

Aus dem Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik Berlin
(Arbeitsgruppe "Development and Disease")
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Etablierung eines automatischen Verfahrens für die
In-Situ-Hybridisierung zur Analyse
differentiell exprimierter Gene im runx2-Mausmodell

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité
– Universitätsmedizin Berlin

von
Maren Urban
aus Freudenstadt

Dekan: Prof. Dr. med. M. Paul

Ester Gutachter: Prof. Dr. med. S. Mundlos

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. A. Winterpacht

Dritter Gutacher: Prof. Dr. med. G.-R. Burmester

Datum der Disputation: 29.09.2006

Datum der Urkundenverleihung: 15.12.2006

-Inhaltsverzeichnis-

Abbildungsverzeichnis
Diagrammverzeichnis
Tabellenverzeichnis
Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	S. 1
1.1. Knochenentwicklung	S. 1
1.2. Molekularbiologie der Chondrozyten und Osteoblasten	S. 4
1.3. Molekularbiologie der Osteoklasten	S. 5
1.4. <i>Runx2</i> , ein Schlüsselgen für die Osteogenese	S. 6
1.5. Vorarbeiten	S. 7
1.6. Gene Ontology	S. 8
1.7. Zielsetzung der Arbeit	S. 8
2. Material und Methoden	S. 10
2.1. Material	S. 10
2.1.1. Geräte	S. 10
2.1.2. Kits	S. 11
2.1.3. Sonstige Materialien	S. 11
2.1.4. Reagenzien	S. 11
2.1.5. Enzyme mit dazugehörigen Puffern	S. 13
2.1.6. Puffer und Lösungen	S. 13
2.1.7. Bakterienstamm, -medien, Vektor	S. 14
2.1.8. Computerprogramme	S. 14
2.1.9. Datenbanken	S. 15
2.2. Methoden	S. 15
2.2.1. Molekularbiologische Methoden	S. 15
2.2.1.1. Polymerase-Kettenreaktion	S. 15
2.2.1.2. PCR-Aufreinigung	S. 16
2.2.1.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	S. 16
2.2.1.4. Sondenherstellung	S. 19
2.2.1.4.1. Sondenherstellung durch Klonieren von DNA-Fragmenten	S. 20
2.2.1.4.1.1. Präparation von Plasmid-DNA	S. 20
2.2.1.4.1.2. Plasmidlinearisierung	S. 21
2.2.1.4.1.3. Phenol/Chloroform-DNA-Aufreinigung	S. 21
2.2.1.4.2. Sondenherstellung durch Kolonie-PCR	S. 22
2.2.1.4.3. Sondenherstellung durch T7-Promotor am Reverse-Primer	S. 22
2.2.1.5. Gelelektrophorese	S. 22

2.2.1.6. DNA-Sequenzierung	S. 23
2.2.1.7. Transkription von RNA-Sonden	S. 24
2.2.2. Histologische Methoden	S. 25
2.2.2.1. Herstellung silanisierter Objektträger	S. 25
2.2.2.2. Vorbehandlung und Einbettung des Gewebes	S. 25
2.2.2.3. Anfertigung von Kryoschnitten	S. 26
2.3. Material und Methoden der <i>In-Situ</i>-Hybridisierung mit Hilfe des TECAN Genesis RSP 150	S. 26
2.3.1. Material und zugehörige Geräte	S. 27
2.3.2. Methoden	S. 27
2.3.2.1. Ansetzen der Puffer	S. 27
2.3.2.2. <i>In-Situ</i> -Hybridisierung	S. 28
2.3.3. Aufbau des Automaten	S. 31
3. Ergebnisse	S. 32
3.1. Duplikate	S. 32
3.2. RNA-Sonden-Herstellung	S. 32
3.3. Funktion der Sonden	S. 34
3.4. Darstellung der Expressionsmuster in der <i>In-Situ</i>-Hybridisierung	S. 36
3.5. Charakteristische Marker	S. 38
3.6. <i>Runx2</i> und seine Expression im Knochen	S. 40
3.7. Einteilung der Gene nach ihrer Funktion aus Literaturangaben	S. 40
3.7.1. Gene mit Funktion in der Osteoblasten- und Chondrozytendifferenzierung	S. 41
3.7.2. Gene mit Funktion in der Osteoblasten- und Osteoklastendifferenzierung	S. 45
3.7.3. Gene mit Funktion in der Osteoblastendifferenzierung	S. 47
3.7.4. Gene mit Funktion in der Chondrozytendifferenzierung	S. 49
3.7.5. Gene mit Funktion in der Osteoklastendifferenzierung	S. 52
3.7.6. Gene mit Funktion in der Knochenentwicklung	S. 55
3.7.7. Gene mit möglicher Funktion in der Knochenentwicklung	S. 57
3.7.8. Gene mit bekannter sonstiger Funktion	S. 64
3.7.9. Gene mit unbekannter Funktion	S. 71
3.8. Promotoranalyse	S. 73
4. Diskussion	S. 74
4.1. Optimierungen	S. 74
4.1.1. Optimierung der Sondenherstellung	S. 74
4.1.2. Optimierungen der <i>ISH</i>	S. 74
4.1.2.1. Optimierung der Gefrierschnitte	S. 74
4.1.2.2. Optimierung des Tecan-Automaten	S. 76

4.2. . Einteilung der Gene und deren Beschreibung aus Literaturangaben	S. 77
4.2.1. Gene mit Funktion in der Osteoblasten- und Chondrozytendifferenzierung	S. 78
4.2.2. Gene mit Funktion in der Osteoblasten- und Osteoklastendifferenzierung	S. 80
4.2.3. Gene mit Funktion in der Osteoblastendifferenzierung	S. 82
4.2.4. Gene mit Funktion in der Chondrozytendifferenzierung	S. 83
4.2.5. Gene mit Funktion in der Osteoklastendifferenzierung	S. 84
4.2.6. Gene mit Funktion in der Knochenentwicklung	S. 86
4.2.7. Gene mit möglicher Funktion in der Knochenentwicklung	S. 87
4.2.8. Gene mit bekannter sonstiger Funktion	S. 89
4.2.9. Gene mit unbekannter Funktion	S. 91
4.3. Überblick über die Runx2-Signaltransduktion und Runx2-regulierten Gene	S. 92
4.4. Promotoranalyse	S. 94
4.5. Datenbank	S. 94
5. Zusammenfassung	S. 96
6. Literaturverzeichnis	S. 98
7. Publikation	S. 107

Abstract

Runx2 is an essential factor for skeletogenesis and heterozygous mutations in the human RUNX2 gene are the cause for the skeletal malformation syndrome cleidocranial dysplasia. *Runx2*-deficient mice lack hypertrophic cartilage and bone.

We compared the expression profiles of wildtype and *Runx2*^{-/-} murine embryonal humeri to identify new transcripts potentially involved in the cartilage and bone development.

After identifying 53 differentially expressed genes by two independent oligonucleotide-microarray hybridizations and quantitative RT-PCR experiments, digoxigenin-labeled RNA *in situ* hybridization on E15.5 limb sections was performed to analyse the expression. For this step it was necessary to establish the procedure of cryosectioning and the process of a semi-automated *in situ* hybridization using the Tecan Genesis RSP 150.

For 35 genes unequivocal and reproducible *in situ* hybridisation results were obtained and 32 of them showed skeletal expression. While 15 of this genes have a known role in bone and/or cartilage, we identified 15 known genes that have not yet been implicated in skeletal development and two entirely new transcripts. Results are viewable at an expressly created website.

Key words: Runx2, development, bone, cartilage, skeletogenesis, gene expression, *in situ* hybridization, Tecan Genesis RSP 150

Zusammenfassung

Runx2 ist ein essentieller Faktor der Skeletogenese. Die heterozygote Mutation dieses Gens verursacht beim Menschen das Skelettmalformations-Syndrom Cleidocraniale Dysplasie. Runx2-defiziente Mäuse weisen einen Verlust von hypertrophen Chondrozyten und Knochen auf.

Wir verglichen die Expressionsprofile von embryonalen murinen Wildtyp- und *Runx2*^{-/-}-Humeri um neue Transkripte zu identifizieren, die potentiell in die Knorpel- und Knochenentwicklung involviert sind.

Nach der Identifizierung von 53 differentiell exprimierten Genen durch zwei unabhängige Oligonukleotid Microarray Hybridisierungen und quantitativen RT-PCR Experimenten, wurde eine *In-Situ*-Hybridisierung mit Digoxigenin-markierter RNA auf Extremitätenschnitten von Mäusen E15,5 durchgeführt. Für diesen Schritt war es zunächst notwendig, den Prozess der Kryoschnittherstellung und das Verfahren der semi-automatischen *In-Situ*-Hybridisierung durch den Tecan Genesis RSP 150 zu etablieren.

Für 35 Gene konnte eine eindeutige und reproduzierbare Expression gefunden werden und 32 dieser Gene zeigten eine skelettäre Expression. Während 15 der Gene eine bekannte Rolle im Knochen und/oder Knorpel besitzen, konnten wir 15 bekannte Gene, denen noch keine Rolle in der Skelettentwicklung zugeschrieben ist, sowie zwei gänzlich unbekannte Gene identifizieren. Die Ergebnisse sind auf einer eigens dafür konzipierten Website einsehbar.

Keywords: Runx2, Entwicklung, Knochen, Knorpel, Skeletogenese, Genexpression, *In-Situ*-Hybridisierung, Tecan Genesis RSP 150

-Abbildungsverzeichnis-

Abb. 1.1.: Desmale Ossifikation

Abb. 1.2.: Schematische Darstellung der enchondralen Ossifikation

Abb. 1.3.: Aufbau des Knochens

Abb. 1.4.: Periosteum

Abb. 1.5.: Differenzierung des Knorpels und Übergang zum trabekulären Knochen

Abb. 1.6.: Osteoklastengenese

Abb. 1.7.: Phänotyp der *cleidocranialen Dysplasie (CCD)*

Abb. 2.1.: Darstellung der unterschiedlichen Vorgehensweisen zur Herstellung von Sonden

Abb. 2.2.: Darstellung der Nested-PCR

Abb. 2.3.: Der TECAN Genesis RSP 150

Abb. 2.4.: Objektträgerhalter und -kasten

Abb. 2.5.: Aufbau des Automaten

Abb. 3.1.: Expression von **Col IIa1**

Abb. 3.2.: Expression von **Col Xa1**

Abb. 3.3.: Expression von **Col Ia1**

Abb. 3.4.: Expression von **Trap**

Abb. 3.5.: Expression von **Runx2**

Abb. 3.6.: Expression von **Tgfb1** (AJ00986)

Abb. 3.7.: Expression von **Cdh2** (M31131)

Abb. 3.8.: Expression von **Dlx5** (U67840)

Abb. 3.9.: Expression von **Spp1** (X13986)

Abb. 3.10.: Expression von **Vdr** (AW061016)

Abb. 3.11.: Expression von **Dkk1** (AF030433)

Abb. 3.12.: Expression von **Ibsp** (L20232)

Abb. 3.13.: Expression von **Wnt5a** (M89798)

Abb. 3.14.: Expression von **Tcf7** (X61385)

Abb. 3.15.: Expression von **Ihh** (X76291)

Abb. 3.16.: Expression von **Gsn** (J04953)

Abb. 3.17.: Expression von **Trap** (M99054)

Abb. 3.18.: Expression von **Ccl9** (U49513) im Vergleich zu Trap

Abb. 3.19.: Expression von **Lox** (D10837)

Abb. 3.20.: Expression von **Mmp13** (X66473)

Abb. 3.21.: Expression von **Unc5b** (AW122703)

Abb. 3.22.: Expression von **Satb2** (AW124651)

Abb. 3.23.: Expression von **Hck** (J03023)

Abb. 3.24.: Expression von **Mef2c** (L13171)

Abb. 3.25.: Expression von **S100A4** (M36579) im Vergleich zu Trap

Abb. 3.26.: Expression von **Epha3** (M68513)

Abb. 3.27.: Expression von **Rasa3** (U20238)

Abb. 3.28.: Expression von **Snx10** (AI746846) im Vergleich zu Trap

Abb. 3.29.: Expression von **Gpc1** (AI852765)

Abb. 3.30.: Expression von **Cdo1** (AI854020)

Abb. 3.31.: Expression von **Thy1** (M12379) im Vergleich zu Trap

Abb. 3.32.: Expression von **Gpx3** (U13705)

Abb. 3.33.: Expression von **Gnai1** (U38501) im Vergleich zu Trap

Abb. 3.34.: Expression von **Fabp3** (X14961)

Abb. 3.35.: Expression von **Cnn2** (Z19513)

Abb. 3.36.: Expression von **Ethanol induced gene product** (AB023957)

Abb. 3.37.: Expression von **AW124306**

Abb. 4.1.: Darstellung der Kupferkammer

Abb. 4.2.: Vergleich der Signalqualität

Abb. 4.3.: Vergleich der Gewebsqualität

Abb. 4.4.: Runx2-Signalwege

Abb. 4.5.: Runx-regulierte Gene

Abb. 4.6.: Darstellung der Datenbank "Bone eXpress"

-Diagrammverzeichnis-

Diagramm 3.1.: Ergebnisse der Sondenherstellung

Diagramm 3.2.: Darstellung, wie viele Sonden in den jeweiligen Gewebsarten nachgewiesen wurden

Diagramm 3.3.: Genauere Darstellung der Sonden mit ihrem jeweiligen Signal

Diagramm 4.1.: Darstellung der Gene mit ihren häufigsten und wichtigsten molekularen Funktionen

Diagramm 4.2.: Darstellung der Gene mit ihren häufigsten und wichtigsten zellulären Komponenten

Diagramm 4.3.: Darstellung der Gene mit ihren häufigsten und wichtigsten biologischen Prozessen

Diagramm 4.4.: Geneinteilung nach ihrer Funktion aus Literaturangaben

-Tabellenverzeichnis-

Tab. 2.1.: Primäramplifikation

Tab. 2.2.: Reamplifikation

Tab. 2.3.: Primerliste

Tab. 2.4.: Sequenzierungsprogramm

Tab. 2.5.: Protokoll des Automaten

Tab. 3.1.: In Chip und Real-Time-PCR bestätigte Gene und deren Funktion

Tab. 3.2.: Darstellung der Expressionsmuster in der *In-Situ*-Hybridisierung

Tab. 3.3.: ESTs, bei denen konservierte Runx-Bindungsstellen im GenPromotor gefunden wurden

-Abkürzungsverzeichnis-

µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
Abb.	Abbildung
A. bidest	Aqua bidest
Acc.-Nr.	Accession number
bP	Basenpaar(e)
Ca	Karzinom
Cbfa1	Core binding factor a1
D.	Deutschland
Diagr.	Diagramm
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonucleinacid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dpc.	Days post coitum
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	expressed sequence tags
et al.	et alteri
EtOH	Ethanol
g	Gramm
h	Stunde
<i>ISH</i>	<i>In-Situ</i> -Hybridisierung-
l	Liter
m	molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimolar
mRNA	messenger-RNA
ng	Nanogramm
p.a.	pro analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
DNA	Ribonucleinacid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
S.	Seite
sek	Sekunde
Syn.	Synonym
Symb.	Symbol
Tab.	Tabelle
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Danksagung

Mein Dank gilt:

Prof. Dr. Mundlos: für die Möglichkeit, an diesem Projekt zu arbeiten, die anregenden Diskussionen und die Möglichkeit des freien Arbeitens und Gestaltens.

Volkhard: für die gute und gewissenhafte Betreuung. Trotz vieler anderer Verpflichtungen fand er immer die Zeit, mich während der Arbeit zu unterstützen. Danke für die Mithilfe bei der Sondenherstellung und Korrektur der Arbeit.

Jochen: für geduldige Hilfestellungen bei vielen Fragen, sei es zu den Vorarbeiten, der Biochemie, dem Klonieren, den Go-Graphiken, etc. . Danke für die Mithilfe bei der Sondenherstellung und Mitkorrektur der Arbeit.

Asita: für das Top-Einarbeiten in das Projekt, sowie das Näherbringen der verschiedenen Methoden.

Norbert: für die gute Zusammenarbeit, für unendliche Geduld rund um den *In-Situ*-Automaten und für viele Diskussionen um Verbesserungsmöglichkeiten.

Anton: für die Arbeit mit der Datenbank

Sigmar: für Hilfe bei den In-Situ-Auswertungen und bei Fragen rund um Expressionsmuster.

Britta: für das Mäuse präpen und einbetten.

Nick: für die Hilfe bei Gene Ontology.

Christoph: für die Promotordaten.

der gesamten AG Mundlos: für die herzliche Aufnahme, stetige Unterstützung, Tipps und Tricks, Aufmunterungen.....Hab mich bei Euch wohl gefühlt!!!

meiner Schwester und meinen Freunden: für viel Geduld und Verständnis in mancher Stunde.

meinen Eltern: für seelische, moralische und finanzielle Unterstützung in der ganzen Zeit.

den Gutachtern: für die Annahme dieser Arbeit.

Der Promotionskommission: für die Zustimmung zu dieser Arbeit

Erklärung an Eides Statt

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

Berlin, den 13. 10. 2006

Maren Urban