

1 Einleitung

1.1 Das Skelett

Das Skelett der Wirbeltiere hat nicht nur eine essentielle Funktion als Widerlager für die Kraft der Muskulatur, es bietet auch Stabilität und Schutz für die inneren Organe und das Knochenmark. Seine Entwicklung und Aufrechterhaltung ist ein komplizierter Vorgang, bei dem eine Vielzahl von Genen und Signalwegen direkt oder indirekt beteiligt sind. Ein Verständnis dieser Vorgänge ist vor allem vor dem Hintergrund einer zunehmend älter werdenden Bevölkerung wichtig, um den damit häufiger auftretenden Erkrankungen des Skeletts, wie zum Beispiel Osteoporose, besser begegnen oder vorbeugen zu können. Auch Frakturen treten mit zunehmendem Alter häufiger auf und sind schlechter behandelbar.

Da Frakturen und Krankheiten des Skeletts schon immer ein wichtiges Problem darstellten, erforschen Wissenschaftler bereits seit Jahrhunderten das menschliche Skelett. So hat zum Beispiel auch Leonardo daVinci, wie die Zeichnung in Abbildung 1.1 zeigt, umfangreiche anatomische Untersuchungen durchgeführt. Ebenso erfolgten schon vor Jahrhunderten bei vielen Völkern erfolgreich Schädeltrepanationen (Weber, J. und Czarnetzki, A., 2001; Carod-Artal, FJ und Vazquez-Cabrera, CB, 2004). Dennoch ist es bis heute meist nicht möglich, bei

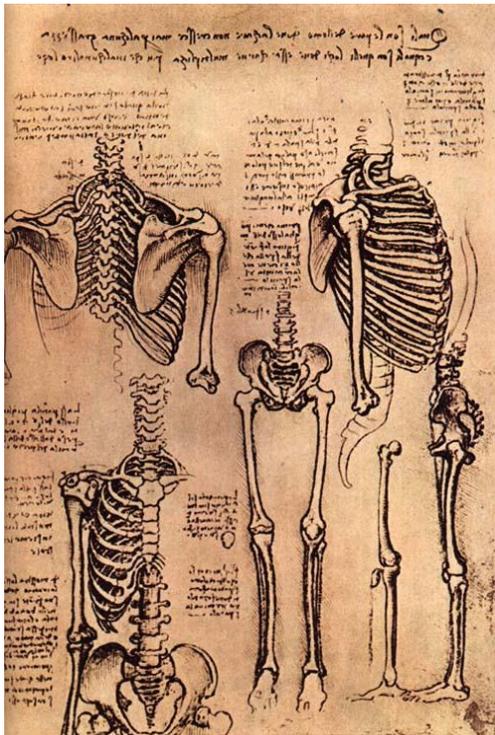


Abb. 1.1: Studie des Skelettsystems
von Leonardo daVinci, um 1510

Erkrankungen der Knochen wirksam und spezifisch die Ursachen zu behandeln. Auch die Versorgung von Frakturen ist häufig schwierig, wenn die endogene Heilung durch die Komplexität des Bruches oder durch begleitende Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, unvollständig verläuft. Weiterhin haben eine Reihe von Medikamenten, wie etwa das als Immunsuppressivum nach Transplantationen eingesetzte Cyclosporin A, Nebenwirkungen auf das Skelett. Daher bedarf es weiterer intensiver Forschung, um die Mechanismen der Knochenentwicklung sowie Homöostase aufzuklären und so gezielt in diese Prozesse eingreifen zu können.

1.2 Die Knochenentwicklung

Bei der Entwicklung des Knochens gibt es zwei wesentliche Prozesse, die endochondrale und die desmale Ossifikation.

Wie Abbildung 1.2 darstellt, formt sich im Laufe der endochondralen Ossifikation zunächst eine Kondensation aus mesenchymalen Vorläuferzellen (Abb. 1.2 a), die zu Chondrozyten differenzieren. Die Zellen, die die Kondensation umgeben, bilden die Knorpelhaut, auch Perichondrium genannt (Abb. 1.2 b). Dieses hat eine wichtige Funktion bei der Regulation des Wachstums und der Differenzierung des Knorpels (Alvarez et al., 2001). Zunächst proliferieren die Chondrozyten und ermöglichen so das Längenwachstum des Skelettelements.

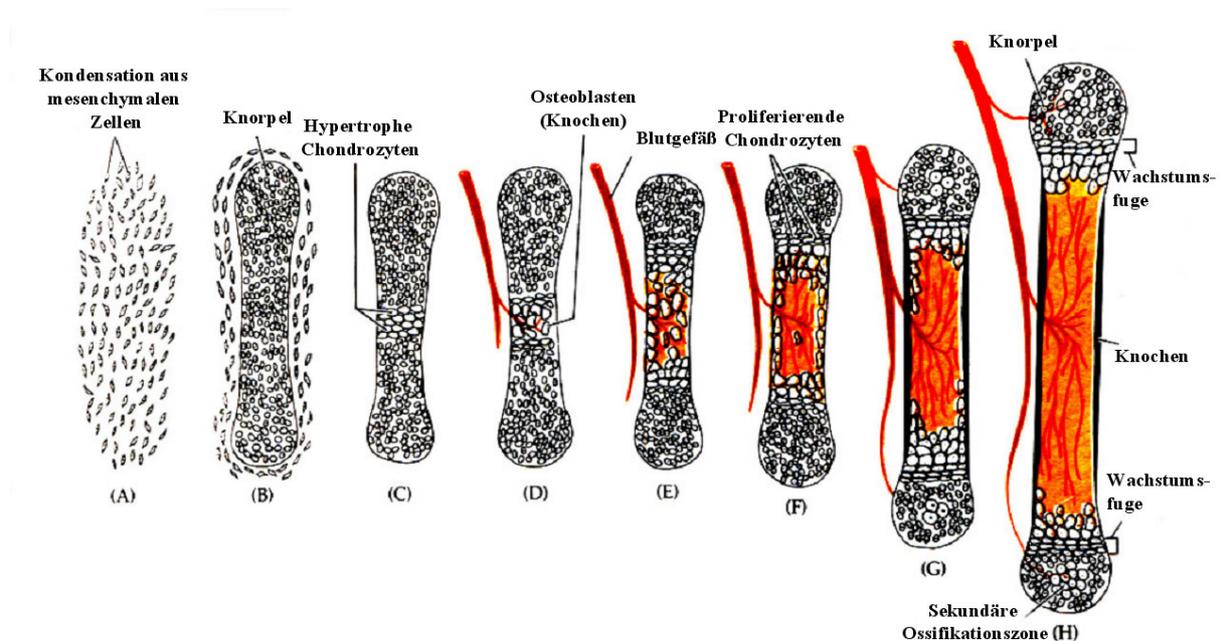


Abb. 1.2: Schematischer Ablauf der endochondralen Ossifikation.

- (A) Kondensation mesenchymaler Vorläuferzellen
- (B) Differenzierung dieser Zellen zu Chondrozyten und Ausbildung des Perichondriums
- (C) Chondrozyten in der Diaphyse werden hypertroph
- (D) Apoptose der terminal hypertrophen Chondrozyten und Invasion von Blutgefäßen, Osteoklasten und Osteoblasten in den Knorpel
- (E) Abbau der Knorpelmatrix durch Osteoklasten und Aufbau von trabekulärem Knochen
- (F),(G) Abbau des trabekulären Knochens, Aufbau des korticalen Knochens, Schaffung der späteren Knochenmarkshöhle
- (H) Einwanderung hämatopoetischer Zellen in die Knochenmarkshöhle, Bildung sekundärer Ossifikationszonen in den Epiphysen

(verändert nach Gilbert, 1994)

Während der weiteren Differenzierung stellen die Chondrozyten in der Mitte des Skelettelements die Proliferation ein und werden hypertroph (Abb. 1.2 c). Dabei nehmen sie um ein Vielfaches an Größe und Volumen zu und sterben schließlich durch Apoptose ab. Gleichzeitig dringen Osteoklasten in den Bereich der terminal hypertrophen Chondrozyten ein und bauen die Knorpelmatrix ab. Es wachsen Blutgefäße ein, durch die Osteoblasten einwandern (Abb. 1.2 d, e). Diese bauen statt der Knorpelmatrix trabekulären Knochen auf (Abb. 1.2 f, g). Das Perichondrium, das die Ossifikationszone umgibt, wird zum Periosteum, der Knochenhaut. Sie ist aus zwei Schichten aufgebaut, dem Stratum osteogenicum als innerer Schicht, welches aus Osteoblasten und ihren Vorläuferzellen besteht und dem äußeren Stratum fibrosum, einer faserigen Schicht, die für die Verbindung des Knochens zu Sehnen und Muskulatur wichtig ist. Die Ossifikation beginnt in der Mitte im Bereich der Diaphyse und setzt sich zu den Enden des Skelettelements hin fort. Hierdurch entstehen zwei Wachstumsfugen, die bis zum Abschluß des Knochenwachstums erhalten bleiben. Im weiteren Verlauf bilden sich auch an den Enden der Knochen, den Epiphysen, sekundäre Ossifikationszentren (Abb 1.2 h).

Bei der desmalen Ossifikation differenzieren sich mesenchymale Vorläuferzellen direkt zu Osteoblasten, welche die Knochenmatrix ablagern. Durch desmale Ossifikation werden die meisten Schädelknochen, sowie Teile des Schlüsselbeins gebildet.

1.3 Die Heilung einer Knochenfraktur

Morphologisch ähnelt die Heilung einer Fraktur deutlich den Schritten, die bei der embryonalen Entwicklung des Knochens stattfinden. Es laufen auch hier Prozesse ab, die mit der endochondralen bzw. der desmalen Ossifikation vergleichbar sind (Gerstenfeld und Einhorn, 2003; Vortkamp et al., 1998). Nach dem Bruch des Knochens wandern aus dem Periost, dem Knochenmarksraum und dem umliegenden Gewebe Zellen zum Ort der Fraktur. Durch Proliferation dieser Zellen wird ein Kallus aufgebaut, der eine stabilisierende Manschette um den Frakturspalt bildet. Ein Teil der Zellen differenziert direkt in Osteoblasten und bildet neuen Knochen (desmale Ossifikation) ein anderer Teil bildet knorpelige Anteile des Kallus, die später durch Knochen ersetzt werden (endochondrale Ossifikation). Die Anteile der beiden Prozesse an der Heilung werden stark durch mechanische Faktoren bestimmt. Erfolgt wenig Bewegung im Frakturspalt und ist die Spaltbreite nicht zu groß, so erfolgt die Heilung überwiegend durch desmale Ossifikation. Bei höherer Beweglichkeit des Spalts oder großer Spaltbreite bildet sich hingegen ein überwiegend knorpeliger Kallus und

die Heilung verläuft eher über den Weg der endochondralen Ossifikation (Schell et al., 2005; Epari et al., 2006). Durch intensive Umbautätigkeit der Osteoklasten und Osteoblasten wird der Kallus im Verlauf der Heilung wieder rückgebildet. Im Gegensatz zur Heilung anderer Verletzungen, die meist durch die Bildung von Narbengewebe erfolgt, ist die Frakturheilung eine echte Regeneration, bei der die ursprüngliche Form und Funktion des Knochens wiederhergestellt wird. Abbildung 1.3 stellt verschiedene Stadien der Kallusbildung dar.

Allerdings gibt es auch Unterschiede zwischen der Knochenheilung und der ursprünglichen Knochenentwicklung. So ist die erste Phase nach der Fraktur durch eine intensive Entzündungsreaktion gekennzeichnet, die während der embryonalen Skeletogenese nicht vorhanden ist.

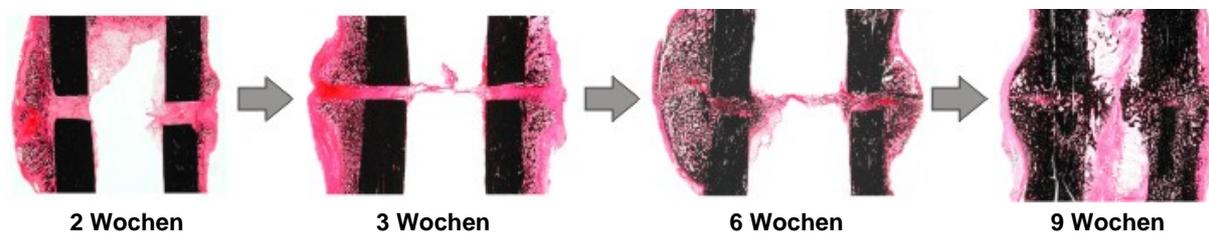


Abb. 1.3 : Kallusentwicklung während der Osteotomieheilung im Schafmodell.

Während der Knochenheilung nimmt der Kallusdurchmesser zunächst zu (2 Wochen ► 6 Wochen), später wird durch Umbauvorgänge der Kallusdurchmesser wieder verringert (6 Wochen ► 9 Wochen).

Bilder mit freundlicher Genehmigung von Prof. Georg Duda, Charité - Universitätsmedizin Berlin.

1.4 An der Skeletogenese sind zahlreiche Gene beteiligt

Die Regulation der Knochenentwicklung ist ein komplexer Vorgang, an dem zahlreiche verschiedene Gene beteiligt sind und ein genau aufeinander abgestimmtes funktionelles Netz bilden. Die Vielzahl der an der Skelettentwicklung beteiligten Gene wird vor allem dadurch ersichtlich, daß Mutationen in den betreffenden Genen zu teils schweren Fehlbildungen des Skeletts führen. Einen Überblick über genetische Ursachen vieler Skelettfehlbildungen gibt der Artikel von Kornak und Mundlos (2003).

Im frühen Stadium der Musterbildung, bei der vor allem die Anzahl der Knorpel-elemente festgelegt wird, sind Gene wie zum Beispiel *Sonic hedgehog (Shh)*, Mitglieder der *Homöobox (Hox)*-Genfamilie oder auch *Fibroblast growth factors (Fgfs)* und ihre Rezeptoren beteiligt. Andere Gene beeinflussen vorwiegend den Differenzierungs- und Reifungsprozeß der Chondrozyten; hierzu gehören unter vielen anderen *Indian hedgehog (Ihh)* und wiederum *Fgfs* mit den zugehörigen Rezeptoren. Abbildung 1.4 zeigt schematisch den Verlauf der Chondrozytendifferenzierung, sowie einige charakteristische Markergene der verschiedenen

Differenzierungsstadien. Auch die durch *Ihh* und das Parathyroid hormone related peptide (*Pthrp*) gebildete wichtige Rückkopplungsschleife ist dargestellt. Zusammen mit *Fgfs* und Bone morphogenetic proteins (*BMPs*) reguliert sie die Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten. Hierbei und insbesondere auch bei der Differenzierung der Osteoblasten übernehmen zudem die Mitglieder der *Runt*-Genfamilie teils essentielle Funktionen.

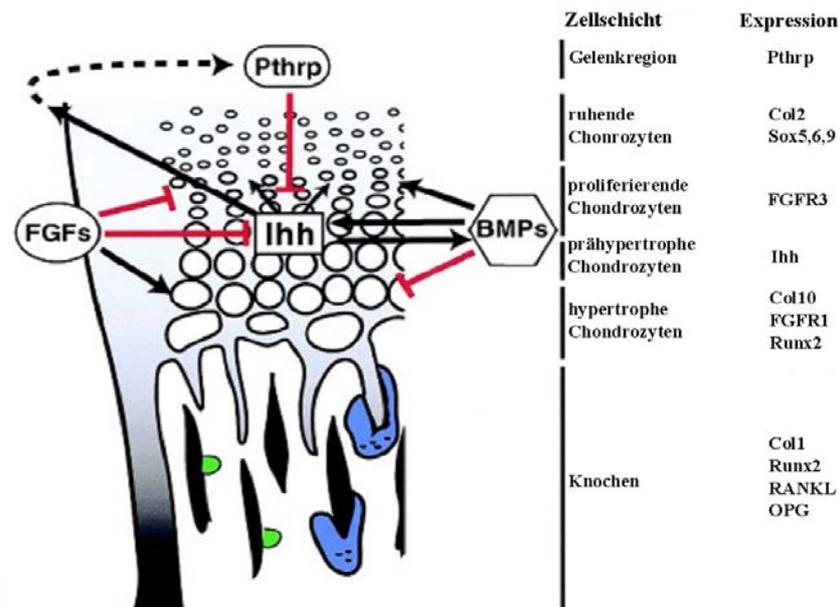


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Chondrozytendifferenzierung in der Wachstumsfuge.

Die Chondrozyten sind entsprechend ihrer Differenzierungsstadien in vier Schichten angeordnet. Die erste Zone wird von ruhenden Chondrozyten gebildet, die zweite von den proliferierenden und die dritte von den prähypertrophen Chondrozyten. Die vierte Zone bilden die hypertrophen und terminal hypertrophen Chondrozyten, die durch die gemeinsame Wirkung von Osteoblasten (grün) und mehrkernigen Osteoklasten (blau) durch Knochen ersetzt werden. Charakteristische Markergene der einzelnen Zonen sind im rechten Teil der Abbildung angegeben. Die Differenzierung der Chondrozyten wird von einer komplexen Signalkaskade reguliert. Prähypertrophe Chondrozyten exprimieren *Ihh*, welches über das Perichondrium die Expression von *Pthrp* in der Gelenkregion reguliert. *Pthrp* wiederum inhibiert die Differenzierung proliferierender Chondrozyten. *Fgfs* inhibieren die Proliferation der Chondrozyten und stimulieren deren Differenzierung, wogegen *Bmps* als Antagonisten wirken. Die Intensität der grauen Schattierung gibt den Grad der Kalzifizierung der extrazellulären Matrix wieder.

Abkürzungen: **BMPs:** Bone Morphogenetic Proteins; **Col:** Collagen; **FGFs:** Fibroblast Growth Factors; **FGFR:** Fibroblast Growth Factor Receptor; **Ihh:** Indian Hedgehog; **OPG:** Osteoprotegerin; **Pthrp:** Parathyroid hormone related peptide; **RANKL:** Receptor activator of nuclear factor-kappaB Ligand; **Runx:** Runt related transcription factor; **Sox:** SRY-box containing gene

(verändert nach Kornak und Mundlos, 2003)

1.5 *Runt*-Gene als wichtige Faktoren für die Knochenentwicklung

Bei den Mammalia sind drei *Runt*-homologe Gene, *Runx1* - 3, bekannt. Sie kodieren Transkriptionsfaktoren, die durch ihre hochkonservierte DNA-bindende Domäne, die Runt-

Domäne, charakterisiert sind. Diese ist nach dem ersten Mitglied der Genfamilie benannt, dem pair-rule-Gen *Runt* aus *Drosophila melanogaster* (Gergen und Butler, 1988).

Abbildung 1.5 zeigt schematisch die Funktionen der drei Runt-Gene bei Mensch und Maus. Jedes Gen hat spezifische aber auch mit den anderen Genen überlappende Funktionen.

Für das 1991 im Zusammenhang mit Akuter Myeloischer Leukämie identifizierte *Runx1* (Miyoshi et al., 1991) wurde erst kürzlich die Funktion in Osteoklasten beschrieben (Saltman et al., 2005). Für *Runx3* ist hingegen schon länger eine Funktion im Skelett bei der Differenzierung der Chondrozyten bekannt, wo es auch an der Regulation von *Ihh* beteiligt ist (Stricker et al., 2002; Yoshida et al., 2004).

Für die Skeletogenese ist jedoch besonders *Runx2* essentiell, das die Expression vieler für die Skeletogenese wichtiger Gene reguliert. Heterozygote Mutationen von *Runx2* führen beim Menschen zu Cleidocranialer Dysplasie (Mundlos et al., 1997) einer Fehlbildung, die durch Kleinwuchs, verspäteten Fontanellenschluß und Hypo- bzw. Aplasie der Schlüsselbeine gekennzeichnet ist. Mäuse mit nur einer defekten Kopie des *Runx2*-Gens stellen ein Tiermodell für diese Erkrankung dar. Sind hingegen beide Kopien des Gens inaktiviert, wird das Skelett zwar weitgehend normal angelegt, jedoch wird es niemals durch Knochen ersetzt, da die Differenzierung von Osteoblasten blockiert ist. Abbildung 1.6 zeigt den Skelettphänotyp der *Runx2*-Knockout-Maus. Daneben können auch Osteoklasten nicht gebildet werden, da die Entwicklung von Osteoblasten hierfür eine Voraussetzung ist (Otto et al., 1997). Bei der Differenzierung des Knorpels treten ebenfalls Störungen auf, die verhindern, daß die Chondrozyten hypertrophieren (Stricker et al., 2002).

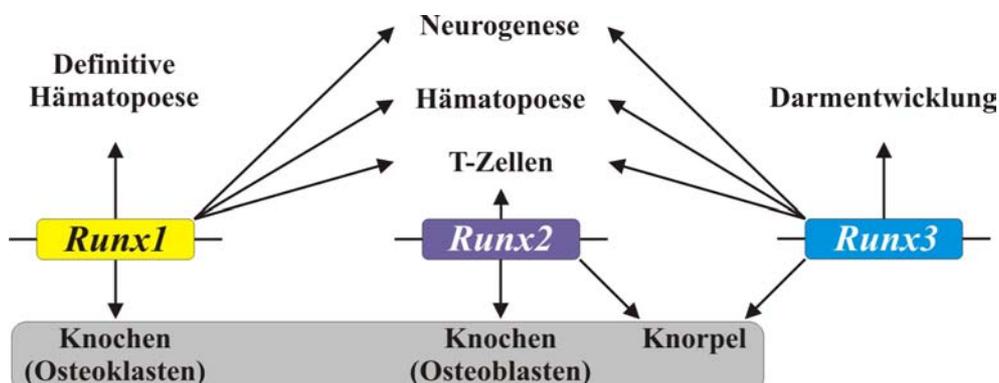


Abb. 1.5: Schema der Funktionen der *Runx*-Gene bei Mensch und Maus.

Alle drei Runt-Gene haben eine Funktion im Skelett. In anderen Geweben besitzen sie teils spezifische, teils überlappende Funktionen.

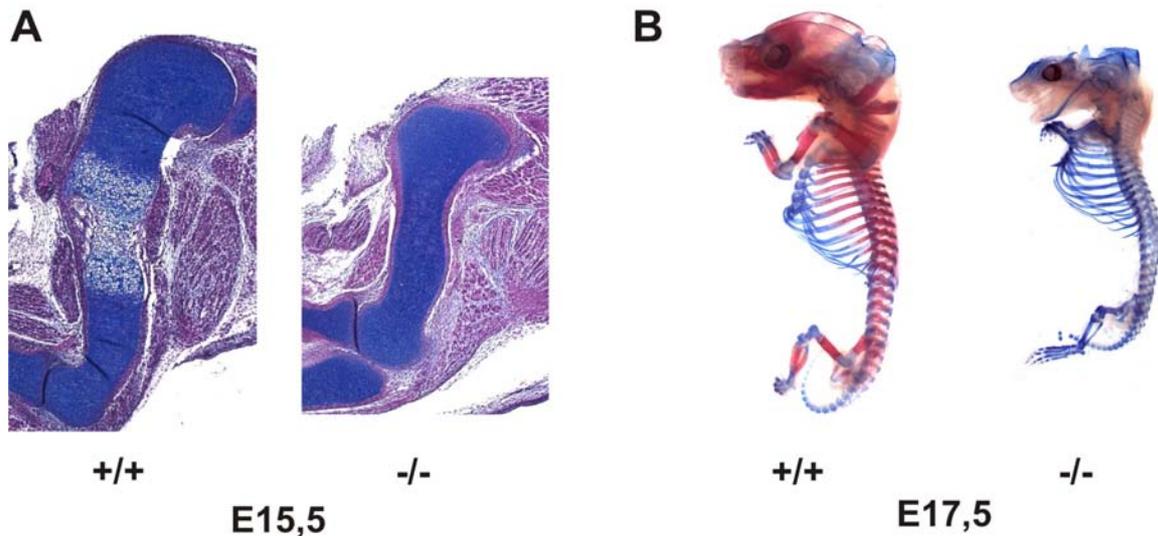


Abb. 1.6: Skelettphänotyp der *Runx2*-Knockout-Maus.

A: Schnitte von *Runx2*-Wildtyp- und Knockout-Humeri des Stadiums E15,5. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin sowie Alcianblau gefärbt. Im Wildtyp sind deutlich die beiden Bereiche des hypertrophen Knorpels zu erkennen, die von der Ossifikationszone getrennt werden. Im Knockout ist zu diesem Zeitpunkt kein hypertropher Knorpel vorhanden und der Humerus ist deutlich kleiner als der des Wildtyps.

B: Mit Alizarin-Rot und Alcianblau gefärbte Skelettpräparationen 17,5 Tage alter *Runx2*-Wildtyp- und Knockout-Embryonen. Nur im Wildtyp findet man Knochen, der durch Alizarinrot rot gefärbt wird. Dieser fehlt im Knockout völlig. Das Skelett besteht nur aus Knorpel, der durch Alcianblau gefärbt ist. Zudem ist der homozygot *Runx2*-defiziente Embryo deutlich kleiner.

1.6 *Runx2* ist in ein komplexes Regulationsnetz eingebunden

Runx2 spielt eine zentrale Rolle im Signalnetzwerk, das die Differenzierung von Chondrozyten und Osteoblasten reguliert. Ein vereinfachtes Schema dieses Netzwerks ist in Abbildung 1.7 gezeigt. Zuerst findet man die Expression von *Runx2* in den mesenchymalen Kondensationen und später in hypertrophen Chondrozyten, Präosteoblasten, Osteoblasten und Osteozyten. Bisher wurde die Interaktion von verschiedenen anderen Faktoren mit *Runx2* beschrieben, allen voran mit *Cbfb*, das für die Bindung von *Runx2* an die DNA wichtig ist (Yoshida et al., 2002). Die Aktivität von *Runx2* wird über den cAMP/PKA-Signalweg durch *Pth/Pthrp* sowie durch Bone morphogenetic proteins (BMPs) über den TGF β -Rezeptor/SMAD-Signalweg verstärkt (Selvamurugan et al., 2000; Tintut et al., 1999; Chang et al., 1998).

In den meisten Fällen ist *Runx2* ein positiver Regulator von Genen, die für die Knochenentwicklung notwendig sind. Zum Beispiel wirkt es aktivierend auf die Expression von *Osteocalcin*, *Matrix-Metalloproteinase 13 (MMP13)*, *Osteopontin*, *Kollagen I* und *X*. Es ist zugleich ein wichtiger Regulator von *Indian Hedgehog (Ihh)*, einem Schlüsselgen der Knorpelentwicklung (Schinke und Karsenty, 1999; Uchida et al., 2001; D'Alonzo et al., 2002;

Sato et al., 1998; Zheng et al., 2003; Yoshida et al., 2004). Die Expression von *Integrin binding sialoprotein (Ibsp)* hingegen wird durch Runx2 reprimiert (Javed et al., 2001). Außerdem gibt es eine Autoregulation von Runx2, die sowohl positiv, als auch negativ sein kann (Ducy et al., 1999; Drissi et al., 2000).

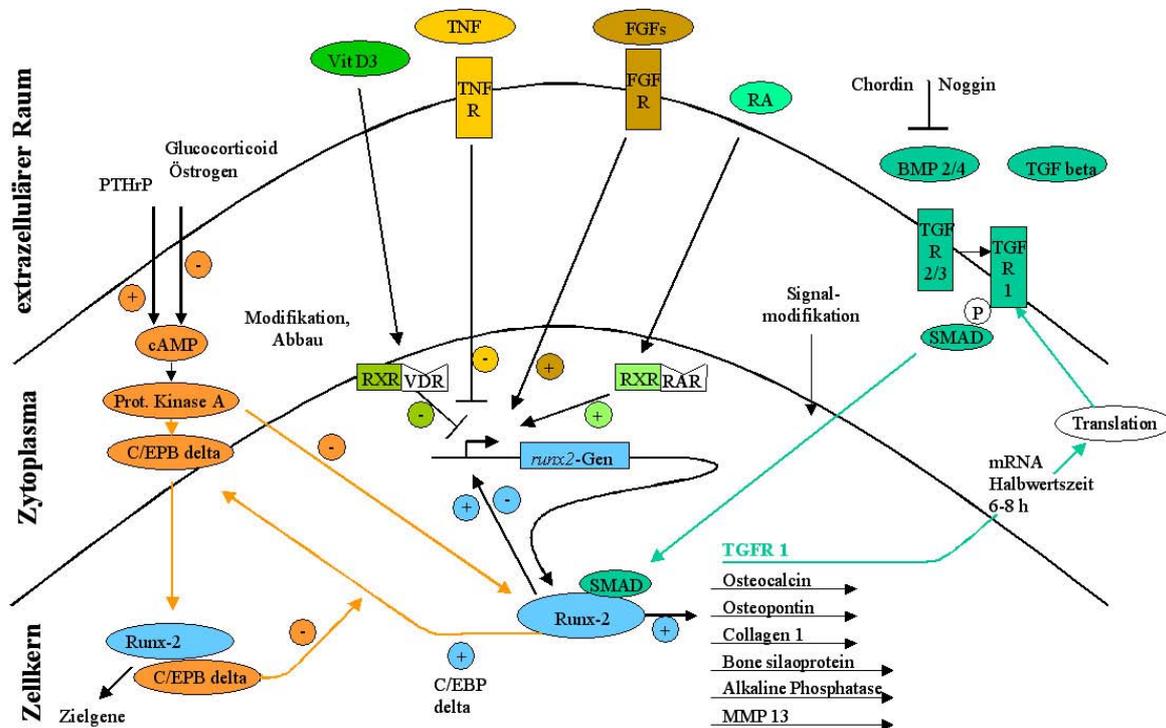


Abb. 1.7: Vereinfachtes Schema des Runx2-Regulationsnetzwerks.

Positive Regulation von Runx2 durch BMPs, FGFs, Runx2, TGFs, Retinsäure; negative Regulation von Runx2 durch $TNF\alpha$, Vit D₃ und Runx2. Runx2 reguliert verschiedene Zielgene, z.B. *Osteocalcin*, *Collagen 1* und *Bone sialoprotein*. Eine regulatorische Schleife wird durch die Regulation der *TGFR1*-Expression und den Einfluß des TGF-Signalwegs auf Runx2 gebildet (rechte Seite in grün). Eine weitere Rückkopplungsschleife entsteht durch die positive Regulation von cEBP/delta durch Runx2 (linke Seite in orange).

1.7 Die Familie der *Runt*-Gene aus evolutionsbiologischer Sicht

Die herausragende Bedeutung der *Runt*-Genfamilie für die Entwicklung verschiedener Merkmale, die während der Vertebratenevolution neu entstanden sind, wie z. B. das Skelett, macht diese Familie aus evolutionsbiologischer Sicht interessant. Es stellt sich die Frage, ob möglicherweise Duplikationsereignisse eines Vorläufergens und die Entstehung neuer Merkmale zusammenhängen.

In den Abbildungen 1.8 und 1.9 sind mit der Seescheide, dem Lanzettfischen, Schleimaal und Katzenhai vier Vertreter von Taxa dargestellt, die für die Rekonstruktion der Chordatenevolution wichtig sind, da sie in verschiedenem Maße ursprüngliche Merkmale

aufweisen. Abbildung 1.10 zeigt schematisch die Evolution der *Runt*-Genfamilie zusammen mit einigen Apomorphien, die die jeweiligen monophyletischen Gruppen begründen. Aus Genomprojekten und anderen Arbeiten ist bekannt, daß bei der Stammart der Chordata vermutlich nur ein *Runt*-homologes Gen vorhanden war, da man sowohl bei Fadenwürmern, als auch bei den Tunicata und Acrania nur ein *Runt*-Gen findet (Stricker et al., 2003). Dagegen findet man bei den Cyclostomata, die die Schwestergruppe aller anderen Vertebraten darstellen, bereits zwei dieser Gene (Wiecha, 2003). Die Tetrapoda, zu denen auch die Säugetiere gehören, besitzen drei *Runt*-Gene und beim Zebrafisch wurden vier *Runt*-Gene beschrieben. Jedoch ist das vierte *Runt*-Gen des Zebrafischs ein unabhängig dupliziertes *Runx2* (van der Meulen et al., 2005). Zu den Knorpelfischen (Chondrichtyes) fehlen genaue Daten zu Anzahl und Sequenz der *Runt*-homologen Gene. Es wurden lediglich partielle Sequenzen von *Runx2* und *Runx3* des Rochens *Raja eglanteria* veröffentlicht (Anderson et al., 2004), sodaß eine komplette Rekonstruktion der Phylogenie für diese Genfamilie innerhalb der Chordata zur Zeit nicht möglich ist.

Auch für andere repräsentative Spezies der Chordatenevolution fehlen noch wichtige Daten zur Expression *Runt*-homologer Gene. Für das Lanzettfischchen, das zu den Acrania gehört, gibt es nur Daten zur embryonalen *Runt*-Expression (Wiecha, 2003). Für den Schleimaal als Vertreter der Cyclostomata, sind dagegen bisher keine Daten zur *Runt*-Expression verfügbar. Um auf eine mögliche Rolle der *Runt*-Duplikationen bei der Entstehung neuer Merkmale innerhalb der Chordata schließen zu können, muß jedoch zuerst analysiert werden, ob zwischen den Zeitpunkten der Duplikationen und der Expression der *Runt*-Gene in den für die Merkmalsentstehung wichtigen Geweben überhaupt eine Korrelation besteht. Daher ist die Rekonstruktion der Duplikationsereignisse sowie die Kenntnis der *Runt*-Expressionsmuster aus den verschiedenen Spezies von besonderer Bedeutung.

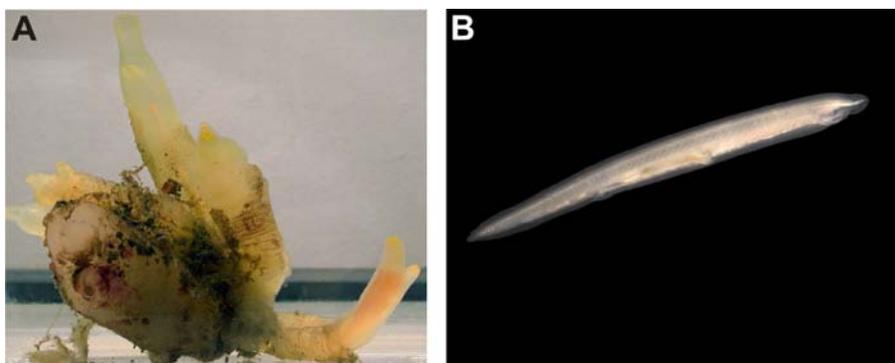


Abb. 1.8: Seescheide (*Ciona intestinalis*) (A) und Lanzettfischchen (*Branchiostoma lanceolatum*) (B). *C. intestinalis* gehört zu den Manteltieren (Tunicata) und wird 10-15 cm groß. *B. lanceolatum* ist ein Vertreter der Schädellosen (Acrania) und erreicht eine Länge von 4-7 cm.
Foto B von Hans Hillewaert publiziert unter der Creative Commons Attribution ShareAlike 2.5-Lizenz, Quelle: http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Branchiostoma_lanceolatum.png

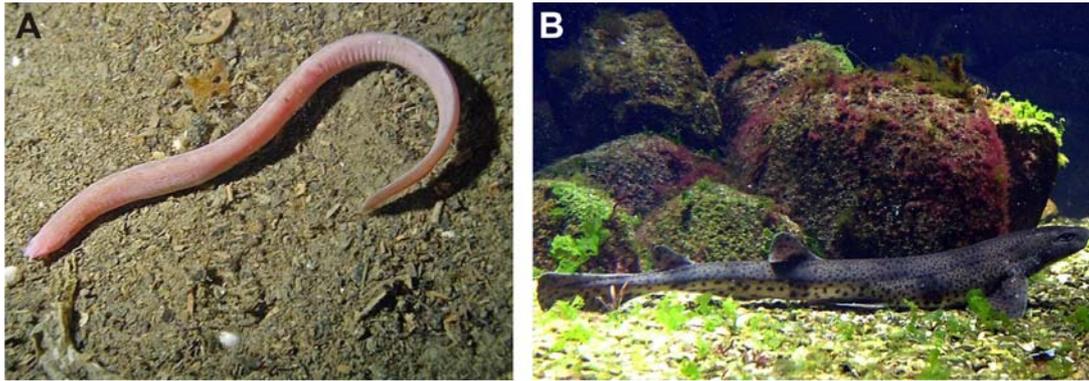


Abb. 1.9: Schleimaal (*Myxine glutinosa*) (A) und Kleingefleckter Katzenhai (*Scyliorhinus canicula*) (B). Der Schleimaal ist ein Vertreter der Rundmäuler (Cyclostomata), der eine Länge von 60-70 cm erreicht. Der Katzenhai gehört zu den Knorpelfischen (Chondrichthyes) und wird ebenfalls meist 60-70 cm groß. Foto A von <http://www.seawater.no> mit freundlicher Genehmigung von Kåre Telnes. Foto B von Thomas Ernst, publiziert unter der Creative Commons Attribution ShareAlike 2.5-Lizenz, Quelle: http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Kleingefleckter_Katzenhai.jpg

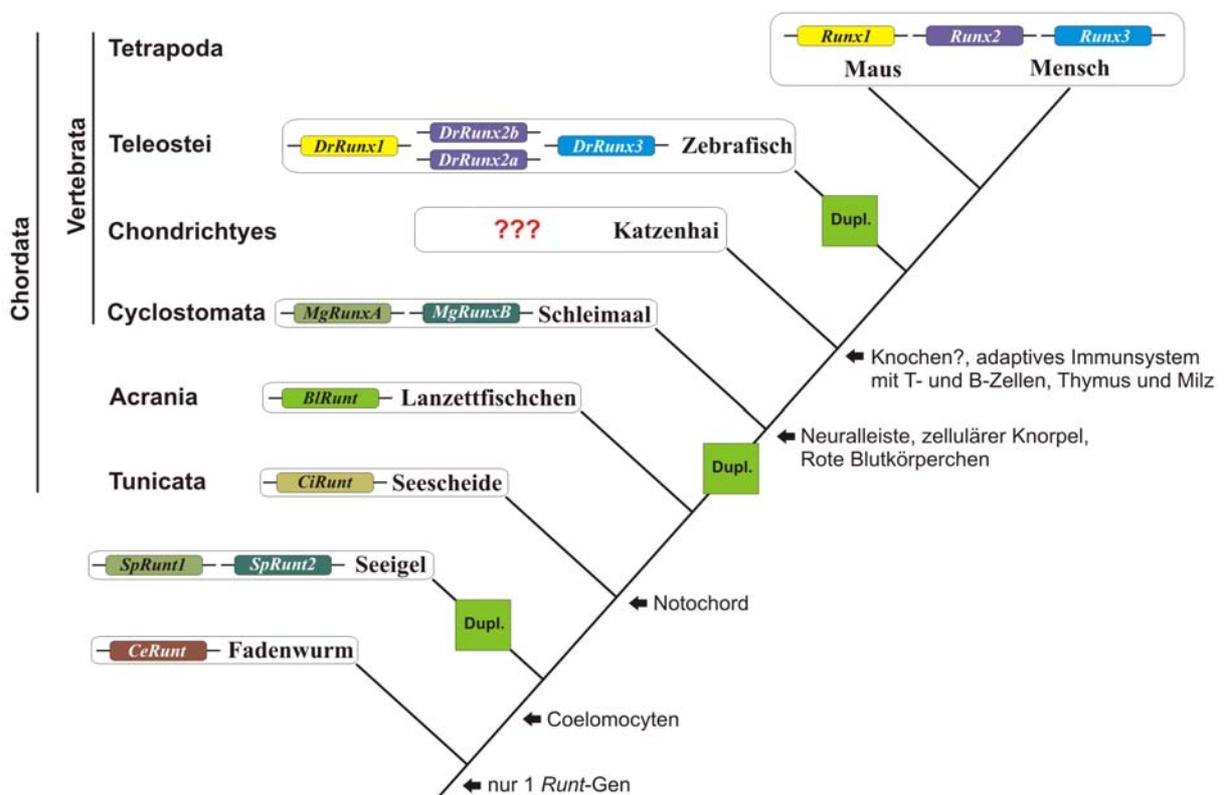


Abb. 1.10: Schematische Darstellung der *Runt*-Evolution.

Dargestellt sind die Anzahl der *Runt*-Gene pro Spezies und die vermuteten Zeitpunkte der *Runt*-Genduplikationen (Dupl.). Mit Pfeilen werden Apomorphien aufgeführt, die die jeweilige monophyletische Gruppe begründen, z.B. das Notochord als neu entstandenes Merkmal bei den Chordata. Der Zeitpunkt der Entstehung von Knochen ist unsicher, da die Stellung der fossilen Placodermi und Ostracodermi mit ihren Hautknochenplatten unklar ist und die Chondrichthyes den Knochen sekundär wieder reduziert haben könnten.

Abkürzungen: **Bl:** *Branchiostoma lanceolatum*; **Ce:** *Caenorhabditis elegans*; **Ci:** *Ciona intestinalis*; **Dr:** *Danio rerio*; **Mg:** *Myxine glutinosa*; **Sc:** *Scyliorhinus canicula*; **Sp:** *Strongylocentrotus purpuratus*.