Bisher waren 5 verschiedene Spleißvarianten vom murinen Mef2c bekannt – Variante V6 wurde im Laufe dieser Arbeit aus embryonaler Maus cDNA kloniert. Die Spleißvarianten unterschieden sich in drei Domänen: $\alpha_{1/2}$, β , γ . Die α Domäne liegt entweder als α_1 oder α_2 vor, während die β -Aktivator und die γ -Repressor Domäne in einigen Varianten fehlen [Janson et al., 2001; Zhu und Gulick, 2004; Zhu et al., 2005]. Rot: In dieser Arbeit verwendete Varianten. **B:** Aktivierung des murinen *Col10a1* Promotors durch Mef2c. Gezeigt ist die relative Aktivierung des pGL4600Int1 Reporterkonstruktes in Cos7 Zellen, durch Überexpression verschiedener Spleißvarianten von Mef2c leerem pcDNA3.1 Plasmid. (\pm Kozak): ohne bzw. mit Kozaksequenz (ACCACC) in den Vektor pcDNA3.1 kloniert. Die Spleißvariante Mef2cV3 mit β -Aktivator Domäne zeigt die höchste, Mef2cV2 mit repressorischer γ Domäne zeigt die niedrigste Aktivierung des Reporters. Ein N-terminaler Flag-Tag am Mef2c Protein verhindert die Aktivierung des Reporters fast vollständig (Mef2cV6 N-Flag).

Es wurden Reporterassays durchgeführt, bei denen die Aktivierung eines *Col10a1* Reporters durch verschiedene Spleißvarianten von Mef2c untersucht wurde. Insgesamt wurden

4 verschiedene Spleißvarianten kloniert – unter ihnen auch die Variante Mef2cV6 – die bisher nicht beschrieben wurde (Abb. 3.29 A). In Cos7 Zellen konnte eine transiente Überexpression dieser Spleißvarianten das Reporterkonstrukt pGL4600Intl, welches einen großen Bereich *Col10a1* Promotors trägt, teilweise mehr als 14fach aktivieren (Abb. 3.29 B). Eine Modifikation des N-terminalen Endes des Mef2c Proteins (Mef2cV6) blockierte die Aktivität fast komplett, so daß der Reporter weniger als zweifach induziert wurde. Dies kann an einer sterischen Hinderung des Proteins durch das FLAG-Peptid gelegen haben. Wie erwartet, aktivierte die Spleißvariante V2 den Reporter nicht so stark, da sie eine repressorisch wirkende γ -Domäne trug.

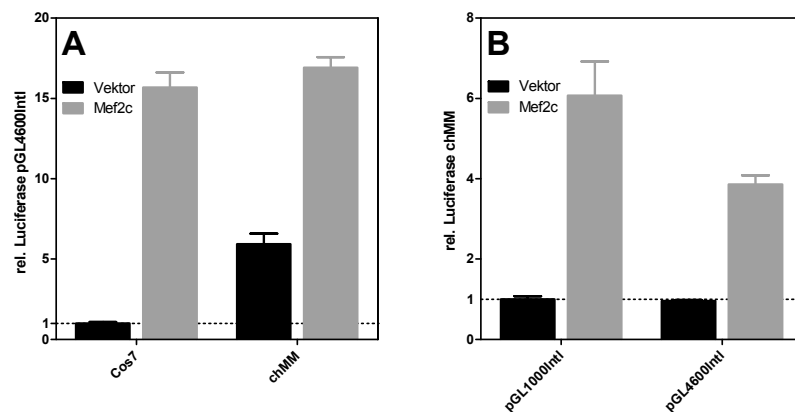


Abbildung 3.30: Unterschiedliche Aktivierung der *Col10a1* Reporter. **A:** Relative Luciferaseaktivitäten pGL4600Intl *Col10a1* Reporters in Cos7 Zellen oder chMM Chondrozyten. Der Promotor wird in chMM Chondrozyten fast 6 \times stärker als in Cos7 Zellen aktiviert. Die Überexpression von Mef2c erhöht die Promotoraktivierung in beiden Zelltypen auf etwa 15 – 16fach in Bezug auf Cos7 Zellen, die mit einem leeren Expressionsplasmid transfiziert wurden. Durch die hohe Basalaktivität in den chMM Chondrozyten ist die Stimulation durch Mef2c reduziert. **B:** Chondrozyten aus chMM Kulturen wurden mit den Reporterplasmiden pGL1000Intl oder pGL4600Intl transfiziert. Beide Reporter zeigen etwa die gleiche Aktivität in den Zellen, durch Überexpression von Mef2c kann aber der pGL1000Intl Reporter stärker aktiviert werden.

Der *Col10a1* Promotor ist *in vivo* nur in hypertrophen Chondrozyten aktiv, deswegen wurde die Aktivierung der Reporterkonstrukte in Hühnerchondrozyten untersucht. Wie in Abbildung 3.10 gezeigt ist, exprimierten mit einem leeren RCAS infizierte chMM Kulturen an Tag 8 relativ hohe Mengen an *Col10a1* – deswegen wurden Zellen aus chMM Kulturen diesen Alters eingesetzt. Abbildung 3.30 A macht deutlich, daß das *Col10a1* Reporterkonstrukt in den Chondrozyten bis zu sechsmal stärker aktiviert wurde als in Cos7 Zellen. Eine Überexpression von Mef2c führte sowohl in Cos7 Zellen als auch in Chondrozyten zu einer Aktivierung des Reporters auf den 15 – 16fachen Wert der Cos7 Zellen, die mit einem leeren Expressionsplasmid transfiziert wurden. Damit war die relative Aktivierung des Reporters durch Mef2c in Chondrozyten mit knapp 3 \times niedriger als in Cos7 Zellen. Ein Vergleich der Aktivierung der beiden Reporterkonstrukte pGL1000Intl und pGL4600Intl in Chondrozyten zeigte eine ähnlich hohe Basalaktivität beider – der pGL1000Intl Reporter wurde aber durch eine Expression von Mef2c um 50 % stärker aktiviert (Abb. 3.30).

Die Mef2c vermittelte Aktivierung des *Col10a1* Promotors wird nicht durch Runx2 oder Sp1 beeinflusst.

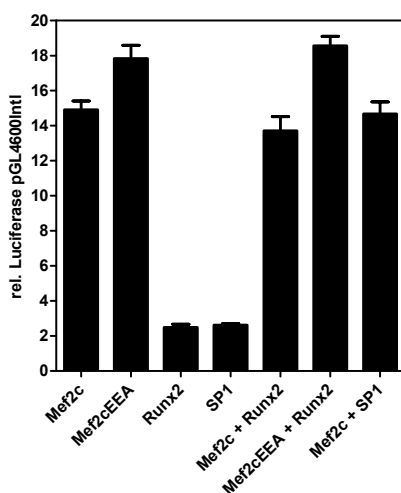


Abbildung 3.31: Beteiligung weiterer Transkriptionsfaktoren an der Aktivierung des *Col10a1* Promotors in Cos7 Zellen. Weder Runx2 noch Sp1 sind in der Lage, die Mef2c vermittelte Aktivierung des *Col10a1* Promotors zu beeinflussen. Gezeigt ist die relative Luciferase Aktivität von Cos7 Zellen 24h nach Transfektion mit dem pGL4600Int Reporterkonstrukt, pcDNA3.1 Leervektor; Mef2c; Mef2cEEA; Runx2; Sp1 oder Kombinationen dieser Plasmide. Mef2c und Mef2cEEA aktivieren den *Col10a1*-Promotor mehr als 14fach, während Runx2 und Sp1 diesen etwas mehr als zweifach induzieren. Eine Koexpression von Mef2c mit Runx2 oder Sp1 zeigt keine weitere Steigerung der Mef2c vermittelten Aktivierung.

In Zheng et al. [2003] wurde beschrieben, daß Runx2 den *Col10a1* Promotor aktiviert, Magee et al. [2005] beschrieben eine Hemmung des Promotors durch Sp1. Um zu überprüfen, ob ein synergistischer Effekt zwischen Mef2c, Runx2 und Sp1 bezüglich der Aktivierung des Promotors vorliegt, wurden Koexpressionsexperimente von Mef2c mit Runx2 oder auch Sp1 durchgeführt. Wie in Abbildung 3.31 zu erkennen ist, zeigt weder eine Koexpression von Mef2c und Runx2 noch die von Mef2c und Sp1 eine Verstärkung der Mef2c abhängigen Aktivierung des *Col10a1* Promotors. Es konnte aber auch keine Hemmung des Reporters durch Sp1 festgestellt werden. Eine Überexpression von Runx2 oder Sp1 allein führte zu einer etwas mehr als zweifachen Aktivierung des Reporters. Eine Mutante von Mef2c, bei der die Aminosäuren T293 und T300 durch eine Glutaminsäure und die Aminosäure S412 durch ein Alanin ersetzt wurden (Mef2cEEA), konnte den Promotor etwas stärker aktivieren als Wildtyp Mef2c. Die Mutagenese der Positionen T293 und T300 sollten eine Aktivierung herbeiführen und die Mutagenese der Position S412 sollte für eine Lokalisation im Zellkern sorgen.

Die Aktivierung des *Col10a1* Promotors ist p38 abhängig

In Stanton et al. [2004] wurde gezeigt, daß die Aktivierung des *Col10a1* Promotors in einer p38 abhängigen Weise geschieht, Abbildung 3.26 verdeutlicht dies zusätzlich. Zwecks

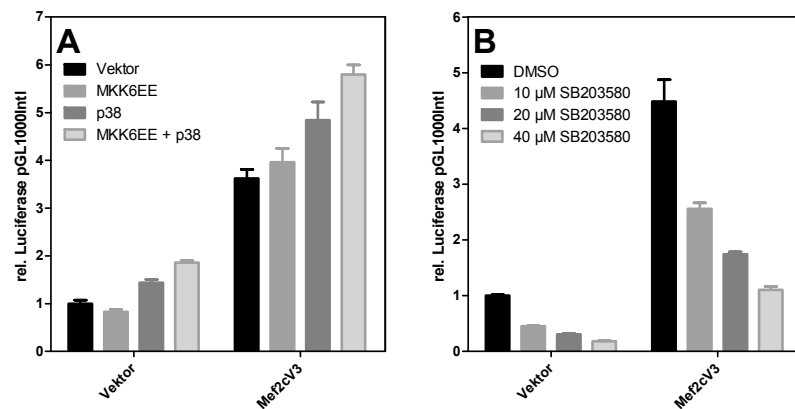


Abbildung 3.32: p38 reguliert den *Col10a1* Promotor. **A:** Hühner Chondrozyten aus Tag 8 Micromass Kulturen wurden mit dem pGL1000Intl *Col10a* Reporterplasmid und einem pcDNA3.1Mef2cV3 Expressionsplasmid oder einem leeren pcDNA3.1 Plasmid transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen noch mit Expressionsplasmiden für MKK6EE oder p38 oder mit beiden cotransfiziert, um den Einfluß von p38 auf den Promotor zu untersuchen. **B:** In einem zweiten Experiment wurden transfizierte Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an SB203580, einem Inhibitor von p38 behandelt. Eine Aktivierung von p38 in Chondrozyten durch MKK6EE oder Überexpression von p38 erhöht die Promotoraktivität, eine Hemmung von p38 durch SB203580 inhibiert den Promotor.

weiterer Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Mef2c vermittelten Aktivierung des *Col10a1* Promotors und p38 wurden diesbezüglich Experimente in Hühnerchondrozyten durchgeführt. Wie in Abbildung 3.32 A zu erkennen ist, konnte die Überexpression von p38 oder einer konstitutiv aktiven Variante der MAP-Kinase-Kinase MKK6 (MKK6EE) die Mef2c vermittelte Aktivierung des *Col10a1* Reporters verstärken. Eine Koexpression von Mef2c und p38 aktivierte den Reporter 4,8× und damit stärker als die Koexpression von Mef2c und MKK6EE (3,9×), die höchste Aktivierung von 5,8× gegenüber der Kontrolle wurde mit der Koexpression von Mef2c, MKK6EE und p38 erreicht. Insgesamt war dies eine Steigerung um 61 % gegenüber der Aktivierung durch Mef2c alleine – die Aktivierung von p38 hatte also nur einen relativ schwachen Einfluß. Dies könnte an der in den Hühnerchondrozyten ohnehin hohen Basalaktivität der *Col10a1* Reporterkonstrukte liegen. Eine pharmakologische Hemmung von p38 durch Behandlung von Chondrozyten mit SB203580 – einem Inhibitor, der die ATP-Bindestelle von p38 blockiert – führte zu einer Reduktion der Promotoraktivität (Abb. 3.32 B). Es wurden verschiedene Konzentrationen von SB203580 eingesetzt, die dosisabhängig die Mef2c vermittelte Aktivierung des Reporterkonstruktes reduzieren konnten.

Untersuchung der Rolle von Mef2c in der PTHrP induzierten Hemmung der Expression von *Col10a1*

Eine Hemmung der Expression von *Col10a1* durch PTHrP wurde von O'Keefe et al. [1997] beschrieben. Kürzlich konnten Leupin et al. [2007] zeigen, daß in Osteozyten ein durch Mef2c aktivierter Enhancer für die Expression von *Sclerostin* (*SOST*) durch PTHrP ge-

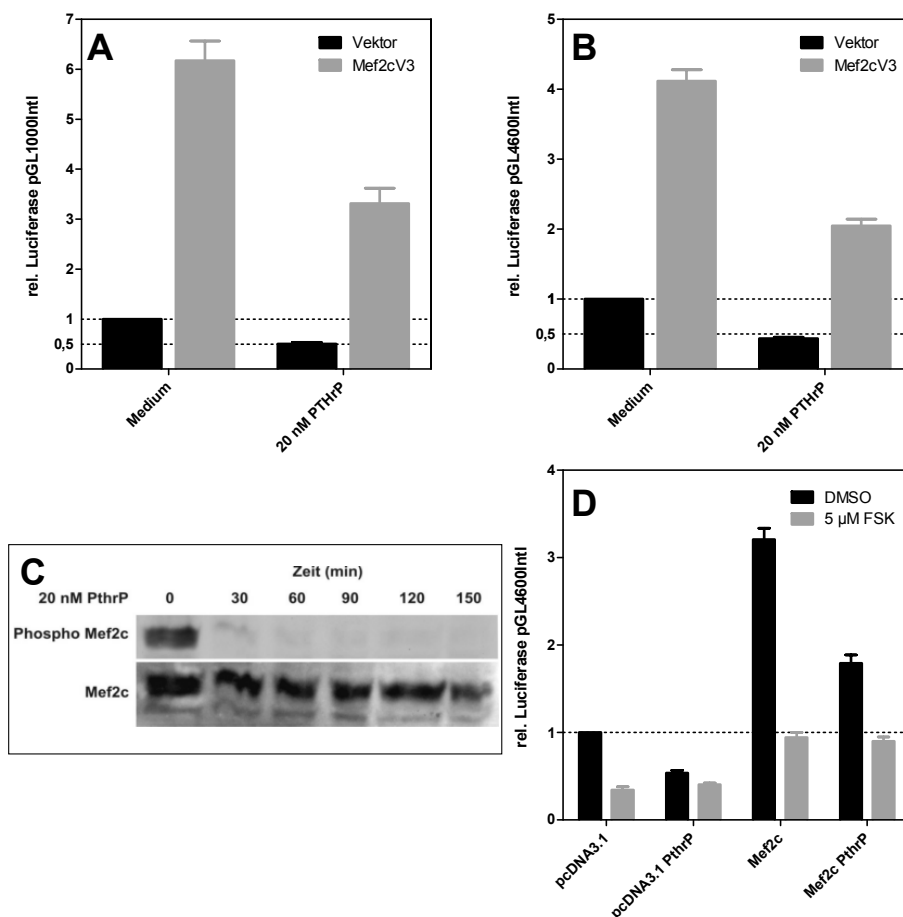


Abbildung 3.33: PTHrP hemmt den *Col10a1* Promotor hauptsächlich über cAMP abhängige Signalwege. **A & B:** Eine Behandlung von chMM Chondrozyten mit 20nM PTHrP resultiert in einer Hemmung der *Col10a1* Promotoraktivierung um ca. 50 %. Eine Überexpression von *Mef2c* kann diese Hemmung nicht beeinflussen. **C:** 8 Tage alte mit einem RCAS-*Mef2c* infizierte Hühner Micromass-Kulturen wurden mit 20 nM PTHrP behandelt und für die angegebenen Zeiten inkubiert. Lysate aus diesen Zellen wurden per Western Blot mit einem anti-phosphoT300-*Mef2c* Antikörper und zur Kontrolle mit einem anti-*Mef2c* Antikörper inkubiert. Durch die Behandlung mit PTHrP wird *Mef2c* innerhalb von 30 Minuten dephosphoryliert. Dieser Zustand hält mindestens 150 Minuten an. **D:** chMM Zellen wurden mit 5 μ M Forskolin (FSK) behandelt, was zu einer starken Reduktion der Reporteraktivierung führt. Eine zusätzliche Behandlung mit 20 nM PTHrP kann diese Reduktion nicht verstärken – dies spricht dafür, daß der Effekt von PTHrP hauptsächlich über cAMP abhängige Signalwege weitergeleitet wird.

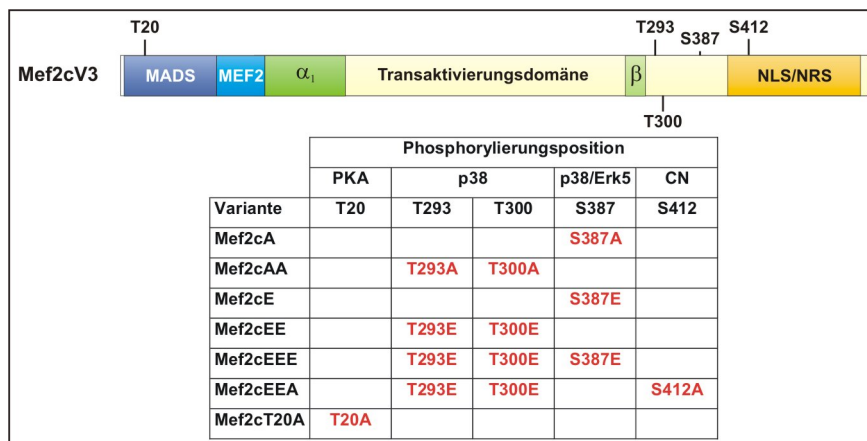


Abbildung 3.34: Übersicht über die Lage der mutierten Aminosäuren in den eingesetzten Mef2c-Mutagenesevarianten. Die Mutagenesen wurden jeweils mit der Spleißvariante Mef2cV3 durchgeführt (CN: Calceineurin, Erk5: Extracellular signal regulated kinase 5, p38: MAP-Kinase p38, PKA: Proteinkinase A).

hemmt wird. PTHrP kann einerseits die Proteinkinase A (PKA), andererseits die Proteinkinase C (PKC) aktivieren. Die PKA kann Mef2c direkt an Position T20 phosphorylieren, was in einer stärkeren DNA-Bindung resultiert [Wang et al., 2005]. In Du et al. [2008] wurde jedoch gezeigt, daß eine Phosphorylierung von Mef2d durch die PKA zu einer verstärkten Rekrutierung von Hdac4 und damit zu einer Transformation von Mef2d zu einem transkriptionellen Repressor führt. Somit bestand die Möglichkeit, daß Mef2c – je nach Zelltyp und Zustand der Zelle – durch PKA in einen transkriptionellen Aktivator oder einen Repressor transformiert wird. Die PKC inhibiert die Phosphorylierung von p38 und könnte dadurch die Aktivierung von Mef2c verhindern.

Es bestand die Möglichkeit, daß PTHrP einen hemmenden Einfluß auf Mef2c ausübt und auf diese Weise die Expression von *Col10a1* reguliert. Da der PTH/PTHrP-Rezeptor, der zur Transduktion des PTHrP Signals notwendig ist, in Chondrozyten exprimiert wird, wurden *Col10a1* Reporterexperimente mit Mef2c und rekombinanten humanen PTHrP in Chondrozyten durchgeführt. In chMM Chondrozyten führte eine Behandlung mit 20 nM PTHrP zu einer Hemmung des *Col10a1* Promotors um ca. 50 % (Abb. 3.33 A & B). Auch die Mef2c vermittelte Aktivierung der Reporterkonstrukte wurde auf ungefähr die Hälfte reduziert. Western Blots mit einem phosphospezifischen Antikörper gegen die Position T300, die durch p38 phosphoryliert wird, konnten zeigen, daß eine Inkubation von Chondrozyten mit PTHrP zu einer Dephosphorylierung von Mef2c an der Position T300 führte (Abb. 3.33 C).

Zur Untersuchung, welcher Signalweg den hemmenden Effekt durch PTHrP weiterleitet, wurde die Adenylatcyclase (AC) durch Forskolin (FSK) stimuliert. Die AC synthetisiert cAMP, welches unter anderem die PKA aktiviert. Wie in (Abb. 3.33 D) zu erkennen ist, konnte eine Behandlung der Zellen mit Forskolin den *Col10a1* Reporter stark hemmen – dies geschah auch bei Überexpression von Mef2c. Eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit 20 nM PTHrP konnte den Effekt durch FSK nicht verstärken – damit scheint ein Großteil

des PTHrP-Signals über den AC/cAMP-Signalweg transduziert zu werden.

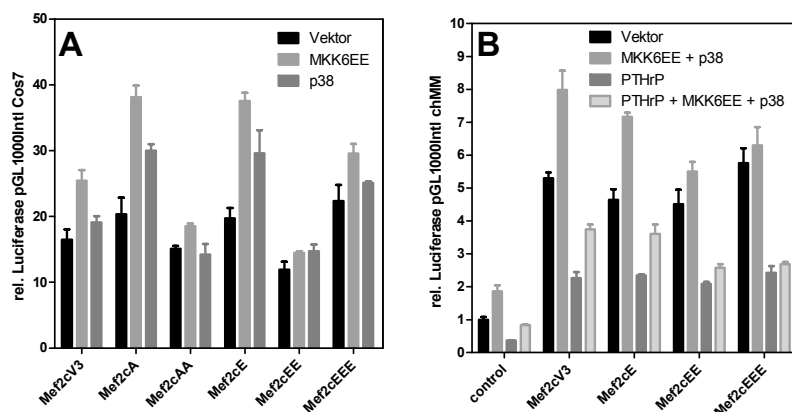


Abbildung 3.35: Aktivierung des *Col10a1* Promotors durch verschiedene *Mef2c* Mutanten und ihre Regulierbarkeit durch PTHrP. **A:** Cos7 Zellen wurden mit dem pGL1000Int Reporterkonstrukt und verschiedenen Mutanten von *Mef2c* transfiziert. Zusätzlich wurden noch Expressionsplasmide mit MKK6EE oder p38 eingesetzt. Keine der eingesetzten Mutanten zeigte extreme Abweichungen zum *Mef2cV3* bezüglich der Aktivität. Die Varianten *Mef2cA* und *Mef2cE* ließen sich am stärksten durch eine Aktivierung von p38 stimulieren, die Varianten *Mef2cAA*, *Mef2cEE* und *Mef2cEEE* ließen sich nur sehr schwach stimulieren. **B:** Chondrozyten wurden mit pGL1000Int und Expressionsplasmiden für verschiedene *Mef2c* Mutanten transfiziert. Zusätzlich wurden MKK6EE und p38 koexprimiert, um den Effekt der Aktivierung der p38 zu messen. Zusätzlich wurden die Zellen noch mit PTHrP (20 nM) behandelt. Keine der Mutanten ist insensitive gegenüber PTHrP – es tritt immer eine Hemmung der Reporteraktivität ein. Die Variante *Mef2cE* lässt sich in gleichem Maße durch MKK6EE und p38 aktivieren wie *Mef2cV3*, während die Mutanten *Mef2cEE* und *Mef2cEEE* sich kaum stimulieren lassen.

Die Daten des phosphorylierungsspezifischen Western-Blots (Abb. 3.33 C) sprachen aber auch für die Theorie, daß PTHrP in Chondrozyten die MAP-Kinase p38 hemmt und so eine Phosphorylierung und damit Aktivierung von *Mef2c* verhindert. Um den Beweis zu erbringen, daß der Effekt von PTHrP über die Inaktivierung von *Mef2c* verläuft, wurden *Mef2c* Varianten hergestellt, die an den p38 Phosphorylierungsstellen T293, T300 und S387 durch Mutagenesen einen Aminosäureaustausch trugen (siehe Abbildung 3.34). Die Positionen T293 und T300 wurden in Kombination mutiert, da sie immer zusammen phosphoryliert werden. Ein Austausch der Aminosäuren gegen eine Glutaminsäure (E) sollte durch die negative Ladung eine Phosphorylierung und damit Aktivierung simulieren, ein Alanin (A) sollte eine Inaktivierung herbeiführen. Im Falle einer Hemmung von p38 durch PTHrP sollten diese Varianten in Reporterassays insensitive gegenüber PTHrP reagieren. Zunächst wurden Assays in Cos7 Zellen und danach in Chondrozyten durchgeführt (vgl. Abb. 3.35). Wider Erwarten waren die *Mef2cA* und *Mef2cAA* Mutanten nicht inaktiv – *Mef2cA* war neben *Mef2cE* die Variante, die sich durch eine Aktivierung von p38 in den Cos7 Zellen am stärksten stimulieren ließ – nämlich um 90 %. Die Mutanten *Mef2cAA*, *Mef2cEE* und *Mef2cEEE*, denen allen die Mutagenese an den Positionen T293 und T300 gemein war, ließen sich durch p38 oder MKK6EE kaum weiter aktivieren – der hauptsächliche Effekt von p38 wurde demnach über die Positionen T293 und T300 vermittelt. Eine durch die

Glutaminsäure eingeführte negative Ladung (Mef2cE) hatte im Vergleich zum eingeführten Alanin (Mef2cA) keinen Effekt – beide Mutationen erhöhten die Aktivität gegenüber Mef2cV3 geringfügig. Erst ein Austausch aller phosphorylierungsrelevanten Positionen gegen Glutaminsäure (Mef2cEEE) konnte die Aktivität um 35 % erhöhen. Eine Mutation der Position S387 allein (Mef2cA & Mef2cE) ergab ein Protein, welches sich stärker durch Koexpression von p38 bzw. MKK6EE stimulieren ließ. Diese Position, die neben p38 auch von Erk5 phosphoryliert werden kann, scheint somit eher einen hemmenden Effekt zu vermitteln. In Chondrozyten aktivierten die getesteten Mutanten den *Col10a1* Promotor ungefähr in gleicher Stärke wie Mef2cV3 (Abb. 3.35 B). Mef2cV3 und Mef2cE wurden durch eine Aktivierung von p38 jeweils stärker stimuliert als Mef2cEE und Mef2cEEE. Eine Behandlung der Zellen mit PTHrP führte bei allen Mef2c Mutanten zu einer ungefähr gleichstarken Hemmung der Aktivierung des *Col10a1* Reporters. Eine Modifikation der p38 Phosphorylierungsstellen konnte also den PTHrP vermittelten Effekt nicht abschwächen.

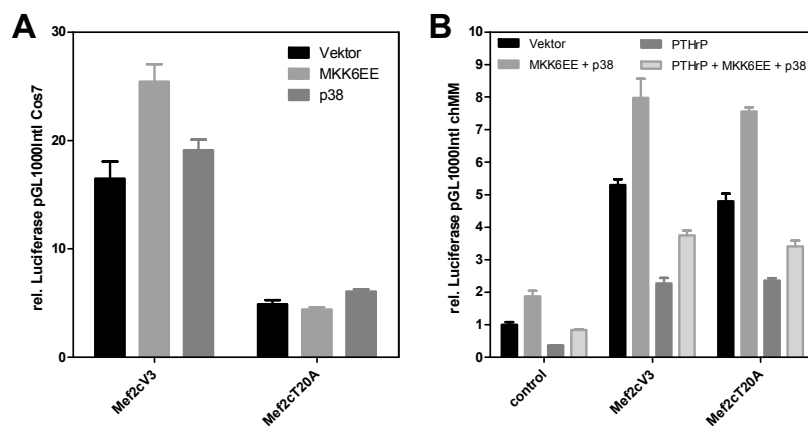


Abbildung 3.36: PTHrP hemmt Mef2c nicht über die PKA vermittelte Phosphorylierung. **A:** Eine Mef2c Mutante, die nicht durch PKA phosphoryliert werden kann (Mef2cT20A), aktiviert den *Col10a1* Promotor in Cos7 Zellen nur schwach und lässt sich durch Koexpression von p38 nicht und durch MKK6EE nur relativ schwach stimulieren. **B:** In Chondrozyten kann die Mef2cT20A Mutante den Reporter in ähnlicher Weise wie Mef2cV3 aktivieren und lässt sich auch ebenso durch p38 und MKK6EE stimulieren. Eine Abschwächung der Hemmung durch PTHrP wird aber auch durch Mef2cT20A nicht erreicht.

Eine weitere Möglichkeit wie der hemmende PTHrP Effekt auf Mef2c wirken könnte, wäre eine Phosphorylierung an Position T20 durch die PKA. Um diesen Weg zu untersuchen, wurde die Mutante Mef2cT20A durch einen Austausch der Aminosäure Threonin gegen ein Alanin hergestellt und in Reporterassays getestet. In Abbildung 3.36 sind die Ergebnisse dieser Experimente gezeigt. Die Mutante Mef2cT20A zeigte in Cos7 Zellen eine sehr niedrige Aktivität und ließ sich auch durch eine Aktivierung von p38 kaum stimulieren (Abb. 3.36 A). In Chondrozyten (Abb. 3.36 B) hingegen war die Mutante Mef2cT20A in der Lage, den *Col10a1* Promotor in gleicher Weise zu aktivieren wie Mef2cV3 – eine weitere Steigerung durch Koexpression von p38 und MKK6EE war ebenfalls möglich. Diese Mutante zeigte jedoch ebenfalls keinerlei Unterschied bezüglich der Hemmung durch PTHrP. Diese Er-

gebnisse verdeutlichen den Unterschied zwischen Cos7 Zellen und chMM Chondrozyten: in letzteren schien ein Kofaktor präsent zu sein, der die verminderte DNA-Bindung von Mef2cT20A ausgleichen konnte, während dieser in den Cos7 Zellen zu fehlen schien.

PKA hemmt den *Col10a1* Promotor unabhängig von Mef2c

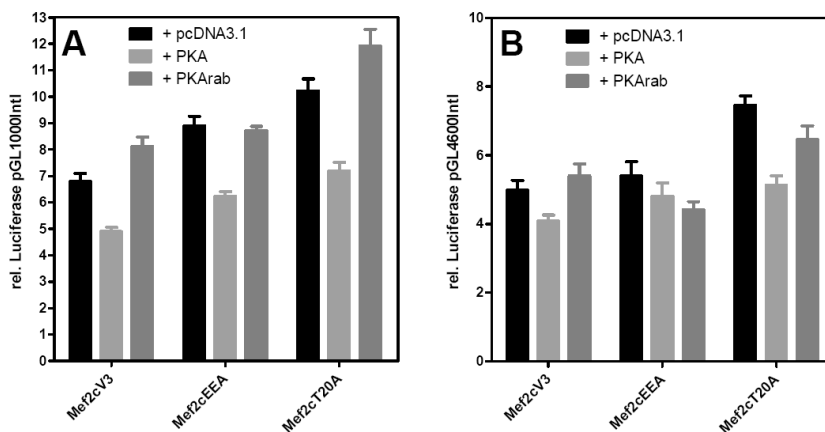


Abbildung 3.37: PKA hemmt die Aktivierung des *Col10a1*-Promotors unabhängig von Mef2c. **A:** Eine Cotransfektion von Chondrozyten mit Mef2c und der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) führt zu einer Reduktion der Promotoraktivität. Eine Cotransfektion von Mef2c mit der regulatorischen Untereinheit der PKA (PKA Arab) hingegen verstärkt die Aktivierung des *Col10a1*-Promotors. Die Mutante Mef2cT20A hat keinen Einfluss auf den hemmenden Effekt der PKA – demnach dürfte dieser nicht über eine Phosphorylierung von Mef2c an dieser Position vermittelt werden. **B:** Die Effekte der PKA auf den pGL4600Intl Reporter sind weniger deutlich, so wird dieser durch die katalytische Untereinheit zwar gehemmt, aber die Aktivierung durch Mef2c wird in Gegenwart der regulatorischen Untereinheit nicht stimuliert.

Zur direkten Untersuchung des Effekts der PKA auf den *Col10a1* Promotor wurden Reporterassays mit den *Col10a1* Promotorkonstrukten und Mef2c in Gegenwart der katalytischen oder der regulatorischen Untereinheit der PKA durchgeführt. Die katalytische Untereinheit von PKA ist bei Dimerisierung mit der regulatorischen Untereinheit inhibiert. In Zellen wird diese Inhibition durch cAMP, welches von der Adenylatcyclase (AC) bereitgestellt wird, aufgehoben. Wie in Abbildung 3.37 A & B zu sehen ist, hemmte die katalytische Untereinheit der PKA (PKA) die Aktivierung der Reporter, während die regulatorische Untereinheit (PKA Arab) die Aktivierung des pGL1000Intl Promotorkonstruktes durch Mef2c weiter steigern konnte. Die Aktivierung des pGL4600Intl Konstruktes konnte nicht weiter gesteigert werden – dies könnte durch das Vorhandensein der repressorischen Region, die durch c-Fos gehemmt werden kann, erklärt werden. Diese Ergebnisse belegen, daß der negative Effekt der PKA nicht durch Phosphorylierung des Mef2c vermittelt wird, da die Aktivierung in Gegenwart von Mef2cT20A in gleicher Weise wie bei Mef2cV3 durch PKA gehemmt wurde. Insgesamt sind die Effekte durch die PKA aber relativ schwach, so daß möglicherweise ein cAMP-abhängiger Signalweg, der nicht über die PKA läuft, für den Großteil der Hemmung verantwortlich ist.

3.4.3 Indian Hedgehog (*Ihh*) Promotor

Die Untersuchung der Regulation des *Ihh* Promotors durch Mef2c war Bestandteil der Diplomarbeit von Ines Dabow [Dabow, 2008]. Der Grund für diese Analysen waren die Aktivierung der *Ihh* Expression in chMM Kulturen durch Mef2c und die Störung der *Ihh* Expression in den Knochen der *Mef2c^{loxP/KO}* Mäuse. Eine Überexpression von Mef2c konnte ein 1,3kb langes Fragment des *Ihh* Promotors [Yoshida et al., 2004] aktivieren (Abb. 3.38 A). Innerhalb dieses Fragments ließen sich 5 potentielle Konsensussequenzen für Mef2c ermitteln, sie lagen an den Positionen -1356, -1214, -967, -787 und -149 relativ zum Translationsstart ATG. Trunkierte Fragmente des *Ihh* Promotors ließen sich ebenfalls leicht durch eine Überexpression von Mef2c aktivieren [Dabow, 2008]. Diese Aktivierung erfolgte aber nicht durch direkte Bindung von Mef2c an den *Ihh* Promotor, denn eine Mutagenese der in Frage kommenden Mef2c-Bindungsstellen hatte keine Abschwächung der Aktivierung zur Folge [Dabow, 2008] und (Abb. 3.38 B). Eine Überexpression von Runx2 hingegen führte zu einer starken Aktivierung des *Ihh* Promotors. Eine Kofunktion mit einem Mef2c Expressionsplasmid reduzierte die Runx2 vermittelte Aktivierung des Reporters um 20 % – eventuell hat Mef2c einen negativen Einfluß auf Runx2. Eine gleichzeitige Expression von Hdac4, einem bekannten Inhibitor von Mef2c und auch Runx2 [Lu et al., 2000; Miska et al., 1999; Vega et al., 2004], kann die Mef2c vermittelte Aktivierung des Reporters hem-

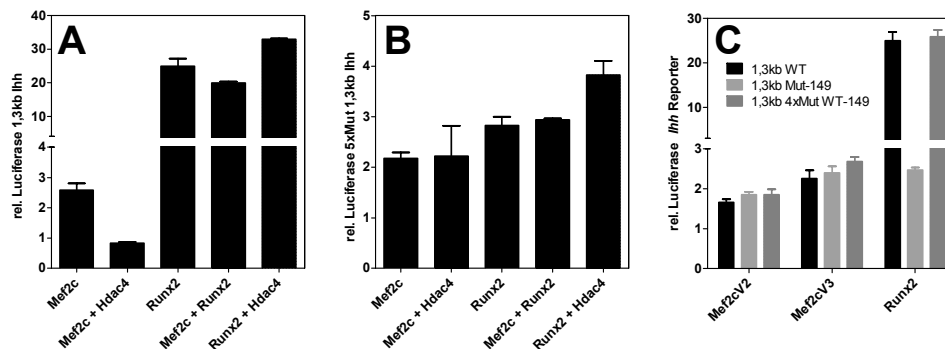


Abbildung 3.38: Aktivierung eines *Ihh* Reporters durch Mef2c und Runx2. **A:** Cos7 Zellen wurden mit einem 1,3kb Indian Hedgehog (*Ihh*)Reporterplasmid und Expressionsplasmiden für Mef2c, Runx2, Hdac4 oder einem leeren pcDNA3.1 Plasmid transfiziert, zur Transfektionskontrolle wurde ein Renillaplasmid eingesetzt. Die Luciferaseaktivität wurde nach 24h gemessen und relativ gegen die Luciferaseaktivität des Reporters in Gegenwart des leeren pcDNA3.1 aufgetragen. Mef2c kann einen *Ihh* Reporter leicht aktivieren, in Gegenwart von Hdac4 wird dies inhibiert. Deutlich stärker ist die Aktivierung durch Runx2, die durch Mef2c leicht gehemmt und durch Hdac4 leicht stimuliert wird. **B:** Relative Luciferaseaktivität eines 1,3kb *Ihh* Reporters, dessen potentielle Mef2c Konsensussequenzen mutiert wurden. Die Aktivierung durch Mef2c wird kaum beeinflusst, während die Aktivierung durch Runx2 stark reprimiert wird. Auch hier hat die Koexpression von Hdac4 einen stimulierenden Einfluß auf die Runx2 vermittelte Aktivierung. **C:** Einfluß der Mef2c Konsensussequenz an Position -149 relativ zum Translationsstart. Eine Mutation dieser Position (1,3kb Mut-149) hat keinen negativen Einfluß auf die Aktivierung des Reporters durch zwei verschiedene Spleißvarianten von Mef2c. Die Aktivierung durch Runx2 wird aber sehr stark reprimiert. Bei einer Mutation der vier anderen Mef2c Konsensussequenzen (1,3kb 4x Mut WT-149) ist weder ein Einfluß auf die Mef2c noch auf die Runx2 vermittelte Aktivierung zu verzeichnen.

men. Die Runx2 vermittelte Aktivierung des Reporters wird durch Hdac4 unerwarteterweise leicht verstärkt. Eine Hemmung der Aktivierung durch Runx2 ließ sich durch Mutagenese der potentiellen Mef2c Bindestelle an Position -149 mit der Sequenz CTATTTATTG fast vollständig unterdrücken. Es könnte sich bei dieser Bindestelle um die TATA-Box des *Ihh* Promotors handeln, aber aufgrund ihrer Position innerhalb des ersten Exons ist dies extrem unwahrscheinlich. Eine Mutation der vier Mef2c Konsensussequenzen außer der an Position -149 hat weder auf die Aktivierung durch Mef2c noch durch Runx2 einen negativen Einfluß (Abb. 3.38 C 1,3kb 4xMut WT-149). Zusammenfassend lässt sich sagen, daß Mef2c zwar die Expression von *Ihh* induziert, aber der Einfluß dürfte indirekter Natur sein.

3.4.4 Integrin binding sialoprotein (*Ibsp*) und Osteocalcin (*Ocn*) Promotoren

Die Überexpression von Mef2c in Hühner Micromass-Kulturen führte zu einer sehr starken Induktion von *Ibsp*, einem Markergen hypertropher Chondrozyten und Osteoblasten. In dem Promotor des Gens *Ibsp* befinden sich mehrere potentielle Bindestellen für Mef2c, so daß eine direkte Aktivierung möglich schien. Das Reporterplasmid BSP-Luc [Barnes et al., 2003], welches den 2,1 kb großen Promotorbereich des humanen *IBSP* enthält, wurde freundlicherweise von Marian F. Young (NIH, Bethesda, USA) zur Verfügung gestellt. Eine Überexpression von Mef2c konnte in Cos7 Zellen den *Ibsp* Promotor nicht aktivieren, während mit Runx2 eine 2,5 fache Aktivierung erreicht wurde (Abb. 3.39 A). Eine Cotransfektion von Mef2c mit Runx2 konnte die Runx2 abhängige Aktivierung nur sehr schwach verstärken, so daß davon auszugehen ist, daß Mef2c keinen direkten Effekt auf den *Ibsp* Promotor hat. Dieses Ergebnis ist in Anbetracht der starken Regulation in chMM Kulturen sowohl durch Mef2c als auch Runx2 überraschend.

Der *Osteocalcin* Promotor wurde ebenfalls nicht durch Mef2c aktiviert, sondern um fast 40 % gegenüber der Kontrolle gehemmt (Abb. 3.39 B). Runx2 induzierte den Reporter fast 14fach, Sp1 immerhin fast 5fach. Eine Koexpression von Runx2 und Sp1 resultierte in einer mehr als 23fachen Aktivierung des Reporters. Mef2c hingegen hatte einen negativen Einfluß auf die Runx2 vermittelte Aktivierung des Reporters – sie wurde um mehr als 60 % auf nur noch knapp 5fach reduziert. Auf die Sp1 vermittelte Regulation des Reporters hatte Mef2c einen sehr viel geringeren Einfluß. Dies ist ein interessantes Ergebnis, da eine retrovirale Überexpression von Mef2c in chBM Kulturen einen leicht induzierenden Einfluß auf die Expression von *Osteocalcin* hatte (Abb. 3.6).

3.4.5 Parathyroid Hormon Rezeptor 1 (*Pthr1*) Promotor

In den chMM Kulturen konnte auch die Expression des Parathyroid Hormon Rezeptors vom Typ1 (*Pthr1*) durch Mef2c erhöht werden. Wie bei *Ihh* war in den mutanten Knochen die Expression von *Pthr1* stark verändert, so daß eine direkte Regulation durch Mef2c angenommen wurde. Dieser Rezeptor ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen, der nach Bindung seines Liganden, dem Parathormon (PTH) oder dem

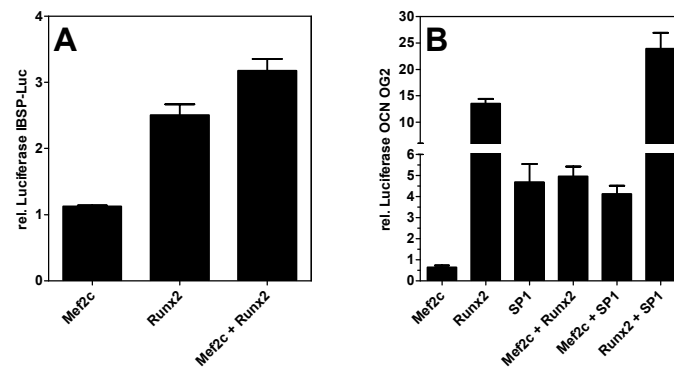


Abbildung 3.39: Regulation des Ibsp und des Ocn Promotors durch Mef2c. **A:** Der Ibsp Promotor wird in Cos7 Zellen nicht durch Mef2c aktiviert. Eine Überexpression von Mef2c kann den Ibsp Promotor nicht aktivieren, während Runx2 eine ca. 2,5 fache Aktivierung hervorruft. Gezeigt ist die Luciferase Aktivität relativ zu der mit leerem pcDNA3.1 transfizierten Zellen. **B:** Regulation des OCN Promotors in Cos7 Zellen. Eine Überexpression von Runx2 und auch Sp1 resultiert in verstärkter Aktivierung des OCN Promotors in Cos7 Zellen, während eine Überexpression von Mef2c den Reporter um fast 40 % gegenüber der Kontrolle hemmt. In Gegenwart von Mef2c wird die Runx2 vermittelte Aktivierung sogar um mehr als 60 % gehemmt. Eine Kofunktion mit Runx2 und Sp1 zeigt die höchste Aktivierung des Promotors, was auf einen synergistischen Effekt zwischen diesen beiden Transkriptionsfaktoren schließen lässt.

Parathormon ähnlichen Peptid (PTHrP), drei Hauptsignalkaskaden induzieren kann. Diese Signalkaskaden führen zu einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), der Proteinkinase C (PKC) und des „extracellular signal-regulated kinase“ (ERK) Signalwegs. Durch die Aktivierung dieser Kinasen werden wiederum Transkriptionsfaktoren in ihrer Aktivität reguliert. Hierzu gehören Runx2, das cAMP response element binding protein (CREB) und AP-1 Transkriptionsfaktoren (z.B. c-Fos und c-Jun). Eine Deletion des *Pthr1*-Gens in der Maus führt zu einem Phänotyp, der dem des konditionellen *Mef2c* Knockouts sehr ähnlich ist [Lanske et al., 1999]. So ist bei *Pthr1*^{-/-} Mäusen die Differenzierung der Chondrozyten und damit die Hypertrophie verzögert (E15,5). Ab E16,5 erscheinen hypertrophe Chondrozyten – im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen aber in einem unregelmässigen Muster und in einem erheblich breiteren Bereich der Wachstumsfuge. Zusätzlich ist die Kortikalis von Radius und Ulna in den KO Mäusen massiv verdickt. Eine Einwanderung von Gefäßen und Osteoblasten in die Wachstumsfuge der KO Tiere ist ebenfalls verzögert und damit auch die Ausbildung trabekulären Knochens.

Durch Überexpression von Mef2c in der Hühner Micromass wurde die Expression des Gens *Pthr1*, welches für den PTH/PTHrP-Rezeptor Typ1 kodiert, bis auf den vierfachen Wert der Kontrolle erhöht (vgl. Abbildung 3.10). In embryonalen Stadien der konditionellen *Mef2c* Knockout Maus war die Expression des Rezeptors in der Wachstumsfuge reduziert und im Perichondrium gänzlich abwesend. Diese Ergebnisse und die ähnlichen Phänotypen der Knockout Mäuse führten zu der Hypothese, daß die Expression des PTH/PTHrP-Rezeptors entweder direkt durch Mef2c reguliert wird oder daß Mef2c im Signalweg unterhalb des Rezeptors einzuordnen ist. Letzteres würde eine Regulation von Mef2c durch PTH oder

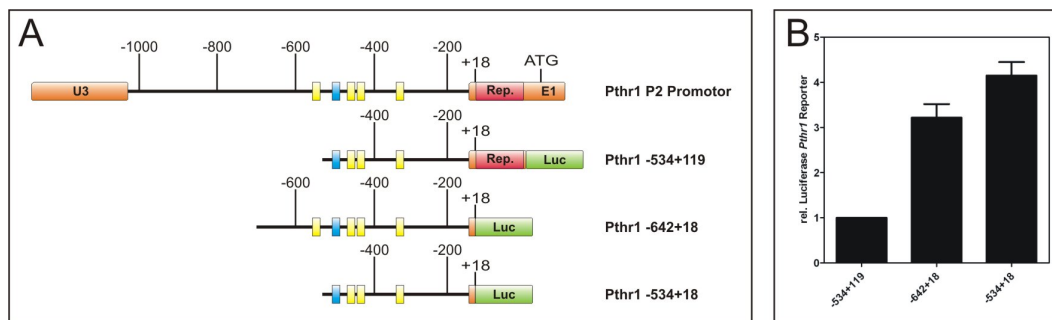


Abbildung 3.40: Aktivierung von *Pthr1* P2 Reporterkonstrukten. **A:** Schematische Übersicht über den Aufbau des murinen *Pthr1* P2 Promotors und der eingesetzten Reporterkonstrukte. Der P2 Promotorbereich erstreckt sich vom untranslatierten Exon U3 bis unmittelbar vor das erste Exon (orange, E1) des Gens, in welchem sich an Position +182 der Translationsstart ATG befindet. Das Konstrukt *Pthr1* -534+119 enthält neben 534 bp aus dem Promotor noch 119 bp aus dem ersten Exon inklusive eines Repressorbereichs (rot, Rep.). Die blauen Boxen markieren die Position der potentiellen Konsensussequenz für Mef2c, die gelben Boxen repräsentieren Sp1 Bindestellen. **B:** Luciferaseaktivitäten der drei eingesetzten Konstrukte relativ zu der Aktivität des *Pthr1* -534+119 Konstrukts. Die Messung erfolgte mit Lysaten aus Cos7 Zellen 24h nach Transfektion. Die beiden Konstrukte ohne den Repressorbereich zeigen eine 3 bzw. 4fach höhere Aktivität.

PTHrP bedeuten.

Das *Pthr1* Gen der Maus setzt besitzt im 5' Bereich 3 untranslatierte Exone (U1-U3) vor dem ersten kodierenden Exon (E1) mit einer Signalsequenz und dem Translationsstart ATG. In der Maus wurden 2 verschiedene Promotorbereiche für das Gen *Pthr1* identifiziert (P1 & P2), die räumlich und zeitlich unterschiedlich aktiviert werden [McCuaig et al., 1994, 1995]. Beim Menschen hingegen wurde noch ein dritter Promotorbereich (P3) identifiziert [Bettoun et al., 1998]. Der P1 Promotor der Maus ist hauptsächlich in der Niere, der Promotor P2 dagegen ist in verschiedenen Geweben aktiv – unter anderem auch im Knochen. Im Bereich des P2 Promotors befindet sich eine potentielle Mef2c Konsensussequenz (CTAAAATA), die über mehrere Spezies konserviert ist. In Abbildung 3.40 A ist eine schematische Übersicht über den Aufbau der *Pthr1* Reporterkonstrukte und die Positionen der Konsensussequenzen für Mef2c und Sp1 gezeigt. Innerhalb des ersten Exons des *Pthr1* Gens befindet sich ein repressorischer Bereich. Reporterkonstrukte, denen dieser Bereich fehlt, zeigten in Cos7 Zellen eine 3–4fach höhere Aktivität (Abb. 3.40 B). Die drei verschiedenen *Pthr1* Reporterkonstrukte konnten durch Überexpression der Transkriptionsfaktoren Mef2c, Sp1 oder Runx2 aktiviert werden (Abb. 3.41). Eine Überexpression von Mef2c oder auch der Variante Mef2cEEA führte zu einer zweifachen Aktivierung der Reporter gegenüber der Kontrolle. Runx2 aktivierte die Reporter mehr als dreifach und Sp1 schließlich mehr als vierfach. Eine Koexpression von Sp1 mit Mef2c bzw. Runx2 führte zu einer Multiplikation der Einzeleffekte – so wurde durch Mef2c + Sp1 eine achtfache Aktivierung und bei Transfektion von Runx2 + Sp1 eine bis zu 16fache Aktivierung erreicht. Dies war aber in gewissem Maße abhängig von dem eingesetzten Reporterkonstrukt. Die höchste Aktivierung (16fach, Runx2 + Sp1, Abb. 3.41 B) ließ sich mit dem Konstrukt *Pthr1* -642+18 erreichen – dieses Konstrukt besaß eine Sp1 Bindestelle mehr und hatte keinen Repressorbereich.

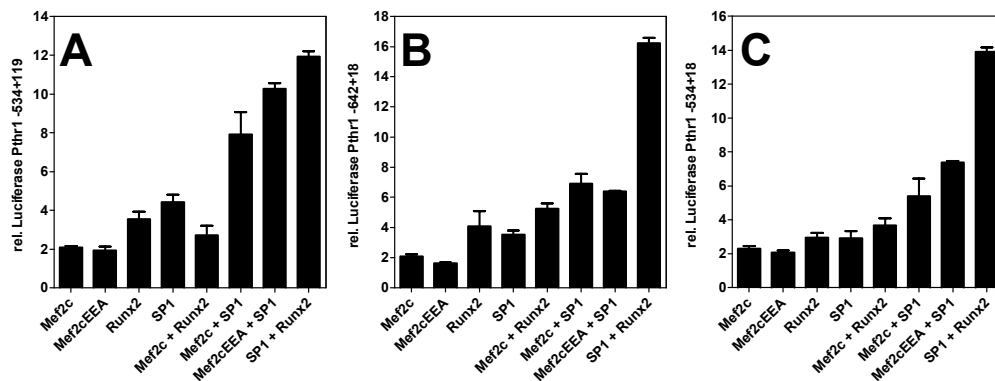


Abbildung 3.41: Regulation des *Pthr1* Promotors durch *Mef2c*, *Runx2* und *Sp1*. Relative Luciferaseaktivitäten von unterschiedlichen *Pthr1* Reporterkonstrukten in *Cos7* Zellen bei Überexpression von *Mef2c*, *Runx2* und *Sp1*. Die Werte sind auf die Luciferaseaktivität der jeweiligen Reporter bei Kotransfektion mit einem leeren *pcDNA3.1* Plasmid bezogen. *Mef2c* kann den *Pthr1* Promotor jeweils ca. zweifach aktivieren, *Runx2* mehr als dreifach und *Sp1* mehr als vierfach. Eine Koexpression der Faktoren führt zu einer synergistischen Aktivierung von bis zu 16fach (B *Sp1* + *Runx2*). In Gegenwart des repressorischen Bereichs innerhalb des ersten Exons des *Pthr1* Gens, erreicht die Koexpression von *Mef2cEEA* und *Sp1* (A) eine ähnlich hohe Aktivierung (10×) wie eine Koexpression von *Runx2* und *Sp1* (ca. 12×). Die Reporter ohne den repressorischen Bereich (B & C) werden durch eine Koexpression von *Runx2* und *Sp1* deutlich stärker aktiviert als bei Koexpression von *Mef2c* mit *Runx2* oder *Sp1*.

Betrachtet man die Regulation des Reporters mit dem Repressorbereich (Abb. 3.41 A), so wird deutlich, daß *Mef2c* die *Runx2* vermittelte Aktivierung reduzierte. Im Gegensatz dazu aktivierte *Mef2cEEA* in Gegenwart von *Sp1* den Reporter auf mehr als 80 % der mit *Runx2* + *Sp1* erreichten Aktivität. Wurden alle drei Faktoren zusammen exprimiert, so war auch hier ein kumulativer Effekt zu beobachten (Abb. 3.42 A & B) – allerdings war die Aktivierung des Reporters insgesamt niedriger – vermutlich aufgrund der größeren Menge an transfizierter DNA.

Zur Überprüfung, ob der *Pthr1* Promotor direkt durch *Mef2c* reguliert wird, wurde die *Mef2c* Konsensussequenz von CTAAAATA nach CTACCAGTA mutiert. Reporterassays mit diesem Konstrukt zeigten keinen Unterschied in der Aktivierung durch *Mef2c* oder auch *Sp1* in Bezug auf den unveränderten Promotor (Abb. 3.42 C). Einzig die synergistische Aktivierung durch *Mef2c* und *Sp1* wurde leicht inhibiert. Damit ist davon auszugehen, daß der *Pthr1* Promotor nicht durch direkte Bindung von *Mef2c* an die DNA reguliert wird.

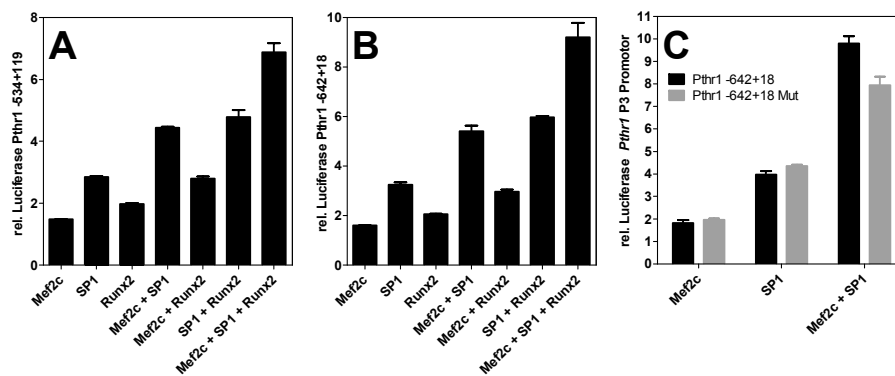


Abbildung 3.42: Zusammenspiel von Mef2c, Sp1 und Runx2 bei der Regulation des Pthr1 Promotors. **A & B:** Eine gleichzeitige Überexpression der Transkriptionsfaktoren Mef2c, Sp1 und Runx2 zeigt multiplikative Effekte bezüglich der Aktivierung des Pthr1 Promotors. Gezeigt sind relative Luciferaseaktivitäten von Pthr1 Reporter-konstrukten bei Koexpression von Mef2c, Runx2 und Sp1. Cos7 Zellen wurden bei Aussaat mit insgesamt 555 ng DNA transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Lysate gemessen. **C:** Der Pthr1 Promotor wird nicht durch direkte Bindung von Mef2c reguliert. Eine Mutation der möglichen Mef2c Bindestelle bewirkt keinen Unterschied in der Aktivierung des Reporters durch Mef2c und auch Sp1 in Bezug auf den Wildtyp Promotor. Einzig die Aktivierung des Reporterkonstruktes durch eine Kotransfektion von Mef2c und Sp1 wird etwas reduziert.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Identifikation und funktionelle Untersuchung von Kandidatengen

Da das Ziel der vorliegenden Arbeit die Identifizierung und funktionelle Untersuchung von neuen Faktoren mit einer regulativen Funktion in der Skelettentwicklung war, wurden Ergebnisse eines Vergleichs der Genexpression von *Runx2*^{-/-} Mäusen mit Wildtyp Mäusen [Hecht et al., 2007] als Grundlage herangezogen. Von den mehr als 70 Genen mit veränderter Expression wurde zunächst anhand der bekannten oder vermutlichen Genfunktion eine Prioritätenliste erstellt. Von 34 Genen wurden die Expressionsmuster in Skelettelementen bestimmt und für die funktionelle Untersuchung wurden schließlich sechs Kandidaten ausgewählt.

4.1.1 Strategie des Kandidatengenscreenings

Zur funktionellen Untersuchung einer größeren Anzahl von Genen mit möglichem Einfluss auf die Skelettentwicklung sollten die Auswirkungen der Überexpression der Kandidaten *in vitro* untersucht werden. *In vivo* Ansätze mit transgenen oder Knockout Tiermodellen waren für ein solches Screening nicht geeignet, da sie erheblich aufwendiger sind. Ebenfalls für ungeeignet wurden *ex vivo* Systeme mit Explantaten von Gliedmaßen erachtet, da diese sich in erster Linie nur für die Behandlung mit sezernierten Faktoren oder chemischen Substanzen eignen, die über Rezeptoren oder Diffusion in die Zellen gelangen. Transkriptionsfaktoren beispielsweise lassen sich auf diese Weise nicht untersuchen. Die Herunterregulation der Expression der Kandidatengene durch einen *siRNA* vermittelten Knockdown wäre eine weitere Möglichkeit, aber sie erfordert ebenfalls mehr Aufwand, da für jedes zu beeinflussende Gen mehrere Sequenzen getestet werden müssen, um eine ausreichende Knockdown Effizienz zu erhalten. Für die Überexpression hingegen ist die einfache Klonierung der kodierenden Sequenz des entsprechenden Gens in einen Expressionsvektor ausreichend.

4.1.2 Zellsysteme und Vektoren

Die aus Mauskalvarien etablierte Zelllinie MC3T3-E1 ist ein viel benutztes Modellsystem für differenzierende Osteoblasten – sie lässt sich aber nur mit relativ niedrigen Effizienzen transfizieren und ist deswegen zum funktionellen Screening durch Überexpression nur bedingt geeignet [Sudo et al., 1983; Wang et al., 1999b; Xiao et al., 1997]. Hühnerzellen hingegen bieten den Vorteil der Infizierbarkeit mit dem retroviralen RCAS-System, welches eine nahezu 100%ige Infektionsrate der Kulturen erlaubt – dadurch können theoretisch auch schwache Effekte analysiert werden, da Schwankungen aufgrund unterschiedlicher Transfektionseffizienzen reduziert werden [Hughes et al., 1987]. Der retrovirale Gentransfer bietet den Vorteil der permanenten Integration des Transgens in das Wirtsgenom, so daß die infizierten Zellen das gewünschte Protein stabil exprimieren. Aufgrund der relativ milden Expression durch den viralen *LTR*-Promotor wird die Zelle durch die transgenen Proteine zusätzlich nicht so stark belastet. Die herkömmliche Vorgehensweise beim Klonieren von kodierenden Sequenzen in den RCAS sieht eine Zwischenklonierung über Adapterplasmide wie z.B. pSlax vor, da diese bezüglich zu verwendender Schnittstellen flexibler als der RCAS sind, der nur die Klonierung über eine *ClaI*-Schnittstelle ermöglicht [Hughes et al., 1987]. Zur Beschleunigung der Klonierungen in den RCAS wurde dieser durch Einfügen einer *Swal/Smil*-Schnittstelle modifiziert, um nach Restriktion und Anhängen eines Thyminrests eine T/A-Klonierung zu ermöglichen (siehe Abschnitt 2.1.8). Diese Modifikation stellte sich als sinnvoll heraus, da Klonierungen in den RCAS-T/A deutlich unaufwendiger waren, was in einer Zeit- und Kostenersparnis resultierte.

4.1.3 Etablierung eines Zellsystems zur Untersuchung der Osteoblastendifferenzierung

Zu Beginn der Arbeit stand mit der Hühner Micromass Kultur (chMM) ein gut etabliertes und charakterisiertes System zur funktionellen Untersuchung von Kandidaten in Chondrozyten zur Verfügung [Mello und Tuan, 1999; Seemann, 2006]. Für die Untersuchung der Effekte auf die Differenzierung von Osteoblasten war jedoch kein *in vitro* System mit Hühnerzellen verfügbar.

Es wurden zwei verschiedene Ansätze mit Primärzellen verfolgt. Im Laufe der Arbeit konnte die Kultivierung von multipotenten mesenchymalen Stromazellen aus dem Knochenmark von Hühnerembryonen (chBM oder chBMSC) etabliert werden, die in der Lage waren, bei Stimulation durch Ascorbinsäure und β -Glycerolphosphat zu Osteoblasten zu differenzieren und eine mineralisierte extrazelluläre Matrix zu sezernieren (Abb. 3.2).

Mesenchymale Stromazellen des Knochenmarks

Bereits in den 1960er Jahren wurden erste Forschungsarbeiten an Stromazellen aus dem Knochenmark durchgeführt [Friedenstein et al., 1966]. In der genannten Arbeit wurde ebenfalls schon das Potential dieser Zellen, nach Transplantation knöcherne Strukturen aufbau-

en zu können, dokumentiert. In weiteren Experimenten konnten einlagige Kulturen (Monolayer) aus adhärennten Zellen des Knochenmarks angelegt werden, in denen unterschiedliche Kolonien gebildet wurden [Friedenstein et al., 1970, 1974]. Anhand dieser Kolonien erkennt man auch hervorragend die heterogene Zusammensetzung der Kulturen – die Kolonien stammen jeweils von einer Vorläuferzelle ab (vergleiche dazu auch Abbildung 3.1). Das Stroma des Knochenmarks dient als Reservoir für Zellen, die einen multipotenten Stammzellcharakter haben – im Gegensatz zu pluripotenten Stammzellen können sie aber nicht in alle Gewebe differenzieren.

Neben der Fähigkeit zur Bildung von Knochen können diese Zellen auch noch in weitere mesodermale Gewebe wie Knorpel, Fettgewebe und Muskeln differenzieren – unter geeigneten Bedingungen können sie auch transformiert werden, z.B. von Adipozyten zu Osteoblasten [Bennett et al., 1991; Mackay et al., 1998; Pittenger et al., 1999; Rickard et al., 1994]. Ein großer Vorteil dieser Zellen gegenüber embryonalen Stammzellen liegt darin, daß sie auch aus adulten Organismen gewonnen werden können [Yoshikawa et al., 1996]. Werden diese Zellen transplantiert, können sie auch Faktoren produzieren, die die sie umgebenden Zellen beeinflussen können. Diese Eigenschaften sind auch der Grund dafür, daß diese Zellen gerade im Bereich der regenerativen Therapien intensiv erforscht werden [Pittenger, 2008]. Neben Knochen kann z.B. auch Lungen- und Herzgewebe durch diese Zellen regeneriert werden [Ferrari et al., 1998; Rojas et al., 2005].

Auch die Zellen der chBM Kulturen haben das Potential, neben Osteoblasten auch zu Chondrozyten und Adipozyten zu differenzieren (Abb. 3.1) – in Yoshida und Yumoto [1987] wurde die Isolation von mindestens zwei unterschiedlichen Zelltypen im Hühnerknochenmark dokumentiert, die eine Aktivität der Alkalischen Phosphatase aufweisen.

Eigenschaften der chBM Kultur

Die chBM Kulturen eignen sich als Modellsystem der osteoblastischen Differenzierung und erlauben eine gleichmässige Überexpression von Genen durch den RCAS. Die Zellen lassen sich mindestens zweimal passagieren, ohne ihr Differenzierungspotential zu verlieren – dadurch können ausreichende Zellzahlen erhalten werden, um auch größere Experimente durchzuführen. Der Differenzierungszustand dieser Zellen konnte zu ausgewählten Zeitpunkten über eine Bestimmung der Mineralisation, der Aktivität der alkalischen Phosphatase oder über ein Expressionsprofil per quantitativer RT-PCR (qRT-PCR) bestimmt werden und erlaubte somit eine detaillierte Analyse. Anhand der Expressionsprofile (vgl. Abb. 3.3) stimulierter chBM Kulturen konnte die osteoblastische Differenzierung dieser Zellen verfolgt werden. So wurde früh nach Stimulation die Expression von *Bmp2*, *Runx2* und damit von *Akp2* und *Ibsp* induziert, die beide unter anderem durch *Runx2* reguliert werden [Barnes et al., 2003; Harada et al., 1999]. Die Expression der Alkalischen Phosphatase wird zusätzlich noch durch *Dlx5* auf eine *Runx2* unabhängige Weise reguliert [Kim et al., 2004]. Im weiteren Verlauf wurden dann *Osteopontin (Opn)* und *Osteocalcin (Ocn)* von den reifen Osteoblasten exprimiert. Beide Gene werden direkt durch *Runx2* reguliert [Ducy et al.,

1997; Frendo et al., 1998; Sato et al., 1998] – interessant ist hierbei, daß die Expression dieser Gene zunahm, obwohl die mRNA Menge von *Runx2* sank. Dies zeigt, daß auch hier neben *Runx2* noch weitere Faktoren an der Regulation der Expression dieser Gene beteiligt sind.

Nachteile der chBM Kultur

Als ein wesentlicher Nachteil der chBM Kultur stellte sich im Verlauf die hohe Sensibilität für die in der Zellkultur verwendeten fetalen Kälberseren her. Vor Beginn der eigentlichen Experimente müssen verschiedene Seren sorgfältig miteinander verglichen werden, um reproduzierbare Ergebnissen zu gewährleisten. Dies bietet aber auch die Chance, durch die Wahl des Serums die Kulturen in der Geschwindigkeit der Differenzierung zu beeinflussen, um z.B. die Effekte eines repressorischen Faktors besser analysieren zu können. Gleiches gilt für die verwendete Konzentration an β -Glycerolphosphat – niedrige Konzentration verlangsamen die Mineralisation und damit lassen sich die Effekte starker Aktivatoren wie z.B. *Runx2* besser auflösen. Die chBM Kulturen stellen heterogene Zellgemische dar, die je nach Präparation eine unterschiedliche Zellzusammensetzung aufweisen und damit auch unterschiedlich stark auf die Überexpression bestimmter Gene reagieren können. Dies wird sicherlich zu einem Teil durch die lange – 18tägige Inkubationszeit der Eier verursacht, da die Hühnerembryonen sich unterschiedlich schnell zu entwickeln scheinen und dadurch die zelluläre Zusammensetzung des Knochenmarks stark variieren kann. Es ist zwingend notwendig, die Experimente mit den chBM Kulturen mehrfach zu wiederholen, um die Ergebnisse abzusichern.

Die Überexpression von *Mef2c* hat gezeigt, daß – trotz des Fehlens eines offensichtlichen Effekts auf die Mineralisation – Expressionsprofile der infizierten Zellen durchgeführt werden sollten, da diese eine sehr viel feinere Analyse erlauben. Dies gilt natürlich auch für die chMM Kulturen.

4.1.4 Überexpression bekannter Faktoren der Skelettentwicklung in der chBM Kultur

Die Überexpression von *Runx2*, einem wichtigen Transkriptionsfaktor der Chondrozyten- und Osteoblastendifferenzierung konnte die Differenzierung dieser Zellen und damit die Mineralisation beschleunigen (Abb. 3.4) und bot sich somit als Positivkontrolle an. Eine Hemmung der Reifung wurde erwartungsgemäß durch die Überexpression einer dominant-negativen Variante von *Runx2* (*Runt*) erreicht – ebenso wie durch PTHrP, *Sox9* und *Sclerostin* (*Sost*) (Abb. 3.5). Eine Überexpression von *Sox9* verschob vermutlich das Gleichgewicht der Kulturen in Richtung der Differenzierung von Chondrozyten. PTHrP ist einerseits bekannt für eine hemmende Wirkung auf die Differenzierung von Chondrozyten [Iwamoto et al., 1995], andererseits hat eine Behandlung von Osteoblasten mit PTHrP sowohl stimulierende als auch hemmende Effekte [Hock und Gera, 1992]. Ein hemmender Effekt tritt bei dauerhafter Behandlung ein – dies könnte an der Hemmung der Expression von *Runx2*

durch PTHrP [Li et al., 2004] liegen. Sclerostin ist bekannt für einen inhibitorischen Effekt auf den Wnt-Signalweg und damit die Mineralisation [Kamiya et al., 2008]. Diese Ergebnisse zeigen, daß die chBM Kulturen zur funktionellen Analyse stimulierender und hemmender Faktoren gleichermaßen geeignet sind.

4.1.5 Kandidatengene

Funktionell untersucht wurden letztlich folgende Kandidaten: *Fabp3*, *Irx5*, *Mef2c*, *Pannexin3*, *Satb2* und *Smpd3*. Hiervon zeigten *Fabp3*, *Irx5* und *Satb2* einen hemmenden, *Mef2c* und *Panx3* einen stimulierenden Effekt auf die Mineralisation der Osteoblasten (Abb. 3.4).

Im Folgenden soll noch kurz auf besonders interessante Kandidaten eingegangen und ein kurzer Überblick über die relevanten Informationen gegeben werden.

Iroquois related homeobox 5 (*Irx5*)

Irx5 ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Musterbildung in der Organentwicklung beteiligt ist. Es existieren *Irx5*-Knockout Mäuse, die lebens- und fortpflanzungsfähig sind, aber leichte Defekte in der Entwicklung der Retina und verminderte EKG-Signale während der ventrikulären Repolarisation zeigen [Costantini et al., 2005]. Zusätzlich sind diese Tiere etwas kleiner als die Kontrolltiere. Mäuse mit einem Doppelknockout von *Irx3* und *Irx5* zeigen einen Skelettphänotyp (interne Kommunikation mit Boris Thurisch). Dadurch, daß schon skelettrelevante Untersuchungen an *Irx5* unternommen wurden/werden, fiel dieses Gen als Kandidat aus.

Pannexin3 (*Panx3*)

Pannexin3 gehört zu einer Familie von Proteinen, die neben Connexinen an der Ausbildung von *Gap junctions* beteiligt sind und dadurch einen Einfluß auf z.B. Calcium-Signale haben [Baranova et al., 2004; Litvin et al., 2006]. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war sehr wenig über die Pannexine im Allgemeinen bekannt, mittlerweile wurde ihre Expression im Knorpel und in der Cochlea nachgewiesen [Penuela et al., 2007; Wang et al., 2009]. Kürzlich wurde eine Interaktion von Pannexin1 mit dem P2X7 Purinrezeptor bei der Regulation verschiedener Interleukine nachgewiesen [Pelegrin, 2008]. Interleukin-1 z.B. induziert *Mmp13*, die für den Abbau von Knorpelmatrix notwendig ist [Mengshol et al., 2001]. Somit könnten die Pannexine eine Rolle bei Entzündungserkrankungen wie rheumatoider Arthritis spielen und wären damit interessante Kandidaten für eine funktionelle Untersuchung im Knochen.

Special AT-rich sequence binding protein 2 (*Satb2*)

Satb2 ist ein Faktor, der an die DNA bindet – Mutationen im humanen *SATB2* Gen führen zu einer Gaumenspalte [FitzPatrick et al., 2003]. Die Deletion des murinen *Satb2* resultiert

in einem Phänotyp, der dem von Patienten mit einer Gaumenspalte ähnelt – darüberhinaus führt die Deletion zu einem Defekt der Osteoblastendifferenzierung und -funktion [Dobrevá et al., 2006]. Eine direkte Interaktion von *Satb2* mit *Runx2* wurde ebenfalls von den Autoren beschrieben. Aus diesen Gründen fiel *Satb2* ebenfalls als Kandidat aus.

Myocyte enhancer factor 2c (Mef2c)

Als Hauptkandidat für detaillierte Untersuchungen wurde *Mef2c* ausgewählt, da es in Chondrozyten und im Perichondrium exprimiert wird und einen positiven Effekt auf die Differenzierung der chBM Kulturen zeigte. Da *Mef2c* ein Transkriptionsfaktor ist, bestand außerdem die Möglichkeit, daß es eine zentrale Rolle bei der Aktivierung eines für die Skelettentwicklung notwendigen Programms spielt. Zum Zeitpunkt der Auswahl war noch nicht belegt, daß *Mef2c* eine Rolle in der Skelettentwicklung spielt. Es gab lediglich Hinweise auf eine Regulation der Expression von *Col10a1*, die aber nicht durch ausreichende funktionelle Untersuchungen verifiziert waren [Harada et al., 1997; Stanton et al., 2003]. Zusätzlich wurde die Wahl durch eine verfügbare *Mef2c^{loxP}* Maus begünstigt [Vong et al., 2005].

4.1.6 Mef2c reguliert die Hypertrophie von Chondrozyten *in vitro*

Mef2c wurde sowohl in chBM Kulturen als auch in chMM Kulturen retroviral überexprimiert. Der zunächst beobachtete stimulierende Effekt auf die Mineralisation der chBM Zellen konnte im weiteren Verlauf nicht mehr reproduziert werden (Abb. 3.5). Der Grund hierfür könnte das im Verlauf der Arbeit veränderte Verfahren zur Kultivierung der chBM Zellen gewesen sein. Es zeigte sich aber bei der Untersuchung der Expressionsprofile der chBM Kulturen, daß eine Überexpression von *Mef2c* vor allem zu einer verstärkten Expression von *Col10a1* und *Ibsp* führte. *Col10a1* ist ein Markergen für hypertrophe Chondrozyten, *Ibsp* wird eher von Osteoblasten, aber auch von hypertrophen Chondrozyten exprimiert [Javed et al., 2001; Schmid und Linsenmayer, 1985a]. Somit ist anzunehmen, daß *Mef2c* evtl. eine stärkere Rolle bei der Hypertrophie der Chondrozyten spielt und weniger in der Osteoblastendifferenzierung. Dies könnte die unterschiedlichen Effekte auf die Mineralisation erklären. Die Expressionsmuster von *Mef2c* und auch *Mef2a* und *Mef2d* (Abb. 3.11) sprechen ebenfalls für eine Rolle der MEF2 Faktoren in den Chondrozyten – es fand sich hauptsächlich Signal in den prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten, aber auch im Perichondrium. Erwartungsgemäß konnte eine Überexpression von *Runx2* in chBM Zellen die Expression von *Mef2c* erhöhen – in den *Runx2^{-/-}* Mäusen war die Expression von *Mef2c* reduziert. *Mef2c* hatte aber keinen Effekt auf die Expression von *Runx2*, während beide Faktoren die Expression von *Mef2b* stimulierten.

Die Hypothese, daß *Mef2c* eine Rolle bei der Differenzierung der Chondrozyten spielt, wurde durch die Ergebnisse der Überexpression von *Mef2c* in chMM Kulturen weiter untermauert (Abb. 3.10). So wurde auch hier die Expression von *Col10a1* und *Ibsp* induziert. Zusätzlich wurde aber auch die Expression der Alkalischen Phosphatase (*Akp2*), von Indian Hedgehog (*Ihh*) und des PTH/PTHrP Rezeptors (*Pthr1*) stimuliert. Letzterer wurde

exklusiv durch *Mef2c* induziert, während die Expression der anderen Faktoren auch durch die Überexpression von *Runx2* stimuliert wurde. Im Gegensatz zu *Runx2* hatte *Mef2c* keinen Einfluß auf die Morphologie der Chondrozyten (vgl. Abb. 3.9) und die Synthese von Proteoglykanen der extrazellulären Matrix (Abb. 3.8). Dies lässt den Schluß zu, daß *Mef2c* entweder weniger Zielgene während der Differenzierung von Skelettelementen reguliert oder daß es selber sehr eng in seiner Aktivität reguliert wird. Die Tatsache, daß *Runx2* die Expression von *Mef2c* reguliert, *Mef2c* aber nicht die Expression von *Runx2*, deutet darauf hin, daß *Mef2c* regulatorisch unterhalb von *Runx2* einzuordnen ist und deswegen nicht so breitgefächert auf die Differenzierung von Chondrozyten wirkt wie *Runx2*, sondern vermutlich spezifisch den Beginn der Hypertrophie reguliert. Hierfür spricht auch die starke Regulation der *Col10a1* Expression. Im Knochen überlappen die Expressionsdomänen von *Mef2c* und den Faktoren, die *in vitro* induziert werden konnten, so daß eine *in vivo* Regulation dieser Gene durch *Mef2c* möglich erscheint. Zumindest die Regulation von *Col10a1* wurde schon in Harada et al. [1997] vermutet und in Arnold et al. [2007] endgültig gezeigt.

4.2 Skelettspezifische Deletion von *Mef2c*

Eine Deletion von *Mef2c* im gesamten Organismus ist aufgrund schwerer Entwicklungsstörungen des Herzens zum Zeitpunkt E9,5 letal [Lin et al., 1997]. Da in diesem Entwicklungsstadium noch keine Skelettelemente angelegt sind, eigneten sich diese Mäuse nicht für eine Untersuchung der Rolle von *Mef2c* in der Skelettentwicklung. Aus diesem Grund wurden *Mef2c^{loxP}* Mäuse [Vong et al., 2005] mit verschiedenen *Cre* Mäusen verpaart, um eine konditionelle Deletion in Skelettelementen zu erreichen.

4.2.1 Die Deletion von *Mef2c* verursacht Veränderungen in den Wachstumsfugen

Die Deletion von *Mef2c* in der gesamten Extremitätenknospe (*Mef2c^{Prx1Cre/KO}*) oder in allen Chondrozyten (*Mef2c^{Col2Cre/KO}*) verursachte einen Phänotyp in den betroffenen Skelettelementen. Betrachtet man die Röhrenknochen der Gliedmaßen, so zeigten beide Ansätze den gleichen Phänotyp – darüberhinaus hatte ein Verlust von *Mef2c* in allen Chondrozyten Auswirkungen auf alle enchondral gebildeten Knochen. Dies und die Tatsache, daß weder eine Deletion von *Mef2c* in hypertrophen Chondrozyten (*Mef2c^{Col10Cre/KO}*) noch in Osteoblasten (*Mef2c^{Col1Cre/KO}*) einen Phänotyp verursachte (Abb. 3.16), spricht für die Hypothese, daß *Mef2c* eine Rolle in Chondrozyten spielt, und zwar bei der Regulation des Übergangs vom prähypertrophen zum hypertrophen Zustand. Dies wurde auch parallel durch Arnold et al. [2007] beschrieben. *Mef2c* reguliert direkt die Expression von *Col10a1*, dies ist der Grund dafür, daß eine Deletion von *Mef2c* mit Hilfe der *Cre* Rekombinase unter der Kontrolle des *Col10a1* Promotors keinen Effekt zeigte (vergleiche dazu die Abbildungen 3.16 und 3.29 B). In diesem Fall wurde *Mef2c* nach der Ausübung seiner Funktion deletiert.

Die homozygoten Mutanten hatten bei der Geburt verkürzte, gebogene und teilweise verdrehte Röhrenknochen mit vergrößerten Knorpelbereichen (Abb. 3.13). Zusätzlich waren die kortikalen Knochen von Humerus, Femur und Ulna gegenüber den Kontrolltieren verdickt, während Radius, Tibia und Fibula keine bzw. fast keine Mineralisation aufwiesen. Die Mäuse zeigten einen watschelnden Gang und die *Mef2c^{Col2Cre/KO}* Mäuse waren auch etwas kleiner als die Kontrolltiere. Histologische Analysen der Humeri verschiedener Stadien zeigten, daß die Anordnung der Chondrozyten in den Wachstumsfugen gestört und die Hypertrophie der Chondrozyten verzögert war (Abb. 3.14). Die vaskuläre Invasion der Wachstumsfuge war wie die Ausbildung der primären Spongiosa verzögert. In älteren Tieren zeigte sich neben der Verdickung des kortikalen Knochens durch das Verbleiben hypertropher Chondrozyten eine erhebliche Verbreiterung der Wachstumsfuge (Abb. 3.17 und 3.18). Auch die Entwicklung des sekundären Ossifikationszentrums war durch die Deletion von *Mef2c* beeinträchtigt – im Alter von vier Wochen bestand es nur aus mineralisierter Knorpelmatrix, acht Wochen nach der Geburt bestand es immer noch zu ca. 50 % aus trabekulärem Knochen.

4.2.2 Vergleich des Phänotyps mit humanen Erkrankungen

Zur Abschätzung, welche regulatorischen Schritte der Knochenentwicklung durch eine Deletion von *Mef2c* beeinträchtigt waren, wurden Vergleiche mit bekannten humanen Erkrankungen und Mausmodellen (siehe Abschnitt 4.2.3) durchgeführt. Die Merkmale der *Mef2c^{-/-}* Mäuse – Kleinwuchs, die verkürzten & gebogenen Extremitäten, der watschelnde Gang, die ungeordnete und verbreiterte hypertrophe Zone in der Wachstumsfuge – finden sich insbesondere bei metaphysären Chondrodysplasien – speziell bei denen von den Typen Schmid (MCDS) und Jansen (JMC) [Kozłowski et al., 1999; Mäkitie et al., 2005].

Metaphysäre Chondrodysplasie Typ Schmid (MCDS)

Die metaphysäre Chondrodysplasie vom Typ Schmid (MCDS) ist durch eine bei Geburt normale Größe und einen postnatal einsetzenden Kleinwuchs mit Verbiegung der Röhrenknochen der unteren Extremität gekennzeichnet. Die Wachstumsfugen sind verbreitert und unregelmäßig. Als Ursache konnten heterozygote Mutationen im *COL10A1* Gen identifiziert werden. Die meisten dieser Mutationen liegen in der C-terminalen nicht-Kollagen-Domäne (NC1) und haben trunkierende Wirkung. Zwar wurde eine teilweise Degradation der mutierten mRNA im Sinne eines Nonsense-mediated Decay festgestellt, jedoch konnte belegt werden, daß die verbleibenden trunkierten COL10A1-Moleküle einen dominant negativen Effekt entfalten [Chan et al., 1998; Ho et al., 2007; Warman et al., 1993]. Erst durch Untersuchung von Mausmodellen (s.u.) konnte näher aufgeklärt werden, ob die Erkrankung durch eine Haploinsuffizienz oder durch einen dominant negativen Effekt der Mutationen verursacht wird.

Metaphysäre Chondrodysplasie Typ Jansen (JMC)

Bei der metaphysären Chondrodysplasie vom Typ Jansen führen aktivierende Mutationen im humanen *PTHR1* Gen zu einer konstitutiven Aktivierung der PTH/PTHrP Signalkaskade, die zu einer Anhäufung von cAMP in den betroffenen Zellen führen [Schipani et al., 1997a, 1995]. Die JMC unterscheidet sich von der MCDS darin, daß sie sich bereits bei Geburt manifestiert und die Metaphysen deutlich stärker betroffen sind, wodurch die Gelenke aufgetrieben erscheinen.

Achondroplasie

Die Achondroplasie ist eine weitere angeborene Entwicklungsstörung, bei der die Patienten kleinwüchsig sind und stark verkürzte Gliedmaßen haben. Die Ursache hierfür sind Mutationen im *FGFR3* Gen, welches für den FGF-Rezeptor 3 kodiert [Rousseau et al., 1994; Shiang et al., 1994]. Bei der Achondroplasie ist die Organisation der Metaphyse jedoch weniger stark betroffen – außerdem wird das *Fgfr3* Gen in ruhenden Chondrozyten und nicht im hypertrophen Knorpel exprimiert – ein Einfluß durch Mef2c erscheint damit unwahrscheinlich [Peters et al., 1993].

4.2.3 Vergleich des Phänotyps mit anderen Mausmodellen mit veränderten Wachstumsfugen

Der Phänotyp, der durch die Deletion von *Mef2c* in Skelettelementen verursacht wird, ähnelt stark dem der metaphysären Chondrodysplasien. Deswegen sollen hier zunächst verfügbare Mausmodelle zu diesen Erkrankungen mit der *Mef2c^{loxP/KO}* Maus verglichen werden. Zusätzlich sollen noch Vergleich mit *Runx2* oder *Hdac4* defizienten Mäusen durchgeführt werden, da diese Deletionen auch einen Einfluß auf die Wachstumsfuge haben.

***Col10a1*-Mausmutanten**

Da zunächst angenommen wurde, daß die MCDS auf einer Haploinsuffizienz des *COL10A1* Gens beruht, wurden als Krankheitsmodell *Col10a1*-defiziente transgene Mäuse generiert. Im Gegensatz zu der Erkrankung beim Menschen zeigen diese Mausmodelle eine Kompression der Wachstumsfuge, aber auch typische Merkmale wie Kleinwuchs, kurze und gebogene Gliedmaßen und eine *Coxa vara* [Jacenko et al., 1993a; Kwan et al., 1997]. Ein weiterer Pathomechanismus für die MCDS wurde kürzlich anhand eines transgenen Mausmodells gezeigt, hier führt eine Frameshift-Mutation im *Col10a1* Gen zu einer Anhäufung mutierten Proteins im endoplasmatischen Reticulum hypertropher Chondrozyten [Ho et al., 2007]. Diese Mäuse zeigen auch eine Verbreiterung der hypertrophen Zone, die dem Phänotyp der *Mef2c^{loxP/KO}* Mäuse ähnelt. In den Wachstumsfugen der *Mef2c^{loxP/KO}* Mäuse ist die Transkriptmenge von *Col10a1* deutlich reduziert – es könnte demnach eine Art Haploinsuffizienz vorliegen, die zu einem Teil für den Phänotyp verantwortlich ist. Dies erscheint aber unwahrscheinlich, da die *Col10a1* haploinsuffizienten Mäuse eine Kompression und

keine Verbreiterung der Wachstumsfuge aufweisen. Unterstützt wird dies auch durch die Tatsache, daß keine der *Col10a1*-Mausmutanten eine Verdickung der Kortikalis entwickelt.

Metaphysäre Chondrodysplasie Typ Jansen

Bei der JMC ist der PTH/PTHrP-Rezeptor durch Mutationen konstitutiv aktiviert. Es existiert ein Mausmodell, bei dem ein *Pthr1* Gen mit einer JMC Mutation transgen in allen Chondrozyten exprimiert wird [Schipani et al., 1997b]. Die transgenen Mäuse zeigen einen Phänotyp mit moderatem Kleinwuchs und leicht verkürzten Extremitäten, aber Störungen der Mineralisation der enchondral gebildeten Knochen. Die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten, die vaskuläre Invasion der Wachstumsfuge und die Bildung der primären Spongiosa sind verzögert. Zum Zeitpunkt E17,5 zeigen die Mutanten eine Anhäufung hypertropher Chondrozyten, die von einer mineralisierten Matrix umgeben sind. Die Anordnung der hypertrophen Chondrozyten scheint in manchen Knochen eher zum Perichondrium orientiert zu sein. Die Invasion der Blutgefäße beginnt an der Peripherie der Diaphyse anstatt im Zentrum. Die Knochen der transgenen Tiere sind insgesamt verdickt, eine Verdickung der Kortikalis liegt aber nicht vor. Im Alter von zwei Wochen haben die transgenen Tiere morphologisch normale Knochen, die jedoch verkürzt sind. Dies rührt von der reduzierten Transgenexpression her, da dieses unter der Kontrolle des *Col2a1* Promotors steht.

Neben den oben beschriebenen Mäusen gibt es auch transgene Mäuse, die *PTHrP* unter der Kontrolle des *Col2a1* Promotors exprimieren [Weir et al., 1996]. Diese Mäuse haben einen Phänotyp, der noch etwas schwerer als der der transgenen PTH/PTHrP-Rezeptormäuse ausgeprägt ist. Diese Mäuse sind deutlich kleiner und die Gliedmaßen sind sehr viel kürzer. Eine Woche nach der Geburt bestehen die Knochen noch komplett aus Knorpel und es beginnt gerade die hypertrophe Differenzierung. Die Wachstumsfuge scheint bei diesen Mäusen um 90° gedreht zu sein. Erst im Alter von zwei Wochen beginnt von der Peripherie her die Vaskularisierung und nach drei Wochen bildet sich unregelmäßiger Knochen. Erstaunlicherweise sind die Knochen im Alter von sieben Wochen weitestgehend normal – nur die Wachstumsfuge ist etwas verbreitert. Diese Normalisierung dürfte ebenfalls von einer Reduktion der Transgenexpression herrühren.

An dieser Stelle sollte nicht unerwähnt bleiben, daß *Pthr1*^{-/-} Mäuse ebenfalls eine Störung der Wachstumsfuge mit verzögerter Hypertrophie und Blutgefäßinvasion und einer verdickten Kortikalis entwickeln Lanske et al. [1999].

***Runx2*^{-/-} und *Hdac4*^{-/-} Mäuse**

Mäuse, bei denen *Runx2* deletiert wurde, entwickeln ein knorpeliges Skelett, welches aufgrund einer Blockade der Osteoblastendifferenzierung nicht ossifiziert [Komori et al., 1997]. Die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten ist bei diesen Mäusen sehr stark verzögert, findet aber in distalen Teilen der Gliedmaßen noch statt. Wie in den *Mef2c*^{loxP/KO} Mäusen, ist die Diaphyse der Knochen in späten Embryonalstadien von hypertrophen Chon-

drozyten angefüllt, die eine mineralisierte Matrix umgibt. Ebenso sammeln sich im an die hypertrophe Zone anliegenden Perichondrium unreife Osteoblasten, die aber aufgrund einer fehlenden Vaskularisierung nicht in die Diaphyse einwandern. Im Gegensatz zu den *Mef2c^{loxP/KO}* Mäusen reifen die Osteoblasten in den *Runx2^{-/-}* Mäusen nicht und bilden auch keinen kortikalen Knochen. Ein weiterer wichtiger Unterschied zu den *Mef2c^{loxP/KO}* Mäusen ist die Tatsache, daß die Ausrichtung der Wachstumsfuge nicht verändert zu sein scheint. Transgene Mäuse, die in Chondrozyten ein dominant-negatives *Runx2* exprimieren, entwickeln ebenfalls verkürzte Gliedmaßen mit gestörter enchondraler Ossifikation [Stricker et al., 2002; Ueta et al., 2001]. Aber auch diese Mäuse zeigen weder die veränderte Ausrichtung der Zellen in der Wachstumsfuge noch die Verdickung der Kortikalis – außerdem findet die Ausbildung der primären Spongiosa deutlich früher und geordneter als in den *Mef2c^{loxP/KO}* Mäusen statt.

Eine Deletion von *Hdac4* resultiert in einer verfrühten terminalen Hypertrophie der Chondrozyten und in überschüssiger Ossifikation. Transgene *Hdac4* Mäuse zeigen eine Blockade der hypertrophen Differenzierung der Chondrozyten [Vega et al., 2004]. *Hdac4* kann direkt mit *Runx2* und *Mef2c* interagieren und diese reprimieren – in Arnold et al. [2007] wurde gezeigt, daß durch eine Deletion von *Hdac4* der Phänotyp von *Mef2c* Mutanten normalisiert werden kann. Es wurde die Theorie aufgestellt, daß eine Deletion von *Mef2c* zu einer unkontrollierten Hemmung von *Runx2* durch überschüssige *Hdac4* führt.

Zusammengenommen zeigt dies, daß eine Deletion von *Mef2c* und *Runx2* in Bezug auf die Chondrozytendifferenzierung teilweise gleiche Effekte verursacht. Bezüglich der Effekte auf die Kortikalis und die Orientierung der Wachstumsfuge unterscheiden sich die Phänotypen jedoch deutlich. Es ist aber anzunehmen, daß *Mef2c* und *Runx2* neben *Col10a1* noch weitere überlappende Zielgene haben.

Es erscheint auch unwahrscheinlich, daß die in den *Mef2c*-defizienten Knochen beobachteten Veränderungen der Wachstumsfuge durch die verringerte, *Mef2c* abhängige Expression von *Col10a1* zu erklären ist. Vielmehr finden sich große Ähnlichkeiten zu Mausmodellen, in denen die Signaltransduktion des PTH/PTHrP-Rezeptors in der Wachstumsfuge verstärkt wird. Dies legt eine Rolle von *Mef2c* in diesem Prozess nahe.

4.2.4 Molekularbiologische Untersuchung des Phänotyps

Der Phänotyp der *Mef2c^{loxP/KO}* Mäuse gleicht einer metaphysären Chondrodysplasie vom Typ Jansen. Dies lässt eine Aktivierung des PTH/PTHrP-Signalwegs vermuten, der in einer negativen Schleife mit dem Morphogen Indian hedgehog (*Ihh*) den Übergang von proliferierenden zu prähypertrophen Chondrozyten reguliert. Betrachtet man nun die Abläufe, die während der enchondralen Ossifikation stattfinden, so wird deutlich, daß die frühen Vorgänge in den *Mef2c^{loxP/KO}* Mäusen nicht beeinträchtigt waren. So bildeten sich mesenchymale Kondensationen in der richtigen Form und Anzahl und die Differenzierung der Vorläuferzellen zu Chondrozyten fand statt. Dies bedeutet, daß weder die Musterbildung, die vornehmlich durch FGF- und Sonic hedgehog-Signale (*Shh*) und Transkriptionsfakto-

ren der Homöobox Familie (Hox) [Kornak und Mundlos, 2003; Zakany und Duboule, 2007], noch die Sox9 abhängigen Mechanismen, die die frühe Chondrozytendifferenzierung regulieren (vgl. Abschnitt 1.3.1), gestört waren. Erst die Differenzierung von proliferierenden zu prähypertrophen Chondrozyten ist durch das Fehlen von *Mef2c* verzögert. Dies steht in Übereinstimmung mit der Vermutung, daß besonders der PTH/PTHrP-Signalweg durch die Deletion betroffen war.

Zur genauen Analyse, welche Mechanismen betroffen waren, sollte die Expression zentraler Faktoren der Chondrozytendifferenzierung untersucht werden. Hierzu wurden *in situ* Hybridisierungen auf Gewebeschnitten von Extremitäten verschiedener Stadien durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen nun im Folgenden in funktionellen Einheiten diskutiert werden.

Die reduzierte *Runx2* Expression verlangsamt die hypertrophe Differenzierung

Wie die Untersuchung der Expression von Markergenen zeigte, befanden sich in den Knorpelanlagen der mutanten Tiere zum Zeitpunkt E14,5 (siehe Abb. 3.19) nur unreife Chondrozyten, die durchweg *Col2a1* exprimierten. Ein zentraler Faktor, der für die Ausprägung des Phänotyps verantwortlich sein dürfte, ist *Runx2*. In den mutanten Humeri war die Expression dieses für die Reifung der Chondrozyten notwendigen Faktors [Enomoto et al., 2000] sehr schwach und unregelmässig, so daß eine Reihe von Genen, deren Transkription direkt von *Runx2* reguliert wird, ebenfalls betroffen waren. So war die Expression der Markergene differenzierender Chondrozyten *Akp2*, *Col10a1*, und *Opn* [Harada et al., 1999; Sato et al., 1998; Zheng et al., 2003] komplett abwesend. In Verzi et al. [2007] wurde beschrieben, daß *Mef2c* für die vollständige Transkription von *Dlx5* und *Dlx6* in der Neuralleiste notwendig ist – *Dlx5* wiederum reguliert die Expression von *Runx2* [Lee et al., 2003a] und *Osx* [Lee et al., 2003b]. *Osx* ist ein notwendiger Faktor für die Reifung der Osteoblasten und damit für die Mineralisation [Nakashima et al., 2002].

Eine Reduktion von *Dlx5* als Folge der Deletion von *Mef2c* wäre demnach eine gute Erklärung für die schwache Expression von *Runx2* und *Osx*. Dies konnte nicht eindeutig geklärt werden, da einerseits die Expression von *Dlx5* in den mutanten Embryonen nicht reduziert war (siehe Abb. 3.19), während in den Wachstumsfugen älterer Tiere eine eindeutige Reduktion vorlag (Abb. 3.24). Zusätzlich wurde in Depew et al. [1999] gezeigt, daß *Dlx5*^{-/-} Mäuse einen Phänotyp ausschließlich in craniofazialen Strukturen entwickeln. Erst der Doppelknockout von *Dlx5* und *Dlx6* führt zu einem Phänotyp, der sich auch auf das appendikuläre und axiale Skelett erstreckt [Robledo et al., 2002]. Demnach müssten noch weitere Untersuchungen zur Expression von *Dlx5* und *Dlx6* vorgenommen werden, um zu klären, ob die reduzierte Expression von *Runx2* ein primärer Effekt der Deletion von *Mef2c* war oder ob es sich hierbei um einen sekundären Effekt handelte, der durch die Verzögerung der Reifung der Chondrozyten verursacht wurde.

Die Ergebnisse aus den *in vitro* Experimenten deuten jedoch eher auf eine Regulation von *Mef2c* durch *Runx2* hin, außerdem war *Mef2c* in den *Runx2*^{-/-} Mäusen reduziert. Hinzu

kommt, daß eine Überexpression von *Mef2c* keine Stimulation von *Runx2* zur Folge hatte (Abb. 3.7). Möglicherweise liegt eine Art Feedback-Schleife vor, bei der *Runx2* zunächst *Mef2c* stimuliert, welches dann über z.B. *Dlx5/6* einen verstärkenden Einfluß auf die Expression von *Runx2* ausübt. Gleichzeitig könnte die von Arnold et al. [2007] beschriebene Interaktion von *Mef2c* mit *Hdac4* zu einer weiteren Aktivierung von *Runx2* führen.

Die veränderte Expression von *Ihh* ist für die abnorme Ausrichtung der Wachstumsfuge verantwortlich

Die Expression des ebenfalls durch *Runx2* regulierten Morphogens Indian hedgehog (*Ihh*) [Yoshida et al., 2004] und seines Rezeptors Patched *Ptch1*, der transkriptionell durch *Ihh* reguliert wird, schien in ihrem Muster um 90° in Richtung des Perichondriums gedreht zu sein. Dies könnte die Ursache für die ebenfalls um 90° gedrehte Ausrichtung der hypertrophen Chondrozyten in der Wachstumsfuge späterer Stadien sein, da *Ihh* eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung einer an der Längsachse ausgerichteten Anordnung der Chondrozyten zu spielen scheint [Karp et al., 2000]. In Pathi et al. [1999] wurde gezeigt, daß *Ihh* die Expression von *Bmp2* und *Bmp4* im Perichondrium induziert, somit könnte die auch bei Neugeborenen zum Perichondrium hin ausgerichtete Expression von *Ihh* die Verdickung und verstärkte Mineralisation des kortikalen Knochens erklären. Mit Sicherheit lässt sich behaupten, daß der Austausch von Signalmolekülen zwischen der Wachstumsfuge und dem Perichondrium aufgrund der Deletion von *Mef2c* durch die veränderte Ausrichtung der *Ihh* Expression beeinträchtigt ist.

Da Indian hedgehog wie in St-Jacques et al. [1999] beschrieben, die Proliferation der Chondrozyten reguliert, dürfte die Verkürzung der mutanten Knochen auf die veränderte Expression von *Ihh* zurückzuführen sein. Die Untersuchung der Proliferation in den Wachstumsfugen zwei Wochen alter Mäuse zeigte auch eine geringere Anzahl an proliferierenden Zellen in den Mutanten (Abb. 3.25).

Durch die Deletion von *Mef2c* wird das Gleichgewicht der *Ihh*/PTHrP-Schleife gestört

Ihh aktiviert über indirekte Mechanismen, die $TGF_{\beta 1}$ involvieren, die Expression von *PTHrP* in den periartikulären Chondrozyten [Pateder et al., 2001]. *PTHrP* wiederum hat einen negativen Einfluß auf die Expression von *Ihh* – u.a. durch die Hemmung von *Runx2* sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene (vergleiche dazu auch Abschnitt 1.3.2). Die Expression des PTH/PTHrP Rezeptors *Pthr1* war in den mutanten Mäusen zum Zeitpunkt E14,5 schwach und über einen durchgehenden Bereich nachzuweisen (Abb. 3.19). Auch in den späteren Stadien war *Pthr1* in der gesamten Wachstumsfuge exprimiert (siehe Abbildungen 3.20 und 3.23). Die Expression im Perichondrium fehlte jedoch. Durch diese breite Expression waren alle Chondrozyten potentiell sensitiv für *PTHrP* und in ihrer Differenzierung hemmbar. Fraglich bleibt, ob die Konzentration von *PTHrP* genügte, um einen ausreichenden Gradienten über die gesamte Wachstumsfuge auszubilden [Lee et al., 1996]. Durch die breite Expression des Rezeptors könnte ebenso zuviel *PTHrP* abgefangen werden, so daß

die Chondrozyten, die weiter von den *PTHrP* exprimierenden epiphysären Chondrozyten entfernt waren, nicht mehr durch PTHrP reguliert werden konnten.

In diesem Zusammenhang spricht die Verzögerung der Hypertrophie aber eher für ein erhöhtes PTHrP-Signaling [Lee et al., 1996]. Dies wird dadurch unterstützt, daß der durch die Deletion von *Mef2c* verursachte Phänotyp große Ähnlichkeit mit dem von Mäusen hat, bei denen entweder PTHrP oder eine aktive Form des Rezeptors transgen überexprimiert wurde (siehe Abschnitt 4.2.3). Denkbar wäre auch eine Hemmung von Runx2 durch den aktivierten PTHrP-Signalweg. Vermutlich reguliert *Mef2c* in den Chondrozyten einen Mechanismus, der den Effekten durch PTH/PTHrP entgegenwirkt und/oder *Mef2c* wird direkt durch PTH/PTHrP gehemmt.

Diese Daten zeigen, daß das empfindliche Gleichgewicht zwischen *Ihh* und PTHrP durch die Deletion von *Mef2c* gestört wird. So schien in den Mutanten, ähnlich wie in Vorkamp et al. [1996] gezeigt, ein verstärktes *Ihh*-Signaling in Richtung des Perichondriums vorzuliegen und deswegen vermutlich eine verstärkte Expression von *PTHrP*, die sich hemmend auf die Hypertrophie auswirkte.

Die verzögerte Gefäßinvasion in die Wachstumsfuge verlangsamt die Ossifikation

Die Differenzierung der Osteoblasten und somit die Ausbildung der primären Spongiosa war in den mutanten Mäusen durch die reduzierte Expression von *Runx2* und *Osx* verzögert. Die Störung der Expression von *Mmp13* und *Opn* – weiteren direkten Zielgenen von Runx2 [Jiménez et al., 1999; Porte et al., 1999], könnte zu einem gewissen Teil für den verringerten Abbau der Knorpelmatrix und damit für die verzögerte Vaskularisierung und Einwanderung von Osteoklasten und Osteoblasten verantwortlich sein. Diese Prozesse begannen erst postnatal (Abb. 3.15), so daß die neugeborenen Mutanten noch keinen trabekulären Knochen besaßen. *Opn* als sezernierter Faktor fungiert als eine Art Anker zur Rekrutierung von Osteoklasten in die Wachstumsfuge [Reinholt et al., 1990]. *Mmp13* reguliert die Aktivität der durch die Osteoklasten sezernierten Kollagenase *Mmp9*, indem sie das Propetid in seine aktive Form spaltet [Dreier et al., 2004]. Durch die auch in späteren Stadien reduzierte Expression von *Mmp13* können die Osteoklasten ihre knorpelabbauende Aktivität demnach nicht voll entfalten, was die Vergrößerung der Knorpelbereiche erklären kann.

Die Vaskularisierung der Knorpelanlage ist aber auch von *Vegf* abhängig, welches durch *Runx2* reguliert wird [Zelzer et al., 2001]. Durch die Reduktion von *Runx2* in den Mutanten dürfte *Vegf* nicht in ausreichender Konzentration vorhanden gewesen sein, um eine normale Vaskularisierung sicherzustellen. Jedoch konnte in den Wachstumsfugen von 4 Wochen alten Tieren keine Reduktion der *Vegf* Expression nachgewiesen werden. Es könnte daher sein, daß *Mef2c* auch über einen anderen Weg einen Einfluß auf die Vaskularisierung der Knorpelanlage ausübt, so wie es für andere Gewebe beschrieben wurde [Bi et al., 1999b].

Potentielle Ursachen für die Verdickung des Knochenschafts

Ihh ist ebenfalls an der Ausbildung des primären Ossifikationszentrums beteiligt (siehe Abschnitt 1.3.2). Durch die zum Perichondrium hin ausgerichtete Expression schien Ihh eine verstärkte osteoblastische Differenzierung der Zellen im Perichondrium stimuliert zu haben. Vermutlich konnten diese aber durch die fehlende Vaskularisierung nicht in die Wachstumsfuge einwandern und die primäre Spongiosa formen. So zeigte sich zum Zeitpunkt E16,5, daß das Perichondrium schon deutlich verdickt, aber noch nicht mineralisiert war (Abb. 3.14). Vermutlich sammelten sich dort Osteoprogenitorzellen, die nicht in die Wachstumsfuge einwandern konnten.

In *Pthr1*^{-/-} Mäusen bildet sich ein verdickter Knochenschaft [Lanske et al., 1999]. Dies scheint durch eine zunächst verzögerte und dann fehlerhaft ausgerichtete Hypertrophie der Chondrozyten verursacht zu werden, die zu einer Anhäufung und Stimulation von Osteoblastenvorläuferzellen im benachbarten Perichondrium führt [Chung et al., 2001]. Durch eine gleichzeitige Deletion von *Ihh* kann dieser Effekt eliminiert werden. PTHrP scheint demzufolge über eine Hemmung der Expression von *Ihh* die Mineralisation des kortikalen Knochens zu reduzieren, während es über andere Signalwege einen positiven Einfluß ausübt. Betrachtet man nun die *Mef2c*^{loxP/KO} Mäuse, so hatte es den Anschein als würde dort aufgrund der fehlenden Expression von *Pthr1* weniger PTH/PTHrP-Signal auf das Perichondrium einwirken – der Knochenschaft wurde verdickt.

Zusätzlich könnte eine aufgrund der Deletion von *Mef2c* verminderte Expression von *Sclerostin* [Leupin et al., 2007] – einem Inhibitor der Mineralisation – in den kortikalen Osteozyten die dysregulierte Mineralisation erklären. Die Untersuchungen bezüglich Sclerostin zeigten, daß dieses in den mutanten Knochen fehlte (Abb. 3.15 B). Gegen diese Theorie spricht, daß *Mef2c*^{Col2Cre/KO} Mäuse ebenfalls eine verdickte Kortikalis ausbildeten, obwohl das Cre-Transgen der *Col2Cre*-Mäuse exklusiv in Chondrozyten exprimiert werden sollte [Ovchinnikov et al., 2000]. Andere transgene *Col2Cre*-Stämme hingegen zeigten eine Expression der Cre-Rekombinase in Osteoblasten, dem Perichondrium und dem Periosteum [Long et al., 2001; Sakai et al., 2001]. Zusätzlich gibt es Hinweise, daß die Osteoblasten des Perichondriums einen teilweise chondrozytären Ursprung haben [Long et al., 2004]. Damit bestünde die Möglichkeit, daß diese Zellen im Verlauf ihrer Differenzierung vorübergehend *Col2a1* exprimiert haben. Zur eindeutigen Klärung müssten zusätzliche Untersuchungen – z.B. Verpaarungen der eingesetzten *Col2Cre*-Mäuse mit *ROSA26*-Reportertermäusen durchgeführt werden, um eine Expression der Cre-Rekombinase in Osteozyten der Kortikalis nachzuweisen.

Rolle der verringerten Osteoklastenaktivität bei der Verbreiterung der Wachstumsfugen

Die Skelette vier Wochen alter Mutanten zeigten weiterhin verkürzte Knochen und vergrößerte Knorpelbereiche – in den Mäusen mit einer Deletion in allen Chondrozyten waren hiervon auch die Wirbelkörper und die Rippen betroffen (Abb. 3.13). Die Femora der Mutan-

ten waren um etwa 20 % kürzer, während die Wachstumsfugen jedoch abnorm bis auf das Vierfache verbreitert waren. Gebildet wurden diese hauptsächlich aus hypertrophen Chondrozyten (Abb. 3.17). Diese Veränderungen setzten sich bis zum Alter von acht Wochen fort (Abb. 3.18). Mit zunehmendem Alter schien sich die abnorme Verdickung der Kortikalis durch das Remodeling der Knochen zu normalisieren. Das abnorme *Ihh*-Signaling hatte in späteren Stadien demzufolge einen weniger starken Effekt auf die Kortikalis als in der embryonalen Entwicklung. Es ist jedoch anzunehmen, daß die gestörte Bildung der sekundären Spongiosa und der Verbleib der hypertrophen Chondrozyten in der Wachstumsfuge durch ein weiterhin erhöhtes PTHrP Signal und die verminderte Osteoklastenaktivität, die anhand der schwachen Expression von *Acp5* und *Mmp9* (Abb. 3.23) nachweisbar war, verursacht wurde. Die unregelmäßige Expression von *Opn* und *Mmp13* in den letzten Schichten der hypertrophen Chondrozyten in der mutanten Wachstumsfuge veranschaulicht auch, daß nur wenige hypertrophe Chondrozyten terminal differenziert waren, was mit Sicherheit ein Grund für die verminderte Präsenz und Aktivität der Osteoklasten war. Durch die Beeinträchtigung des sekundären Ossifikationszentrums waren auch die Hüft- und Kniegelenke betroffen – dies dürfte den watschelnden Gang der Mutanten erklären. Durch die breiten Knorpel Elemente in den Metaphysen waren die Knochen instabil und erschienen nicht sehr belastbar.

4.2.5 Zusammenfassung der *in vivo* Daten

Eine Deletion von *Mef2c* führt zu einer Reduktion der Expression von *Runx2* und hat dadurch einen hemmenden Einfluß auf die Differenzierung von Chondrozyten und Osteoblasten. Durch eine Störung in der Expression von *Ihh* und *Pthr1* erscheint die Wachstumsfuge um 90° gedreht und es wird mehr *Ihh*-Signal in Richtung des Perichondriums transduziert, in dem sich Osteoblastenvorläuferzellen sammeln. Diese können aufgrund einer reduzierten Aktivität der Osteoklasten und Störungen der Gefäßinvasion nicht in die Wachstumsfuge eindringen. Sie mineralisieren die Matrix im Bereich des Perichondriums, wodurch der kortikale Knochen verdickt wird. Die primäre Spongiosa wird durch die verlangsamte Invasion der Wachstumsfuge erst verzögert gebildet. Ältere Tiere zeigen eine deutliche Osteoklastopenie und dadurch eine Anhäufung von hypertrophen Chondrozyten in der verbreiterten Wachstumsfuge. Die abnorme Verdickung des kortikalen Knochens normalisiert sich mit zunehmendem Alter.

Der Phänotyp der *Mef2c^{loxP/KO}* Mäuse ähnelt einer metaphysären Chondrodysplasie vom Typ Jansen. Somit dürfte in den betroffenen Tieren der PTH/PTHrP-Signalweg aktiviert sein – dies bedeutet, daß *Mef2c* an der antagonistischen Regulation von Komponenten dieses Signalwegs beteiligt ist und/oder selber durch diesen inhibiert wird. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, daß eine Maus, die transgen für eine konstitutiv aktive Variante vom *Mef2c* ist (*Mef2cVP16*), einen Phänotyp entwickelt, der dem von *PTHrP^{-/-}* Mäusen gleicht [Arnold et al., 2007; Karaplis et al., 1994]. Die veränderten Expressionsmuster von *Ihh* und *Pthr1* und die *in vitro* qRT-PCR Daten, die eine Regulation dieser Gene

durch Mef2c vermuten ließen, sprachen ebenfalls für eine Interaktion von Mef2c mit der Ihh/PTHrP Schleife.

4.3 Die Rolle von Mef2c in Signalwegen der Skelettentwicklung

Die *in vitro* Überexpression von Mef2c und die Erkenntnisse aus der Untersuchung der *Mef2c^{loxP/KO}* Mäuse lieferten konkrete Hinweise dafür, daß Mef2c eine Rolle bei der Regulation der Chondrozytendifferenzierung spielt. Parallel zu der vorliegenden Arbeit wurde dies auch in weiteren Arbeiten beschrieben [Arnold et al., 2007; Miller et al., 2007; Verzi et al., 2007]. Der Nachweis einer möglichen Rolle bei der Differenzierung von Osteoblasten und bei der Regulation der Mineralisation durch Osteozyten bedarf weiterer Untersuchungen – erste Hinweise sind aber auch dafür belegt [Leupin et al., 2007]. Die Deletion von *Mef2c* in allen Chondrozyten oder kompletten Gliedmaßen verursacht einen Phänotyp, der dem der metaphysären Chondrodysplasie vom Typ Jansen sehr ähnlich ist. Dies und die Störungen der Expression von *Ihh* und *Pthr1* lassen eine Beteiligung von Mef2c an der Regulation der Ihh/PTHrP-Schleife vermuten.

Da sowohl *Ihh* als auch *Pthr1* durch eine Überexpression von Mef2c in der Hühner Micromass Kultur stimuliert wurden, sollte die Regulation der Promotoren dieser Gene durch Mef2c mittels Reporterassays untersucht werden. Weiterhin wurden *Ibsp* und *Ocn* durch Mef2c stimuliert – die Regulation dieser Promotoren sollte Aufschluß über eine mögliche Rolle von Mef2c in Osteoblasten liefern. Die direkte Interaktion von Mef2c mit dem *Col10a1* Promotor wurde in [Arnold et al., 2007] gezeigt – dieser Promotor war somit ein ideales Modellsystem zur Untersuchung der Mechanismen, die bei der Regulation der transkriptionellen Aktivität von Mef2c involviert sind.

4.3.1 Mef2c wird in Chondrozyten vermutlich durch p38 aktiviert

Mef2c ist ein bekanntes Substrat für die MAP-Kinase p38 [Han et al., 1997; Zhao et al., 1999], deren Rolle in der Skelettentwicklung teilweise beschrieben wurde [Beier und Lu-Valle, 1999; Lee et al., 2002; Stanton und Beier, 2007; Stanton et al., 2004]. Es lag also nahe, ein mögliches Zusammenspiel dieser Faktoren auch in der Chondrozytenentwicklung zu vermuten – erwähnenswert ist auch die Tatsache, daß hypertrophe Chondrozyten eine zehnfach höhere p38 Aktivität haben als prähypertrophe [Zhen et al., 2001]. Damit wäre eine verstärkte Aktivierung von Mef2c zum Zeitpunkt der Hypertrophie gewährleistet. Eine Behandlung von chMM Kulturen mit SB203580, einem Inhibitor von p38, konnte die Mef2c-vermittelte Stimulation von Differenzierungsmarkern reduzieren (Abb. 3.26) und damit scheint p38 ein guter Kandidat zur Regulation der Aktivität von Mef2c in Chondrozyten zu sein.

4.3.2 Regulation des *Col10a1* Promotors durch Mef2c

Der *Col10a1* Promotor unterliegt einer komplexen und fein abgestimmten Regulation, da eine Expression dieses Gens ausschließlich in hypertrophen Chondrozyten stattfindet. Mit der Identifikation von Mef2c und Hdac4 als funktionelle Regulatoren dieses Gens bot sich ein guter Ansatzpunkt zur weiteren Aufklärung der Signalwege, die zur Hypertrophie der Chondrozyten notwendig sind [Arnold et al., 2007]. *Col10a1* Reporterkonstrukte sollten als Modellsystem zur Untersuchung der Regulation von und durch Mef2c in Chondrozyten dienen.

Verschiedene Spleißvarianten aktivieren den *Col10a1* Promotor

Alle getesteten unmodifizierten Spleißvarianten von Mef2c konnten ein *Col10a1* Reporterkonstrukt stark aktivieren (Abb. 3.29), dabei spielte es keine Rolle, ob sich in dem Expressionsvektor eine Kozaksequenz [Kozak, 1987] – zur effizienten Initiation der Translation [Kozak, 1990] – befand oder nicht. Entscheidend war, daß ein N-terminaler FLAG-Tag das Mef2c Protein in seiner Aktivität hemmte (Mef2cV6 N-Flag), wahrscheinlich durch eine sterische Hinderung der benachbarten MADS-Box, die für die DNA-Bindung und Dimerisierung notwendig ist. Die Spleißvariante Mef2cV6 war ohne FLAG-Tag grundsätzlich funktionell, da eine retrovirale Überexpression dieser in Hühnerzellen die Expression von Differenzierungsmarkern induzieren konnte. Die Spleißvariante V2 zeigte die geringste Aktivität der unmarkierten Varianten, dies war zu erwarten, da diese Variante die γ -Repressor Domäne besaß. Der Repressor blockierte aber nicht die Funktion, sondern reduzierte sie nur, so daß diesem eher eine modulierende Funktion zuzuschreiben ist.

Mef2c aktiviert den *Col10a1* Promotor unabhängig von Runx2 und Sp1

Der Effekt durch eine Überexpression von Mef2c war in Cos7 Zellen sehr viel stärker als in hypertrophen chMM Chondrozyten (Abb. 3.30 A), in denen die Basalaktivität des Reporters bereits fast sechsmal höher lag. Dies verdeutlicht die stringente Regulation des Promotors außerhalb hypertropher Chondrozyten. Das Reporterkonstrukt pGL1000Intl ließ sich in Chondrozyten durch Mef2c gegenüber dem längeren pGL4600Intl stärker aktivieren – vermutlich weil letzteres einen Bereich enthielt, der homolog zu einem durch PTH/PTHrP hemmbaren Enhancer im humanen *COL10A1* Promotor ist [Rierner et al., 2002]. Neben der in diesem Artikel beschriebenen Repression von *COL10A1* durch c-Fos, wurde in Zheng et al. [2003] und Magee et al. [2005] eine Aktivierung bzw. Hemmung des Maus- bzw. Huhn-Promotors durch Runx2 und Sp1 belegt. Es zeigte sich, daß eine Überexpression von Mef2c einen deutlich stärkeren Effekt auf die Aktivität des Reporters hatte als die Überexpression von Runx2 (ca. 15fache gegenüber ca. 2facher Aktivierung – siehe Abbildung 3.31). Eine Überexpression von Sp1 verursachte ebenfalls eine ca. 2fache Aktivierung des Reporters – dies steht im Gegensatz zu der in Magee et al. [2005] beschriebenen Hemmung des *Col10a1* Promotors. Eventuell unterscheiden sich der Maus- und der Huhn-Promotor bezüglich der Regulation durch Sp1. Die Koexpression von Mef2c mit Runx2 oder

Sp1 zeigte keine Auswirkung auf die Mef2c vermittelte Aktivierung des Reporters – somit ist Mef2c *in vitro* der stärkste Aktivator des *Col10a1* Promotors.

Eine Hemmung von p38 reduziert die Aktivierung des *Col10a1* Reporters

Eine Behandlung von chMM Kulturen mit dem p38 Inhibitor SB203580 verringerte unter anderem die Expression von *Col10a1* (vgl. Abb. 3.26). Dies war in Übereinstimmung mit den Resultaten von Stanton et al. [2004] – dort wurde aber ein alternativer p38 Inhibitor (PD169316) verwendet. Die direkte Regulation von *Col10a1* durch Mef2c und die Tatsache, daß Mef2c ein bekanntes Substrat für die MAP-Kinase p38 ist, ließen vermuten, daß die Aktivierung des *Col10a1* Promotors zum Teil über die p38 abhängige Phosphorylierung von Mef2c vermittelt wurde. So konnte die Aktivierung des *Col10a1* Promotors durch gleichzeitige Überexpression von p38 und einer aktiven Form der MAP-Kinase-Kinase MKK6 (MKK6EE) um 61 % gesteigert werden (Abb. 3.32 A). In den Zellen schien die verfügbare Menge an p38 ein limitierender Faktor gewesen zu sein, da eine Expression von MKK6EE alleine nur einen sehr schwachen Effekt zeigte. Diese Daten ergänzen die Ergebnisse aus Stanton et al. [2004], da dort nur die Hemmung von *Col10a1* durch dominant-negative Varianten von p38 und Mef2c gezeigt wurde. Eine Hemmung von p38 durch den Einsatz von SB203580 führte bei steigender Konzentration des Inhibitors zu einer drastischen Hemmung der Mef2c vermittelten Aktivierung des *Col10a1* Reporters (Abb. 3.32 B). Insgesamt hatte eine Aktivierung von p38 in chMM Chondrozyten einen schwächeren Effekt als die Hemmung – zusammen mit der recht hohen Basalaktivität des Reporters in diesen Zellen deutet dies auf eine ausreichend hohe Aktivität von p38 hin, die sich nur noch relativ schwach steigern ließ.

PTHrP hemmt den *Col10a1* Promotor

Die Aktivität von p38 in Chondrozyten unterliegt der Regulation durch PTH/PTHrP – so wurde in Zhen et al. [2001] gezeigt, daß PTH die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von p38 über eine Phospholipase C (PLC)/Proteinkinase C (PKC) Kaskade inhibiert. Weiterhin wurde in O'Keefe et al. [1997] ein negativer Effekt von PTH/PTHrP auf die Expression von *Col10a1* nachgewiesen. Einen Überblick über die Vorgänge, die die Expression von *Col10a1* regulieren, soll die Abbildung 4.1 verschaffen.

Es lag die Vermutung nah, daß eine Hemmung von p38 durch PTH/PTHrP Mef2c in seiner Aktivität beeinflusst und somit zu einer Repression der *Col10a1* Expression führt. Dies wurde durch die Ergebnisse von Leupin et al. [2007] unterstützt, die zeigen konnten, daß PTH in Osteozyten die Expression von *Sost* hemmen konnte. Diese Hemmung wurde exklusiv durch einen Enhancerbereich vermittelt, der von Mef2c gebunden wird. In diesem Fall scheint PTH für die Transformation von Mef2c zu einem Repressor verantwortlich zu sein bzw. die Dissoziation von Mef2c aus einem repressorischen Komplex zu verhindern. Es galt also, den Zusammenhang zwischen PTH/PTHrP und Mef2c bei der Hemmung der Expression von *Col10a1* zu klären. Weitere Anhaltspunkte für eine solche Interaktion er-

gaben sich auch anhand des Phänotyps, der durch eine skelettspezifische Deletion von *Mef2c* verursacht wird, da dieser dem von Mäusen mit aktiviertem PTH/PTHrP Signalweg gleicht.

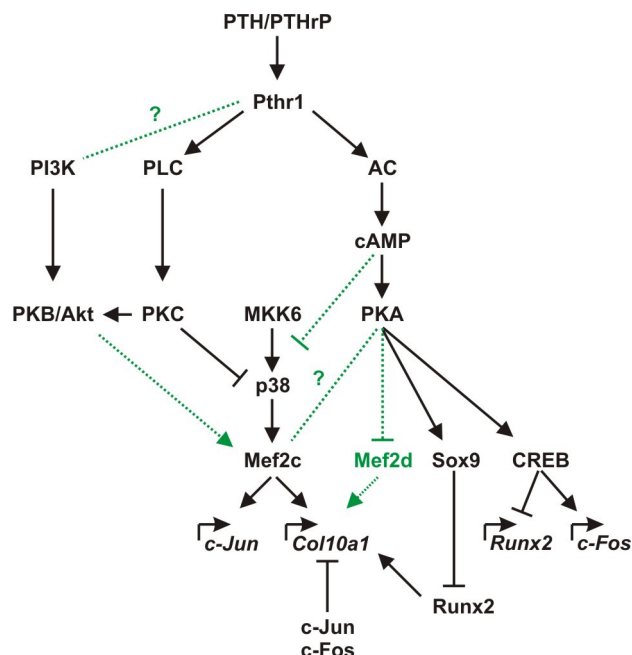


Abbildung 4.1: Mögliche Regulation von *Mef2c* in Chondrozyten (Schematische Übersicht). PTH/PTHrP kann über den gemeinsamen Rezeptor *Pthr1* zwei hauptsächliche Signalwege aktivieren: den cAMP/PKA und den PLC/PKC Signalweg – die Regulation des PI3K/PKB Signalwegs wird vermutet. (Pfeile repräsentieren aktivierende, senkrechte Striche hemmende Effekte. Ein '?' markiert Interaktionen, bei denen aufgrund widersprüchlicher Aussagen in der Literatur nicht klar ist, ob sie aktivierend oder hemmend wirken. Grün & gestrichelt: bisher nicht bestätigte Signalwege in Chondrozyten.)

Eine Behandlung von Chondrozyten mit 20 nM PTHrP konnte die Aktivität der *Col10a1* Reporterstrukture um ca. 50 % reduzieren (Abb. 3.33 A und B). Dies geschah sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit eines *Mef2c*-Expressionskonstrukts. Da das pGL1000Intl Konstrukt in gleicher Weise wie das pGL4600Intl Konstrukt durch PTHrP gehemmt wurde, konnte der repressorische Effekt nicht durch den in Riemer et al. [2002] beschriebenen Mechanismus der Bindung eines AP-1 Komplexes aus c-Fos und c-Jun im Bereich des Enhancers vermittelt worden sein. Dieser Bereich fehlte dem kürzeren pGL1000Intl Konstrukt. Möglicherweise besitzt der murine *Col10a1* Promotor weitere, nicht identifizierte, inhibitorische AP-1 Konsensussequenzen.

Der PTHrP induzierte Verlust der p38 abhängigen Phosphorylierung reduziert nicht die Aktivität von *Mef2c*

PTHrP führte zu einem Verlust der p38 abhängigen Phosphorylierung von *Mef2c* in Chondrozyten (siehe Abb. 3.33 C) – damit schien der Beweis erbracht, daß PTHrP über die Hemmung von p38 zu einer Inaktivierung von *Mef2c* führt. Unter Verwendung von *Mef2c*-

Varianten, die an unterschiedlichen Phosphorylierungspositionen für p38 mutiert wurden, konnte diese Theorie jedoch nicht bestätigt werden. Keine der Manipulationen zeigte einen Effekt auf die PTHrP induzierte Hemmung der Reporter (Abb. 3.34 & 3.35).

Interessanterweise führten Mutagenesen der Position S387 zu einer erhöhten Stimulierbarkeit durch p38, während die Mutagenesen der Positionen T293 und T300 wie erwartet zu einer Insensitivität gegenüber p38 führten. Die Position S387, die auch durch BMK1/Erk5 phosphoryliert werden kann [Kato et al., 1997], scheint demzufolge nach Phosphorylierung eine hemmende Funktion auszuüben. Diese Ergebnisse zeigen, daß PTHrP zwar die p38 abhängige Phosphorylierung von Mef2c inhibiert, dies hat aber keinen nennenswerten Einfluß auf die Aktivierung des *Col10a1* Reporters – somit spielt p38 bei der Regulation von Mef2c in Chondrozyten eher eine modulierende als eine notwendige Rolle.

Der negative Effekt von PTHrP wird hauptsächlich über cAMP transduziert

PTHrP kann neben dem PLC/PKC Signalweg noch den Adenylatcyclase (AC)/cAMP Signalweg aktivieren (siehe Abb. 4.1), der in erster Linie zu einer Proteinkinase A (PKA) vermittelten Aktivierung des cAMP response element-binding protein (CREB) führt [Tyson et al., 1999]. Dieser Signalweg wird in Chondrozyten auch als der hauptsächlich im PTH/PTHrP Signaling angesehen, da die aktivierenden Mutationen im PTH/PTHrP-Rezeptor, die zu metaphysärer Chondrodysplasie vom Typ Jansen führen, eine Anhäufung von cAMP in den Zellen bewirkten [Schipani et al., 1997b]. Guo et al. [2002] konnten zeigen, daß Mäuse, die transgen für einen PTH/PTHrP-Rezeptor waren, der nur noch den cAMP Weg aktiviert, eine verzögerte hypertrophe Differenzierung von Chondrozyten aufwiesen. Auch Riemer et al. [2002] konnten zeigen, daß die Hemmung eines *COL10A1* Reporters über den AC/cAMP/PKA Weg verlief.

Eine direkte Interaktion zwischen Mef2c und der PKA wurde in Wang et al. [2005] beschrieben. Die PKA kann Mef2c an der Aminosäure T20 phosphorylieren und damit über eine stärkere Bindung von Mef2c an die DNA eine Erhöhung der transkriptionellen Aktivität bewirken. Die Experimente von Du et al. [2008] wiederum zeigten, daß eine PKA abhängige Phosphorylierung von Mef2d zu einer erhöhten Rekrutierung von Hdac4 an die DNA führt und somit Mef2d zu einem Repressor transformiert.

Ein Aktivierung der Adenylatcyclase durch Forskolin (FSK) resultierte in einer drastischen Reduktion der Aktivität der *Col10a1* Reporter (Abb. 3.33 D). Eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit PTHrP konnte diesen Effekt nicht verstärken – damit scheint ein Großteil der PTHrP induzierten Hemmung über den AC/cAMP Signalweg transduziert zu werden. Untersuchungen mit Mef2cT20A, welches an der PKA Phosphorylierungsstelle mutiert wurde, zeigten jedoch, daß der negative Effekt durch PTHrP/cAMP vermutlich nicht über die PKA abhängige Phosphorylierung des Mef2c vermittelt wurde (Abb. 3.36 B). Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß endogenes Mef2d durch die PKA phosphoryliert wurde und das Mef2cT20A in einem Heterodimer reprimierte. In diesem Zusammenhang ist auch fraglich, ob Mef2c analog zu Mef2d durch PKA abhängige Phosphorylierung an einer bisher unbekannt Position ebenfalls zu einem Repressor transformiert werden kann.

Im Gegensatz zu Chondrozyten zeigte Mef2cT20A in Cos7 Zellen eine deutlich reduzierte Aktivität und ließ sich auch nicht durch MKK6EE oder p38 aktivieren (Abb. 3.36 A). Dies spricht für eine verringerte DNA-Bindung dieser Variante aufgrund der Mutagenese. Demnach muss in den Chondrozyten ein Interaktionspartner vorhanden gewesen sein, der die DNA-Bindung vermittelte – in Frage kämen z.B. endogenes Mef2c oder Mef2d.

Eine Überexpression der katalytischen oder der regulatorischen Untereinheiten der PKA hatte einen Einfluß auf beide *Col10a1* Reporterkonstrukte (Abb. 3.37). Das pGL1000Intl Konstrukt unterlag hierbei einer stärkeren Regulation als das pGL4600Intl Konstrukt – ein weiterer Hinweis darauf, daß der murine *Col10a1* Promotor nicht nur c-Fos abhängig über den Enhancerbereich gehemmt wird.

Diese Ergebnisse zeigen, daß der negative Effekt von PTHrP hauptsächlich über cAMP, aber nur zu einem Teil über eine Aktivierung der PKA vermittelt wird. Dies passt zu der Vermutung, daß die PTH induzierte, cAMP abhängige Hemmung von *Sost* über Signalwege transduziert wird, die PKA unabhängig sind und Mef2c involvieren [Keller und Kneissel, 2005; Leupin et al., 2007]. Eine Hemmung von z.B. p38 über cAMP abhängige Mechanismen wurde kürzlich beschrieben [Rahman et al., 2004; Yin et al., 2006].

Möglicherweise interagiert PTHrP mit dem Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) Signalweg

Die drastische Reduktion der *Col10a1* Expression in den chMM Kulturen und der Reporteraktivitäten in Gegenwart von SB203580 könnten auch auf einer in Lali et al. [2000] beschriebenen Hemmung der Proteinkinase B (PKB/Akt) basieren, da diese durch SB203580 Konzentrationen im mikromolaren Bereich gehemmt wird. PKB ist die hauptsächliche Kinase für die Weiterleitung von Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) Signalen – erst kürzlich wurde die Rolle des PI3K/PKB Signalwegs während der hypertrophen Differenzierung von Chondrozyten nachgewiesen [Kita et al., 2008; Ulici et al., 2008]. Der PI3K/PKB Signalweg kann Mef2c in einer mit p38 vergleichbaren Weise aktivieren [Tamir und Bengal, 2000; Xu und Wu, 2000] – beide Signalwege zeigen eine funktionelle Interaktion auf der Ebene der Chromatinmodifikation [Serra et al., 2007]. PKB kann hierbei die Histonacetyltransferase p300, einen Koaktivator von Mef2c, phosphorylieren und aktivieren. Eine Regulation des PI3K/PKB Signalwegs durch PTH/PTHrP wird vermutet [Ulici et al., 2008], somit könnte eine negative Regulation von *Col10a1* über eine Hemmung der PI3K/PKB vermittelten Aktivierung von Mef2c stattfinden.

Abschließende Zusammenfassung und Analyse der Ergebnisse aus den *Col10a1* Reporterassays

Mef2c ist ein starker transkriptioneller Aktivator der Expression von *Col10a1*. Die Ergebnisse zeigen, daß PTHrP über eine Hemmung von p38 zwar einen Einfluß auf die Phosphorylierung von Mef2c ausübt, dieser scheint aber nur modulatorischer Natur zu sein und kann nicht die starke Hemmung der *Col10a1* Expression erklären. Dies wird auch durch die Ko-

expressionsexperimente mit p38 und MKK6EE unterstützt – in diesen bewirkte eine Aktivierung von p38 eine eher schwache Stimulation. Mutagenesen der bekannten p38 Phosphorylierungsstellen im Mef2c zeigten keinen Einfluß auf die PTHrP vermittelte Hemmung der *Col10a1* Reporter. Interessant wäre eine genauere Untersuchung der Regulation der S387 Phosphorylierungsstelle, da eine Mutagenese dieser eine stärkere Aktivierung von Mef2c durch p38 bewirkte. Hier gilt es zu klären, ob und wenn ja, welchen Einfluß BMK1/Erk5 bei der chondrozytenspezifischen Regulation von Mef2c ausübt. Die starke Repression von *Col10a1* durch SB203580 in der chMM und in Reporterassays könnte einerseits für unspezifische Effekte des Inhibitors sprechen – z.B. die Hemmung des PI3K/PKB Signalwegs, andererseits kann es auch Hinweis dafür sein, daß neben Mef2c weitere Faktoren in p38 abhängiger Weise die Expression von *Col10a1* aktivieren.

Ein Großteil der PTHrP induzierten Effekte dürfte über eine Aktivierung des AC/cAMP Signalwegs vermittelt werden, aber nur ein geringer Anteil über die PKA. Die PKA Phosphorylierungsstelle T20 ist in Cos7 Zellen für die volle Mef2c Aktivität notwendig, während sie in Chondrozyten eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Über diese Position werden keine PTH/PTHrP Effekte vermittelt, so daß anzunehmen ist, daß die PKA abhängige Hemmung der *Col10a1* Expression über andere Faktoren vermittelt wird – es sei denn, Mef2c besitzt analog zu Mef2d eine repressorische PKA-Phosphorylierungsstelle.

Die endgültige Aufklärung der Mechanismen, die die Aktivität von Mef2c in Chondrozyten regulieren, bedarf weiterer Experimente. Mittlerweile sind eine Reihe von Signalwegen bekannt, die in verschiedenen Zelltypen einen Einfluß auf Mef2c haben – hinzu kommt, daß alle MEF2 Proteine sowohl als transkriptionelle Aktivatoren als auch als Repressoren fungieren können. Dies ist von dem Vorhandensein einer Reihe von Kofaktoren abhängig – wie z.B. Histondeacetylasen als repressorische und Histonacetyltransferasen als aktivierende Interaktionspartner. Mef2c unterliegt einer Reihe weiterer posttranslationaler Regulationen – z.B. wird die Kernlokalisation über die Protein Phosphatase Calcineurin reguliert [Lynch et al., 2005], die an der Regulation der Knochenbildung durch Osteoblasten beteiligt ist [Sun et al., 2005; Winslow et al., 2006]. Die Regulation durch Calcineurin scheint aber eher in Osteoblasten und Osteozyten notwendig zu sein, da eine Deletion von *Calcineurin* zu Osteoporose führt [Sun et al., 2007b]. Zusätzlich wird Calcineurin für die Bildung von Osteoklasten benötigt [Sun et al., 2007a].

Eine indirekte Verbindung zwischen Runx2 und Mef2c wurde in Arnold et al. [2007] hergestellt, beide Faktoren werden durch Bindung von Hdac4 zu einem transkriptionellen Repressor transformiert – so konnte eine Deletion von *Hdac4* den Phänotyp der Deletion von *Mef2c* aufheben. Den Autoren zufolge war ein Überschuß an ungebundenem Hdac4 in den *Mef2c*-Mutanten die Ursache für eine Repression von Runx2 und damit für den Phänotyp. Da Mef2c den *Col10a1* Reporter unabhängig von Runx2 aktivieren kann, wäre eine reine Konkurrenz um den gleichen Repressor als Erklärung jedoch unzureichend. An dieser Stelle soll auf die Ergebnisse von Shimizu et al. [2007] hingewiesen werden, die eine Regulation von Histondeacetylasen in Osteoblasten durch PTH beschrieben haben. Dieser Mechanismus könnte auch in Chondrozyten greifen und damit die Expression von *Col10a1*

durch eine Repression von Runx2 und/oder Mef2c hemmen. Dies könnte auch eine Erklärung für die Tatsache liefern, daß keine der Mutagenesen im Mef2c einen Einfluß auf die Regulation der *Col10a1* Reporter durch PTHrP gezeigt haben. Zur Untersuchung dieses Zusammenhanges könnten Experimente in Gegenwart eines Hdac Inhibitors (z.B. Trichostatin A) durchgeführt werden.

Ein weiterer Mechanismus, der sowohl Runx2 als auch Mef2c betrifft, ist die Interaktion mit dem Retinoblastom tumor-suppressor Protein (pRb), die für die Stimulation der Transaktivierungsdomäne beider Faktoren notwendig ist [Novitch et al., 1999; Thomas et al., 2001]. In Chondrozyten wird pRb durch FGF Signale hypophosphoryliert und damit aktiviert, was zu einer Hemmung der Proliferation führt [Aikawa et al., 2001] – somit könnte Mef2c einer Regulation durch FGF Signale unterliegen. Eine Untersuchung der möglichen Interaktion von Runx2 und Mef2c in einem transkriptionellen Aktivatorkomplex erscheint aufgrund der ihrer Beteiligung an der Regulation der Hypertrophie und der Interaktion mit den gleichen Kofaktoren als sinnvoll.

Ein Szenario könnte auch sein, daß Mef2c nicht durch PTH/PTHrP reguliert wird, sondern daß Mef2c in prähypertrophen Chondrozyten die Expression von *c-Jun* aktiviert [Han et al., 1997]. Dies kann dann mit c-Fos, dessen Expression durch PTH/PTHrP erhöht wird [Ionescu et al., 2001], als AP-1 Komplex die Expression von *Col10a1* reprimieren. Mef2c würde also über *c-Jun* eine Feinregulation der *Col10a1* Expression ausüben. Als Bedingung hierfür müsste aber innerhalb der proximalen 791 bp des murinen *Col10a1* Promotors eine AP-1 Konsensussequenz liegen. Die in Kameda et al. [1997] beschriebene PTHrP vermittelte Steigerung der Expression von *c-Jun* und *JunD* in Chondrozyten läßt sogar eine Aktivierung von Mef2c durch PTH/PTHrP vermuten.

4.3.3 Regulation des *Ihh* Promotors durch Mefc

Der *Ihh*-Promotor konnte nur schwach durch Mef2c induziert werden, während eine Kotransfektion von Runx2 eine mehr als zwanzigfache Aktivierung eines *Ihh*-Reporterkonstruktes erzielte (Abb. 3.38). Durch Mutagenese aller potentiellen Mef2c Konsensussequenzen konnte ausgeschlossen werden, daß eine Regulation des Promotors durch direkte Bindung von Mef2c an die DNA erfolgte. Einzig und allein eine Mutagenese der Sequenz CTATTATTG zu GCTCCGTTG an Position -149 hatte einen Einfluß, aber nur auf die Regulation durch Runx2 – anhand der Sequenz und der drastischen Auswirkung auf die Aktivierung des Reporters lag die Vermutung nah, daß es sich bei dieser Sequenz um die TATA-Box des Promotors handelt – dies kann aber mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da sich dieses Motiv innerhalb des ersten Exons des *Ihh* Gens befindet. Vermutlich ist diese Sequenz wichtig für einen generellen Faktor, der an der Transkriptionsmaschinerie beteiligt ist. Eine Kotransfektion von Mef2c und Runx2 führte zu einer Hemmung der Runx2 vermittelten Promotoraktivierung um 20 % – es könnte also ein negativer Effekt von Mef2c auf Runx2 ausgeübt werden. Dadurch, daß Mef2c nicht direkt an den Promotor bindet, müsste dieser entweder durch eine Interaktion der beiden Proteine oder durch weitere Faktoren, die Mef2c aktiviert, vermittelt werden. Interessant ist hierbei, daß eine Kotrans-

fektion von Hdac4 mit Mef2c die schwache Aktivierung durch Mef2c inhibierte, während Hdac4 auf Runx2 sogar einen leicht stimulierenden Effekt hatte. Hdac4 gilt als transkriptioneller Repressor sowohl von Mef2c [Miska et al., 1999] als auch von Runx2 [Vega et al., 2004]. In Wang et al. [1999a] wurde beschrieben, daß Hdac4 oder Mef2c jeweils in der Lage waren, den *c-Jun* Promotor zu aktivieren, während die Kotransfektion von Mef2c und Hdac4 diesen hemmte. So scheint die Rekrutierung von Hdac4 oder auch anderen Histon Deacetylasen durch verschiedene Transkriptionsfaktoren individuelle Effekte an den jeweiligen Promotoren auszuüben. Es könnte natürlich auch sein, daß Hdac4 in Abwesenheit eines den zu untersuchenden Promotor regulierenden Transkriptionsfaktors repressorische Faktoren bindet und blockiert.

4.3.4 Regulation des *Ibsp* Promotors durch Mef2c

Wie in Abbildung 3.39 A gezeigt, wurde der *Ibsp* Promotor nicht durch Mef2c reguliert. Erwartungsgemäß konnte die bereits beschriebene Regulation des *Ibsp* Promotors durch Runx2 [Barnes et al., 2003; Javed et al., 2001] bestätigt werden. Die starke Stimulation der *Ibsp* Expression in chBM und chMM Kulturen als Folge retroviraler Überexpression von Mef2c muß demnach über weitere, durch Mef2c regulierte Faktoren vermittelt werden. In Roca et al. [2005] wird eine Beteiligung von Dlx5 an der Regulation des *Ibsp* Promotors gezeigt, es kann also durchaus sein, daß eine Überexpression von Mef2c in der chMM indirekt über die Expression von Dlx5 die Expression von *Ibsp* induziert. Hierzu müßte aber die Regulation von *Dlx5* durch Mef2c in den chMM und chBM Kulturen untersucht werden.

4.3.5 Regulation des *Ocn* Promotors durch Mef2c

Die Erhöhung der *Osteocalcin* mRNA in chBM Kulturen durch Mef2c und die Identifikation von potentiellen Mef2c Bindestellen im Promotor ließen eine direkte Regulation vermuten. Überraschenderweise wurde ein *Osteocalcin* Reporter durch Kotransfektion mit Mef2c gehemmt, während Runx2 und Sp1 beide den Reporter aktivieren konnten. Letztere sind für die positive Regulation des Promotors bekannt [Frendo et al., 1998; Yeung et al., 2002], so daß diese Aktivierung den Erwartungen entsprach. Interessant ist hierbei, daß die Sp1 vermittelte Aktivierung des Promotors nicht signifikant durch Kotransfektion von Mef2c gehemmt wurde, während die Aktivierung des Reporters durch Runx2 in Gegenwart von Mef2c um mehr als 60 % reduziert wurde. Eine Erklärung hierfür könnte sein, daß Mef2c Runx2 durch direkte Proteininteraktion hemmt oder daß Mef2c und Runx2 um die Bindung an die DNA konkurrieren. Zumindest existieren im *Ocn* Promotor benachbarte Konsensussequenzen für Runx2 und Mef2c. In Owen et al. [1990] wurde gezeigt, daß ein Heterodimer aus c-Jun und c-Fos in proliferierenden Osteoblasten durch Bindung an einer AP-1 Konsensussequenz eine benachbarte Vitamin D Rezeptor Bindestelle blockiert und damit den Promotor inhibiert. Die Hemmung des Promotors durch Mef2c könnte also auch ein sekundärer Effekt durch die transkriptionelle Aktivierung von *c-Jun* sein – einem bekannten

Zielgen von Mef2c [Coso et al., 1997].

4.3.6 Regulation des *Pthr1* Promotors durch Mef2c

In Hühnchen Micromass Kulturen, die mit einem Mef2c-RCAS infiziert wurden, war die Expression des Gens *Pthr1* erhöht. *In situ* Expressionsanalysen in frühen embryonalen Stadien zeigten ein verändertes Expressionmuster von *Pthr1* in *Mef2c^{loxP/KO}* Tieren. So war z.B. kein Signal im Perichondrium zu sehen, während in den Wildtyp Tieren dort schon eine starke *Pthr1* Expression nachzuweisen war. Diese Ergebnisse ließen vermuten, daß die Expression von *Pthr1* abhängig von Mef2c ist – in Luciferase Reporterexperimenten konnte auch eine Regulation des – auch im Knochen aktiven – Promotors P2 durch Mef2c gezeigt werden (Abb. 3.41). Verschiedene Fragmente des Promotorbereichs zeigten eine zweifache Aktivierung durch Mef2c. Die Aktivierung beruhte aber nicht auf direkter Bindung von Mef2c an den Promotorbereich, da eine Mutagenese der Mef2c Bindestelle im *Pthr1* Promotorbereich keine Abschwächung der Mef2c vermittelten Aktivierung zur Folge hatte (Abb. 3.42 C). Etwas höhere Reporteraktivitäten von mehr als vierfach konnten durch Runx2 oder Sp1 erzielt werden. Die Regulation des humanen *PTH1* durch Sp1 ist bereits beschrieben [Bettoun et al., 1998; Leroy et al., 2004; Minagawa et al., 2001], während eine direkte Regulation durch Runx2 bisher nicht bekannt war.

Es ist möglich, daß Mef2c indirekt über eine Komplexierung mit Sp1/Runx2 an den Promotor rekrutiert wird, weil eine Koexpression aller drei Faktoren additive Effekte auf die Aktivierung zeigte (Abb. 3.41 und 3.42 A & B). Eine Interaktion von MEF2-Faktoren mit Sp1 bei der Aktivierung von Zielgenen wurde bereits mehrfach nachgewiesen [Grayson et al., 1998; Park et al., 2002]. Ebenso wäre es möglich, daß überexprimiertes Mef2c Faktoren bindet, die inhibitorisch auf den *Pthr1* Promotor wirken – es käme z.B. Hdac4 in Frage. Somit könnte der Effekt gänzlich indirekt sein und nur auf einer Entfernung der Repressoren beruhen. Eine weitere Möglichkeit wäre ein Mef2c abhängiger Enhancer-Bereich für die Expression des PTH/PthrP Rezeptors, der z.B. in der chMM Kultur aktiviert würde.

4.4 Ausblick

Die Deletion von *Mef2c* in allen Chondrozyten oder kompletten Gliedmaßen führt zu einem Phänotyp, der dem von Patienten mit einer metaphysären Chondrodysplasie vom Typ Jansen (JMC) sehr ähnlich ist. Da die JMC durch aktivierende Mutationen im *PTH1* Gen verursacht wird, ist anzunehmen, daß eine Deletion von *Mef2c* einer Aktivierung des PTH/PTHrP Signalwegs entspricht. Mef2c und der PTH/PTHrP Signalweg müssen in einem antagonistischen Verhältnis zueinander stehen, denn eine reine Transformation von Mef2c durch PTHrP zu einem transkriptionellen Repressor kann die Effekte durch die Deletion von *Mef2c* nicht erklären. Eine Verkreuzung von *Mef2c^{loxP/KO}* mit *PTHrP^{-/-}* Mäusen wäre ein interessanter Ansatz, um diesen Zusammenhang weiter zu analysieren – eine Normalisierung der Phänotypen wäre ein denkbare Szenario. Es sollte auch ein etwaiger

Einfluß von Mef2c auf die Expression von *PTHrP* untersucht werden.

In Arnold et al. [2007] und Vega et al. [2004] wurde die Repression von Mef2c bzw. Runx2 durch Interaktion mit Hdac4 beschrieben. Dabei bindet Hdac4 jeweils über die gleiche Domäne an den zu hemmenden Transkriptionsfaktor. Da Runx2 und Mef2c beide an der Regulation des *Col10a1* und evtl. des *Ocn* Promotors beteiligt sind, liegt die Vermutung nah, daß beide Faktoren interagieren. Diese Interaktion könnte durch eine Coimmunopräzipitation untersucht werden. Gerade der hemmende Effekt von Mef2c auf Runx2 bei der Regulation des *Ocn* Promotors könnte als Modell für die Interaktion dieser beiden Faktoren dienen – so könnte durch Mutagenese der jeweiligen Bindestellen untersucht werden, ob die Interaktion auf einer Konkurrenz um die DNA-Bindung beruht.

In diesem Zusammenhang ist natürlich gerade die Regulation von *Dlx5/6* durch Mef2c hochinteressant – diese wurde kürzlich in differenzierenden Zellen der Neuralleiste und im Zebrafisch gezeigt [Miller et al., 2007; Verzi et al., 2007]. Da die *Runx2* und *Osx* Expression von *Dlx5/6* abhängig sind, würde eine Regulation in Chondrozyten oder Osteoblasten durch Mef2c dieses in einen festen Kontext mit Runx2 stellen. Sogar als Regulator der *Runx2* Expression. Hier sind noch sorgfältige Untersuchungen mittels qRT-PCR und ISH notwendig – vor allem angesichts der Tatsache, daß Runx2 *in vitro* zwar *Mef2c* induzieren konnte, Mef2c aber nicht *Runx2*.

Bezüglich der Mechanismen, die die transkriptionelle Aktivierung des *Col10a1* Promotors durch Mef2c regulieren, wären weitere Experimente notwendig. So könnte z.B. durch Mutagenese der Mef2c Konsensussequenzen im *Col10a1* Promotor und Behandlung mit PTHrP analysiert werden, ob die Hemmung unabhängig von Mef2c erfolgt. Denkbar wäre auch die Konstruktion von Fusionsproteinen, mit Hilfe derer die Regulation der DNA-Bindungs- und der Transaktivierungsdomäne vom Mef2c unabhängig voneinander untersucht werden könnte.

Gerade die Erkenntnisse, daß die Mef2cT20A Variante in Cos7 Zellen deutlich weniger aktiv ist, eröffnet einen Ansatz zur Untersuchung potentieller Kofaktoren von Mef2c bei der Aktivierung des *Col10a1* Promotors. Eine Koexpression bekannter Kofaktoren von Mef2c wie die übrigen Mitglieder der MEF2 Familie oder auch p300 könnten Aufschluß über die Vermittlung der DNA-Bindung bringen.

Ein sehr wichtiger Aspekt der durch Mef2c vermittelten Effekte ist die Tatsache, daß *c-Jun* ein bekanntes Zielgen von Mef2c ist [Coso et al., 1997]. Der Einfluß von *c-Jun* in der Skelettentwicklung ist bereits nachgewiesen. Da *c-Jun* im sogenannten AP-1 Komplex mit anderen Transkriptionsfaktoren interagiert und je nach Partner aktivierend oder reprimierend wirken kann, ist eine Veränderung des Gleichgewichts zwischen den AP-1 Faktoren durch Mef2c zu beachten. Es wäre von Bedeutung, in Chondrozyten oder auch Osteoblasten, die Effekte von Mef2c auf die Expression von *c-Jun* zu untersuchen. Hierzu wären Überexpressionen von Mef2c mittels RCAS in chMM und/oder chBM Kulturen mit anschließenden

qRT-PCRs sehr gut geeignet. In diesem Kontext wäre natürlich auch die Untersuchung anderer AP-1 Faktoren interessant – insbesondere die Expression von *c-Fos*, da dieses eine wichtige Rolle bei der Regulation des *Col10a1* Promotors spielt [Gebhard et al., 2004; Riemer et al., 2002]. Die Mutagenese aller AP-1 Konsensussequenzen in den *Col10a1* Reporterkonstrukten könnte neue Erkenntnisse in der PTHrP/Mef2c Regulation bringen. Es besteht die Möglichkeit, daß in Chondrozyten eine regulatorische Schleife existiert, bei der Mef2c durch die Aktivierung von *c-Jun* zu einer Repression seiner eigenen Zielgene beiträgt.

Kapitel 5

Summary

Skeletal development is subject to complex regulatory mechanisms and many diseases are associated with mutations in genes that contribute to this process. Since the network of factors involved in this process has not been entirely elucidated yet, this work focused on the identification of new genes with a role in skeletal development.

The expression of the transcription factor *Mef2c* was discovered to be downregulated in embryonic humeri of *Runx2*^{-/-} mice [Hecht et al., 2007]. Expression analysis revealed an expression pattern of *Mef2c* in the perichondrium, prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes of E15,5 humeri suggesting a role in the skeletal development. Functional analysis *in vitro* in chicken mesenchymal cells undergoing osteoblastic differentiation and chicken micromass cultures showed that retroviral overexpression of *Mef2c* could upregulate the transcript levels of the differentiation markers *Col10a1*, *Ibsp*, *Akp2*, *Ihh* and *Pthr1*.

Cre/lox mediated deletion of *Mef2c* in the limb mesenchyme or in chondrocytes resulted in a short-limbed phenotype with a delay in hypertrophic differentiation and endochondral ossification. Histological analysis of the mutant bones revealed a significant broadening and disturbed orientation of the growth plates plus a significant thickening of the cortical bone. These characteristics resembled the human metaphyseal chondrodysplasias, especially the type Jansen (JMC). This implied a dysfunction of the *Ihh*/PTHrP regulatory loop since the PTH/PTHrP receptor was found to be hyperactivated in JMC. Furthermore in the *Mef2c*^{loxP/KO} bones the expression patterns of *Col10a1*, *Ihh*, *Pthr1* and *Runx2* appeared to be disorganised and reduced in strength.

Analysis of the regulatory regions of genes that were stimulated *in vitro* by overexpression of *Mef2c* revealed putative MEF2 binding sites in the promoters of *Col10a1*, *Ihh*, *Ocn* and *Pthr1*. In reporter-assays *Mef2c* showed the strongest activating effect on *Col10a1* reporter construct whereas *Pthr1* reporter constructs were synergistically activated by *Mef2c*, *Runx2* and *Sp1*. In contrast, *Mef2c* exerted inhibitory effects on the *Runx2*-mediated activation of a *Ocn* reporter.

PTH/PTHrP signaling is known to inhibit *Col10a1* expression and was found to reduce p38 dependent phosphorylation of *Mef2c* in chondrocytes. However mutations of known phosphorylation sites in the *Mef2c* protein were not able to abolish the regulation of the *Col10a1*

promoter by PTHrP and p38. Interestingly a loss of the p38 and Erk5 specific phosphorylation site at position S387 resulted in a higher response of Mef2c to p38 activation. Thus, the p38-dependent phosphorylation of Mef2c is regulated by PTHrP, but only has a modulatory role.

Taken together the results show an important role of Mef2c during endochondral ossification and position Mef2c within the *lhh*/PTHrP signaling loop with a potential role of regulating *Runx2* expression and function.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Die Skelettentwicklung unterliegt komplexen regulatorischen Mechanismen und viele Krankheiten sind mit Mutationen in den Genen, die zu diesem Prozess beitragen, assoziiert. Bis heute ist das gesamte Netzwerk an Faktoren, die in diese Vorgänge involviert sind, noch nicht vollständig aufgeklärt. Deswegen lag der Fokus dieser Arbeit auf der Identifikation von neuen Genen mit einer relevanten Funktion für die Skelettentwicklung.

Die Expression des Transkriptionsfaktors *Mef2c* war in embryonalen Humeri von *Runx2*^{-/-} Mäusen reduziert [Hecht et al., 2007]. Expressionsanalysen zeigten mRNA Transkript von *Mef2c* im Perichondrium, den prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten von Humeri zum embryonalen Stadium E15,5. Dies ließ eine Rolle von *Mef2c* in der Skelettentwicklung vermuten. Funktionelle Untersuchungen *in vitro* in mesenchymalen Hühnerzellen, die eine osteoblastische Differenzierung durchliefen und in Hühner Micromass Kulturen zeigten, daß eine retrovirale Überexpression von *Mef2c* die Transkriptmenge der Differenzierungsmarker *Col10a1*, *Ibsp*, *Akp2*, *Ihh* und *Pthr1* erhöhte.

Die *Cre/lox* vermittelte Deletion von *Mef2c* im Gliedmaßenmesenchym und in Chondrozyten führte zu einem kurzgliedrigen Phänotyp mit einer Verzögerung der hypertrophen Differenzierung und enchondralen Ossifikation. Histologische Untersuchungen der mutanten Knochen zeigten eine signifikante Verbreiterung und gestörte Orientierung der Wachstumsfugen plus eine auffällige Verdickung des kortikalen Knochens. Diese Merkmale ähnelten denen bei metaphysären Chondrodysplasien des Menschen – speziell vom Typ Jansen (JMC). Dies implizierte eine Fehlregulation der *Ihh*/PTHrP Signalschleife, da eine Hyperaktivierung des PTH/PTHrP-Rezeptors bei der JMC nachgewiesen wurde. Zusätzlich erschienen in den Knochen der *Mef2c*^{loxP/KO} Mäuse die Expressionsmuster von *Col10a1*, *Ihh*, *Pthr1* und *Runx2* gestört und in ihrer Stärke reduziert.

Die Analyse regulatorischer Regionen in den Promotoren der Gene, die durch eine *in vitro* Überexpression von *Mef2c* stimuliert wurden, enthüllte mögliche *Mef2c* Konsensussequenzen in den Promotoren von *Col10a1*, *Ihh*, *Ocn* und *Pthr1*. In Reporterassays war *Mef2c* der stärkste Aktivator von *Col10a1* Reporterkonstrukten, während *Pthr1* Reporterkonstrukte synergistisch durch *Mef2c*, *Runx2* und *Sp1* aktiviert wurden. Im Gegensatz dazu zeigte *Mef2c* einen inhibitorischen Effekt auf die *Runx2* vermittelte Aktivierung eines *Ocn* Repor-

ters.

PTH/PTHrP Signale sind bekannte Inhibitoren für die Expression von *Col10a1* – in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß sie auch die p38 abhängige Phosphorylierung von Mef2c in Chondrozyten reduzierten. Mutationen unterschiedlicher Phosphorylierungsstellen im Mef2c konnten jedoch die Regulation des *Col10a1* Promotors durch PTHrP und p38 nicht aufheben. Interessanterweise führte ein Verlust der p38 und Erk5 spezifischen Phosphorylierungsstelle an Position S387 zu einer erhöhten Aktivierbarkeit des Mef2c durch p38. Damit wird die p38 abhängige Phosphorylierung von Mef2c durch PTHrP reguliert, aber sie übt nur eine modulierende Rolle aus.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, daß Mef2c eine wichtige Rolle in der enchondralen Ossifikation spielt und erlauben eine Positionierung von Mef2c innerhalb der Ihh/PTHrP Signalschleife mit einer potentiellen Rolle bei der Regulation der *Runx2* Expression und Funktion.

Literaturverzeichnis

- Aikawa, T., Segre, G. V., und Lee, K. (2001). Fibroblast growth factor inhibits chondrocytic growth through induction of p21 and subsequent inactivation of cyclin E-Cdk2. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(31):29347–52. PMID: 11384971.
- Akiyama, H., Chaboissier, M., Martin, J. F., Schedl, A., und de Crombrughe, B. (2002). The transcription factor sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of sox5 and sox6. *Genes & Development*, 16(21):2813–28. PMID: 12414734.
- Amizuka, N., Warshawsky, H., Henderson, J. E., Goltzman, D., und Karapalis, A. C. (1994). Parathyroid hormone-related peptide-depleted mice show abnormal epiphyseal cartilage development and altered endochondral bone formation. *The Journal of Cell Biology*, 126(6):1611–23. PMID: 8089190.
- Arnold, M. A., Kim, Y., Czubryt, M. P., Phan, D., McAnally, J., Qi, X., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., und Olson, E. N. (2007). MEF2C transcription factor controls chondrocyte hypertrophy and bone development. *Developmental cell*, 12(3):377–89. PMID: 17336904.
- Baranova, A., Ivanov, D., Petrash, N., Pestova, A., Skoblov, M., Kelmanson, I., Shagin, D., Nazarenko, S., Geraymovych, E., Litvin, O., Tiunova, A., Born, T. L., Usman, N., Staroverov, D., Lukyanov, S., und Panchin, Y. (2004). The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics*, 83(4):706–16. PMID: 15028292.
- Barnes, G. L., Javed, A., Waller, S. M., Kamal, M. H., Hebert, K. E., Hassan, M. Q., Bellahcene, A., Wijnen, A. J. V., Young, M. F., Lian, J. B., Stein, G. S., und Gerstenfeld, L. C. (2003). Osteoblast-related transcription factors runx2 (Cbfa1/AML3) and MSX2 mediate the expression of bone sialoprotein in human metastatic breast cancer cells. *Cancer research*, 63(10):2631–7. PMID: 12750290.
- Beier, F. und LuValle, P. (1999). Serum induction of the collagen x promoter requires the Raf/MEK/ERK and p38 pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 262(1):50–4. PMID: 10448066.
- Bennett, J. H., Joyner, C. J., Triffitt, J. T., und Owen, M. E. (1991). Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *Journal of Cell Science*, 99 (Pt 1):131–9. PMID: 1757497.
- Bettoun, J. D., Minagawa, M., Hendy, G. N., Alpert, L. C., Goodyer, C. G., Goltzman, D., und White, J. H. (1998). Developmental upregulation of human parathyroid

- hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene expression from conserved and human-specific promoters. *The Journal of Clinical Investigation*, 102(5):958–67. PMID: 9727064.
- Bi, W., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R., und de Crombrughe, B. (1999a). Sox9 is required for cartilage formation. *Nature Genetics*, 22(1):85–9. PMID: 10319868.
- Bi, W., Drake, C. J., und Schwarz, J. J. (1999b). The transcription factor MEF2C-null mouse exhibits complex vascular malformations and reduced cardiac expression of angiopoietin 1 and VEGF. *Developmental biology*, 211(2):255–67. PMID: 10395786.
- Broulik, P. D. und Jaráb, J. (1993). The effect of chronic nicotine administration on bone mineral content in mice. *Hormone and Metabolic Research. Hormon- Und Stoffwechselforschung. Hormones Et Métabolisme*, 25(4):219–21. PMID: 8514242.
- Chan, D., Weng, Y. M., Graham, H. K., Silience, D. O., und Bateman, J. F. (1998). A nonsense mutation in the carboxyl-terminal domain of type x collagen causes haploinsufficiency in schmid metaphyseal chondrodysplasia. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(7):1490–9. PMID: 9525992.
- Chang, S., Young, B. D., Li, S., Qi, X., Richardson, J. A., und Olson, E. N. (2006). Histone deacetylase 7 maintains vascular integrity by repressing matrix metalloproteinase 10. *Cell*, 126(2):321–34. PMID: 16873063.
- Chen, Y. und Struhl, G. (1996). Dual roles for patched in sequestering and transducing hedgehog. *Cell*, 87(3):553–63. PMID: 8898207.
- Chung, U. I., Schipani, E., McMahon, A. P., und Kronenberg, H. M. (2001). Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. *The Journal of Clinical Investigation*, 107(3):295–304. PMID: 11160153.
- Coso, O. A., Montaner, S., Fromm, C., Lacal, J. C., Prywes, R., Teramoto, H., und Gutkind, J. S. (1997). Signaling from g protein-coupled receptors to the c-jun promoter involves the MEF2 transcription factor. EVIDENCE FOR a NOVEL c-Jun AMINO-TERMINAL KINASE-INDEPENDENT PATHWAY. *J. Biol. Chem.*, 272(33):20691–20697.
- Costantini, D. L., Arruda, E. P., Agarwal, P., Kim, K., Zhu, Y., Zhu, W., Lebel, M., Cheng, C. W., Park, C. Y., Pierce, S. A., Guerchicoff, A., Pollevick, G. D., Chan, T. Y., Kabir, M. G., Cheng, S. H., Husain, M., Antzelevitch, C., Srivastava, D., Gross, G. J., chung Hui, C., Backx, P. H., und Bruneau, B. G. (2005). The homeodomain transcription factor irx5 establishes the mouse cardiac ventricular repolarization gradient. *Cell*, 123(2):347–58. PMID: 16239150.
- Cserjesi, P. und Olson, E. N. (1991). Myogenin induces the myocyte-specific enhancer binding factor MEF-2 independently of other muscle-specific gene products. *Molecular and Cellular Biology*, 11(10):4854–62. PMID: 1656214.
- Dabow, I. (2008). *Untersuchungen zur Rolle des Transkriptionsfaktors Mef2c in der Skelettentwicklung*. Diplomarbeit, Universität Potsdam.

- Dacquin, R., Starbuck, M., Schinke, T., und Karsenty, G. (2002). Mouse alpha1(I)-collagen promoter is the best known promoter to drive efficient cre recombinase expression in osteoblast. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 224(2):245–51. PMID: 12112477.
- de Crombrughe, B., Lefebvre, V., und Nakashima, K. (2001). Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(6):721–7. PMID: 11698188.
- Deal, C. L. (1997). Osteoporosis: prevention, diagnosis, and management. *The American Journal of Medicine*, 102(1A):35S–39S. PMID: 9217558.
- Depew, M. J., Liu, J. K., Long, J. E., Presley, R., Meneses, J. J., Pedersen, R. A., und Rubenstein, J. L. (1999). Dlx5 regulates regional development of the branchial arches and sensory capsules. *Development (Cambridge, England)*, 126(17):3831–46. PMID: 10433912.
- Dobrev, G., Chahrouh, M., Dautzenberg, M., Chirivella, L., Kanzler, B., Farinas, I., Karsenty, G., und Grosschedl, R. (2006). SATB2 is a multifunctional determinant of craniofacial patterning and osteoblast differentiation. *Cell*, 125(5):971–86. PMID: 16751105.
- Dreier, R., Grässel, S., Fuchs, S., Schaumburger, J., und Bruckner, P. (2004). Pro-MMP-9 is a specific macrophage product and is activated by osteoarthritic chondrocytes via MMP-3 or a MT1-MMP/MMP-13 cascade. *Experimental Cell Research*, 297(2):303–312.
- Drissi, H., Luc, Q., Shakoori, R., Lopes, S. C. D. S., Choi, J. Y., Terry, A., Hu, M., Jones, S., Neil, J. C., Lian, J. B., Stein, J. L., Wijnen, A. J. V., und Stein, G. S. (2000). Transcriptional autoregulation of the bone related CBFA1/RUNX2 gene. *Journal of Cellular Physiology*, 184(3):341–50. PMID: 10911365.
- Du, M., Perry, R. L. S., Nowacki, N. B., Gordon, J. W., Salma, J., Zhao, J., Aziz, A., Chan, J., Siu, K. W. M., und McDermott, J. C. (2008). Protein kinase a represses skeletal myogenesis by targeting myocyte enhancer factor 2D. *Molecular and cellular biology*. PMID: 18299387.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L., und Karsenty, G. (1997). *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89(5):747–54. PMID: 9182762.
- Enomoto, H., Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M., Nomura, S., Himeno, M., Kitamura, Y., Kishimoto, T., und Komori, T. (2000). *Cbfa1* is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(12):8695–702. PMID: 10722711.
- Fedde, K. N., Blair, L., Silverstein, J., Coburn, S. P., Ryan, L. M., Weinstein, R. S., Waymire, K., Narisawa, S., Millán, J. L., MacGregor, G. R., und Whyte, M. P. (1999). Alkaline phosphatase knock-out mice recapitulate the metabolic and skeletal defects of infantile hypophosphatasia. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 14(12):2015–26. PMID: 10620060.
- Ferrari, G., Angelis, G. C., Coletta, M.,

- Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., und Mavilio, F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5356):1528–30. PMID: 9488650.
- FitzPatrick, D. R., Carr, I. M., McLaren, L., Leek, J. P., Wightman, P., Williamson, K., Gautier, P., McGill, N., Hayward, C., Firth, H., Markham, A. F., Fantes, J. A., und Bonthron, D. T. (2003). Identification of SATB2 as the cleft palate gene on 2q32-q33. *Human Molecular Genetics*, 12(19):2491–501. PMID: 12915443.
- Frendo, J. L., Xiao, G., Fuchs, S., Franceschi, R. T., Karsenty, G., und Ducy, P. (1998). Functional hierarchy between two OSE2 elements in the control of osteocalcin gene expression in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(46):30509–16. PMID: 9804819.
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., und Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and Tissue Kinetics*, 3(4):393–403. PMID: 5523063.
- Friedenstein, A. J., Deriglasova, U. F., Kulagina, N. N., Panasuk, A. F., Rudakowa, S. F., Luriá, E. A., und Ruadkow, I. A. (1974). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Experimental Hematology*, 2(2):83–92. PMID: 4455512.
- Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I., und Petrakova, K. V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 16(3):381–90. PMID: 5336210.
- Gebhard, S., Pöschl, E., Riemer, S., Bauer, E., Hattori, T., Eberspaecher, H., Zhang, Z., Lefebvre, V., de Crombrughe, B., und von der Mark, K. (2004). A highly conserved enhancer in mammalian type x collagen genes drives high levels of tissue-specific expression in hypertrophic cartilage in vitro and in vivo. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 23(5):309–22. PMID: 15464363.
- Geoffroy, V., Kneissel, M., Fournier, B., Boyde, A., und Matthias, P. (2002). High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing Cbfa1/Runx2 in cells of the osteoblastic lineage. *Molecular and Cellular Biology*, 22(17):6222–33. PMC134019.
- Gerber, H. P., Vu, T. H., Ryan, A. M., Kowalski, J., Werb, Z., und Ferrara, N. (1999). VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Medicine*, 5(6):623–8. PMID: 10371499.
- Gossett, L. A., Kelvin, D. J., Sternberg, E. A., und Olson, E. N. (1989). A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Molecular and Cellular Biology*, 9(11):5022–33. PMID: 2601707.
- Grayson, J., Bassel-Duby, R., und Williams, R. S. (1998). Collaborative interactions between MEF-2 and sp1 in muscle-specific gene regulation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 70(3):366–75. PMID: 9706874.

- Guo, J., Chung, U., Kondo, H., Bringhurst, F. R., und Kronenberg, H. M. (2002). The PTH/PTHrP receptor can delay chondrocyte hypertrophy in vivo without activating phospholipase c. *Developmental cell*, 3(2):183–94. PMID: 12194850.
- Guo, J., Chung, U., Yang, D., Karsenty, G., Bringhurst, F. R., und Kronenberg, H. M. (2006). PTH/PTHrP receptor delays chondrocyte hypertrophy via both runx2-dependent and -independent pathways. *Developmental Biology*, 292(1):116–28. PMID: 16476422.
- Han, J., Jiang, Y., Li, Z., Kravchenko, V. V., und Ulevitch, R. J. (1997). Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature*, 386(6622):296–9. PMID: 9069290.
- Harada, H., Tagashira, S., Fujiwara, M., Ogawa, S., Katsumata, T., Yamaguchi, A., Komori, T., und Nakatsuka, M. (1999). Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(11):6972–8. PMID: 10066751.
- Harada, S., Sampath, T. K., Aubin, J. E., und Rodan, G. A. (1997). Osteogenic protein-1 up-regulation of the collagen x promoter activity is mediated by a MEF-2-like sequence and requires an adjacent AP-1 sequence. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 11(12):1832–45. PMID: 9369451.
- Hecht, J. (2006). *Genexpressionsanalysen zum besseren Verständnis von Knochenheilung und -entwicklung*. PhD thesis, FU Berlin.
- Hecht, J., Seitz, V., Urban, M., Wagner, F., Robinson, P. N., Stiege, A., Dieterich, C., Kornak, U., Wilkening, U., Brieske, N., Zwingman, C., Kidess, A., Stricker, S., und Mundlos, S. (2007). Detection of novel skeletogenesis target genes by comprehensive analysis of a runx2(-/-) mouse model. *Gene expression patterns : GEP*, 7(1-2):102–12. PMID: 16829211.
- Herzig, U., Cadenas, C., Sieckmann, F., Sieralta, W., Thaller, C., Visel, A., und Eichele, G. (2001). Development of high-throughput tools to unravel the complexity of gene expression patterns in the mammalian brain. *Novartis Foundation Symposium*, 239:129–46; discussion 146–59. PMID: 11529308.
- Hess, J., Porte, D., Munz, C., und Angel, P. (2001). AP-1 and cbfa/runt physically interact and regulate parathyroid hormone-dependent MMP13 expression in osteoblasts through a new osteoblast-specific element 2/AP-1 composite element. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(23):20029–38. PMID: 11274169.
- Himly, M., Foster, D. N., Bottoli, I., Iacovoni, J. S., und Vogt, P. K. (1998). The DF-1 chicken fibroblast cell line: transformation induced by diverse oncogenes and cell death resulting from infection by avian leukemia viruses. *Virology*, 248(2):295–304. PMID: 9721238.
- Ho, M. S. P., Tsang, K. Y., Lo, R. L. K., Susic, M., Mäkitie, O., Chan, T. W. Y., Ng, V. C. W., Sillence, D. O., Boot-Handford, R. P., Gibson, G., Cheung, K. M. C., Cole, W. G., Cheah, K. S. E., und Chan, D. (2007). COL10A1 nonsense and frameshift mutations have a gain-of-function effect on the growth plate in human and

- mouse metaphyseal chondrodysplasia type schmid. *Human Molecular Genetics*, 16(10):1201–15. PMID: 17403716.
- Hock, J. M. und Gera, I. (1992). Effects of continuous and intermittent administration and inhibition of resorption on the anabolic response of bone to parathyroid hormone. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 7(1):65–72. PMID: 1532281.
- Holleville, N., Matéos, S., Bontoux, M., Bollerot, K., und Monsoro-Burq, A. (2007). Dlx5 drives runx2 expression and osteogenic differentiation in developing cranial suture mesenchyme. *Developmental Biology*, 304(2):860–74. PMID: 17335796.
- Huang, K., Louis, J. M., Donaldson, L., Lim, F. L., Sharrocks, A. D., und Clore, G. M. (2000). Solution structure of the MEF2A-DNA complex: structural basis for the modulation of DNA bending and specificity by MADS-box transcription factors. *The EMBO Journal*, 19(11):2615–28. PMID: 10835359.
- Hughes, S. H., Greenhouse, J. J., Petropoulos, C. J., und Sutrave, P. (1987). Adaptor plasmids simplify the insertion of foreign DNA into helper-independent retroviral vectors. *Journal of virology*, 61(10):3004–12. PMID: 3041020.
- Inada, M., Yasui, T., Nomura, S., Miyake, S., Deguchi, K., Himeno, M., Sato, M., Yamagiwa, H., Kimura, T., Yasui, N., Ochi, T., Endo, N., Kitamura, Y., Kishimoto, T., und Komori, T. (1999). Maturation disturbance of chondrocytes in cbfa1-deficient mice. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 214(4):279–90. PMID: 10213384.
- Ionescu, A. M., Schwarz, E. M., Vinson, C., Puzas, J. E., Rosier, R., Reynolds, P. R., und O’Keefe, R. J. (2001). PTHrP modulates chondrocyte differentiation through AP-1 and CREB signaling. *The Journal of biological chemistry*, 276(15):11639–47. PMID: 11136722.
- Iwamoto, M., Shimazu, A., und Pacifici, M. (1995). Regulation of chondrocyte maturation by fibroblast growth factor-2 and parathyroid hormone. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 13(6):838–45. PMID: 8544019.
- Jacenko, O., LuValle, P., Solum, K., und Olsen, B. R. (1993a). A dominant negative mutation in the alpha 1 (X) collagen gene produces spondylometaphyseal defects in mice. *Progress in Clinical and Biological Research*, 383B:427–36. PMID: 8115362.
- Jacenko, O., LuValle, P. A., und Olsen, B. R. (1993b). Spondylometaphyseal dysplasia in mice carrying a dominant negative mutation in a matrix protein specific for cartilage-to-bone transition. *Nature*, 365(6441):56–61. PMID: 8361538.
- Janson, C. G., Chen, Y., Li, Y., und Leifer, D. (2001). Functional regulatory regions of human transcription factor MEF2C. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 97(1):70–82. PMID: 11744164.
- Javed, A., Barnes, G. L., Jasanya, B. O., Stein, J. L., Gerstenfeld, L., Lian, J. B., und Stein, G. S. (2001). runt homology domain transcription factors (Runx, cbfa, and AML) mediate repression of the bone

- sialoprotein promoter: evidence for promoter context-dependent activity of cbfa proteins. *Molecular and cellular biology*, 21(8):2891–905. PMID: 11283267.
- Jiménez, M. J., Balbín, M., Alvarez, J., Komori, T., Bianco, P., Holmbeck, K., Birkedal-Hansen, H., López, J. M., and López-Otín, C. (2001). A regulatory cascade involving retinoic acid, cbfa1, and matrix metalloproteinases is coupled to the development of a process of perichondrial invasion and osteogenic differentiation during bone formation. *The Journal of Cell Biology*, 155(7):1333–44. PMID: 11748248.
- Jiménez, M. J., Balbín, M., López, J. M., Alvarez, J., Komori, T., and López-Otín, C. (1999). Collagenase 3 is a target of cbfa1, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation. *Molecular and Cellular Biology*, 19(6):4431–42. PMID: 10330183.
- Kameda, T., Watanabe, H., and Iba, H. (1997). C-Jun and JunD suppress maturation of chondrocytes. *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 8(5):495–503. PMID: 9149901.
- Kamiya, N., Ye, L., Kobayashi, T., Mochida, Y., Yamauchi, M., Kronenberg, H. M., Feng, J. Q., and Mishina, Y. (2008). BMP signaling negatively regulates bone mass through sclerostin by inhibiting the canonical wnt pathway. *Development (Cambridge, England)*, 135(22):3801–11. PMID: 18927151.
- Karaplis, A. C., Luz, A., Glowacki, J., Bronson, R. T., Tybulewicz, V. L., Kronenberg, H. M., and Mulligan, R. C. (1994). Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes & Development*, 8(3):277–89. PMID: 8314082.
- Karp, S., Schipani, E., St-Jacques, B., Hunzelman, J., Kronenberg, H., and McMahon, A. (2000). Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent pathways. *Development*, 127(3):543–548.
- Karsenty, G. und Wagner, E. F. (2002). Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Developmental Cell*, 2(4):389–406. PMID: 11970890.
- Kasler, H. G., Victoria, J., Duramad, O., und Winoto, A. (2000). ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Molecular and Cellular Biology*, 20(22):8382–9. PMID: 11046135.
- Kato, Y., Kravchenko, V. V., Tapping, R. I., Han, J., Ulevitch, R. J., und Lee, J. D. (1997). BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *The EMBO Journal*, 16(23):7054–66. PMID: 9384584.
- Keller, H. und Kneissel, M. (2005). SOST is a target gene for PTH in bone. *Bone*, 37(2):148–58. PMID: 15946907.
- Kim, I. S., Otto, F., Zabel, B., und Mundlos, S. (1999). Regulation of chondrocyte differentiation by cbfa1. *Mechanisms of development*, 80(2):159–70. PMID: 10072783.

- Kim, Y., Lee, M., Wozney, J. M., Cho, J., und Ryoo, H. (2004). Bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase expression is stimulated by *dlx5* and repressed by *msx2*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(49):50773–80. PMID: 15383550.
- Kita, K., Kimura, T., Nakamura, N., Yoshikawa, H., und Nakano, T. (2008). PI3K/Akt signaling as a key regulatory pathway for chondrocyte terminal differentiation. *Genes to Cells*, 13(8):839–850.
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S., und Kishimoto, T. (1997). Targeted disruption of *cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 89(5):755–64. PMID: 9182763.
- Kornak, U. und Mundlos, S. (2003). Genetic disorders of the skeleton: a developmental approach. *American Journal of Human Genetics*, 73(3):447–74. PMID: 12900795.
- Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Research*, 15(20):8125–48. PMID: 3313277.
- Kozak, M. (1990). Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(21):8301–5. PMID: 2236042.
- Kozlowski, K., Campbell, J. B., Azouz, M. E., und Sprague, P. (1999). Metaphyseal chondrodysplasia, type jansen. *Australasian Radiology*, 43(4):544–7. PMID: 10901979.
- Kronenberg, H. M. (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, 423(6937):332–6. PMID: 12748651.
- Kronenberg, H. M. (2007). The role of the perichondrium in fetal bone development. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1116:59–64. PMID: 18083921.
- Kwan, K. M., Pang, M. K., Zhou, S., Cowan, S. K., Kong, R. Y., Pfordte, T., Olsen, B. R., Sillence, D. O., Tam, P. P., und Cheah, K. S. (1997). Abnormal compartmentalization of cartilage matrix components in mice lacking collagen x: implications for function. *The Journal of cell biology*, 136(2):459–71. PMID: 9015315.
- Lali, F. V., Hunt, A. E., Turner, S. J., und Foxwell, B. M. (2000). The pyridinyl imidazole inhibitor SB203580 blocks phosphoinositide-dependent protein kinase activity, protein kinase b phosphorylation, and retinoblastoma hyperphosphorylation in interleukin-2-stimulated t cells independently of p38 mitogen-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(10):7395–402. PMID: 10702313.
- Lanske, B., Amling, M., Neff, L., Guiducci, J., Baron, R., und Kronenberg, H. M. (1999). Ablation of the PTHrP gene or the PTH/PTHrP receptor gene leads to distinct abnormalities in bone development. *The Journal of clinical investigation*, 104(4):399–407. PMID: 10449432.
- Lanske, B., Karaplis, A. C., Lee, K., Luz, A., Vortkamp, A., Pirro, A., Karperien, M., Defize, L. H., Ho, C., Mulligan, R. C.,

- Abou-Samra, A. B., Jüppner, H., Segre, G. V., und Kronenberg, H. M. (1996). PTH/PTHrP receptor in early development and indian hedgehog-regulated bone growth. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5275):663–6. PMID: 8662561.
- Lee, K., Hong, S., und Bae, S. (2002). Both the smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in runx2 expression following induction by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein. *Oncogene*, 21(47):7156–63. PMID: 12370805.
- Lee, K., Lanske, B., Karaplis, A. C., Deeds, J. D., Kohno, H., Nissenson, R. A., Kronenberg, H. M., und Segre, G. V. (1996). Parathyroid hormone-related peptide delays terminal differentiation of chondrocytes during endochondral bone development. *Endocrinology*, 137(11):5109–18. PMID: 8895385.
- Lee, K. S., Kim, H. J., Li, Q. L., Chi, X. Z., Ueta, C., Komori, T., Wozney, J. M., Kim, E. G., Choi, J. Y., Ryoo, H. M., und Bae, S. C. (2000). Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between runx2 and smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Molecular and Cellular Biology*, 20(23):8783–92. PMID: 11073979.
- Lee, M., Kim, Y., Kim, H., Park, H., Kang, A., Kyung, H., Sung, J., Wozney, J. M., Kim, H., und Ryoo, H. (2003a). BMP-2-induced runx2 expression is mediated by dlx5, and TGF-beta 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of dlx5 expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(36):34387–94. PMID: 12815054.
- Lee, M., Kwon, T., Park, H., Wozney, J. M., und Ryoo, H. (2003b). BMP-2-induced osterix expression is mediated by dlx5 but is independent of runx2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309(3):689–94. PMID: 12963046.
- Lefebvre, V., Huang, W., Harley, V. R., Goodfellow, P. N., und de Crombrughe, B. (1997). SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Molecular and Cellular Biology*, 17(4):2336–46. PMID: 9121483.
- Lefebvre, V., Li, P., und de Crombrughe, B. (1998). A new long form of sox5 (L-Sox5), sox6 and sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *The EMBO Journal*, 17(19):5718–33. PMID: 9755172.
- Lehmann, K., Seemann, P., Stricker, S., Sammar, M., Meyer, B., Süring, K., Majewski, F., Tinschert, S., Grzeschik, K., Müller, D., Knaus, P., Nürnberg, P., und Mundlos, S. (2003). From the cover: Mutations in bone morphogenetic protein receptor 1B cause brachydactyly type a2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(21). PMC218749.
- Leroy, C., Manen, D., Rizzoli, R., Lombès, M., und Silve, C. (2004). Functional importance of myc-associated zinc finger protein for the human parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor-1 p2 promoter constitutive activity. *Journal of Molecular Endocrinology*, 32(1):99–113. PMID: 14765995.

- Leupin, O., Kramer, I., Collette, N. M., Loots, G. G., Natt, F., Kneissel, M., und Keller, H. (2007). Control of the SOST bone enhancer by PTH using MEF2 transcription factors. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 22(12):1957–67. PMID: 17696759.
- Li, T., Dong, Y., Ionescu, A. M., Rosier, R. N., Zuscik, M. J., Schwarz, E. M., O'Keefe, R. J., und Drissi, H. (2004). Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) inhibits runx2 expression through the PKA signaling pathway. *Experimental cell research*, 299(1):128–36. PMID: 15302580.
- Lin, Q., Lu, J., Yanagisawa, H., Webb, R., Lyons, G. E., Richardson, J. A., und Olson, E. N. (1998). Requirement of the MADS-box transcription factor MEF2C for vascular development. *Development (Cambridge, England)*, 125(22):4565–74. PMID: 9778514.
- Lin, Q., Schwarz, J., Bucana, C., und Olson, E. N. (1997). Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5317):1404–7. PMID: 9162005.
- Litvin, O., Tiunova, A., Connell-Alberts, Y., Panchin, Y., und Baranova, A. (2006). What is hidden in the pannexin treasure trove: the sneak peek and the guesswork. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10(3):613–34. PMID: 16989724.
- Liu, S., Zhou, J., Tang, W., Menard, R., Feng, J. Q., und Quarles, L. D. (2008). Pathogenic role of fgf23 in dmp1-null mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 295(2):E254–61. PMID: 18559986.
- Liu, W., Toyosawa, S., Furuichi, T., Kanatani, N., Yoshida, C., Liu, Y., Himeno, M., Narai, S., Yamaguchi, A., und Komori, T. (2001). Overexpression of cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *The Journal of Cell Biology*, 155(1):157–66. PMID: 11581292.
- Logan, M., Martin, J. F., Nagy, A., Lobe, C., Olson, E. N., und Tabin, C. J. (2002). Expression of cre recombinase in the developing mouse limb bud driven by a prxl enhancer. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 33(2):77–80. PMID: 12112875.
- Long, F., il Chung, U., Ohba, S., McMahon, J., Kronenberg, H. M., und McMahon, A. P. (2004). Ihh signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development (Cambridge, England)*, 131(6):1309–18. PMID: 14973297.
- Long, F., Zhang, X. M., Karp, S., Yang, Y., und McMahon, A. P. (2001). Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Development*, 128(24):5099–5108.
- Lu, J., McKinsey, T. A., Zhang, C., und Olson, E. N. (2000). Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases. *Molecular Cell*, 6(2):233–244.
- Lynch, J., Guo, L., Gelebart, P., Chilibeck, K., Xu, J., Molkentin, J. D., Agellon, L. B., und Michalak, M. (2005). Calreticulin signals upstream of calcineurin and MEF2C in a

- critical Ca^{2+} -dependent signaling cascade. *The Journal of cell biology*, 170(1):37–47. PMID: 15998798.
- Mackay, A. M., Beck, S. C., Murphy, J. M., Barry, F. P., Chichester, C. O., and Pittenger, M. F. (1998). Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Engineering*, 4(4):415–28. PMID: 9916173.
- Mackie, E. J., Ahmed, Y. A., Tatarczuch, L., Chen, K., and Mirams, M. (2008). Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(1):46–62. PMID: 17659995.
- Magee, C., Nurminskaya, M., Faverman, L., Galera, P., and Linsenmayer, T. F. (2005). SP3/SP1 transcription activity regulates specific expression of collagen type x in hypertrophic chondrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(27):25331–8. PMID: 15849196.
- Mäkitie, O., Susic, M., Ward, L., Barclay, C., Glorieux, F. H., and Cole, W. G. (2005). Schmid type of metaphyseal chondrodysplasia and COL10A1 mutations—findings in 10 patients. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 137A(3):241–8. PMID: 16088909.
- Marigo, V. und Tabin, C. J. (1996). Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18):9346–9351.
- Marinescu, V., Kohane, I., und Riva, A. (2005). MAPPER: a search engine for the computational identification of putative transcription factor binding sites in multiple genomes. *BMC Bioinformatics*, 6(1):79.
- McCuaig, K. A., Clarke, J. C., und White, J. H. (1994). Molecular cloning of the gene encoding the mouse parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(11):5051–5. PMID: 8197183.
- McCuaig, K. A., Lee, H. S., Clarke, J. C., Assar, H., Horsford, J., und White, J. H. (1995). Parathyroid hormone/parathyroid hormone related peptide receptor gene transcripts are expressed from tissue-specific and ubiquitous promoters. *Nucleic Acids Research*, 23(11):1948–55. PMID: 7596823.
- McDermott, J. C., Cardoso, M. C., Yu, Y. T., Andres, V., Leifer, D., Krainc, D., Lipton, S. A., und Nadal-Ginard, B. (1993). hMEF2C gene encodes skeletal muscle- and brain-specific transcription factors. *Molecular and Cellular Biology*, 13(4):2564–77. PMID: 8455629.
- McKinsey, T. A., Zhang, C. L., und Olson, E. N. (2001). Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Current Opinion in Genetics & Development*, 11(5):497–504. PMID: 11532390.
- McKinsey, T. A., Zhang, C. L., und Olson, E. N. (2002). MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(1):40–7. PMID: 11796223.

- Mello, M. A. und Tuan, R. S. (1999). High density micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: an in vitro model of endochondral skeletal development. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 35(5):262–9. PMID: 10475272.
- Mengshol, J. A., Vincenti, M. P., und Brinckerhoff, C. E. (2001). IL-1 induces collagenase-3 (MMP-13) promoter activity in stably transfected chondrocytic cells: requirement for runx-2 and activation by p38 MAPK and JNK pathways. *Nucleic Acids Research*, 29(21):4361–72. PMID: 11691923.
- Miller, C. T., Swartz, M. E., Khuu, P. A., Walker, M. B., Eberhart, J. K., und Kimmel, C. B. (2007). *mef2ca* is required in cranial neural crest to effect endothelin1 signaling in zebrafish. *Developmental biology*, 308(1):144–57. PMID: 17574232.
- Minagawa, M., Watanabe, T., Kohno, Y., Mochizuki, H., Hendy, G. N., Goltzman, D., White, J. H., und Yasuda, T. (2001). Analysis of the p3 promoter of the human parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene in pseudohypoparathyroidism type 1b. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(3):1394–7. PMID: 11238537.
- Minina, E., Wenzel, H. M., Kreschel, C., Karp, S., Gaffield, W., McMahon, A. P., und Vortkamp, A. (2001). BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development (Cambridge, England)*, 128(22):4523–34. PMID: 11714677.
- Miska, E. A., Karlsson, C., Langley, E., Nielsen, S. J., Pines, J., und Kouzarides, T. (1999). HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *The EMBO Journal*, 18(18):5099–107. PMID: 10487761.
- Molkentin, J. D., Li, L., und Olson, E. N. (1996). Phosphorylation of the MADS-Box transcription factor MEF2C enhances its DNA binding activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(29):17199–204. PMID: 8663403.
- Morisaki, T., Sermsuvitayawong, K., Byun, S. H., Matsuda, Y., Hidaka, K., Morisaki, H., und Mukai, T. (1997). Mouse *mef2b* gene: unique member of MEF2 gene family. *Journal of Biochemistry*, 122(5):939–46. PMID: 9443808.
- Mundlos, S., Otto, F., Mundlos, C., Mulliken, J. B., Aylsworth, A. S., Albright, S., Lindhout, D., Cole, W. G., Henn, W., Knoll, J. H., Owen, M. J., Mertelsmann, R., Zabel, B. U., und Olsen, B. R. (1997). Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell*, 89(5):773–9. PMID: 9182765.
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., und de Crombrughe, B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108(1):17–29. PMID: 11792318.
- Novitch, B. G., Spicer, D. B., Kim, P. S., Cheung, W. L., und Lassar, A. B. (1999). pRb is required for MEF2-dependent gene expression as well as cell-cycle arrest during skeletal muscle differentiation. *Current Biology: CB*, 9(9):449–59. PMID: 10322110.

- O'Brien, C. A., Plotkin, L. I., Galli, C., Gollner, J. J., Gortazar, A. R., Allen, M. R., Robling, A. G., Bouxsein, M., Schipani, E., Turner, C. H., Jilka, R. L., Weinstein, R. S., Manolagas, S. C., und Bellido, T. (2008). Control of bone mass and remodeling by PTH receptor signaling in osteocytes. *PLoS ONE*, 3(8):e2942. PMID: 18698360.
- O'Keefe, R. J., Loveys, L. S., Hicks, D. G., Reynolds, P. R., Crabb, I. D., Puzas, J. E., und Rosier, R. N. (1997). Differential regulation of type-II and type-X collagen synthesis by parathyroid hormone-related protein in chick growth-plate chondrocytes. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 15(2):162–74. PMID: 9167617.
- Otto, F., Thornell, A. P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K. C., Rosewell, I. R., Stamp, G. W., Beddington, R. S., Mundlos, S., Olsen, B. R., Selby, P. B., und Owen, M. J. (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, 89(5):765–71. PMID: 9182764.
- Ovchinnikov, D. A., Deng, J. M., Ogunrinu, G., und Behringer, R. R. (2000). *Col2a1*-directed expression of cre recombinase in differentiating chondrocytes in transgenic mice. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, 26(2):145–6. PMID: 10686612.
- Owen, T. A., Bortell, R., Yocum, S. A., Smock, S. L., Zhang, M., Abate, C., Shalhoub, V., Aronin, N., Wright, K. L., und van Wijnen, A. J. (1990). Coordinate occupancy of AP-1 sites in the vitamin d-responsive and CCAAT box elements by Fos-Jun in the osteocalcin gene: model for phenotype suppression of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(24):9990–4. PMID: 2124710.
- Park, S., Shin, H., und Han, T. (2002). Synergistic interaction of MEF2D and sp1 in activation of the CD14 promoter. *Molecular immunology*, 39(1-2):25–30. PMID: 12213324.
- Passier, R., Zeng, H., Frey, N., Naya, F. J., Nicol, R. L., McKinsey, T. A., Overbeek, P., Richardson, J. A., Grant, S. R., und Olson, E. N. (2000). CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*, 105(10):1395–406. PMID: 10811847.
- Pateder, D. B., Ferguson, C. M., Ionescu, A. M., Schwarz, E. M., Rosier, R. N., Puzas, J. E., und O'Keefe, R. J. (2001). PTHrP expression in chick sternal chondrocytes is regulated by TGF-beta through smad-mediated signaling. *Journal of Cellular Physiology*, 188(3):343–51. PMID: 11473361.
- Pathi, S., Rutenberg, J. B., Johnson, R. L., und Vortkamp, A. (1999). Interaction of *ihh* and BMP/Noggin signaling during cartilage differentiation. *Developmental Biology*, 209(2):239–53. PMID: 10328918.
- Pelegrin, P. (2008). Targeting interleukin-1 signaling in chronic inflammation: Focus on P2X(7) receptor and pannexin-1. *Drug News & Perspectives*, 21(8):424–33. PMID: 19034348.
- Penuela, S., Bhalla, R., Gong, X., Cowan, K. N., Celetti, S. J., Cowan, B. J., Bai, D.,

- Shao, Q., und Laird, D. W. (2007). Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics from the connexin family of gap junction proteins. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 21):3772–83. PMID: 17925379.
- Peters, K., Ornitz, D., Werner, S., und Williams, L. (1993). Unique expression pattern of the FGF receptor 3 gene during mouse organogenesis. *Developmental Biology*, 155(2):423–30. PMID: 8432397.
- Pittenger, M. F. (2008). Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 449:27–44. PMID: 18370081.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., und Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5411):143–7. PMID: 10102814.
- Porte, D., Tuckermann, J., Becker, M., Baumann, B., Teurich, S., Higgins, T., Owen, M. J., Schorpp-Kistner, M., und Angel, P. (1999). Both AP-1 and cbfa1-like factors are required for the induction of interstitial collagenase by parathyroid hormone. *Oncogene*, 18(3):667–78. PMID: 9989817.
- Potthoff, M. J., Arnold, M. A., McAnally, J., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., und Olson, E. N. (2007a). Regulation of skeletal muscle sarcomere integrity and postnatal muscle function by *mef2c*. *Molecular and Cellular Biology*, 27(23):8143–51. PMID: 17875930.
- Potthoff, M. J. und Olson, E. N. (2007). MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development (Cambridge, England)*, 134(23):4131–40. PMID: 17959722.
- Potthoff, M. J., Wu, H., Arnold, M. A., Shelton, J. M., Backs, J., McAnally, J., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., und Olson, E. N. (2007b). Histone deacetylase degradation and MEF2 activation promote the formation of slow-twitch myofibers. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(9):2459–67. PMID: 17786239.
- Provot, S., Kempf, H., Murtaugh, L. C., il Chung, U., Kim, D., Chyung, J., Kronenberg, H. M., und Lassar, A. B. (2006). Nkx3.2/Bapx1 acts as a negative regulator of chondrocyte maturation. *Development (Cambridge, England)*, 133(4):651–62. PMID: 16421188.
- Rahman, A., Anwar, K. N., Minhajuddin, M., Bijli, K. M., Javaid, K., True, A. L., und Malik, A. B. (2004). cAMP targeting of p38 MAP kinase inhibits thrombin-induced NF-kappaB activation and ICAM-1 expression in endothelial cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 287(5):L1017–24. PMID: 15246972.
- Reinholt, F. P., Hultenby, K., Oldberg, A., und Heinegard, D. (1990). Osteopontin—a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12):4473–5. PMID: 1693772.
- Rickard, D. J., Sullivan, T. A., Shenker, B. J., Leboy, P. S., und Kazhdan, I. (1994). Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Developmental Biology*, 161(1):218–28. PMID: 8293874.

- Riemer, S., Gebhard, S., Beier, F., Pöschl, E., und von der Mark, K. (2002). Role of c-fos in the regulation of type x collagen gene expression by PTH and PTHrP: localization of a PTH/PTHrP-responsive region in the human COL10A1 enhancer. *Journal of cellular biochemistry*, 86(4):688–99. PMID: 12210735.
- Robledo, R. F., Rajan, L., Li, X., und Lufkin, T. (2002). The dlx5 and dlx6 homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development. *Genes Dev.*, 16(9):1089–1101.
- Roca, H., Phimpilai, M., Gopalakrishnan, R., Xiao, G., und Franceschi, R. T. (2005). Cooperative interactions between RUNX2 and homeodomain protein-binding sites are critical for the osteoblast-specific expression of the bone sialoprotein gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(35):30845–55. PMID: 16000302.
- Rojas, M., Xu, J., Woods, C. R., Mora, A. L., Spears, W., Roman, J., und Brigham, K. L. (2005). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 33(2):145–52. PMID: 15891110.
- Rosati, R., Horan, G. S., Pinero, G. J., Garofalo, S., Keene, D. R., Horton, W. A., Vuorio, E., de Crombrughe, B., und Behringer, R. R. (1994). Normal long bone growth and development in type x collagen-null mice. *Nature genetics*, 8(2):129–35. PMID: 7842010.
- Rousseau, F., Bonaventure, J., Legeai-Mallet, L., Pelet, A., Rozet, J. M., Maroteaux, P., Merrer, M. L., und Munnich, A. (1994). Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature*, 371(6494):252–4. PMID: 8078586.
- Sahni, M., Ambrosetti, D. C., Mansukhani, A., Gertner, R., Levy, D., und Basilico, C. (1999). FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes & Development*, 13(11):1361–6. PMID: 10364154.
- Sakai, K., Hiripi, L., Glumoff, V., Brandau, O., Eerola, R., Vuorio, E., Bösze, Z., Fässler, R., und Aszódi, A. (2001). Stage- and tissue-specific expression of a Col2a1-Cre fusion gene in transgenic mice. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 19(8):761–7. PMID: 11223335.
- Sambrook, J. und Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3 lab edition.
- Sato, M., Morii, E., Komori, T., Kawahata, H., Sugimoto, M., Terai, K., Shimizu, H., Yasui, T., Ogihara, H., Yasui, N., Ochi, T., Kitamura, Y., Ito, Y., und Nomura, S. (1998). Transcriptional regulation of osteopontin gene in vivo by PEBP2alphaA/CBFA1 and ETS1 in the skeletal tissues. *Oncogene*, 17(12):1517–25. PMID: 9794229.
- Schipani, E., Jensen, G. S., Pincus, J., Nissenson, R. A., Gardella, T. J., und Jüppner, H. (1997a). Constitutive activation of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signaling pathway by parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptors mutated at the two loci

- for jansen's metaphyseal chondrodysplasia. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 11(7):851–8. PMID: 9178745.
- Schipani, E., Kruse, K., und Jüppner, H. (1995). A constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in jansen-type metaphyseal chondrodysplasia. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5207):98–100. PMID: 7701349.
- Schipani, E., Lanske, B., Hunzelman, J., Luz, A., Kovacs, C. S., Lee, K., Pirro, A., Kronenberg, H. M., und Jüppner, H. (1997b). Targeted expression of constitutively active receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide delays endochondral bone formation and rescues mice that lack parathyroid hormone-related peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(25):13689–94. PMID: 9391087.
- Schmid, T. M. und Linsenmayer, T. F. (1985a). Developmental acquisition of type x collagen in the embryonic chick tibiotarsus. *Developmental Biology*, 107(2):373–81. PMID: 3882482.
- Schmid, T. M. und Linsenmayer, T. F. (1985b). Immunohistochemical localization of short chain cartilage collagen (type x) in avian tissues. *The Journal of Cell Biology*, 100(2):598–605. PMID: 2578471.
- Seemann, P. (2006). *Zur Bedeutung des Wachstumsfaktors GDF5*. PhD thesis, FU Berlin.
- Serra, C., Palacios, D., Mozzetta, C., Forcales, S. V., Morantte, I., Ripani, M., Jones, D. R., Du, K., Jhala, U. S., Simone, C., und Puri, P. L. (2007). Functional interdependence at the chromatin level between the MKK6/p38 and IGF1/PI3K/AKT pathways during muscle differentiation. *Molecular Cell*, 28(2):200–13. PMID: 17964260.
- Shiang, R., Thompson, L. M., Zhu, Y. Z., Church, D. M., Fielder, T. J., Bocian, M., Winokur, S. T., und Wasmuth, J. J. (1994). Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell*, 78(2):335–42. PMID: 7913883.
- Shimizu, E., Selvamurugan, N., Westendorf, J. J., und Partridge, N. C. (2007). Parathyroid hormone regulates histone deacetylases in osteoblasts. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1116:349–53. PMID: 17656568.
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M., und McMahon, A. P. (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes & Development*, 13(16):2072–86. PMID: 10465785.
- Stanton, L. und Beier, F. (2007). Inhibition of p38 MAPK signaling in chondrocyte cultures results in enhanced osteogenic differentiation of perichondral cells. *Experimental Cell Research*, 313(1):146–55. PMID: 17067574.
- Stanton, L., Sabari, S., Sampaio, A. V., Underhill, T. M., und Beier, F. (2004). p38 MAP kinase signalling is required for hypertrophic chondrocyte differentiation. *The Biochemical journal*, 378(Pt 1):53–62. PMID: 14594450.
- Stanton, L., Underhill, T. M., und Beier, F. (2003). MAP kinases in chondrocy-

- te differentiation. *Developmental Biology*, 263(2):165–75. PMID: 14597193.
- Stricker, S., Fundele, R., Vortkamp, A., und Mundlos, S. (2002). Role of runx genes in chondrocyte differentiation. *Developmental Biology*, 245(1):95–108. PMID: 11969258.
- Sudo, H., Kodama, H. A., Amagai, Y., Yamamoto, S., und Kasai, S. (1983). In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *The Journal of Cell Biology*, 96(1):191–8. PMID: 6826647.
- Sun, L., Blair, H. C., Peng, Y., Zaidi, N., Adebajo, O. A., Wu, X. B., Wu, X. Y., Iqbal, J., Epstein, S., Abe, E., Moonga, B. S., und Zaidi, M. (2005). Calcineurin regulates bone formation by the osteoblast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(47):17130–5. PMID: 16286645.
- Sun, L., Peng, Y., Zaidi, N., Zhu, L., Iqbal, J., Yamoah, K., Wang, X., Liu, P., Abe, E., Moonga, B. S., Epstein, S., und Zaidi, M. (2007a). Evidence that calcineurin is required for the genesis of bone-resorbing osteoclasts. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 292(1):F285–91. PMID: 16968888.
- Sun, L., Zhu, L., Zaidi, N., Yang, G., Moonga, B. S., Abe, E., Iqbal, J., Epstein, S., Blair, H. C., Huang, C. L., und Zaidi, M. (2007b). Cellular and molecular consequences of calcineurin α gene deletion. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1116:216–26. PMID: 17872390.
- Takeda, S., Bonnamy, J. P., Owen, M. J., Ducy, P., und Karsenty, G. (2001). Continuous expression of cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues cbfa1-deficient mice. *Genes & Development*, 15(4):467–81. PMID: 11230154.
- Tamir, Y. und Bengal, E. (2000). Phosphoinositide 3-kinase induces the transcriptional activity of MEF2 proteins during muscle differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(44):34424–32. PMID: 10896679.
- Thomas, D. M., Carty, S. A., Piscopo, D. M., Lee, J. S., Wang, W. F., Forrester, W. C., und Hinds, P. W. (2001). The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation. *Molecular Cell*, 8(2):303–16. PMID: 11545733.
- Tou, L., Quibria, N., und Alexander, J. M. (2003). Transcriptional regulation of the human Runx2/Cbfa1 gene promoter by bone morphogenetic protein-7. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 205(1-2):121–9. PMID: 12890574.
- Tyson, D. R., Swarthout, J. T., und Partidge, N. C. (1999). Increased osteoblastic c-fos expression by parathyroid hormone requires protein kinase a phosphorylation of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein at serine 133. *Endocrinology*, 140(3):1255–61. PMID: 10067851.
- Ueta, C., Iwamoto, M., Kanatani, N., Yoshida, C., Liu, Y., Enomoto-Iwamoto, M., Ohmori, T., Enomoto, H., Nakata, K., Takada, K., Kurisu, K., und Komori, T. (2001). Skeletal malformations caused by overexpression of cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes. *The Journal*

- of Cell Biology*, 153(1):87–100. PMID: 11285276.
- Ulici, V., Hoenselaar, K. D., Gillespie, J. R., und Beier, F. (2008). The PI3K pathway regulates endochondral bone growth through control of hypertrophic chondrocyte differentiation. *BMC Developmental Biology*, 8:40. PMC2329617.
- Ulsamer, A., no, M. J. O., Ruiz, S., Susperregui, A. R. G., Osses, N., Rosa, J. L., und Ventura, F. (2008). BMP-2 induces osterix expression through up-regulation of *dlx5* and its phosphorylation by p38. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(7):3816–26. PMID: 18056716.
- van Bezooijen, R. L., Roelen, B. A. J., Visser, A., van der Wee-Pals, L., de Wilt, E., Karperien, M., Hamersma, H., Papapoulos, S. E., ten Dijke, P., und Löwik, C. W. G. M. (2004). Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *The Journal of Experimental Medicine*, 199(6):805–14. PMID: 15024046.
- Vega, R. B., Matsuda, K., Oh, J., Barbosa, A. C., Yang, X., Meadows, E., McAnally, J., Pomajzl, C., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Karsenty, G., und Olson, E. N. (2004). Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell*, 119(4):555–66. PMID: 15537544.
- Verzi, M. P., Agarwal, P., Brown, C., McCulley, D. J., Schwarz, J. J., und Black, B. L. (2007). The transcription factor MEF2C is required for craniofacial development. *Developmental cell*, 12(4):645–52. PMID: 17420000.
- Vong, L. H., Ragusa, M. J., und Schwarz, J. J. (2005). Generation of conditional Mef2cloxP/loxP mice for temporal- and tissue-specific analyses. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 43(1):43–8. PMID: 16106363.
- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G. V., Kronenberg, H. M., und Tabin, C. J. (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by indian hedgehog and PTH-related protein. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5275):613–22. PMID: 8662546.
- Wang, A. H., Bertos, N. R., Vezmar, M., Pelletier, N., Crosato, M., Heng, H. H., Th'ng, J., Han, J., und Yang, X. J. (1999a). HDAC4, a human histone deacetylase related to yeast HDA1, is a transcriptional corepressor. *Molecular and Cellular Biology*, 19(11):7816–27. PMID: 10523670.
- Wang, D., Christensen, K., Chawla, K., Xiao, G., Krebsbach, P. H., und Franceschi, R. T. (1999b). Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 14(6):893–903. PMID: 10352097.
- Wang, X., Streeter, M., Liu, Y., und Zhao, H. (2009). Identification and characterization of pannexin expression in the mammalian cochlea. *The Journal of Comparative Neurology*, 512(3):336–46. PMID: 19009624.
- Wang, X., Tang, X., Li, M., Marshall, J., und Mao, Z. (2005). Regulation of neuroprotective activity of myocyte enhancer factor 2 by cAMP-PKA signaling pathway in

- neuronal survival. *J. Biol. Chem.*, page M501819200.
- Warman, M. L., Abbott, M., Apte, S. S., Hefferon, T., McIntosh, I., Cohn, D. H., Hecht, J. T., Olsen, B. R., und Francomano, C. A. (1993). A type x collagen mutation causes schmid metaphyseal chondrodysplasia. *Nature Genetics*, 5(1):79–82. PMID: 8220429.
- Weir, E. C., Philbrick, W. M., Amling, M., Neff, L. A., Baron, R., und Broadus, A. E. (1996). Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(19):10240–5. PMID: 8816783.
- Westendorf, J. J., Zaidi, S. K., Cascino, J. E., Kahler, R., van Wijnen, A. J., Lian, J. B., Yoshida, M., Stein, G. S., und Li, X. (2002). Runx2 (Cbfa1, AML-3) interacts with histone deacetylase 6 and represses the p21(CIP1/WAF1) promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 22(22):7982–92. PMID: 12391164.
- Winslow, M. M., Pan, M., Starbuck, M., Gallo, E. M., Deng, L., Karsenty, G., und Crabtree, G. R. (2006). Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass. *Developmental Cell*, 10(6):771–82. PMID: 16740479.
- Wronski, T. J. und Morey, E. R. (1983). Effect of spaceflight on periosteal bone formation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 244(3):R305–309.
- Xiao, G., Cui, Y., Ducy, P., Karsenty, G., und Franceschi, R. T. (1997). Ascorbic acid-dependent activation of the osteocalcin promoter in MC3T3-E1 preosteoblasts: requirement for collagen matrix synthesis and the presence of an intact OSE2 sequence. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 11(8):1103–13. PMID: 9212058.
- Xu, Q. und Wu, Z. (2000). The insulin-like growth factor-phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling pathway regulates myogenin expression in normal myogenic cells but not in rhabdomyosarcoma-derived RD cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(47):36750–7. PMID: 10973962.
- Yang, C. C., Ornatsky, O. I., McDermott, J. C., Cruz, T. F., und Prody, C. A. (1998). Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogen-activated protein kinase, ERK5/BMK1. *Nucleic Acids Research*, 26(20):4771–7. PMID: 9753748.
- Yeung, F., Law, W. K., Yeh, C., Westendorf, J. J., Zhang, Y., Wang, R., Kao, C., und Chung, L. W. K. (2002). Regulation of human osteocalcin promoter in hormone-independent human prostate cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(4):2468–76. PMID: 11684680.
- Yin, F., Wang, Y., Du, J., Li, C., Lu, Z., Han, C., und Zhang, Y. (2006). Noncanonical cAMP pathway and p38 MAPK mediate beta2-adrenergic receptor-induced IL-6 production in neonatal mouse cardiac fibroblasts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 40(3):384–93. PMID: 16466739.
- Yoshida, C. A., Furuichi, T., Fujita, T., Fukuyama, R., Kanatani, N., Kobayashi, S., Satake, M., Takada, K., und Komori, T.

- (2002). Core-binding factor beta interacts with runx2 and is required for skeletal development. *Nature Genetics*, 32(4):633–8. PMID: 12434152.
- Yoshida, C. A., Yamamoto, H., Fujita, T., Furuichi, T., Ito, K., Ichi Inoue, K., Yamana, K., Zanma, A., Takada, K., Ito, Y., und Komori, T. (2004). Runx2 and runx3 are essential for chondrocyte maturation, and runx2 regulates limb growth through induction of indian hedgehog. *Genes & Development*, 18(8):952–63. PMID: 15107406.
- Yoshida, H. und Yumoto, T. (1987). Alkaline phosphatase-positive reticular cells of chicken bone marrow—in vivo and in vitro studies. *International Journal of Cell Cloning*, 5(1):35–54. PMID: 3559293.
- Yoshikawa, T., Ohgushi, H., und Tamai, S. (1996). Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research*, 32(3):481–92. PMID: 8897155.
- Zakany, J. und Duboule, D. (2007). The role of hox genes during vertebrate limb development. *Current Opinion in Genetics & Development*, 17(4):359–66. PMID: 17644373.
- Zelzer, E., Glotzer, D. J., Hartmann, C., Thomas, D., Fukai, N., Soker, S., und Olsen, B. R. (2001). Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mechanisms of Development*, 106(1-2):97–106. PMID: 11472838.
- Zhao, M., New, L., Kravchenko, V. V., Kato, Y., Gram, H., di Padova, F., Olson, E. N., Ulevitch, R. J., und Han, J. (1999). Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. *Molecular and Cellular Biology*, 19(1):21–30. PMID: 9858528.
- Zhen, X., Wei, L., Wu, Q., Zhang, Y., und Chen, Q. (2001). Mitogen-activated protein kinase p38 mediates regulation of chondrocyte differentiation by parathyroid hormone. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(7):4879–85. PMID: 11098049.
- Zheng, Q., Zhou, G., Morello, R., Chen, Y., Garcia-Rojas, X., und Lee, B. (2003). Type x collagen gene regulation by runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo. *The Journal of cell biology*, 162(5):833–42. PMID: 12952936.
- Zhou, G., Zheng, Q., Engin, F., Munivez, E., Chen, Y., Sebald, E., Krakow, D., und Lee, B. (2006). Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(50):19004–9. PMID: 17142326.
- Zhu, B. und Gulick, T. (2004). Phosphorylation and alternative pre-mRNA splicing converge to regulate myocyte enhancer factor 2C activity. *Molecular and Cellular Biology*, 24(18):8264–75. PMID: 15340086.
- Zhu, B., Ramachandran, B., und Gulick, T. (2005). Alternative pre-mRNA splicing governs expression of a conserved acidic transactivation domain in myocyte enhancer factor 2 factors of striated muscle and brain. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(31):28749–60. PMID: 15834131.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung	kb	Kilobasen
ALP	Alkalische Phosphatase	kDa	Kilodalton
Amp	Ampicillin	KO	Knockout
ATP	Adenosintriphosphat	l	Liter
bp	Basenpaare	LB	Luria-Bertani
BSA	Rinder Serum Albumin	LTR	<i>Long terminal repeat</i>
°C	Grad Celsius	luc	Luciferase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	m (Präfix)	Milli-
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	μ (Präfix)	Mikro-
CDS	kodierende Sequenz	M	molar (Mol/l)
chBM	Hühner Knochenmarkzellen	MCDS	Metaphysäre Chondrodysplasie, Typ Schmid
chMM	Hühner Micromass	Mef2(a–d)	<i>Myocyte enhancer factor 2(a–d)</i>
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>	MEM	<i>Modified eagle's medium</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat	min	Minute(n)
DIG	Digoxygenin	n (Präfix)	Nano-
DMEM	<i>Dulbeccos's modified eagle's medium</i>	n.d.	nicht detektierbar
DMSO	Dimethylsulfoxid	PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PCR	Polymerasekettenreaktion
dNTP	Desoxyribonukleotid-triphosphat	Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
E	Embryonalstadium	Phu	<i>Phusion</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	rel.	relativ(e)
EtBr	Ethidiumbromid	RNA	Ribonukleinsäure
FCS	Fötale Rinderserum	rpm	Umdrehungen pro Minute
g	Gramm oder Erdbeschleunigung	RT	Raumtemperatur
GFP	Grün fluoreszierendes Protein	SD	Standardabweichung
h	Stunde	SDS	Natriumdodecylsulfat
HRP	Meerrettich Peroxidase	Tab.	Tabelle
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung	TAE	Tris-Acetat-EDTA
JMC	Metaphysäre Chondrodysplasie, Typ Jansen	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
		Tm	Schmelzpunkt
		U	Unit
		UTR	untranslatierter Bereich

UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen/Totalvolumen
w/v	Gewicht/Totalvolumen

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Professor Dr. Stefan Mundlos für die Möglichkeit bedanken, dieses spannende und herausfordernde Thema in seiner Arbeitsgruppe bearbeiten zu dürfen. Ohne seine fortwährende Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Besonderer Dank gilt auch Professor Dr. Wolfgang Schuster für die Übernahme des Korreferats und die Vertretung dieser Arbeit vor dem Fachbereich Biologie/Chemie/Pharmazie der Freien Universität Berlin.

Uwe Kornak möchte ich für die Betreuung der Arbeit, die guten Tipps & Ratschläge zum richtigen Zeitpunkt und das felsenfeste Vertrauen in meine Fähigkeiten danken. Diese Arbeit wäre ohne seinen allumfassenden Überblick über die Knochenentwicklung und die intergalaktisch schnellen Korrekturen mit Sicherheit deutlich unverständlicher geworden.

Ich danke der AG Mundlos am MPI für Molekulare Genetik für die tolle Zusammenarbeit. Nadine „Herbal“ Kossler danke ich nicht zuletzt für lustige und kurzweilige Tage am Kryotom: „Das schneidet ja gut!“. Anja und Julia H. danke ich dafür, daß sie immer ein Eppi voller chMM-Zellen übrig hatten, wenn ich mal schnell ein ungeplantes Experiment ansetzen wollte. Norbert danke ich für die gute Zusammenarbeit beim ISH-Screen – ohne seine Kenntnisse in „Robotik“ wäre dieses Vorhaben unmöglich gewesen. Natürlich danke ich auch der Tierhaus-Crew – allen voran Janine Wetzel, die immer einen perfekten Überblick über die laufenden Mef2c-Verpaarungen hatte.

Jochen „Method-Man“ Hecht gebührt besonderer Dank für seine Unterstützung von Anfang an. Ohne seine guten Tipps zur Durchführung des einen oder anderen Experiments und seine schier unerschöpflichen Materialvorräte wäre der praktische Teil dieser Arbeit wohl erheblich komplizierter gewesen.

Bei Wibke, Andreas, Mateusz und Fabian möchte ich mich für die zahllosen, amüsanten und durch leckeren Kaffee unterstützten Diskussionen und Anregungen bedanken. Natürlich war die Laborarbeit mit euch ebenso toll und kurzweilig. Auch der eine oder andere wissenschaftliche Snowboardausflug sowie perfekte Schnitzel sorgten für die notwendige Abwechslung.

Pablo, meinem langjährigen Benchnachbarn gilt natürlich ganz besonderer Dank für den ständigen humorvollen Austausch über Hühner, Knochenmark, RNAs, Essensportionen und all die anderen Dinge, die im Leben wichtig sind. Besonders die Unterhaltungen in der

Sprache „Grrriutsch“ waren super! Ansonsten gilt: „Stulle statt Schoko!“

Meiner „Rakete“ Ines danke ich für die liebevolle Unterstützung und den sanften Druck, ohne den ich wahrscheinlich immer noch an der Arbeit schreiben würde.

Meinem Bruder Lars danke ich nicht zuletzt für die sechs Wochen Unterschlupf im „Chez Lalle“, die mir die Wohnungssuche in Berlin deutlich erleichtert haben.

Zu guter Letzt möchte ich mich auch ganz besonders bei meinen Eltern bedanken, die mich jahrelang unterstützt und mir Rückhalt gegeben haben, ohne dabei den Glauben an mich zu verlieren. Ohne Euch wäre ich nicht so weit gekommen!

Publikationsverzeichnis

Kolanczyk M, Kossler N, Kühnisch J, Lavitas L, Stricker S, Wilkening U, Manjubala I, Fratzl P, Spörle R, Herrmann BG, Parada LF, Kornak U, Mundlos S. (2007) **Multiple roles for neurofibromin in skeletal development and growth.** *Hum Mol Genet*, 16(8):874–86. PMID: 17317783.

Hecht J, Seitz V, Urban M, Wagner F, Robinson PN, Stiege A, Dieterich C, Kornak U, Wilkening U, Brieske N, Zwingman C, Kidess A, Stricker S, Mundlos S. (2006) **Detection of novel skeletogenesis target genes by comprehensive analysis of a Runx2(-/-) mouse model.** *Gene Expr Patterns*, 7(1-2):102–12. PMID: 16829211.