

1 Einleitung

1.1. Knochenentwicklung

An der Entstehung und Aufrechterhaltung des Skeletts sind drei Zelltypen maßgeblich beteiligt. Auf der einen Seite sind dies die Chondrozyten, die den Knorpel aufbauen und die Osteoblasten, die den Knochen aufbauen. Auf der anderen Seite stehen die Osteoklasten, die Knorpel- und Knochensubstanz resorbieren und dadurch einen wichtigen Antagonismus zur Knochenbildung darstellen. Durch die Osteoklastenaktivität entsteht z.B. die Knochenmarkshöhle¹.

Über die Aktivierung und Differenzierung dieser drei Zelltypen werden Wachstum und Homöostase des Knorpels und Knochens gesteuert².

Zwei Arten der Skelettentwicklung werden unterschieden; die desmale und die enchondrale Ossifikation.

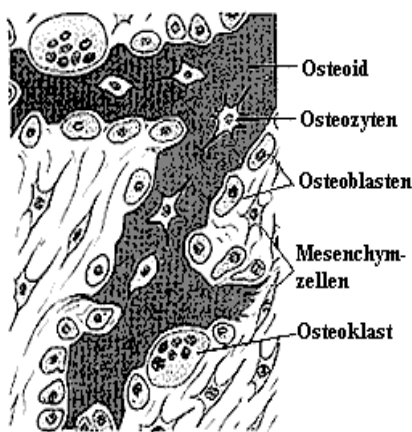


Abb. 1.1.: Desmale Ossifikation

Osteoblasten, die aus Mesenchymzellen hervorgegangen sind, geben an ihre Umgebung Grundsubstanz ab und werden dadurch, daß sie sich "einmauern", zu Osteozyten. Auf bereits entstandenen Knochenanlagen bilden Osteoblasten häufig eine zusammenhängende Schicht; das Osteoid. Parallel zum Knochenaufbau erfolgt ein Knochenabbau durch Osteoklasten. (Verändert aus Anatomie; Schiebler, Schmidt, Zilles, 1997^(a))

Bei der sogenannten desmalen Ossifikation differenzieren sich mesenchymale Zellen zu Osteoblasten, die direkt Knochen (Osteoid) bilden. Osteoblasten, die sich durch Knochenmatrix „einmauern“, werden zu Osteozyten.

Fast gleichzeitig mit dem Knochenaufbau beginnen Umbauvorgänge, für welche die Osteoklasten wichtig sind. Durch den Prozess der desmalen Ossifikation entstehen Teile des Schädeldachs, der Gesichtsschädel, die Kieferknochen und ein Teil der Schlüsselbeine^{a,d}.

Bei der sogenannten enchondralen Ossifikation entsteht zunächst ein Knorpelmodell des späteren Skeletts, welches während der Entwicklung durch Knochen ersetzt wird. Bei der enchondralen Ossifikation differenzieren sich anfangs mesenchymale Zellen zu Chondroblasten.

Diesen ersten Schritt nennt man Kondensation. Die sich um die Kondensation befindenden Zellen stellen das

Perichondrium (Knorpelhaut) dar. Es trägt zum Knorpelwachstum bei und reguliert dessen Wachstumsrate³. Die Chondroblasten proliferieren zunächst (sie stellen den Säulenknorpel dar).

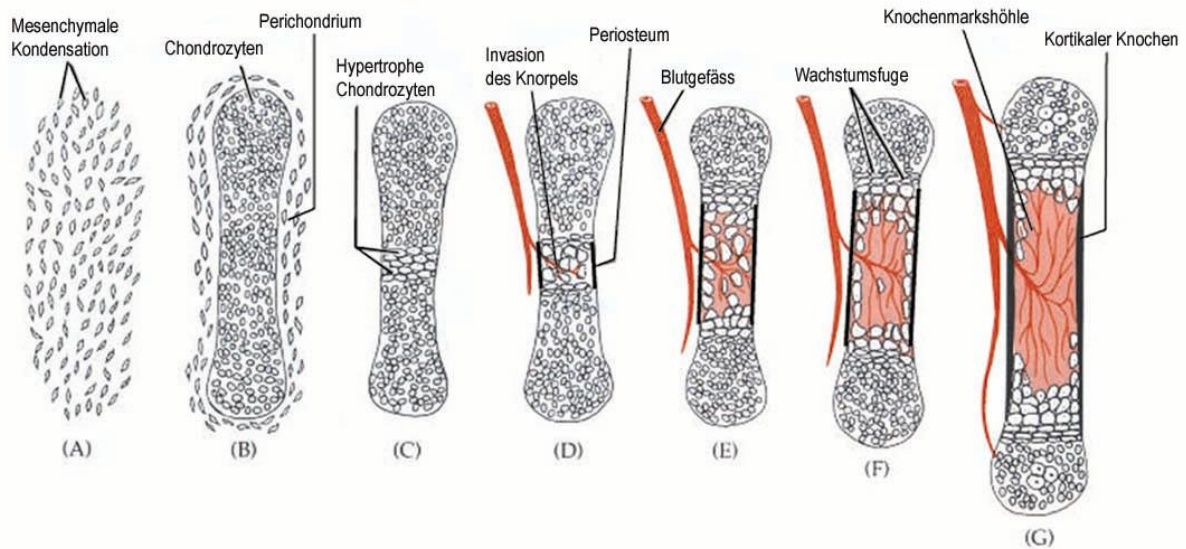


Abb. 1.2.: Schematische Darstellung der enchondralen Ossifikation

- (A) Mesenchymale Zellen differenzieren sich zu Chondroblasten und bilden die Kondensationszone.
 (B) Chondroblasten werden zu Chondrozyten und bilden eine Knorpelanlage, umgeben von Perichondrium.
 (C) Zentral liegende Chondrozyten beginnen zu hypertrophieren.
 (D) Terminal hypertrophe Chondrozyten werden apoptotisch. Beginn der Invasion des Knorpels durch Blutgefäße und Osteoklasten. Das flankierende Perichondrium wird zum Periosteum.
 (E) Osteoklasten lassen einen Hohlraum entstehen, die spätere Knochenmarkshöhle.
 (F) Das Knorpelgewebe wird zentral durch trabekulären Knochen ersetzt. Das Längenwachstum erfolgt nun an den distalen Enden in den beiden Wachstumsfugen.
 (G) Die Knochenmarkshöhle beinhaltet nun hämatopoetische Zellen. Von außen lagert sich kortikaler Knochen an .
 (Abgewandelt nach Gilbert, 1994 ^(b))

Im zweiten Schritt beginnen sich die zentralen Knorpelzellen zu differenzieren, was sich morphologisch dadurch äußert, dass sie ihr Volumen vervielfachen und eine sich kalzifizierende Matrix bilden. Diese Zellen nennt man hypertrophe Chondrozyten. In dieser Zone der hypertrophierenden Knorpelzellen spricht man auch von Blasenknorpel. Nach der terminalen hypertrophen Differenzierung werden die Chondrozyten apoptotisch. Zu diesem Zeitpunkt dringen von außen Osteoklasten ein und zersetzen die Knorpelmatrix. In die so entstandenen Einbruchzonen können Blutgefäße aus dem Periost einwandern. Dies wird als Invasion des Knorpels bezeichnet. Dadurch können Osteoblasten in den Freiraum gelangen. Diese Osteoblasten beginnen mit dem Aufbau des trabekulären Knochens. Das umliegende Perichondrium wird dann Periosteum (Knochenhaut) genannt.

Die enchondrale Ossifikation schreitet zu den beiden Enden der Diaphyse weiter, so dass schließlich zwei Zonen entstehen, in denen das Wachstum so lange abläuft, bis die endgültige Länge des Knochens erreicht wird (siehe Abb.1.3.) ^{a,d,e}.

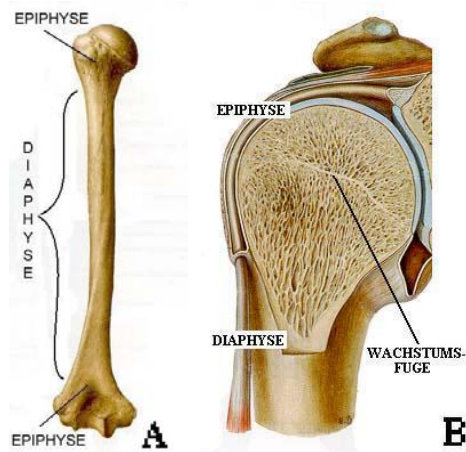


Abb. 1.3.: Aufbau des Knochens

Abb.A zeigt einen menschlichen Oberarmknochen (Humerus). Der ganze Knochenschaft wird als Diaphyse bezeichnet, während die Enden zum Gelenk hin jeweils Epiphysen genannt werden.

Abb.B. zeigt einen adulten (und somit ausgewachsenen) menschlichen Humerus im Querschnitt. Zwischen Diaphyse und Epiphyse befindet sich eine Fuge, die als Wachstumsfuge oder auch Epiphysenfuge, bzw. Metaphyse bezeichnet wird. Dort findet zum Zeitpunkt der Entwicklung der vollen Knochenlänge das Knochenwachstum statt. (Verändert nach Sobotta ^(b))

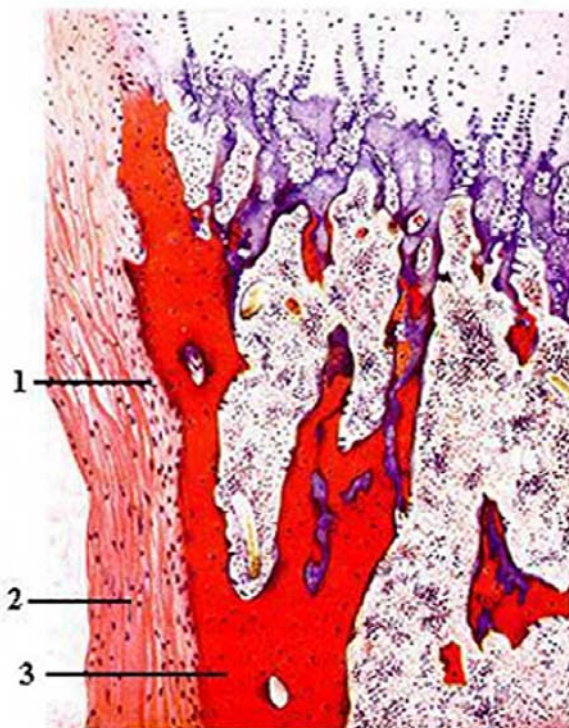


Abb. 1.4. Periosteum

- 1.: Stratum osteogenicum (knochenbildende Schicht): Sie enthält reichlich Osteoblasten.
 - 2.: Stratum fibrosum (Faserschicht): Sie besteht aus einem Fasergeflecht.
 - 3.: Knochen (80-fache Vergrößerung)
- (Verändert aus Lippert ^(c))

Periosteum:

Das Periosteum umhüllt alle Knochen vollständig. Ausgenommen sind die Gelenkflächen, die mit Gelenkknorpel überzogen sind. Das Periosteum besteht aus zwei Schichten. Die innere, dem Knochen direkt anliegende Schicht besteht im Entwicklungsstadium aus Osteoblasten und deren Vorläuferzellen. Sie wird als Stratum osteogenicum, oder auch Kambiumschicht, bezeichnet. Die äußere Schicht nennt man Stratum fibrosum, bzw. Faserschicht. Sie besteht aus einem Geflecht zugfester Fasern und vermittelt u.a. die Befestigung von

Muskeln, Sehnen und Bändern ^{a,c,d}.

1.2. Molekularbiologie der Chondrozyten und Osteoblasten

Die enchondrale Ossifikation besteht aus verschiedenen Prozessen der Proliferation und Differenzierung. Diese Prozesse müssen koordiniert werden, damit Knochenwachstum und Knochenerneuerung, sowie Frakturheilung gewährleistet sind. Diese Rolle übernehmen verschiedenste Gene, die in bestimmten Stadien der Differenzierung Signalwege einleiten und vernetzen.

Sox9 (Sex determining region-type HMG box 9) ist ein Transkriptionsfaktor, der für die frühe Kondensation der mesenchymalen Zellen wichtig ist^{4,5}.

Die anschließende Proliferationsphase wird durch Signalmoleküle wie BMPs (Bone morphogenetic proteins), welche zur TGF (Transforming growth factor)- β -Familie gehören⁶, sowie Runx2 aus der Runt-Familie gesteuert⁷⁻⁹. Dieser Transkriptionsfaktor induziert Ihh (Indian hedgehog), ein Mitglied der Hedgehog Familie⁹.

Zur Chondrozytendifferenzierung von prähypertrophen zu hypertrophen Chondrozyten tragen erneut BMPs entscheidend bei^{3,10,11}. Auch Ihh reguliert u.a. die Chondrozytendifferenzierung^{12,13}; einerseits über eine Aktivierung der Proliferation, und andererseits durch eine negative Rückkopplung mit PTHrP (Parathyroid hormone related peptide) durch eine Hemmung der Differenzierung von prähypertrophen zu hypertrophen Chondrozyten^{5,14}.

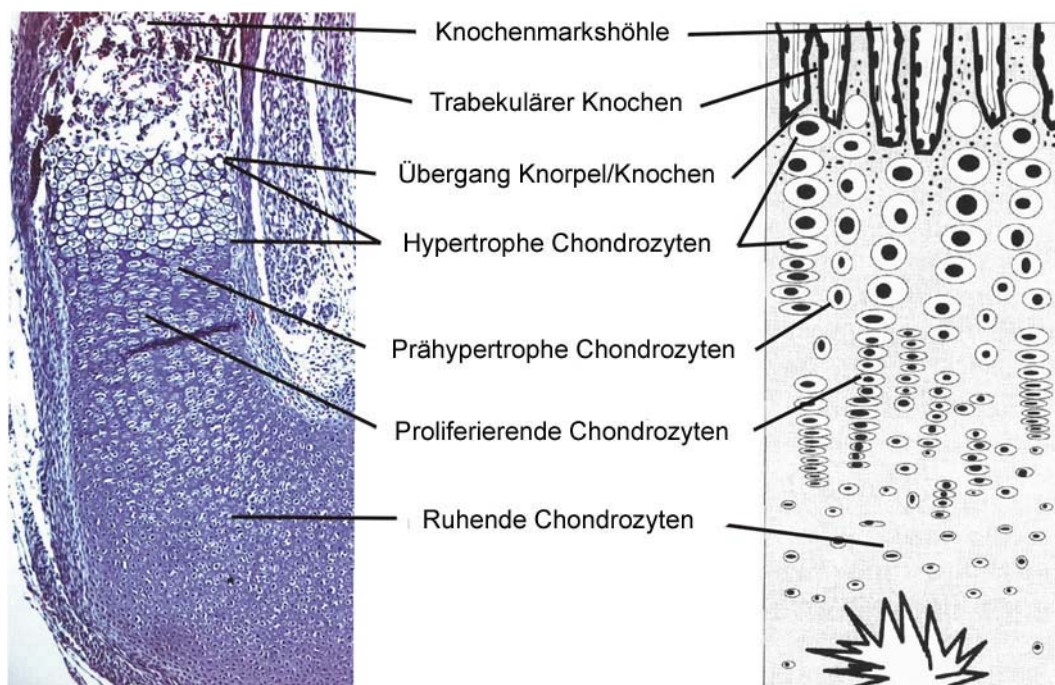


Abb. 1.5.: Differenzierung des Knorpels und Übergang zum trabekulären Knochen

Die Abbildung zeigt links einen Hämatoxylin/Eosin-gefärbten Schnitt durch den proximalen Teil eines embryonalen Humerus (E15.5), rechts ist die Wachstumsfuge schematisch dargestellt. Die wesentlichen Schritte der Knorpeldifferenzierung und des Übergangs zum trabekulären Knochen sind angegeben.

(Freundlich überlassen von Dr. Sigmar Stricker, AG Mundlos, MPI für molekulare Genetik, Berlin.)

Die weitere Differenzierung von hypertrophen Chondrozyten ist relativ unbekannt, wobei hier auch Runx2 eine Rolle zu spielen scheint⁸.

Essentiell für die frühe Osteoblastendifferenzierung ist Runx2^{15,16}. Ein weiterer bekannter Effektor ist der Transkriptionsfaktor OSX (Osterix)¹⁵.

1.3. Molekularbiologie der Osteoklasten

Während der enchondralen Ossifikation bauen die Osteoklasten Knorpel ab und werden hier deshalb definitionsgemäß Chondroklasten genannt. Sie sind hämatopoetischen Ursprungs und zweigen von der Monozyten-/Makrophagenlinie ab. Die Vorläuferzellen wandeln sich zu mehrkernigen Riesenzellen, den Osteoklasten, um^{a,d}.

Die unspezifische Differenzierung der monozytären Zellen unterliegt zuerst Pu.1 und anschließend der MITF (Microphthalmia-associated transcription factor)-Familie von Transkriptionsfaktoren und dem von Osteoblasten exprimierte M-CSF (Makrophage colony stimulating factor). M-CSF fördert die Proliferation der Osteoklastenvorläuferzellen. Der ebenfalls durch Osteoblasten exprimierte RANKL (Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand) aktiviert RANK (Receptor activator of nuclear factor-kappaB), welcher die undifferenzierten Monozyten in den Osteoklastenpfad lenkt.

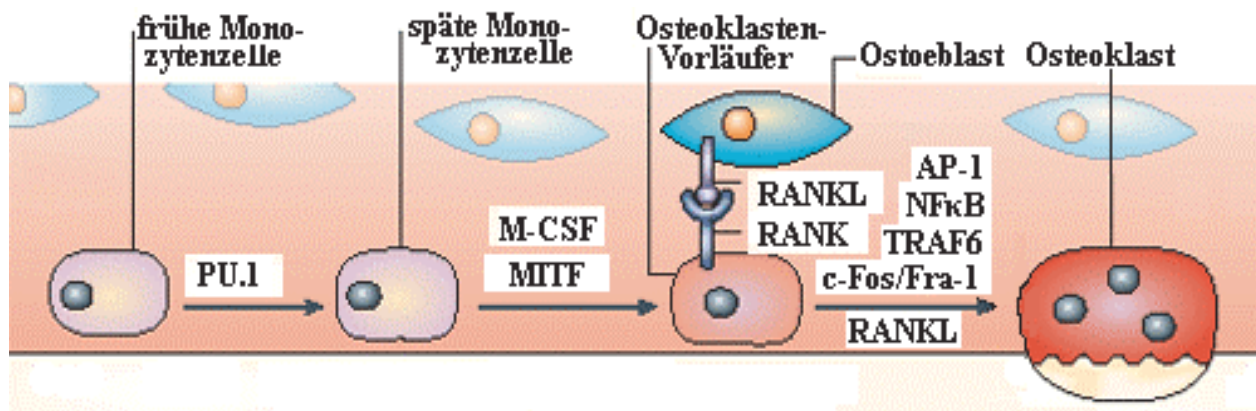


Abb. 1.6.: Osteoklastengnese

Die Abbildung zeigt die wichtigsten Schritte der monozytären Vorläuferzellen bis zu resorptionsfähigen Osteoklasten. (Verändert nach Teitelbaum and Ross, 2003⁽¹⁷⁾)

Die Osteoklastengnese wird durch unterschiedliche Moleküle vermittelt. Hierzu gehören u.a. der Transkriptionsfaktor AP-1 (Adaptor protein 1), NFκB (Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells), TRAF6 (Tumor necrosis factor rezeptor associated factor 6), sowie die Proto-Onkogene c-Fos (FBJ osteosarcoma oncogene) und Fra1 (Fos-related antigen-1).

Während der Genese durchlaufen die Osteoklasten die Schritte der sogenannten Fusion und Polarisation. Hierbei spielt neben den bereits oben erwähnten Faktoren M-CSF und RANKL der Faktor Trap (Tartrate-resistente Acid Phosphatase) eine wichtige Rolle¹⁷⁻²¹. Die Anzahl und Aktivität der Osteoklasten wird unter anderem durch Hormone gesteuert; Hemmung durch Östrogen und Kalzitinin und Förderung durch Parathormon und 1,25-Dihydroxyvitamin D3^a.

1.4. *Runx2*, ein Schlüsselgen der Osteogenese

Runx2 (früher bekannt unter *Cbfa1*, *Pebp2αA*, *AML-3*) ist ein essentieller Transkriptionsfaktor bei der Knochenbildung. Mäuse, die defizient für *Runx2* sind, zeigen ein vollständiges Fehlen von Knochen aufgrund einer Blockade in der frühen Differenzierung der Osteoblasten. Das Skelett besteht daher ausschließlich aus Knorpelgewebe²². Die homozygote Mutation ist perinatal letal, da der Brustkorb nicht genug Stabilität aufbringen kann, um den für das Atmen benötigten Unterdruck zu erzeugen^{22,23}.

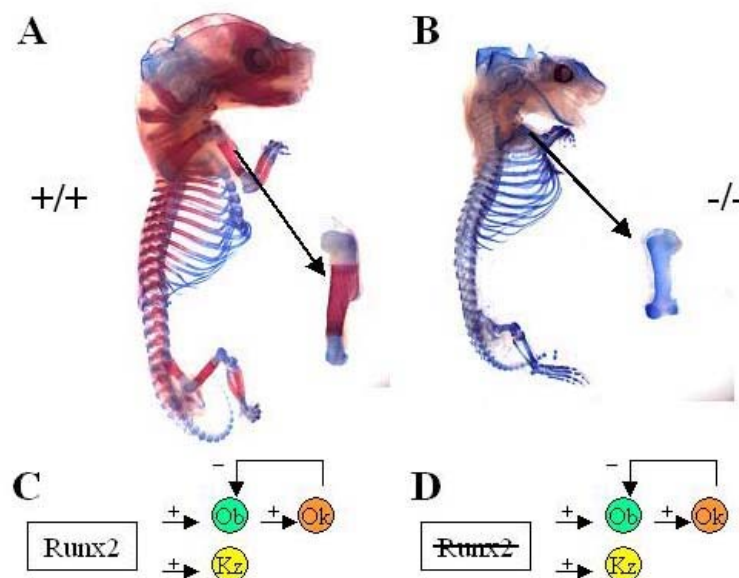


Abb. 1.7.: Phänotyp der *cleidocranialen Dysplasie (CCD)*

Abb. A zeigt eine Wildtyp-Maus (16,5 dpc.), Knochen rot und Knorpel blau gefärbt. *Runx2* reguliert die Chondrozytengnese und Osteoblastengnese mit, und indirekt auch die Osteoklastengnese (Abb. C). In Abb. B ist eine *runx-2* Knockout-Maus (16,5 dpc.) dargestellt, welche nur Knorpel-elemente (blau) und keine Verknöcherungen aufweist. Bei dieser Mausmutante fehlt die Osteoblasten- und somit auch die Osteoklastengnese (Abb. D).
Kz: Knorpelzellen; Ob: Osteoblasten; Ok: Osteoklasten

Beim Menschen verursachen heterozygote Mutationen in diesem Gen die autosomal-dominante Erbkrankheit *Cleidocraniale Dysplasie (CCD)*²⁴. Diese zeichnet sich durch fehlerhafte Knochenbildung, sich langsam schließende Knochenfenster im Schädel (Fontanellen), erhöhte Zahnzahl, Hypoplasie/Aplasie der Schlüsselbeine (Claviculae), sowie kurze Statur aus²⁴⁻²⁶.

Wie in der Abbildung 1.7. dargestellt, ist Runx2 als positiver Regulator an der Entwicklung des Knorpels^{8,27,28} und bei der Differenzierung von Osteoblasten^{16,23,29} beteiligt. Da für die Differenzierung von Osteoklasten Signale von Osteoblasten notwendig sind, besitzen *runx2*-defiziente Mäuse auch keine Osteoklasten (Abb.1.6./Abb.1.7.D)²⁸. Die essentielle Rolle von Runx2 in der Knochenbildung und seine Involvierung in die Knorpelbildung machen dieses Molekül zu einem zentralen Faktor der Skeletogenese.

Das Genexpressionsprofil der *runx2*-Knockout-Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus ermöglicht die Identifizierung von Genen der Osteoblasten-, Osteoklasten- und Chondrozyten-differenzierung. Diese Identifizierung verspricht einen besseren Einblick in die Pathogenese der *CCD*, wie auch ein besseres Verständnis der Knorpel- und Knochenentstehung. Diese Gene sind von therapeutischer Relevanz, da man mit ihrer Hilfe besser auf Krankheiten wie Osteoporose (Erkrankung des Skelettsystems mit Verlust bzw. Verminderung von Knochensubstanz und -struktur^a), Osteopetrose (angeborene Störung der Osteoklastentätigkeit, die bei erhaltener Funktion der Knochenbildung zur Einschränkung des Knochenabbaus führt^a), sowie Arthrose (bei der durch unterschiedliche Ursachen der Gelenkknorpel geschädigt ist) und Arthritis (Gelenkentzündung) eingehen könnte.

Aus den weiterführenden Analysen können potentielle Gene erwartet werden, die aufbauende bzw. aufrechterhaltende Funktionen im Knorpel ausführen und damit geeignete Kandidaten für eine therapeutische Anwendung darstellen könnten.

1.5. Vorarbeiten

Um möglichst umfassend die Unterschiede in der Genexpression bei Wildtyp- und *runx2*-Knockout-Mäusen festzustellen, wurde die Gene-Chip-Technik von Affymetrix genutzt. Diese bot die Möglichkeit, auf drei Chips (U74v2 A, B und C) die Expression von etwa 36000 Genen und ESTs zu untersuchen. Für diese Technik benötigt man RNA, die in komplementäre DNA umgeschrieben und fluoreszenzmarkiert wird. Die Proben werden dann auf die Chips hybridisiert. Dabei bindet die cDNA an kurze DNA-Sequenzen, die jeweils für ein Gen spezifisch sind. Das Auslesen der Chips liefert ein Fluoreszenzsignal, das proportional zur

Expressionsstärke des jeweiligen Gens ist. Für die Hybridisierungen wurde RNA aus Humerusgewebe von 14,5 Tage alten Wildtyp- und Knockout-Embryonen verwendet. (Man geht davon aus, dass in diesem Stadium bei der Wildtyp-Maus alle Differenzierungsgrade im Skelettelement vorhanden sind, die für das Knochenwachstum erforderlich sind ^e. Für die Expressionsanalyse wurden Embryonen im Stadium 15,5 dpc. verwendet, da diese alle Gewebsstrukturen aufweisen.)

Der Vergleich der beiden RNA-Populationen liefert Unterschiede in der Expression von knorpel- und knochenspezifischen Genen, da nur der Wildtyp-Humerus Osteoblasten und Osteoklasten enthält und kaum ein anderer Gewebetyp außer Knorpel und Knochen vorhanden ist. Somit ist es möglich, die Rate an falsch positiven Genen gering zu halten. Bei der Hybridisierung der RNA aus Humerusgewebe wurden bei ca. 120 von ca. 36.000 Genen und ESTs eine mindestens zweifach veränderte Expressionsstärke zwischen Wildtyp und Knockout gefunden. Bei 59 (49,2 %) dieser Gene konnten ein mindestens zweifacher Expressionsunterschied durch quantitative PCR bestätigt werden.

1.6. Gene Ontology (GO)

Die GO-Termini beschreiben ein Gen exakt in seinen Eigenschaften. Jede Eigenschaft besitzt eine festgelegte Zahlenkodierung. So hat z.B. der Terminus "skeletal development" die genaue Kodierung "GO:0001501". Innerhalb der Strukturierung gibt es Hierarchien, so dass spezifische Zuordnungen möglich sind. Das bedeutet, dass bei einer sehr spezifischen Eigenschaft (Funktion), übergeordnet mehrere unspezifische Eigenschaften (Funktionen) zu finden sein können. So hat z.B. M68513 (Ephrin receptor A3) die spezifische molekulare Funktion "transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway (GO:0007169)", sowie die beiden unspezifischeren übergeordneten Funktionen "receptor activity (GO:0004872)" und "protein kinase activity (GO:0004672)".

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Nach einer Affymetrix Gene-Chip-Analyse mit 36.000 Genen, wurden 119 Gene oder ESTs mit mehr als zweifach veränderter Expressionsstärke gefunden. 59 dieser Gene zeigten in der quantitativen Real-Time-PCR eine mindestens zweifach veränderte Expressionsstärke zwischen Wildtyp und *runx2*-Knockout im embryonalen Humerus der Maus.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Expression dieser 59 Gene analysiert werden.

Dazu war es notwendig, die *In-Situ*-Hybridisierung durch den TECAN Genesis Automaten zu etablieren. Mit Hilfe dieses Automaten ist es möglich, innerhalb kurzer Zeit (ca. 23 h) bis zu 48 Objektträger gleichzeitig zu bearbeiten. Dessen Einsatz ermöglicht es, einen hohen Probendurchsatz nicht-radioaktiv, präzise und reproduzierbar zu bearbeiten. Dieses Verfahren ist auch als allgemeine Screeningmethode zur Bestimmung interessanter Expressionsmuster geeignet.

Des Weiteren sollten die Gene, die ein eindeutiges Signal in Knochen und/oder Knorpel aufwiesen, nach GO-Kriterien analysiert, sowie charakterisiert und sinnvoll eingeteilt werden.

Um auf die Ergebnisse schnell zugreifen und um die Expression darstellen zu können, wurde eine Datenbank angelegt.