

# **Funktionelle Charakterisierung von Neurofibromin in der Entwicklung des muskuloskelettalen Systems**

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

**Nadine Kossler**

aus Berlin

**Dezember 2010**



Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum März 2005 bis Dezember 2010 am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mundlos angefertigt.

**1. Gutachter:**

**Prof. Dr. Stefan Mundlos**  
Max-Planck-Institut für molekulare Genetik  
Ihnestrasse 63-73  
14195 Berlin  
Tel.: 030/ 84131449  
E-Mail: mundlos@molgen.mpg.de

**2. Gutachter:**

**Prof. Dr. Rupert Mutzel**  
Institut für Biologie  
Freie Universität Berlin  
Königin-Luise-Straße 12-16  
14195 Berlin  
Tel.: 030/ 83853116  
E-Mail: rmutzel@zedat.fu-berlin.de

Disputation am : 08.03.2011



## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt und keine anderen, als die hier angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere, dass ich diese Arbeit weder in dieser noch in einer anderen Form bei einer anderen Prüfungsbehörde eingereicht habe.

Berlin, den 16.12.2010

-----

Nadine Kossler



## **Danke!**

An erster Stelle möchte ich meinen Eltern danken! Ihr habt stets an mich geglaubt, mich in jederlei Hinsicht unterstützt und ermutigt auch in schwierigen Zeiten weiterzumachen! „Wenn das so einfach wäre, würde ja jeder seinen Doktor machen!“

Dann bedanke ich mich bei Prof. Dr. Stefan Mundlos für die Bereitstellung des interessanten Themas, die sehr guten Arbeitsbedingungen am MPI und das Interesse am Fortgang der Arbeit.

Besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Rupert Mutzel für die kurzfristige Übernahme des Korreferats.

Ein weiteres Dankeschön geht an meinem Betreuer Dr. Mateusz Kolanczyk für die professionelle Unterstützung.

Dr. Sigmar Stricker danke ich für die eine oder andere Hilfe beim Einstellen des Mikroskops sowie den Diskussionen und zahlreichen Hilfestellungen auf dem Gebiet der Muskelentwicklung.

„Prof.“ Jirko Kühnisch danke ich für zahlreiche nicht-triviale Diskussionen, für seine kritischen Worte, für methodische Unterstützung und nicht zuletzt fürs stetige Aufmuntern in schwierigen Situationen.

Ebenfalls Danke an Carola Dietrich, Monika Osswald und Norbert Brieske für die tatkräftige Unterstützung vor allem beim Genotypisieren, bei Western Blots und bei WM-ISH! In diesem Zusammenhang auch vielen Dank an Janine Wetzels und Katja Reinsch für die Mausearbeit.

Außerdem danke ich meinen „alten“ Doktorandenkollegen Pia Kuss, Florian Witte und Ulrich Wilkening für den Spaß im und außerhalb des Labors. Die letzten eineinhalb Jahre ohne euch waren langweilig! Ich bin froh, dass wir uns kennengelernt haben.

Natürlich möchte ich auch allen anderen MDL-Labormitgliedern für die gute Arbeitsatmosphäre und die gegenseitige Hilfsbereitschaft danken.

Besonders hervorheben möchte ich dabei Mareen Schmidt von Kegler, Annika Mahl, Nina Günther, Anja Brehm, Boris Thurisch, Till Scheuer, Jana König, Hendrikje Hein, Saniye Yumlu und Daniel Ibrahim.

Die größte Anerkennung gilt jedoch meinen beiden Männern Martin und Lennart. Ihr habt mir stets den Rücken frei gehalten und die Freiheit gelassen auch außerhalb von Labor und Familie ein soziales Leben zu führen. Unser Familienleben hat mich sooft den Laboralltag vergessen lassen. Danke für euer Verständnis, eure unerschöpfliche Geduld und vor allem Liebe. Ich bin froh, dass ihr da seid.

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Muskuloskelettales System der Vertebraten</b>	<b>1</b>
1.1.1	Knochen	1
	Knochenentwicklung	1
	Steuerung der endochondralen Ossifikation	3
1.1.2	Gelenke	5
	Aufbau synovialer Gelenke	5
	Gelenkbildung	6
1.1.3	Muskeln	8
	Aufbau der Skelettmuskeln	8
	Muskelentwicklung	8
<b>1.2</b>	<b>Neurofibromatose Typ 1</b>	<b>11</b>
1.2.1	Neurofibromatose Typ 1- humane Multiorganerkrankung	11
1.2.2	Pathogenese	12
1.2.3	Signaltransduktion über RAS/MAPK-Signalkaskade	13
1.2.4	Nf1 <sup>Prx1</sup> Mausmodell	15
<b>1.3</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Geräte</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>19</b>
<b>2.3</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>20</b>
<b>2.4</b>	<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>23</b>
<b>2.5</b>	<b>Molekularbiologische Reaktionssysteme/Kits</b>	<b>25</b>
<b>2.6</b>	<b>Enzyme</b>	<b>26</b>
<b>2.7</b>	<b>Primer</b>	<b>26</b>
<b>2.8</b>	<b>Längenstandards</b>	<b>28</b>
<b>2.9</b>	<b>Antikörper</b>	<b>28</b>
<b>2.10</b>	<b>Vektoren, Bakterienstämme und Nährmedien</b>	<b>29</b>
<b>2.11</b>	<b>Zelllinie und Medium</b>	<b>29</b>
<b>2.12</b>	<b>Tiere</b>	<b>30</b>
<b>2.13</b>	<b>Computerprogramme</b>	<b>30</b>

<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>31</b>
3.1.1	DNA-Isolierung	31
	Isolierung von Plasmid-DNA	31
	Isolierung von genomischer DNA	31
3.1.2	RNA-Isolierung	31
3.1.3	Herstellung von cDNA (Reverse Transkription)	32
3.1.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	32
	Genotypisierungs-PCR	32
	Amplifikation der Sondensequenz aus cDNA	34
	Kolonie-PCR	34
3.1.5	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten und DNA-Gelextraktion	35
	GelOut Kit	35
	Prinzip „Freeze and Queueze“	35
3.1.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	35
3.1.7	Klonierung von DNA-Fragmenten in bakterielle Vektoren	35
	Ligation	36
	Transformation	36
3.1.8	DNA-Sequenzierung	36
3.1.9	Herstellung von DIG-markierten Sonden	37
3.1.10	<i>In situ</i> Hybridisierung auf Paraffinschnitten (ISH)	38
3.1.11	Whole Mount <i>in situ</i> Hybridisierung (WM-ISH)	39
3.1.12	Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)	40
<b>3.2</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>40</b>
3.2.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	40
3.2.2	SDS-PAGE nach Laemmli	40
	SDS-Polyacrylamid-Gel	41
	Vorbereitung der Proteinproben	41
	Gelelektrophorese	41
3.2.3	Western Blot	41
	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran	41
	Detektion der Proteine mittels Antikörper	42
	Visualisierung der Proteine	42
	Wiederholter Gebrauch einer Membran	42
<b>3.3</b>	<b>Histologische Methoden</b>	<b>42</b>
3.3.1	Skelettpräparation	42
3.3.2	Paraffineinbettung und Schnitthanfertigung	43

3.3.3	Plastikeinbettung und Schnitthanfertigung _____	43
3.3.4	Kryoeinbettung und Gefrierschnitthanfertigung _____	44
3.3.5	Alzian Blau/Hämatoxylin Eosin-Färbung _____	44
3.3.6	Masson Goldner-Färbung _____	45
3.3.7	Toluidinblau-Färbung _____	45
3.3.8	Azan-Färbung _____	46
3.3.9	Immunhistochemie _____	46
	Paraffinschnitte _____	46
	Gefrierschnitte _____	47
3.3.10	X-Gal-Färbung _____	47
	Embryonen _____	47
	Gefrierschnitte _____	47
<b>3.4</b>	<b>Zellkulturmethoden _____</b>	<b>48</b>
3.4.1	Isolation von Chondrozyten aus Knorpelgewebe _____	48
3.4.2	Aussähen der Chondrozyten für Proliferationsmessung _____	48
3.4.3	Immunzytologie _____	48
<b>3.5</b>	<b>Andere Methoden _____</b>	<b>49</b>
3.5.1	Micro CT-3D-Rekonstruktion ( $\mu$ CT) _____	49
3.5.2	Zugkraftmessung _____	49
<b>4</b>	<b>Ergebnisse _____</b>	<b>50</b>
<b>4.1</b>	<b>Etablierung eines konditionellen Knockout Systems von <i>Nf1</i> in frühen mesenchymalen Vorläuferzellen der Extremitäten _____</b>	<b>50</b>
4.1.1	Gewebespezifische Prx1-Cre Expression mittels Rosa26-Reportermäusen _____	50
4.1.2	Exzisionseffizienz der Prx1-Cre vermittelten Rekombination _____	52
<b>4.2</b>	<b>Inaktivierung von <i>Nf1</i> führt zur Wachstumsverzögerung der Skelettelemente und zu veränderter Wachstumsfuge _____</b>	<b>52</b>
4.2.1	Längenreduktion der Skelettelemente _____	52
4.2.2	Reduktion der proliferierenden und hypertrophen Chondrozytenzonen _____	53
4.2.3	Verminderte Proliferationsrate der Chondrozyten _____	54
4.2.4	Expressionsanalyse wachstumsfugenspezifischer Gene _____	54
4.2.5	Aktivierung der RAS/MAPK-Signalkaskade _____	56
<b>4.3</b>	<b>Verlust von <i>Nf1</i> führt zur Missbildung der Gelenke _____</b>	<b>57</b>
4.3.1	Fusion des Hüftgelenks _____	57
4.3.2	Fehlende Ausbildung des Gelenkspalts in der pränatalen Entwicklung _____	59
4.3.3	Expressionsanalyse Gelenk-assoziiierter Signalmoleküle _____	62
4.3.4	Deformation von Ellenbogen- und Kniegelenk im Verlauf der postnatalen Entwicklung _____	63

<b>4.4</b>	<b>Chondrozytenspezifische Ablation von <i>Nf1</i> resultiert nicht im Gelenkphänotyp</b>	<b>66</b>
4.4.1	Gewebespezifische Col2-Cre Expression mittels Rosa26-Reportermäusen	66
4.4.2	Identifizierung eines Gelenkspalts	67
<b>4.5</b>	<b><i>Nf1</i> Geninaktivierung führt zur Fibrose-assoziierten Muskelschwäche</b>	<b>68</b>
4.5.1	Exzisionseffizienz der Prx1-Cre vermittelten Rekombination in Muskeln	69
4.5.2	Größenreduktion der Muskeln und verminderte Zugkraft	70
4.5.3	Reduktion der Anzahl an Muskelfasern und Zunahme an Bindegewebe	72
4.5.4	Unveränderter Migrations- und Proliferationsprozess der Muskelvorläuferzellen	74
4.5.5	Gestörte Myoblastendifferenzierung und gesteigerte Myoblastenproliferation	78
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>83</b>
<b>5.1</b>	<b>Etablierung eines konditionellen Knockout Systems von <i>Nf1</i> in frühen mesenchymalen Vorläuferzellen der Extremitäten</b>	<b>83</b>
5.1.1	Zeit- und Gewebespezifität des Prx1-Promotors	83
5.1.2	Vor- und Nachteile des Prx1-Promotors	84
<b>5.2</b>	<b>Inaktivierung von <i>Nf1</i> führt zur Wachstumsverzögerung der Skelettelemente und zu veränderter Wachstumsfuge</b>	<b>85</b>
5.2.1	Fehlregulation der IHH-Signaltransduktion und SOX9 Aktivierung in der Wachstumsfuge	85
5.2.2	RAS Aktivierung führt zur gesteigerten <i>Opn</i> Genexpression	86
5.2.3	Aktivierung der RAS/MAPK-Signalkaskade	88
<b>5.3</b>	<b>Verlust von <i>Nf1</i> führt zur Missbildung der Gelenke in der <i>Nf1</i><sup>Prx1</sup> Mutante</b>	<b>89</b>
5.3.1	Missbildung von Hüft-, Ellenbogen- und Kniegelenk	89
5.3.2	Persistente nukleäre SOX9 Proteinlokalisierung, durchgängige <i>Col2a1</i> und verminderte <i>Gdf5</i> Genexpression führen zur fehlenden Ausbildung des Gelenkspalts	91
5.3.3	Der Einfluss von Wnt-Signalmolekülen auf die Gelenkentwicklung	93
5.3.4	Zellen, die im Prozess der Gelenkspaltbildung beteiligt sind	96
<b>5.4</b>	<b><i>Nf1</i> Geninaktivierung führt zur Fibrose-assoziierten Muskelschwäche</b>	<b>99</b>
5.4.1	Fibrose-assoziierte Muskelschwäche führt zu skelettalen Fehlbildungen	99
5.4.2	LBX1 und PAX3 sind notwendige Transkriptionsfaktoren im Migrationsprozess der Muskelvorläuferzellen	100
5.4.3	Die Rolle der Transkriptionsfaktoren Myogenin und MYOD im Differenzierungsprozess der Myoblasten	101
<b>5.5</b>	<b>Mechanische Stimulation führt zur Ausbildung eines Gelenkspalts</b>	<b>103</b>
<b>5.6</b>	<b><i>Nf1</i><sup>Prx1</sup> Mausmodell rekapituliert annähernd den humanen muskuloskelettalen Neurofibromatose Typ 1 Phänotyp</b>	<b>105</b>

<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>109</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>111</b>
<b>9</b>	<b>Weitere Verzeichnisse</b>	<b>127</b>
9.1	Abbildungsverzeichnis	127
9.2	Abkürzungen	128
9.3	Tabellenverzeichnis	131
<b>10</b>	<b>Anhang</b>	<b>132</b>
10.1	Publikationen	132







# 1 Einleitung

## 1.1 Muskuloskelettales System der Vertebraten

Das muskuloskelettales System bezeichnet alle Teile des Körpers, die zum Stütz- und Bewegungsapparat gehören, das Skelett bestehend aus Gelenken und Knochen, sowie Muskeln und Sehnen.

Das menschliche Skelett (griechisch *skeletos* „ausgetrockneter Körper“) besteht aus etwa 200 Knochen. Es übernimmt zum einen als Exoskelett die Stützfunktion und Gestaltgebung des Organismus und zum anderen fungiert es in Form des Endoskeletts, um eine Stützstruktur für die inneren Organe zu bilden und das Gehirn vor äußeren Einwirkungen zu schützen. Weiterhin spielt das Skelett eine wichtige Rolle bei der Blutbildung und bei der Speicherung von Mineralien wie Kalzium und Phosphat und ist somit essentiell für die Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase (Morgan 1972; Rasmussen et al. 1974).

Unterschieden wird zwischen axialem, kranialem und appendikulärem Skelett. Das Axialskelett besteht aus der Wirbelsäule, den Rippen und dem Sternum und schließt mit dem kranialen Skelett, dem Schädel ab. Das appendikuläre Skelett umfasst die oberen und unteren Extremitäten, welche über den Schulter- und Beckengürtel mit dem axialen Skelett verbunden sind (Erlebacher et al. 1995).

Als Muskulatur wird das Organsystem bezeichnet, das die Gesamtheit aller Muskeln eines Lebewesens umfasst. Jeder einzelne Muskel ist ein kontraktiles Organ, welches durch die Abfolge von Kontraktionen (aktive Verkürzungen eines Muskels) innere und äußere Strukturen des Organismus bewegen kann. Diese Bewegung ist sowohl die Grundlage der aktiven Fortbewegung des Lebewesens als auch vieler innerer Körperfunktionen wie z.B. die Kontraktion des Herzens.

Generell unterscheidet man zwischen glatter Muskulatur, die das kontraktile Gewebe der Hohlorgane, Blut- und Lymphgefäße umfasst, quergestreifter Muskulatur, zu der die Skelettmuskulatur zählt und schließlich der Herzmuskulatur, die eigentlich den Hohlorganen zuzuordnen ist, jedoch Merkmale der quergestreiften Muskulatur aufweist.

### 1.1.1 Knochen

#### Knochenentwicklung

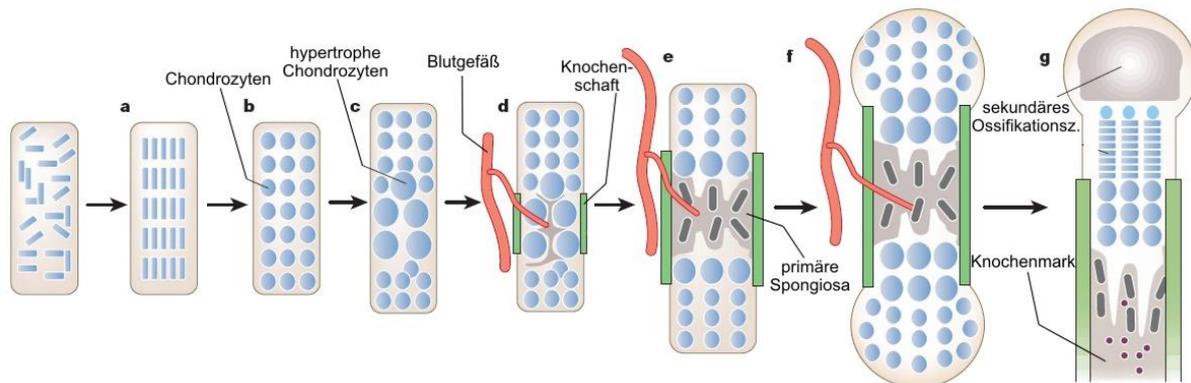
Man differenziert zwischen zwei Arten der Verknöcherung, der desmalen (direkten) und der endochondralen (indirekten) Ossifikation. Die Knochen des Schädeldachs und des Gesichts-

schädels sowie Teile des Schlüsselbeins entstehen über desmale Ossifikation. Hierbei kondensieren zunächst mesenchymale Zellen und formieren Vorläuferzellen, die schließlich zu Osteoblasten differenzieren. Osteoblasten produzieren Knochenmatrix (Osteoid), welche durch die Einlagerung von Kalzium mineralisiert. Die Osteoblasten lagern sich durch die Ansammlung weiterer Osteoidschichten ein. Es entsteht der primäre desmale Knochen.

Röhrenknochen sind Knochen mit einer einheitlichen Markhöhle, in der sich Knochenmark befindet. Dazu zählen z.B. Humerus, Femur und Tibia. Die Röhrenknochen bestehen aus zwei Knochenenden (Epiphysen) und einem Knochenschaft (Diaphyse). Als Metaphyse wird der Bereich zwischen Epi- und Diaphyse bezeichnet.

Diese Knochen werden über den Prozess der endochondralen Ossifikation gebildet (Abb. 1). Zunächst kondensieren dabei mesenchymale Vorläuferzellen an dem Ort und mit der Form des zukünftigen Skelettelements (Abb. 1a). Im Differenzierungsprozess entstehen dabei Chondrozyten, die COL2a1 und Aggrecan produzieren und in die Matrix sezernieren (Abb. 1b). So formiert sich ein Netzwerk aus Kollagenfasern, welche Proteoglykane und andere Glykoproteine umschließen. Zellen, die außerhalb der Kondensation sitzen, bilden das Perichondrium, welches maßgeblich an der Regulation des Knorpelwachstums und der Differenzierung beteiligt ist (Alvarez et al. 2001; Kronenberg 2003). Zunächst lagern sich säulenartig Chondrozyten entlang der Längsachse im zukünftigen Skelettelement an und proliferieren. Das führt zum Längenwachstum des Skelettelements. Während eines Differenzierungsprozesses stellen Chondrozyten in der Mitte des Skelettelements die Proliferation ein und werden hypertroph (Abb. 1c). Dabei nehmen die Zellen um ein Vielfaches an Größe und Volumen zu und sterben schließlich durch Apoptose ab. Hypertrophe Chondrozyten exprimieren *Coll10a1* und sezernieren das Protein in die umliegende Matrix. Gleichzeitig dringen Osteoklasten in den Bereich der terminalen hypertrophen Chondrozyten ein, die ihrerseits über Sezernierung von MMP9 (Matrix metalloproteinase 9) die Knorpelmatrix abbauen, wodurch Platz für die ins Perichondrium migrierenden Osteoblasten geschaffen wird (Karsenty and Wagner 2002). Des Weiteren wird die Invasion von Blutgefäßen initiiert (Abb. 1d). Osteoblasten bauen den trabekulären und kortikalen Knochen auf (Abb. 1e). Das Perichondrium, welches die Ossifikationszone umkleidet, wird zum Periosteum. Die Ossifikation beginnt im mittleren Bereich der Diaphyse und setzt sich zu den Enden des Skelettelements hin fort. Dabei entstehen zwei Wachstumsfugen, in denen Chondrozyten so lange proliferieren, bis der Knochen seine endgültige Größe erreicht hat (Abb. 1f). In der postnatalen Skelettentwicklung formieren sich an den Enden der Knochen die sog. sekundären Ossifikationszentren, die in einem ähnlichen

Prozess von hypertrophen Chondrozyten, Blutgefäßinvasion und Osteoblasten gebildet werden (Abb. 1g).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der endochondralen Ossifikation**

**a:** Kondensation mesenchymaler Vorläuferzellen. **b:** Zellen in den Kondensationen werden zu Chondrozyten. **c:** Proliferation der Chondrozyten, im Inneren der Diaphyse werden die Chondrozyten hypertroph. **d:** hypertrophe Chondrozyten, Formation des Knochenschafts, terminal hypertrophe Chondrozyten mineralisieren die Knochenmatrix und sterben durch Apoptose ab, Invasion von Blutgefäßen. **e:** Einwanderung von Osteoblasten und Blutgefäßen, Formation der primären Spongiosa, Aufbau des kortikalen Knochens. **f:** Proliferation der Chondrozyten führt zum andauernden Knochenwachstum. **g:** Bildung des sekundären Ossifikationszentrums und der Knochenmarkhöhle, Migration hämatopoetischer Zellen in die Knochenmarkhöhle. (modifiziert nach Kronenberg 2003)

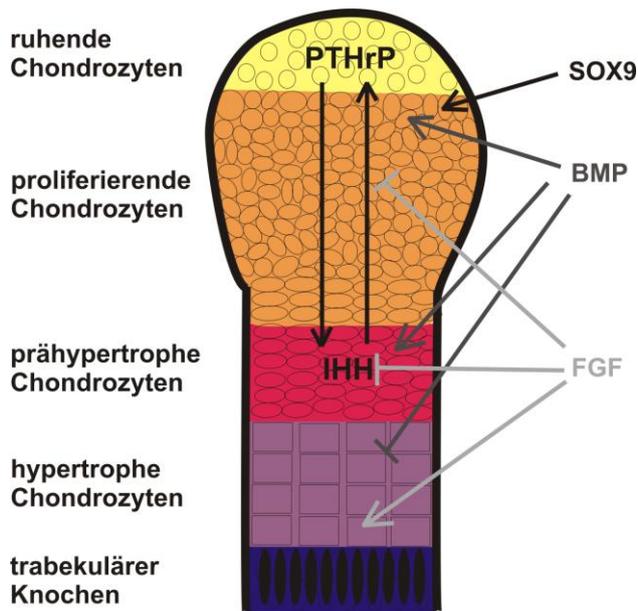
### Steuerung der endochondralen Ossifikation

Die endochondrale Ossifikation wird von einer Vielzahl regulatorischer Prozesse gesteuert. Während der Kondensationsphase wird in den mesenchymalen Vorläuferzellen das Gen des Transkriptionsfaktors SOX9 exprimiert. Dieser gehört zur Familie der SOX-Transkriptionsfaktoren, die eine als HMG (*High Mobility Group*)-Box bezeichnete DNA-Bindedomäne aufweisen. SOX9 ist in der frühen Phase für die Initialisierung der Knorpelstrukturformation verantwortlich (Wright et al. 1995; Bi et al. 1999). Konditionelle Knock-outstudien zeigten, dass ein Verlust von SOX9 sowohl zur Hemmung der Chondrogenese als auch zur Proliferationsinhibition führt (Akiyama et al. 2002). Weiterhin wird das *Sox9* Gen sowohl in proliferierenden als auch in Chondrozyten permanenter Knorpelstrukturen exprimiert (Abb. 2). Es aktiviert eine Reihe von Knorpel-assoziierten Zielgenen wie *Col2a1*, Aggrecan und Noggin (Zhou et al. 1995; Bell et al. 1997a; Lefebvre et al. 1997; 1998; Zehentner et al. 2002). Eine Koexpression mit dem Hauptprotein chondrogener Matrix COL2a1 ist ebenfalls publiziert (Zhao et al. 1997a). FGF (*Fibroblast Growth Factor*)- und BMP (*Bone Morphogenetic Protein*)-Signaltransduktionswege sind für die frühe Regulation der Proliferation über *Sox9* verantwortlich (Naski et al. 1998; Minina et al. 2001).

Die prähypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge exprimieren *Ihh* (*Indian hedgehog*), ein lokales Morphogen. IHH kann zu den Enden der Epiphysenfuge als auch in das Perichondrium diffundieren, wo es an seinen Rezeptor PTC1 (*Patched 1*) bindet (Vortkamp et al. 1996). Durch das Binden von IHH an PTC1 verliert der Rezeptor seine inhibierende Wirkung auf Smoothened (SMO), einen G-gekoppelten Rezeptor. Die Folge ist eine intrazelluläre Signalweiterleitung, die zur Translokation von GLI-Transkriptionsfaktoren in den Zellkern führt, wo spezifische Zielgene u.a. für die Proliferation z.B. *Cyclin D1* reguliert werden (Marigo and Tabin 1996; Long et al. 2001).

Die wesentliche Regulation des Knochenwachstums besteht aus einem negativen Rückkopplungsmechanismus von IHH und PTHrP (*Parathyroid hormone related peptide*), der sowohl die Chondrozytenproliferation als auch die Differenzierung in der Wachstumsfuge reguliert (Abb. 2). Dabei induziert IHH eine gradientenabhängige Expression von *Pthrp* sowohl in der Region der Epiphyse als auch im periartikulären Perichondrium, was folglich zur Inhibierung der hypertrophen Chondrozytendifferenzierung führt. PTHrP diffundiert durch die Wachstumsfuge zu seinem Rezeptor PTHrPR (*Parathyroid hormone related peptide receptor*), welcher in proliferierenden Chondrozyten nur schwach, in frühen hypertrophen Chondrozyten hingegen stark exprimiert wird. Der Verlust eines der beiden Gene führt zum beschleunigten Einsetzen der hypertrophen Chondrozytendifferenzierung, wobei die Zone proliferierender Chondrozyten dabei verkürzt ist (Amizuka et al. 1994; Karaplis et al. 1994). Im Gegensatz dazu führten PTHrP Überexpressionsstudien zur Verzögerung der Hypertrophie und einer verlängerten Zone proliferierender Chondrozyten (Schipani et al. 1997).

Es kann zusammengefasst werden, dass die Stärke der *Ihh* Genexpression die Anzahl der Chondrozyten bestimmt, welche in den Differenzierungsprozess eintreten. Außerdem wird durch den Rückkopplungsmechanismus zwischen IHH und PTHrP der Abstand der hypertrophen Zone vom Gelenk und damit der Vorrat an proliferierenden Chondrozyten determiniert (Vortkamp et al. 1996).



**Abb. 2: Organisation und Regulation der Knochenwachstumsfuge**

Die Wachstumsfuge des Knochens setzt sich aus ruhenden, proliferierenden, prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten sowie dem trabekulären Knochen zusammen. SOX9 reguliert die Proliferation der Chondrozyten. Die Chondrozytenproliferation und Differenzierung wird von einem *feedback*-Mechanismus zwischen IHH und PTHrP gesteuert. BMP-Signale fördern die Proliferation, inhibieren allerdings die hypertrophe Chondrozytendifferenzierung. Hingegen inhibieren FGF-Signalmoleküle die Proliferation und begünstigen damit die Hypertrophie der Chondrozyten.

### 1.1.2 Gelenke

#### Aufbau synovialer Gelenke

Als Gelenk (lat. *Articulatio*) wird eine bewegliche Verbindung zwischen zwei oder mehreren Skelettelementen definiert, wobei zwischen unechten und echten Gelenken unterschieden wird. Im Gegensatz zu den unechten Gelenken (z.B. Brustbein, Bandscheibe, Kreuz- oder Steißbein) befindet sich bei den echten Gelenken ein Gelenkspalt zwischen gegenüberliegenden Skelettelementen z.B. Knie-, Ellenbogen- und Hüftgelenk (synoviales Gelenk). Die Gelenkflächen sind von artikulärem Knorpel überzogen, welcher eine hohe Druckelastizität besitzt (Abb. 3). Der Gelenkknorpel besteht aus Chondrozyten, die zusammen mit kollagenen Fasern (hauptsächlich COL2a1, COL4 und COL6) in die extrazelluläre Matrix (ECM) eingebettet sind.

Mit zunehmendem Alter kommt es zum progressiven Verlust der ECM-Moleküle und folglich zu verminderter Elastizität des Knorpelgewebes. Zu altersbedingten Knorpelerkrankungen zählen weltweit Osteoarthritis und rheumatoide Arthritis. Die pathologischen Veränderungen sind strukturelle und funktionelle Schäden im Knorpel- und im umliegenden Kapselgewebe. Dabei treten inflammatorische Prozesse auf, die letztendlich in eine beeinträchtigte Gelenkfunktion sowie in Schmerzen münden.

Um das Gelenk befindet sich die sog. Gelenkkapsel, welche aus einer äußeren Bindegewebschicht (Synovialmembran) und einem inneren epithelähnlichen Gewebe besteht (Abb. 3). Der äußere Teil der Gelenkkapsel wird von Gelenk- und Kapselbändern verstärkt. Der rundum abgeschlossene Hohlraum, die sog. Gelenkhöhle, ist mit Gelenkflüssigkeit (Synovia) gefüllt (Abb. 3).

Die synovialen Gelenke lassen sich aufgrund ihres geometrischen Bewegungszentrums in verschiedene Gruppen wie z.B. das Kugel-, das Sattel- oder das Scharniergelenk einteilen.



**Abb. 3: Aufbau eines synovialen Gelenks**

Ein synoviales Gelenk befindet sich zwischen zwei Knochenelementen und gewährleistet die Bewegung. Die Gelenkfläche wird von artikulärem Knorpel (Gelenkknorpel) überzogen. Das Gelenk wird von der Gelenkkapsel umrundet, die von der inneren Bindegewebschicht (Synovialmembran) ausgekleidet wird. Im Inneren befindet sich die Gelenkhöhle mit dem Gelenkspalt, welche mit Gelenkflüssigkeit (Synovia) gefüllt ist. (Quelle: modifiziert nach [www.mediziinfo.de](http://www.mediziinfo.de))

### Gelenkbildung

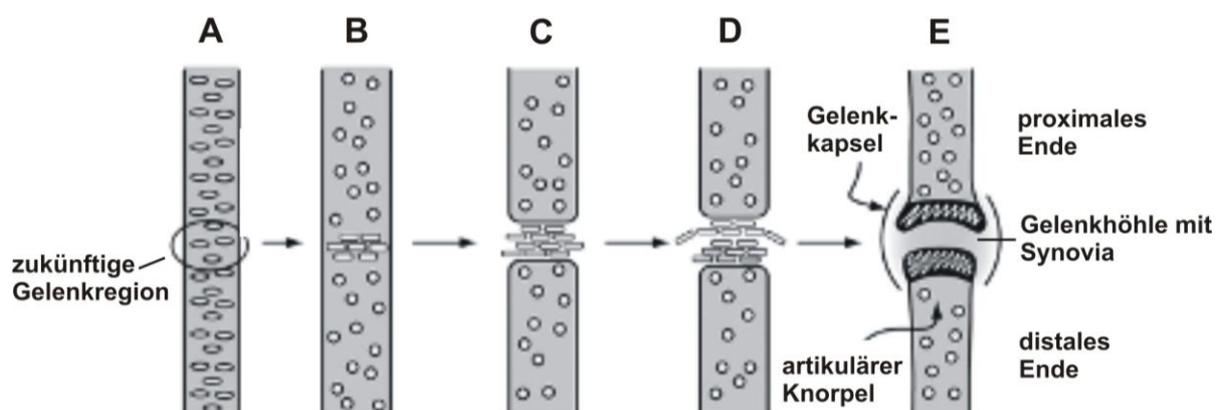
Die Gelenkbildung ist ein mehrstufiger Prozess, der in seinem komplexen Funktionsablauf noch nicht allumfassend entschlüsselt werden konnte.

In Abb. 4 ist eine Übersicht der Gelenkbildung dargestellt. Initial kondensieren mesenchymale Vorläuferzellen. Unbekannte Mechanismen der Musterbildung aus dem umliegenden Gewebe determinieren den genauen Ort des zukünftigen Gelenks (Pacifci et al. 2005a). Die Zellen der Gelenkspaltregion verdichten sich, nehmen eine flache Zellmorphologie an und bilden die Interzone, in der die Zellen nicht länger chondrogenen Charakter besitzen (Craig et al. 1987; Archer et al. 2003). Stattdessen exprimieren die Zellen dort *Wnt14*, *Gdf5* (*Growth and differentiation factor 5*), Chordin und Noggin (Khan et al. 2007). Außerdem sind die Zellen der Interzone über *gap junctions* miteinander verbunden (Archer et al. 2003). Die Zellen der Interzone stellen den Ursprung für das Gelenkgewebe und deren Strukturen (artikulärer Knorpel, Ligamente, Synovialmembran) dar. Die Interzone besteht aus drei Schichten. Die Zellen der beiden äußeren Schichten differenzieren zu Chondrozyten und lagern sich in die Epiphyse ein. Aus der inneren Schicht der Interzone entsteht artikuläres Knorpelgewebe, das die Knochenenden bedeckt (Ito and Kida 2000). Die Gelenkkapsel hingegen wird von einer separaten mesenchymalen Kondensation geformt (Mitrovic 1977, 1978).

Es folgt der Prozess der Kavitation, in dem die beiden gegenüberstehenden Knorpelenden voneinander getrennt werden. Dieser Vorgang wird wissenschaftlich konträr diskutiert und es existieren verschiedene Hypothesen dazu. So wird z.B. Apoptose als eine mögliche Ursache für die Gelenkspaltbildung in Betracht gezogen (Ballard and Holt 1968; Mitrovic 1971, 1972). Andere Studien hingegen zeigten, dass enzymatische Degradationsprozesse oder differentiales Wachstum gegenüberliegender Skelettelemente zum Verlust der Zellen in der Inter-

zone führen (Craig et al. 1987). Die wohl überzeugendsten wissenschaftlichen Arbeiten bewiesen, dass die Spaltbildung durch differentielle Matrix-Synthese unter dem Einfluss mechanischer Stimuli erfolgt. Im Fokus stehen dabei das Glykosaminoglykan HA (Hyaluronsäure), sein Rezeptor CD44 und das Enzym UDPGD (Uridine-Diphosphoglucose Dehydrogenase), welches die Vorstufe von HA synthetisiert (Craig et al. 1990; Pitsillides et al. 1995). Diese Moleküle werden unterschiedlich in Zellen der Interzone und den sich entwickelnden artikulären Knorpelzellen exprimiert (Craig et al. 1990; Archer et al. 1994; Edwards et al. 1994; Pitsillides et al. 1995). Die Interaktion von HA und CD44 induziert in einem HA-konzentrationsabhängigen Prozess sowohl Zelladhäsion als auch Zellseparation. Wenn HA in großer Konzentration präsent ist und somit der Rezeptor gesättigt, liegt mehr freies HA in der Interzone vor und induziert so über den Verlust der ECM-Widerstandseigenschaften die Gelenkspaltbildung (Archer et al. 2003). Der mechanische Einfluss moduliert die Menge an HA und somit die Gelenkspaltformation (Dowthwaite et al. 1998; Bastow et al. 2005). Bereits erwiesen ist, dass Bewegungsabläufe im Embryo essentiell für die Bildung des Gelenkspaltes sind (Drachman 1965; Mitrovic 1982; Dowthwaite et al. 2003).

Nachdem sich der Gelenkspalt formiert hat, finden verschiedene morphogenetische Prozesse zur finalen Bildung der Gelenkkapsel und des artikulären Knorpels statt. Zudem wandern Blutgefäße ein und die Gelenkhöhle füllt sich mit Gelenkflüssigkeit (Synovia). Der Gelenkspalt bleibt frei von Zellen und Kollagenfibrillen.



**Abb. 4: Schematische Darstellung der Gelenkbildung**

**A:** Kondensation mesenchymaler Vorläuferzellen und Determination der zukünftigen Gelenkspaltregion durch äußere noch nicht vollkommen entschlüsselte Signale. **B:** Formation der Interzone (dicht gepackte flache Zellen) und Differenzierung der Epiphysen-Chondrozyten **C:** Beginn der Gelenkspaltbildung **D:** Entstehung gegenüberliegender Epiphysenfugen **E:** Entstehung der Gelenkkomponenten (artikulärer Knorpel, Gelenkkapsel, Gelenkhöhle mit Synovia). (modifiziert nach Pacifici et al. 2006a)

### 1.1.3 Muskeln

#### Aufbau der Skelettmuskeln

Bewegung in Form von körperlicher Aktivität entsteht durch das gezielte Zusammenspiel von Nervensystem und Muskeln. Skelettmuskeln stellen über 45 % der Gesamtmuskulatur dar. Sie sind über Sehnen mit den Knochen verbunden. Kontraktile Bewegungsabläufe verkürzen oder entspannen die Muskeln und erlauben damit einen aktiven Bewegungsvorgang.

Ein Skelettmuskel besteht aus vielen Muskelfaserbündeln, welche vom Epimysium (Bindegewebeschicht) umhüllt werden. Das Epimysium wird zusätzlich von einer festen Muskelhülle, der Muskelfaszie, umschlossen, die zum Erhalt der Muskelform dient.

Ein Muskelfaserbündel setzt sich aus mehreren Muskelfasern zusammen und wird von Septen aus Bindegewebe (Perimysium) umgeben.

Eine einzelne Muskelfaser ist der grundlegende Baustein jedes Skelettmuskels. Sie besteht aus langgestreckten, auf Kontraktion spezialisierten multinukleären Zellen (Synzytium). Jede Muskelfaser wird von Bindegewebe (Endomysium) umgeben. In der Feinstruktur besteht eine Muskelfaser aus parallel verlaufenden Myofibrillen, Bündeln dicht gepackter Myofilamente (Au 2004). Myofibrillen setzen sich wiederum aus dünnen Actin- und dicken Myosin-Filamenten zusammen.

Zur Muskelkontraktion kommt es, wenn eine erhöhte zytosolische Kalziumionenkonzentration zur gegenseitigen Verschiebung der Actin- und Myosinfilamente führt. Durch Konformationsänderungen werden die Sarkomere (strukturelle Grundeinheit der Myofibrille) verkürzt. Dieser Vorgang ist energieabhängig und wird durch den Mechanismus der elektromechanischen Kopplung ausgelöst (Walker and Schrodt 1967).

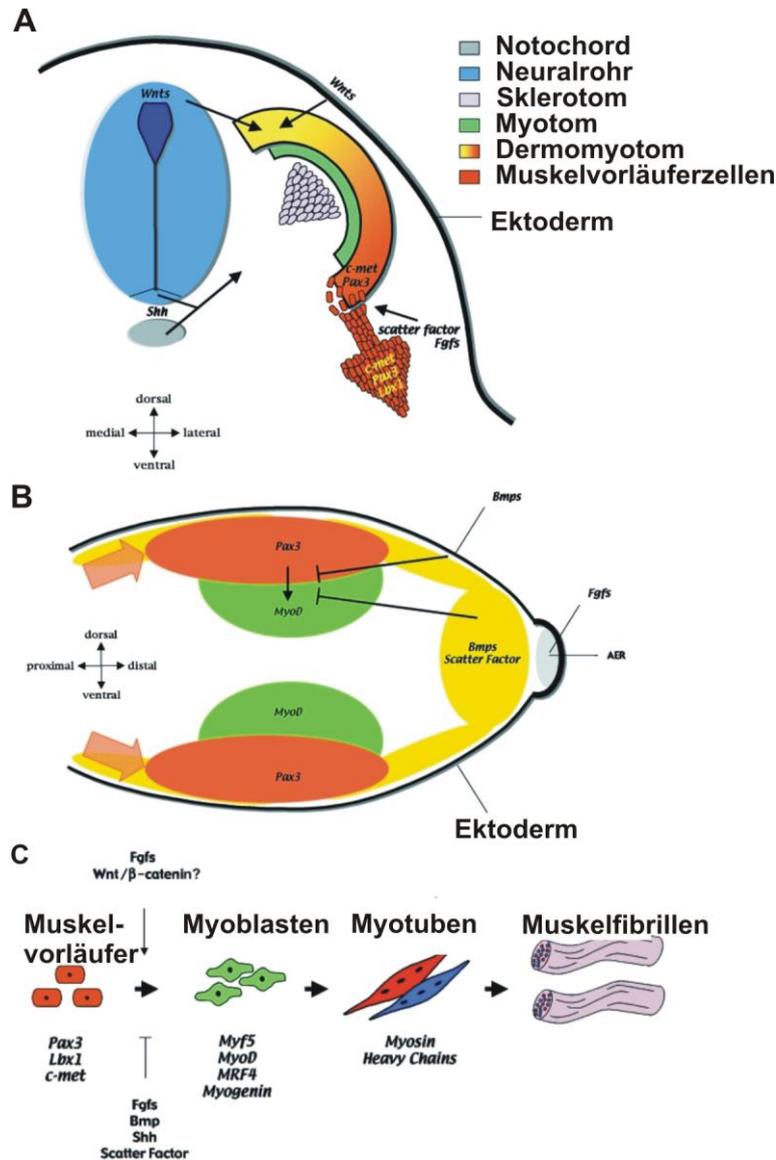
#### Muskelentwicklung

Die Skelettmuskulatur der Vertebraten wird nach ihrem Ursprung in drei Gruppen eingeteilt: die kraniofaziale, die epaxiale und die hyperaxiale Muskulatur (Christ and Ordahl 1995). Die kraniofaziale Muskulatur geht aus dem Kopfmesoderm hervor, welches keine offensichtliche Segmentierung aufweist (Bothe and Dietrich 2006). Die Körpermuskulatur umfasst die epaxiale und hyperaxiale Muskulatur und wird aus dem Dermomyotom gebildet, welches seinen Ursprung in den Somiten hat (Buckingham et al. 2003). Als Somiten werden die Ursegmente, bläschenartig segmentierte, paarig angeordnete Zellkomplexe des paraxialen Mesoderm, bezeichnet. Sie bilden das Anlagematerial der Skelettelemente, der Haut und der Rumpfmuskeln. Signale aus dem benachbarten Neuralrohr und dem umschließenden Gewebe führen zu einer Polarisation innerhalb der Somiten. Die Somiten differenzieren entlang der

dorso-ventralen Achse und formieren schließlich das Dermomyotom an der dorsalen und das Sklerotom an der ventralen Seite. Dieser Vorgang wird von verschiedenen Signalmolekülen u.a. SHH (Sonig Hedgehog), Wnts (Gründungsmitglieder Wingless und Int-1) und BMPs gesteuert (Cossu et al. 1996; Francis-West et al. 2003).

In der weiteren vertebralen Entwicklung werden aus dem Sklerotom Knochen- und Knorpel-elemente der Wirbelsäule und Rippen gebildet. Hingegen stellt das Dermomyotom den Ursprung für die Haut (aus dem Dermatome) und der Skelettmuskulatur (aus dem Myotome) dar. Es wird dabei unterschieden in den medialen Teil des Myotoms, aus dem die epaxialen Muskeln (Rumpfmuskulatur) entspringen, und dem lateralen Teil (hypaxial), aus welchem Gliedmaßenmuskulatur, Zungenmuskel, Bauchmuskeln und das Zwerchfell entstehen.

Im Prozess der Muskelbildung (Myogenese) spalten sich in Folge von Signalen des lateralen Plattenmesoderms Muskelvorläuferzellen vom lateralen Dermomyotom ab und wandern distal in die Extremitätenanlage ein (Chevallier et al. 1977; Hayashi and Ozawa 1995). Dieser Vorgang wird von Mitgliedern der FGF-Familie, BMPs und Scatter Factor gesteuert (Brand-Saberi et al. 1996; Heymann et al. 1996). Die Muskelvorläuferzellen exprimieren die Transkriptionsfaktoren PAX3 (*Paired Box 3*), LBX1 (*Labybird homeobox 1*) sowie C-MET (Tyrosin Kinase-Rezeptor für Scatter Factor) (Bober et al. 1994; Goulding et al. 1994; Williams and Ordahl 1994a; Bladt et al. 1995; Gross et al. 2000; Brohmann et al. 2000) (Abb. 5A und C). Schließlich spaltet sich eine Subpopulation der Vorläuferzellen ab, wandert ins Zentrum der Extremitätenknospe ein und beginnt mit der Differenzierung zu Myoblasten (Abb. 5B). Dabei wird die Expression der Transkriptionsfaktoren der MRF-Familie (*myogenic regulatory factors*) induziert (Abb. 5C). Diese Gruppe beinhaltet die Muskeldifferenzierungsgene *Myf5* (*myogenic factor 5*), *MyoD* (*myogenic differentiation 1*), *MRF4* (*myogenic regulating factor 4*) und Myogenin (Pownall et al. 2002; Francis-West et al. 2003). *Myf5* und *MyoD* werden als Marker der frühen Differenzierung identifiziert. Hingegen stellen *MRF4* und Myogenin Markergene des terminalen Differenzierungsprozesses dar, währenddessen aus Myoblasten Myozyten entstehen (Ontell et al. 1995). Proliferierende, *Pax3* exprimierende Vorläuferzellen, verbleiben ektodermal orientiert. Der Muskeldifferenzierungsprozess wird von ektodermalen und mesenchymalen BMP-Signalen, Scatter Factor sowie FGFs in der AER (*apical ectodermal ridge*) reprimiert. Nach Proliferation und Differenzierung schließt sich die terminale Differenzierung an, in der sich zuerst Myozyten bilden, die schließlich zu mehrkernigen Myotuben fusionieren. Die Myotuben exprimieren MHC-Moleküle (*Myosin heavy chain*) und formen final Muskelfibrillen (Duprez 2002) (Abb. 5C).



**Abb. 5: Regulation der Myogenese**

**A: Induktion der Myogenese in den Somiten.** Der Somit setzt sich aus Sklerotom (violett) und Dermomyotom (gelb-orange) zusammen. Der dorsal-mediale Teil des Dermomyotoms (gelb) formt epaxiale Muskeln, dorsal-laterale Teil des Dermomyotoms (orange) formt hypaxiale Muskeln. Die Muskelvorläuferzellen migrieren distal in die sich entwickelnde Extremität (orangener Pfeil). Moleküle des FGF-Signalwegs und Scatter factor kontrollieren den Migrationsprozess. Die Vorläuferzellen exprimieren *Pax3*, *Lbx1* und *c-met*. Notochord (grau) und Neuralrohr (blau) produzieren SHH (*Sonig hedgehog*), welches wiederum das Sklerotom induziert. Myogenese fördernde Wnt-Signalmoleküle werden im Neuralrohr und dem dorsalen Ektoderm exprimiert. **B: Regulation von Migration und Muskeldifferenzierung.** Distale Muskelvorläufermigration (*Pax 3* Positive, orange) in Richtung der AER (*apical ectodermal ridge*; grau). AER exprimiert FGFs (*fibroblast growth factors*) und reguliert Scatter factors Genexpression (gelb). Zellsubpopulation wandert proximal ein, exprimiert *MyoD* (grün) und beginnt zu differenzieren. BMP-Signale aus dem Ektoderm, *Scatter factor* (gelb) und FGFs in der AER reprimieren die Muskeldifferenzierung. **C: Übersicht der Myogenese.** Muskelvorläuferzellen exprimieren initial *Pax3*, *Lbx1* und *c-met*. Differenzierende Myoblasten exprimieren *Myf5* und *MyoD*, später *MRF4* und Myogenin. Myozyten fusionieren zu mehrkernigen Myotuben und exprimieren verschiedene Isoformen der MHC (*myosin heavy chain*)-Moleküle. Final assemblieren Myotuben zu Muskelfibrillen. (modifiziert nach Francis-West 2003)

## 1.2 Neurofibromatose Typ 1

### 1.2.1 Neurofibromatose Typ 1- humane Multiorganerkrankung

Neurofibromatose Typ 1 (NF1) wurde erstmals 1882 von Friedrich Daniel von Recklinghausen beschrieben und wird nach ihrem Entdecker auch Morbus Recklinghausen oder periphere Neurofibromatose genannt.

Es handelt sich um eine autosomal dominante Erbkrankheit, die multiple Organe befällt und schätzungsweise bei einem Kind von 2500-3000 Geburten vorkommt (Zhu et al. 2001). Mutationen im Neurofibromin 1 Gen (*NF1*) führen zu der Erkrankung. In 50 % aller Fälle kommt es zu *de novo* Mutationen im verantwortlichen Gen. Die hohe Wahrscheinlichkeit für Neumutationen hängt mit der Größe des Gens zusammen, da große Gene prädestiniert sind für Mutationen. Wenn ein Elternteil erkrankt, besteht ein 50 %iges Risiko für die Kinder, das mutierte Gen zu tragen (Riccardi 1999). Interessanterweise erkranken Männer häufiger als Frauen.

NF1 Patienten zeigen charakteristische Hautveränderungen, u.a. Café-au-lait-Flecken (milchkaffeefarbene Pigmentstörungen), sommersprossen-ähnliche Verfärbungen (Freckling) im Bereich der Achselhöhlen und der Leistengegend, sowie Neurofibrome (Riccardi 1999). Als Neurofibrom wird ein Tumor des peripheren Nervensystems bezeichnet, der in Form von kutanen, subkutanen oder plexiformen Neurofibromen auftritt. Die Haut eines Neurofibromatose Typ 1 Patienten kann mit bis zu 10.000 Tumoren bedeckt sein. Weiterhin können verschiedene andere Tumorarten wie z.B. bösartige periphere Nervenscheidentumore und Gliome auftreten. Daneben gibt es oftmals Veränderungen der Augen in Form von Lisch-Knötchen (Pigmentveränderung der Regenbogenhaut).

Neben der Symptomatik der Haut und der Prädisposition an Tumoren zu erkranken leiden die Patienten an Skelettveränderungen. Dazu zählen Kleinwuchs, Kyphoskoliosen (Verbiegungen der Wirbelsäule), Pseudoarthrose, Verbiegungen der langen Röhrenknochen und pathologische Frakturen aufgrund einer veränderten Knochenstruktur (Stevenson et al. 1999; Alwan et al. 2005; Schindeler and Little 2008; Riccardi 2010).

Weiterhin können NF1 Patienten mental retardiert und minderbegabt sein bzw. leiden sie oft an epileptischen Anfällen.

Da das symptomatische Spektrum sehr breit gefächert ist und nicht alle Patienten im Laufe ihrer Erkrankung einzelne Symptome entwickeln, wurden diagnostische Kriterien zusammengefasst, von denen der Erkrankte zwei oder mehrere Kriterien erfüllen muß, um als NF1 Patient diagnostiziert zu werden (Tab. 1).

Tab. 1: Diagnostische Kriterien für Neurofibromatose Typ 1

Nr.	Kriterium
1	6 Café-au-lait-Flecken (5 mm vor Pubertät; danach $\geq 15$ mm)
2	axilläre oder inguinale Pigmentierung
3	2 oder mehrere Neurofibrome oder 1 plexiformes Neurofibrom
4	ein Verwandter (1.Grades) mit Neurofibromatose Typ 1
5	mindestens 2 Lisch-Knötchen
6	Knochenläsionen

(Gutmann et al. 1997)

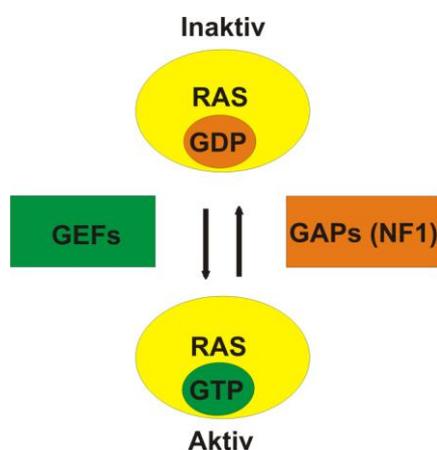
### 1.2.2 Pathogenese

Neurofibromatose Typ 1 resultiert aus Mutationen im Neurofibromin 1 Gen (*NF1*), das auf Chromosom 17q11.2 lokalisiert und für das Neurofibromin Protein (NF1) kodiert. *NF1* umfasst 60 Exone und ist eines der Kandidatengene im menschlichen Genom, welches die höchste Rate an Spontanmutationen aufweist (Theos and Korf 2006). In 90 % aller Fälle führen Mutationen wie Gendeletionen, Insertionen, *nonsense*-Mutationen, *missense*-Mutationen und *splicing*-Mutationen zu einem Funktionsverlust bedingten Neurofibromin (Riccardi 1999). Das 250 kDa große Protein wird in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen, vornehmlich in Neuronen, Gliazellen, Schwann-Zellen und in frühen Melanozyten (Stocker et al. 1995).

Interessanterweise zeigt NF1 Sequenzhomologien mit dem von Säugetieren bekannten GAP (GTPase aktivierendes Protein) und den IRA1- und IRA2-Genen der Hefe (Trahey and McCormick 1987; Tanaka et al. 1990; Xu et al. 1990; Ballester et al. 1990). *In vitro* Studien belegen, dass die GAP-verwandte Domäne von NF1 spezifisch an das p21 RAS Protein bindet (Martin et al. 1990).

Das RAS Protein gehört zur Familie der kleinen Guanin-Nukleotid-bindenden Proteine und spielt eine Rolle in verschiedenen Signaltransduktionswegen. Dort übernimmt es die Übermittlung von extrazellulären Signalen in den Zellkern und beeinflusst damit Prozesse wie z.B. Differenzierung, Proliferation, Zellerhalt, Apoptose und *Seneszenz* (Marshall 1995; Clark and Hynes 1996; Serrano et al. 1997; Gille and Downward 1999; Bonni et al. 1999). Als monomeres GTP-bindendes Protein übernimmt RAS die Funktion eines regulatorischen Schalters, mit welchem zelluläre Prozesse an- und ausgeschaltet werden können. Dabei wechselt RAS zwischen einem aktiv GTP-gebundenen und einem inaktiv GDP-gebundenen Zustand, bei dem GTP zu GDP hydrolysiert wird (Boguski and McCormick 1993). Grundlage dabei sind unter-

schiedliche Proteinkonformationen bei der Bindung von GTP oder GDP. Nur der aktiv GTP-gebundene Zustand lässt weitere Effektormoleküle induzieren und Signalwege anschalten (Wittinghofer and Nassar 1996; Geyer et al. 1997). Da sowohl die GTPase-Aktivität als auch der intrinsische Nukleotidaustausch sehr langsame Prozesse sind, wird der Erhalt beider RAS-Konformationszustände über GAPs und GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) reguliert (Abb. 6). Neurofibromin kann mittels seiner GAP-Region RAS in den inaktiven Zustand überführen und übernimmt damit die Funktion eines Tumorsuppressors (Corral et al. 2003; Ballester et al. 1990). Mutationen in *NF1* führen zu einem nicht-funktionsfähigen NF1 Protein und damit zu einer fehlenden Suppression des aktivierten RAS Proteins, was schwerwiegende multiple Auswirkungen auf den Gesamtorganismus hat z.B. eine gesteigerte Zellproliferation.



**Abb. 6: NF1 hemmt RAS**

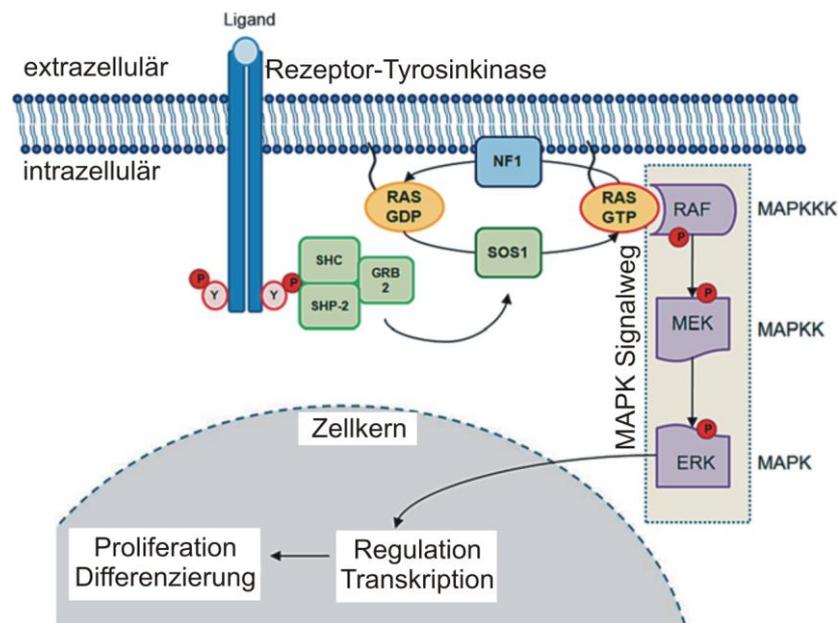
Das RAS Protein kann in einem inaktiv GDP-gebundenen oder aktiv GTP-gebundenen Zustand vorliegen. Über die NF1 GAP-Domäne kann das RAS Protein in seinem inaktiv GDP-gebundenen Zustand gehalten werden. Mittels GEFs wird RAS in den aktiv GTP-gebundenen Zustand formiert. Dieser Wechsel erfolgt aufgrund unterschiedlicher Proteinkonformationen bei der Bindung von GTP oder GDP. Nur im aktiven Zustand kann RAS weitere Effektoren aktivieren und eine Signaltransduktion stattfinden. Abkürzungen: RAS – *Rat sarcoma*; NF1 – *Neurofibromin*; GEF - *guanine nucleotide exchange factor*

### 1.2.3 Signaltransduktion über RAS/MAPK-Signalkaskade

Der MAPKinase-Weg (*mitogen-activated protein kinases*) ist eine Signaltransduktionskaskade, in der in einem mehrstufigen Prozess Proteinkinasen durch Phosphorylierung von Serin- oder Tyrosinresten aktiviert werden und schließlich in der Transkriptionsregulation verschiedener Prozesse wie der Embryogenese, der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums und der Apoptose enden. Dazu zählen u.a. die Transkriptionsfaktoren CREB (*cAMP response element-binding protein*), c-Myc (*cellular myelocytomatosis oncogene*) und NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*).

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen drei verschiedenen Signalwegen, die durch unterschiedliche Signale aktiviert werden. Mitogene Aktivierung erfolgt über RAF-, MEK1/2- und ERK1/2-Kinasen und reguliert Zellwachstum, Zellproliferation und Zelldifferenzierung. Aktivierung bei Streß führt letztendlich über den p38 MAPK-Signalweg zu Apoptose, Zellwachstum und Differenzierung. Eine dritte Aktivierung erfolgt ebenfalls stressbedingt z.B. durch UV-Licht final über JNK (c-jun N-terminale Kinasen).

Ein durch RAS vermittelter Signaltransduktionsweg führt über die mitogen-aktivierende MAPKinase-Signalkaskade (Abb. 7). Hierbei binden initial Signalmoleküle z.B. Wachstumsfaktoren wie EGF (*epidermal growth factor*) und FGF an die extrazelluläre Domäne ihres entsprechenden Rezeptors und induzieren so eine Dimerisierung des Rezeptors. So werden die intrazellulären Tyrosinreste des Rezeptors phosphoryliert und weitere Interaktionen mit Adaptormolekülen initiiert, z.B. SHC, SHP-2 (*Src homology region 2- domain phosphatase 2*) und GRB2 (*growth factor receptor bound protein 2*). GRB2 bildet mit dem Guaninnukleotid-Austauschfaktor SOS1 (*son of sevenless 1*) einen GTP-gebundenen aktiven RAS-Komplex (Chardin 1993). Es folgt die Wechselwirkung des aktivierten RAS mit der ersten Protein-Kinase RAF (*rapid fibrosarcoma*). Die Kinase wird phosphoryliert und tritt in Kontakt mit einer weiteren Proteinkinase-MEK (MAP/ERK-Kinase oder auch MAPKinase-Kinase), die nun ihrerseits die beiden Formen p42 und p44 der ERK-Kinasen (*extracellular signal-regulated kinase*) phosphoryliert. Final endet die Phosphorylierungskaskade mit der Signalweiterleitung in den Zellkern, wo die Transkription spezifischer Gene reguliert wird (Jorge et al. 2009).



**Abb. 7: RAS/MAPK-Signaltransduktion**

Wachstumsfaktoren binden an eine Rezeptor-Tyrosinkinase und führen zur Rezeptor-Dimerisierung. Durch Wechselwirkungen mit verschiedenen Adaptormolekülen kann letztendlich der Guaninnukleotid-Austauschfaktor SOS1 mit aktiviertem RAS interagieren. Das führt über eine dreistufige Phosphorylierungskaskade (RAF-MEK-ERK) zur Aktivierung der Kinasen und resultiert in der Regulation von spezifischen Transkriptionsfaktoren für Proliferation und Differenzierung. Abkürzungen: SHC - *Src homology*; SHP-2 - *Src homology region 2- domain phosphatase 2*; GRB2 - *growth factor receptor bound protein 2*; SOS1 – *son of sevenless 1*; RAF - *rapid fibrosarcoma*; MEK - MAP/ERK-Kinase; ERK - *extracellular signal-regulated kinase*. (modifiziert nach Jorge et al. 2009)

### 1.2.4 $Nf1^{Prx1}$ Mausmodell

Homozygote *Nf1* Mäuse ( $Nf1^{-/-}$ ) sterben bereits im Uterus aufgrund eines kardiovaskulären Defekts (Brannan et al. 1994; Jacks et al. 1994; Henkemeyer et al. 1995). Heterozygote *Nf1* Mäuse ( $Nf1^{-/+}$ ) sind phänotypisch sehr variabel und weisen nur einige wenige Symptome der humanen Neurofibromatose Typ 1 Erkrankung auf. Somit ist dieses Mausmodell nicht geeignet für eine möglichst patientennahe Rekapitulation des humanen muskuloskelettalen Phänotyps.

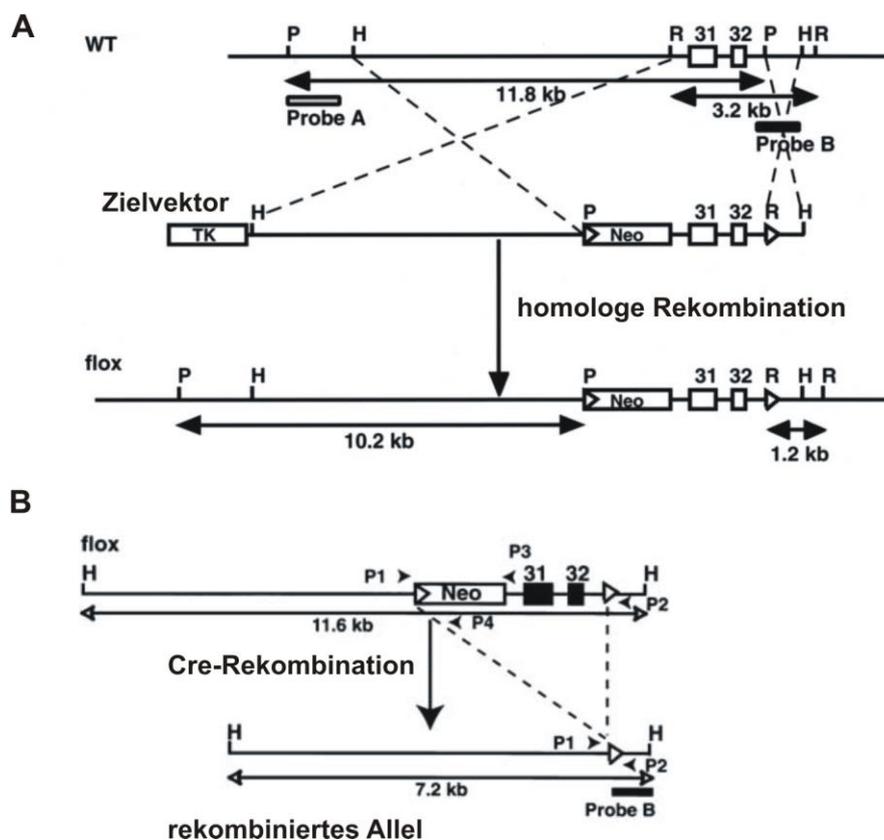
Deshalb wurde mit einem konditionellen Knockout System (Cre/loxP) gearbeitet, in welchem eine gezielt zeit- und/oder gewebespezifische Geninaktivierung erfolgen kann (Lobe and Nagy 1998). Im Cre/loxP-Rekombinationssystem findet eine Kombination aus Genmodifikation und Rekombination statt. Der Bakteriophage P1 aus *E.coli* kodiert für dieses ortsspezifische Rekombinationssystem, das sich sowohl aus loxP-Sequenzen (Stellen der Rekombination) als auch aus dem Cre-Rekombinase Protein zusammensetzt. Die Cre-Rekombinase ermöglicht durch ihre katalytische Aktivität den Austausch zwischen den DNA-Erkennungssequenzen (Sternberg and Hamilton 1981; Sternberg et al. 1981).

Um in einem konditionellen Knockout Maussystem beide Allele des *Nf1* Gens in mesenchymalen Vorläuferzellen zu inaktivieren, wurden folgende zwei Mausstämme miteinander verkreuzt. Zum einen wurde ein Mausstamm benötigt, in dem das Zielgen von flankierenden Sequenzen für das Rekombinationsereignis umgeben ist. Es ist bekannt, dass Exon 31 essentiell für die Neurofibromin 1 Genfunktion im Menschen und in der Maus ist (Brannan et al. 1994). Auf dieser Basis wurde ein Zielvektor kreiert, welcher der Generierung einer  $Nf1^{lox/lox}$  Maus diente (Zhu et al. 2001). In diesem Zielvektor waren Exon 31 und 32 von loxP-Stellen flankiert, welche als spezifische Erkennungssignale einer Cre-Rekombinase fungieren. Zusätzlich enthielt der Vektor eine Neomycinkassette (Abb. 8A).

Weiterhin wurde für das konditionelle Knockout System eine transgene Mauslinie benötigt, welche eine Cre-Rekombinase unter einem spezifischen Promotor trägt. Nur in den Zellen, wo der gewebespezifische Promotor aktiv ist, kann nach Expression der Cre-Rekombinase das Rekombinationsereignis stattfinden. Im Fall der  $Nf1^{Prx1}$  Maus war die Cre-Rekombinase unter dem Prx1-Promotor und erlaubte damit die Inaktivierung des Gens in den frühen mesenchymalen Vorläuferzellen der sich entwickelnden Extremitäten (Logan et al. 2002). Bei der Verpaarung einer homozygote  $Nf1^{lox/lox}$  Maus mit einer transgenen  $Nf1^{lox/+}; Prx1^{Cre}$  Maus wurden über Cre-vermittelte Rekombination Exon 31 und 32 des *Nf1* Gens entfernt. Der Nachweis des Rekombinationsereignisses erfolgte über eine Genotypisierungs-PCR, in der verschiedene Primerkombinationen verwendet wurden (Abb. 8B und 3.1.4). Fand die Rekombination

bination statt, so ergaben die Primer P1 und P2, welche sowohl den Bereich der Neomycinkassette als auch die geflochtenen Exone beinhalten, ein kurzes DNA-Fragment. Wurden hingegen die *Nf1* Exone nicht entfernt, so war der loxP-Sequenzen-markierte Bereich wie auch die Neomycinkassette präsent. Dieser Nachweis erfolgte mittels der Primerkombinationen P1 und P3 als auch P1 und P4 und ergab eine Wildtyp DNA-Bande (Zhu et al. 2001).

Im Verlauf dieser Arbeit werden homozygote *Nf1* Mutanten als  $Nf1^{\text{Prx1}}$  Mäuse bezeichnet.



**Abb. 8: Cre/loxP-Rekombinationssystem zur Generierung der *Nf1<sup>Prx1</sup>* Maus**

**A: Generierung einer *Nf1<sup>flox/flox</sup>* Maus.** Nach erfolgreicher homologer Rekombination sind Exon 31 und 32 der *Nf1* Allele mit loxP-Sequenzen flankiert. Davor befindet sich eine Neomycinkassette. **B: Cre-vermittelte Rekombination des geflochtenen *Nf1* Allels.** Durch die enzymatische Aktivität einer Cre-Rekombinase werden die flankierenden Stellen erkannt und ausgeschnitten. Das rekombinierte Allel besitzt im Gegenteil zum geflochtenen Allel eine verminderte Länge von 7,4 kb. Findet Rekombination statt, erfolgt der Nachweis mittels Primer P1 und P2 und ergibt ein kurzes DNA-Fragment. Wird hingegen nicht rekombiniert, ergeben bei der PCR die Primer P1 und P3 eine DNA-Bande, welche der Neomycinkassette entspricht. (modifiziert nach Zhu et al. 2001)

### 1.3 Zielsetzung

Die Neurofibromatose Typ 1 Erkrankung wird durch vererbte bzw. *de novo* Mutationen im *NF1* Gen und dem daraus resultierenden Neurofibromin Funktionsverlust verursacht.

Das für funktionelle Studien erzeugte *Nf1*<sup>-/-</sup> Mausmodell ist durch einen Defekt des kardio-vaskulären Systems letal. Somit steht für die Untersuchung des muskuloskelettalen Phänotyps der Neurofibromatose Typ 1 kein geeignetes Tiermodell zur Verfügung.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher ein konditionelles Knockout Maussystem etabliert werden, in welchem *Nf1* in mesenchymalen Vorläuferzellen der sich entwickelnden Extremitäten inaktiviert wird (*Nf1*<sup>Prx1</sup>). Mittels PCR und Reportermausverpaarungen soll die gewebe- und zellspezifische Ablation von *Nf1* identifiziert werden. Die sich daran anschließende Charakterisierung des *Nf1*<sup>Prx1</sup> Mausphänotyps soll mittels Micro-CT, Histologie, Genexpressionsanalysen, Proteinbiochemie und immunhistochemischen Methoden erfolgen. Diese Arbeit umfasst dabei folgende Ziele:

1. Untersuchungen der *Nf1*<sup>Prx1</sup> Skelettelemente (Skelettpräparationen, Histologie, Genexpressionsanalysen, Zellkulturexperimente) und Identifizierung der molekularen Mechanismen (Proteinbiochemie und qRT-PCR)
2. Charakterisierung des postnatalen *Nf1*<sup>Prx1</sup> Gelenkphänotyps (Micro-CT Analyse, Histologie); Untersuchung der pränatalen Gelenkentstehung in der *Nf1*<sup>Prx1</sup> Maus (Histologie, Genexpressionsanalysen und Immunhistochemie)
3. Konditionelle Ablation von *Nf1* in Chondrozyten (*Nf1*<sup>Col2</sup>) und Charakterisierung der Gelenke; vergleichende Betrachtung der *Nf1*<sup>Prx1</sup> und *Nf1*<sup>Col2</sup> Gelenke
4. Morphologische und histologische Untersuchungen der Muskulatur der *Nf1*<sup>Prx1</sup> Maus (Größen- und Gewichtbestimmung, Zugkraftmessung, Histologie)
5. Analyse der pränatalen Muskelentwicklung wie Migration und Proliferation von Muskelvorläuferzellen als auch Differenzierung und Proliferation der Myoblasten (Genexpressionsanalysen und Immunhistochemie)

Ziel dieser Arbeit ist die funktionelle Charakterisierung von Neurofibromin in der Entwicklung des muskuloskelettalen Systems am Beispiel der *Nf1*<sup>Prx1</sup> Mausmutante. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen zur Aufklärung des Pathomechanismus der Neurofibromatose beitragen.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Gerät	Zusatzbezeichnung	Hersteller
Axio Cam	HRC oder MRC5	Zeiss
Binokular	MZ 12	Leica
Blotkammer	Transblot Semi-Dry	Bio-Rad
Einbettstation	EC 350-1/EC 350-2	Microm
ELISA Reader	Spectra Max 250	Molecular Devices
Entwässerungsautomat	TP 1020	Leica
Filmentwickler	Curix 60	Agfa-Gevaert AG
Gefrierschrank	-80 °C, Forma 906	Thermo
Geldokumentationssystem	Easy Win.32	Herolab
Gelelektrophorese-Zubehör	Schlitten, Kammern, Kämmen	PeqLab
Heizblock	Ori-Block OV 3	Techne
Hybridisierungsöfen	OV 2	Biometra
Kraftmesser Chatillon®		Ametek, Largo, USA
Kryostat	HM 650 M Cryo-Star	Mikrom
Kühlgefrierkombination	4 °C, -20 °C	Bosch
Laborwaage	FI1500	Fischer
Megafuge	1.0	Heraeus
Mikroskop	Fluoreszenz Axiovert 200	Zeiss
Mikrotom	Cool-Cut oder 2050 Supercut	Microm oder Reichert-Jung
Mikrowelle	8020	Privileg
Multikanalpipette	5-10 µl, 3-300 µl	Eppendorf
pH -Meter	MP220	Mettler
Photometer	Biophotometer	Eppendorf
Pipetten	10 µl , 20 µl, 200 µl, 1 ml	Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipettboy acu	ISS Intergra Bioscience
Plastikmesser	Edelstahl	Leica
Rollator	Roller Mixer SRT9	Stuart
Schüttler	G10 Gyrotory	New Brunswick Scientific
Sequenzierer	Sequence Analyser 3100	AB Applied Biosystems
Sterilbank	HERA safe	Kendro
Strom-/Spannungsversorger		Peqlab

Taqman 7500		ABI
Thermal Cycler	2720	AB Applied Biosystems
Thermomixer	Comfort, für 1,5 ml tubes	Eppendorf
Transilluminator		Hartenstein
UV-Dunkelkammer		Hormuth-Vetter
Vortex	Microspin FV-2400	Lab4you
Wasserbad	D1	Haake fisions
Zellzählkammer	Tiefe 0,100 mm; 0,0025 mm	Birker
Zentrifuge	Biofuge pico	Thermo
Zentrifuge	3417R	Eppendorf
Zentrifuge	RC-5 Superspeed	DuPont Instruments Sorvall

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Zusatzbezeichnung	Hersteller
8-tube Strip + caps	0,2 ml, MicroAmp™	AB Applied Biosystems
96 well plate	MicroAmp™ / Thermowell	AB Applied Biosystems CostarR
Autoklavierband	Comply™	Steam
Deckgläschen		Leica
Einbettförmchen	verschiedene Größen	Polysciences
Einfrierbox	Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene™
Falcon-Röhrchen	15 ml; 50 ml	TPPR / Greiner
Glaspipetten	1 ml; 5 ml; 10 ml; 20 ml	FortunaR Germany
Kisolfolie	Platzhalter und Isolierfolie	Dental Labor Henry Schein
Klingen	Sec35p Low Profile Blades	Microm
Kryo-Röhrchen	Cryo.S PP	Greiner
Objektträger	Super Frost Plus	Menzel-Gläser
Parafilm M		Pechinery
Pasteurpipette	3 ml	Brand Plastibrand
Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson, Eppendorf, Biozym
Reaktionsgefäße	0,5 ml- ; 1,5 ml- ; 2 ml-tubes	Eppendorf
Röntgenfilm	Super RX Fuji Rays Film	Hartenstein
Silikatkugeln	Silica Gel Orange	Roth
Transfer Membran (0,45µm)	Immobilon™-P	Millipore
Untersuchungshandschuhe	Latex; safety & comfort	Latech
Whatman Papier	Extra thick Blot Paper Crite- rion™	Biorad

Zellkultur Testplatte	6- ;12- ; 24- ; 96- Well	TPPR
Zellkulturflaschen / -schalen	25 cm <sup>2</sup> ; 75 cm <sup>2</sup> ; 150 cm <sup>2</sup> / 60 mm	TPPR
Zellkultur-Pipetten	StripetteR	CostarR

## 2.3 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2-Methoxyethylacetat (MEA)	VWR
5-Bromo-2`-deoxy-uridine (10 mM)	Roche
Aceton	Merck
Acrylamid Mix 30 % Rotiphorese Gel	Roth
Agarose	Invitrogen
Alizarin Rot	Sigma
Alzian Blau	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Ampicillin	Bayer
Anilinblau	Merck
Azokarmin G	Merck
Bio-Rad Protein Assay	Biorad
Blocking Reagenz	Roche
BSA	Sigma
Chloroform	Merck
Collagenase	Sigma
DAPI	Invitrogen
Dextransulfat	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat ( Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck
Dinatriumthiosulfat (Na <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> )	Merck
Distilled Water, Bio Whittaker™	Cambrex
dNTPs	Fermentas
DPBS (Zellkultur)	Lonza
EDTA	Merck
Entellan	Merck
Eosin	Sigma-Aldrich

Essigsäure	Merck
Essigsäureanhydrid	Merck
Ethanol; pro analysis	Merck
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	Roth
Ethylenglykolmonobutylether	Roth
Fluoromount G	Southern Biotech
Formaldehyd (37 %)	Merck
Formamid, pro analysis	Merck
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco™/ Biochrom AG
Glutaraldehyd (25 %)	Sigma
Glycin, pro analysis	Merck
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich
Hanks Buffered Saline Solution	Biochrom AG
HEPES	Calbiochem
HISS (Schafserum)	Gibco
Hydromatrix	Micro-Tech-Lab
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
KOH	Merck
L-Glutamin	Cambrex
Lichtgrün	Sigma
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck
Maleinsäure	Sigma
Mercaptoethanol	Fluka
Methanol, pro analysis	Merck
Methyl-Methacrylat	Polyscience
Milchpulver	Roth
Natriumacetat	Merck
Natriumbicarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdeoxycholate	Sigma

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumtetraborat	Merck
Natronlauge	Merck
NBT/BCIP	Roche
Nonidet P40 (NP-40)	Fluka
Normal Goat Serum	Vector Laboratories
Normal Horse Serum	Vector Laboratories
Orange G	Merck
Paraffin	Leica
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
Penicillin/Streptomycin	Cambrex
peqGold TriFast	peqLab Biotechnologie
Phenol	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Phosphowolframsäure	Waldeck
Proteinase K (Stock 20 mg/ml)	Boehringer
Salzsäure (37 %)	Merck
Saponin	Roth
Säurefuchsin	Fluka
Silbernitrat	Sigma
Sucrose	Invitrogen
SYBR Green	Applied Biosystems
TEMED	Invitrogen
Tetramisol	Merck
Toluidinblau	Sigma
Triethanolamin (TEA)	Merck
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	Merck
Tris-Base	Merck
Triton X-100	Sigma
t-RNA (Typ III baker's yeast)	Sigma
Trypsin	Cambrex / Gibco
Tween20	Roth

Ultraclear	J.T.Baker
Wasserstoffperoxid (30 %)	Merck
Xylol	Roth

## 2.4 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
10 x DNA Polymerase Puffer	750 mM Tris HCl pH 8.8; 200 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 15 mM MgCl <sub>2</sub> mit H <sub>2</sub> O auffüllen, steril filtrieren
10 x Pfu-Puffer mit MgSO <sub>4</sub>	200 mM Tris/HCl pH 8.8; 100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 100 mM KCl; 1 mg/ml BSA; 1 % Triton X-100; 20 mM MgSO <sub>4</sub>
10 x TBS-Puffer	300 ml 5 M NaCl; 100 ml 1M Tris; auffüllen auf 1l mit H <sub>2</sub> O-DEPC; pH 7.4
4 % PFA / EDTA	40g PFA in 0,5 mM EDTA; pH 7.4
4 % PFA / PBS	40 g PFA in 1l PBS durch Erhitzen lösen; pH 7.4
6 x Ladepuffer für Agarosegele	15 g Sucrose; 0,175 g Orange G auf 50 ml H <sub>2</sub> O
LB-Medium (Luria Bertami)	10 g select pepton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; pH 7.4; autoklavieren
PBS (10 x)	80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; auffüllen auf 1l mit H <sub>2</sub> O-DEPC; pH 7.4
PBST	PBS mit 0,1 % Tween20
SDS-Puffer (tailtip)	0,85 % SDS; 17 mM EDTA; 170 mM NaCl; 17 mM Tris/HCl; pH 7.5; 200 µg/ml Proteinase K
TAE-Puffer	0,04 M Tris; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; pH 8
Citratpuffer	2,94 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat auf 1l H <sub>2</sub> O; pH 6
<b><i>In situ</i> Hybridisierung auf Paraffinschnitten (ISH)</b>	
10 x RNase Waschpuffer	800 ml 5 M NaCl; 100 ml 1M Tris; 100 ml 0,5 M EDTA
20 x SSC Puffer (saline-sodium citrate)	175,32 g/L (3 M) NaCl; Na <sub>3</sub> -Citrate: 88,23 g/L (0,3 M)
5 x MABT	100 ml 1M Maleinsäure; 30 ml 5 M NaCl; 10 ml 10 % Tween20; auffüllen auf 200 ml H <sub>2</sub> O-DEPC
50 x Denhardt´s Solution	1 % Ficoll 400; 1 % Polyvinylpyrrolidon; 1 % BSA
Acetylierungslösung	0,1 M TEA; 500 µl Essigsäureanhydrid auf 200 ml
ALP-Puffer	16 ml NaCl; 80 ml 1M Tris pH 9.5; 40 ml 1 M MgCl <sub>2</sub> , 4 ml 10 % Tween20
Blocking-Lösung	10 % BBR in 1 x MABT
Hybridisierungspuffer	1 ml 1 M Tris; 12 ml 5 M NaCl; 200 µl 0,5 M EDTA; 1,25 ml 20 % SDS; 25 ml 40 % Dextran Sulfat; 2 ml Denhardt´s; 2 ml tRNA; 50 ml Formamid; auffüllen auf 100 µl mit H <sub>2</sub> O-DEPC

**Whole Mount *in situ* Hybridisierung (WM-ISH)**

4 % PFA / PBS/ 0,2 % Glutaraldehyd	50 ml 4 % PFA/PBS; 400 µl Glutaraldehyd; 500 ml 0.5 M EDTA
Alkalische Phosphatase-Puffer	12 ml 5 M NaCl; 30 ml 1 M MgCl <sub>2</sub> ; 6 ml 10 % Tween20; 60 ml 1 M Tris pH 9.5; 300 mg Tetramisol; auffüllen auf 600 ml mit A.bidest
Hybridisierungspuffer	25 ml Formamid; 12,5 ml 20 x SSC; 25 µl Heparin; 500 µl 10 % Tween20; auffüllen auf 50 µl mit H <sub>2</sub> O-DEPC
PBST/Glycin	2 mg/ml Glycin
PBST/Tetramisol	500 mg Tetramisol auf 1 l PBST
Proteinase K-Puffer	1 ml Tris pH 7; 0,1 ml 0.5 M EDTA; auf 500 ml H <sub>2</sub> O-DEPC auffüllen
RIPA-Puffer	2,5 ml SDS 10 %; 15 ml 5 M NaCl; 5 ml NP 40; 2,5g Deoxycholat; 1 ml 0,5 M EDTA; 25 ml 1 M Tris (pH 8); auffüllen auf 500 ml mit H <sub>2</sub> O-DEPC
RNase A-Lösung	50 ml RNase-Lösung; 500 µl 10 mg/ml RNase-Stock
SSC/FA/T	100 ml 20 x SSC; 500 ml Formamid; 10 ml 10 % Tween20; auffüllen auf 1 l mit H <sub>2</sub> O

**Skelettpräparation**

Alizarin Rot-Färbelösung	50 mg Alizarin Rot in 1 % KOH
Alzian Blau-Färbelösung	500 mg Alzian Blau; 800 ml 100 % EtOH; 200 ml Eisessig

**Plastikeinbettung**

Gieslösung	200 ml entstabilisiertes MMA; 20 ml LPG; 1,1g Benzoylperoxid
MMA Infiltrationslösung (4°C, dunkel)	200 ml entstabilisiertes MMA (über Aluminiumoxid 60 Säule); 20 ml LPG; 0,66 g Benzoylperoxid
Streckflüssigkeit	300 ml 70 % EtOH; 200 ml Ethylenglycolmonobutylether

**Western Blot**

1 x Transferpuffer	100 ml 10 x Transferpuffer, 200 ml MetOH add 1 l H <sub>2</sub> O
10 x Transferpuffer	29 g Glycin; 58 g Tris Base; 40 ml 10 % (w/v) SDS /l
4 x Proteinprobenpuffer	2 ml 1 M Tris; 4 ml Glycerin; 2 ml 20 % (w/v) SDS; 400 µl 1 % Bromphenolblau; 600 µl H <sub>2</sub> O, 1 ml 40 x Reduktionsmittel (z.B. β-Mercaptoethanol); pH 7.5
5 x Laufpuffer	25 mM Tris; 250 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS
Lysispuffer (RIPA-Puffer)	1,5 ml 5 M NaCl; 0,5 ml 1M Tris pH 7.2; 0,5 ml 10 % SDS; 5 ml 10 % Triton X-100; 0,5 g Deoxycholat; 0,5 ml 0,5 M EDTA; add 50 ml A.bidest; Zugabe Complete (Protease Inhibitor Cocktail Tablets); 200 µM PMSF

Stripping-Puffer 7,5 ml 1 M Glycin, 2 ml 10 % (w/v) SDS/50 ml H<sub>2</sub>O; p2.5

### Färbelösungen Histologie

0,1 % Säurefuchsin-Lösung	0,2 g Säurefuchsin; add 200 ml A.bidest
0,25 % Toluidinblau-Lösung	1 g Toluidinblau; 1,9 g Natriumtetraborat in 100 ml A.bidest lösen
Alzian Blau-Lösung	2 g Alzian Blau; 200 ml A.bidest; pH 2.5
Anilinblau-Orange G-Lösung	2,5 g Anilinblau; 10 g Orange G in 500 ml A.bidest lösen; 40 ml Essigsäure; aufkochen und filtrieren; Stock 1:2 bis 1:4 verdünnen
Azokarmin-Lösung	0,5 g Azokarmin G in 500 ml A.bidest; aufkochen und filtrieren; 5 ml Essigsäure
Lichtgrün	0,2 g Lichtgrün; add 200 ml A.bidest
Orange G-Lösung	8 g Phosphowolframsäure, 4 g Orange G; add. 200 ml A.bidest

### Immunhistochemie

HS/BSA-Puffer	1 ml 10 x PBS; 300 µl HS; 300 µl 10 % BSA; 50 µl 20 % TritonX-100; ad 10 ml A.bidest
TSA-Blockingpuffer	10 % Horse Serum; 10 % 10 x PBS; 80 ml A.bidest; 0,5 g TSA Blocking Reagenz; 0,1 % Triton X-100

### X-Gal-Färbung (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid)

Fixierlösung	0,2 % Glutaraldehyd; 2 mM MgCl <sub>2</sub> ; 5 mM EGTA; in PBS
Waschpuffer	2mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,01 % SDS; 0,02 % Nonident P40 in PBS
X-Gal-Färbelösung	1mg/ml X-Gal; 5mM K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> ; 5mM K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> ; 2mM MgCl <sub>2</sub> in PBS

## 2.5 Molekularbiologische Reaktionssysteme/Kits

Bezeichnung	Hersteller
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce
Big Dye V3.1 Terminator Sequencing Kit	Applied Biosystems
BrdU Labeling and Detection II	Roche
DIG-RNA-Labeling Kit	Roche
ECL-Roti-Lumin	Roth
Gel-out Gel extraction Kit	A & A Biotechnology
Invisorb Spin PCR Purification	Invitek
Plasmid DNA Mini Kit	A & A Biotechnology

Plasmid DNA Purification Kit Nucleobond® AX (Midi; Maxi)	Machery-Nagel
Ras Activation Assay Kit	Upstate
Technovit Methyl Methacrylate Kit 9100	EBScience
Weigerts Hämatoxylinlösung A und B	Roth
TaqMan Reverse Transcription Reagent Kit	Applied Biosystems
TSA Tyramide Signal Amplification	Perkin Elmer
Vectastain Elite ABC Kit	Vector Laboratories

## 2.6 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
DNase I	Roche
Proteinase K	Boehringer Ingelheim
Reverse Transkriptase SuperscriptII	Invitrogen
RNase A	Sigma
Sp6 Polymerase	Roche
T3 Polymerase	Roche
T4 Ligase	Fermentas
T7 Polymerase	Roche
Taq Polymerase	Fermentas

## 2.7 Primer

**Tab. 2: Primer**

Es werden alle Primer der Genotypisierungs-PCR, quantitativen Real Time PCR (qRT-PCR), zur Amplifikation der Sondensequenz aus cDNA sowie Standardprimer für die Klonierung aufgelistet.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
<b>Genotypisierung</b>	
Cre1	GAGTGATGAGGTTGCAAGA
Cre2	CTACACCAGAGACGGAAATC
NF1 P1	CTTCAGACTGATTGTTGTACCTGA
NF1 P2	CATCTGCTGCTCTTAGAGGAACA
NF1 P3	ACCTCTCTAGCCTCAGGAATGA
NF1 P4	TGATTCCCACTTTGTGGTTCTAAG
Rosa_1295	GCGAAGAGTTTGTCTCAACC
Rosa26F2	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT

Rosa523	GGAGCGGGAGAAATGGATATG
---------	-----------------------

**Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) Forward ; Reverse (5' → 3')**

Col1	TG TTCAGCTTTGTGGACCTC; TCAAGCATACCTCGGGTTC
Col10a1	GTGAAAGGGACTCAGGTTTGG; CGTAGGCGTGCCGTTCTTAT
Col2a1	CTTCAATTCAACATCCCCTTTTG; TCTACTTTTGAAGCTCGCATGCT
GAPDH	AACTTTGGCATTGTGGAAGG; CAGTCTTCTGGGTGGCAGTG
Ihh	GCCGACCGCCTCATGAC; CATGACAGAGATGGCCAGTGA
Lef1	AGGAAAACCGAAGCGAAAGG; GCAGACGTCCGCGTTAGAG
MMP13	CTCTTGCGGGAATCCTGAAG; GCCTGTCAACTGTGGAGGTCA
MMP9	TCGTGGCTCTAAGCCTGACC; GGTCAGTTGTGGTGGTGGC
Pea3	GATGGAGCGGAGGATGAAAG; GTGTAGGGCACTCGCTGGTC
PthrP	CTGGTTCAGCAGTGGAGTGTC; CTGGTTCAGCAGTGGAGTGTC
PthrPR	GGCAGCTGGGAGGTGGTT; ATGAACTTGAGGCACTCGCTGTA
Rank11	GTACGCCAACATTTGCTTTTCG; GTAGGTACGCTTCCCGATGTTT
Runx2	CCGTGGCCTTCAAGGTTGT; CGGCCATGACGGTAACCA
Sox9	AGATGCAGTGAGGAGCACTGAGT; AGGTCTATGGCTGAAAACATTGC
VEGF	ACCAGACCTCTCACCGGAAA; GATGGCGTGGTGGTGACA
VEGF 146	GCAGACCAAAGAAAGACGAACA; CAGCCTGGCTCACC
VEGF 190	GCAGACCAAAGAAAGACGAACA; TCCGCTCTGAACAAGGCTC
VEGF 214	GCAGACCAAAGAAAGACGAACA; CTTTCCCTTTCCTCGAACTGA
Opn	CCTGCTTGGGTTTGCAGTCTT; GCTGGTTTCCTCCGAGAATG
Ptc	TGATGAAATCCATAATGTCTGGAACCT; CCTTGCTGTCATTTATAACGAAACG

**Sonden**

Col1	CCCTACTCAGCCGTCTGTGC; GGGTTCGGGCTGATGTACC
Col10a1	(Kim et al. 1999)
Col2a1	CGACATCAAACCTCTGCCATC; TGGTTCGGGTCAATCCAG
Dkk3	TTGGCTTCATAGGGGAAGTG; TTGTGTAGCCACTGCCTCAG
Gdf5	(Storm et al. 1994)
Ihh	(Vortkamp et al. 1996)
Lbx1	(Jagla et al. 1995)
MMP13	CATTCAGCTATCCTGGCCACCTTC; CATCCACATGGTTGGGAAGTTCTG
MyoD	(Sassoon et al. 1989)
Myogenin	(Sassoon et al. 1989)
Opn	(Kim et al. 1999)
Pax3	(Goulding et al. 1994)
Ptc	(Vortkamp et al. 1996)
sFRP2	AGTTCCTGTGCTCGCTCTTC; CTGTAGCTTTCCCGGACTGT

Wnt4	GTACCTGGCCAAGCTGTCAT; CAGCCTCGTTGTTGTGAAGA
------	--

**Standardprimer**

Sp6	CATTAGGTGACACTATAG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

**2.8 Längenstandards**

Bezeichnung	Hersteller
-------------	------------

**Western Blot**

Protein-Größenmarker Precision Plus Protein Standards      Bio-Rad

**DNA-Gelelektrophorese**

DNA-Größenmarker 100bp      Fermentas

**2.9 Antikörper****Tab. 3: Antikörper**

Die Tabelle beinhaltet alle verwendeten Primär- und Sekundärantikörper, die in der Immunhistochemie, Western Blots sowie *in situ* Hybridisierung (ISH) und Whole mount *in situ* Hybridisierung (WM-ISH) verwendet werden. Abkürzungen: WB – Western Blot; IHC – Immunhistochemie; ISH – *in situ* Hybridisierung

Bezeichnung	Verdünnung/Anwendung	Spezies	Hersteller
Actin	WB 1:1000	Kaninchen	Sigma A5060
Alexa Fluor 488 anti goat	IHC 1:1000	Ziege	Molecular Probes
Alexa Fluor 488 goat anti-guineapig	IHC 1:1000	Meerschwein	Molecular Probes
Alexa Fluor 546 goat anti-mouse	IHC 1:1000	Maus	Molecular Probes
Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit	IHC 1:1000	Kaninchen	Molecular Probes
Anti-DIG-Fab-ALP	WM 1:5000; ISH 1:2500		Roche
BrdU	IHC und ICC 1:50	Maus	Roche
Desmin	IHC 1:200	Ziege	R&D
Goat Anti-Mouse IgG HRP Conjugate	WB 1:1000	Maus	Millipore
Goat Anti-Rabbit IgG Peroxidase Conjugate	WB 1:1000	Kaninchen	Merck

Labelled Polymer- HRP	nach Anleitung des Herstellers	Kaninchen	DakoCytomation
Lbx1	IHC 1:100	Meerschwein	C. Birchmeier Labor eigene Herstellung
MyoD	IHC 1:100	Kaninchen	Santa Cruz
Osteopontin	WB 1:1000	Maus	DSHB MPIIB10 <sub>1</sub>
p21/Waf1	WB 1:1000	Maus	Santa Cruz sc-6246
p42 (ERK2)	WB 1:1000	Kaninchen	Cell Signaling #9108
p44 (ERK1)	WB 1:1000	Kaninchen	Cell Signaling #4372
phospho-p42/44 (pERK1/2)	WB 1:1000	Kaninchen	Cell Signaling #9102
Sox9	IHC 1:50; WB 1:1000	Kaninchen	Santa Cruz sc-20095
Streptavidin Alexa Fluor 488 Conjugate	IHC 1:500		Invitrogen

## 2.10 Vektoren, Bakterienstämme und Nährmedien

E.coli Top10:	hauseigene Herstellung
LB Medium:	10 g Bacto-Trypton; 5g Bacto-Hefeextrakt; 10 g NaCl; auf 1l mit A.bidest auffüllen; pH 7.5; autoklavieren
LB-Agar:	LB-Medium; 1,5 % Bacto-Agar (w/v); autoklavieren
pTA1 (50 ng pro 0,5 ml):	hauseigene Herstellung

## 2.11 Zelllinie und Medium

isolierte Chondrozyten aus Knorpelgewebe des Kniegelenks (P4) werden in folgendem Nährmedium kultiviert:

Zusatz	Hersteller
DMEM (4,5 g/L Glucose)	BioWhittaker Cambrex
10 % FCS	Biochrom
2 % L-Glutamin	BioWhittaker Cambrex
1 % Penicillin/Streptomycin	BioWhittaker Cambrex

## 2.12 Tiere

Die Züchtung und Verkreuzungsarbeit der Mäuse wird im institutseigenen Tierhaus von Janine Wetzel und Katja Reinsch unter der Leitung von Dr. L. Hartmann vorgenommen.

- $Nf1^{flox/flox}$  Maus (Zhu et al. 2001): Exon 31 und 32 der *Nf1* Allele sind mit loxP-Sequenzen flankiert, bezogen über Prof. L. Parada
- Prx1-Cre Maus (Logan et al. 2002): Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Prx1-Promotors, bezogen über Dr. A. Nagy
- Rosa26 (Soriano 1999): Reportermausstamm
- Col2-Cre Maus (Onyekwelu et al. 2009): Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Col2-Promotors, bezogen über Prof. G. Karsenty

## 2.13 Computerprogramme

Programm	Verwendung
Axio Vision Outmess	Quantifizierung
AxioVision 4.6	Digitale Photographie
CorelDraw	Bildbearbeitung
DNA Star Seqman	Sequenzen
EASY win 32	Geldokumentation
Excel	Auswertungen
Graph Pad Prism	Auswertung, Erstellung der Graphiken
Windows2000	Betriebssystem

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 DNA-Isolierung

##### Isolierung von Plasmid-DNA

Unter Verwendung des Plasmid DNA Mini Kit (A&A Biotechnologie) konnte Plasmid-DNA im kleineren Massstab isoliert werden. DNA-Isolationen im grösseren Massstab (Midi als auch Maxipräparation) erfolgten mittels Nucleobond PC100 bzw. PC500 Kits von Macherey-Nagel. Es wurde stets nach Anleitung des Herstellerprotokolls gearbeitet (2.5).

##### Isolierung von genomischer DNA

Genomische DNA wurde aus Biopsiematerial z.B. Schwanzspitzen, Knochen- als auch Knorpelgewebe oder Amnien isoliert. Dies war notwendig, um die Genotypen der Mäuse zu ermitteln. Dazu wurde das spezifische Gewebe (bei Embryonen: Amnion; für quantitative PCR: Knochen- Knorpelgewebe; adulte Mäuse: Schwanzspitzen) in 1 ml 0,5 M SDS-Puffer (*tailtip* Puffer) und Proteinase-K verdaut. Am darauf folgenden Tag wurde zum Ansatz 0,5 ml 5M NaCl gegeben und dieser schüttelnd für 10 min bei RT inkubiert. Anschliessend wurden die Proben für 10 min auf Eis gestellt, bei 10.000 rpm 10 min zentrifugiert und dann der Überstand in ein neues Reaktionsgefäss überführt, in welchem 1 ml kaltes 100 % EtOH vorgelegt war. Es wurde erneut für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pelett zweimalig mit 70 % EtOH bei 12.000 rpm und 4 °C gewaschen. Danach wurde das Pelett getrocknet und in 100 µl A.bidest aufgenommen.

#### 3.1.2 RNA-Isolierung

Gesamt-RNA wurde mit peqGold TriFast isoliert. Hierfür wurde das Gewebe zunächst in 10fachem Volumen TriFast homogenisiert und 5 min bei RT inkubiert. Pro ml TriFast wurden 200 µl Chloroform zugegeben und weitere 3 min bei RT inkubiert. Anschliessend wurden die Proben 20 min bei 4 °C (13000 rpm) zentrifugiert und die obere wässrige Phase abgenommen, mit 500 µl 100 % EtOH pro ml TriFast versetzt und weitere 10 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pelett wurde zweimalig mit 70 % EtOH bei einer Zentrifugation von 13000 rpm 4 °C gewaschen, anschliessend kurz getrocknet und final in 50 bis 100 µl RNAse freiem Wasser gelöst.

### 3.1.3 Herstellung von cDNA (Reverse Transkription)

Für die Herstellung von cDNA aus Total-RNA wurde nach Anleitung des Herstellers das Kit SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) verwendet (2.5). Um allerdings cDNA für die quantitative Real Time PCR zu erzeugen, wurde mit dem TaqMan Reverse Transcription Reagents Kit nach Anleitung (Roche) gearbeitet (2.5).

### 3.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

#### Genotypisierungs-PCR

Für die Genotypisierungen wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien oder Amnien gewonnen (3.1.1). Die gefällte DNA wurde standardmäßig in 100 µl A.bidest aufgenommen und bei der Genotypisierung 1:5, 1:10 und gegebenenfalls 1:20 verdünnt eingesetzt.

## *Nf1*

#### Tab. 4: *Nf1*-Genotypisierung (Nachweis der *Nf1* Allele)

Um den Genotyp der  $Nf1^{flox/flox}$ ,  $Nf1^{Prx1}$  der  $Nf1^{Col2}$  Mäuse zu ermitteln, wird eine spezielle Genotypisierungs-PCR angesetzt. Dabei wird detektiert, ob eines, beide oder keines der *Nf1* Allele durch Rekombination ausgeschnitten wurden. Als Primerkombinationen werden zum einen P1 und P2 bzw. P1 und P3 eingesetzt. Die zu erwartenden Bandengrößen liegen bei der Primerkombination P1 und P2 bei ca. 300 bp, bei P1 und P3 bei etwa 500 bp (Abb. 8). Die Primersequenzen sind Tab. 2 zu entnehmen.

Reaktion (25 µl Ansatz)		Programm		
Menge	Reagenz	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
· 2,5 µl	10 x Puffer	94 °C	3 min	x 1
· 0,3 µl	dNTPs (12.5 mM)	94 °C	30 sec	x 35
· 1 µl	3' Primer	50 °C	30 sec	
· 1 µl	5' Primer	72 °C	1.10 min	
· 0,4 µl	Taq	72 °C	5 min	x 1
· 1 µl	DNA	4 °C	∞	
· 18,8 µl	A.bidest			

**Cre****Tab. 5: *Nf1*-Genotypisierung (Nachweis der Cre-Rekombination)**

Zweiter Teil der *Nf1*-Genotypisierung ist der Nachweis der Cre-Rekombinase. Tiere/Embryonen, die als homozygot deletierte *Nf1* Tiere identifiziert werden, müssen zusätzlich Cre positiv sein. Es wird eine DNA-Bandengröße von ca. 700 bp erwartet. Die Primersequenzen sind Tab. 2 zu entnehmen.

Reaktion (25 µl Ansatz)		Programm		
Menge	Reagenz	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
· 2,5 µl	10 x Puffer	94 °C	3 min	x 1
· 0,3 µl	dNTPs (12.5 mM)	94 °C	30 sec	x 35
· 1 µl	Cre1 Primer	55 °C	30 sec	
· 1 µl	Cre2 Primer	72 °C	1 min	
· 0,4 µl	Taq	72 °C	5 min	x 1
· 1 µl	DNA	4 °C	∞	
· 18,8 µl	A.bidest			

**Rosa26R****Tab. 6: Rosa26-Genotypisierung (Nachweis der Cre-Integration und LacZ Expression)**

Bei den Nachkommen einer Rosa26/ PrxCre-Verpaarung bzw. Rosa26/Col2Cre-Verpaarung wird überprüft, ob die gefloxtete Neomycinkassette durch die Cre-Rekombinase herausgeschnitten wurde und damit folglich die Expression des lacZ Gens initiiert. Fand die Exzision statt, wird eine DNA-Bande von ca. 340 bp amplifiziert. Hingegen wird beim WT eine Bande von ca. 650 bp amplifiziert. Die Primersequenzen sind Tab. 2 zu entnehmen.

Reaktion (25 µl Ansatz)		Programm		
Menge	Reagenz	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
· 2,5 µl	10 x Puffer	94 °C	3 min	x 1
· 0,4 µl	dNTPs (12.5 mM)	94 °C	30 sec	x 35
· 1 µl	Primer 1	55 °C	30 sec	
· 1 µl	Primer 2	72 °C	1 min	
· 1 µl	Primer 3	72 °C	5 min	x 1
· 0,4 µl	Taq	4 °C	∞	
· 1 µl	DNA			
· 17,7 µl	A.bidest			

Amplifikation der Sondensequenz aus cDNA

Für die Sondenherstellung wurden die Kandidatengene spezifisch aus cDNA amplifiziert (400 bis 700 bp). Generell wurden die Sonden in die 3' UTR gelegt, um eine hohe Spezifität der jeweilige Sonde zu gewährleisten.

**Tab. 7: Amplifikation der Sondensequenz aus cDNA**

Um eine Sonde für *in situ* Hybridisierung (Paraffinschnitte oder Whole Mount) herzustellen, wird zunächst die Sondensequenz aus cDNA amplifiziert. Sie angewandten Primersequenzen sind Tab. 2 zu entnehmen.

Reaktion (50 µl Ansatz)		Programm		
Menge	Reagenz	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
· 5 µl	10 x Puffer	96 °C	3 min	x 1
· 1 µl	dNTPs (12.5 mM)	96 °C	30 sec	x 35
· 1 µl	Primer 1	55 °C	45 sec	
· 1 µl	Primer 2	72 °C	1 min	
· 0,5 µl	Taq	72 °C	7 min	x 1
· 1 µl	DNA	4 °C	∞	
· 40,5 µl	A.bidest			

Kolonie-PCR

Kolonie-PCR dient der Verifizierung der erhaltenen Klone nach Ligation und Transformation auf erfolgreiche Insertion des amplifizierten *Inserts* und dessen Orientierung im Vektor.

Als DNA-*template* wurde Bakterienmaterial genommen.

**Tab. 8: Ansatz einer Kolonie-PCR**

Mittels Kolonie-PCR wird überprüft, ob das gewünschte *Insert* in den Vektor integriert wurde. Durch die Verwendung zweier Primer kann die Orientierung des Inserts im Vektor bestimmt werden. Die Primersequenzen sind Tab. 2 zu entnehmen.

Reaktion (25 µl Ansatz)		Programm		
Menge	Reagenz	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
· 2,5 µl	10 x Puffer	96 °C	3 min	x 1
· 0,5 µl	dNTPs (12.5 mM)	96 °C	30 sec	x 35
· 0,5 µl	SP6	55 °C	45 sec	
· 0,5 µl	T7	72 °C	1 min	
· 0,2 µl	Taq	72 °C	7 min	x 1
· 21,8 µl	A.bidest	4 °C	∞	

### 3.1.5 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten und DNA-Gelextraktion

Nach einer PCR erfolgte das Auftrennen der amplifizierten DNA-Fragmente in einem Agarosegel. Für ein 1 %iges Agarosegel wurden 1 g Agarose auf 100 ml 1 x TAE eingewogen, aufgekocht und schließlich abgekühlt, um 3 µl Ethidiumbromid dazuzugeben. Bevor die Proben auf das Gel geladen wurden, musste der PCR-Ansatz mit 6 x Ladepuffer versetzt werden. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt. Unter Verwendung von UV-Licht konnten die DNA-Banden anschließend sichtbar gemacht werden.

#### GelOut Kit

Die DNA-Fragmente wurden aus dem Gel geschnitten und mittels GelOut Kit (Quiagen) nach Anleitung durchgeführt.

#### Prinzip „Freeze and Queue“

Diese Methode dient dem Aufreinigen großer DNA-Fragmente. Dazu wurden die DNA-Banden aus dem Agarosegel geschnitten, mit gleichem Volumen Phenol versetzt und direkt in flüssigen Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 13000 rpm bei RT zentrifugiert und die obere Phase, welche die DNA enthält in ein neues Reagenzgefäß überführt. Dazu wurde das gleiche Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gegeben und erneut für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Wiederholt wurde die obere Phase in ein neues Reagenzgefäß überführt, diese mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) überschichtet und erneut für 5 min zentrifugiert. Danach wurde erneut die obere Phase isoliert, mit 1 µl Glykogen versetzt, 1/10 Volumen NaOAc (3M pH 5,2) dazugegeben sowie 2,5 Volumen kaltes 100 % Ethanol. Der Ansatz wurde mindestens 20 min bei -20°C gefällt, wiederholt 20 min bei 13000 rpm zentrifugiert und zweimal mit 70 % Ethanol beim Zentrifugieren gewaschen. Final wurde das Pelett in A.bidest gelöst.

### 3.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte am Photometer. Dafür wurden 2 µl des Plasmids in 48 µl A.bidest verdünnt und die Konzentration dieses Gemisch in einer Küvette photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen.

### 3.1.7 Klonierung von DNA-Fragmenten in bakterielle Vektoren

Nach der Amplifikation der spezifischen Sonden-Fragmente aus cDNA (3.1.4), erfolgte die Aufreinigung des PCR-Fragmentes mittels *PCR Purification Kit (Invisorb Spin Rapid* von Invitex).

Ligation

Über Ligation können die DNA-Fragmente in Plasmid-DNA eingefügt werden.

Die durch PCR gewonnenen Fragmente wurden in den aus eigener Herstellung entwickelten pTA1-Vektor ligiert.

**Tab. 9: Ligationsansatz**

Zum hauseigen entwickelten pTA1-Vektor wird das DNA-Fragment, Ligationspuffer, PEG 4000 und die Ligase hinzugegeben. Der Ansatz wird üN im Wasserbad bei einer Temperatur von 16°C inkubiert.

**Reaktion (20 µl Ansatz)**

Menge	Reagenz
· 20 – 100 ng	DNA Fragment
· 2 µl	10 x Ligationspuffer
· 2 µl	PEG 4000
· 1 µl	Ligase
1 Aliquot	pTA1
· add auf 20 µl mit A.bidest	

Transformation

Die Hälfte des Ligationsansatzes (Tab. 9) wurde zusammen mit 100 µl *E.coli* Top10 pipettiert und der Ansatz für 30 bis 45 min auf Eis inkubiert. Es folgte der Hitzeschock bei 37 °C für 1 min. Dann wurde der Ansatz erneut für 15 min auf Eis gelassen, mit 900 µl LB-Medium versetzt sowie 45 min schüttelt bei 37 °C inkubiert. Es folgte das Ausplattieren des Gesamtansatzes auf einer LB-Platte, welche das entsprechende Antibiotikum enthielt, und die Inkubation üN bei 37 °C. Die gewachsenen Bakterienklone wurden auf erfolgreiche Ligation und Orientierung des Inserts im Vektor mittels Kolonie-PCR (3.1.4) und Sequenzierung hin untersucht.

**3.1.8 DNA-Sequenzierung**

DNA-Sequenzierungen wurden nach der Ketten-Abbruch-Methode (Sanger et al. 1977) durchgeführt (Tab. 10).

**Tab. 10: Ansatz einer Sequenzierungs-PCR**

Die zu untersuchende DNA wird zusammen mit einem Primer, BigDye, Puffer und A.bidest gemischt und im Cyclor nach folgendem Programm schrittweise inkubiert.

Reaktion (10 µl Ansatz)		Programm		
Menge	Reagenz	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
· 50 bis 150 ng	DNA	96 °C	1 min	x 1
· 2 µl	Primer	96 °C	10 sec	x 25
· 1 µl	BigDye	50 °C	5 min	
· 2 µl	5 x Puffer	60 °C	4 min	
add 10 µl A.bidest				

Nachdem die PCR-Reaktion abgeschlossen war, wurde der Ansatz (Tab. 10) mit 1 µl 2 %igem SDS versehen und für 10 min bei 98 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Fällung der Sequenzierreaktion, bei der die Proben zuerst mit 25 µl 100 % EtOH für 1 h bei 4000 rpm (4 °C) und danach mit 150 µl 70 % EtOH für 30 min bei 4000 rpm (4 °C) zentrifugiert wurden. Schließlich wurde das Sediment trocken zentrifugiert und die Sequenzierreaktion konnte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Genetik an der Charité durchgeführt werden.

### 3.1.9 Herstellung von DIG-markierten Sonden

Üblicherweise wurden Sonden in der Größe von 400-700 bp ausgewählt. Zuerst wurde das DNA-Fragment aus cDNA amplifiziert und schließlich in den pTA1-Vektor kloniert (3.1.4 und 3.1.8). Nach Überprüfung der DNA-Sequenz und Ermittlung der Fragment-Orientierung mittels Kolonie-PCR erfolgte die eigentliche Transkription (3.1.9 und 3.1.4).

Dafür wurde das Eluat einer Sp6/T7 PCR aufgereinigt und als Vorlage eingesetzt. Je nach Orientierung des Fragments wurden Sp6- oder T7-RNA Polymerase für die Transkription verwendet. Die *in vitro* Sondentranskription und Markierung mit DIG erfolgte mit dem DIG RNA Labeling Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers. Nach dem Abstoppen der Reaktion wurde die RNA gefällt, indem das Volumen auf 100 µl mit H<sub>2</sub>O DEPC aufgefüllt wurde, der Ansatz mit 10 µl LiCl und 300 µl eiskaltem 100 % EtOH versehen und mind. 1 h bei -80 °C inkubiert wird. Nach einer Zentrifugation von 30 min bei 13 000 rpm wurde zweimalig mit 70 % EtOH gewaschen und das finale RNA Sediment in RNase freiem Wasser in 100 µl aufgenommen. Nach der Kontrolle der Sonde auf einem Agarosegel war die Lagerung der Sonde bei -80 °C stabil möglich.

### 3.1.10 *In situ* Hybridisierung auf Paraffinschnitten (ISH)

Die ISH stellt eine Nachweismethode für mRNA direkt in einzelnen Zellen und Geweben dar. Mittels dieser Methode kann das Expressionslevel und das Expressionsmuster des jeweiligen Gens gewebespezifisch und im Verlauf der embryonalen Entwicklung untersucht werden.

Zuerst wurden Paraffin-Gewebeschnitte deparaffinisiert und rehydriert (zweimalige 15 minütige Ultra Clear-Behandlung; absteigende Ethanolreihe von 100 % bis 25 % EtOH/PBS für jeweils 5 min). Die sich letztendlich in 1x PBS befindenen Schnitte wurden im Anschluss für 10 min in 4 % PFA/PBS fixiert, in 1 x PBST dreimalig für jeweils 5 min gewaschen und dann in Proteinase K-Lösung verdaut. Die Konzentration der verwendeten Proteinase K-Lösung als auch die Behandlungsdauer waren abhängig vom Alter der Embryonen sowie von der Art des Gewebes (E13.5 und E14.5: 10 µg/ml für 10 min; E15.5 bis E17.5: 20 µg/ml für 10 min; P1: 20 µg/ml für 20 min). Nach der Proteinase K-Behandlung wurde erneut 3 x in PBST gewaschen, wiederum für 5 min in 4 % PFA/PBS fixiert, 3 x gewaschen mit PBST und dann für 10 min acetyliert. Nach wiederholtem Waschen in 1 x PBST erfolgte die Prähybridisierung der Schnitte, um unspezifische Bindungen abzudecken. Dafür wurden die Objektträger (versehen mit Abdeckfolie, um das Austrocknen der Schnitte zu vermeiden) für mindestens 2 h mit vorgewärmten Hybridisierungspuffer bei 65°C in einer feuchten Kammer, die mit 5 x SSC/50 % Formamid versehen war, inkubiert. Anschliessend erfolgte die Sondenhybridisierung bei 65°C üN. Dabei wurde 1 µl Sonde auf 100 µl Hybridisierungspuffer eingesetzt, die zuvor 5 min bei 85 °C denaturiert wurde. Am zweiten Tag erfolgte das Ablösen der Abdeckfolie von den Objektträgern in 5 x SSC sowie ein Waschschrift in 1 x SSC/50 % Formamid. Um überschüssige Sonde zu entfernen, wurden die Objektträger schließlich für 10 min bei 37 °C in RNase-Waschpuffer vorinkubiert, dann in RNase-Waschpuffer mit RNase (400 µl auf 200 ml Puffer) für 30 min bei 37 °C inkubiert und abschließend erneut für 10 min in RNase-Waschpuffer gewaschen. Es folgten mehrere Waschschriffe für jeweils 20 min in 2 x SSC und 0.2 x SSC bei 65 °C. Nach zweimaligem Waschen in MABT bei RT wurde für mind. 2 h mit 20 % HISS/MABT in einer Feuchtkammer geblockt, um unspezifische Wechselwirkungen mit dem Antikörper zu vermeiden. Nach dem Blocken erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper anti-DIG-AP in 5 % HISS/MABT (1:2500) üN bei 4 °C. Am dritten Tag wurden die Schnitte mehrmals in MABT für jeweils 5 min gewaschen und für 10 min in ALP-Puffer vorinkubiert. Final erfolgte die enzymatische Reaktion mittels NBT/BCIP in ALP-Puffer (jeweils 35 µl auf 100 ml ALP-Puffer) bei RT in einer lichtgeschützten Reaktion. War ein spezifisches Signal auf den Schnitten erkennbar, so wurde die Reaktion abgestoppt, indem die Ob-

jektträger erneut mit ALP-Puffer gespült wurden, zweimalig mit 1 x PBS gewaschen, 30 min in 4 % PFA/PBS nachfixiert und final mittels Hydromatrix eingedeckelt.

### 3.1.11 Whole Mount *in situ* Hybridisierung (WM-ISH)

Für eine WM-ISH wurden Embryonen der Stadien E9.5 –E13.5 in PBS/DEPC präpariert und üN in 4 % PFA/PBS fixiert. Am folgenden Tag wurden die Embryonen 2 x 15 min in PBST gewaschen, 2 x 15 min in 50 % MetOH und zuletzt in 100 % für mind. 15 min inkubiert. Nach einem Wechsel des 100 % MetOH war eine Lagerung der Embryonen bei -20°C über mehrere Wochen möglich. Zur Hybridisierung wurden die Embryonen in einer absteigenden MetOH Reihe rehydriert, mit PBST zweimal gewaschen und in 6 % Wasserstoffperoxid in PBST für 1 h bei 4°C gebleicht. Je nach Entwicklungsstadium schloss sich ein 3-8 minütiger Verdau mit Proteinase K bei RT an. Die Stadien E9.5 –E11.5 wurden mit 10 g/ml Proteinase K für 3 min, E12.5 mit 20 g/ml für 5 min und E13.5 mit 20 g/ml für 8 min behandelt. Nach mehrfachem Waschen mit PBST, PBST/Glycin und RIPA-Puffer wurden die Embryonen für 20 min in 4 % PFA/0,2 % Glutaraldehyd fixiert und wieder mehrfach in PBST, PBST/Hybridisierungspuffer und Hybridisierungspuffer gewaschen. Nach der Prähybridisierung bei 65 °C für mindestens 3 h wurden die Embryonen üN mit der gewünschten Sonde bei ebenfalls 65 °C inkubiert. Für die Herstellung des Sondenmixes wurden Hybridisierungspuffer und tRNA (100 µg/ml) 100:1 gemischt und je 1 ml davon mit 10 µl Sonde (Endkonzentration 0,25 µg/ml) vereint. Dieser Mix wurde 5 min bei 80 °C inkubiert, um die Sonde zu denaturieren, und im Anschluss zu den Embryonen gegeben. Überschüssige Sonde wurde am nächsten Tag entfernt, indem zweimalig für je 30 min bei 65 °C mit frischem Hybridisierungspuffer gewaschen wurde. Nachdem die Embryonen auf RT abgekühlt waren, folgte ein RNaseA-Verdau bei 37 °C. Anschließend wurde mehrfach mit Formamid-Puffer bei 65°C gewaschen, zunächst 1:1 verdünnt mit RNase-Lösung und später verdünnt mit MABT (1:1), gefolgt von zwei Waschschritten mit MABT. Zur Absättigung unspezifischer RNAs wurden die Präparate in Blockierlösung 1 h vorbehandelt und anschließend üN bei 4 °C mit Anti-DIG-Fab Antikörper (1:5000) in 1 % BBR/MABT inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden ungebundene Antikörper während eines 1-tägigen Waschens mit PBST/Tetramisol unter mehrfachem Lösungswechsel entfernt. Zur Detektion des Antikörpersignals wurden die Embryonen zunächst 3 x für 20 min in ALP-Puffer äquilibriert und anschließend mit BM Purple AP Substrat versehen und bei RT inkubiert bis ein deutlich sichtbares Signal zu erkennen war. Zur Konservierung der Signale wurden die Präparate letztlich 3 x mit ALP-Puffer gewaschen und in 4 % PFA/PBS fixiert. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit dem Binokular und der AxioVision 4.6 Software.

### 3.1.12 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Ziel der Real Time-PCR ist die Detektion von Transkriptmengen, die einen direkten Vergleich der Expressionsstärken gewünschter Zielgene erlaubt. Das Prinzip beruht auf einer herkömmlichen PCR-Reaktion, in der hingegen zusätzlich ein Fluoreszenzfarbstoff bei der Amplifizierung in die DNA eingebaut wird. Durch die zyklische Synthese wird das Produkt jeweils verdoppelt. Das Signal des Farbstoffes wird pro Zyklus gemessen. Es ist proportional zur Menge der cDNA und ermöglicht damit eine Quantifizierung. Als Standard wird das Haushaltsgen *Gapdh* eingesetzt.

Nachdem mit Hilfe des TaqMan Reverse Transcription Reagents Kits cDNAs synthetisiert wurden, erfolgte die Reaktion im 384 Well Format (Tab. 11).

Tab. 11: Ansatz einer qRT-PCR

Menge	Reagenz
· 6 $\mu$ l	cDNA (1:10)
· 3 $\mu$ l	Primermix
· 9 $\mu$ l	SYBR Green PCR Mastermix

## 3.2 Proteinbiochemische Methoden

### 3.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte nach Anleitung des Herstellers (BCA Protein Assay Reagent Kit). Mit Hilfe einer Eichgerade bekannter BSA-Konzentrationen wurden die unbekanntes Lysatkonzentrationen berechnet. Mittels eines ELISA-Readers wurde die Adsorption bei 562 nm gemessen.

### 3.2.2 SDS-PAGE nach Laemmli

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient zur Auftrennung als auch zur Reinheitskontrolle von Proteinen (Tab. 12).

## SDS-Polyacrylamid-Gel

### **Tab. 12: Ansatz eines 10 %igen Proteingels**

Das SDS-Polyacrylamid-Gel besteht aus einem oberen Sammelgel, welches der anfänglich gleichmäßigen Probenverteilung dient und einem unteren Trenngel, in welchem die unterschiedlichen Moleküle je nach Masse unterschiedlich schnell wandern.

<b>Sammelgel (5 ml)</b>		<b>Trenngel (20 ml)</b>	
<b>Menge</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Menge</b>	<b>Reagenz</b>
· 3,4 ml	A.bidest	· 7,9 ml	A.bidest
· 0,83 ml	30 % Acrylamid-Mix	· 6,7 ml	30 % Acrylamid-Mix
· 0,63 ml	1 M Tris (pH 6.8)	· 5 ml	1.5 M Tris (pH 8.8)
· 0,05 ml	10 % SDS	· 0,2 ml	10 % SDS
· 0,05 ml	10 % APS	· 0,2 ml	10 % APS
· 0,005 ml	TEMED	· 0,008 ml	TEMED

### Vorbereitung der Proteinproben

Die Proben wurden immer direkt in Lysispuffer aufgenommen (2.4). Nach der Lyse wurden die Proben mit 4 x Proteinprobenpuffer versehen und vor dem Beladen für 5 min bei 95 °C gekocht. Parallel zu den zu analysierenden Proben wurde immer ein Proteinmarker aufgetragen, der sich aus bekannten Proteinproben zusammensetzt und so das Abschätzen der zu analysierenden Proteingrößen ermöglicht (2.8).

### Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese benötigte den Gebrauch des Laufpuffers (2.4) und dauerte etwa 2 h bei einer angelegten Spannung von 80V.

### **3.2.3 Western Blot**

Mittels Western Blot ist es möglich, über die Detektion mit poly- oder monoklonalen Antikörpern, Proteine aus Kulturzellen oder Zellfraktionen nachzuweisen.

### Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran

Die Proteine wurden anfangs über SDS-PAGE (3.2.2) aufgetrennt und dann auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dafür wurde eine Nitrozellulosemembran in Größe des Gels für wenige Minuten in Methanol aktiviert. Anschließend wurden sowohl die Membran als auch das Gel für 15 – 30 min in 1 x Transferpuffer (2.4) inkubiert. Der Proteintransfer erfolgte nach dem *semi-dry*-Verfahren, in einer dafür vorgesehen Blot-Kammer (Aufbau von

oben/negative Seite nach unten/positive Seite: Whatman Papier-Gel-aktivierte Membran-Whatman Papier). Geblottet wurde für 30 min bei 20 V.

#### Detektion der Proteine mittels Antikörper

Nach dem Blotten wurde die Membran zunächst für 5 min in 1 x TBST gewaschen und dann für mind. 1 h bei RT in 5 % Milch/TBST inkubiert, um unspezifische Bindungen abzudecken. Bei der Verwendung von phosphospezifischen Antikörpern wurde in 5 % BSA/TBST geblockt, da die in der Milch enthaltenen Phosphoproteine stören. Danach wurde die Membran wiederholt in 1 x TBST gewaschen und schließlich mit dem gewünschten Primärantikörper bei 4 °C inkubiert (Tab. 3). Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Membran mehrmals für 5 - 10 min in 1 x TBST bei RT gewaschen sowie mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Danach wurde erneut in 1 x TBST gewaschen und final war es möglich die Proteine auf der Membran mittels enzymatischer Reaktion zu visualisieren.

#### Visualisierung der Proteine

Die Detektion der Sekundärantikörper und somit der Proteine wurde mittels *enhanced chemiluminescence* (ECL) laut Herstellerprotokoll und mittels Belichtung eines Röntgenfilms durchgeführt. Die Filme wurden im Anschluss daran eingescannt.

#### Wiederholter Gebrauch einer Membran

Es ist möglich eine Western Blot Membran mehrmals zu verwenden, da die Proteine auf der Nitrozellulosemembran fest gebunden sind. Entfernt werden müssen nur die bereits gebundenen Antikörper. Hierzu wurde die Membran in einem speziellen Stripping-Puffer zweimalig für je 10 min inkubiert (2.4). Um sicher zu gehen, dass die Membran keine gebundenen Antikörper mehr enthält, wurde erneut mittels ECL ein Röntgenfilm entwickelt. Nachdem die Antikörper entfernt wurden, musste wiederholt geblockt werden und eine weitere Inkubation mit einem primären Antikörper konnte erfolgen.

### **3.3 Histologische Methoden**

#### **3.3.1 Skelettpräparation**

Mittels Skelettpräparation und sich anschließender Färbemethoden können die Knochen- und Knorpel-elemente visualisiert werden. Alzian Blau färbt die Proteoglykane des Knorpels blau, wohingegen Knochen (kalzifizierte extrazelluläre Matrix) rot gefärbt wird.

Zur Anfertigung von Skelettpräparationen wurden die Tiere gehäutet, ausgenommen und das Präparat in 100 % Ethanol üN bei 4 °C gelagert. Über eine Inkubationsphase von mehreren Tagen wurden die Präparate zunächst in Alzian Blau-Färbelösung inkubiert (2.4). Anschließend erfolgte ein mehrstündiger Waschschrift in 50 % Ethanol, gefolgt von einer weiteren zweitägigen Inkubation in Alizarin Rot-Färbelösung (2.4)

Im Anschluss an die Färbungen wurden die Tiere unter stetiger Beobachtung zuerst in 1 % KOH, dann in 0,3 % KOH verdaut, und in aufsteigender Reihe bis hin zu 80 % Glycerin überführt, wo sie langfristig lagerfähig waren. Die photographische Analyse erfolgte mit einem Binokular und AxioVision 4.6 Software.

### **3.3.2 Paraffineinbettung und Schnitthanfertigung**

Um das spezifische Gewebe für die Paraffineinbettung vorzubereiten, wurde dieses abpräpariert und im direkten Anschluss üN in 4 % PFA/PBS bei 4 °C inkubiert. Handelte es sich hierbei um postnatales Gewebe, so wurde dieses in einen Dekalzifizierungsschritt (4 % PFA/PBS/EDTA), der abhängig vom Alter des Mausgewebes bis hin zu mehreren Wochen andauern kann, bei 4°C behandelt. Die Präparate wurden nachfolgend mehrmalig mit 1 x PBS gewaschen, danach mindestens 1 h in 50 % EtOH bei 4 °C inkubiert sowie mind. 2 – 3 h in 70 % EtOH dehydriert. Für die weiteren Entwässerungsschritte wurde ein Entwässerungsautomat verwendet, welcher die Präparate durch koordinierte Zeitvorgaben stufenweise bis hin zu Paraffin umsetzen konnte (3 h 90 % EtOH; 3 h 95 % EtOH; 2 h 100 % EtOH mit Vakuum; 2 h 100 % EtOH mit Vakuum; 2 h 100 % EtOH mit Vakuum; 15 min UC mit Vakuum; 15 min UC mit Vakuum; 30 min UC mit Vakuum; 3 h UC/Paraffin mit Vakuum; 3 h Paraffin mit Vakuum). Anschließend wurden die Präparate in der gewünschten Position eingebettet. Nachdem die Paraffinblöcke ausgehärtet waren, konnten sie mittels Mikrotom geschnitten werden. Danach wurden die Objektträger zum Trocknen bei 40 °C auf der Heizplatte inkubiert als auch üN im Trockenofen bei 37 °C gelassen. Die Lagerung der Paraffinschnitte erfolgte stets bei 4 °C.

### **3.3.3 Plastikeinbettung und Schnitthanfertigung**

Plastikeinbettung ermöglicht das Schneiden und Analysieren von kalzifiziertem Gewebe, wobei dabei die Gewebestrukturen grundlegend besser erhalten bleiben.

Dafür wurden die gewünschten Gewebestrukturen präpariert, üN in 4 % PFA/ PBS fixiert, in 1 x PBS mehrmals gewaschen und dann in 70 % EtOH üN bei 4 °C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Präparate 2 h bei 200 mbar entgast, anschließend in 80 % EtOH für mind. 24 h bei 4 °C inkubiert. Es folgten zwei weitere Inkubationsschritte für jeweils mind.

24 h in 90 % EtOH und 100 % EtOH bei 4 °C. Weiterhin wurden die Präparate zweimalig in Infiltrationslösung für jeweils 24 h bei 4 °C inkubiert. Final schloss sich das Einbetten des Gewebes unter Verwendung des Technovit 9100 Kit an. Die ausgehärteten Plastikblöcke wurden für weitere Prozessierungen in Form geschliffen und dann mittels eines Mikrotoms mit einem Stahlmesser geschnitten. Wichtig beim Schneiden war das stetige Befeuchten der Klinge als auch des Blockes mit Streckflüssigkeit (2.4). Im Anschluss daran wurden die fertigen Gewebeschnitte auf Objektträger überführt, diese mit Streckflüssigkeit beschichtet als auch mit Kisolfolie abgedeckt. Mittels einer Presse wurden die Objektträger dann bei 58 °C für mind. 24 h gepresst und getrocknet. Final wurde die Kisolfolie von den Objektträgern gelöst und die Schnitte konnten weiter prozessiert werden.

### **3.3.4 Kryoeinbettung und Gefrierschnittanfertigung**

Gefrierschnitte werden angefertigt, weil sie eine relativ gute Gewebehistologie zulassen. Ein weiterer Vorteil ist die gute Antigenerhaltung, die immunhistochemische Analysen auf Kryoschnitten weitaus einfacher gestalten im Gegensatz zu Paraffinschnitten.

Zuerst wurde das Gewebe präpariert, mehrfach in 1 x PBS gewaschen und schließlich in 30 % Sucrose/PBS überführt, wo es  $\infty$  bei 4°C inkubiert. Am zweiten Tag wurde das Gewebe für mehrere Stunden in Tissue Tek überführt, bevor man es in die Gefrierkammer, die ebenfalls Tissue Tek enthält, positionierte. Es wurde mittels einer isolierten Kältekammer, die ein Gemisch aus 100 % EtOH und Trockeneis enthält, bei einer Temperatur von ca. -20 °C, das langsame und damit schonende Gefrieren des Blockes gewährleistet, eingefroren. Bei -20 °C konnten die Kryoblöcke für einige Wochen gelagert werden. Eine längerfristige Lagerung sollte hingegen bei -80 °C erfolgen. Nachdem das Gewebe eingefroren war, konnte es relativ zeitnah unter Verwendung eines Kryostaten geschnitten werden (10-12  $\mu$ m dicke Schnitte). Die fertigen Objektträger wurden anschließend auf einer Heizplatte bei 40 °C für einige Minuten gebacken und dann unter Feuchtigkeitsausschluss in einer Objektträgerbox bei -20 °C gelagert.

### **3.3.5 Alzian Blau/Hämatoxylin Eosin-Färbung**

Die Hämatoxylin/Eosin-Färbung (HE) ist ein Färbeverfahren in der Histologie, mit dem die verschiedenen Strukturen eines feingeweblichen Schnittes angefärbt werden können. Diese Übersichtsfärbung dient der Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen im mikroskopischen Bild anhand von zwei verschiedenen Einzelfärbungen und ist eine der am weitesten verbreiteten Routinefärbungen für morphologische Untersuchungen. Kombiniert werden kann

diese Färbung mit einer spezifischen Knorpelfärbung, der sog. Alzian Blau-Färbung (AB). Dabei werden mittels blauen Farbstoffs die Proteoglykane der ECM angefärbt.

Zunächst wurden die Schnitte deparaffiniert und rehydriert (30-45 min bei Ultra Clear, absteigende Ethanolreihe bis A.bidest für jeweils 2 min), schließlich für 20-30 min in Alzian Blau-Färbelösung inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Schnitte zweimalig in A.bidest gespült sowie für 5-7 min in der Hämatoxylin-Lösung gefärbt. Nach kurzem Spülen in A.bidest wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser für 10 min gewaschen. Es folgte die Inkubation der Schnitte in der Eosin-Färbelösung für max. 3 min. Anschließend wurden die Schnitte erneut kurz in A.bidest gespült, und dann über eine steigende Ethanolreihe in zweiminütigen Inkubationsschritten bis hin zu Ultra Clear überführt. Final erfolgte das Einbetten mittels Entellan.

### **3.3.6 Masson Goldner-Färbung**

Diese histologische Färbemethode ermöglicht das Visualisieren von Muskelfasern, kollagenhaltigen Strukturen, Fibrinen und Erythrozyten auf Gewebeschnitten. Zunächst wurden Paraffinschnitte deparaffiniert (30-45 min Ultra Clear; Rehydration in absteigender Ethanolreihe für jeweils 2 min; max. 5 min A.bidest) bzw. Plastikschnitte entplastet (3 x 10 min MEA; 2 x 8 min Ultra Clear; absteigende Ethanolreihe für jeweils 2 min bis hin zu A.bidest). Es erfolgte ein zweiminütiger Färbeschritt in Weigerts Eisenhämatoxylin-Lösung sowie ein anschließender Waschschrift in Leitungswasser für 5–10 min. Danach wurden die Schnitte für 5 min in Säurefuchsin inkubiert und 2 x in 1 %iger Essigsäure abgespült. Ein Differenzierungsschritt in Orange G-Färbelösung von 2–5 min schloss sich an. Danach wurden die Schnitte erneut in 1 %iger Essigsäure kurz gewaschen sowie für 5–10 min in Lichtgrün angefärbt. Nach wiederholtem Spülen in 1 %iger Essigsäure wurden die Objektträger über 100 % Ethanol bis hin zu Ultra Clear überführt und mittels Entellan eingedeckelt.

### **3.3.7 Toluidinblau-Färbung**

Eine Färbung mit Toluidinblau dient der Erfassung von Kollagenfasern (blau) und Knorpelmatrix (rötlich violett). Hierfür wurden zunächst Paraffinschnitte deparaffiniert (30-45 min Ultra Clear; Rehydrierung in absteigender Ethanolreihe für jeweils 2 min; max. 5 min A.bidest) bzw. Plastikschnitte entplastet (3 x 10 min MEA; 2 x 8 min Ultra Clear; absteigende Ethanolreihe für jeweils 2 min bis hin zu A.bidest). Dann erfolgte die Inkubation der Schnitte mit 0,25 %iger Toluidinblau-Lösung für 5 min. Final wurde die Färbung der Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe für jeweils 2 min (30 % bis 100 %) differenziert, in Ultra Clear inkubiert und unter Verwendung von Entellan eingedeckelt.

### 3.3.8 Azan-Färbung

Die Azan-Färbung ist ebenfalls eine histologische Übersichtsfärbung. Zuerst wurden die Schnitte entplastet bzw. mittels Xylolinkubation und einer absteigenden Ethanolreihe deparaffinisiert (3.3.6). Es folgte die Inkubation für 15 min in einer Azokarmin-Lösung bei 60 °C, danach wurden die Schnitte in A.bidest gespült. Weiterhin wurden die Schnitte in 1 %iger Essigsäure-Alkohol-Lösung für 1 min gespült. Danach erfolgte eine zweistündige Inkubation in 5 % Phosphowolframsäure. Dann wurde erneut in A.bidest gewaschen und für weitere 2 Stunden in Anilin-Orange G-Lösung bei RT inkubiert. Final wurden die Schnitte über zweiminütige Differenzierungsschritte in einer aufsteigenden Ethanolreihe gespült und schließlich in Entellan eingedeckelt.

### 3.3.9 Immunhistochemie

Als Immunhistochemie bezeichnet man die Detektion von Proteinen auf Gewebeschnitten mittels Antikörper. In dieser Arbeit werden immunhistochemische Analysen sowohl auf Paraffin- als auch auf Gefrierschnitten durchgeführt. Dabei werden direkt fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper zur Detektion verwendet.

#### Paraffinschnitte

Zuerst wurden die Gewebeschnitte deparaffinisiert und rehydriert (30 – 40 min Ultra Clear; 2 minütige Inkubationsschritte in absteigender Ethanolreihe bis hin zu A. bidest). Anschließend erfolgte die sog. Antigendemaskierung, die entweder unter pH 6 im Citratpuffer bzw. unter high pH (DAKO) Bedingungen stattfand. Dazu wurden die Objektträger im jeweiligen Puffer in einer Plastikbox platziert und mittels Mikrowelle 1 x 3 min bei voller Stärke, 5 minütiger Pause und nochmals 3 minütiger Inkubationsphase bei mittlerer Mikrowellenstärke gekocht. Dem schloss sich eine ca. 30 min Abkühlphase bei RT an. Die Gewebeschnitte wurden dann in 1 x PBS gewaschen und schließlich in einer 0,2 % Triton X-100/PBS Lösung für 15 min permeabilisiert. Nach wiederholtem Waschen in 1 x PBS wurden dann unspezifische Bindungsstellen mittels einer Inkubation von mind. 1 h bei RT in einer Feuchtkammer mit 5 % Normal Goat Serum/ 0,2 % Tween 20/ PBS blockiert. Danach erfolgte die Inkubation der Gewebeschnitte mit dem Primärantikörper üN bei 4 °C. Am darauf folgenden Tag wurden die Schnitte mind. 3 x für 5 min in 1 x PBS gewaschen und die Inkubation mit dem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper für mehrere Std. bei RT erfolgte. Dabei wurde zusätzlich zur Inkubationslösung DAPI gegeben (1: 750), um die Zellkerne sichtbar zu machen. Anschließend wurde gründlich mit 1 x PBS gewaschen und mit Fluoromount G eingedeckelt.

Wenn das zu detektierende Signal nicht zufriedenstellend ist, konnte ein Verstärkungsschritt über Biotinyl-Tyramid durchgeführt werden (Tyramid Signal Amplification, TSA). Hierzu wurden vor dem Blockieren in einem 10 minütigen Inkubationsschritt mit 0,75 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol die endogenen Peroxidasen blockiert. Desweiteren wurde als Sekundärantikörper ein HRP-Konjugat (1: 200) für 30 min verwendet und die Peroxidase nach erneutem Waschen in 1 x PBS laut TSA-Herstellerangaben detektiert. Dabei wurde der Verstärkungspuffer von dem Enzym zur Produktion von Biotin verwendet, welches anschließend mittels Streptavidin-gekoppelten Fluoreszenz-Tertiärantikörper detektiert werden konnte.

#### Gefrierschnitte

Die Präparate wurden zusätzlich direkt nach der Präparation (vor dem Wegfrieren) für 2 h bei 4°C in 4 % PFA/PBS inkubiert. Zuerst wurden die Gefrierschnitte für mehrere Stunden langsam aufgetaut, dann erfolgte eine Inkubation in 1 x PBS. Anschliessend erfolgte für mindestens 1 h das Blocken in TSA-Blockingpuffer bei RT. Der Antikörper wurde dann je nach Verdünnung in HS/BSA-Puffer angesetzt und eine Inkubation üN bei 4°C erfolgte (Tab. 3).

Am nächsten Tag wurde mehrmal in 1 x PBST gewaschen bevor die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in HS/BSA-Puffer bei 1 h RT stattfand. Final wurde wieder mehrmal in 1 x PBST gewaschen, bevor schließlich mittels Fluoromount eingedeckelt wurde.

### **3.3.10 X-Gal-Färbung**

#### Embryonen

Bei der X-Gal-Färbung wurde mittels des vom LacZ-Gen kodierenden  $\beta$ -Galaktosidase Enzyms das X-Gal Substrat (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D.galactopyranosid) zu Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl umgesetzt. Sichtbar wurde dies durch eine blaue Färbung.

Für die X-Gal-Färbung auf Gesamtpräparaten wurden die Embryonen präpariert, in 1 x PBS gewaschen und dann bei 4 °C für mindestens 30 min fixiert. Anschließend wurde das Gewebe mehrmals in Waschpuffer gewaschen und schliesslich üN bei 30-37 °C unter Lichtabschluss gefärbt (2.4).

#### Gefrierschnitte

Die Verifizierung der gefärbten Präparate erfolgte auf Schnitten. Dafür wurde das Gewebe präpariert, in 1 x PBS gewaschen und fixiert bei 4 °C für 30-60 min. Nach mehrmaligen PBS-Waschschritten wurde das Gewebe zuerst in eine 15 % Sucroselösung für mehrere Stunden überführt, gefolgt von einer Inkubation in 30 % Sucrose üN bei 4 °C. Am darauf folgenden Tag wurde das Gewebe für mehrere Stunden im Einfriermedium Tissue Tek vorinkubiert,

bevor es mittels Gefriertechnik weiter prozessiert wurde. Nachdem die Gefrierschnitte angefertigt waren, erfolgte die Refixierung in 0,2 % Glutaraldehyd/PBS für 10 min. Dann wurden die Schnitte 3 x für je 5 min in 1 x Waschpuffer gewaschen sowie in die Färbelösung überführt (2.4). Nach erneutem Waschen in 1 x PBS erfolgte die Dehydrierung der Schnitte über eine steigende Ethanolreihe bis hin zu Ultra Clear. Mittels Entellan wurden die Schnitte dann letztendlich eingedeckelt.

### **3.4 Zellkulturmethoden**

#### **3.4.1 Isolation von Chondrozyten aus Knorpelgewebe**

Chondrozyten können direkt aus dem Knorpel isoliert werden. Dafür wurde Knorpelgewebe aus dem Knie von 4 Tage alten Mäusen resektiert und ün bei 4°C in DMEM Medium gelagert. Am darauf folgenden Tag wurde in einem zweimaligen Kollagenase-Schritt das Knorpelgewebe für je 1 h bei 37°C angedaut. Der Überstand wurde jeweils durch ein Zellsieb gegeben, Zellen aus dem ersten Verdau wurden verworfen. Die Zellen des zweiten Kollagenaseverdaus wurden in eine Kulturflasche ausgesät und konfluent wachsen gelassen.

#### **3.4.2 Aussähen der Chondrozyten für Proliferationsmessung**

Nach 2-3maligem Passagieren wurden frisch isolierte Chondrozyten im 12 Well-Format auf Glasplättchen in einer Zelldichte von  $0,5 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen ün in Mangelmedium (Komplettmedium mit nur 0,5 % FCS) überführt. Dann erfolgte die BrdU Markierung (1:1000) für 6 h in Komplettmedium, bevor am darauf folgenden Tag die Immunzytologie zum Nachweis proliferierender Zellen stattfand.

#### **3.4.3 Immunzytologie**

Zuerst wurde das Medium der Zellen abgesaugt und die Zellen mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 10 min in 4 % PFA/PBS bei 4 °C fixiert. Nach wiederholtem Waschen mit 1 x PBS erfolgte die Permeabilisierung der Zellen für 10 min bei RT in einer Lösung bestehend aus 3 % BSA; 5 % NGS; 0,1 % Saponin; 0,1% Triton X-100 in 1 x PBS. Nun wurde erneut gewaschen und ein Blockschritt für mindestens 1 h bei RT (3 % BSA; 5 % NGS in 1 x PBS) schloss sich an. Nach wiederholtem Waschen in 1 x PBS wurde der BrdU Antikörper 1:50 in der Blockinglösung verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach etwa 1 h wurde erneut gewaschen und die Inkubation mit dem Primärantikörper sowie DAPI erfolgte. Danach konnten die Glasplättchen mittels Fluoromount eingedeckelt werden.

## 3.5 Andere Methoden

### 3.5.1 Micro CT-3D-Rekonstruktion ( $\mu$ CT)

Mittels  $\mu$ CT-Technik kann die Knochenarchitektur, die eine Detailerkennbarkeit im Mikrometer-Bereich erlaubt, erfasst werden. Das Prinzip des bildgebenden Verfahrens der Computertomographie basiert auf der Durchstrahlung eines Objektes mit Röntgenstrahlen aus verschiedenen Projektionen heraus. Mittels Detektoren werden diese Strahlen aufgezeichnet. Das Verhältnis der Strahlungsintensität von ausgesandter und gemessener Strahlung wird ermittelt und gibt so Aufschluss über die Abschwächung durch das untersuchte Gewebe. Dieser Schwächungskoeffizient wird in verschiedenen Grauwerten abgebildet. Die finale Auswertung erfolgt letztendlich über ein mathematisches Verfahren. Das zu scannende Objekt musste zunächst präpariert und in 100 % Ethanol überführt werden. In Zusammenarbeit mit Jirko Kühnisch an der Charité konnten die Versuchsobjekte mikroarchitektonisch betrachtet werden.

### 3.5.2 Zugkraftmessung

Die Kraftmessung der Mäuse erfolgte mittels eines speziellen Kraftmessgeräts (Piróg et al. 2010a). An diesem automatischen Kraftmesser war eine Metallklammer montiert, die als Griff für die Mäuse fungiert. Das Gerät war direkt an den Computer angeschlossen, so dass eine automatische Auswertung der Messung erfolgte. Prinzip dieser Kraftbestimmung war das kontinuierliche Schwingen der Mäuse in Richtung der Metallklammer. Die Tiere versuchten dabei die Metallhalterung mit ihren Vorderläufen zu greifen. Bevor die eigentliche Messung stattfand, wurden die Tiere dahingehend konditioniert, sich an der Metallhalterung festzuhalten. Anschließend erfolgte die tatsächliche Messung. Jedes Tier wurde zweimal gemessen über einen Gesamtzeitraum von ca. einer Minute.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Etablierung eines konditionellen Knockout Systems von *Nf1* in frühen mesenchymalen Vorläuferzellen der Extremitäten

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Untersuchung des Verlustes von Neurofibromin während der muskuloskelettalen Entwicklung der Maus. Da eine direkte Geninaktivierung aufgrund eines Herzdefektes während der Embryonalentwicklung zur frühen Letalität führt, wurde mit einem konditionellen Knockout System gearbeitet. Dieses Modell ermöglicht eine gezielte zeit- und/oder gewebespezifische Inaktivierung einzelner Gene.

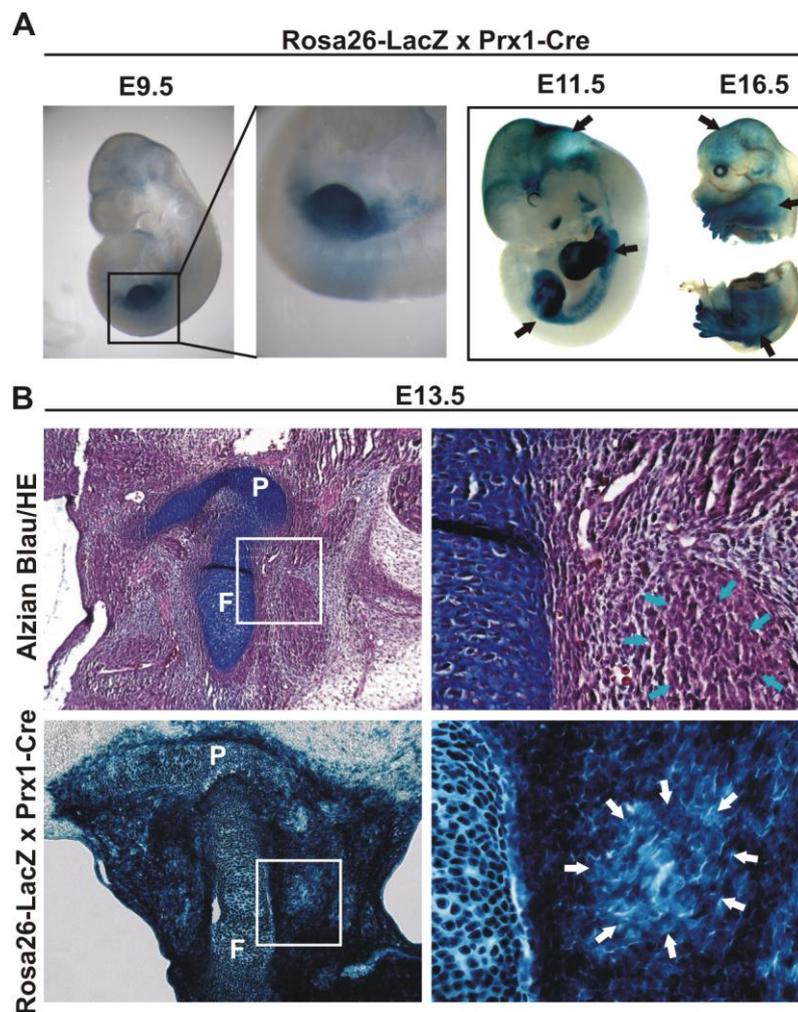
In den Versuchen wurden homozygote *Nf1<sup>flox/flox</sup>* Mäuse mit *Nf1<sup>flox/+</sup>; Prx1<sup>Cre</sup>* Mäusen verpaart (1.2.4). Das führte zur Inaktivierung des *Nf1* Gens in den frühen mesenchymalen Vorläuferzellen der sich entwickelnden Gliedmaßen. Im Weiteren werden die homozygoten *Nf1* Mutanten als *Nf1<sup>Prx1</sup>* Mäuse bezeichnet.

#### 4.1.1 Gewebespezifische *Prx1*-Cre Expression mittels *Rosa26*-Reporterstämmen

Um das Expressionsprofil der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des *Prx1*-Promotors zu charakterisieren, wurden *Prx1*-Cre Mäuse mit *Rosa26*-Reporterstämmen verpaart. Das Prinzip dabei beruht auf der enzymatischen Aktivität der Cre-Rekombinase (Zambrowicz et al. 1997; Friedrich and Soriano 1991; Soriano 1999). Der Reporterstamm *Rosa26* trägt sowohl eine geflochte Neomycinkassette mit PolyA-Sequenz als auch das stromabwärts gelegene *lacZ*-Reporter-gen, das für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase kodiert. Erst durch die Anknüpfung des Cre-Proteins an die flankierenden loxP-Sequenzen kann die Terminationskassette entfernt werden und folgerichtig wird eine *lacZ*-Genexpression initiiert. Somit liegt bei den Reporterstämmen eine *lacZ*-Expression nur in diesen Zellen vor, in denen die Cre-Rekombinase katalytisch aktiv ist. In Abwesenheit des Cre-Enzyms findet keine Transkription des *lacZ*-Gens statt, folglich kann man über eine enzymatisch bedingte Farbreaktion zwischen Cre-exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellen unterscheiden.

Zuerst wurden X-Gal-Färbungen auf Gesamtpräparaten von Mausembryonen durchgeführt. Zum Zeitpunkt E9.5 konnte die Expression in den vorderen Extremitätenknospen nachgewiesen werden. E11.5 und E16.5 X-Gal-gefärbte Embryonen zeigten Rekombinaseaktivität sowohl in den vorderen als auch hinteren Extremitäten, im Seitenplattenmesoderm sowie im kranialen Bereich (Abb. 9A). Bei der Betrachtung von E13.5 gefärbten Gefrierschnitten wird außerdem deutlich, dass sich die Cre-Genexpression unter Kontrolle des *Prx1*-Promotors auf

die sich entwickelnden Extremitäten beschränkte. In diesem Bereich war die Genexpression homogen, die Grenze war klar determiniert und schloß verschiedene Zelltypen mit ein. Man erkennt, dass die Knorpel Elemente des Hüftgelenks und das umliegende Muskel- und Bindegewebe lacZ-positiv waren (Abb. 9B). Diese ersten Ergebnisse bestätigen zusammenfassend, dass die transgene Prx1-Cre Mauslinie das Enzym spezifisch in Extremitätenvorläuferzellen exprimiert und somit nach der Verpaarung mit homozygoten *Nf1<sup>fllox/fllox</sup>* Mäusen das Zielgen in diesen Zellen inaktiviert.



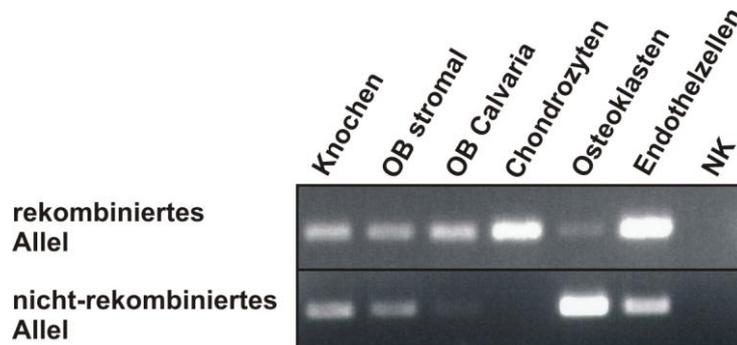
**Abb. 9: Expressionsprofil der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Prx1-Promotors**

Verpaarung von Rosa26-Reportermausen mit Prx1-Cre-Transgenen. **(A)** WM-X-Gal-Färbungen von E9.5, E11.5 und E16.5 Rosa26-LacZxPrx1-Cre Präparaten. Eine Cre-Expression kann zuerst in den vorderen Extremitätenknospen, zu späteren Zeitpunkten in den vorderen und hinteren Extremitäten, im Seitenplattenmesoderm sowie im kranialen Bereich detektiert werden (Pfeile; Vergrößerung: 100fach). **(B)** Mittels Alzian Blau/HE-Färbung auf E13.5 Paraffinschnitten sind die Knorpelanlagen des zukünftigen Hüftgelenks sowie Muskel- und Bindegewebe (Vergrößerung, blaue Pfeile) angefärbt. Auf E13.5 Rosa26-LacZxPrx1-Cre Gefrierschnitten zeigt sich spezifische Cre-Rekombinaseaktivität sowohl in Knorpelanlagen als auch im umliegenden Binde- und Muskelgewebe (Vergrößerung, weiße Pfeile). Vergrößerung A: 160fach, B: 100fach; Abkürzungen: P – Pelvis; F – Femur

#### 4.1.2 Exzisionseffizienz der Prx1-Cre vermittelten Rekombination

Zuerst wurde mittels einer Genotypisierungs-PCR die Inaktivierung des *Nf1* Gens in verschiedenen Zelltypen der Maus nachgewiesen (3.1.4).

Aus Abb. 10 geht hervor, dass ein Rekombinationsereignis des *Nf1* Gens im Knochen, in stromalen Osteoblasten, Osteoblasten aus dem Schädel der Maus, Chondrozyten und Endothelzellen stattfand. In allen Ansätzen war jedoch eine schwache WT-Bande (nicht-rekombiniertes Allel) präsent. Hingegen wurde das Gen nicht in den Osteoklasten inaktiviert.



**Abb. 10: Rekombination von *Nf1* in verschiedenen Zelltypen der *Nf1<sup>Prx1</sup>* Maus**

Die Inaktivierung des *Nf1* Gens wurde mit einer Genotypisierungs-PCR im Knochen, stromaler Osteoblasten, Osteoblasten aus Calvaria, Chondrozyten und Endothelzellen, jedoch nicht in Osteoklasten nachgewiesen. Abkürzungen: OB stromal – stromale Osteoblasten; OB Calvaria – Osteoblasten aus Calvaria; NK – negative Kontrolle

Nachdem bewiesen wurde, dass *Nf1* in multiplen Zelltypen des skelettalen Systems spezifisch inaktiviert wird, konnte die phänotypische Charakterisierung der *Nf1<sup>Prx1</sup>* Mausmutanten erfolgen.

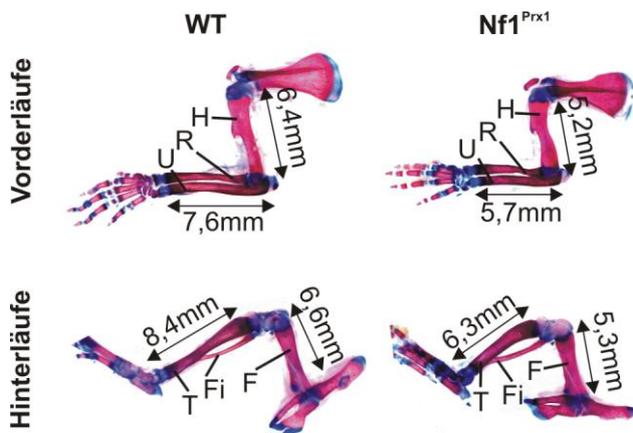
## 4.2 Inaktivierung von *Nf1* führt zur Wachstumsverzögerung der Skelettelemente und zu veränderter Wachstumsfuge

### 4.2.1 Längenreduktion der Skelettelemente

*Nf1<sup>Prx1</sup>* Mutanten waren von ihren Geschwistertieren nach der Geburt leicht zu identifizieren, da sie kleiner waren und verkürzte Extremitäten besaßen. Um die Skelettelemente der Mäuse näher betrachten zu können, wurden Skelettpräparationen der Vorder- und Hinterextremitäten angefertigt. Alizarin Rot färbt dabei die Knochenstrukturen rot, Alzian Blau färbt Knorpelstrukturen blau.

In Abb. 11 sind Skelettpräparationen der Extremitäten von 7 Tage alten Mäusen (P7) mit den dazugehörigen Längen dargestellt. Es ist eindeutig ersichtlich, dass sowohl der Vorder- als

auch der Hinterlauf der Mutante in ihrer Größe verglichen mit dem Wildtyp (WT) um ca. 25 % reduziert waren.



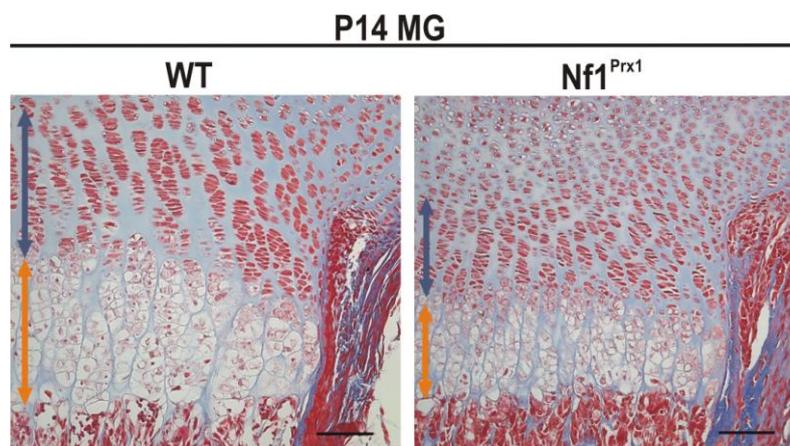
**Abb. 11: Skelettpräparationen und Längenbestimmungen der Extremitäten (P7)**

Alzian Blau färbt Knorpel blau, Alizarin Rot markiert Knochen rot. Die Skelettelemente der Vorder- als auch der Hinterläufe sind in der Nf1<sup>Prx1</sup> Mutante deutlich kleiner. Die langen Röhrenknochen sind in der Mutante um ca. 25 % kürzer. Abkürzungen: H – Humerus; R – Radius; U – Ulna; T – Tibia; Fi – Fibula; F - Femur

#### 4.2.2 Reduktion der proliferierenden und hypertrophen Chondrozytenzonen

Um eine Korrelation zwischen der Größenreduktion der Skelettelemente und einer eventuell veränderten Organisation der Knochenwachstumsfuge herstellen zu können, wurden Paraffinschnitte des Femurs histologisch unter Verwendung der Azan-Färbung betrachtet.

In Abb. 12 sind die Wachstumsfugen von 14 Tage alten Tieren (P14) dargestellt. Der blaue Pfeil markiert die Zone proliferierender Chondrozyten, die Zone der hypertrophen Chondrozyten wird orange hervorgehoben. Es ist eindeutig zu erkennen, dass in der Wachstumsfuge sowohl proliferierende als auch hypertrophe Zone in Nf1<sup>Prx1</sup> Mutante kürzer waren als im WT.



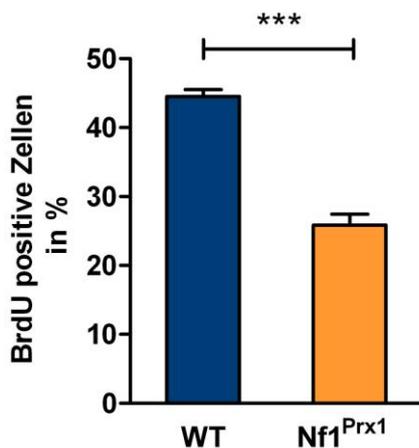
**Abb. 12: Histologie der Knochenwachstumsfuge**

Azan-Färbung auf Paraffinschnitten der Vorderextremität (P14). Die Zone der proliferierenden Chondrozyten ist mit einem blauen Pfeil, die Zone hypertropher Chondrozyten orange markiert. Sowohl die proliferierende als auch die hypertrophe Zone der Chondrozyten sind in der Nf1<sup>Prx1</sup> Mutante kleiner. Maßstab: 100 µm; Abkürzungen: MG – Masson Goldner Färbung

### 4.2.3 Verminderte Proliferationsrate der Chondrozyten

Des Weiteren wurde untersucht, ob es einen kausalen Zusammenhang zwischen der Proliferationsrate der Chondrozyten in der Wachstumsfuge und den verkürzten skelettalen Elementen gibt. Dafür wurden Chondrozyten aus artikulärem Knorpelgewebe des Knies isoliert und BrdU (Bromdesoxyuridin) markiert. BrdU dient dem Nachweis proliferierender Zellen. Es kann von den Zellen aufgenommen und anstelle des Nukleotids dTTP (Desoxythymidintriphosphat) während des Zellzyklus in die DNA eingebaut werden. Über einen spezifischen Antikörper gegen BrdU kann eine stattgefundene DNA-Synthese immunhistochemisch nachgewiesen werden.

Aus Abb. 13 geht hervor, dass die Proliferationsrate der Chondrozyten aus der Mutante im Vergleich zum WT um etwa 30 % reduziert war.



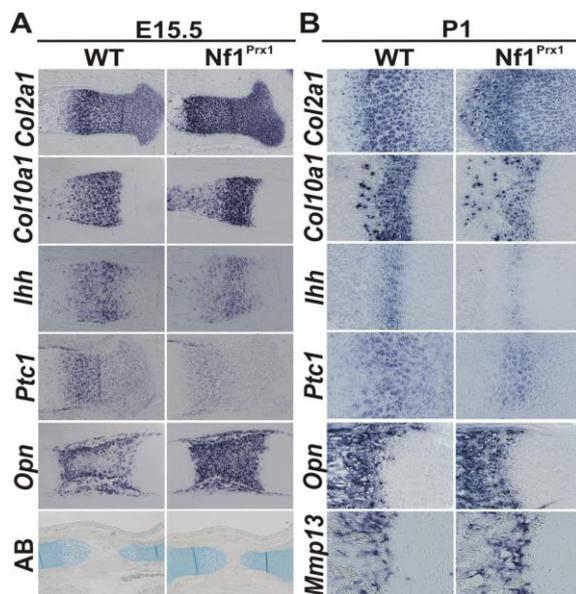
**Abb. 13: Proliferationsrate der Chondrozyten**

Chondrozyten aus artikulärem Knorpel (Knie P4) BrdU markiert und anschließend über Antikörperfärbung detektiert. Die Anzahl an BrdU-positiven Zellen in der Mutante (orange) ist im Gegensatz zum WT (blau) um ca. 30 % reduziert. Die statistische Auswertung erfolgte anhand eines t-Tests (n = 3; \*\*\*P ≤ 0,001).

### 4.2.4 Expressionsanalyse wachstumsfugenspezifischer Gene

Die Veränderungen in der Wachstumsfuge waren Ausgangspunkt für tieferegreifende Analysen. Um das Expressionsprofil verschiedener Markergene in der Wachstumsfuge darzustellen, wurden ISH auf E15.5 und P1 Paraffinschnitte des Femurs angefertigt (Abb. 14).

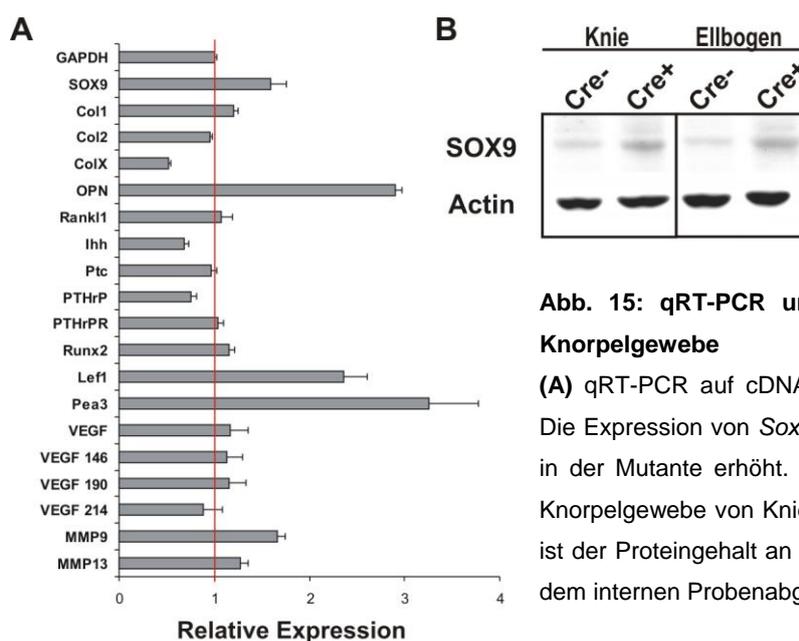
Die Expression des Knorpelmarkers *Col2a1* war in der Mutante unverändert. *Col10a1*, ein Marker für hypertrophe Chondrozyten, war zum Zeitpunkt P1 in der Mutante reduziert exprimiert (Abb. 14B). Das *Ihh* Gen und sein Rezeptor *Ptc1*, wichtige Regulatoren der Chondrozytenproliferation und Differenzierung, waren zu beiden Stadien in der prähypertrophen Zone der Nf1<sup>Prx1</sup> Mutante herunterreguliert. Hingegen konnten stärkere Expressionssignale von *Opn* (Osteopontin) und *Mmp13* (Matrix metalloproteinase 13) in der Mutante verzeichnet werden.



**Abb. 14: Expressionsanalyse von Markergenen in der Wachstumsfuge**

ISH auf Paraffinschnitten des Femurs zu den Zeitpunkten E15.5 (**A**) und P1 (**B**) mit wachstumsfugenspezifischen Sonden. Die Expression von *Col2a1* ist in Mutante und WT gleich. *Col10a1*, *Ihh* und *Ptc1* sind in der Mutante reduziert exprimiert, hingegen ist die *Opn* Genexpression in der Mutante erhöht. Zum Zeitpunkt P1 ist *Mmp13* in der Mutante ebenfalls stärker exprimiert. Vergrößerung: 200fach; Abkürzungen: AB – Alzian Blau

Die Resultate der ISH wurden mittels qRT-PCR bestätigt. Hierfür wurde Knorpelgewebe aus dem Knie von Mutante und Kontrolle präpariert, RNA isoliert und in cDNA synthetisiert. Wie Abb. 15 zu entnehmen ist, wurde eine Hochregulation von *Opn* und seinen bekannten Aktivatoren *Lef1* und *Pea1* deutlich. Die relative Expression von *Sox9* und *Mmp9* war ebenfalls eindeutig erhöht. Neben einer gesteigerten *Sox9* Genexpression konnte mittels Western Blot Analyse eine sichtbar größere Proteinmenge an SOX9 in 4 Tage alte Knielysaten der Mutante detektiert werden (Abb. 15B). Keine Expressionsunterschiede waren in den verschiedenen *Vegf*-Isoformen, *Runx2* und *Rank11* zu messen. Hingegen ließ sich die verminderte Genexpression von *Ihh* und *Col10a1* aus der ISH klar bestätigen.



**Abb. 15: qRT-PCR und Western Blot Analyse auf Knorpelgewebe**

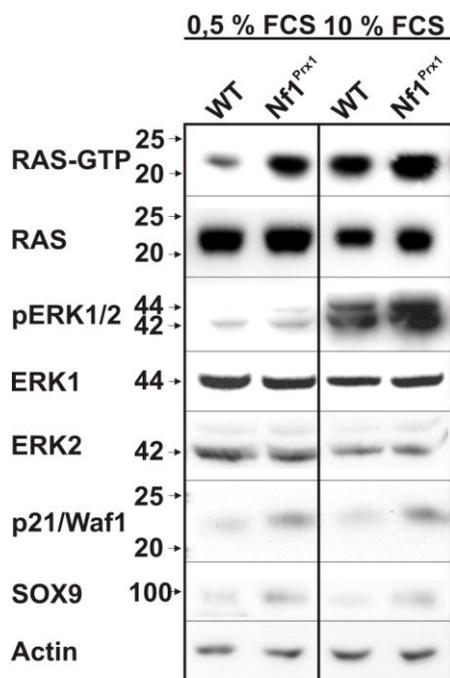
(**A**) qRT-PCR auf cDNA von Knorpelgewebe (P4 Knie). Die Expression von *Sox9*, *Opn*, *Lef1*, *Pea3* und *Mmp9* ist in der Mutante erhöht. (**B**) Western Blot auf artikulärem Knorpelgewebe von Knie und Ellenbogen. In der Mutante ist der Proteingehalt an SOX9 deutlich erhöht. Actin dient dem internen Probenabgleich.

#### 4.2.5 Aktivierung der RAS/MAPK-Signalkaskade

Es ist bekannt, dass die Inaktivierung des *Nf1* Gens in einem nicht-funktionsfähigen NF1 Protein resultiert. Das wiederum führt zur fehlenden Suppression des RAS Proteins und damit zur Aktivierung der MAPK-Signalkaskade (Martin et al. 1990; Williams et al. 2001). Um dies im  $Nf1^{Prx1}$  Mausmodell zu prüfen, wurden parallel *in vitro* Experimente mit primären Chondrozyten durchgeführt.

Nach der Isolation der Chondrozyten aus Kniegewebe wurden die Zellen unter Mangelmedium mit 0,5 % Serum bzw. Vollmedium (10 % Serum) kultiviert und jeweils Gesamtzelllysate aufgearbeitet. Unter Verwendung des *Ras activation Assay* konnte aktives RAS nachgewiesen werden (2.5). Das Prinzip dabei basiert auf der hohen Bindeaffinität der RAS-bindenden Domäne der Effektor kinase RAF1 an GTP-gebundenes aktives RAS. Über einen *Pull down Assay* wurde der Komplex isoliert und in Western Blot Analysen wurde mittels spezifischen RAS Antikörpers aktives GTP-gebundenes RAS nachgewiesen (Abb. 16).

GTP-gebundenes aktives RAS konnte in erhöhter Menge im Chondrozytenlysate der  $Nf1^{Prx1}$  Mausmutante detektiert werden. Zur Kontrolle wurden Zellen für 10 Minuten mit Vollmedium stimuliert. Das führte zur Induktion der RAS-Signalkaskade. Weiterhin konnte ein deutlich erhöhter Proteingehalt der Proteinkinase pERK1/2 sowie p21/Waf1 und SOX9 in der Mutante gemessen werden. Es erfolgte ein Abgleich der Proteinmengen RAS-GTP zu RAS, sowie pERK1/2 zu ERK1/2, wobei Actin als Referenz für den internen Probenabgleich diente.

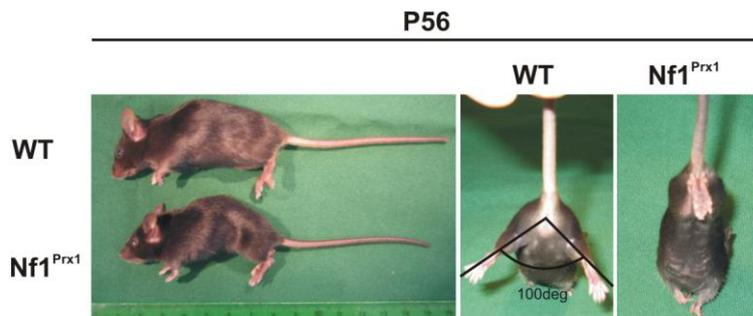


**Abb. 16: Aktivierung der RAS/MAPK-Signalkaskade**

Western Blot Analyse auf Chondrozytenlysate, isoliert aus artikulärem Knorpelgewebe 4 Tage alter Mäuse; in Kultur mit Mangelmedium (0,5 % FCS- Spur 1 und 2) oder Vollmedium (10 % FCS- Spur 3 und 4). Der RAS/MAPK-Signalweg ist in der Mutante aktiviert. Als Kontrollexperiment werden die Zellen in Vollmedium für 10 min kultiviert. Eine Induktion der RAS-Signalkaskade wird in WT und Mutante sichtbar. pERK1/2, p21/Waf1 und SOX9 sind in der Mutante erhöht. Actin dient als Referenz für den internen Probenabgleich.

### 4.3 Verlust von *Nf1* führt zur Missbildung der Gelenke

Das auffälligste Merkmal neugeborener *Nf1*<sup>Prx1</sup> Mausmutanten war die Art ihrer Fortbewegung. Die Tiere bewegten sich ausschließlich mit Hilfe ihrer Vorderläufe fort, die Hinterläufe wurden lediglich hinterhergezogen. Im Vergleich zu Kontrolltieren waren die *Nf1*<sup>Prx1</sup> Mutanten nicht in der Lage, ihre Beine um 100 Grad von der Hüfte abzuspreizen (Abb. 17). Die Tiere litten offensichtlich an einer beeinträchtigten Funktion des Hüftgelenks.

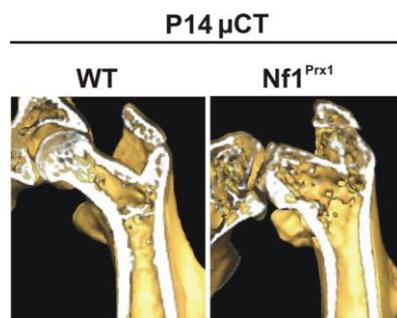


**Abb. 17: Darstellung von *Nf1*<sup>Prx1</sup> Mausmutante und WT**

Darstellung einer 56 Tage alten WT Maus und *Nf1*<sup>Prx1</sup> Mausmutante. *Nf1*<sup>Prx1</sup> Mäuse sind kleinwüchsig, besitzen verkürzte Extremitäten und leiden an einer beeinträchtigten Funktion des Hüftgelenks. Im Vergleich zum WT spreizen sie ihre Beine nicht um 100 Grad vom Körper ab.

#### 4.3.1 Fusion des Hüftgelenks

Zur genaueren Untersuchung des Hüftgelenks wurden verschiedene Analysen durchgeführt. Zuerst wurde in Zusammenarbeit mit Jirko Kühnisch (Medizinische Genetik, Charité) mittels einer MicroCT-3D-Rekonstruktion ( $\mu$ CT) die Mikroarchitektur der Knochenstruktur untersucht. Hinterläufe wurden isoliert, entwässert und schließlich im  $\mu$ CT gescannt. Abb. 18 lässt erkennen, dass die Hüftgelenkstrukturen mit angrenzendem Femur und Pelvis der 14 Tage alten *Nf1*<sup>Prx1</sup> Mutante (P14) stark deformiert waren. Die Knochenstrukturen waren verdickt. Der femurale Gelenkkopf war dramatisch verkürzt und verbreitert. Eine typische Kugelgelenkform war nicht zu erkennen.



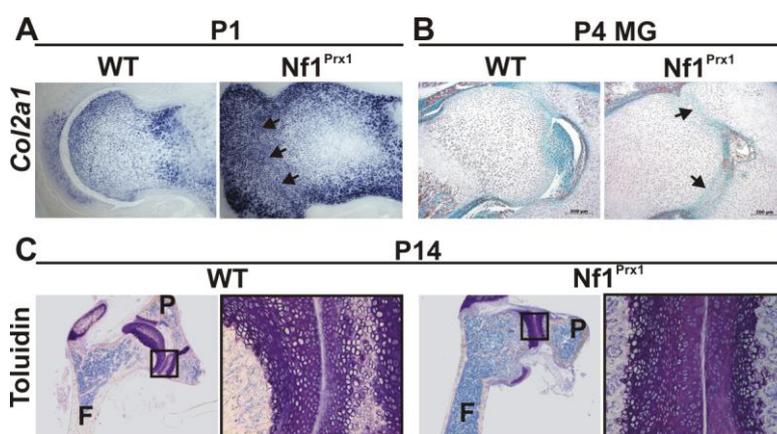
**Abb. 18: Architektur des Hüftgelenks**

$\mu$ CT-3D-Rekonstruktionen des proximalen Femurs zum postnatalen Stadium P14 zeigen eine starke Missbildung der Hüftgelenkelemente in der *Nf1*<sup>Prx1</sup> Mutante. Der Gelenkkopf gleicht nicht einer Gelenkkugel sondern ist stark deformiert, Knorpel- und auch Knochelemente sind verkürzt und verdickt.

Eine detaillierte Analyse der Gelenkmorphologie konnte nur auf Ebene der Histologie und ISH erfolgen. Verschiedene Schnittpräparate wurden angefertigt, die es ermöglichten, die Gelenke mikroskopisch zu betrachten. In Abb. 19A ist eine ISH zum Stadium P1 auf Paraffinschnitten mit der spezifischen Sonde für *Col2a1* zu sehen. Der Knorpelmarker macht deutlich, dass sich in der Mutante kein Gelenkspalt entwickelt hat, wobei im WT zwischen dem Knorpelteil des Femurs und des Pelvis ein Gelenkspalt eindeutig identifiziert werden konnte. Die histologische Masson Goldner-Färbung auf Plastikschnitten (P4) in Abb. 19B bestätigte, dass im Hüftgelenk der Mutante kein Gelenkspalt vorhanden war. Pelvis und Femur waren miteinander verschmolzen. Um die Knorpeloberfläche genauer betrachten zu können, wurde zusätzlich eine Toluidin-Färbung auf 4 Tage alten Plastikschnitten angefertigt. Zu erfassen war die typische Blaufärbung des hyalinen Knorpels (Abb. 19C). Deutlich zu erkennen ist, dass die Gelenkkopfform der Mutante keiner normalen Kugelgelenkform gleicht, sondern dass eine abgeflachte Morphologie des Knorpels vorlag. An der Gelenkoberfläche waren Chondrozyten weniger präsent als in der Kontrolle, und der vermeintliche Gelenkspalt erschien unregelmäßig strukturiert und brüchig.

An dieser Stelle ist anzumerken, dass der Gelenkphänotyp in seiner Ausprägung sehr variabel war. So wurden  $Nf1^{Prx1}$  Mäuse geboren, die nur eine partielle Fusion des Hüftgelenks aufweisen, in anderen Mäusen waren die Hüftgelenke hingegen vollständig fusioniert.

Die gezeigten Ergebnisse identifizieren den fehlenden Gelenkspalt als Erklärung dafür, dass die  $Nf1^{Prx1}$  Mutanten nicht in der Lage sind, ihre Beine abzupreizen und sich normal fortzubewegen.



**Abb. 19: Histologie des Hüftgelenks**

(A und B) ISH mit *Col2a1* Sonde auf P1 Paraffinschnitten und Masson Goldner-Färbung zum Zeitpunkt P4. Im Gegensatz zum WT hat sich in der  $Nf1^{Prx1}$  Mutante kein Gelenkspalt im Hüftgelenk formiert. Die Knorpel-elemente von Femur und Pelvis sind

in der Mutante miteinander verschmolzen (Pfeile). (C) Toluidin-Färbung proximaler Schnitte des Femurs weisen auf eine unregelmäßige und zellärmere Knorpeloberfläche des Hüftgelenks in der  $Nf1^{Prx1}$  Mutante hin.

Maßstab: 200 µm; Abkürzungen: P – Pelvis; F – Femur; MG – Masson Goldner-Färbung

### 4.3.2 Fehlende Ausbildung des Gelenkspalts in der pränatalen Entwicklung

Um den Prozess der Hüftgelenkentstehung zu verstehen und vor allem zeitlich in die embryonale Entwicklung der Maus einzuordnen, wurden verschiedene embryonale Stadien gesammelt, in Paraffin eingebettet, geschnitten und mittels histologischer Färbemethoden analysiert. Bereits zum Zeitpunkt E15.5 hat sich im WT ein Gelenkspalt gebildet (Abb. 20A). Hingegen konnte kein Gelenkspalt in der Mutante identifiziert werden. Deshalb waren Analysen zu früheren Zeitpunkten der pränatalen Entwicklung notwendig. Unter Verwendung von Alzian Blau/HE-Färbung wurden E12.5, E13.5 und E14.5 Paraffinschnitte von  $Nf1^{Prx1}$  Mutanten und Kontrolltieren histologisch angefärbt (Abb. 20B). Zum Zeitpunkt E12.5 hatten sich sowohl in der Kontrolle als auch in der Mutante kleine Knorpelkondensationen gebildet. Diese liessen die späteren Knorpelstrukturen des Hüftgelenks nur erahnen. Bereits einen Tag später formierten sich die Knorpelanlagen des späteren Hüftgelenks. Dabei war der Knorpelteil von Pelvis mit dem des Femurs zu einer Anlage verschmolzen. Zu diesem Zeitpunkt gab es keine Unterschiede zwischen WT und Mutante. Zum Entwicklungszeitpunkt E14.5 fand im WT der Separationsprozess von Pelvis und Femur statt, bei dem sich ein Gelenkspalt bildete. Dieser Prozess erfolgte in der  $Nf1^{Prx1}$  Mutante nicht, da Pelvis und Femur nach wie vor miteinander verbunden blieben.

Da die Gelenkbildung zwischen den Entwicklungszeitpunkten E13.5 und E14.5 stattfindet, wurden zu diesen Zeitpunkten weitere Analysen durchgeführt.

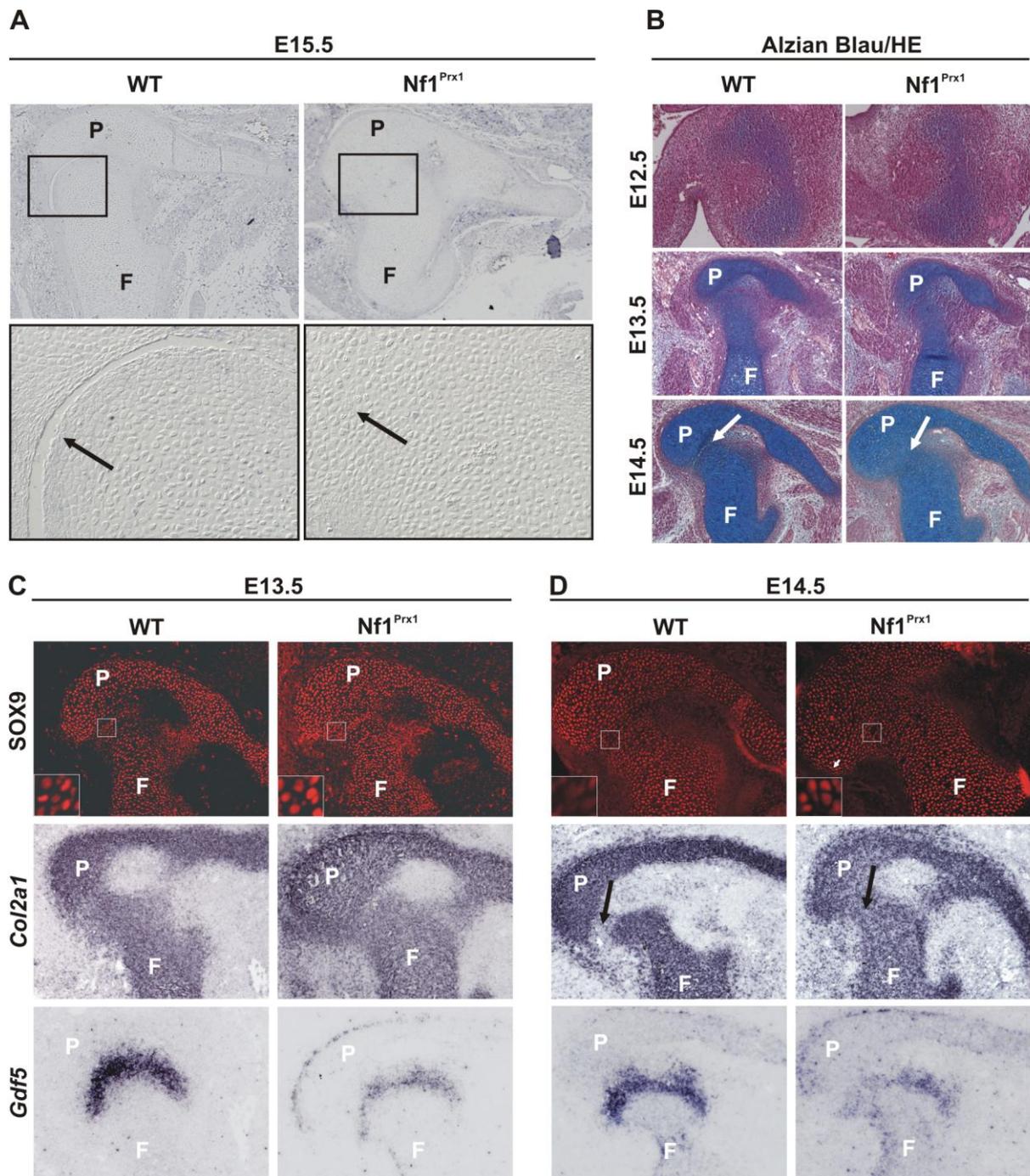
Im Fokus der Knorpelentwicklung stand dabei zunächst der Transkriptionsfaktor SOX9. Dieser wird während der Embryogenese in mesenchymalen Knorpelvorläuferzellen exprimiert und stellt einen essentiellen Regulator für die Knorpelzellbildung dar (Bi et al. 1999; Crombrughe et al. 2000; Lefebvre et al. 1998). Mittels Immunhistochemie auf Paraffinschnitten konnte das SOX9 Protein in den Knorpelanlagen nachgewiesen werden (Abb. 20C und D). Sowohl Kontrolle als auch Mutante zeigten zum Zeitpunkt E13.5 eine nukleäre SOX9 Lokalisation in den Zellen des zukünftigen Gelenkspalts (Abb. 20C). Zum Zeitpunkt E14.5 konnte allerdings in der Kontrolle ein Lokalisationswechsel des SOX9 Proteins ins Zytoplasma beobachtet werden. In der Mutante wurde SOX9 weiterhin im Nukleus der Chondrozyten detektiert (Abb. 20D).

Im Zusammenhang mit der Gelenkentwicklung ist außerdem das Strukturprotein COL2a1 von Bedeutung, das in Knorpelvorläuferzellen und Chondrozyten exprimiert wird (Zhao et al. 1997b; Bell et al. 1997b; Seghatoleslami et al. 1995). Daneben spielt GDF5 (Growth and Differentiation factor 5) eine essentielle Rolle. GDF5 reguliert die initiale Knorpelbildung, hat Einfluss auf die Form und das Wachstum der sich entwickelnden Knochen und wird zudem in

den zukünftigen Gelenkzonen exprimiert, wo es entscheidend auf die Bildung der Gelenke wirkt (Francis-West et al. 1999; Storm and Kingsley 1999). Da eine *Gdf5* Genexpression in der zukünftigen Gelenkspaltregion vor der eigentlichen Spaltbildung detektiert werden kann, stellt es einen häufig genutzten Marker für die frühe Gelenkentwicklung dar (Merino et al. 1999; Storm and Kingsley 1996). Mittels ISH wurden die Expressionsmuster von *Col2a1* und *Gdf5* betrachtet (Abb. 20C und D). Es wird ersichtlich, dass *Col2a1* zum Zeitpunkt E13.5 in WT und Mutante durchgängig exprimiert wurde (Abb. 20C). Während sich zum Zeitpunkt E14.5 der Gelenkspalt im WT formiert hat, wurde dieser *Col2a1*-negativ (Abb. 20D). *Gdf5* markiert die Zellen im Gelenkspalt. Im Vergleich zur Kontrolle war die Expression von *Gdf5* in der Mutante zu beiden Zeitpunkten im zukünftigen Gelenkspalt deutlich verringert (Abb. 20C und D).

#### Abb. 20 nächste Seite: Pränatale Entstehung des Hüftgelenks

**(A)** Mikroskopische Betrachtung von Paraffinschnitten unter Verwendung der Nomarski-Optik. Im Gegensatz zur  $Nf1^{Prx1}$  Mutante hat sich bereits im WT zum Entwicklungsstadium E15.5 der Gelenkspalt im Hüftgelenk gebildet (Vergrößerung, Pfeil). **(B)** Alzian Blau/HE-Färbungen. Zum Zeitpunkt E12.5 sind Knorpelkondensationen im WT als auch in der Mutante erkennbar. Zum Zeitpunkt E13.5 sind die Knorpelanlagen des zukünftigen Hüftgelenks miteinander verschmolzen. Auf E14.5 Schnitten ist die klare Trennung von Pelvis und Femur in der Kontrolle sichtbar (Pfeil). Keine Gelenkspaltformation findet in der Mutante statt (Pfeil). **(C und D)** SOX9 Immunhistochemie. Zum Zeitpunkt E13.5 ist SOX9 sowohl im WT als auch in der Mutante im Nukleus lokalisiert. Einen Tag später findet ein Lokalisationswechsel vom Nukleus ins Zytoplasma statt. In der  $Nf1^{Prx1}$  Mutante hingegen verbleibt SOX9 im Nukleus. ISH von *Col2a1* und *Gdf5* auf E13.5 und E14.5 Paraffinschnitten. *Col2a1* ist zum Zeitpunkt E13.5 durchgängig in den Knorpelanlagen des zukünftigen Hüftgelenks exprimiert. Im WT ist *Col2a1* zum Zeitpunkt E14.5 im Knorpelbereich des Pelvis und des Femurs exprimiert, der Gelenkspalt hingegen ist *Col2a1*-negativ (Pfeil). In der Mutante kann *Col2a1* jedoch weiterhin durchgängig detektiert werden, ein Gelenkspalt entwickelt sich nicht (Pfeil). *Gdf5* markiert die Region des Gelenkspaltes. Die *Gdf5* Expression ist in der Mutante eindeutig verringert. Vergrößerung: 160fach; Abkürzungen: P – Pelvis; F – Femur

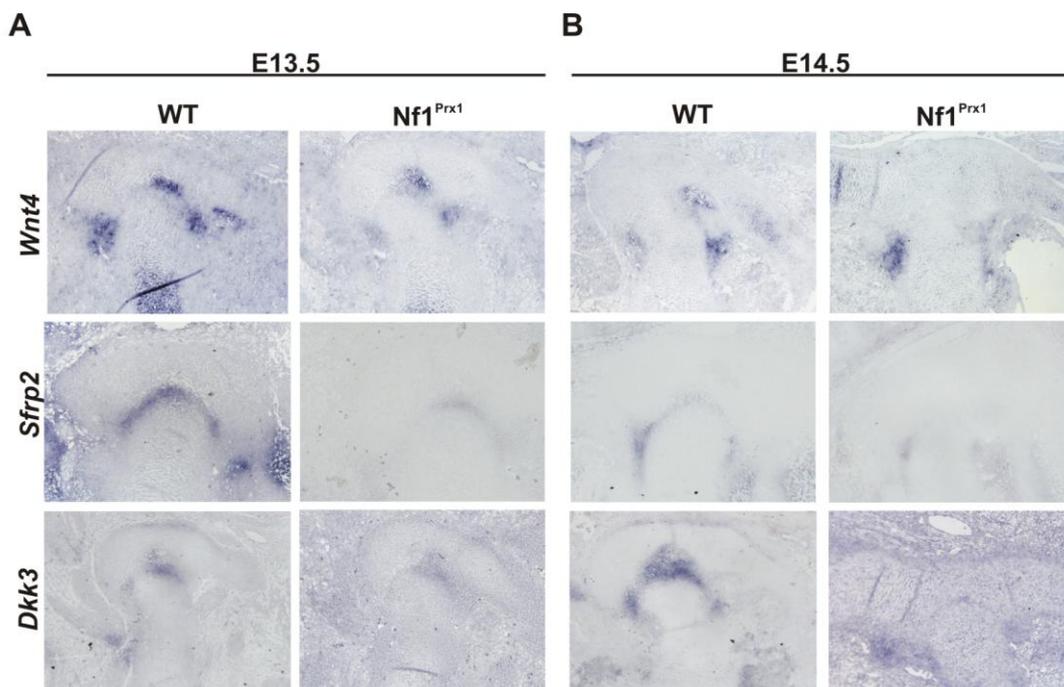


**Abb. 20: Pränatale Entstehung des Hüftgelenks**  
 Beschriftung siehe vorherige Seite

### 4.3.3 Expressionsanalyse Gelenk-assoziiierter Signalmoleküle

In den Prozess der Gelenkbildung sind verschiedene Signalmoleküle involviert. Aus der Literatur geht hervor, daß sowohl der BMP- als auch der Wnt-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Gelenkentstehung spielen (Archer et al. 2003; Hartmann and Tabin 2001). Um herauszufinden, welcher Signalweg in der *Nf1<sup>Prx1</sup>* Mutante bei der Entstehung der Gelenke verändert ist, wurden ISH auf Paraffinschnitten mit Sonden für verschiedene Signalmoleküle, die mit der Gelenkbildung assoziiert sind, durchgeführt (Abb. 21A und B).

Für *Bmp2* (*Bone morphogenetic protein 2*), *Bmp4* (*Bone morphogenetic protein 4*) und *Noggin* wurden keine Expressionsunterschiede in *Nf1<sup>Prx1</sup>* Mutanten festgestellt (Daten nicht gezeigt). Bei der Betrachtung der Expressionsprofile einiger Wnt-Signalmoleküle wird offensichtlich, dass *Wnt4* stärker im Gelenkspalt der Kontrolle exprimiert wurde als in der Mutante. Außerdem wurde eine stärkere Genexpression der Wnt-Antagonisten *Sfrp2* (*secreted frizzled protein 2*) und *Dkk3* (*Dickkopf 3*) im WT in beiden Entwicklungsstadien detektiert (Abb. 21A und B).



**Abb. 21: Expressionsprofil Gelenk-assoziiierter Signalmoleküle**

ISH auf E13.5 (A) und E14.5 (B) Paraffinschnitten mit Sonden gegen *Wnt4*, *Sfrp2* und *Dkk3*. Zum Embryonalstadium E13.5 ist *Wnt4* deutlich stärker im Gelenkspalt als auch im umgrenzenden Gewebe des WT exprimiert. Einen Tag später kann *Wnt4* merklich schwächer in der Region des Gelenkspalts im WT und Mutante nachgewiesen werden. Die Wnt-Antagonisten *Sfrp2* und *Dkk3* werden im Gelenkspalt der *Nf1<sup>Prx1</sup>* Mutante schwächer exprimiert als in der Kontrolle. Vergrößerung: 160fach

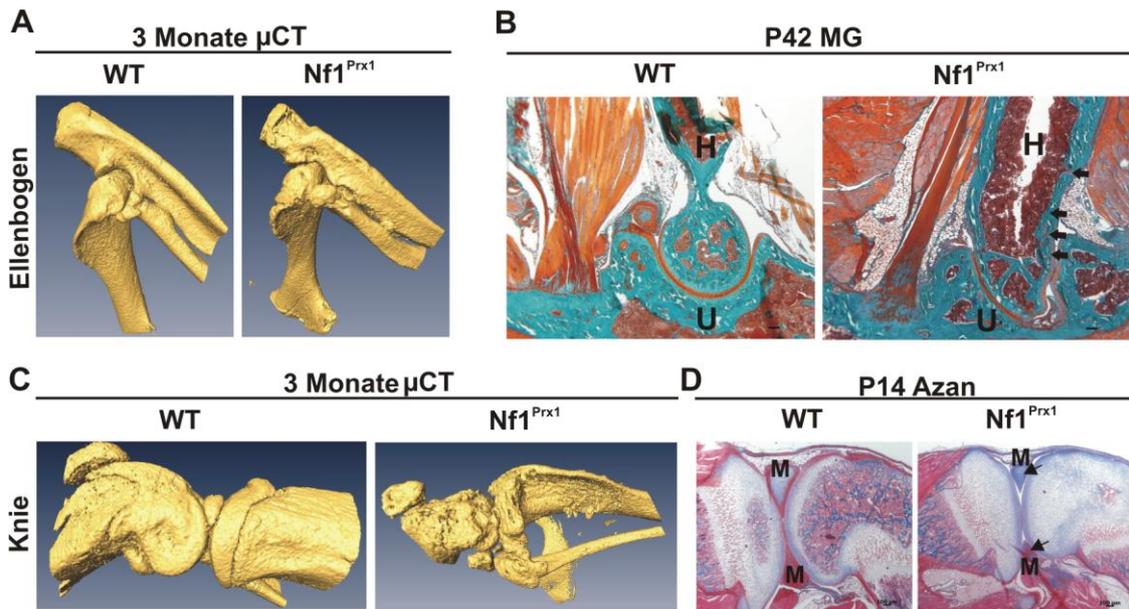
#### 4.3.4 Deformation von Ellenbogen- und Kniegelenk im Verlauf der postnatalen Entwicklung

Die Missbildung des Hüftgelenks in der  $Nf1^{Prx1}$  Mausmutante war die auffälligste und schwerwiegendste Gelenkfehlbildung. Andere Kugelgelenke, wie z.B. das Schultergelenk, wiesen keine Fusion auf. Betrachtete man allerdings Ellenbogen- und Kniegelenk, so waren auch dort phänotypische Merkmale auffällig. An dieser Stelle muss ebenfalls darauf aufmerksam gemacht werden, dass auch hier die Ausprägung des Phänotyps sehr variabel war.

In Abb. 22A und C sind 3D-Rekonstruktionen von  $\mu$ CT-Scans des Ellenbogen- und Kniegelenkes von 3 Monate alten Mäusen dargestellt. Die Knochenoberfläche war bei den Mutanten, anders als beim WT, sehr grob und uneben. Im Ellenbogen waren die Knochenelemente von Radius, Ulna und Humerus augenscheinlich untrennbar miteinander verbunden. Man konnte die Ausbildung eines Gelenkspalts nur erahnen. Die Gelenkelemente wirkten an dieser Stelle zusammenhängend, morphologisch missgebildet (Abb. 22A). Besonders dramatisch waren die  $\mu$ CT-Aufnahmen des Kniegelenks (Abb. 22C). Auch hier wurde eine fehlgebildete Gelenkstruktur sichtbar. Das Knie der  $Nf1^{Prx1}$  Mutante war im Vergleich zur Kontrolle kleiner, die Knochenoberflächen waren löchrig. Die schlechtere Auflösung der 3D-Struktur beruht auf einer verminderten Strukturdichte des Knochens.

Histologische Untersuchungen von Ellenbogen- und Kniegelenk bestätigten die missgebildeten Knochen- und Knorpelstrukturen (Abb. 22B und D). Mit Hilfe der Masson Goldner-Färbung wurde spezifisch das muskuloskeletale Gewebe im Ellenbogenbereich von 42 Tage alten Mäusen (P42) angefärbt. Betrachtet man die Plastikschnitte, so ist erkennbar, dass Humerus und Ulna in der Mutante stark deformiert waren. Der Humerus war verbreitert und wies einen unregelmäßig verdickten kortikalen Knochen auf. Im Gegensatz zur Kontrolle glich der Gelenkkopf keiner Kugel, sondern erschien pfeilförmig. Die Struktur der Ulna war der pfeilartigen Form des Humerus angepasst. Ein Gelenkspalt ließ sich nur erahnen (Abb. 22B).

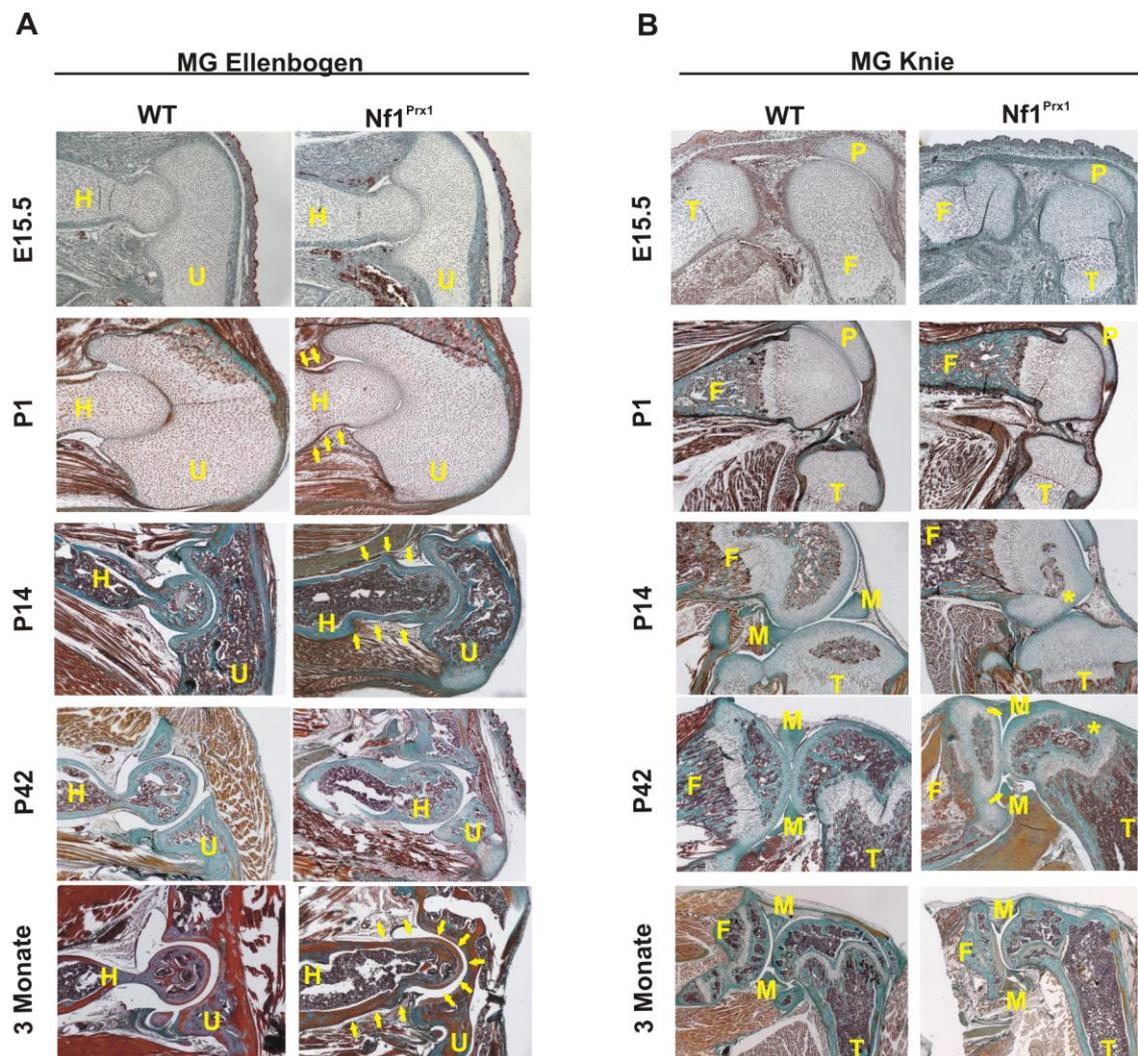
Eine mikroskopische Betrachtung des Kniegelenks erfolgte auf P14 Azan-gefärbten Paraffinschnitten. Abb. 22D veranschaulicht die kleinere Struktur des Kniegelenkes in der  $Nf1^{Prx1}$  Mutante. Im Vergleich zum WT waren die Menisci in ihrer Größe reduziert, die sekundäre Ossifizierung war verzögert.



**Abb. 22: Ellenbogen- und Kniegelenk der  $Nf1^{Prx1}$  Mausmutante**

(A)  $\mu$ CT-3D-Rekonstruktionen von 3 Monate alten Ellenbogen zeigen eine starke Deformation sowie eine unregelmäßige Oberfläche der Knorpel- und Knochenelemente in der  $Nf1^{Prx1}$  Mutante. (B) Masson Goldner-Färbung auf P42 Plastikschnitten eines Ellenbogengelenks offenbaren eine anormale Form von Humerus und Ulna in der Mutante. Der kortikale Knochen des Humerus ist verdickt (Pfeile). Der Gelenkkopf weist keine typische Kugelform auf. (C)  $\mu$ CT Analysen von 3 Monate alten Kniegelenken dokumentieren eine verkleinerte, missgebildete Knorpelstruktur in der Mutante. (D) Histologische Azan-Färbung auf sagittalen Schnitten des Kniegelenks zeigen, dass das Kniegelenk der  $Nf1^{Prx1}$  Mutante kleinere Menisci besitzt (Pfeile), die sekundäre Ossifizierung ist zudem verzögert. Maßstab: 100  $\mu$ m; Abkürzungen: H – Humerus; U – Ulna; M – Meniscus; MG – Masson Goldner-Färbung

Um herauszufinden, ob es sich beim Phänotyp des Ellenbogen- und Kniegelenks um einen entwicklungsbedingten Defekt in der Embryogenese oder um ein postnatales Ereignis handelt, wurden verschiedene embryonale und postnatale Mausstadien präpariert. Das Gewebe wurde unter Verwendung der Masson Goldner-Färbung histologisch angefärbt (Abb. 23A und B). Sowohl das Ellenbogen- als auch das Kniegelenk der Mutanten entwickelten sich zum Zeitpunkt E15.5 normal. Bei der histologischen Begutachtung des P1 Stadiums erkennt man erste morphologische Veränderungen im Knie- und auch im Ellenbogengelenk der  $Nf1^{Prx1}$  Mutante. So war z.B. der Humerus auffällig verdickt. Im weiteren postnatalen Verlauf war eine dramatische phänotypische Veränderung der Gelenke in der Mutante zu erkennen. Bereits zum Zeitpunkt P14 war das Ellenbogengelenk der Mutante anormal formiert. Im Vergleich zur Kontrolle war der Humerus verkürzt, breiter und die Schicht des kortikalen Knochens verdickt. Der Gelenkkopf wies keine Kugelform auf. Mit zunehmendem Alter der Mäuse war eine stärkere Missbildung des Ellenbogengelenks zu verzeichnen. Dieser Deformationsprozess liess sich ebenfalls im Kniegelenk beobachten. Im Stadium P14 war bereits eine verzögerte sekundäre Ossifizierung in der Mutante zu erkennen. Im Vergleich zur Kontrolle waren die Menisci in der  $Nf1^{Prx1}$  Mutante deutlich kleiner.



**Abb. 23: Prä- und postnataler Entwicklungsverlauf von Ellenbogen- und Kniegelenk**

Masson Goldner-Färbung auf Paraffinschnitten verschiedener prä- und postnataler Entwicklungsstadien von Ellenbogen- und Kniegelenk. **(A)** Zum Embryonalstadium E15.5 entwickelt sich das Ellenbogengelenk von WT und  $Nf1^{Prx1}$  Mutante scheinbar gleich. Im Verlauf der postnatalen Entwicklung deformieren die mutanten Gelenke. Der Humerus ist verkürzt und dicker (Pfeile). Der Gelenkkopf zeigt eine anormale Form (Pfeile). Man erkennt, dass die Knorpel Elemente des Gelenks nicht kompatibel miteinander sind. **(B)** Das Kniegelenk der  $Nf1^{Prx1}$  Mutante entwickelt sich zum Zeitpunkt E15.5 wie der WT. Mit zunehmendem Alter der Mutante ist jedoch ein Deformations- und Degradationsprozess des Gelenks deutlich zu erkennen. In der Mutante sind die Menisci stark in ihrer Größe reduziert (Pfeil), die sekundäre Ossifizierung ist verzögert (Stern). Vergrößerung: 80fach; Abkürzungen: H – Humerus; U – Ulna; F – Femur; T – Tibia; M – Meniscus; MG – Masson Goldner

## 4.4 Chondrozytenspezifische Ablation von *Nf1* resultiert nicht im Gelenkphänotyp

Der Prozess der Gelenkbildung ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. So ist beispielsweise unklar, aus welchem Zelltyp der spätere Gelenkspalt entsteht, welche Vorgänge dafür verantwortlich sind und welche Signalwege mitwirken. Hypothesen erklären die Spaltbildung bedingt durch Apoptose oder durch Migration außerhalb sich befindener Zellen (Ballard and Holt 1968; Mitrovic 1971, 1972).

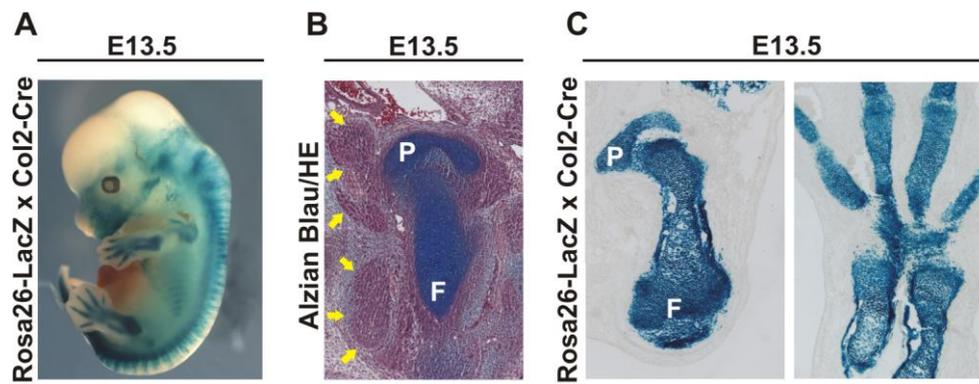
Da in *Nf1<sup>Prx1</sup>* Tieren der Gelenkspalt des Hüftgelenks während der embryonalen Entwicklung nicht angelegt wurde, ergab sich die Frage nach dem zugrunde liegenden fehlerhaften Mechanismus. Zunächst galt es zu klären, ob eine spezielle Zellpopulation für die entstehende Fehlbildung verantwortlich ist. Da der *Prx1*-Promotor in allen Zellen mesenchymalen Ursprungs aktiv ist, wurden weitere Verkreuzungsexperimente mit transgenen *Col2-Cre* Mäusen angesetzt. Dabei wurden homozygote *Nf1<sup>flox/flox</sup>* Mäuse mit *Col2-Cre; Nf1<sup>flox/+</sup>* Mäusen verpaart. Das führte zur Inaktivierung des *Nf1* Gens in Chondrozyten. Die homozygoten mutanten Tiere werden im Folgenden als *Nf1<sup>Col2</sup>* Mäuse bezeichnet.

### 4.4.1 Gewebespezifische *Col2-Cre* Expression mittels *Rosa26-Reporter*mäusen

Ähnlich wie im konditionellen *Nf1<sup>Prx1</sup>* Mausmodell musste anfänglich die spezifische Expression der Cre-Rekombinase in Chondrozyten bestätigt werden. So wurden *Col2-Cre* Tiere mit dem *Rosa26-Reporter*mausstamm verpaart und der erhaltene Nachwuchs sowohl im Ganztierpräparat als auch auf Gefrierschnitten getestet.

Aus Abb. 24A ist ersichtlich, dass die Cre-Expression im Embryo zum Zeitpunkt E13.5 chondrozytenspezifisch auftrat. Die blaue Färbung war in allen Knorpel-elementen des Embryos zu erkennen. Auf gefärbten Gefrierschnitten zum Zeitpunkt E13.5 konnte bestätigt werden, dass sich die X-Gal-Färbung ausschließlich auf die Knorpel-elemente beschränkte.

Eine spezifische Cre-Expression konnte somit sowohl in den Chondrozyten des zukünftigen Hüftgelenks als auch in den knorpeligen Fingeranlagen nachgewiesen werden (Abb. 24C). Zur Übersicht des Hüftgelenks mit umliegendem Muskel- und Bindegewebe wurden Alzian Blau/HE-gefärbte E13.5 Paraffinschnitte im Bereich des Hüftgelenks angefertigt (Abb. 24B). Auch detaillierte Vergleiche der Schnittebenen in Abb. 24B und C machten definitiv deutlich, dass umliegendes Muskel- und Bindegewebe lacZ-negativ waren. Die Expression der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des *Col2*-Promotors fand ausschließlich in Knorpelzellen statt.



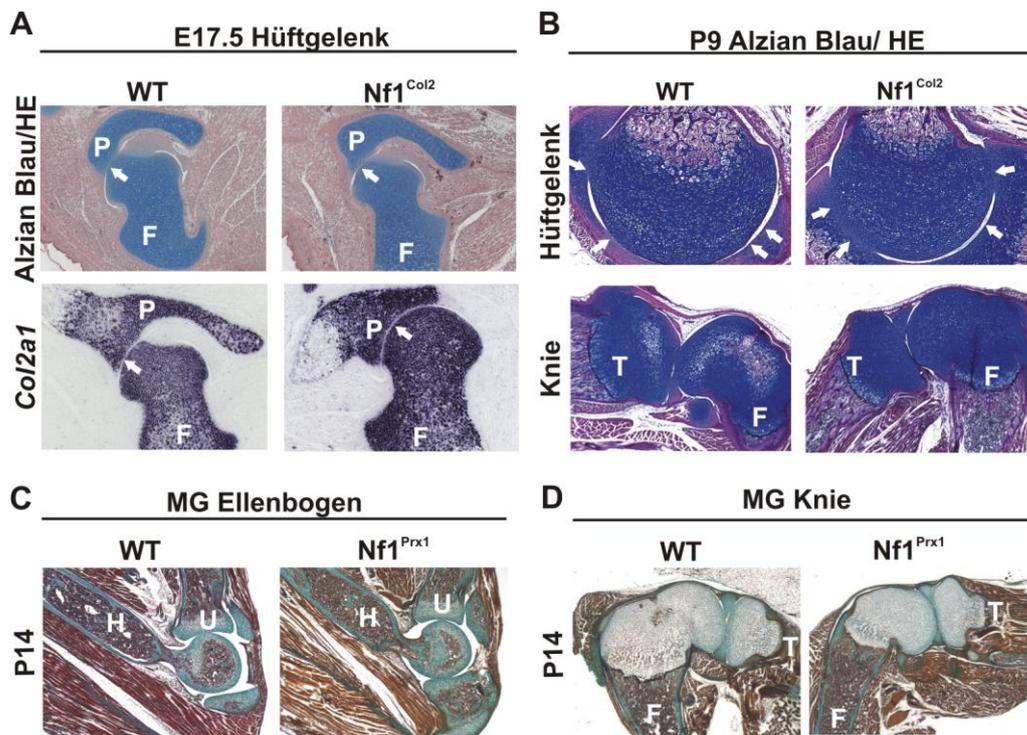
**Abb. 24: Expressionsprofil der Cre-Rekombinase unter Col2-Promotor**

Rosa26-LacZ Reporterermäuse verpaart mit Col2-Cre transgenen Tieren. **(A)** WM-X-Gal-Färbung auf E13.5 Präparaten. Cre-Expression in allen Knorpel-elementen (Gliedmaßen, Wirbelsäule) des sich entwickelnden Embryos. **(B)** Alzian Blau/HE- Färbung auf E13.5 Paraffinschnitten. Blaufärbung der Knorpelanlagen des zukünftigen Hüftgelenks. Muskel- und Bindegewebe markiert (gelbe Pfeile). **(C)** X-Gal-Färbung auf E13.5 Rosa26-LacZxCol2-Cre Gefrierschnitten. Cre-Expression unter Col2-Promotor in Knorpel-elementen des Hüftgelenks sowie in der sich entwickelnden Vorderextremität. Muskel- und Bindegewebe sind lacZ-negativ. Vergrößerung A: 160fach, B und C: 100fach; Abkürzungen: P – Pelvis; F – Femur

#### 4.4.2 Identifizierung eines Gelenkspalts

$Nf1^{Col2}$  Mutanten waren kleinwüchsig, besaßen verkürzte Extremitäten und hatten offensichtlich einen Wirbelsäulendefekt (Daten nicht gezeigt). Auf den ersten Blick waren die Gelenke dieser Mäuse augenscheinlich phänotypisch unauffällig, da die Mäuse nicht wie die  $Nf1^{Prx1}$  Mausmutante ihre Beine nachziehen. Über histologische Analysen wurde dies bestätigt. In Abb. 25A sind eine Alzian Blau/HE-Übersichtsfärbung sowie eine *Col2a1* ISH auf E17.5 alten proximalen Schnitten dargestellt. Man erkennt eindeutig die Trennung von Pelvis und Femur in der Mutante. Zudem konnte mittels ISH die Bildung eines Gelenkspalts bestätigt werden, da die Knorpel-elemente nicht durchgängig *Col2a1*-positiv waren (Abb. 25A). Auch die Übersichtsfärbungen auf 9 Tage alten Paraffinschnitte (P9) des Hüft- und Kniegelenks in Abb. 25B zeigen, dass die Bildung eines Gelenkspalts sowohl im WT als auch in der  $Nf1^{Col2}$  Mutante stattgefunden hat. Betrachtet man jedoch das Kniegelenk der Mutante in Abb. 25B und D, so wird ersichtlich, dass die sekundäre Ossifizierung verzögert war. Die Gelenk-Morphologie von Ellenbogen und Knie hingegen zeigte keine Unterschiede im Vergleich zum WT auf (Abb. 25C und D).

Es ist anzumerken, dass die Exzisionseffizienz der Cre-Rekombinase unter dem Col2-Promotor nicht ermittelt wurde.



**Abb. 25: Histologie der  $Nf1^{Col2}$  Gelenke**

(A) Alzian Blau/HE-Färbung und ISH mit *Col2a1* Sonde auf E17.7 Paraffinschnitten.  $Nf1^{Col2}$  Mutante besitzen ein normal formiertes Hüftgelenk. Die Gelenkkomponenten von Femur und Pelvis sind durch einen Gelenkspalt voneinander getrennt (Pfeil). (B) Alzian Blau/HE-Färbungen auf P9 Paraffinschnitten von Hüftgelenk und Kniegelenk. Das Hüftgelenk der  $Nf1^{Col2}$  Mutante weist einen Gelenkspalt auf (Pfeile). Das Kniegelenk der Mutante hat sich normal entwickelt, die sekundäre Ossifizierung ist jedoch verzögert. (C und D) Masson Goldner-Färbung auf P14 Paraffinschnitten von Ellenbogen- und Kniegelenk. Die Gelenke der Mutante sind in ihrer Größe leicht reduziert, das sekundäre Ossifikationszentrum ist im Kniegelenk der Mutante verzögert ausgebildet. Vergrößerung A: 100fach, B: 50 und 100fach, C und D: 52,5fach; Abkürzungen: P – Pelvis; F – Femur; MG – Masson Goldner-Färbung

#### 4.5 *Nf1* Geninaktivierung führt zur Fibrose-assoziierten Muskelschwäche

Aus der Literatur geht hervor, dass NF1 Patienten an einer verminderten Muskelkraft leiden (Souza et al. 2009; Stevenson et al. 2005).

Um zu überprüfen, ob das  $Nf1^{Prx1}$  Mausmodell auch hier den humanen muskuloskelettalen Phänotyp rekapituliert, wurde im Folgenden der Schwerpunkt auf die prä- und postnatale Muskelentwicklung in der  $Nf1^{Prx1}$  Mutante gelegt.

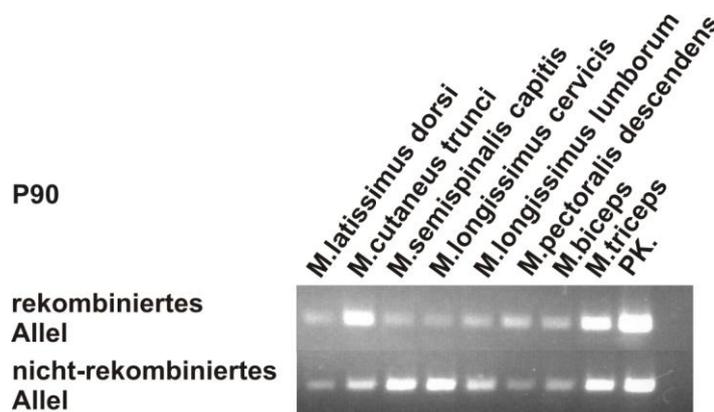
Zudem wurden in den letzten Jahren erste Publikationen veröffentlicht, die einen direkten Zusammenhang zwischen Muskelentwicklung und Gelenkformation beschreiben (Kahn et al. 2009; Nowlan et al. 2010). Dies stellte zusätzlich einen wichtigen und interessanten Ansatzpunkt dar, um eine mögliche Erklärung für den Gelenkphänotyp in der  $Nf1^{Prx1}$  Mutante zu finden.

#### 4.5.1 Exzisionseffizienz der Prx1-Cre vermittelten Rekombination in Muskeln

Zunächst wurde überprüft, wie effizient die Inaktivierung des *Nf1* Gens im Muskelgewebe war. Dafür wurden verschiedene Muskeln aus der Maus isoliert, die sowohl aus unterschiedlichen Bereichen der Extremitäten als auch aus Brust- und Rückenmuskulatur stammen. Mit Hilfe einer speziell etablierten PCR (3.1.4) konnte die Exzisionsrate des Gens ermittelt werden.

Aus Abb. 26 geht hervor, dass das *Nf1* Gen unterschiedlich stark in verschiedenen Muskeln inaktiviert wurde. So zeigte sich eine nahezu vollständige Geninaktivierung im M. triceps (Oberarmmuskel) sowie M. cutaneus trunci (Rumpfhautmuskel). In der Rücken- (M. semispinalis capitis, M. longissimus cervicis, M. longissimus lumborum) und Brustmuskulatur (M. latissimus dorsi; M. pectoralis descendens) hingegen war die Exzision des Gens geringer, teilweise fand dort keine Rekombination statt. Eine WT-Bande (nicht rekombiniertes Allel) wurde sichtbar. Dies gilt in einem wiederholenden Experiment zu prüfen.

Über Rosa26-Reportermaus-Verpaarungen konnte die Spezifität der Cre-Expression unter Kontrolle des Prx1-Promotors gezeigt werden. Abb. 9 beschreibt die X-Gal-Färbung, welche der Cre-Expression entspricht, in allen Zellen der sich entwickelnden Extremitäten. Die in Abb. 9B dargestellten X-Gal-gefärbten Gefrierschnitte beweisen, dass eine Cre-Expression sowohl in Knorpel- als auch im umliegenden Muskelgewebe detektiert werden konnte. Mit Hilfe des konditionellen  $Nf1^{\text{Prx1}}$  Mausmodells ist es demnach möglich, das *Nf1* Gen auch in den Muskeln zu inaktivieren.



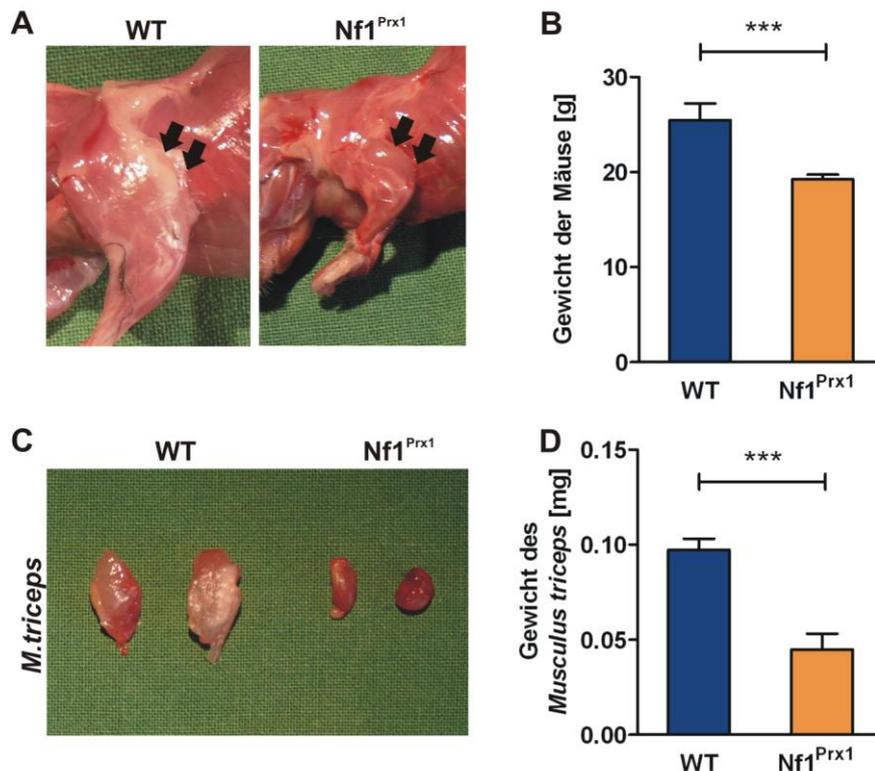
**Abb. 26: Muskelspezifische Rekombination der *Nf1* Allele**

In verschiedene Muskeln aus Extremitäten, Brust und Rücken 90 Tage alter  $Nf1^{\text{Prx1}}$  Mutanten wird über Genotypisierungs-PCR die Geninaktivierung ermittelt. *Nf1* wird unterschiedlich stark in verschiedenen Muskeln der Maus inaktiviert. Im M. triceps und im M. cutaneus trunci wird das Gen nahezu vollständig inaktiviert. In der Rückenmuskulatur (M. semispinalis capitis; M. longissimus cervicis, M. longissimus lumborum) sowie in der Brustmuskulatur (M. latissimus dorsi; M. pectoralis descendens) ist die Geninaktivierung schwächer. Abkürzungen: M – musculus; PK – positive Kontrolle

#### 4.5.2 Größenreduktion der Muskeln und verminderte Zugkraft

Weitere Analysen wurden vornehmlich mit dem M. triceps durchgeführt, weil dieser Oberarmmuskel von den Nf1<sup>Prx1</sup> Mäusen stetig gebraucht wurde, da sich die Fortbewegung der Tiere ausschließlich auf die Vorderextremitäten beschränkte. Die hinteren Extremitäten hingegen waren aufgrund der Fusion des Hüftgelenks nicht in Bewegung, die Muskeln wurden nicht genutzt. Es sollte ausgeschlossen werden, dass der mangelnde Gebrauch der Muskeln zur Veränderung der Muskeleigenschaften führt.

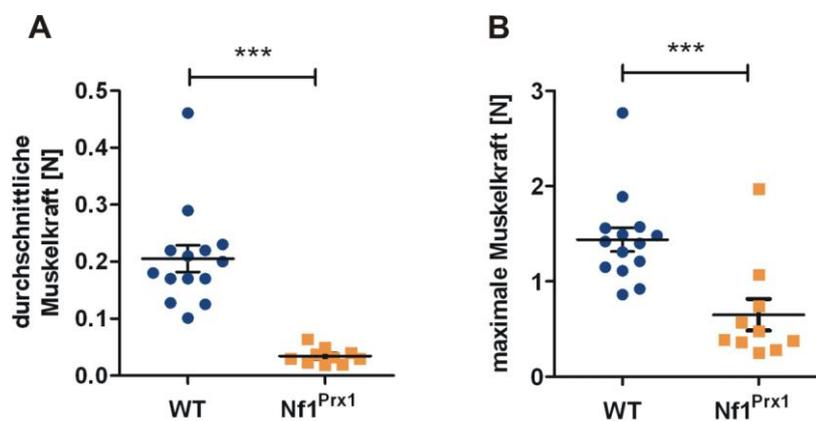
Um im weiteren Verlauf eine Aussage über Größe und Gewicht von Kontrollmäusen und Nf1<sup>Prx1</sup> Mutanten sowie deren Muskeln treffen zu können, wurden jeweils 15 Tiere analysiert. Es ist zu erwähnen, dass hierbei ausschließlich mit Weibchen gearbeitet wurde, um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Aus Abb. 27B wird ersichtlich, dass das mittlere Gesamtgewicht der Nf1<sup>Prx1</sup> Mutanten im Vergleich zur Kontrolle um ca. 30 % verringert war. Anschließend wurde das Gewicht isolierter M. triceps ermittelt. Aus Abb. 27A, C und D geht hervor, dass der M. triceps der Mutante sowohl in seiner Größe als auch im Gewicht deutlich reduziert war. Der M. triceps der Mutante wog durchschnittlich 0,05 g, der Muskel in der Kontrolle hingegen 0,1 g.



**Abb. 27: Bestimmung des Gesamtkörper- und des M. triceps Gewichts**

(A) NF1<sup>Prx1</sup> Mutanten besitzen im Vergleich zum WT einen kleineren M. triceps (Pfeil). (B) Das Gesamtgewicht der NF1<sup>Prx1</sup> Mäuse ist etwa um 30 % gegenüber den Kontrolltieren reduziert. (C und D) Die Größe des Mutanten M. triceps und auch das Gewicht ist um etwa 50 % gegenüber dem WT verringert. Die statistische Auswertung beider Messungen erfolgte anhand eines t-Tests (n = 15; \*\*\* P ≤ 0,001).

Erste Versuche belegten, dass die  $Nf1^{Prx1}$  Mutanten sowohl ein kleineres mittleres Gesamtgewicht als auch kleinere und leichtere Muskeln besitzen. Im Weiteren lag der Fokus auf der Charakterisierung der physikalischen Muskeleigenschaften der Mäuse. Entsprechend dem kausalen Zusammenhang zwischen Muskelgröße und Muskelkraft wurde eine vergleichende Zugkraftmessung an WT Mäusen und  $Nf1^{Prx1}$  Mausmutanten durchgeführt. Dafür wurde ein Kraftmessgerät verwendet (Piróg et al. 2010b). Mit Hilfe der automatischen Auswertung konnte die durchschnittliche wie auch die maximale *pull test* Kraft (Kraft, mit der die Mäuse an der Metallklammer ziehen) der Mäuse ermittelt werden (3.5.2). Bei Betrachtung aller Messwerte (maximale und durchschnittliche Zugkraft) war insgesamt eine große Streuung zu beobachten, was auch die Variabilität des Phänotyps widerspiegelt, die sich bereits auch in der Gelenkausbildung zeigte. Aus der graphischen Darstellung in Abb. 28 ist erkennbar, dass die durchschnittliche Zugkraft [N] in den Kontrolltieren bei ca. 0,2 N lag. In den Mutanten war diese um ca. 90 % reduziert, der Wert entsprach 0,02 N (Abb. 28A). Vergleichbare Tendenzen zeigten sich bei der Auswertung der maximalen Zugkraft. Im Vergleich zum WT (ca. 1,5 N) war diese in der Gruppe der Mutanten um 60-70 % verringert und lag bei ca. 0,5 N (Abb. 28B).



**Abb. 28: Darstellung der durchschnittlichen und der maximalen Zugkraft**

Die Zugkraft der vorderen Extremitäten wird gemessen.

**(A)** Die durchschnittliche Zugkraft der  $Nf1^{Prx1}$  Mutanten ist gegenüber den Kontrolltieren um etwa 90 % reduziert.

**(B)** Die maximale Zugkraft der Mutanten ist um ca. 60-70 % verringert. Die statistische Auswertung der

Messungen erfolgte anhand eines t-Tests ( $n = 15$ ;  $***P \leq 0,001$ ).

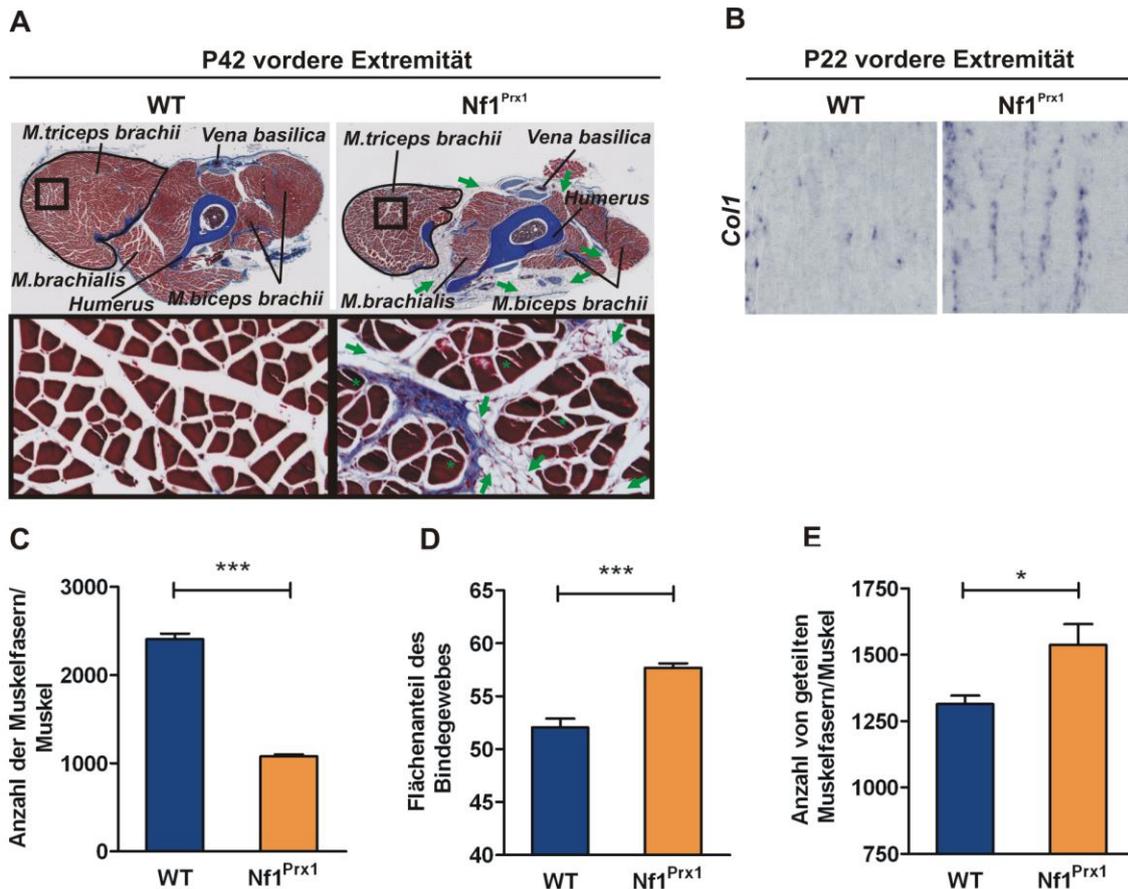
### 4.5.3 Reduktion der Anzahl an Muskelfasern und Zunahme an Bindegewebe

Der Fund über die geringere Muskelgröße und verminderte Zugkraft der Nf1<sup>Prx1</sup> Mäuse stellte einen interessanten Ausgangspunkt für tiefergehende Analysen dar. Um Erkenntnisse über die Morphologie und den strukturellen Aufbau der Skelettmuskulatur zu gewinnen, wurden histologisch angefärbte Querschnitte der Vorderextremitäten angefertigt (Abb. 29).

Es ist eindeutig zu erkennen, dass in der Nf1<sup>Prx1</sup> Mutante alle den Humerus umgebenden Muskelgruppen, wie M. biceps brachii, M. brachialis und M. triceps brachii, kleiner waren im Vergleich zum WT. Demnach war die Fläche des Gesamtquerschnittes durch den proximalen Bereich der vorderen Extremität in der Mutante merklich reduziert (Abb. 29A). Betrachtet man den vergrößerten Ausschnitt des M. triceps, so wird ersichtlich, dass die Anzahl der Muskelfasern/Muskel in der Mutante deutlich verringert war. Diese Beobachtung konnte mittels histomorphometrischer Auswertung bestätigt werden. Die Reduktion der Anzahl an Muskelfasern lag in der Mutante bei ca. 60-70 % (Abb. 29C). Weiterhin war zu beobachten, dass die Fläche an kollagenhaltigem Binde- und Fettgewebe im Muskel der Mutante vergrößert ist. Mittels quantitativer Flächenbestimmung konnte ermittelt werden, dass der Anteil an Binde- und Fettgewebe in der Mutante um ca. 25 % im Vergleich zur Kontrolle erhöht war (Abb. 29D). Das Binde- und Fettgewebe konnte sowohl innerhalb eines Muskels zwischen den Muskelfasern als auch zwischen den einzelnen Muskelgruppen der Vorderextremität im Übermaß detektiert werden. In Abb. 29B ist eine ISH auf Paraffinschnitten (P22) einer Vorderextremität dargestellt. Vergleicht man die *Col1* Genexpression in Kontrolle und Mutante, so konnte eine erhöhte Expression des Markers für Bindegewebe im Muskel der Nf1<sup>Prx1</sup> Maus detektiert werden. Dieses Ergebnis bestätigte nochmal den vermehrten Anteil an kollagenhaltigem Bindegewebe im Muskel der Mutante. Weiterhin wurde in den Muskeln der Nf1<sup>Prx1</sup> Mutante eine erhöhte Anzahl an geteilten Muskelfasern pro Muskel beobachtet. Die Quantifizierung der Anzahl geteilter Muskelfasern offenbarte 25 % mehr geteilte Muskelfasern in der Mutante im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 29E).

#### Abb. 29 nächste Seite: Histologie der Vorderlaufmuskulatur

Azan-Färbung auf sagittalen Schnitten der Vorderläufe von 42 Tage alten Mäusen (P42). Quantitative Auswertung mittels AxioVision Software. **(A, C, D und E)** Die Muskeln der vorderen Extremität der Mutante sind deutlich kleiner im Vergleich zum WT. Die Anzahl der Muskelfasern ist über 50 % gegenüber der Kontrolle reduziert (A und C). Der Anteil an Binde- und Fettgewebe ist im Muskel der Mutante größer (grüne Pfeile, A und D). Quantitative Analysen belegen eine erhöhte Anzahl an geteilten Muskelfasern in den Muskeln der NF1<sup>Prx1</sup> Maus (grüne Sterne, E). **(B)** *Col1* ISH auf P22 Schnitten zeigen eine erhöhte Genexpression in der Mutante. Die statistische Auswertung erfolgte anhand eines t-Tests (n = 3; \*P ≤ 0,5; \*\*\*P ≤ 0,001). Vergrößerung: 25fach und 200fach



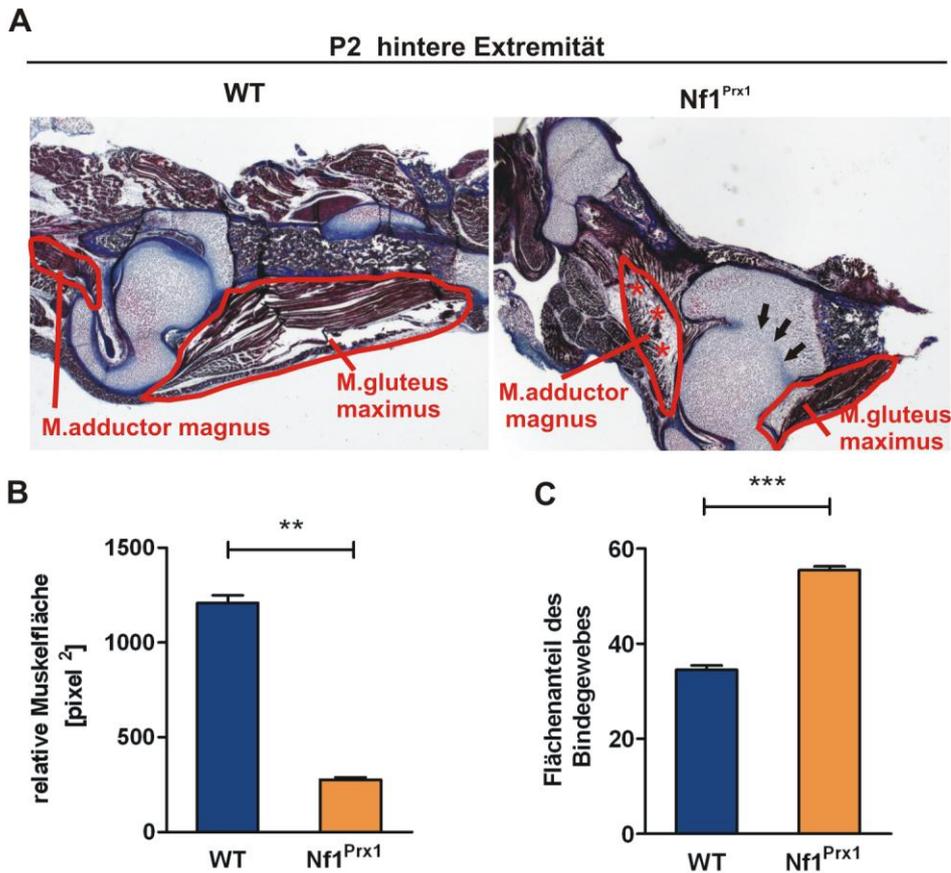
**Abb. 29: Histologie der Vorderlaufmuskulatur**

Beschriftung siehe vorherige Seite

Zusätzlich wurden Histologien der hinteren Gliedmaßen angefertigt. Dafür wurden 2 Tage alte Mäuse präpariert (P2), sagittale Paraffinschnitte angefertigt und diese ebenfalls mit Azan histologisch angefärbt (Abb. 30). In der Nf1<sup>Prx1</sup> Mutante war deutlich das fusionierte Hüftgelenk zu erkennen, wobei der umliegende M. gluteus maximus in seiner Größe stark reduziert war. Aus Abb. 30B geht hervor, dass die relative Muskelfläche um ca. 80 % gegenüber der Kontrolle verringert war. Zudem wurde auch hier im Muskel eine erhöhte Menge an Binde- und Fettgewebe detektiert. Quantitative Analysen zeigten einen ca. 30 %igen Anstieg des Flächenanteils an Binde- und Fettgewebe im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 30C).

**Abb. 30 siehe nächste Seite: Histologie der Hinterlaufmuskulatur**

Azan-Färbung auf sagittalen Paraffinschnitten der hinteren Extremität zum Zeitpunkt P2. Quantitative Auswertung mit AxioVision Software. **(A, B und C)** Die Mutante hat ein fusioniertes Hüftgelenk (Pfeil). Die Größe des M. gluteus maximus der Mutante ist im Vergleich zum WT deutlich reduziert (rote Umrandung, B). Der Anteil an Binde- und Fettgewebe ist zusätzlich um ca. 30 % im M. adductor magnus der Mutante erhöht (rote Sterne, C). Die statistische Auswertung beider Messungen erfolgte anhand eines t-Tests ( $n = 4$ ;  $**P \leq 0,01$ ;  $***P \leq 0,001$ ). Vergrößerung: 25fach



**Abb. 30: Histologie der Hinterlaufmuskulatur**

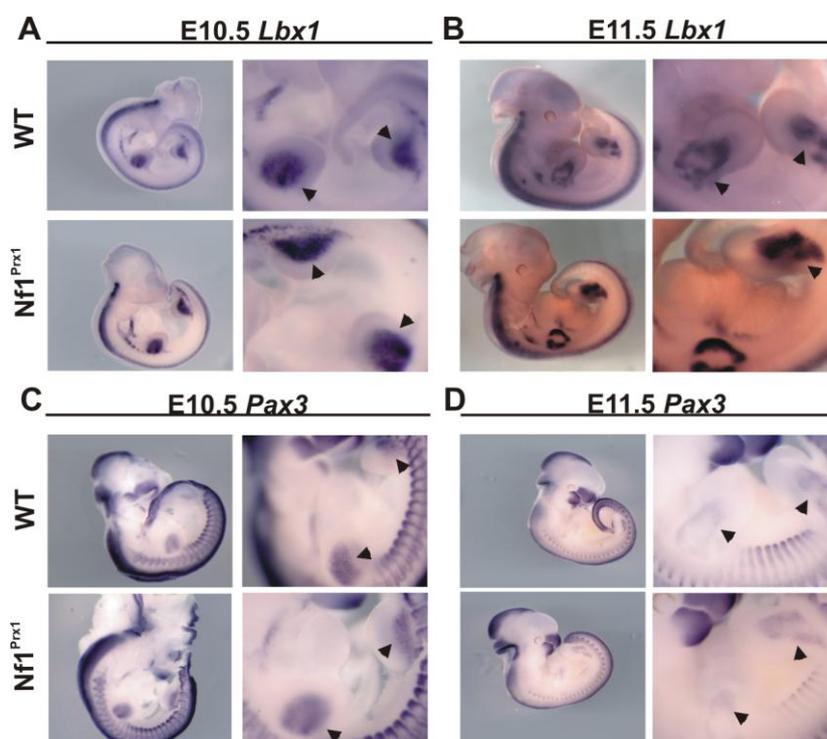
Beschreibung siehe vorherige Seite

#### 4.5.4 Unveränderter Migrations- und Proliferationsprozess der Muskelvorläuferzellen

Es wurden sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch Unterschiede in Größe und Struktur der Muskeln zwischen WT und Nf1<sup>Prx1</sup> Mutante festgestellt. Aufgrund dessen wurde die Muskelentwicklung, die sog. Myogenese, während der Embryonalentwicklung detaillierter untersucht. Ziel dieser Versuche war die Analyse der verschiedenen Phasen der Myogenese, bestehend aus Migration, Proliferation, Differenzierung und terminaler Differenzierung mit den dazugehörigen Markermolekülen, um einen eventuellen Entwicklungsdefekt nachzuweisen (Francis-West et al. 2003).

Zuerst wurde der Prozess der Migration von Muskelvorläuferzellen in der frühen embryonalen Entwicklung zu den Zeitpunkten E10.5 und E11.5 betrachtet. In dieser frühen Phase wandern Vorläuferzellen distal in die sich entwickelnde Extremitätenknospe ein. Die Muskelvorläuferzellen werden von Beginn der Delamination bis zum Ende der Migration durch die Expression der Transkriptionsfaktoren PAX3 (Williams and Ordahl 1994b; Daston et al. 1996; Bober et al. 1994), LBX1 (Schäfer and Braun 1999) und des Tyrosine-Kinase Rezeptors C-MET (Bladt et al. 1995) markiert.

Um zunächst einen Eindruck von den Expressionsprofilen der Migrationsmarkergene *Lbx1* und *Pax3* zu gewinnen, wurden Embryonen zu den Entwicklungsstadien E10.5 und E11.5 gesammelt und diese über eine WM-ISH angefärbt (Abb. 31). Zum Zeitpunkt E10.5 war *Lbx1*, sowohl in den vorderen als auch in den hinteren Extremitätenknospen, einheitlich im Mesenchym exprimiert. Es konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Expression in WT und  $Nf1^{Prx1}$  Mutante beobachtet werden. In E11.5 Embryonen war die *Lbx1* Genexpression zweigeteilt, in eine ventrale und eine dorsale Region der Extremität. Auch hier waren keine Unterschiede zwischen Mutante und Kontrolle erkennbar. Vergleichbare Ergebnisse zeigten die Untersuchungen des Expressionsprofils von *Pax3* (Abb. 31). Dieser Marker konnte zu beiden Entwicklungsstadien detektiert werden und zeigte sowohl in Mutante als auch Kontrolle eine schwächere Expression als *Lbx1*. Es waren ebenfalls keine Unterschiede zwischen Mutante und Kontrolle ersichtlich.

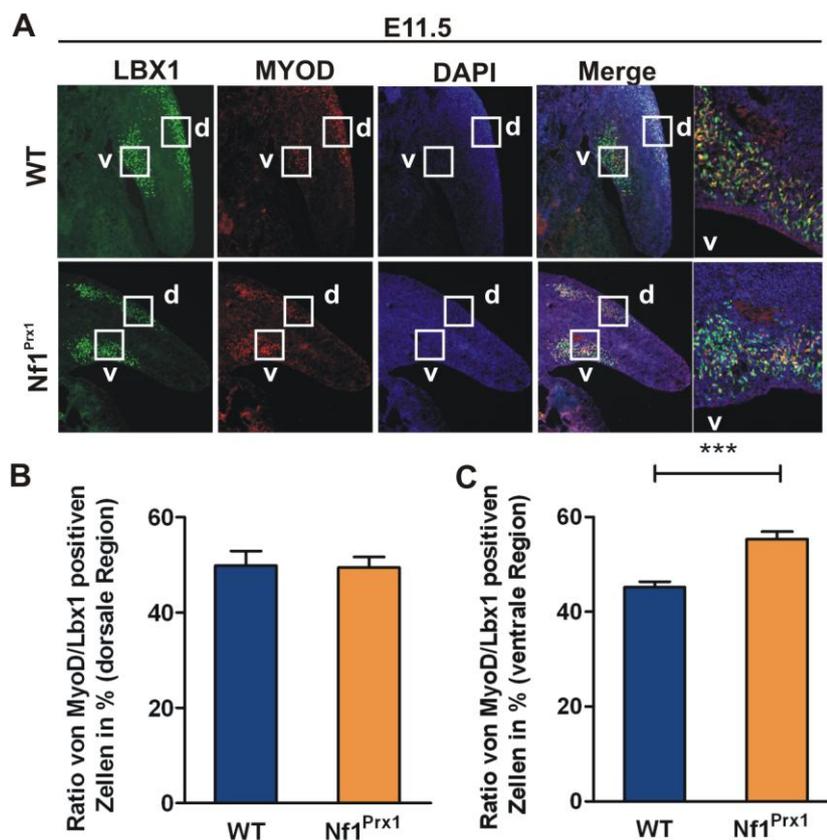


**Abb. 31: WM-ISH zur Detektion migrierender Muskelvorläuferzellen**

WM-ISH für *Lbx1* und *Pax3* (**A und B**) *Lbx1* ist ubiquitär in den Extremitätenknospen und Wirbelbereich von Mutante und WT zum Entwicklungsstadium E10.5 exprimiert (Pfeile). (**C und D**) Die schwache Expression von *Pax3* beschränkt sich auf die Extremitätenknospen und den Wirbelbereich zu den Zeitpunkten E10.5 und E11.5. Es gibt ebenfalls keine Expressionsunterschiede zwischen  $Nf1^{Prx1}$  Mutante und Kontrolle (Pfeil). Vergrößerung: 25fach

Da die Methode der WM-ISH nicht sensitiv genug ist, um eine quantitative Aussage treffen zu können, wurden weitere Versuche unter Verwendung von Antikörpern auf Schnittpräparaten durchgeführt. In Abb. 32A ist ein immunhistochemischer Versuchsansatz auf

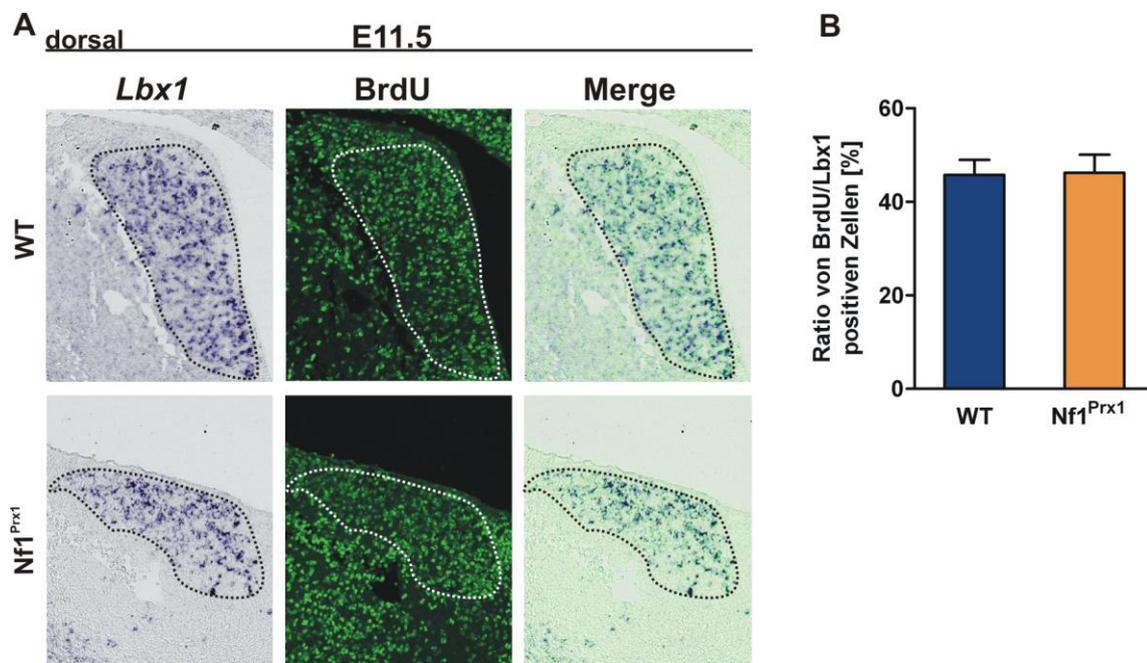
E11.5 Schnitten dargestellt. Es wurden sagittale Gefrierschnitte der sich entwickelnden hinteren Extremität angefertigt. Vorläuferzellen wurden mittels LBX1 Antikörper (grün) und Myoblasten unter Verwendung des MYOD Antikörpers (rot) detektiert, DAPI färbte die Zellkerne an (blau). Um zu überprüfen, ob es Unterschiede hinsichtlich der LBX1- und /oder MYOD-Zellpopulationen in Mutante oder WT gibt, wurden die jeweils angefärbten Zellpopulationen verifiziert. Das Verhältnis beider Zellpopulationen zueinander wurde betrachtet, wobei die ventrale und die dorsale Region der Extremitätenknospe unterschieden wurden. In der dorsalen Region gab es keinen Unterschied hinsichtlich des Verhältnisses von MYOD positiven zu LBX1-markierten Zellen in Mutante und Kontrolle (Abb. 32A und B). Es konnte die gleiche Anzahl sowohl von migrierenden Vorläuferzellen als auch sich entwickelnden Myoblasten bestimmt werden. In der ventralen Region der Vorderextremität war hingegen eine geringe Verschiebung von LBX1 zu MYOD positiven Zellen in der  $Nf1^{Prx1}$  Mutante zu verzeichnen (Abb. 32A und C). Dort war die Anzahl der Myoblasten gegenüber den migrierenden Muskelvorläuferzellen leicht, aber signifikant erhöht.



**Abb. 32: Nachweis migrierender Muskelvorläuferzellen und Myoblasten**

Immunhistochemie auf E11.5 Gefrierschnitten mit LBX1 (grün) und MYOD (rot) Antikörper. Differenzierung in ventrale und dorsale Region der sich entwickelnden Hinterextremität. In der dorsalen Region ist das Verhältnis von MYOD-positiven zu LBX1-positiven Zellen in WT und Mutante gleich (B). In der ventralen Region der Mutante ist die Anzahl an Myoblasten gegenüber den Muskelvorläuferzellen im Vergleich zur Kontrolle erhöht (C). Die statistische Auswertung beider Messungen erfolgte mittels t-Tests ( $n = 4$ ;  $***P \leq 0,001$ ). Vergrößerung: 50fach und 200fach; Abkürzungen: d – dorsal; v – ventral

Nachdem die migrierenden Vorläuferzellen ihren Zielort erreicht haben, beginnen sie zu proliferieren, um die Anzahl myogener Zellen zu erweitern. Gegenstand weiterer Versuche waren daher Untersuchungen des Proliferationsverhaltens der Muskelvorläuferzellen. Unter Verwendung einer Kombinationsmethode aus ISH und Antikörperdetektion konnten sich teilende Muskelvorläuferzellen identifiziert werden. Abb. 33 und Abb. 34 zeigen E11.5 Paraffinschnitte, auf denen die migrierende Muskelvorläuferpopulation mit der *Lbx1* Sonde (blau) und die proliferierenden Zellen über einen BrdU Antikörper (grün) detektiert wurden. Es wurde wieder zwischen dorsaler (Abb. 33) und ventraler Region (Abb. 34) der Extremität differenziert. Für die Auswertung wurden proliferierende migrierende Zellen des Entwicklungsstadiums E11.5 gezählt. Weder in der ventralen noch in der dorsalen Region fanden sich Unterschiede im Proliferationsverhalten zwischen Mutante und WT.

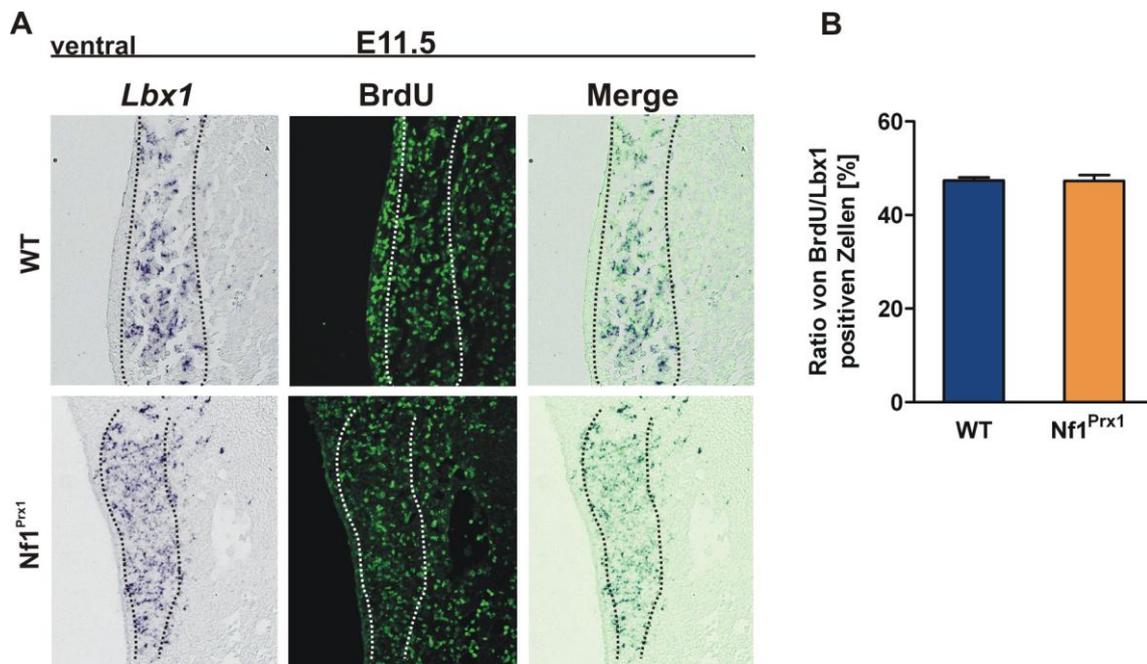


**Abb. 33: Proliferation migrierender Muskelvorläuferzellen (dorsal)**

**(A)** E11.5 Paraffinschnitte gegen *Lbx1* hybridisiert (blaues Signal) und anschließend immunhistochemisch unter Verwendung des BrdU Antikörpers (grünes Signal) behandelt. **(B)** Quantitative Auswertung. In der dorsalen Region werden keine Unterschiede im Proliferationsverhalten von Kontrolle und Mutante detektiert. Vergrößerung: 200fach; n = 3

**Abb. 34 auf der nächsten Seite: Proliferation migrierender Muskelvorläuferzellen (ventral)**

**(A)** Gezeigt sind E11.5 Paraffinschnitte, die zuerst mit der Sonde gegen *Lbx1* hybridisiert (blaues Signal) und danach immunhistochemisch unter Verwendung des BrdU Antikörpers (grün) behandelt werden. **(B)** Quantifizierung. Es werden in der ventralen Region keine Unterschiede im Proliferationsverhalten der Vorläuferzellen von Mutante und WT detektiert. Vergrößerung: 200fach; n = 3



**Abb. 34: Proliferation migrierender Muskelvorläuferzellen (ventral)**

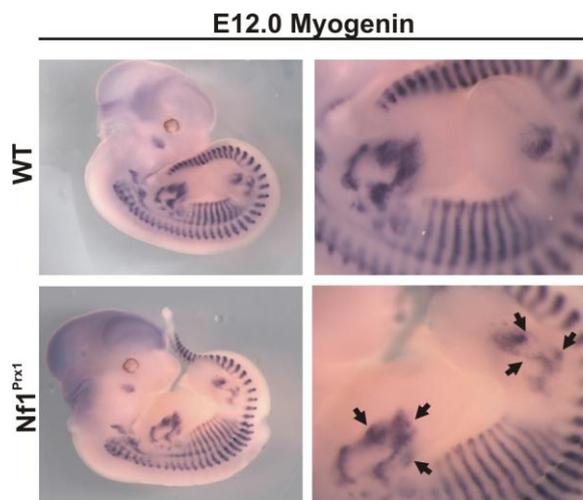
Beschriftung siehe vorherige Seite

#### 4.5.5 Gestörte Myoblastendifferenzierung und gesteigerte Myoblastenproliferation

Da offenbar dem Muskelphänotyp der Nf1<sup>Prx1</sup> Mutante kein Migrations- oder Proliferationsdefekt in der frühen myogenen Entwicklung zu Grunde liegt, wurde der Fokus im Folgenden auf die Prozesse der Muskeldifferenzierung und auf das Gleichgewicht zwischen Differenzierung und Proliferation späterer embryonaler Entwicklungsstadien gelegt.

Nach dem Erreichen der Zielregionen beginnen die Prämyoblasten mit der Expression von Genen der MRF-Familie, d.h. mit dem Start der myogenen Differenzierung (Francis-West et al. 2003). Die Muskeldifferenzierung beginnt mit der Genexpression von *MRF4*, Myogenin und *MyoD*. Diese Transkriptionsfaktoren regulieren den Differenzierungsprozess und begleiten die Fusion von Muskelvorläuferzellen zu primären Myotuben.

Um zunächst eine erste Aussage über das Genexpressionsprofil des Differenzierungsmarkers Myogenin während der Myogenese zu treffen, wurde eine WM-ISH durchgeführt. Zum Zeitpunkt E12.0 war Myogenin zwischen den Wirbelementen sowie in den sich entwickelnden Extremitäten exprimiert (Abb. 35). Gegenüber dem WT war die Expression in der Nf1<sup>Prx1</sup> Mutante deutlich reduziert. Dieses ISH-Ergebnis konnte in mehreren Nf1<sup>Prx1</sup> Embryonen bestätigt werden. Anzumerken ist jedoch, dass der Grad der Expressionsreduktion in den Nf1<sup>Prx1</sup> Mutanten variabel war.



**Abb. 35: WM-ISH mit Myogenin**

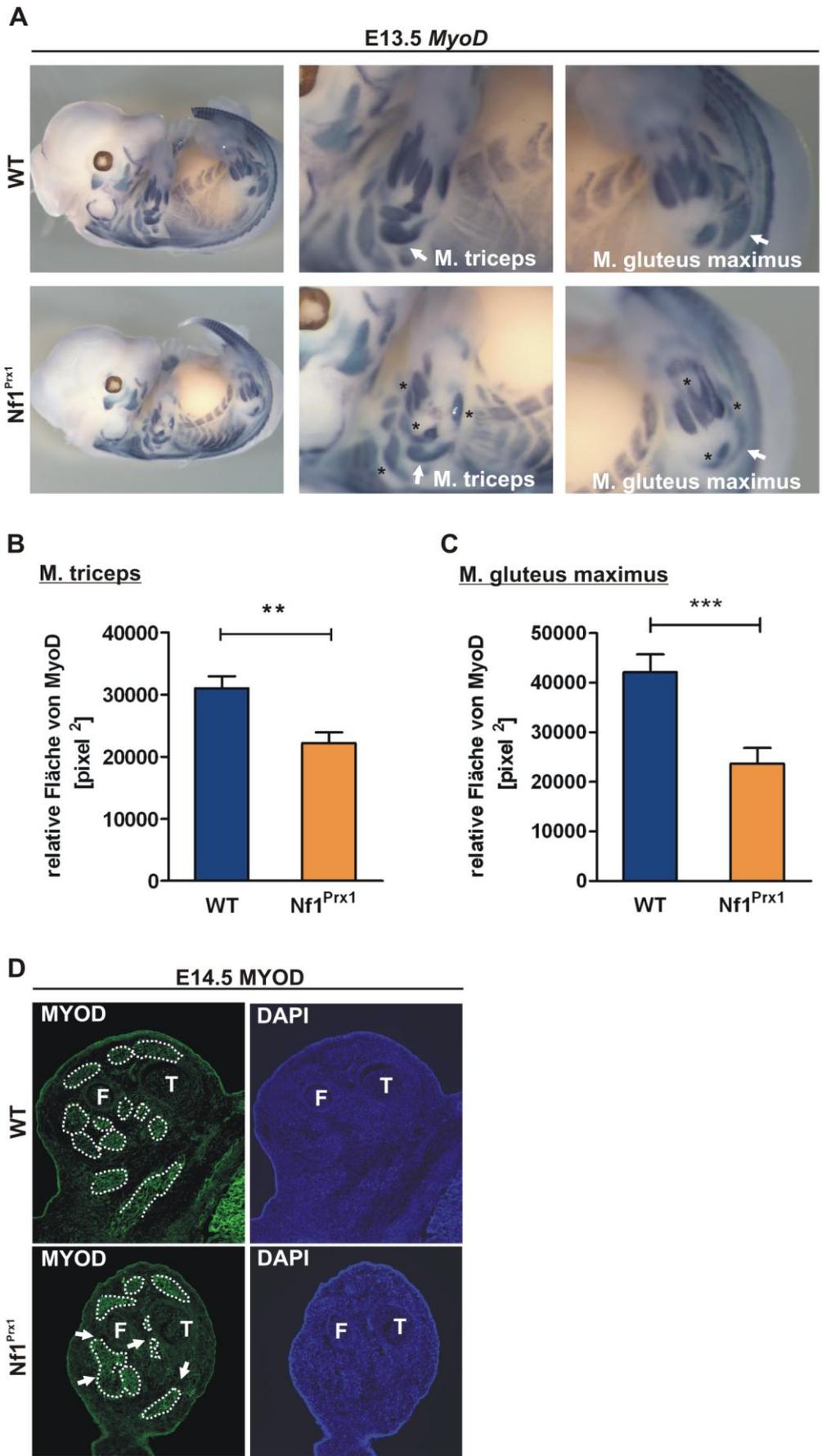
E12.0 Embryonen hybridisiert mit der Sonde gegen Myogenin. Die Genexpression von Myogenin beschränkt sich auf die Zwischenräume der Wirbelemente und die sich formierenden Extremitäten. Im Vergleich zum WT ist die Expression in den sich entwickelnden Extremitäten der  $Nf1^{P_{rx1}}$  Mutante deutlich reduziert (Pfeile).

Um die Differenzierungsunterschiede zwischen Mutante und Kontrolle nochmals zu bestätigen, wurde das Expressionsmuster des Transkriptionsfaktors MYOD analysiert. Abb. 36A zeigt eine WM-ISH von E13.5 Embryonen. Aus den vergrößerten Aufnahmen der Vorder- und Hinterextremitäten wird ersichtlich, dass die *MyoD* Genexpression in der Mutante schwächer als im WT war. Alle Muskeln in der Mutante waren kleiner, einige Muskeln fehlten vollständig. Beispielhaft wurde der M. triceps näher betrachtet (Abb. 36A). Die relative *MyoD* Fläche wurde in diesem Muskel quantitativ bestimmt und war in der Mutante um ca. 25 % gegenüber dem WT verringert (Abb. 36B). Zusätzlich wurde in den Embryonen der M. gluteus maximus markiert, welcher in der Region des missgebildeten Hüftgelenks lokalisiert (Abb. 36A). Auch hier wurde die relative *MyoD* Fläche vermessen, welche in der Mutante im Vergleich zur Kontrolle um nahezu 50 % reduziert war (Abb. 36C).

Die Reduktion des *MyoD* kodierenden Proteins (MYOD) konnte parallel mittels Immunhistochemie auf transversen Schnitten durch den distalen Teil der Hinterextremität bestätigt werden (Abb. 36D). Muskelgruppen um Fibula und Tibia waren in der Mutante in ihrer Größe reduziert. Zusätzlich waren einige Muskeln nicht separiert, sondern traten verschmolzen miteinander auf, andere Muskeln fehlten vollständig.

**Abb. 36 siehe nächste Seite: Muskelspezifische *MyoD* Genexpression und MYOD Proteindetektion**

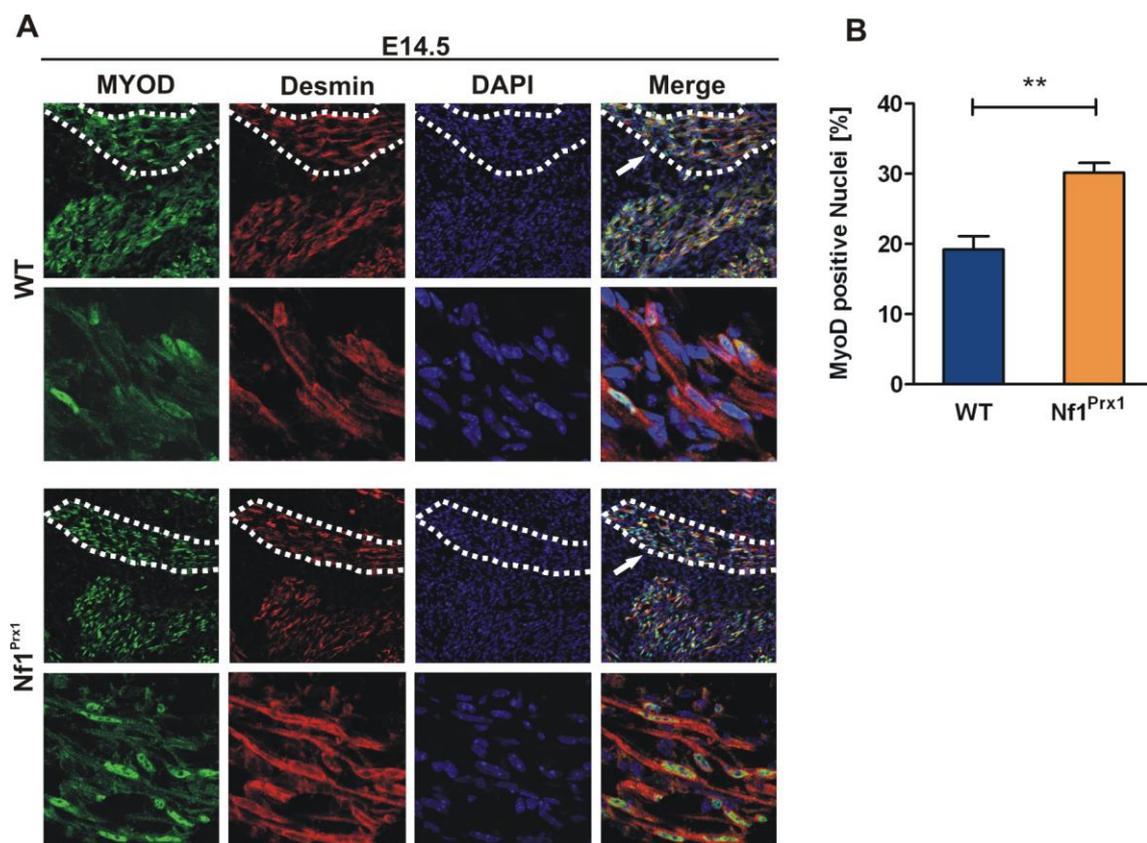
**(A, B und C)** WM-ISH auf E13.5 Embryonen gegen *MyoD*. Die Expression ist deutlich in fast allen Muskeln der  $Nf1^{P_{rx1}}$  Mutante reduziert (Sterne). Die relative Fläche von *MyoD* im M. triceps und M. gluteus maximus (Pfeile) ist in der Mutante verringert (B und C). **(D)** Detektion des MYOD Proteins auf transversen E14.5 Paraffinschnitten der hinteren Extremität. MYOD markiert Myoblasten (grün), DAPI diente als Kernfärbung (blau). Die Muskeln der Mutante sind kleiner, einige fehlen vollständig (Umrandung und Pfeile). Die statistische Auswertung der Messungen erfolgte mittels t-Test ( $n = 6$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P \leq 0,001$ ). Vergrößerung A: 25fach und 32fach; D: 100fach; Abkürzungen: T – Tibia; F – Fibula



**Abb. 36: Muskelspezifische *MyoD* Genexpression und MYOD Proteindetektion**  
 Beschriftung siehe vorherige Seite

Im Prozess der terminalen Muskeldifferenzierung verlassen differenzierende Myoblasten den Zellzyklus, die Myotubenformation beginnt. Ab etwa dem Zeitpunkt E14.0 spricht man vom Abschluss der primären Myogenese, die Primärmyotuben stellen eine Art Vorlage für weitere einwandernde Myoblasten dar (Francis-West et al. 2003).

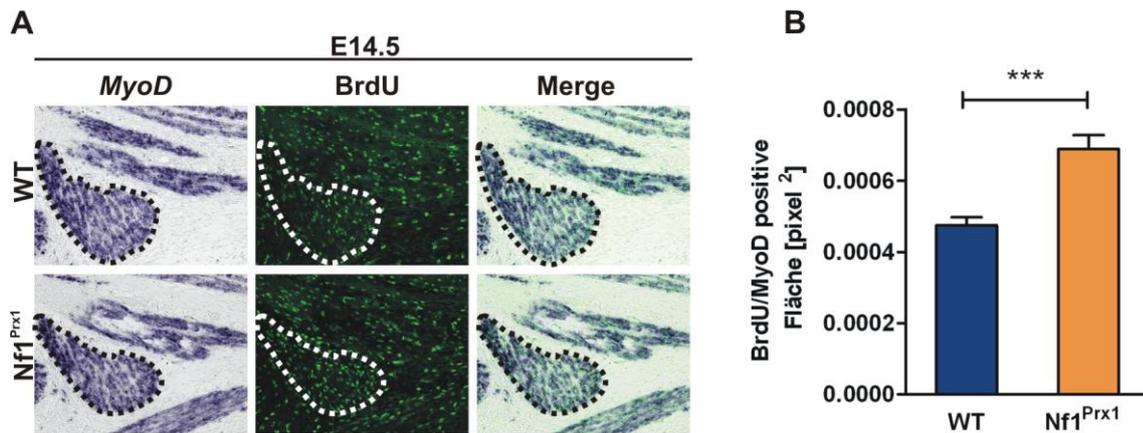
Im Weiteren wurde der terminale Muskeldifferenzierungsprozess näher betrachtet. Dafür wurden E14.5 transverse Schnitte durch die Hinterläufe des Embryos angefertigt. Unter Verwendung eines Antikörpers gegen MYOD konnten Myoblasten (grün) detektiert werden. Ein Desmin Antikörper markierte fertige Myotuben (rot). Für die Kernfärbung wurde DAPI verwendet (blau). Aus Abb. 37A geht hervor, dass die MYOD Proteinverteilung in der Kontrolle weitaus breitflächiger war, das Protein war im Zytoplasma wie auch im Nukleus lokalisiert. In der Mutante schien die Proteinlokalisierung vornehmlich auf den Nukleus beschränkt zu sein. Es wurden etwa 30 % mehr MYOD-positive Nuklei in der Mutante im Vergleich zum WT detektiert (Abb. 37B).



**Abb. 37: MYOD Proteinlokalisierung in Myofibrillen**

**(A)** E14.5 transverse Gefrierschnitte, die immunhistochemisch mit MYOD Antikörper (grün), Desmin Antikörper (rot) und DAPI (blau) markiert werden. Im Vergleich zum WT ist die Anzahl an MYOD-positiven Nuklei in Desmin-markierenden Myofibrillen der Nf1<sup>Prx1</sup> Mutante um etwa 30 % erhöht **(B)**. Die statistische Auswertung beider Messungen erfolgte anhand eines t-Tests (n = 4, \*\*P ≤ 0,01). Vergrößerung: 200fach und 630fach

Parallel dazu wurde die Proliferationsrate der Myoblasten zum Zeitpunkt der terminalen Differenzierung untersucht. Dabei wurde ebenfalls eine Kombinationsmethode, bestehend aus ISH mit anschließender Antikörperdetektion, auf E14.5 Paraffinschnitten verwendet. Abb. 38A zeigt das detektierte mRNA Signal von *MyoD* (blau), proliferierende Zellen wurden mit BrdU Antikörper angefärbt (grün). Bei der Betrachtung gleicher Muskelregionen und der Quantifizierung der Anzahl proliferierender Zellen konnte eine um 30 % gesteigerte Proliferationsrate im *MyoD*-positiven Bereich der  $Nf1^{Prx1}$  Mutante nachgewiesen werden (Abb. 38B).



**Abb. 38: Proliferationsrate *MyoD*-positiver Myoblasten**

(A) Gezeigt sind E14.5 transverse Paraffinschnitte, welche mit der Sonde gegen *MyoD* hybridisiert und über BrdU Antikörper immunhistochemisch angefärbt sind. (B) Quantitative Auswertung BrdU-positiver Zellen im *MyoD*-exprimierenden Bereich. Die Proliferationsrate *MyoD*-markierter Zellen ist in der  $Nf1^{Prx1}$  Mutante um etwa 30 % erhöht. Die statistische Auswertung beider Messungen erfolgte anhand eines t-Tests (n = 3, \*\*\*P ≤ 0,001). Vergrößerung: 200fach

Untersuchungen der Myogenese in der  $Nf1^{Prx1}$  Mutante zeigten, dass dem Muskeldefekt kein verändertes Migrations- und Proliferationsverhalten der initialen Myogenese zugrunde liegt. Weitere Untersuchungen bewiesen jedoch, dass zum einen der Differenzierungsprozess der  $Nf1^{Prx1}$  Muskelzellen gestört ist, und zum anderen, dass die *MyoD*-positiven Myoblasten eine gesteigerte Proliferationsrate aufweisen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Etablierung eines konditionellen Knockout Systems von *Nf1* in frühen mesenchymalen Vorläuferzellen der Extremitäten

#### 5.1.1 Zeit- und Gewebespezifität des *Prx1*-Promotors

Ziel war die Etablierung eines konditionellen  $Nf1^{Prx1}$  Mausmodells, in dem *Nf1* unter Kontrolle des *Prx1*-Promotors inaktiviert wird. Um die Spezifität des *Prx1*-Promotors zu überprüfen, wurde die *Prx1*-Cre Maus mit dem Rosa26-Reporterstamm verpaart (Soriano 1999). Die Cre-Rekombinaseexpression konnte, wie erwartet zum Zeitpunkt E9.5 in den sich entwickelnden Extremitätenknospen nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt E11.5 wurde eine Cre-Genexpression in beiden Extremitäten, kranial und kraniofazial, detektiert (Abb. 9A). Mit Hilfe von X-Gal-gefärbten Schnittpräparaten konnten die Zellen identifiziert werden, in denen eine Cre-Rekombination stattfand. Auf E13.5 Schnitten zeigte sich eine klare Determination der Cre-Expression in den sich entwickelnden Extremitäten. Sowohl Knorpel als auch umliegendes Binde- und Muskelgewebe waren lacZ-positiv (Abb. 9B). Diese Ergebnisse decken sich demzufolge mit denen von Logan et al. und bestätigen die Spezifität der Cre-Rekombinase unter dem *Prx1*-Promotor (Logan et al. 2002; Durland et al. 2008).

Mittels Genotypisierungs-PCR konnte in verschiedenen Zellen der  $Nf1^{Prx1}$  Mutanten das Rekombinationsereignis des *Nf1* Gens nachgewiesen werden. Aus Abb. 10 ist erkennbar, dass *Nf1* sowohl in stromalen als auch in Osteoblasten aus dem Schädeldach (Calvaria), in Chondrozyten und in Endothelzellen fast vollkommen inaktiviert wurde. Wie erwartet, wurde das Gen in Osteoklasten nicht inaktiviert, da diese nicht mesenchymalen, sondern hämatopoetischen Ursprungs sind (Marks and Popoff 1988). Weiterhin fand eine Geninaktivierung in verschiedenen Muskeln der  $Nf1^{Prx1}$  Maus statt. Aus Abb. 26 geht hervor, dass *Nf1* nahezu vollständig sowohl im M. triceps als auch im M. cutaneus trunci inaktiviert wurde. In den Muskeln der Rücken- und der Brustmuskulatur hingegen war die Geninaktivierung schwächer.

Aus den Ergebnissen der Genotypisierungs-PCR wurde ersichtlich, dass in den jeweiligen Proben eine schwache WT DNA-Bande amplifiziert wurde (Abb. 10 und Abb. 26). Das bedeutet, dass ein Restniveau von *Nf1* vorhanden ist bzw. dass in der jeweiligen Gewebeprobe Zellen hämatopoetischen Ursprungs vorhanden sind. Und in diesen findet wie bereits gesagt, keine Geninaktivierung statt.

### 5.1.2 Vor- und Nachteile des Prx1-Promotors

Der Prx1-Promotor steuert die Transgenexpression innerhalb eines breiten Zellspektrums, da verschiedene Zellpopulationen des vertebralen muskuloskelettalen Systems den Promotor exprimieren. Dazu zählen sowohl das somitische Mesoderm als auch das laterale Plattenmesoderm (Winslow et al. 2007). Ein weiterer Vorteil ist die relativ frühe Expression zum Entwicklungszeitpunkt E9.5 (Logan et al. 2002).

Als Nachteil hingegen erweist sich die Untersuchung von zellautonomen und nicht-zellautonomen Entwicklungsprozessen. Man kann nicht eindeutig zwischen den initial verursachten Effekten einzelner Zelltypen mesenchymalen Ursprungs unterscheiden und daraus Rückschlüsse über entwicklungsbedingte zellautonome bzw. nicht-zellautonome Prozesse ziehen. Es gilt: Je spezifischer man die Gewebeexpression bzw. den Expressionszeitpunkt wählt, desto spezifischer kann unter einem gezielt gewählten Promotor das Gen inaktiviert werden und umso einfacher kann die phänotypische Analyse verlaufen. Primär- und Sekundäreffekte können dann einfach voneinander unterschieden und gegebenenfalls vernachlässigt werden.

Um den durch *Nf1* Verlust bedingten muskuloskelettalen Phänotyp zu untersuchen, könnte man für die Untersuchung des Knochenphänotyps den Col1-Promotor verwenden. Eine chondrozytenspezifische Geninaktivierung kann mittels Col2-Promotor erfolgen. Eine Gen-Ablation in der frühen Phase der Myogenese könnte z.B. unter Verwendung eines Lbx1- oder Pax3-Promotors erfolgen.

Die dabei eventuell auftretenden Phänotypen können miteinander verglichen und Rückschlüsse auf zellartsspezifische Prozesse gezogen werden. Durch Eingrenzung der Zellart kann deren Rolle im Entwicklungsprozess einfacher charakterisiert werden.

Im Falle der *Nf1*<sup>Prx1</sup> Mutante ist die phänotypische Analyse sehr komplex, da unterschiedliche Elemente wie Knochen, Knorpel, Gelenk und Muskel betroffen sind. Es ist dabei schwierig, Primär- und Sekundäreffekte zu unterscheiden und auch den komplexen Pathomechanismus der Neurofibromatose detailliert zu verstehen.

## 5.2 Inaktivierung von *Nf1* führt zur Wachstumsverzögerung der Skelettelemente und zu veränderter Wachstumsfuge

### 5.2.1 Fehlregulation der IHH-Signaltransduktion und SOX9 Aktivierung in der Wachstumsfuge

Es ist bekannt, dass das Längenwachstum der Skelettelemente in der pränatalen Entwicklung wie auch nach der Geburt über die Wachstumsfuge der Röhrenknochen im Prozess der endochondralen Ossifikation erfolgt (1.1.1). Dabei wird zunächst eine knorpelige Anlage gebildet, die später durch Knochen ersetzt wird (Kornak and Mundlos 2003).

Kinder, die an Neurofibromatose Typ 1 leiden, sind charakteristisch meist kleinwüchsig (Wallace 2000). *Nf1*<sup>P<sub>rx1</sub></sup> Mausmutanten waren ebenfalls minderwüchsig (Abb. 17). Die Skelettelemente der Vorder- und Hinterextremitäten waren in ihrer Größe um ca. 25 % gegenüber dem WT reduziert (Abb. 11). Bei histologischer Begutachtung der Knochenwachstumsfugen wurde eine Größenreduktion der proliferierenden und hypertrophen Chondrozytenzonen sichtbar (Abb. 12). Mittels Zellkulturexperimenten konnte ein vermindertes Proliferationsverhalten der Chondrozyten um ca. 30 % gegenüber den WT Chondrozyten demonstriert werden (Abb. 13). Unter Verwendung von ISH auf E15.5 und P1 Wachstumsfugen und qRT-PCR wurde gezeigt, dass *Ihh* und *Ptc1* reduziert exprimiert wurden (Abb. 14 und Abb. 15). Zusätzlich konnte durch qRT-PCR und Western Blot Analysen eine *Sox9* und *p21/waf1* Aktivierung in *Nf1*<sup>P<sub>rx1</sub></sup> Mausmutanten detektiert werden (Abb. 15).

Es ist bereits publiziert, dass IHH als Hauptregulator der Proliferation und Chondrozyten-differenzierung über einen PTHrP-abhängigen sowie unabhängigen Signalweg fungiert (Kobayashi et al. 2005; Minina et al. 2002). Eine verminderte *Ihh* sowie *Ptc1* Genexpression, wie es in den *Nf1*<sup>P<sub>rx1</sub></sup> Wachstumsfugen gezeigt werden konnte, resultiert in einem geringeren Proliferationspotenzial der Chondrozyten und einer kleineren Zone proliferierender Chondrozyten. Im Knockout Modell für *Ihh* wurde jedoch gezeigt, dass der Verlust des *Ihh* Gens zu einer verkürzten proliferierenden Chondrozytenzone führt. Die Chondrozyten treten vorzeitig in den Prozess der hypertrophen Chondrozytendifferenzierung ein. Folglich ist die hypertrophe Zone größer (St-Jacques et al. 1999). Das hingegen deckt sich nicht mit den Ergebnissen in der *Nf1*<sup>P<sub>rx1</sub></sup> Wachstumsfuge, da dort sowohl die hypertrophe wie auch die proliferierende Chondrozytenzone verkürzt vorlagen. Daraus wird ersichtlich, dass die Regulation der Chondrozytenproliferation und Differenzierung in der *Nf1*<sup>P<sub>rx1</sub></sup> Mutante sowohl vom IHH-Signalweg als auch durch andere Mechanismen gesteuert wird.

Daneben ist bekannt, dass eine Größenreduktion der Skelettelemente, eine verminderte Proliferationsrate und eine geringere *Ihh* Genexpression in Mäusen beobachtet werden konnte, die

eine aktivierende Mutation im *Fgfr3* (*fibroblast growth factor receptor 3*) Gen tragen (Rousseau et al. 1994; Chen et al. 1999). Diese an Achondroplasie leidenden Mäuse sind den  $Nf1^{Prx1}$  Mausmutanten phänotypisch sehr ähnlich. Sie sind ebenfalls kleinwüchsig und besitzen verkürzte Gliedmaßen. Die FGF-Signalkaskade ist auch ein potentieller Pfad zur Aktivierung von RAS. Funktionsgewinn-Mutationen (*gain-of-function mutation*) im *Fgfr3* Gen führen zur Inhibierung der Proliferation von Chondrozyten, was eine gestörte Knorpelbildung, eine verfrühte Verknöcherung der Epiphyse und damit eine Einschränkung des Längenwachstums in den Extremitäten zur Folge hat (Wang et al. 2001).

In FGFR3 Überexpressionsstudien konnte zusätzlich eine Zunahme des p21/Waf1 Zellzyklusregulators ermittelt werden. Das führt in den Chondrozyten zum vorzeitigen Verlassen des Zellzyklus und zum Eintreten der Zellen in die Hypertrophie (Li et al. 1999; Legeai-Mallet et al. 2004). In  $Nf1^{Prx1}$  Mutanten war der Proteingehalt an p21/Waf1 ebenfalls erhöht und kann damit als mögliche Erklärung einer verminderten Chondrozytenproliferation dienen (Abb. 16).

Die Aktivierung des MAPK-Signaltransduktionswegs stromabwärts von RAS führt in Chondrozyten gleichermaßen zu einem Achondroplasie-ähnlichen Kleinwuchs. So konnten *in vitro* Studien mit mesenchymalen Zellen einen stimulierenden Einfluß von FGFs auf *Sox9* und *Col2a1* Genexpression unter Aktivierung der MAPK-Signalkaskade demonstrieren (Murakami et al. 2000). SOX9 Überexpressionsstudien führten zu einem ähnlichen Phänotyp, gekennzeichnet durch Inhibition der Chondrozytenproliferation und Verzögerung des Überganges von Proliferation zu Hypertrophie (Akiyama et al. 2004). Anhand von SOX9 *in vitro* Überexpressionsversuchen wurde ein direkter Zusammenhang in der Regulation der Chondrozytendifferenzierung zwischen SOX9 und IHH/PTHrP beschrieben (Amano et al. 2009).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der Minderwuchs der  $Nf1^{Prx1}$  Mausmutanten auf eine verringerte Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten in der Knochenwachstumsfuge zurückzuführen ist. Sowohl die SOX9 Aktivierung als auch eine veränderte IHH-Signaltransduktionskaskade können dafür als mögliche Erklärung dienen.

### 5.2.2 RAS Aktivierung führt zur gesteigerten *Opn* Genexpression

Expressionsanalysen mittels ISH und qRT-PCR liessen Osteopontin (*Opn*) in den näheren Fokus treten. Das *Opn* Gen war in der Mutante deutlich hochreguliert (Abb. 14 und Abb. 15). Das OPN Protein ist ein sezerniertes Zytokin und Zelladhäsionsprotein, welches von verschiedenen Zelltypen produziert wird. Im Knochen wird es vornehmlich in Osteoblasten, terminal differenzierten Chondrozyten sowie an den Knorpel-Knochengrenzen exprimiert

(Denhardt et al. 2001). Seine Funktion beschränkt sich dort auf den Prozess des Knochenumbaus (*bone remodeling*), in dem alte Knochensubstanz von Osteoklasten abgebaut und neue durch Osteoblasten aufgebaut wird. Dabei spielt OPN eine entscheidende Rolle beim Verankern der Osteoklasten in die ECM des Knochens (Reinholt et al. 1990). OPN beinhaltet ein RGDS-Sequenz-Motiv, welches das Überleben, Verankern und die Migration unterschiedlicher Zelltypen fördert (Standal et al. 2004).

Zudem sprechen mehrere Publikationen OPN einen angiogenen Effekt zu. Überexpressionsstudien von OPN in den Modellorganismen Huhn und Maus zeigten eine vermehrte Blutgefäßbildung im Knochen (Asou et al. 2001; Leali et al. 2003). Dieser Effekt wurde auch in der *Nf1<sup>Prx1</sup>* Mausmutante beobachtet (Daten nicht gezeigt; Kolanczyk et al. 2007). Der Verlust von *Nf1* führt zu einer dramatischen Invasion von Blutgefäßen im Bereich des Ranvierschen Schnürrings und in der Wachstumsfuge des Knochens. Eine gesteigerte *Opn* Genexpression kann demnach die Erklärung für eine vermehrte Vaskularisierung an der Knorpel-Knochengrenze sowie eine vermehrte Anzahl an Osteoklasten darstellen (Daten nicht gezeigt; Kolanczyk et al. 2007). In anderen Studien konnte demonstriert werden, dass eine aktivierende Mutation im Gen des kodierenden FGFR3 einen induzierenden Einfluss auf die *Opn* Expression in Chondrozyten und Osteoblasten ausübt (Chen et al. 1999). Parallel dazu konnten Segev et al. beweisen, dass eine konstitutive Aktivierung des FGFR3 zur vermehrten Angiogenese und Osteoklastenbildung führt (Segev et al. 2000).

Es ist bekannt, dass Krebspatienten mit aggressiven Tumoren erhöhte Mengen an OPN aufweisen (Crawford et al. 1998; Wang and Denhardt 2008). OPN übernimmt die Funktion eines Botenstoffes, führt vielfältige Aufgaben aus wie z.B. die Regulation des Tumorwachstums durch gezielte Zell-Matrix-Interaktionen und zelluläre Signalweiterleitung durch die Bindung mit Integrinen und dem CD44-Rezeptor (Wai and Kuo 2004). Im Zusammenhang mit Tumoren und OPN ist an dieser Stelle das onkogene RAS Protein zu erwähnen. Es ist bereits bekannt, dass das RAS Protein *Opn* reguliert (Denhardt et al. 2001; El-Tanani et al. 2006). *In vitro* Experimente konnten bestätigen, dass RAS-transformierte Zellen eine erhöhte *Opn* Genexpression besitzen. Durch eine Behandlung der Zellen mit *antisense-Opn* sank die Fähigkeit der Tumorbildung und Metastasenbildung (Chambers 1995).

Der *Opn* Promotor besitzt LEF1-, ETS- und AP1-Bindemotive, die einen Einfluss auf die Transkription ausüben. Diese Transkriptionsfaktoren gehören zur ETS (*E-twenty six*)-Transkriptionsfamilie, die wichtige Funktionen in physiologischen und pathologischen Prozessen wie Embryogenese, Wundheilung und Tumorprogression ausüben (Wasylyk et al. 1993). Es ist bekannt, dass eine Koexpression der Gene *Pea3* und *Lef1* zur gesteigerten Emp-

findlichkeit des *Opn* Promotors führen (El-Tanani et al. 2004). Mit Hilfe der qRT-PCR konnte in  $Nf1^{Prx1}$  Chondrozyten ebenfalls eine erhöhte Genexpression von *Pea3* und *Lef1* nachgewiesen werden (Abb. 15). Demnach lässt sich mutmaßen, dass diese Transkriptionsfaktoren den Einfluss der gesteigerten RAS Aktivierung direkt auf *Opn* übertragen.

### 5.2.3 Aktivierung der RAS/MAPK-Signalkaskade

Wie bereits beschrieben ist der MAPK-Signaltransduktionsweg eine mehrstufige Phosphorylierungskaskade von Serin/Threonin-Kinasen, die an der Regulation der Embryogenese, der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums und dem programmierten Zelltod beteiligt sind (Mordret 1993; Guan 1994). Zellwachstum, Zellproliferation und Differenzierung werden über die mitogen-aktivierenden *extracellular signal-related kinases* (ERK1/2), eine der drei MAPK-Gruppen, gesteuert. Hierbei ist das onkogene RAS Protein zu nennen, welches durch Aktivierung der ersten Kinase (RAF) direkten Einfluss auf das Zellverhalten nehmen kann (1.2.3). Dieser Signalweg ist in vielen Krebsarten hyperaktiviert (Bos 1989; Goodsell 1999).

Im  $Nf1^{Prx1}$  Mausmodell liegt das *Nf1* Gen inaktiv vor. Folglich wird das RAS Protein nicht inaktiviert, was eine ungehemmte Aktivierung der MAPK-Signalkaskade zur Folge hat. Um den Einfluss des *Nf1* Verlustes auf den MAPK-Signalweg zu untersuchen, wurden Western Blot Analysen mit Knorpellysaten aus WT und  $Nf1^{Prx1}$  Mutante durchgeführt. Mittels eines *Pulldown Assays* und anschließender Antikörperdetektion konnte eine erhöhte Menge GTP-gebundenes aktives RAS im Lysat der Mutante nachgewiesen werden (Abb. 16). Eine Aktivierung des RAS-Signalweges war damit bewiesen. Auch Dasgupta und Gutmann konnten den Einfluss von Neurofibromin und seine Schlüsselrolle als RAS-GAP Protein in ihren Analysen herausstellen (Dasgupta and Gutmann 2003).

Als Nächstes wurde der Fokus auf die stromabwärts gelegenen ERK1/2-Kinasen des MAPK-Signalweges gelegt. Auch hier war es möglich, die phosphorylierten aktiven Formen von ERK1 und ERK2 (pERK1/2) nachzuweisen. Im Vergleich zum WT konnte ein erhöhter Proteingehalt in der Mutante gemessen werden (Abb. 16).

Zudem ist ein direkter Zusammenhang zwischen dem MAPK-Signalweg und dem p21/Waf1 Protein beschrieben. p21/Waf1 gehört zur der Cip/Kip Familie der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKI, *Cyclin-dependent kinase inhibitor*). Es fungiert einerseits als Inhibitor der Proliferation und Zelldifferenzierung, inhibiert damit Cyclin/CDK-Komplexe und folglich die Zellzyklusprogression (Sherr 1995; Dotto 2000). Andererseits wurde p21/Waf1 auch als Apoptose-Inhibitor beschrieben (Gartel et al. 2001). In den Western Blot Experimenten konnte wie bereits erwähnt eine erhöhte Proteinmenge an p21/Waf im Chondrozytenlysat der Mutante detektiert werden (Abb. 16). Dieser Fund deckt sich mit verschiedenen Literaturanga-

ben, in denen eine Aktivierung des MAPK-Signalwegs zur erhöhten *p21/Waf1* Genexpression führte (Moosavi and Yazdanparast 2008; Das et al. 2000).

Der Verlust von *Nf1* führt zur Hyperaktivierung der RAS/MAPK-Signaltransduktionskaskade, was in einer Vielzahl an dysregulierten Entwicklungsprozessen des skelettalen Systems resultiert. Der Einfluss der aktivierten MAPK-Signalkaskade auf das skelettale System wurde bereits beschrieben (Murakami et al. 2000; Kolanczyk et al. 2007).

### 5.3 Verlust von *Nf1* führt zur Missbildung der Gelenke in der *Nf1<sup>Prx1</sup>* Mutante

#### 5.3.1 Missbildung von Hüft-, Ellenbogen- und Kniegelenk

Mittels  $\mu$ CT-3D-Rekonstruktion konnte eine makroskopische Betrachtung des Hüft-, Ellenbogen und Kniegelenks der *Nf1<sup>Prx1</sup>* Mausmutante erfolgen. Allen drei Gelenken war eine deformierte Knochen- und Gelenkstruktur gemeinsam (Abb. 18 und Abb. 22). Die Knochen waren teilweise verdickt und wiesen als Hauptmerkmal alle eine unebene Oberfläche auf. Die Gelenkköpfe von Hüfte und Ellenbogen waren verformt. Die Kugelgelenkform liess sich nur erahnen (Abb. 18 und Abb. 22). Zudem war das Kniegelenk der Mutante in seiner Größe deutlich reduziert (Abb. 22D).

Untersuchungen der Knocheneigenschaften in der Vorderextremität zeigten, dass die Knochen der Mutante eine gesteigerte Porosität und einen geringeren Mineralgehalt aufwiesen (Daten nicht gezeigt; Kolanczyk et al. 2007). Zusätzlich konnten vermehrt Gefäße in diesem Knochen immunhistochemisch angefärbt werden, die eine mögliche Erklärung für die veränderten physikalischen Eigenschaften des Knochens und seiner porösen Oberflächenstruktur bieten (Daten nicht gezeigt; Kolanczyk et al. 2007). Parallel zur *in vivo* Analyse wurde ein *in vitro* System etabliert, mit dem das Differenzierungsverhalten der Osteoblasten studiert werden konnte. So konnte u.a. nachgewiesen werden, dass die *Opn* Genexpression in den mineralisierenden Zellen der Mutante erhöht war (Daten nicht gezeigt; Kolanczyk et al. 2007). Aus der Literatur geht bereits hervor, dass OPN als Inhibitor für die Knochenmineralisierung fungiert (Pampena et al. 2004). Dies kann folglich eine mögliche Erklärung für die veränderten Knocheneigenschaften und die daraus resultierende poröse Oberflächenstruktur sein.

Da die oben genannten Analysen nur auf den Knochen der Vorderextremitäten durchgeführt wurden, können diese Ergebnisse nicht zweifelsfrei als Erklärung für die Skelettelemente der Hinterextremität wie Knie- und Hüftgelenk dienen. *Nf1<sup>Prx1</sup>* Mäuse sind aufgrund der fusionierten Hüften nicht in der Lage, ihre Hinterbeine zu bewegen. Wie bekannt ist, führt u.a. eine mangelnde körperliche Aktivität zum Abbau der Knochenmasse. Aufgrund ähnlicher phäno-

typischer Veränderungen, wie eines verdickten kortikalen Knochens und einer rauhen Oberflächenstruktur, können jedoch Parallelen zwischen den veränderten Knochen- und Knorpel-elementen der Vorder- und Hinterextremitäten gezogen werden.

Mittels histologischer Analysen prä- und postnataler Entwicklungsstadien wurde überprüft, ob es sich bei den deformierten Gelenkstrukturen von Knie und Ellenbogen um einen entwicklungsbedingten Defekt oder um ein postnatales Degradationsereignis handelt. Beiden gemeinsam war die unauffällige Entwicklung zum Zeitpunkt E15.5 (Abb. 23). Mit zunehmendem Alter der Mutante konnte allerdings die Missbildung von Ellenbogen- und Kniegelenk beobachten werden. Eine Verformung von Humerus und Ulna wurde deutlich erkennbar. Der Gelenkkopf des Humerus wies keine typische Kugelform auf, sondern glich eher einem Pfeil und war damit nicht kompatibel mit dem Gelenkteil der Ulna. Das Kniegelenk der Mutante war deutlich in seiner Größe reduziert, die Menisci waren in ihrer Größe reduziert und die sekundäre Ossifizierung war verzögert (Abb. 23).

Interessanterweise werden in Patienten mit Pseudoarchondroplasie ähnliche Skelett-assoziierte Symptome diagnostiziert. Als Pseudoarchondroplasie wird eine autosomal dominante Erbkrankheit bezeichnet, die durch Kleinwüchsigkeit, verkürzte Gliedmaßen, Fehlstellung der Beine, Gelenkhypermobilität und Osteoarthritis gekennzeichnet ist. Das verantwortliche Protein für diese skelettale Dysplasie nennt sich COMP (*cartilage oligomeric protein*) (Briggs et al. 1993, 1995; Hecht et al. 1995). Das COMP Gen wird in Knorpel, Ligament und Sehne exprimiert. Die Chondrozyten-Pathologie beruht auf einer intrazellulären Ansammlung von COMP und anderen ECM-Proteinen im rauhen Endoplasmatischen Retikulum. Dadurch wird der Export zur ECM gehemmt, Chondrozyten sterben ab und die Knorpeloberfläche wird löchrig. Eine normale physische Aktivität der Gelenke kann nicht länger gewährleistet werden (Cohn et al. 1996; Hecht et al. 2005; Posey and Hecht 2008). Die molekulare Funktion von COMP beinhaltet die Bindung anderer ECM-Proteine, die Polymerisation von Kollagenfibrillen und die Regulation der Chondrozytenproliferation. Im Zuge dieser Krankheitsstudien konnte gezeigt werden, dass die Degeneration der Gelenke, vornehmlich das Ellenbogen- und Kniegelenk betreffend, im frühen Kindesalter beginnt. Dies deckt sich mit den altersbedingten Degradationsprozessen in der  $Nf1^{Prx1}$  Mausmutante.

Weiterhin konnten Piróg et al. mit Hilfe eines COMP Mausmodells beweisen, dass die Mäuse einen muskuloskelettalen Phänotyp besitzen. Damit liegen Myopathie als auch skelettale Dysplasie dem COMP Phänotyp zugrunde (Piróg et al. 2010a). Auch hier gibt es Übereinstimmungen mit dem muskuloskelettalen Phänotyp der  $Nf1^{Prx1}$  Maus, welcher in einem weiteren Abschnitt ausführlich diskutiert wird (5.4).

Allerdings muss man hinzufügen, dass den skelettalen Dysplasien der Neurofibromatose Typ 1 und Pseudoarchondroplasie verschiedene Genmutationen zugrunde liegen, die zwar in einem ähnlichen muskuloskelettalen Phänotyp resultieren, wahrscheinlich jedoch unterschiedlichen Mechanismen unterliegen. Es kann lediglich festgehalten werden, dass in beiden Erkrankungen die Gelenkstrukturen im zunehmenden Zeitverlauf degradieren. Außerdem wird in beiden Mausmodellen ein Muskelphänotyp identifiziert. Das läßt mutmaßen, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen Muskel- und Gelenkentstehung gibt.

Im Gegensatz zum postnatalen Degradationsprozess von Ellenbogen- und Kniegelenk, läßt sich die Missbildung des Hüftgelenks hingegen nur durch einen pränatalen Entwicklungsdefekt erklären, welcher im folgenden Kapitel ausführlich diskutiert wird (5.3.2).

### **5.3.2 Persistente nukleäre SOX9 Proteinlokalisierung, durchgängige *Col2a1* und verminderte *Gdf5* Genexpression führen zur fehlenden Ausbildung des Gelenkspalts**

In Vertebraten erfolgt die Knochen- und Gelenkbildung zeitunabhängig voneinander. Zuerst entwickeln sich die Knorpelanlagen der zukünftigen Knochen, bevor die Formation der notwendigen Gelenke beginnt. Die Gelenkbildung ist ein komplexer Prozess, der in vielen Aspekten noch unklar ist. Generell wird die Gelenkformation in vier Phasen unterteilt: 1. Musterbildung, 2. Formation einer Interzone, 3. Bildung des Gelenkspalts und 4. Entwicklung der Gelenkkomponenten wie z.B. Gelenkkapsel (Abb. 4).

$Nf1^{Prx1}$  Mausmutanten leiden an einer beeinträchtigten Funktion des Hüftgelenks. Histologische Untersuchungen zeigten, dass sich im Hüftgelenk der Mutante kein Gelenkspalt formiert hat (Abb. 19). Um den Prozess der Gelenkentwicklung zu verstehen und Rückschlüsse auf einen Entwicklungsdefekt in der Mutante ziehen zu können, wurden pränatale Analysen durchgeführt. Dabei wurde zunächst der Zeitpunkt der Hüftgelenkentwicklung definiert, welcher zwischen den Stadien E13.5 und E14.5 der embryonalen Entwicklung determiniert werden konnte (Abb. 20A und B).

SOX9 wird als wichtiger Transkriptionsfaktor beschrieben, der in pluripotenten mesenchymalen Zellen exprimiert wird und notwendig für das Überleben von Knorpelvorläuferzellen in den Kondensationen und für die Chondrozytendifferenzierung ist (Ng et al. 1997). Immunhistochemische Untersuchungen in der  $Nf1^{Prx1}$  Maus zeigten, dass SOX9 zum Zeitpunkt E13.5 nukleär in den Chondrozyten von Mutante und WT lokalisiert war (Abb. 20C). Kommt es hingegen einen Tag später zur Ausbildung des Gelenkspalts, so wechselte das Protein seine Lokalisation ins Zytoplasma (Abb. 20D). In der Mutante hingegen konnte SOX9 persistent im Nukleus der Knorpelzellen detektiert werden. Die Zellen im Bereich des Gelenkspalts besitzen somit weiterhin einen chondrogenen Charakter. Dieser Fund wurde

zusätzlich von der durchgängigen *Col2a1* Genexpression im Gelenk der  $Nf1^{Prx1}$  Mausmutante bestätigt, während in der Kontrolle der Gelenkspalt als *Col2a1*-negativ identifiziert wurde (Abb. 20D). Eine Koexpression von *Sox9* und *Col2a1* in Knorpel-elementen ist wissenschaftlich belegt (Zhao et al. 1997b).

GDF5 ist als Mitglied der TGF $\beta$ -Superfamilie essentiell für die Entwicklung des appendikulären Skeletts. Expressionsstudien in den Modellorganismen Huhn und Maus zeigten eine *Gdf5* Genexpression in den frühen Knorpelkondensationen und im weiteren Entwicklungsverlauf sowohl im Gelenkspalt der Gliedmaßen als auch im Perichondrium (Storm et al. 1994; Luyten 1997). Homozygote *Gdf5* Mutationen führen zur brachypodism (bp) Mausmutante, die verkürzte Extremitäten besitzt. Der Phänotyp wird in der frühen Entwicklung zum Zeitpunkt E12.5 sichtbar. In diesem Stadium treten erste Knorpelkondensationen auf. Diese bilden sich in der bp-Mausmutante verzögert und reduziert aus und führen folglich zur Ausbildung kürzerer Röhrenknochen. Außerdem sind die medialen und proximalen Phalangen fusioniert (Storm et al. 1994). Hingegen führen Überexpressionsstudien von GDF5 in Maus und Huhn zu einem ungehemmten Knorpelwachstum, sekundär zur Verdickung der Knorpelanlagen sowie zur völligen Abwesenheit der Gelenke (Tsumaki et al. 1999; Buxton et al. 2001).

GDF5 spielt in der humanen Extremitätenausbildung ebenfalls eine wichtige Rolle. Heterozygote Mutationen im *GDF5* Gen führen als sogenannte Funktionsverlust-Mutationen zur Brachydaktylie Typ C. Bei dieser Handfehlbildung sind die Finger oder Zehen verkürzt (Polinkovsky et al. 1997; Robin et al. 1997). Homozygote *GDF5* Funktionsverlust-Mutationen resultieren in starken Skelettveränderungen wie z.B. Grebe Syndrom. Betroffene Patienten leiden an einem starken Kleinwuchs, verkürzten Extremitäten und nur rudimentär angelegten Fingeranlagen (Thomas et al. 1997).

GDF5 Studien in den Modellorganismen Maus und Huhn als auch Erkenntnisse im Patienten beweisen, dass GDF5 eine tragende Rolle während der Extremitätenbildung besitzt. GDF5 steuert die Knorpelbildung, in dem es die Zelladhäsion und Kondensation von mesenchymalen Zellen bewirkt und damit direkten Einfluß auf die sich anschließende Chondrozytendifferenzierung ausübt. Im weiteren Entwicklungsverlauf reguliert GDF5 die Proliferation der Chondrozyten im Perichondrium und beeinflusst damit das Wachstum und die Gestalt der sich bildenden Skelettelemente. Zudem wird das Gen in der zukünftigen Gelenkregion exprimiert und nimmt damit direkten Einfluss auf die Bildung der Gelenke (Francis-West et al. 1999; Storm and Kingsley 1999).

Untersucht man die *Gdf5* Genexpression in einem fusionierten Gelenk, so ist diese reduziert im Vergleich zu einem Gelenk mit Gelenkspalt (Wang et al. 2001; Kahn et al. 2009). In *Nf1<sup>Prx1</sup>* Mutanten war die *Gdf5* Genexpression, verglichen mit dem WT ebenfalls geringer (Abb. 20C und D). Durch die verminderte *Gdf5* Expression ist die Determination der zukünftigen Gelenkregion verändert und die Formation des Gelenkspalts gestört. Die Zellen des zukünftigen Gelenkspalts bleiben Chondrozyten und sind als Knorpelanlagen miteinander fusioniert.

Neben dem BMP-Signalweg sind auch andere Kaskaden in den Prozess der Gelenkentstehung involviert. So konnten z.B. Wang et al. nachweisen, dass eine Überexpression der aktiven Form des FGFR1 (*Fibroblast Growth Factor Receptor 1*) die Gelenke fusionieren lässt (Wang et al. 2001). Demnach lässt sich mutmaßen, dass die Aktivierung des FGF-Signalwegs Einfluss auf den Erhalt des Chondrozyten-Zellcharakters ausübt und damit einer Interzonen-Formation indirekt entgegenwirkt.

### 5.3.3 Der Einfluss von Wnt-Signalmolekülen auf die Gelenkentwicklung

Da verschiedene Signaltransduktionskaskaden in der Gelenkentstehung eine Rolle spielen, wurde mit Hilfe von ISH das Expressionsprofil Gelenk-assoziiierter Marker näher betrachtet. Untersucht wurden Signalmoleküle sowohl des BMP- als auch des Wnt-Signalwegs.

BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*) werden als Knochen-induzierende Faktoren bezeichnet, welche in der Extremitätenentwicklung eine wichtige Funktion haben. So steuern sie die Fingerbildung, Chondrogenese, Spezifizierung der Fingeridentitäten, Apoptose in den Fingerzwischenräumen und die Gelenkbildung (Francis-West et al. 1999; Robert 2007; Xiangwei et al. 2007). Den Genen *Bmp2*, *Bmp4* und *Gdf6* werden entscheidende Rollen bei der Gelenkformation zugesprochen (King et al. 1996; Francis-West et al. 1999). Es ist auch bekannt, dass Deletionen im *Tgfb $\beta$ 2* (*transforming growth factor  $\beta$  receptor 2*) Gen zur Gelenkfehlformation führen (Seo and Rosa Serra 2007). Untersuchungen der BMP-Expressionsprofile zeigten entgegen den Erwartungen nur geringe Expressionsunterschiede zwischen WT und *Nf1<sup>Prx1</sup>* Mutante (Daten nicht gezeigt).

Der weitere Fokus lag auf dem Wnt-Signalweg. Dieser Signaltransduktionsweg steuert multiple Entwicklungsprozesse während der Embryonalentwicklung, wird jedoch auch bei einigen Krebsformen beobachtet (Nusse 1992). Wnt-Proteine sind sezernierte Glykoproteine, die eine essentielle Rolle in der Induktion und Musterbildung der Extremitäten besitzen. So sind sie an der Regulation der Zellspezifität, Differenzierung mesenchymaler Zellen in Chondrozyten oder Osteoblasten beteiligt und werden zur Aufrechterhaltung und Induktion der Gelenke benötigt (Hartmann and Tabin 2000; Später et al. 2006). Generell unterscheidet

man zwischen dem kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalweg. Im kanonischen Signalweg (Liganden: WNT1, WNT3a, WNT7a, WNT8, DKK-Familie und SFRPs) binden Wnt-Liganden an Rezeptoren der FZD (*Frizzled*)- und LRP5/6 (*Low density lipoprotein*)-Klasse. Es folgt die Rekrutierung von Dishevelled (DVL) und Axin an die Membran und schließlich die Phosphorylierung und Aktivierung von LRP6. Dies führt zur intrazellulären Stabilisierung und nukleären Translokation des Effektormoleküls  $\beta$ -Catenins, welches die TCF/LEF-vermittelte Transkription induziert (Cadigan 2008; Huang and He 2008). Daneben existiert der nicht-kanonische,  $\beta$ -Catenin-unabhängige Wnt-Signaltransduktionsweg (Liganden: WNT4, WNT5a, WNT11 und SFRPs), bei dem man in den Wnt/PCP-Signalweg (Wnt/*planar cell polarity*) sowie dem Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg differenziert (Semenov et al. 2007). Beim Wnt/PCP-Signalweg bindet der Ligand an den Rezeptor, es erfolgt die Signaltransduktion über DVL und kleine GTPasen wie RAC und RHO und resultiert schließlich in der Aktivierung der JNK (c-Jun N-terminalen Kinasen). Hingegen erfolgt beim Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg die Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Kinase und der Proteinkinase C (PKC). NFAT und ATF2 werden hier als Transkriptionsfaktoren beschrieben. Neben Liganden und Rezeptoren verschiedener Klassen existieren Antagonisten und extrazelluläre Adaptermoleküle. Durch die direkte Interaktion sezernierter Antagonisten der Familie der SFRPs (*secreted frizzled-related proteins*) oder DKK (Dickkopf)-Familie mit Wnt-Liganden oder LPRs kann die Wnt-Signaltransduktion inhibiert werden. Aufgrund seiner Komplexität, bedingt durch die Vielzahl an Liganden, Rezeptoren und Antagonisten, stellt der Wnt-Signalweg eine wichtige Signaltransduktionskaskade in der Embryogenese dar (Veeman et al. 2003; Mikels and Nusse 2006). So können Mutationen einzelner Wnt-Komponenten zu Skelettfehlbildungen führen (Satoh et al. 2006; Morello et al. 2008).

Mittels ISH konnten die Expressionsmuster verschiedener Wnt-Liganden und Antagonisten untersucht werden. Aus Abb. 21 geht hervor, dass die Expression von *Wnt4* in der Gelenkregion der  $\text{Nf1}^{\text{Prx1}}$  Mutante reduziert war. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass *Wnt4* in den Zellen der späteren Gelenkregion exprimiert wird (Hartmann and Tabin 2000, 2001; Guo et al. 2004; Lee and Behringer 2007). Hartmann und Tabin beschrieben im Jahr 2000 eine *Wnt4* Genexpression im Modellorganismus Huhn in den sich entwickelnden Gelenken. Sie postulierten, dass das Wnt4/ $\beta$ -Catenin-Signal die Knorpelbildung beschleunigt, indem es negative regulatorische Signalwege inhibiert und somit die Chondrozytendifferenzierung fördert. *Wnt4* Knockout Mäuse zeigten ein verzögertes Differenzierungsverhalten der Chondrozyten. Auch Guo et al. veranschaulichten, dass WNT4 eine initiale Rolle in der Entstehung synovialer Gelenke spielt (Guo et al. 2004). Hierbei ist darauf zu verweisen, dass konträre Meinungen exis-

tieren. Durch funktionelle Analysen konnte gezeigt werden, dass weder WNT4 noch WNT9a, welches ebenfalls an der Gelenkinduktion beteiligt ist, für die Formation der meisten synovialen Gelenke notwendig zu sein scheint (Später et al. 2006).

Als ein weiteres Gelenk-assoziiertes Gen wird *Sfrp2* beschrieben. Es zählt zu den Antagonisten der Wnt-Komponenten, welches durch direkte Ligandenbindung die Formation mit dem Rezeptor verhindern kann. Es spielt eine Rolle während der Entwicklung von ZNS, Niere, Augen und bei der Bildung der Gelenke. Im Vergleich zum WT war *Sfrp2* in der Gelenkregion der  $Nf1^{Prx1}$  Mutante deutlich reduziert exprimiert (Abb. 21). Experimente von Leimeister lassen auf eine Funktion von SFRP2 für die Spezifizierung und Differenzierung der Gelenk-bildenden Zellen vermuten (Leimeister et al. 1998). Da *Sfrp2* wie auch *Wnt4* in den mesenchymalen Knorpelvorläuferzellen exprimiert werden, könnte man von einem Zusammenspiel des kodierenden Wnt-Liganden und Wnt-Antagonisten ausgehen, welche die Position und Abstände zwischen den Skelettelementen klar determinieren (Guo et al. 2004).

*Sfrp2* wird wie auch *Gdf5* als Markergen für die zukünftige Gelenkregion verwendet. Tavella und Mitarbeiter zeigten in einem Mausmodell für *Shh* Überexpression, dass sowohl *Gdf5* wie auch *Sfrp2* in den fehlformierten Gelenken reduziert exprimiert sind (Tavella et al. 2006). Wohingegen Mausstudien zu *Sfrp2* demonstrieren, dass der Genverlust zur Verkürzung der Skelettelemente und zur Brachydaktylie führte, jedoch keine Auswirkungen auf die Gelenkbildung hatte (Morello et al. 2008). Demnach wird dem Wnt-Antagonisten SFRP2 keine alleinige Funktion in der Gelenkspaltinduktion zugesprochen.

Neben *Wnt4* und *Sfrp2* wurde auch das Genexpressionsprofil von *Dkk3* (Dickkopf3) beschrieben. Bisher ist dazu nur wenig aus der Literatur bekannt. Aus Abb. 21 geht hervor, dass *Dkk3* im Gelenkspalt exprimiert wurde. Im Vergleich zum WT war das Genexpressionsmuster deutlich in der Mutante reduziert. Auch Witte et al. konnten eine Expression des Gens im Gelenkspalt nachweisen (Witte et al. 2009). *Dkk3* Knockout Studien im Mausmodell zeigten keine Fehlbildungen in den Extremitäten oder anderen Skelettelementen (Barrantes et al. 2006). Demnach kann man schlussfolgern, dass dieses Wnt-Molekül DKK3 keine alleinige Schlüsselposition im Prozess der Gelenkentwicklung ausübt.

Die Entwicklung der Gelenke ist ein komplexer Prozess, in dem verschiedene Signalwege wie z.B. der Wnt-, BMP- und FGF-Signalweg zusammenspielen. Dem Wnt-Signalweg wird eine hinreichende und auch notwendige Funktion in der frühen Entstehung der Gelenke zugesprochen. Überexpressionsstudien von konstitutiv aktiven  $\beta$ -Catenin oder WNT14 resultierten in ektoper Gelenkbildung. Umgekehrt führte der Verlust des  $\beta$ -Catenin Gens in früh differenzierenden Chondrozyten ebenfalls zur Fusion skelettaler Elemente (Guo et al. 2004).

In der  $Nf1^{Prx1}$  Mutante waren einzelne Gene des Wnt-Signalweges wie *Wnt4*, *Sfrp2* und *Dkk3* im Gelenkspaltbereich verändert exprimiert.

Zusätzlich zu den bereits erwähnten Molekülen übernehmen auch die Liganden WNT14 (auch bekannt als WNT9a) und WNT16 wichtige regulatorische Aufgaben bei der Gelenkentstehung. Retrovirale *Wnt14* Genüberexpressionsstudien führten im Modellorganismus Huhn zu gelenkspaltähnlichen Strukturen im kondensierten mesenchymalen Gewebe. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zellen Interzonen-Zellcharakter besitzen, wie eine dichte Zellmorphologie, eine erhöhte *Gdf5* Genexpression sowie eine verminderte Expression der Chondrozytenmarker *Col2a1* und *Sox9* (Hartmann and Tabin 2001). Untersuchungen zur Genexpression von *Wnt14* und *Wnt16* in der  $Nf1^{Prx1}$  Maus ergaben jedoch keine Unterschiede zwischen Mutante und WT (Daten nicht gezeigt).

Die Genexpressionsunterschiede von *Wnt4*, *Sfrp2* und *Dkk3* zwischen  $Nf1^{Prx1}$  Mutante und Kontrolle lassen jedoch keine Schlußfolgerung über eine mögliche Dysregulation des Wnt-Signalwegs in der  $Nf1^{Prx1}$  Maus zu. Da bekannt ist, dass SOX9 die transkriptionelle Aktivität des nukleären  $\beta$ -Catenin/TCF-Proteinkomplexes inhibiert und zur Degradation von  $\beta$ -Catenin führt (Akiyama et al. 2004), könnten weiterführende immunhistochemische Versuchsansätze zur Detektion des  $\beta$ -Catenin Proteins auf Gewebeschnitten der Mutante erfolgen. Eine weitere Möglichkeit wären ISH von *downstream targets* wie z.B. *c-Myc* (He et al. 1998).

#### 5.3.4 Zellen, die im Prozess der Gelenkspaltbildung beteiligt sind

Wie bereits beschrieben, wurden parallele Studien mit dem konditionellen  $Nf1^{Col2}$  Knockout Mausmodell durchgeführt. Ziel dabei war die Eingrenzung und/oder mögliche Identifizierung der gelenkspaltbildenden Zellart. Bevor erste *Nf1* Verpaarungen angesetzt wurden, konnte die Zeit- und Gewebespezifität des *Col2*-Promotors ermittelt werden. Abb. 24 beschreibt eine Cre-Expression ausschließlich in allen Knorpelanlagen der zukünftigen Skelettelemente sowie im Bereich des Unterkiefers. Dies deckt sich mit bereits publizierten Daten (Onyekwelu et al. 2009). Andere Gewebetypen wie zum Beispiel Muskel oder Bindegewebe waren *Col2a1*-negativ (Abb. 24B und C).

Nach Ermittlung der *Col2*-Promotorspezifität wurden homozygote  $Nf1^{flox/flox}$  Mäuse mit *Col2-Cre*;  $Nf1^{flox/+}$  Mäusen verpaart. Das führte zur Inaktivierung des *Nf1* Gens in Chondrozyten ( $Nf1^{Col2}$ ). Augenscheinlich waren die  $Nf1^{Col2}$  Mutanten in ihrer Größe reduziert und litten primär an einem Wirbelsäulendefekt (Daten nicht gezeigt). Entgegen den Erwartungen zeigten die  $Nf1^{Col2}$  Nachkommen keine fusionierten Gelenke. Bei der Betrachtung histologischer Schnittpräparate vom Hüftgelenk konnte eindeutig ein Gelenkspalt im Gelenk der Mutante identifiziert werden (Abb. 25A und B). Analysen von Knie- und Ellenbogengelenk zeigten

ebenfalls eine normale Gelenkformation. Ein Gelenkspalt hatte sich formiert. Knorpel- und Knochenstrukturen waren allerdings in ihrer Größe leicht reduziert, wiesen jedoch keine anormale Architektur auf (Abb. 25C und D). Es bleibt allerdings zu erwähnen, dass die sekundäre Ossifizierung im Kniegelenk der Mutante im Gegensatz zum WT verzögert war (Abb. 25B).

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass der Verlust von *Nf1* in frühen mesenchymalen Vorläuferzellen der sich entwickelnden Extremitäten zum Gelenkphänotyp führte. Der konditionelle Knockout von *Nf1* in Chondrozyten führte hingegen nicht zu fusionierten Gelenken. Folglich kann die Hypothese aufgestellt werden, dass Chondrozyten nicht den Ursprung gelenkspaltbildender Zellen darstellen, sondern es muss sich um eine Zellpopulation handeln, die ursprünglich nicht von Chondrozyten abstammt.

Seit Jahrzehnten wird über die zellulären und molekularen Mechanismen bei der Gelenkentstehung diskutiert. Dabei gilt es vornehmlich folgende Fragen zu beantworten:

- Wie werden die zukünftigen Gelenkbereiche determiniert?
- Wie formieren sich die Zellen der Interzone und aus welcher ursprünglichen Zellart entstehen diese?
- Welche Prozesse determinieren die unterschiedlichen Arten der Gelenkzellen wie z.B. artikuläre Chondrozyten?

Die Frage nach dem Ursprung bzw. dem Differenzierungspotenzial der Zellen der Interzone lässt konträre Meinungen entstehen. Die Zellen der Interzone sind bereits als dichtgepackte Zellpopulation, welche durch *gap junctions* miteinander verbunden sind, charakterisiert (Mitrovic 1977, 1978; Archer et al. 2003).

Pacifici und Mitarbeiter hatten zum Ursprung dieser Zellen zwei unterschiedliche Hypothesen, die entweder die Abstammung der Interzonen-Zellen aus den mesenchymalen Kondensationen der sich entwickelnden Extremitäten sehen oder Migration einer außerhalb sich befindenden Zellpopulation postulieren. Um dies zu prüfen, wurden Mikroinjektionsstudien im Modellorganismus Huhn durchgeführt. Dabei wurden Zellen fluoreszent markiert, außerhalb der Gelenkregion injiziert und schließlich das Verhalten der Zellen im Verlauf der Entwicklung verfolgt (Pacifici et al. 2006b). Es zeigte sich, dass die markierten Zellen in die sich formierende Gelenkephiphyse und in die Interzone einwandern. Daraus konnte abgeleitet werden, dass außerhalb des zukünftigen Gelenks eine Zellpopulation existiert, die in der Lage ist, in die Gelenk-Interzone zu migrieren. Mikropräparation von Zellen der Interzone mit anschließender Genexpressionsanalyse zeigte, dass diese Zellen eine fibroblastenartige Zellmorphologie besitzen und Gelenkmarkergene wie *Wnt14*, *Gdf5*, *Gli3* und *CD44* exprimieren. Neben

der Lokalisation dieser Zellen in der zukünftigen Interzone wurden fluoreszent markierte Zellen ebenfalls in der äußeren artikulären Knorpelschicht des Gelenks detektiert.

Koyama und Mitarbeiter konnten in ihren Studien ebenfalls belegen, dass verschiedene Gelenkkomponenten *Gdf5*-positiv sind (Koyama et al. 2008). Dazu nutzten sie die Mausverpaarung von *Gdf5*-Cre Transgenen mit Rosa26-Reportermausen. Durch eine indirekte Methode des *cell fate mappings* gelang es ihnen, *Gdf5*-positive Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien zu analysieren. Ihre Experimente zeigten, dass zum Zeitpunkt E14.0 der gesamte Gelenkbereich von *Gdf5*-positiven Zellen besiedelt wurde. Mit zunehmender Entwicklung wurden *Gdf5*-positive Zellen im artikulären Knorpel, in Zellen der Synovialmembran und im Kapselgewebe detektiert. Dieses Expressionsprofil deckt sich mit den Daten der bereits erwähnten Publikation von Pacifici und lässt mutmaßen, dass *Gdf5*-positive Zellen in den zukünftigen Gelenkbereich einwandern, um weitere Differenzierungsprozesse im Verlauf der Gelenkentwicklung zu initiieren. So stammen letztendlich sowohl artikuläre Chondrozyten als auch andere gelenkbildende Zellen von *Gdf5*-exprimierenden Vorläuferzellen ab. Dementgegen gehen die Chondrozyten der Wachstumsfuge von einer *Gdf5*-negativen Zellpopulation, wahrscheinlich von den mesenchymalen Vorläuferzellen der Extremitäten, hervor. Allerdings muss festgestellt werden, dass Koyama und Mitarbeiter keine migrierenden *Gdf5*-positiven Zellen in ihrer Publikation zeigten. Das könnte wiederum daran liegen, dass alle Untersuchungen zu späteren Entwicklungszeitpunkten durchgeführt wurden, in denen bereits *Gdf5*-positive Gelenkbereiche präsent sind.

Es ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass versucht wurde, ein konditionelles Knockout System von *Nf1* unter dem *Gdf5*-Promotor zu etablieren. Aufgrund der unspezifisch variablen Aktivität der Cre-Rekombinase unter dem *Gdf5*-Promotor konnten jedoch keine weiteren Mausverpaarungen angesetzt werden (Daten nicht gezeigt). Es besteht die Hypothese, dass  $Nf1^{Gdf5}$  Mutanten ebenfalls fusionierte Gelenke aufweisen. Daraus könnte interpretiert werden, dass *Gdf5*-positive Zellen den Ursprung gelenkspaltbildender Zellen darstellen. Wenn hingegen  $Nf1^{Gdf5}$  Mutanten normal entwickelte Gelenke besitzen, könnte daraus geschlossen werden, dass die Zellen der Interzone keine migrierenden *Gdf5*-positive Zellen sind und damit der Ursprung der Interzonen-Zellen aufzuklären bleibt.

## 5.4 *Nf1* Geninaktivierung führt zur Fibrose-assoziierten Muskelschwäche

### 5.4.1 Fibrose-assoziierte Muskelschwäche führt zu skelettalen Fehlbildungen

Als Myopathien werden Erkrankungen bezeichnet, die entweder auf einen krankhaft, in der Skelettmuskulatur selbst entstandenen Prozess zurückgehen (Muskeldystrophien oder kongenitale Myopathien) oder auf einer Beteiligung der Skelettmuskulatur bei einer Allgemeinerkrankung beruhen (metabolische, endokrine, ischämische, vaskuläre, toxische und paraneoplastische Myopathien). Als Merkmale der Myopathie gelten Veränderungen des Muskelfaserdurchmessers, die Fasertypen einer Muskelfaserart, segmentelle Fasernekrosen, Muskelfaseraufspaltungen, Zellkernveränderungen, entzündliche Infiltrate sowie die Zunahme an Bindegewebe (Booth 1978).

Makroskopische Untersuchungen der Skelettmuskulatur zeigten, dass die Muskeln der *Nf1*<sup>Prx1</sup> Mutante im Vergleich zur Kontrolle in ihrer Größe reduziert waren (Abb. 27C und D). Das korrelierte mit einer verminderten Muskelkraft der Mutanten (Abb. 28). Histologische Analysen demonstrierten sowohl eine geringere Anzahl an Muskelfasern pro Muskel als auch eine dramatische Zunahme an Bindegewebe in der *Nf1*<sup>Prx1</sup> Maus (Abb. 29 und Abb. 30).

Weiterhin ist auffällig, dass die Gesamtzahl aller geteilten Muskelfasern in der *Nf1*<sup>Prx1</sup> Mausmutante erhöht war (Abb. 29A und E). Diese Veränderungen der *Nf1*<sup>Prx1</sup> Muskeln stimmen größtenteils mit den oben beschriebenen Merkmalen einer Myopathie überein und erlauben damit die Hypothese, dass der *Nf1*<sup>Prx1</sup> Muskelphänotyp in die Gruppe der Myopathien einzugliedern ist.

In der Literatur existieren bereits Angaben zu Skelettmuskel-assoziierte Fibrose. Anhand eines Mausmodells für *Duchenne Muscular Dystrophy* (DMD) konnte der Verlust des Muskelfaserproteins Dystrophin nachgeahmt werden. Die Mäuse leiden an Fibrose-befallenem Muskelgewebe und an einer Muskelschwäche. Zusätzlich weisen die Mäuse einen Rundrücken (Kyphose) auf. Es wurde postuliert, dass Muskelschwäche und Fibrose im Zusammenhang mit der Kyphose der Mäuse stehen (Laws and Hoey 2004). Die an der Wirbelsäule angreifenden Muskelgruppen sind schwächer ausgebildet und können dadurch keine Stabilisierung der Wirbelsäule gewährleisten. In Folge dessen verbiegt sich die Wirbelsäule.

Interessanterweise wird zum einen das phänotypische Merkmal der Kyphose in *Nf1*<sup>Prx1</sup> Mutanten beobachtet (Daten nicht gezeigt), und zum anderen leiden *Nf1*<sup>Prx1</sup> Mäuse ebenfalls an einer Fibrose-assoziierten Muskelschwäche wie bereits oben beschrieben (Abb. 29, Abb. 30 und Abb. 28).

Auch Li et al. beschrieben eine Skelettmuskel-assoziierte Fibrose als chronische Myopathie, in der Muskelfasern durch eine Anlagerung von Kollagenen und anderen Proteinen der ECM

ersetzt werden. Als wichtiger Regulator in diesem Zusammenhang wurde Myostatin beschrieben. Es reguliert das Wachstum von Myozyten und Muskelfibroblasten. Durch Aktivierung von Myostatin wird die Proliferation der Muskelfibroblasten erhöht, was schließlich zum Verdrängen der Muskelfasern führt. Dieser Prozess verläuft über eine Aktivierung der MAPK-Signalkaskade (Li et al. 2008). Die Aktivierung der MAPK-Signalkaskade konnte bereits mittels Western Blot Analysen auf postnatalem Nf1<sup>Prx1</sup> Muskelgewebe nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Es besteht die Hypothese, dass Nf1<sup>Prx1</sup> Mäuse an einer progressiven Fibrose-assoziierten Myopathie leiden. Als Folge eines pränatalen Entwicklungsdefektes in der Myogenese (5.4.3) sowie möglichen zusätzlichen noch nicht entschlüsselten Mechanismen sind die Muskeln der Tiere kleiner und weisen einen hohen Anteil an Binde- und Fettgewebe auf. Das resultiert in einer verringerten Muskelkraft und führt möglicherweise damit zu skelettalen Abnormalitäten wie z.B. der Kyphose bzw. der fehlenden Ausbildung des Gelenkspalts im Hüftgelenk (5.5).

#### **5.4.2 LBX1 und PAX3 sind notwendige Transkriptionsfaktoren im Migrationsprozess der Muskelvorläuferzellen**

Wie bereits erklärt, verläuft die Myogenese in verschiedenen Phasen (1.1.3). Kommt es innerhalb dieser Entwicklungsschritte zu Störungen, z.B. durch fehlende Genexpression folgen häufig entwicklungspezifische Phänotypen (Francis-West et al. 2003; Buckingham and Vincent 2009). Um zu überprüfen, welcher Defekt in der Myogenese der Nf1<sup>Prx1</sup> Mutante vorliegt, wurden die verschiedenen Entwicklungsphasen wie Migration und Differenzierung näher analysiert.

LBX1 und PAX3 sind wichtige Transkriptionsfaktoren, welche die Migration und Delamination der Muskelprogenitorzellen regulieren (Vasyutina and Birchmeier 2006). Es wurde bereits gezeigt, dass LBX1 notwendig ist für den lateralen Migrationsprozess der Muskelprogenitorzellen in die sich entwickelnde Extremität (Brohmann et al. 2000; Gross et al. 2000). Knockout Studien in der Maus verdeutlichten, dass eine fehlende *Lbx1* Genexpression zur Reduktion der Anzahl an Muskelprogenitorzellen führt. Das wiederum resultierte in einer dramatischen Größenreduktion oder gar einem kompletten Fehlen der Extremitätenmuskulatur (Gross et al. 2000; Brohmann et al. 2000). PAX3 wurde als notwendiger Regulator für die Genexpression von *Lbx1* beschrieben (Franz et al. 1993; Bober et al. 1994; Goulding et al. 1994; Mennerich et al. 1998). In *Pax3* Mutanten (semidominante Mutationen in den *Spotch* Allelen) konnte dargestellt werden, dass der Transkriptionsfaktor notwendig ist für die Etablierung der Vorläuferzellpopulation im lateralen Bereich des Dermomyotoms. Die Anzahl von Progenitoren war in der *Spotch* Mutante aufgrund einer

erhöhten Apoptoserate reduziert. Als Folge dessen fehlten die Muskeln in der Extremität und im Zwerchfell (Daston et al. 1996; Tremblay et al. 1998; Birchmeier and Brohmann 2000).

Aus Abb. 32 geht hervor, dass die Anzahl an migrierenden Vorläuferzellen im Vergleich zur Kontrolle gleich war. Es konnte zudem auch kein Unterschied im Verhältnis von Vorläuferzellen (LBX1 positive) zu Myoblasten (MYOD positive) in der dorsalen Region der Extremitätenknospe ermittelt werden, was eventuelle Hinweise auf eine verzögerte oder fortschreitende Anzahl migrierender Vorläuferzellen liefert. In der ventralen Region jedoch gab es eine leicht erhöhte Anzahl an Myoblasten gegenüber den Vorläuferzellen in der Mutante. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Progenitorzellen vorzeitig in den Differenzierungsprozess eintreten. Auch das Proliferationsverhalten der *Lbx1*-positiven Vorläuferzellen zeigte in Mutante und WT keine Unterschiede (Abb. 33 und Abb. 34). Demnach lässt sich schlussfolgern, dass kein Migrationsdefekt die mögliche Ursache für die fehlgebildeten Muskeln in der  $Nf1^{Prx1}$  Mutanten ist. Dies war bereits zu vermuten, da der Phänotyp dafür zu mild in seiner Ausprägung ist.

#### 5.4.3 Die Rolle der Transkriptionsfaktoren Myogenin und MYOD im Differenzierungsprozess der Myoblasten

Nach Delamination, Migration und Proliferation der Muskelvorläuferzellen folgen Differenzierung zu Myoblasten und schließlich terminale Differenzierung zu Myotuben (Francis-West et al. 2003).

Die Initiierung der Muskeldifferenzierung geht mit dem Entziehen der Zellen aus dem Zellzyklus einher und wird vor allem durch den Transkriptionsfaktor MYOD eingeleitet. MYOD initiiert die Transkription von *p21*, was zur Arretierung der Zellen im G<sub>1</sub>-Stadium des Zellzyklus und folglich zur Differenzierung der Muskelvorläuferzellen führt (Kitzmann and Fernandez 2001). Mittels MyoD-LacZ Studien konnte der Ursprung und das Schicksal von Muskelvorläuferzellen verfolgt werden. So zeigte sich, dass die Muskelvorläuferzellen während des Migrationsprozesses unspezifiziert sind und erst durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren MYOD und MYF5 Muskelcharakter gewinnen (Kablar et al. 1999). MYOD hat damit eine essentiell regulatorische Funktion in der Spezifizierung der Muskelvorläuferzellen, Proliferation und Initiierung der Myoblastendifferenzierung. *MyoD* Knockout Studien zeigten, dass die Myoblasten der zukünftigen Muskeln ein verzögertes Differenzierungsverhalten besitzen (Kablar et al. 1997). Der Verlust des Gens wird allerdings durch einen kompensatorischen Mechanismus von *Myf5* größtenteils ausgeglichen und lässt damit auf eine funktionale Redundanz zwischen *MyoD* und *Myf5* schließen (Rudnicki et al. 1992). Demnach waren die phänotypischen Veränderungen nicht so groß wie erwartet.

Ein weiterer Transkriptionsfaktor für die Aktivierung muskelspezifischer Gene ist Myogenin. Myogenin ist das direkte transkriptionelle Zielgen von MYOD (Hollenberg et al. 1993). Untersuchungen von Myogenin Knockout Mäusen zeigten, dass die Migration und das Eintreten der Vorläuferzellen in den Prozess der Differenzierung nicht betroffen sind. Hingegen war die terminale Myotuben-Formation gestört (Venuti et al. 1995).

Um den Differenzierungsprozess der Muskelzellen in der  $Nf1^{Prx1}$  Maus näher analysieren zu können, wurde zuerst eine WM-ISH mit der Sonde gegen Myogenin durchgeführt. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die Myogenin Genexpression in der Mutante im Vergleich zum WT reduziert war (Abb. 35). Zusätzlich wird aus Abb. 36 ersichtlich, dass die Expression von *MyoD* in den  $Nf1^{Prx1}$  Mutanten geringer war. Mittels histomorphometrischer Messungen wurden die relativen *MyoD* Flächen des M. triceps als auch des M. gluteus maximus gemessen, welche in der Mutante im Vergleich zur Kontrolle stark reduziert waren (Abb. 36B und C). Die Muskeln in der Mutante waren kleiner, einige fehlten vollständig (Abb. 36D). Aus diesen ersten Ergebnissen wurde geschlussfolgert, dass die Reduktion der Transkriptionsfaktoren MYOD und Myogenin zu einer unzulänglichen Anzahl an differenzierenden Myoblasten respektive Myozyten führt, was in einer Unterentwicklung der Muskeln resultiert.

Es ist bereits bekannt, dass die Aktivierung der RAS/MAPK-Signaltransduktion eine inhibierende Wirkung auf die Myogenese durch Genexpressionshemmung von *MyoD* hat (Lassar et al. 1989; Konieczny et al. 1989).

Weiterhin wurden in einem immunhistochemischen Versuchsansatz Myoblasten über einen MYOD Antikörper und Myotuben mit einem Desmin Antikörper markiert (Abb. 37). So zeigten sich Unterschiede hinsichtlich der MYOD Proteinverteilung in Nukleus und Zytoplasma der Myotuben zwischen Mutante und Kontrolle. In der  $Nf1^{Prx1}$  Mausmutante waren etwa 30 % mehr positive MYOD Nuklei vorhanden als im WT. Betrachtet man die Proliferation der *MyoD*-exprimierenden Myoblasten, so wird ersichtlich, dass diese in der Mutante erhöht war (Abb. 38). Aus den Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass die terminale Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben in der Mutante gestört ist.

Eine inhibierende Wirkung auf die Myoblastendifferenzierung durch Effektoren der MAPK-Signalkaskade wurde bereits publiziert. So wurde eine direkte Interaktion der aktivierten MEK1-Proteinkinase mit dem MYOD-Transkriptionskomplex nachgewiesen (Perry et al. 2001; Penn et al. 2001). Durch die Bindung eines transkriptionell nukleären MEK1/MYOD-Komplexes wird das MYOD Protein dauerhaft im Nukleus gebunden und somit werden weitere Schritte in der terminalen Muskeldifferenzierung blockiert (Perry et al. 2001). Die Zellen verbleiben in einem proliferierenden Zustand. Durch Western Blot Analysen auf postnatalem

Muskelgewebe konnte ebenfalls eine erhöhte Proteinmenge an pMEK1 in der Nf1<sup>Prx1</sup> Mutante nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Eine Aktivierung der RAF-Proteinkinase führt ebenfalls zu einem inhibierenden Effekt auf die Skelettmuskeldifferenzierung (Dorman and Johnson 2000). Es wurde bereits publiziert, dass die Aktivierung der RAF-Proteinkinase zur Hochregulation von *Gdf8* (*Growth and differentiation factor 8*) führt. *Gdf8* kodiert das sezernierte Protein Myostatin. *In vitro* Studien zeigten eine inhibierende Wirkung von Myostatin auf Proliferation und Differenzierung der Muskelzellen (Langley et al. 2002). Durch Zugabe von rekombinantem Myostatin wird die Genexpression von *MyoD* und *p21* in den Muskelzellen herunterreguliert. Dies führt zur fehlenden Induktion muskelspezifischer Gene sowie zu ausbleibender Arretierung des Zellzyklus und folglich zur gehemmten Differenzierung der Muskelvorläuferzellen.

Um die genannten Thesen zu prüfen, könnten weiterführende Experimente wie folgt aussehen. Satellitenzellen werden aus den Nf1<sup>Prx1</sup> Mäusen isoliert und das Muskeldifferenzierungspotenzial im Zeitverlauf dokumentiert. Durch die Verwendung eines Myotubenmarkers z.B. MHC Antikörper können die Myotuben immunhistochemisch angefärbt werden. Parallel dazu wird über BrdU Markierung und nachfolgender Immunhistochemie das Proliferationsverhalten der Zellen untersucht. Unter Verwendung eines immunzytochemischen Versuchsansatzes könnte auch der MEK1/MYOD Komplex zellkompartimentspezifisch detektiert werden. Alternativ dazu könnten auch die aus den Nf1<sup>Prx1</sup> Mäusen isolierten und differenzierenden Muskelzellen zellkompartimentspezifisch fraktioniert werden. Mittels Western Blot Analyse der Zellkernfraktion als auch der zytoplasmatischen Fraktion könnten pMEK und MYOD Proteine detektiert und quantifiziert werden.

## 5.5 Mechanische Stimulation führt zur Ausbildung eines Gelenkspalts

Die Gelenkspaltbildung und Morphogenese ist ein komplexer Entwicklungsprozess, bei dem durch Separation zwei gegenüberliegende skelettale Elemente voneinander getrennt werden (1.1.2). Es folgt die Ausbildung der Gelenkkapsel mit der Synovia. Dieser Entwicklungsprozess wird seit Jahrzehnten diskutiert und lässt eine Vielzahl an Hypothesen bestehen.

Aus der Literatur geht hervor, dass die vitale Rolle der Bewegung notwendig in Entwicklungsprozessen einschließlich der Gelenkentwicklung zu sein scheint (Mitrovic 1982; Dowthwaite et al. 1999). Unerlässlich im Zusammenhang mit dieser Theorie ist auch das Absterben der Zellen in der Mittelschicht der Interzone, da die beiden äußeren Zellschichten zur Ausbildung der artikulären Knorpelschicht führen (Nalin et al. 1995; Kimura and Shiota 1996). Versuche, in denen durch pharmakologische oder chirurgische Eingriffe Paralyse in

den Mausembryonen erzeugt wurde, gehen einher mit einer defekten Gelenkspaltformation (LELKES 1958; Mitrovic 1982).

Im Zusammenhang mit der Gelenkspaltbildung und mechanischer Stimulation steht die Synthese von Hyaluronsäure (HA). Das Glykosaminoglykan gilt als wichtiger Bestandteil der ECM von Vertebraten. Es erfüllt Funktionen wie die Wasserspeicherung, Druckbeständigkeit, Hauptbestandteil der Synovia u.v.m. Dieses Molekül stellt mit seinem Oberflächenrezeptor CD44 wichtige Schlüsselkomponenten in der Gelenkspaltbildung dar. Verschiedene Studien zeigten, dass die HA und CD44 vornehmlich in der Interzone und später im artikulären Knorpelbereich präsent sind (Craig et al. 1990; Archer et al. 1994; Edwards et al. 1994). Durch eine lokale HA-Produktion und Akkumulation wird die Bindungsfähigkeit HA-bindender Proteine gesättigt. Dadurch kommt es entweder zum Verlust der Zellen im Gewebe der Interzone oder zu veränderten Eigenschaften der ECM-Komposition, was schließlich zu einer physikalischen Separation gegenüberliegender Skelettelemente führt (Pacifci et al. 2005b). Dowthwaite und Mitarbeiter zeigten, dass die Gelenkspaltbildung durch die Zugabe von exogenem HA bzw. Inhibition des CD44 Rezeptors blockiert wird (Dowthwaite et al. 1998). Zudem beschreiben verschiedene Quellen eine synergistische Beziehung zwischen mechanischer Stimulation und HA-Synthese und bringen damit die Muskeln und deren Dynamik in den näheren Fokus (Dowthwaite et al. 2003).

Umstritten ist, dass die reine Muskelaktivität ohne den veränderten Einfluss von ECM-Molekülen zur Unterbrechung der Zell-Zell-Kontakte führt und damit eine Gelenkspaltbildung initiiert. Der direkte Zusammenhang von Muskel- und Gelenkbildung wird kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite konnten Studien mit Myogenin-defizienten Mäusen zeigen, dass diese Tiere trotz fehlender Muskulatur normale Gelenke entwickeln (Hasty et al. 1993). Andererseits demonstrierten Wissenschaftler anhand von Muskel-defizienten Mäusen einen direkten Zusammenhang zwischen Muskel- und Skelettbildung (Kahn et al. 2009; Nowlan et al. 2010). So konnten Kahn und Mitarbeiter anhand von Mausstudien beweisen, dass Muskelkontraktionen notwendig für die Entstehung der Gelenke sind. Sowohl Punktmutationen im *Pax3* als auch im *Myf5* Gen führten zu rudimentär angelegten Muskeln wie auch zu fehlgebildeten Gelenken (Kahn et al. 2009).

Wie aus dem Abschnitt 5.4.3 hervorgeht, war das Differenzierungsverhalten der Myoblasten in der  $Nf1^{Prx1}$  Mutante gehemmt. Muskelanalysen postnataler Stadien zeigten, dass die Muskelkraft verringert und die Muskelstrukturen verändert vorlagen (Abb. 28 und Abb. 30). Außerdem leiden  $Nf1^{Prx1}$  Mäuse an fusionierten Hüftgelenken, was auf einen Fehlbildungsmechanismus in der Embryonalentwicklung zurückzuführen ist (Abb. 19 und Abb. 20). Die ge-

nannten Ergebnisse verweisen darauf, dass es einen Zusammenhang zwischen der Entwicklung der Muskeln und Gelenke gibt. Es besteht die Hypothese, dass der Verlust des *Nf1* Gens zu einem Muskeldifferenzierungsdefekt in den  $Nf1^{Prx1}$  Mausmutanten führt. Folglich sind die Muskeln kleiner, weisen eine anormale Muskelstruktur auf und münden letztendlich in eine Muskelschwäche bei den Mäusen. Dieser pränatale Muskeldefekt resultiert wiederum in einer fehlenden Ausbildung des Hüftgelenkspalts, da die notwendige mechanische Stimulation für die Gelenkspaltformation reduziert ist bzw. vollkommen fehlt.

Untersuchungen zur Komplexität und Vernetzung einzelner Komponenten des muskuloskelettalen Systems führten Nowlan und Mitforscher durch. Sie konnten anhand ihrer Studien demonstrieren, dass phänotypische Veränderungen verschieden lokalisierter skelettaler Elemente von einem komplexen Netzwerk zwischen mechanischer Stimulation und ortsspezifisch regulatorischen Faktoren der Knorpel- und Knochenentwicklung abhängen (Nowlan et al. 2010). Es wurde gezeigt, dass es einen Zusammenhang zwischen der phänotypischen Variabilität der Gelenke und der Gelenklokalisierung gibt.

Um den direkten Zusammenhang zwischen Muskel- und Gelenkentwicklung weiter zu prüfen, könnten weiterführende Studien mit der  $Nf1^{Col2}$  Mausmutante erfolgen. Wie bereits gezeigt, war die Cre-Rekombinase unter dem *Col2*-Promotor nur in den Knorpelanlagen aktiv (Abb. 24). Muskel- als auch umliegendes Bindegewebe zeigten keine Cre-Rekombinaseaktivität. Die Gelenke der  $Nf1^{Col2}$  Mutanten waren nicht fusioniert (Abb. 25). In fortführenden Experimenten sollten daher die strukturellen Eigenschaften der  $Nf1^{Col2}$  Muskeln, die Zugkraft der Mäuse und ggf. die Muskelentwicklung näher analysiert werden. Wird kein Muskelphänotyp in den  $Nf1^{Col2}$  Mäusen identifiziert, stützt das die Hypothese, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen Muskel- und Gelenkentwicklung gibt.

## **5.6 $Nf1^{Prx1}$ Mausmodell rekapituliert annähernd den humanen muskuloskelettalen Neurofibromatose Typ 1 Phänotyp**

Es gibt bisher kein geeignetes Modell, welches das breite symptomatische Spektrum der muskuloskelettalen humanen Neurofibromatose Typ 1 Erkrankung widerspiegelt. NF1 Patienten leiden sowohl an verschiedensten Tumor-assoziierten Haut- und Nervenveränderungen als auch an muskuloskelettalen Abnormalitäten (1.2.1).

Die Etablierung des konditionellen  $Nf1^{Prx1}$  Mausmodells ermöglichte eine gezielte Inaktivierung des *Nf1* Gens in den mesenchymalen Vorläuferzellen der sich entwickelnden Extremitäten (1.2.4). Die  $Nf1^{Prx1}$  Mausmutanten zeigten starke phänotypische Veränderungen des Ske-

letts und der Muskulatur. Interessanterweise sind die muskuloskelettalen phänotypischen Merkmale der  $Nf1^{Prx1}$  Maus denen des NF1 Patienten sehr ähnlich.

So leiden etwa 50 % der Patienten an Wirbelsäulendefekten in Form von Skoliose (seitliche Verbiegung der Wirbelsäule bei gleichzeitiger Verdrehung der Wirbel) oder Kyphoskoliose (Rundrücken mit gleichzeitig seitlicher Verkrümmung) (Riccardi 2010). In  $Nf1^{Prx1}$  Mäusen wurden ebenfalls kyphotische Wirbelsäulenverbiegungen sichtbar (Daten nicht gezeigt). Daneben weisen etwa 20 % der Betroffenen Knochenveränderungen, wie z.B. Biegung der langen Röhrenknochen und Pseudarthrose auf (Stevenson et al. 1999; Alwan et al. 2005). Diese Symptome traten in den Mäusen ebenfalls auf. So wurde beispielsweise eine Biegung der Tibia in  $Nf1^{Prx1}$  Mutanten beobachtet (Daten nicht gezeigt; Kolanczyk et al. 2007; 2008). Neben skelettalen Veränderungen haben NF1 Patienten auch eine geringere Muskelmasse, was folglich zu einer Muskelschwäche führt (Stevenson et al. 2005; Souza et al. 2009). Bei den  $Nf1^{Prx1}$  Mäusen waren in Folge eines pränatalen Differenzierungsdefekts die Muskeln ebenfalls deutlich in ihrer Größe reduziert und die Zugkraft war geringer (Abb. 28).

Da das konditionelle  $Nf1^{Prx1}$  Maussystem größtenteils den humanen muskuloskelettalen Phänotyp rekapituliert, ist es als Modell für die humane Neurofibromatose Typ 1 Erkrankung sehr gut geeignet und eignet sich daher für das Entschlüsseln des Pathomechanismus.

Da in Maus und Mensch das Skelett- und der Muskelapparat betroffen sind, ermöglicht das Mausmodell Untersuchungen komplexer Zusammenhänge des muskuloskelettalen Systems und unterstützt die Hypothese, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen Muskel- und Skelettentwicklung gibt. Zudem stellt die Etablierung des  $Nf1^{Prx1}$  Mausmodells eine ideale Voraussetzung dar, zukünftig therapeutische Versuchsansätze für z.B. Pseudarthrose zu etablieren.

## 6 Zusammenfassung

Neurofibromatose Typ 1 (NF1) ist eine autosomal dominant vererbte Multiorganerkrankung, die schätzungsweise bei einem Kind von 2500-3000 Geburten auftritt. Das Krankheitsbild eines NF1 Patienten ist gekennzeichnet durch Hautveränderungen, den sog. Café-au-lait-Flecken sowie subkutanen und plexiformen Neurofibromen. Zusätzliche Symptome sind Lisch-Knötchen in den Augen, mentale Retardierung und Epilepsieanfälle. Spezifische Veränderungen des muskuloskelettalen Systems sind Kleinwuchs, Skoliose, Pseudarthrose, Osteoporose, tibiale Dysplasie sowie eine verminderte Muskelkraft.

Das krankheitsverursachende *NF1* Gen lokalisiert auf Chromosom 17 und kodiert das kleine GTPase aktivierende Protein Neurofibromin, welches eine Funktion als Tumorsuppressor ausübt. Vererbte als auch *de novo* Mutationen im *NF1* Gen führen zu einem nicht-funktionsfähigen Protein, einer Hyperaktivierung des p21 RAS Proteins und einem dysregulierten Zellteilungsverhalten durch Aktivierung der RAS/MAPK-Signalkaskade.

Das Ziel der Dissertation war die funktionelle Charakterisierung von Neurofibromin in der Entwicklung des muskuloskelettalen Systems. Dafür wurde ein konditionelles Knockout Maussystem etabliert, in dem *Nf1* in undifferenzierten mesenchymalen Vorläuferzellen der sich entwickelnden Extremitäten inaktiviert wurde ( $Nf1^{Prx1}$ ). Der daraus resultierende  $Nf1^{Prx1}$  Mausphänotyp wurde hinsichtlich seines muskuloskelettalen Phänotyps charakterisiert.

Die  $Nf1^{Prx1}$  Mäuse waren kleiner und die Skelettelemente in ihrer Größe reduziert. Histologische Untersuchungen, Genexpressionsstudien und *in vivo* Analysen belegten, dass in Folge der Aktivierung der RAS/MAPK-Signaltransduktion die Chondrozytenproliferation verringert war und die Chondrozytenzonen in der Wachstumsfuge verkürzt vorlagen.

Das wohl auffälligste Merkmal neugeborener  $Nf1^{Prx1}$  Mausmutanten waren die fusionierten Hüftgelenke, wodurch die Hinterläufe hinterhergezogen wurden und eine normale Fortbewegung verhindert wurde. Dieser Phänotyp entstand in der pränatalen Entwicklung durch die gestörte Ausbildung eines Gelenkspalts, welcher normalerweise zwischen den Entwicklungsstadien E13.5 und E14.5 gebildet wird. Anhand einer durchgängigen *Col2a1* Genexpression und einem persistent nukleär lokalisiertem SOX9 Protein konnte gezeigt werden, dass die Zellen des Gelenkspalts weiterhin chondrogenen Charakter besaßen und demnach die Knorpel-elemente von Pelvis und Femur miteinander verschmolzen blieben. Auch andere Gelenke wie Ellenbogen- und Kniegelenk waren in der  $Nf1^{Prx1}$  Maus deformiert. Histologische Analysen prä- und postnataler Entwicklungsstadien zeigten, dass dieser Defekt auf einen zunehmenden Degradationsprozess in der postnatalen Entwicklung zurückzuführen ist.

Die chondrozytenspezifische Ablation von *Nf1* in einem weiteren Mausmodell (*Nf1<sup>Col2</sup>*) führte hingegen nicht zu einem Gelenkphänotyp.

Zusätzlich zu den Skelett-Abnormalitäten zeigten *Nf1<sup>Prx1</sup>* Mutanten starke Veränderungen des Muskelapparates. Am Beispiel des *M.triceps* konnte demonstriert werden, dass der Muskel kleiner war, die Anzahl an Muskelfasern pro Muskel reduziert und der Anteil an Fett- und Bindegewebe im Muskel dramatisch erhöht war. Damit ging eine verringerte Zugkraft der Vorderextremitäten der Mäuse einher. Um zu prüfen, ob der Muskelphänotyp auf einen pränatalen Entwicklungsdefekt zurückzuführen ist, wurden die einzelnen Phasen der Myogenese näher betrachtet. Immunhistochemische Analysen der frühen Myogenese demonstrierten, dass weder Migrations- noch Proliferationsprozess der Muskelvorläuferzellen in den *Nf1<sup>Prx1</sup>* Mausmutanten betroffen waren. Hingegen konnte anhand der verminderten Genexpressionen von Markern der Muskeldifferenzierung wie Myogenin und *MyoD* ein Muskeldifferenzierungsdefekt in der *Nf1<sup>Prx1</sup>* Mutante gezeigt werden. Zudem war die Proliferationsrate der Myoblasten erhöht und das MYOD Protein vornehmlich nukleär in den Muskelfibrillen lokalisiert.

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass Neurofibromin in verschiedenen Aspekten der muskuloskelettalen Entwicklung eine wichtige Rolle spielt. Die Inaktivierung von *Nf1* resultiert in einem Muskel- und Gelenkphänotyp und läßt damit auf einen direkten Zusammenhang in der Entwicklung der einzelnen Komponenten des muskuloskelettalen Systems schliessen.

Das *Nf1<sup>Prx1</sup>* Mausmodell eignet sich als Modellsystem für die humane NF1 Erkrankung, da es wichtige Aspekte des humanen muskuloskelettalen NF1 Phänotyps rekapituliert und damit das Entschlüsseln des Pathomechanismus ermöglicht.

## 7 Summary

Neurofibromatosis Type 1 (NF1) is a tumor predisposition syndrome. It is inherited in an autosomal dominant manner and affects 1 in 2500-3000 individuals. NF1 is mainly characterized by the occurrence of pigmented skin lesions (café-au-lait spots) and the formation of neurofibromas along central and peripheral nerves. In addition to that, patients suffer from iris Lisch nodules, mental retardation, learning disabilities and epilepsy. Furthermore, NF1 patients show musculoskeletal lesions such as short stature, scoliosis, pseudarthrosis, osteoporosis, tibial dysplasia and a diminished muscle force.

The affected gene Neurofibromin 1 (*NF1*) is located on Chromosom 17. The protein negatively regulates a key signal transduction protein called p21 RAS. Thus, loss of *NF1* activity is expected to lead to the inability to shut off activated p21 RAS with subsequent aberrant growth promoting signals.

In this work I was able to establish a conditional inactivation approach to ablate *Nf1* function specifically in the early undifferentiated cells of the developing limbs. Loss of Neurofibromin leads to a severe musculoskeletal phenotype ( $Nf1^{Prx1}$ ).

Inactivation of *Nf1* resulted in short stature and mice exhibited congenital limb shortening. Measurements of bone growth, histology, gene expression profiling and *in vivo* analysis revealed diminished chondrocyte proliferation and a differentiation defect due to the activation of RAS/MAPK signaling.

Newborn  $Nf1^{Prx1}$  mice were easily recognized at birth due to their inability to bend their hind limbs at the hip joint. Examinations displayed cartilaginous fusions of the hip joints. This phenotype resulted from a lack of joint cavity initiation caused by an impaired chondrocyte de-differentiation in the presumptive joint region. This was shown by a continuous expression pattern of *Col2a1*, a reduced *Gdf5* expression and a nuclear SOX9 localization persisted in all cells of the cartilage anlage in  $Nf1^{Prx1}$  mice. Elbow and knee joint were severely deformed, too. Histological analysis indicated a postnatal degradation process of elbow and knee joint. In contrast to that, chondrocyte specific inactivation of *Nf1* did not lead to fused and misshaped joints. Furthermore, loss of *Nf1* resulted in a muscle phenotype. In M. triceps, for example, muscle size was reduced, number of muscle fibers diminished but connective tissue and fat was dramatically increased in the mutant muscle.  $Nf1^{Prx1}$  mice had also diminished grip strength. Detailed analysis of myogenesis revealed no differences in migration and early proliferation of muscle precursors in the mutant mice. In contrast, gene expression of muscle differentiation markers Myogenin and *MyoD* was reduced. Besides myoblast proliferation

was increased and MYOD protein primarily localized in the nuclei of Desmin positive muscle fibres. These results proposed a defect in differentiation of  $Nf1^{Prx1}$  muscles.

In fact, *Nf1* has essential multiple roles in skeletal and muscle development and therefore promotes assumptions on a direct developmental relation of musculoskeletal components.

$Nf1^{Prx1}$  mouse model recapitulates the human musculoskeletal NF1 phenotype and can be used for understanding pathomechanism and the establishment of prospective therapy approaches.

## 8 Literaturverzeichnis

- Akiyama, Haruhiko, Marie-Christine Chaboissier, James F Martin, Andreas Schedl, and Benoit de Crombrughe. 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* 16:2813-2828.
- Akiyama, Haruhiko et al. 2004. "Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation." *Genes & Development* 18:1072-1087.
- Alvarez, J, J Horton, P Sohn, and R Serra. 2001. "The perichondrium plays an important role in mediating the effects of TGF-beta1 on endochondral bone formation." *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 221:311-321.
- Alwan, S, S J Tredwell, and J M Friedman. 2005. "Is osseous dysplasia a primary feature of neurofibromatosis 1 (NF1)?" *Clinical Genetics* 67:378-390.
- Amano, Katsuhiko et al. 2009. "Sox9 family members negatively regulate maturation and calcification of chondrocytes through up-regulation of parathyroid hormone-related protein." *Molecular Biology of the Cell* 20:4541-4551.
- Amizuka, N, H Warshawsky, J E Henderson, D Goltzman, and A C Karaplis. 1994. "Parathyroid hormone-related peptide-depleted mice show abnormal epiphyseal cartilage development and altered endochondral bone formation." *The Journal of Cell Biology* 126:1611-1623.
- Archer, C W, H Morrison, and A A Pitsillides. 1994. "Cellular aspects of the development of diarthrodial joints and articular cartilage." *Journal of Anatomy* 184 ( Pt 3):447-456.
- Archer, Charles W, Gary P Dowthwaite, and Philippa Francis-West. 2003. "Development of synovial joints." *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews* 69:144-155.
- Asou, Y et al. 2001. "Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoclasts, and resorption in ectopic bone." *Endocrinology* 142:1325-1332.
- Au, Y. 2004. "The muscle ultrastructure: a structural perspective of the sarcomere." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 61:3016-3033.
- Ballard, K J, and S J Holt. 1968. "Cytological and cytochemical studies on cell death and digestion in the foetal rat foot: the role of macrophages and hydrolytic enzymes." *Journal of Cell Science* 3:245-262.
- Ballester, R et al. 1990. "The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins." *Cell* 63:851-859.
- Barrantes, Ivan del Barco et al. 2006. "Generation and characterization of dickkopf3 mutant mice." *Molecular and Cellular Biology* 26:2317-2326.

- Bastow, Edward R et al. 2005. "Selective activation of the MEK-ERK pathway is regulated by mechanical stimuli in forming joints and promotes pericellular matrix formation." *The Journal of Biological Chemistry* 280:11749-11758.
- Bell, D M et al. 1997a. "SOX9 directly regulates the type-II collagen gene." *Nature Genetics* 16:174-178.
- Bi, Weimin, Jian Min Deng, Zhaoping Zhang, Richard R. Behringer, and Benoit de Crombrughe. 1999. "Sox9 is required for cartilage formation." *Nat Genet* 22:85-89.
- Birchmeier, C, and H Brohmann. 2000. "Genes that control the development of migrating muscle precursor cells." *Current Opinion in Cell Biology* 12:725-730.
- Bladt, F, D Riethmacher, S Isenmann, A Aguzzi, and C Birchmeier. 1995. "Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud." *Nature* 376:768-771.
- Bober, E, T Franz, H H Arnold, P Gruss, and P Tremblay. 1994. "Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells." *Development (Cambridge, England)* 120:603-612.
- Boguski, M S, and F McCormick. 1993. "Proteins regulating Ras and its relatives." *Nature* 366:643-654.
- Bonni, A et al. 1999. "Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms." *Science (New York, N.Y.)* 286:1358-1362.
- Booth, F W. 1978. "Regrowth of atrophied skeletal muscle in adult rats after ending immobilization." *Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology* 44:225-230.
- Bos, J L. 1989. "ras oncogenes in human cancer: a review." *Cancer Research* 49:4682-4689.
- Bothe, Ingo, and Susanne Dietrich. 2006. "The molecular setup of the avian head mesoderm and its implication for craniofacial myogenesis." *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 235:2845-2860.
- Brand-Saberi, B, J Wilting, C Ebensperger, and B Christ. 1996. "The formation of somite compartments in the avian embryo." *The International Journal of Developmental Biology* 40:411-420.
- Brannan, C I et al. 1994. "Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various neural crest-derived tissues." *Genes & Development* 8:1019-1029.
- Briggs, M D et al. 1995. "Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia due to mutations in the cartilage oligomeric matrix protein gene." *Nature Genetics* 10:330-336.

- Briggs, M D et al. 1993. "Genetic linkage of mild pseudoachondroplasia (PSACH) to markers in the pericentromeric region of chromosome 19." *Genomics* 18:656-660.
- Brohmann, H, K Jagla, and C Birchmeier. 2000. "The role of Lbx1 in migration of muscle precursor cells." *Development (Cambridge, England)* 127:437-445.
- Buckingham, Margaret et al. 2003. "The formation of skeletal muscle: from somite to limb." *Journal of Anatomy* 202:59-68.
- Buckingham, Margaret, and Stéphane D Vincent. 2009. "Distinct and dynamic myogenic populations in the vertebrate embryo." *Current Opinion in Genetics & Development* 19:444-453.
- Buxton, P, C Edwards, C W Archer, and P Francis-West. 2001. "Growth/differentiation factor-5 (GDF-5) and skeletal development." *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 83-A Suppl 1:S23-30.
- Cadigan, Ken M. 2008. "Wnt-beta-catenin signaling." *Current Biology: CB* 18:R943-947.
- Chambers, A F. 1995. "Regulation and function of osteopontin in ras-transformed cells." *Annals of the New York Academy of Sciences* 760:101-108.
- Chen, L et al. 1999. "Gly369Cys mutation in mouse FGFR3 causes achondroplasia by affecting both chondrogenesis and osteogenesis." *The Journal of Clinical Investigation* 104:1517-1525.
- Chevallier, A, M Kieny, and A Mauger. 1977. "Limb-somite relationship: origin of the limb musculature." *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 41:245-258.
- Christ, B, and C P Ordahl. 1995. "Early stages of chick somite development." *Anatomy and Embryology* 191:381-396.
- Clark, E A, and R O Hynes. 1996. "Ras activation is necessary for integrin-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and cytosolic phospholipase A2 but not for cytoskeletal organization." *The Journal of Biological Chemistry* 271:14814-14818.
- Cohn, D H et al. 1996. "Mutations in the cartilage oligomeric matrix protein (COMP) gene in pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia." *Annals of the New York Academy of Sciences* 785:188-194.
- Corral, Teresa, María Jiménez, Inmaculada Hernández-Muñoz, Ignacio Pérez de Castro, and Angel Pellicer. 2003. "NF1 modulates the effects of Ras oncogenes: evidence of other NF1 function besides its GAP activity." *Journal of Cellular Physiology* 197:214-224.
- Cossu, G, S Tajbakhsh, and M Buckingham. 1996. "How is myogenesis initiated in the embryo?." *Trends in Genetics: TIG* 12:218-223.
- Craig, F M, M T Bayliss, G Bentley, and C W Archer. 1990. "A role for hyaluronan in joint development." *Journal of Anatomy* 171:17-23.

- Craig, F M, G Bentley, and C W Archer. 1987. "The spatial and temporal pattern of collagens I and II and keratan sulphate in the developing chick metatarsophalangeal joint." *Development (Cambridge, England)* 99:383-391.
- Crawford, H C, L M Matrisian, and L Liaw. 1998. "Distinct roles of osteopontin in host defense activity and tumor survival during squamous cell carcinoma progression in vivo." *Cancer Research* 58:5206-5215.
- Das, Dipak, Giuseppe Pintucci, and Arnold Stern. 2000. "MAPK-dependent expression of p21WAF and p27kip1 in PMA-induced differentiation of HL60 cells." *FEBS Letters* 472:50-52.
- Dasgupta, Biplab, and David H Gutmann. 2003. "Neurofibromatosis 1: closing the GAP between mice and men." *Current Opinion in Genetics & Development* 13:20-27.
- Daston, G, E Lamar, M Olivier, and M Goulding. 1996. "Pax-3 is necessary for migration but not differentiation of limb muscle precursors in the mouse." *Development (Cambridge, England)* 122:1017-1027.
- Denhardt, D T, M Noda, A W O'Regan, D Pavlin, and J S Berman. 2001. "Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival." *The Journal of Clinical Investigation* 107:1055-1061.
- Dorman, C M, and S E Johnson. 2000. "Activated Raf inhibits myogenesis through a mechanism independent of activator protein 1-mediated myoblast transformation." *The Journal of Biological Chemistry* 275:27481-27487.
- Dotto, G P. 2000. "p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle?." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1471:M43-56.
- Dowthwaite, G P, J C Edwards, and A A Pitsillides. 1998. "An essential role for the interaction between hyaluronan and hyaluronan binding proteins during joint development." *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 46:641-651.
- Dowthwaite, G P et al. 2003. "A mechanism underlying the movement requirement for synovial joint cavitation." *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 22:311-322.
- Dowthwaite, G P et al. 1999. "The effect of mechanical strain on hyaluronan metabolism in embryonic fibrocartilage cells." *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 18:523-532.
- Drachman, D B. 1965. "Pharmacological denervation of skeletal muscle in chick embryos treated with botulinum toxin." *Transactions of the American Neurological Association* 90:241-242.
- Duprez, Delphine. 2002. "Signals regulating muscle formation in the limb during embryonic development." *The International Journal of Developmental Biology* 46:915-925.

- Durland, J Logan, Matteo Sferlazzo, Malcolm Logan, and Ann Campbell Burke. 2008. "Visualizing the lateral somitic frontier in the Prx1Cre transgenic mouse." *Journal of Anatomy* 212:590-602.
- Edwards, J C et al. 1994. "The formation of human synovial joint cavities: a possible role for hyaluronan and CD44 in altered interzone cohesion." *Journal of Anatomy* 185 ( Pt 2):355-367.
- El-Tanani, Mohamed, Angela Platt-Higgins, Philip S Rudland, and Frederick Charles Campbell. 2004. "Ets gene PEA3 cooperates with beta-catenin-Lef-1 and c-Jun in regulation of osteopontin transcription." *The Journal of Biological Chemistry* 279:20794-20806.
- El-Tanani, Mohamed K et al. 2006. "The regulation and role of osteopontin in malignant transformation and cancer." *Cytokine & Growth Factor Reviews* 17:463-474.
- Erlebacher, A, E H Filvaroff, S E Gitelman, and R Derynck. 1995. "Toward a molecular understanding of skeletal development." *Cell* 80:371-378.
- Francis-West, P. H., Kevin Lee, and Charles W. Archer. 1999. "BMP/GDF-signalling interactions during synovial joint development." *Cell and Tissue Research* 296:111-119.
- Francis-West, Philippa H, Laurent Antoni, and Kelly Anakwe. 2003. "Regulation of myogenic differentiation in the developing limb bud." *Journal of Anatomy* 202:69-81.
- Franz, T, R Kothary, M A Surani, Z Halata, and M Grim. 1993. "The Splotch mutation interferes with muscle development in the limbs." *Anatomy and Embryology* 187:153-160.
- Friedrich, G, and P Soriano. 1991. "Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice." *Genes & Development* 5:1513-1523.
- Gartel, A L et al. 2001. "Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:4510-4515.
- Geyer, M, C Herrmann, S Wohlgemuth, A Wittinghofer, and H R Kalbitzer. 1997. "Structure of the Ras-binding domain of RalGEF and implications for Ras binding and signaling." *Nature Structural Biology* 4:694-699.
- Gille, H, and J Downward. 1999. "Multiple ras effector pathways contribute to G(1) cell cycle progression." *The Journal of Biological Chemistry* 274:22033-22040.
- Goodsell, D S. 1999. "The molecular perspective: the ras oncogene." *The Oncologist* 4:263-264.
- Goulding, M, A Lumsden, and A J Paquette. 1994. "Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development." *Development (Cambridge, England)* 120:957-971.

- Gross, M K et al. 2000. "Lbx1 is required for muscle precursor migration along a lateral pathway into the limb." *Development (Cambridge, England)* 127:413-424.
- Guan, K L. 1994. "The mitogen activated protein kinase signal transduction pathway: from the cell surface to the nucleus." *Cellular Signalling* 6:581-589.
- Guo, Xizhi et al. 2004. "Wnt/beta-catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation." *Genes & Development* 18:2404-2417.
- Gutmann, D H et al. 1997. "The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2." *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 278:51-57.
- Hartmann, C, and C J Tabin. 2000. "Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb." *Development (Cambridge, England)* 127:3141-3159.
- Hartmann, C, and C J Tabin. 2001. "Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton." *Cell* 104:341-351.
- Hasty, P et al. 1993. "Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene." *Nature* 364:501-506.
- Hayashi, K, and E Ozawa. 1995. "Myogenic cell migration from somites is induced by tissue contact with medial region of the presumptive limb mesoderm in chick embryos." *Development (Cambridge, England)* 121:661-669.
- He, T C et al. 1998. "Identification of c-MYC as a target of the APC pathway." *Science (New York, N.Y.)* 281:1509-1512.
- Hecht, J T et al. 1995. "Mutations in exon 17B of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) cause pseudoachondroplasia." *Nature Genetics* 10:325-329.
- Hecht, Jacqueline T, Elizabeth Hayes, Richard Haynes, and William G Cole. 2005. "COMP mutations, chondrocyte function and cartilage matrix." *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 23:525-533.
- Henkemeyer, M et al. 1995. "Vascular system defects and neuronal apoptosis in mice lacking ras GTPase-activating protein." *Nature* 377:695-701.
- Heymann, S, M Koudrova, H Arnold, M Köster, and T Braun. 1996. "Regulation and function of SF/HGF during migration of limb muscle precursor cells in chicken." *Developmental Biology* 180:566-578.
- Hollenberg, S M, P F Cheng, and H Weintraub. 1993. "Use of a conditional MyoD transcription factor in studies of MyoD trans-activation and muscle determination." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:8028-8032.
- Huang, He, and Xi He. 2008. "Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights." *Current Opinion in Cell Biology* 20:119-125.

- InFriedman, J.M., Gutmann; D.H.; MacCollin, M. and Riccardi, V.M. 1999. "Neurofibromatosis: Phenotype, Natural History, and Pathogenesis." *John Hopkins Press, Baltimore*: 1-25.
- Ito, M M, and M Y Kida. 2000. "Morphological and biochemical re-evaluation of the process of cavitation in the rat knee joint: cellular and cell strata alterations in the interzone." *Journal of Anatomy* 197 Pt 4:659-679.
- Jacks, T et al. 1994. "Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in Nf1." *Nature Genetics* 7:353-361.
- Jagla, K et al. 1995. "Mouse Lbx1 and human LBX1 define a novel mammalian homeobox gene family related to the Drosophila lady bird genes." *Mechanisms of Development* 53:345-356.
- Jorge, Alexander A L, Alexsandra C Malaquias, Ivo J P Arnhold, and Berenice B Mendonca. 2009. "Noonan syndrome and related disorders: a review of clinical features and mutations in genes of the RAS/MAPK pathway." *Hormone Research* 71:185-193.
- Kablar, B et al. 1997. "MyoD and Myf-5 differentially regulate the development of limb versus trunk skeletal muscle." *Development (Cambridge, England)* 124:4729-4738.
- Kablar, B et al. 1999. "Myogenic determination occurs independently in somites and limb buds." *Developmental Biology* 206:219-231.
- Kahn, Joy et al. 2009. "Muscle contraction is necessary to maintain joint progenitor cell fate." *Developmental Cell* 16:734-743.
- Karaplis, A C et al. 1994. "Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene." *Genes & Development* 8:277-289.
- Karsenty, Gerard, and Erwin F Wagner. 2002. "Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development." *Developmental Cell* 2:389-406.
- Khan, I M et al. 2007. "The development of synovial joints." *Current Topics in Developmental Biology* 79:1-36.
- Kim, I S, F Otto, B Zabel, and S Mundlos. 1999. "Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1." *Mechanisms of Development* 80:159-170.
- Kimura, S, and K Shiota. 1996. "Sequential changes of programmed cell death in developing fetal mouse limbs and its possible roles in limb morphogenesis." *Journal of Morphology* 229:337-346.
- King, J A, E E Storm, P C Marker, R J Dileone, and D M Kingsley. 1996. "The role of BMPs and GDFs in development of region-specific skeletal structures." *Annals of the New York Academy of Sciences* 785:70-79.
- Kitzmann, M, and A Fernandez. 2001. "Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 58:571-579.

- Kobayashi, Tatsuya et al. 2005. "Indian hedgehog stimulates periarticular chondrocyte differentiation to regulate growth plate length independently of PTHrP." *The Journal of Clinical Investigation* 115:1734-1742.
- Kolanczyk, Mateusz et al. 2007. "Multiple roles for neurofibromin in skeletal development and growth." *Human Molecular Genetics* 16:874-886.
- Kolanczyk, Mateusz et al. 2008. "Modelling neurofibromatosis type 1 tibial dysplasia and its treatment with lovastatin." *BMC Med* 31:6-21.
- Konieczny, S F, B L Drobos, S L Menke, and E J Taparowsky. 1989. "Inhibition of myogenic differentiation by the H-ras oncogene is associated with the down regulation of the MyoD1 gene." *Oncogene* 4:473-481.
- Kornak, Uwe, and Stefan Mundlos. 2003. "Genetic disorders of the skeleton: a developmental approach." *American Journal of Human Genetics* 73:447-474.
- Koyama, Eiki et al. 2008. "A distinct cohort of progenitor cells participates in synovial joint and articular cartilage formation during mouse limb skeletogenesis." *Developmental Biology* 316:62-73.
- Kronenberg, Henry M. 2003. "Developmental regulation of the growth plate." *Nature* 423:332-336.
- Langley, Brett et al. 2002. "Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression." *The Journal of Biological Chemistry* 277:49831-49840.
- Lassar, A B, M J Thayer, R W Overell, and H Weintraub. 1989. "Transformation by activated ras or fos prevents myogenesis by inhibiting expression of MyoD1." *Cell* 58:659-667.
- Laws, Nicola, and Andrew Hoey. 2004. "Progression of kyphosis in mdx mice." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 97:1970-1977.
- Leali, Daria et al. 2003. "Osteopontin (Eta-1) and fibroblast growth factor-2 cross-talk in angiogenesis." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171:1085-1093.
- Lee, Hu-Hui, and Richard R Behringer. 2007. "Conditional expression of Wnt4 during chondrogenesis leads to dwarfism in mice." *PLoS One* 2:e450.
- Lefebvre, V, W Huang, V R Harley, P N Goodfellow, and B de Crombrughe. 1997. "SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene." *Molecular and Cellular Biology* 17:2336-2346.
- Legeai-Mallet, L, C Benoist-Lasselin, A Munnich, and J Bonaventure. 2004. "Overexpression of FGFR3, Stat1, Stat5 and p21Cip1 correlates with phenotypic severity and defective chondrocyte differentiation in FGFR3-related chondrodysplasias." *Bone* 34:26-36.
- Leimeister, C, A Bach, and M Gessler. 1998. "Developmental expression patterns of mouse sFRP genes encoding members of the secreted frizzled related protein family." *Mechanisms of Development* 75:29-42.

- LELKES, G. 1958. "Experiments in vitro on the role of movement in the development of joints." *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 6:183-186.
- Li, Cuiling et al. 1999. "A Lys644Glu Substitution in Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) Causes Dwarfism in Mice by Activation of STATs and Ink4 Cell Cycle Inhibitors." *Human Molecular Genetics* 8:35-44.
- Li, Zhao Bo, Helen D Kollias, and Kathryn R Wagner. 2008. "Myostatin directly regulates skeletal muscle fibrosis." *The Journal of Biological Chemistry* 283:19371-19378.
- Lobe, C G, and A Nagy. 1998. "Conditional genome alteration in mice." *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 20:200-208.
- Logan, Malcolm et al. 2002. "Expression of Cre Recombinase in the developing mouse limb bud driven by a Prxl enhancer." *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 33:77-80.
- Long, F, X M Zhang, S Karp, Y Yang, and A P McMahon. 2001. "Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation." *Development (Cambridge, England)* 128:5099-5108.
- Luyten, F P. 1997. "Cartilage-derived morphogenetic protein-1." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29:1241-1244.
- Margaret R. Wallace. 2000. "Neurofibromatosis: Phenotype, Natural History, and Pathogenesis." *American Journal of Human Genetics* 67:264-264.
- Marigo, V, and C J Tabin. 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* 93:9346-9351.
- Marks, S C, and S N Popoff. 1988. "Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton." *The American Journal of Anatomy* 183:1-44.
- Marshall, M S. 1995. "Ras target proteins in eukaryotic cells." *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9:1311-1318.
- Martin, G A et al. 1990. "The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21." *Cell* 63:843-849.
- Mennerich, D, K Schäfer, and T Braun. 1998. "Pax-3 is necessary but not sufficient for lbx1 expression in myogenic precursor cells of the limb." *Mechanisms of Development* 73:147-158.
- Merino, R et al. 1999. "Expression and function of Gdf-5 during digit skeletogenesis in the embryonic chick leg bud." *Developmental Biology* 206:33-45.
- Mikels, A J, and R Nusse. 2006. "Wnts as ligands: processing, secretion and reception." *Oncogene* 25:7461-7468.

- Minina, E et al. 2001. "BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation." *Development (Cambridge, England)* 128:4523-4534.
- Minina, Eleonora, Conny Kreschel, Michael C Naski, David M Ornitz, and Andrea Vortkamp. 2002. "Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation." *Developmental Cell* 3:439-449.
- Mitrovic, D. 1971. "[Effect of pharmacological paralysis on the formation and evolution of articular fissures of the digital joints in chick embryo fleet]." *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances De l'Académie Des Sciences. Série D: Sciences Naturelles* 273:1748-1751.
- Mitrovic, D. 1972. "[Regression of normally constituted articular cavities in paralyzed chick embryos]." *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances De l'Académie Des Sciences. Série D: Sciences Naturelles* 274:288-291.
- Mitrovic, D. 1982. "Development of the articular cavity in paralyzed chick embryos and in chick embryo limb buds cultured on chorioallantoic membranes." *Acta Anatomica* 113:313-324.
- Mitrovic, D. 1978. "Development of the diarthrodial joints in the rat embryo." *The American Journal of Anatomy* 151:475-485.
- Mitrovic, D R. 1977. "Development of the metatarsophalangeal joint of the chick embryo: morphological, ultrastructural and histochemical studies." *The American Journal of Anatomy* 150:333-347.
- Moosavi, Mohammad Amin, and Razieh Yazdanparast. 2008. "Distinct MAPK signaling pathways, p21 up-regulation and caspase-mediated p21 cleavage establishes the fate of U937 cells exposed to 3-hydrogenkwadaphnin: differentiation versus apoptosis." *Toxicology and Applied Pharmacology* 230:86-96.
- Mordret, G. 1993. "MAP kinase kinase: a node connecting multiple pathways." *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 79:193-207.
- Morello, Roy et al. 2008. "Brachy-syndactyly caused by loss of Sfrp2 function." *Journal of Cellular Physiology* 217:127-137.
- Morgan, D B. 1972. "Calcium and phosphate metabolism and the bone." *Progress in Surgery* 10:24-75.
- Murakami, S, M Kan, W L McKeehan, and B de Crombrughe. 2000. "Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:1113-1118.
- Nalin, A M, T K Greenlee, and L J Sandell. 1995. "Collagen gene expression during development of avian synovial joints: transient expression of types II and XI collagen genes in the joint capsule." *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 203:352-362.

- Naski, M C, J S Colvin, J D Coffin, and D M Ornitz. 1998. "Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3." *Development (Cambridge, England)* 125:4977-4988.
- Ng, L J et al. 1997. "SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse." *Developmental Biology* 183:108-121.
- Nowlan, Niamh C et al. 2010. "Developing bones are differentially affected by compromised skeletal muscle formation." *Bone* 46:1275-1285.
- Nusse, R. 1992. "The Wnt gene family in tumorigenesis and in normal development." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 43:9-12.
- Ontell, M, M P Ontell, and M Buckingham. 1995. "Muscle-specific gene expression during myogenesis in the mouse." *Microscopy Research and Technique* 30:354-365.
- Onyekwelu, Ikemefuna, Mary B Goldring, and Chisa Hidaka. 2009. "Chondrogenesis, joint formation, and articular cartilage regeneration." *Journal of Cellular Biochemistry* 107:383-392.
- Pacifici, Maurizio, Eiki Koyama, and Masahiro Iwamoto. 2005b. "Mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation: recent advances, but many lingering mysteries." *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews* 75:237-248.
- Pacifici, Maurizio et al. 2006a. "Cellular and molecular mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1068:74-86.
- Pampena, David A et al. 2004. "Inhibition of hydroxyapatite formation by osteopontin phosphopeptides." *The Biochemical Journal* 378:1083-1087.
- Penn, B H, C A Berkes, D A Bergstrom, and S J Tapscott. 2001. "How to MEK muscle." *Molecular Cell* 8:245-246.
- Perry, R L, M H Parker, and M A Rudnicki. 2001. "Activated MEK1 binds the nuclear MyoD transcriptional complex to repress transactivation." *Molecular Cell* 8:291-301.
- Piróg, Katarzyna A et al. 2010a. "A mouse model offers novel insights into the myopathy and tendinopathy often associated with pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia." *Human Molecular Genetics* 19:52-64.
- Pitsillides, A A, C W Archer, P Prehm, M T Bayliss, and J C Edwards. 1995. "Alterations in hyaluronan synthesis during developing joint cavitation." *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 43:263-273.
- Polinkovsky, A et al. 1997. "Mutations in CDMP1 cause autosomal dominant brachydactyly type C." *Nature Genetics* 17:18-19.
- Posey, K L, and J T Hecht. 2008. "The role of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in skeletal disease." *Current Drug Targets* 9:869-877.

- Pownall, Mary Elizabeth, Marcus K Gustafsson, and Charles P Emerson. 2002. "Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 18:747-783.
- Rasmussen, H, P Bordier, K Kurokawa, N Nagata, and E Ogata. 1974. "Hormonal control of skeletal and mineral homeostasis." *The American Journal of Medicine* 56:751-758.
- Reinholt, F P, K Hultenby, A Oldberg, and D Heinegård. 1990. "Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:4473-4475.
- Riccardi, Vincent Michael. 2010. "Neurofibromatosis type 1 is a disorder of dysplasia: the importance of distinguishing features, consequences, and complications." *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology* 88:9-14.
- Robert, Benoît. 2007. "Bone morphogenetic protein signaling in limb outgrowth and patterning." *Development, Growth & Differentiation* 49:455-468.
- Robin, N H, M Gunay-Aygun, A Polinkovsky, M L Warman, and S Morrison. 1997. "Clinical and locus heterogeneity in brachydactyly type C." *American Journal of Medical Genetics* 68:369-377.
- Rousseau, F et al. 1994. "Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia." *Nature* 371:252-254.
- Rudnicki, M A, T Braun, S Hinuma, and R Jaenisch. 1992. "Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development." *Cell* 71:383-390.
- Sanger, F, S Nicklen, and A R Coulson. 1977. "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:5463-5467.
- Sassoon, D et al. 1989. "Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis." *Nature* 341:303-307.
- Satoh, Wataru, Takafumi Gotoh, Yasuhiko Tsunematsu, Shinichi Aizawa, and Akihiko Shimono. 2006. "Sfrp1 and Sfrp2 regulate anteroposterior axis elongation and somite segmentation during mouse embryogenesis." *Development (Cambridge, England)* 133:989-999.
- Schäfer, K, and T Braun. 1999. "Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene Lbx1h." *Nature Genetics* 23:213-216.
- Schindeler, Aaron, and David G Little. 2008. "Recent insights into bone development, homeostasis, and repair in type 1 neurofibromatosis (NF1)." *Bone* 42:616-622.
- Schipani, E et al. 1997. "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* 94:13689-13694.

- Segev, O et al. 2000. "Restrained chondrocyte proliferation and maturation with abnormal growth plate vascularization and ossification in human FGFR-3(G380R) transgenic mice." *Human Molecular Genetics* 9:249-258.
- Seghatoleslami, M R et al. 1995. "Differential regulation of COL2A1 expression in developing and mature chondrocytes." *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 14:753-764.
- Semenov, Mikhail V, Raymond Habas, Bryan T Macdonald, and Xi He. 2007. "SnapShot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways." *Cell* 131:1378.
- Seo, Hwa-Seon, and Rosa Serra. 2007. "Deletion of Tgfb2 in Prx1-cre expressing mesenchyme results in defects in development of the long bones and joints." *Developmental Biology* 310:304-316.
- Serrano, M, A W Lin, M E McCurrach, D Beach, and S W Lowe. 1997. "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a." *Cell* 88:593-602.
- Sherr, C J. 1995. "Mammalian G1 cyclins and cell cycle progression." *Proceedings of the Association of American Physicians* 107:181-186.
- Soriano, P. 1999. "Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain." *Nature Genetics* 21:70-71.
- Souza, J F, R L F Passos, A C M Guedes, N A Rezende, and L O C Rodrigues. 2009. "Muscular force is reduced in neurofibromatosis type 1." *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions* 9:15-17.
- Später, D, T P Hill, M Gruber, and C Hartmann. 2006. "Role of canonical Wnt-signalling in joint formation." *European Cells & Materials* 12:71-80.
- Standal, Therese, Magne Borset, and Anders Sundan. 2004. "Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling." *Experimental Oncology* 26:179-184.
- Sternberg, N, and D Hamilton. 1981. "Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites." *Journal of Molecular Biology* 150:467-486.
- Sternberg, N, D Hamilton, S Austin, M Yarmolinsky, and R Hoess. 1981. "Site-specific recombination and its role in the life cycle of bacteriophage P1." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 45 Pt 1:297-309.
- Stevenson, D A et al. 1999. "Descriptive analysis of tibial pseudarthrosis in patients with neurofibromatosis 1." *American Journal of Medical Genetics* 84:413-419.
- Stevenson, D A et al. 2005. "Case-control study of the muscular compartments and osseous strength in neurofibromatosis type 1 using peripheral quantitative computed tomography." *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions* 5:145-149.

- St-Jacques, B, M Hammerschmidt, and A P McMahon. 1999. "Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation." *Genes & Development* 13:2072-2086.
- Stocker, K M, L Baizer, T Coston, L Sherman, and G Ciment. 1995. "Regulated expression of neurofibromin in migrating neural crest cells of avian embryos." *Journal of Neurobiology* 27:535-552.
- Storm, E E et al. 1994. "Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily." *Nature* 368:639-643.
- Storm, E E, and D M Kingsley. 1999. "GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development." *Developmental Biology* 209:11-27.
- Storm, E E, and D M Kingsley. 1996. "Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family." *Development (Cambridge, England)* 122:3969-3979.
- Tanaka, K et al. 1990. "S. cerevisiae genes IRA1 and IRA2 encode proteins that may be functionally equivalent to mammalian ras GTPase activating protein." *Cell* 60:803-807.
- Tavella, S et al. 2006. "Forced chondrocyte expression of sonic hedgehog impairs joint formation affecting proliferation and apoptosis." *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 25:389-397.
- Theos, Amy, and Bruce R Korf. 2006. "Pathophysiology of neurofibromatosis type 1." *Annals of Internal Medicine* 144:842-849.
- Thomas, J T et al. 1997. "Disruption of human limb morphogenesis by a dominant negative mutation in CDMP1." *Nature Genetics* 17:58-64.
- Trahey, M, and F McCormick. 1987. "A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants." *Science (New York, N.Y.)* 238:542-545.
- Tremblay, P et al. 1998. "A crucial role for Pax3 in the development of the hypaxial musculature and the long-range migration of muscle precursors." *Developmental Biology* 203:49-61.
- Tsumaki, N et al. 1999. "Role of CDMP-1 in skeletal morphogenesis: promotion of mesenchymal cell recruitment and chondrocyte differentiation." *The Journal of Cell Biology* 144:161-173.
- Vasyutina, Elena, and Carmen Birchmeier. 2006. "The development of migrating muscle precursor cells." *Anatomy and Embryology* 211 Suppl 1:37-41.
- Veeman, Michael T, Jeffrey D Axelrod, and Randall T Moon. 2003. "A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling." *Developmental Cell* 5:367-377.

- Venuti, J M, J H Morris, J L Vivian, E N Olson, and W H Klein. 1995. "Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development." *The Journal of Cell Biology* 128:563-576.
- Vortkamp, A et al. 1996. "Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein." *Science (New York, N.Y.)* 273:613-622.
- Wai, Philip Y, and Paul C Kuo. 2004. "The role of Osteopontin in tumor metastasis." *The Journal of Surgical Research* 121:228-241.
- Walker, S M, and G R Schrodt. 1967. "Contraction of skeletal muscle." *American Journal of Physical Medicine* 46:151-172.
- Wang, Kathryn X, and David T Denhardt. 2008. "Osteopontin: role in immune regulation and stress responses." *Cytokine & Growth Factor Reviews* 19:333-345.
- Wang, Q, R P Green, G Zhao, and D M Ornitz. 2001. "Differential regulation of endochondral bone growth and joint development by FGFR1 and FGFR3 tyrosine kinase domains." *Development (Cambridge, England)* 128:3867-3876.
- Wasylyk, B, S L Hahn, and A Giovane. 1993. "The Ets family of transcription factors." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 211:7-18.
- Williams, B A, and C P Ordahl. 1994a. "Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification." *Development (Cambridge, England)* 120:785-796.
- Williams, J A, H S Su, A Bernards, J Field, and A Sehgal. 2001. "A circadian output in *Drosophila* mediated by neurofibromatosis-1 and Ras/MAPK." *Science (New York, N.Y.)* 293:2251-2256.
- Winslow, Benjamin Britton, Ryoko Takimoto-Kimura, and Ann Campbell Burke. 2007. "Global patterning of the vertebrate mesoderm." *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 236:2371-2381.
- Witte, Florian, Janine Dokas, Franziska Neuendorf, Stefan Mundlos, and Sigmar Stricker. 2009. "Comprehensive expression analysis of all Wnt genes and their major secreted antagonists during mouse limb development and cartilage differentiation." *Gene Expression Patterns: GEP* 9:215-223.
- Wittinghofer, A, and N Nassar. 1996. "How Ras-related proteins talk to their effectors." *Trends in Biochemical Sciences* 21:488-491.
- Wright, E et al. 1995. "The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos." *Nature Genetics* 9:15-20.
- Wu, Xiangwei, Weibin Shi, and Xu Cao. 2007. "Multiplicity of BMP signaling in skeletal development." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1116:29-49.
- Xu, G F et al. 1990. "The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP." *Cell* 62:599-608.

- Zambrowicz, B P et al. 1997. "Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:3789-3794.
- Zehentner, Barbara Katharina, Anja Haussmann, and Helmut Bartscher. 2002. "The bone morphogenetic protein antagonist Noggin is regulated by Sox9 during endochondral differentiation." *Development, Growth & Differentiation* 44:1-9.
- Zhao, Q, H Eberspaecher, V Lefebvre, and B De Crombrughe. 1997a. "Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis." *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 209:377-386..
- Zhou, G et al. 1995. "A 182 bp fragment of the mouse pro alpha 1(II) collagen gene is sufficient to direct chondrocyte expression in transgenic mice." *Journal of Cell Science* 108 ( Pt 12):3677-3684.
- Zhu, Y et al. 2001. "Ablation of NF1 function in neurons induces abnormal development of cerebral cortex and reactive gliosis in the brain." *Genes & Development* 15:859-876.

## 9 Weitere Verzeichnisse

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ENDOCHONDRALEN OSSIFIKATION .....	3
ABB. 2: ORGANISATION UND REGULATION DER KNOCHENWACHSTUMSFUGE .....	5
ABB. 3: AUFBAU EINES SYNOVIALEN GELENKS .....	6
ABB. 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER GELENKBILDUNG .....	7
ABB. 5: REGULATION DER MYOGENESE .....	10
ABB. 6: NF1 HEMMT RAS .....	13
ABB. 7: RAS/MAPK-SIGNALTRANSDUKTION .....	14
ABB. 8: CRE/LOXP-REKOMBINATIONSSYSTEM ZUR GENERIERUNG DER NF1 <sup>PRX1</sup> MAUS .....	16
ABB. 9: EXPRESSIONSPROFIL DER CRE-REKOMBINASE UNTER KONTROLLE DES PRX1-PROMOTORS .....	51
ABB. 10: REKOMBINATION VON <i>NF1</i> IN VERSCHIEDENEN ZELLTYPEN DER NF1 <sup>PRX1</sup> MAUS .....	52
ABB. 11: SKELETTPRÄPARATIONEN UND LÄNGENBESTIMMUNGEN DER EXTREMITÄTEN (P7) .....	53
ABB. 12: HISTOLOGIE DER KNOCHENWACHSTUMSFUGE .....	53
ABB. 13: PROLIFERATIONSRATE DER CHONDROZYTEN .....	54
ABB. 14: EXPRESSIONSANALYSE VON MARKERGENEN IN DER WACHSTUMSFUGE .....	55
ABB. 15: QRT-PCR UND WESTERN BLOT ANALYSE AUF KNORPELGEWEBE .....	55
ABB. 16: AKTIVIERUNG DER RAS/MAPK-SIGNALKASKADE .....	56
ABB. 17: DARSTELLUNG VON NF1 <sup>PRX1</sup> MAUSMUTANTE UND WT .....	57
ABB. 18: ARCHITEKTUR DES HÜFTGELENKS .....	57
ABB. 19: HISTOLOGIE DES HÜFTGELENKS .....	58
ABB. 20: PRÄNATALE ENTSTEHUNG DES HÜFTGELENKS .....	61
ABB. 21: EXPRESSIONSPROFIL GELENK-ASSOZIIERTER SIGNALMOLEKÜLE .....	62
ABB. 22: ELLENBOGEN- UND KNIEGELENK DER NF1 <sup>PRX1</sup> MAUSMUTANTE .....	64
ABB. 23: PRÄ- UND POSTNATALER ENTWICKLUNGSVERLAUF VON ELLENBOGEN- UND KNIEGELENK .....	65
ABB. 24: EXPRESSIONSPROFIL DER CRE-REKOMBINASE UNTER COL2-PROMOTOR .....	67
ABB. 25: HISTOLOGIE DER NF1 <sup>COL2</sup> GELENKE .....	68
ABB. 26: MUSKELSPEZIFISCHE REKOMBINATION DER <i>NF1</i> ALLELE .....	69
ABB. 27: BESTIMMUNG DES GESAMTKÖRPER- UND DES M. TRICEPS GEWICHTS .....	70
ABB. 28: DARSTELLUNG DER DURCHSCHNITTLICHEN UND DER MAXIMALEN ZUGKRAFT .....	71
ABB. 29: HISTOLOGIE DER VORDERLAUFMUSKULATUR .....	73
ABB. 30: HISTOLOGIE DER HINTERLAUFMUSKULATUR .....	74
ABB. 31: WM-ISH ZUR DETEKTION MIGRIERENDER MUSKELVORLÄUFERZELLEN .....	75
ABB. 32: NACHWEIS MIGRIERENDER MUSKELVORLÄUFERZELLEN UND MYOBLASTEN .....	76
ABB. 33: PROLIFERATION MIGRIERENDER MUSKELVORLÄUFERZELLEN (DORSAL) .....	77
ABB. 34: PROLIFERATION MIGRIERENDER MUSKELVORLÄUFERZELLEN (VENTRAL) .....	78

ABB. 35: WM-ISH MIT MYOGENIN .....	79
ABB. 36: MUSKELSPEZIFISCHE <i>MYOD</i> GENEXPRESSION UND MYOD PROTEINDETEKTION.....	80
ABB. 37: MYOD PROTEINLOKALISATION IN MYOFIBRILLEN .....	81
ABB. 38: PROLIFERATIONSRATE <i>MYOD</i> -POSITIVER MYOBLASTEN.....	82

## 9.2 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
3D	dreidimensional
AB	Alzian Blau
Abb.	Abbildung
AER	apikale ektodermale Randleiste
BCIP	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolylphosphat
Bidest	zweifach destilliert
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serum Albumin
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMEM	<i>Dubledecco 's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPS	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E	Embryonalstadium
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
FGFs	<i>Fibroblast Growth Factors</i>
g	Gramm

GAP	GTPase aktivierende Proteine
GDF	<i>Growth and Differentiation Factor</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanine Nucleotide Exchange Factor</i>
GRD	<i>GAP-related domain</i> (GAP assoziierte Domäne)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HE	Hämatoxylin/Eosin
HISS	Hitze inaktiviertes Schafserum
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
kDA	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LacZ	Genbezeichnung für das Enzym $\beta$ -Galaktosidase
LB	Luria Bertami
M	molar
MAPK	<i>Mitogen-Activated Proteine Kinase</i>
MEA	2-Methoxyethylacetat
MEK	MAP/ERK – Kinase
MetOH	Methanol
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
MMA	Methyl-Methacrylat
ms	Millisekunden
Myf	<i>myogenic factor</i>
MyoD	<i>myogenic differentiation</i>
NBT	Nitro blue tetrazolium
NF1	Neurofibromin 1
ng	Nanogramm
NGS	<i>normal goat serum</i>
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p	post / nach der Geburt

p.a.	pro analysis
Pax	<i>paired box</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin und Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentium hydrogenii
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
qRT	quantitative <i>Real Time</i>
RAS	<i>rat sarcoma</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Runden pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
IHH	<i>Indian Hedgehog</i>
SHC	<i>src- and collagen-homolog</i>
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
SHP	<i>SH2 domain-containing tyrosine phosphatase</i>
SOX9	SRY ( <i>sex determining region Y</i> )-box 9
SSC	<i>Saline Sodium Citrate</i>
Tab.	Tabelle
TEA	Triethanolamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
UC	Ultraclear
üN	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
WM-ISH	Whole mount <i>in situ</i> Hybridisierung
Wnt	<i>Wingless-related MMTV integration site</i>
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

### 9.3 Tabellenverzeichnis

TAB. 1: DIAGNOSTISCHE KRITERIEN FÜR NEUROFIBROMATOSE TYP 1.....	12
TAB. 2: PRIMER .....	26
TAB. 3: ANTIKÖRPER .....	28
TAB. 4: <i>NF1</i> -GENOTYPISIERUNG (NACHWEIS DER <i>NF1</i> ALLELE).....	32
TAB. 5: <i>NF1</i> -GENOTYPISIERUNG (NACHWEIS DER CRE-REKOMBINATION).....	33
TAB. 6: ROSA26-GENOTYPISIERUNG (NACHWEIS DER CRE-INTEGRATION UND LACZ EXPRESSION).....	33
TAB. 7: AMPLIFIKATION DER SONDESEQUENZ AUS CDNA.....	34
TAB. 8: ANSATZ EINER KOLONIE-PCR.....	34
TAB. 9: LIGATIONSANSATZ .....	36
TAB. 10: ANSATZ EINER SEQUENZIERUNGS-PCR .....	37
TAB. 11: ANSATZ EINER QRT-PCR.....	40
TAB. 12: ANSATZ EINES 10 %IGEN PROTEINGELS .....	41

## 10 Anhang

### 10.1 Publikationen

- Zemojtel, Tomasz, Mateusz Kolanczyk, **Nadine Kossler**, Sigmar Stricker, Rudi Lurz, Ivan Mikula, Marlena Duchniewicz, Markus Schuelke, Pedram Ghafourifar, Pavel Martasek, Martin Vingron and Stefan Mundlos. 2006. "Mammalian mitochondrial nitric oxide synthase: characterization of a novel candidate." *FEBS Lett* 580(2):455-62.
- Kolanczyk, Mateusz, **Nadine Kossler**, Jirko Kühnisch, Liron Lavitas, Sigmar Stricker, Ulrich Wilkening, Inderchand Manjubala, Peter Fratzl, Ralf Spoerle, Bernhard G. Herrmann, Luis F. Parada, Uwe Kornak and Stefan Mundlos. 2007. "Multiple roles for neurofibromin in skeletal development and growth." *Human Molecular Genetics* 16:874-886.
- Kolanczyk, Mateusz, Jirko Kühnisch, **Nadine Kossler**, Monika Osswald, Sabine Stumpp, Boris Thurisch, Uwe Kornak and Stefan Mundlos. 2008. "Modelling neurofibromatosis type 1 tibial dysplasia and its treatment with lovastatin." *BMC Med* 31:6-21.
- Kolanczyk, Mateusz, Markus Pech, Tomasz Zemojtel, Hiroshi Yamamoto, Ivan Mikula Maria-Antoniette Calvaruso, Mariël van den Brand, Ricarda Richter, Bjoern Fischer, Anita Ritz, **Nadine Kossler**, Boris Thurisch, Ralf Spoerle, Jan Smeitink, Uwe Kornak, Danny Chan, Martin Vingron, Pavel Martasek, Robert N. Lightowers, Leo Nijtmans, Markus Schuelke, Knud H. Nierhaus and Stefan Mundlos. 2010. "NOA1 is an essential GTPase required for mitochondrial protein synthesis." *Mol Biol Cell* (im Druck)
- Kossler, Nadine**, Sigmar Stricker, Johnny Kim, Carola Dietrich, Monika Osswald, Jirko Kühnisch, Thomas Braun, Stefan Mundlos and Mateusz Kolanczyk. "Nf1 is required for normal skeletal muscle development." (eingereicht)
- Kolanczyk, Mateusz, Lan Kluwe, **Nadine Kossler**, Jirko Kühnisch, Tomasz Zemojtel, Alexander Jamsheer, Eike Wegener, Boris Thurisch, Sigrid Tincherd, Nikola Holtkamp, Patricia Birch, David Kendler, Anja Harder, Stefan Mundlos and Victor F. Mautner. "MIA (cd-rap) is a potential serum biomarker for tumour load in neurofibromatosis type 1." (eingereicht)