

Genexpressionsanalysen zum besseren Verständnis von Knochenheilung und -entwicklung

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

Jochen Hecht
aus Wuppertal

Dezember 2006

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Mundlos

Max-Planck-Institut für molekulare Genetik

Innestr. 73, 14195 Berlin

Tel. 030 – 8413 1449

E-Mail: mundlos@molgen.mpg.de

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Bartolomaeus

Institut für Zoologie - Systematik und Evolution der Tiere

Freie Universität Berlin

Königin-Luise-Str. 1-3, 14195 Berlin

E-Mail: tbartol@zoosyst-berlin.de

Disputation am: 14.03.2007

Menschliche Unwissenheit

Wie sehr der Mensch um Wissenschaft verborgner Dinge ringt,
so bleibt ihm doch unzählig viel, davon er sagt: Mich dünkt.

(Friedrich Freiherr von Logau, 1604-1655)

Danksagung

Mein Dank gilt zuallererst Herrn Professor Dr. Stefan Mundlos für die Überlassung des interessanten und spannenden Themas, seine ständige Unterstützung, stete Diskussionsbereitschaft und sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit. Die großzügig gewährten Freiräume für so manches Hobbyprojekt waren dabei das Salz in einer ohnehin schon sehr schmackhaften Suppe.

Herrn Professor Dr. Thomas Bartolomaeus danke ich für die Übernahme des Korreferats, die Vertretung der Arbeit vor dem Fachbereich, die sehr hilfreichen Tips und die Unterstützung für den evolutionsbiologischen Teil dieser Arbeit. Besonders bei Dr. Lars Podsiadlowski möchte ich mich für die Hilfe bei der Erstellung und Beschreibung der Phylogenien bedanken.

Ganz besonderer Dank gebührt meinem Betreuer Dr. Volkhard Seitz, der mir in allen Situationen zur Seite stand und mich mit Beharrlichkeit letztendlich sogar von der Existenz dreier *Runt*-Gene im Hai überzeugen konnte. Er erklärte mir auf verständliche Art und Weise die Feinheiten und Begriffe der Evolutionsbiologie und war bzw. ist jederzeit ein hilfsbereiter Freund. Sein Einsatz und seine immer positive Einstellung haben so manches scheinbar großes Problem auf ein rechtes Maß zurückgestutzt.

Bei Asita möchte ich mich nicht nur dafür bedanken, daß sie nie gemurrt und gefauchet hat, wenn immer noch etwas zu optimieren war, obwohl alle anderen schon längst die Füße hochlegen konnten, sondern auch für die stete moralische Unterstützung, die über viele schwierige Phasen hinweggeholfen hat. Ihr kleines Laborgeräte-, Puffer- und Chemikalienprivatmuseum war ein unerschöpflicher Quell gerade benötigter Utensilien.

Bei den anderen Mitstreitern am Chip-Projekt, Christine, Maren, Norbert, Sigmar, Ulli und Uwe möchte ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit und großartige Unterstützung bedanken. Trotz eines unkooperativen Roboters ist aus dem Chip-Projekt schlußendlich eine schöne, runde Sache geworden.

Ulrike danke ich für die tatkräftige Hilfe bei Klonierung aller möglichen *Runt*-Gene. Wenn sie es nicht vorgezogen hätte die Laborarbeit hinter sich zu lassen, hätten wir bestimmt noch viele weitere *Runxe* finden und zusammen klonieren können.

Nick und Sebastian danke ich für die essentielle Hilfe bei der Bearbeitung der Schaf- und Chip-Kandidatengene und die Lösung so manches mathematischen oder bioinformatischen Problems, an dem ich alleine gescheitert wäre. Auch die Gene Ontology wäre ohne diese Unterstützung für mich sicher ein Buch mit sieben Siegeln geblieben.

Den Kolleginnen der „AG Seehecht“, Anja, Cindy, Julia, Mareen und Susann danke ich für jede Menge Spaß bei der Arbeit im neuen Labor. Ich muß zugeben, daß es mich gar nicht so schlecht getroffen hat und sollte ich einmal Diät machen müssen, kann ich mich jetzt aus einem reichhaltigen Fundus an Rezepten bedienen.

Nicht zu vergessen die anderen jetzigen und ehemaligen Mitarbeiter der AG Mundlos, Andrea, Andreas, Barbara, Britta, Daniel, Flo, Georg, Jirko, Kathrin, Manuela, Mateusz, Michael, Monika, Nadine, Nicole, Pablo, Pia, Wibke, denen eine optimale Arbeitsatmosphäre zu verdanken ist und die mir so manches Mal meine Geheimvorräte plünderten, aber auch oftmals mit Rat und Tat zur Seite standen.

Dr. Rudi Lurz und Gerhild Lüder möchte ich ebenfalls ganz herzlich danken. Ihre stete Hilfsbereitschaft hat bei vielen Problemen weitergeholfen. So manche Chemikalie fand sich bei Gerhild und Rudi und für die Dokumentation wichtiger Ergebnisse konnte man immer auf Rudis virtuosen Umgang mit dem Fotoapparat bauen. Auch die vielen Einladungen zu Tee, Kuchen oder Eis waren natürlich immer sehr willkommen.

Bei Jürgen Willert bedanke ich mich sehr herzlich für viele methodische Tips und Tricks und die Versorgung mit allen möglichen gerade dringend benötigten Enzymen. Sein Bananencurry war eine kulinarische Bereicherung vieler Grillabende und auch die gemeinsamen Restaurantbesuche möchte ich nicht missen.

Dr. Albert Poustka und Dr. Georgia Panopoulou danke ich für die Hilfe beim Picken der cDNA-Klone und die vortreffliche Zusammenarbeit am Evolutionsprojekt.

Mit Professor Dr. Georg Duda, Dr. Hanna Schell, Dr. Jasmin Lienau und Camilla Bergmann war die Konstruktion der Schaf cDNA-Banken nahezu ein Kinderspiel. Daher sei auch ihnen an dieser Stelle für die exzellente Zusammenarbeit ganz herzlich gedankt. Egal welchen Sonderwunsch ich zur Optimierung der Präparationen hatte – er wurde immer prompt erfüllt.

Bei Dr. Richard Reinhard und Heiner Kuhl sowie Beatrice Baumann, Janina Thiel, Sven Klages und Verena Gimmel bedanke ich mich für die spannende Kooperation bei der Sequenzierung der Schaf-cDNA-Banken und viele methodische Tips und Tricks. Es war beeindruckend einen kleinen Einblick in die große Welt der Hochdurchsatztechnologien zu bekommen.

Dr. Stefan Haas danke ich für das Clustering der Schaf-Sequenzen und das geduldige Erklären so mancher Frage zu bioinformatischen Problemen. Seine GeneNest-Software macht das Arbeiten mit den Schafsequenzen zu einem Vergnügen. Dr. Christoph Dieterich danke ich für die Zusammenarbeit bei der Suche nach den direkt regulierten Runx2-Zielgenen. Die CORG-Datenbank hat es erst ermöglicht die vielversprechendsten Kandidaten herauszufiltern.

Dr. Florian Wagner möchte ich ganz herzlich für die Hybridisierung der Affymetrix-Chips und die ausgezeichnete Hilfe bei der Auswertung der Daten danken. Aus diesen Kandidaten läßt sich sicher noch der ein oder andere Schatz heben.

Professor Dr. Siegfried Ehrich von der Bundesforschungsanstalt für Fischerei danke ich für das freundliche Zurverfügungstellen der Schleimaale. Bei Dr. Wolfgang Gettmann und Dr. Hubert Bosch vom Aquazoo in Düsseldorf möchte ich mich für die Überlassung der Katzenhaiembryonen bedanken. Margret Krüß von der Biologischen Anstalt Helgoland danke ich für die vielen Lanzettfischchen, die Katzenhaie und die freundliche Hilfe bei der Präparation der Schleimaale.

Petra möchte ich nicht nur für unzählige kleine und große Gefallen bei der Arbeit, die Einarbeitung in die Zellkultur und viele Ratschläge zur Gestaltung von Abbildungen danken, sondern auch für zahlreiche schöne Abende in der Luise, bei Curry 36 usw. und der damit oft verbundenen Rettung vor dem Hungertod. Hier geht natürlich auch an Lutz ein großes Dankeschön.

Katarina danke ich für die regelmäßigen Ablenkungsversuche von der Laborarbeit durch gemeinsame Opernbesuche und Anderes, wie zum Beispiel das gute Essen beim Inder oder im Adelino. Auch die (meist) erfolgreichen gemeinsamen Versuche selbst etwas eßbares zu kochen möchte ich nicht missen. Nicht zu vergessen: Vielen Dank auch für das gründliche Korrekturlesen dieser Arbeit.

Last but not least gilt mein Dank natürlich meiner Familie für den Rückhalt und die ständige Unterstützung, die diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Das Skelett.....	1
1.2 Die Knochenentwicklung	2
1.3 Die Heilung einer Knochenfraktur	3
1.4 An der Skeletogenese sind zahlreiche Gene beteiligt	4
1.5 <i>Runt</i> -Gene als wichtige Faktoren für die Knochenentwicklung	5
1.6 <i>Runx2</i> ist in ein komplexes Regulationsnetz eingebunden	7
1.7 Die Familie der <i>Runt</i> -Gene aus evolutionsbiologischer Sicht.....	8

2 Zielstellung der Arbeit 11

3 Materialien und Methoden 12

3.1 Material	12
3.1.1 Chemikalien.....	12
3.1.2 Radiochemikalien	12
3.1.3 Puffer und Lösungen.....	12
3.1.4 Enzyme	12
3.1.5 Bakterien.....	12
3.1.6 Kits.....	13
3.1.7 Geräte.....	13
3.1.8 Primer	14
3.1.8.1 Primer für Schafsequenzen	14
3.1.8.2 Primer für Maussequenzen	15
3.1.8.3 Primer für Katzenhaisequenzen	18
3.1.8.4 Sonstige Primer.....	19
3.1.9 Tiere.....	20
3.2 Allgemeine Molekularbiologische Methoden.....	20
3.2.1 DNA-Isolierung	20
3.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA	20
3.2.1.2 Isolierung von genomischer DNA	21
3.2.2 RNA-Isolierung	21
3.2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA	21
3.2.2.2 Isolierung von poly(A)-RNA.....	22
3.2.3 Herstellung von cDNA	22
3.2.3.1 Herstellung von cDNA für die quantitative RT-PCR.....	22
3.2.3.2 Herstellung von cDNA für die nicht-quantitative RT-PCR	22
3.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	23
3.2.4.1 Standard-PCR	23
3.2.4.2 <i>Runx2</i> -Genotypisierungs-PCR.....	23

3.2.4.3	Quantitative RT-PCR (qRT-PCR).....	24
3.2.4.3.1	Relative Quantifizierung durch qRT-PCR.....	24
3.2.4.3.2	Absolute Quantifizierung durch qRT-PCR	24
3.2.4.4	Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)	25
3.2.5	DNA-Sequenzierung.....	25
3.3	Gewinnung des Probenmaterials	25
3.3.1	Gewinnung von Probenmaterial aus Schafkallusgewebe	25
3.3.2	Präparation von embryonalen Oberarmknochen der Maus	26
3.3.3	Präparation von Geweben aus Lanzettfischchen und Schleimaalen.....	26
3.4	Histologie	26
3.4.1	Entwässerung und Paraffineinbettung von Gewebe	26
3.4.2	Kryo-Einbettung von Gewebe	27
3.4.3	Anfertigung von Gewebeschnitten	28
3.4.3.1	Anfertigung von Paraffinschnitten	28
3.4.3.2	Anfertigung von Gefrierschnitten.....	28
3.5	In situ-Hybridisierung	29
3.5.1	Herstellung von Templates zur Sondentranskription	29
3.5.2	In situ-Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden.....	29
3.5.3	in situ-Hybridisierung mit dem Tecan Genesis Robotersystem	31
3.6	Konstruktion und Analyse von cDNA-Banken.....	31
3.6.1	Konstruktion von cDNA-Banken	31
3.6.2	Automatisiertes Picken von Bakterienkolonien.....	31
3.6.3	Präparation von Templates zur Sequenzierung von cDNA-Bank-Klonen durch Hochdurchsatz -PCRs	32
3.6.4	Gewinnung von Templates zur Sequenzierung von cDNA-Bank-Klonen durch Plasmid-Micropräps im 384-well-Format	32
3.6.5	Clustering und bioinformatische Auswertung der EST-Sequenzen	33
3.7	Zellkultur.....	33
3.7.1	Hühnchen-Micromasskulturen	33
3.7.2	Kulturen von Hühnerosteoblasten aus Knochenmark	33
3.8	Statistische Methoden	34
3.9	Hybridisierung der Microarrays und Analyse der Primärdaten	34
3.10	Analyse der Promotorbereiche potentieller <i>Runx2</i> -Zielgene	34
3.11	Phylogenetische Analyse der <i>Runt</i> -Genfamilie.....	35

4 Ergebnisse

36

4.1	Konstruktion und Analyse von cDNA-Banken aus heilendem Knochen des Schafs (<i>Ovis aries</i>).....	36
4.1.1	Generierung der ESTs, Erzeugung der Contigs und einer Schaf- Sequenzdatenbank	36

4.1.2	BLAST-Analyse der <i>Ovis aries</i> -Contigs zur Zuordnung wahrscheinlicher Identitäten	38
4.1.3	Gene Ontology (GO)-Analyse der Schafkallus-cDNA-Banken.....	39
4.1.4	Vergleich der neuen cDNA-Banken mit cDNA-Banken aus intaktem humanem Knochen	40
4.1.5	Expressionsanalysen von Kandidatengenen mit differentieller Expression im Heilungsverlauf.....	43
4.2	Genexpressionsanalyse im <i>Runx2</i> -Mausmodell.....	47
4.2.1	Hybridisierung von Affymetrix GeneChips und Bestätigung durch quantitative RT-PCR	47
4.2.2	Funktionelle Einordnung der Kandidatengene	50
4.2.3	Gene Ontology (GO)-Analyse der Kandidatengene.....	54
4.2.4	Bestimmung des Expressionsmusters der Kandidatengene.....	55
4.2.5	Untersuchung der Promotorregionen der Kandidatengene.....	58
4.2.6	Untersuchung der Regulation möglicher direkter Zielgene durch <i>Runx2</i>	59
4.3	Untersuchungen zur Evolution der <i>Runt</i> -Genfamilie.....	61
4.3.1	Klonierung der <i>Runt</i> -homologen Gene des Kleingefleckten Katzenhais <i>Scyliorhinus canicula</i>	61
4.3.2	Phylogenie der <i>Runt</i> -homologen Gene der Chordata	63
4.3.3	Vergleich der Exon/Intron-Struktur einiger <i>Runt</i> -Gene	64
4.3.4	Bestimmung des Expressionsmusters der <i>Runt</i> -Gene von <i>S. canicula</i>	64
4.3.5	Quantitative Bestimmung der <i>Runt</i> -Expressionsstärke in verschiedenen Geweben des Katzenhais	67
4.3.6	Bestimmung der Expressionstärke der <i>Runt</i> -Gene des Schleimaals und von <i>Runt</i> und <i>Sox9</i> des Lanzettfischchens.....	68

5 Diskussion

70

5.1	Konstruktion von cDNA-Banken aus Frakturkallusgewebe des Schafs.....	70
5.1.1	Gene mit differentieller Expression während der Frakturheilung	71
5.1.2	Ribosomale Gene.....	72
5.1.3	Proteine der extrazellulären Matrix	72
5.1.4	Gene mit Funktion in der Angiogenese	73
5.1.5	Gene mit Funktionen bei Resorption, Umbau und Entzündung.....	74
5.1.6	Gene mit Funktionen in der Kontrolle freier Radikale	75
5.1.7	Transkription und Signaltransduktion	75
5.2	Expressionsprofile der <i>Runx2</i> -Microarray-Experimente.....	76
5.2.1	Korrelation der Chiphybridisierungen mit den Ergebnissen der qRT-PCR	77
5.2.2	Identifizierung von Genen mit bisher unbekannter Funktion in der Skeletogenese	78
5.2.3	Gene Ontology-Analyse und Funktion der Kandidatengene.....	79
5.2.4	Signifikanz der Ergebnisse für das <i>Runx2</i> -Signalnetzwerk.....	79
5.2.5	Überschneidungen mit den Kandidaten der Frakturheilungs-cDNA-Banken .	80
5.3	Die Evolution der <i>Runt</i> -Genfamilie	80

5.3.1	Duplikationsereignisse in der Evolution der Chordaten- <i>Runt</i> -Gene	81
5.3.2	Der gesamte <i>Runt</i> -Locus wurde einschließlich eines stromabwärts liegenden <i>Clic</i> -Gens tripliziert	82
5.3.3	Bedeutung der <i>Runt</i> -Exon/Intron-Struktur für die Phylogenie der Chordata..	83
5.3.4	Die <i>Runt</i> -Expression in konservierten und neu entstandenen Merkmalen.....	84
5.3.4.1	Das Notochord ist eine apomorphe <i>Runt</i> -Expressionsdomäne in Chordaten..	85
5.3.4.2	Der Darm ist eine plesiomorphe <i>Runt</i> -Expressionsdomäne bei Chordaten.....	85
5.3.4.3	Alle drei <i>Runt</i> -Gene sind an der Entwicklung der Placoidschuppen und Zähne beteiligt	86
5.3.4.4	<i>Runt</i> -Gene in der Evolution von Knorpel und Knochen	87
5.4	Fazit und Ausblick	88
6 Zusammenfassung		90
7 Summary		92
8 Literaturverzeichnis		93
9 Verzeichnisse		110
9.1	Verzeichnis der Gensymbole und -namen	110
9.2	Abkürzungsverzeichnis	112
9.3	Abbildungsverzeichnis	113
9.4	Tabellenverzeichnis.....	114
10 Anhang		115
10.1	Publikationsverzeichnis.....	115
10.2	Selbständigkeitserklärung	116