

Expression einer konstitutiv aktiven Form der Rezeptortyrosinkinase PDGFR α in Osteoblasten

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Anne Mönning

aus

Bonn

Mai 2008

Die vorliegende Arbeit wurde mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn am Institut für Pathologie unter der Leitung von Prof. Dr. Hubert Schorle angefertigt.

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Tag der Promotionsprüfung: 29.08.2008

Erscheinungsjahr: 2008

Erstgutachter: Prof. Dr. Hubert Schorle

Zweitgutachter: Prof. Dr. Dieter O. Fürst

Fachnaher Gutachter: Prof. Dr. Karl-Heinz Scheidtman

Fachangrenzender Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Büttner

Erklärung zur Urheberschaft

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Wörtlich oder indirekt übernommenes Gedankengut wurde als solches kenntlich gemacht. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht wurde.

Anne Mönning, im Mai 2008

Zusammenfassung

Das sekundäre Dickenwachstum des Wirbeltierschädels erfolgt durch desmale Ossifikation und wird durch die Entwicklung der Mesenchymzellen innerhalb der Schädelnähte reguliert. Dabei differenzieren diese Zellen direkt zu Osteoblasten, welche die Bestandteile der Knochenmatrix synthetisieren. Bei einer Dysregulation der Schädelossifikation, kann es zu einer vorzeitigen Verknöcherung einer oder mehrerer Schädelnähte kommen. Diese Abberation wird Kraniosynostose genannt und verhindert das normale Wachstum des Schädels. Obwohl mittlerweile verschiedene Gene mit einer Kraniosynostose in Verbindung gebracht werden können, konnte die Pathogenese der Kraniosynostose bislang noch nicht vollständig geklärt werden. Dies liegt vor allem daran, dass über den normalen molekularbiologischen Mechanismus, der die geordnete Ossifikation des Schädels reguliert, wenig bekannt ist. Deswegen kann die Identifikation weiterer Gene und Signalwege, die bei der desmalen Verknöcherung des Schädels eine Rolle spielen, zum Verständnis dieses Krankheitsbildes beitragen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die während meiner Diplomarbeit hergestellten R26^{hPDGFR α PM}-ES-Zellklone dafür verwendet, um ein transgenes Mausmodell zu generieren, das eine konditionale Expression eines autoaktiven PDGFR α erlaubt. Die gewebsspezifische Expression des autoaktiven PDGFR α in Neuralleistenzellen (NLZ) und ihren Derivaten führte zu einer Kraniosynostose, welche die Sutura frontalis und Sutura coronalis betraf. In verschiedenen *in-vivo* und *in-vitro* Experimenten konnte eine Hyperproliferation der Knochenvorläuferzellen und eine frühzeitige Differenzierung dieser in reife Osteoblasten detektiert werden. Weitere Western-Blot-Analysen demonstrierten eine gesteigerte Aktivierung des PLC γ -Signalweges in Osteoblasten, die den autoaktiven PDGFR α exprimieren. Eine Behandlung der Knochenvorläuferzellen mit einem PLC γ -spezifischen Inhibitor blockierte ihre Differenzierung in Osteoblasten. Obwohl PDGFR α -Sequenzanalysen von Kraniosynostose Patienten keine Rolle von autoaktivierenden PDGFR α -Mutationen in der Pathogenese dieser Krankheit beweisen konnten, wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig eine Funktion des Rezeptors in der Osteogenese von NLZ-abstammenden Osteoblasten durch die Regulation des PLC γ -Signalweges nachgewiesen.

Abstract

The development and growth of the skull is controlled by cranial sutures, which serve as growth centres for osteogenesis by providing a pool of osteoprogenitors. These osteoprogenitors undergo intramembranous ossification by direct differentiation into osteoblasts, which synthesize the components of the extracellular bone matrix. A dysregulation of osteoblast differentiation can lead to premature fusion of sutures resulting in an abnormal skull shape, a disease called craniosynostosis. Although, that several genes could be linked to craniosynostosis, mechanisms regulating cranial suture development remain largely elusive.

Here, we have established transgenic mice conditionally expressing an autoactivated PDGFR α in neural crest cells (NCC) and their derivatives. In these mice, premature fusion of NCC-derived sutures occurs at early postnatal stages. *In-vivo* and *in-vitro* experiments demonstrated enhanced proliferation of osteoprogenitors and accelerated ossification of osteoblasts. Furthermore, in osteoblasts expressing the autoactivated receptor we detected an upregulation of the PLC γ pathway. Treatment of differentiating osteoblasts with a PLC γ -specific inhibitor prevented mineralization of synthesized bone matrix. Although, sequencing analysis of craniosynostosis patients could not reveal a role of autoactivating PDGFR α mutations in human craniosynostosis, we show for the first time an effect of PDGFR α signalling in osteogenesis of NCC-derived osteoblasts by activating the PLC γ pathway.

Inhaltsverzeichnis

Erklärung zur Urheberschaft	I
Zusammenfassung	II
Abstract	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1. PDGF- Familie.....	1
1.2. Rolle des PDGFR α während der frühen Wirbeltierentwicklung	3
1.3. PDGF-Familie als onkogene Faktoren	5
1.4. Abstammung und Bildung der Schädelknochen.....	6
1.5. Kraniosynostose.....	9
1.6. Osteoblastäre Differenzierung in Kultur	10
1.7. Gene-Targeting	13
1.8. Konditionales Gene-Targeting: das Cre/loxP-Rekombinasesystem	15
1.9. ROSA26-Lokus und R26R- Mauslinie	16
1.10. Generierung der R26 ^{hPDGFRαPM} -ES-Zellen	18
1.11. Zielsetzung	22
2. Material	23
2.1. Chemikalien	23
2.1.1. Allgemein	23
2.1.2. Zellkultur.....	25
2.1.3. Radiochemikalien	25
2.2. Geräte	25
2.3. Lösungen, Puffer und Medien.....	27
2.4. Verbrauchsmaterialien	27
2.5. Größenstandards	28
2.6. Kits	28
2.7. Plasmide.....	29
2.8. Oligonukleotide.....	29
2.8.1. Zweitstrangsynthese (RT-PCR)	29
2.8.2.Genotypisierung	30
2.8.3. Sequenzierung.....	30

2.9. Enzyme.....	30
2.9.1. Polymerasen	30
2.9.2. Restriktionsendonukleasen.....	31
2.9.3. Sonstige Enzyme.....	31
2.10. Antikörper.....	31
2.10.1. Primäre Antikörper	31
2.10.2. Sekundäre Antikörper	32
2.11. Bakterien	32
2.12. Mauslinien.....	32
2.13. Zellen	32
3. Methoden.....	33
3.1. Molekularbiologische Methoden	33
3.1.1. Präparation kompetenter Zellen.....	33
3.1.2. Hitzeschock-Transformation von <i>E.coli</i>	33
3.1.3. Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA („Mini-Präp“).....	34
3.1.4. Präparation großer Mengen Plasmid-DNA („Maxi-Präp“).....	35
3.1.5. Restriktionsverdau.....	35
3.1.6. Präparation von Dialyse-Schläuchen	35
3.1.7. Elektroelution von DNA-Fragmenten	36
3.1.8. Phenol-/Chloroform-Extraktion von DNA-Lösungen.....	36
3.1.9. Ethanol-Präzipitation von Nukleinsäuren.....	36
3.1.10. Photometrische Messung	36
3.1.11. Polymerase-Kettenreaktion	37
3.1.12. Herstellung von cDNA	37
3.1.13. Agarosegel-Elektrophorese	38
3.1.14. Sequenzierung von DNA.....	39
3.1.15. Southern-Blot	40
3.1.16. Herstellung radioaktiv markierter Sonden	41
3.1.17. Herstellung einer Sephadex-Säule.....	42
3.1.18. <i>In-vitro</i> Transkription DIG-markierter RNA-Sonden.....	42
3.2. Proteinchemische Methoden	43
3.2.1. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	43
3.2.2. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
3.2.3. Immunoblotanalyse (Western-Blot)	44

3.2.4. Chemilumineszenz-Detektion.....	45
3.2.5. Entfernen von Antikörpern und Reaktionslösung („strippen“)	45
3.3. Tierpräparation und Zellkultur	46
3.3.1. Tierhaltung.....	46
3.3.2. Entnahme von Geweben.....	46
3.3.3. DNA-Isolation aus Schwanzbiopsien der Maus.....	46
3.3.4. Isolierung von primären Knochenzellen aus Mauskalvarien	47
3.3.5. Kultivierung von primären Knochenzellen	48
3.3.6. Zellzahlbestimmung	48
3.3.7. Passagieren der Zellen.....	48
3.3.8. Induktion osteogener Differenzierung	48
3.3.9. Behandlung der Zellen mit U73122.....	49
3.3.10. Fixieren von Zellen.....	49
3.3.11. Isolierung von RNA aus Gewebe und Zellen.....	49
3.3.12. Isolierung von Proteinen aus Zellen.....	50
3.3.13. Cre-Transduktion von ES-Zellen	50
3.4. Histologische und Immunhistochemische Untersuchungen	51
3.4.1. Gewebefixierung.....	51
3.4.2. Entmineralisierung.....	51
3.4.3. Paraffineinbettung	51
3.4.4. Herstellung von Paraffinschnitten	51
3.4.5. Entparaffinierung	52
3.4.6. Hematoxylin Eosin (H/E) Färbung	52
3.4.7. Giemsa-Färbung.....	52
3.4.8. Von-Kossa-Färbung von Zellen	53
3.4.9. Alkalische-Phosphatase-Färbung von Zellen	53
3.4.10. Proliferationsassay.....	54
3.4.11. Apoptose-Assay	54
3.4.12. <i>In-situ</i> Hybridisierung	55
3.4.13. Schädelpräparation.....	57
3.5. Quantitative Auswertung.....	58
4. Ergebnisse	59
4.1. Funktionalitätstest der loxP- Elemente in R26 ^{hPDGFRαPM} -ES-Zellklonen	59
4.2. Generierung der R26 ^{hPDGFRαPM} - Mauslinie.....	60

4.3. Generierung der Wnt1Cre;R26 ^{hPDGFRαPM} - Mauslinie	62
4.4. Morphologie der Wnt1Cre;R26 ^{hPDGFRαPM} - Mäuse	63
4.5. Analyse der NLZ-abstammenden Schädelnähte	64
4.6. Etablierung eines Zellkultursystems	70
4.7. <i>in-vitro</i> -Proliferationsassay	75
4.8. Funktionelle Rolle des autoaktiven PDGFR α in Osteoblastendifferenzierung	76
4.9. Untersuchung des Aktivierungsstatus PDGFR α -assoziierter Signalwege mittels Western-Blot-Analyse	80
4.10. Hemmung des PLC γ -Signalweges in Osteoblasten	82
4.11. Sequenzanalyse des PDGFR α in Kraniosynostose Patienten	83
5. Diskussion	86
5.1. Rolle des PDGFR α in der Entwicklung kranialer Neuralleistenzellen	86
5.2. Funktion von PDGF in der Knochenentwicklung	88
5.3. Biphasischer Effekt von PDGFR α in Osteoblasten	89
5.4. ALP2 und Stoffwechselaktivität	91
5.5. Der transkriptionelle Repressor Msx2	92
5.6. MAPK-Signalweg in Osteoblasten	93
5.7. PDGFR α -Sequenzanalyse	94
5.8. Molekulare Mechanismen der PDGFR α -abhängigen Schädelossifikation	94
6. Ausblick	97
7. Literaturverzeichnis	102
8. Abkürzungsverzeichnis	118
Danksagung	121
Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis

Einleitung

Abb. 1.1. Mechanismus einer Rezeptortyrosinkinase Typ III (PDGFR α/β).....	2
Abb. 1.2. Interaktionen zwischen PDGF-Dimeren und PDGF-Rezeptoren.	3
Abb. 1.3. Die entwicklungsbiologische Abstammung der Schädelknochen	8
Abb. 1.4. Formen der Kraniosynostose.....	9
Abb. 1.5. Gene-Targeting-Schema.....	14
Abb. 1.6. Struktur eines loxP-Elements.	16
Abb. 1.7. Der Genfallenvektor ROSA β geo.....	17
Abb. 1.8. X-gal-Färbung von Mausembryonen (E 9).....	18
Abb. 1.9. Schematische Darstellung des Targeting-Vektors RPP	19
Abb. 1.10. Schematische Darstellung der Generierung von R26 ^{hPDGFRαPM} -ES-Zellen und Southern-Blot-Strategie	20
Abb. 1.11. Nachweis der homologen Rekombination mittels Southern-Blot-Analyse	21
Abb. 1.12. Schema des konditionalen Gene-Targeting mit Hilfe des Plasmids RPP..	21

Ergebnisse

Abb. 4.1. Aufbau des HTN-Cre-Fusionsproteins und Southern-Blot-Strategie nach Cre-Transduktion	59
Abb. 4.2. Nachweis der Funktionalität der loxP-Elemente mittels Southern-Blot- Analyse.....	60
Abb. 4.3. Chimären nach Blastozysteninjektion.....	61
Abb. 4.4. Schema der 3-Primer-PCR.....	61
Abb. 4.5. Ergebnis der 3-Primer-PCR nach Auftrennung im Agarosegel... ..	62
Abb. 4.6. Verpaarungsschema zur Generierung einer Wnt1Cre;R26 ^{hPDGFRαPM} Mauslinie und Mögliche Genotypen der Nachkommen.....	63
Abb. 4.7. Morphologie der Wnt1Cre;R26 ^{hPDGFRαPM} -Maus.....	64
Abb. 4.8. Alizarin-Rot- und Alzian-Blau-Färbung von Schädelpräparationen.....	65
Abb. 4.9. Histologische Untersuchungen der Sutura frontalis.....	67
Abb. 4.10. Histologische Untersuchungen der Sutura coronalis.	68
Abb. 4.11. Giemsa-Färbung.	69
Abb. 4.12. Effekt des autoaktiven PDGFR α auf die Proliferation von Knochenvorläuferzellen.	70

Abb. 4.13. Effekt des autoaktiven PDGFR α auf die Apoptose.	70
Abb. 4.14. Schematische Darstellung der Mauskalvarien.	71
Abb. 4.15. X-Gal-Färbung primärer Zellen.	72
Abb. 4.16. Veränderung der Zellmorphologie während der Differenzierung der Mesenchymzellen zu Osteoblasten	72
Abb. 4.17. RT-PCR zum Nachweis osteoblastärer Marker.....	73
Abb. 4.18. Kontrolle der Differenzierungsspezifität der primären Zellen aus Mauskalvarien.	74
Abb. 4.19. <i>in-vitro</i> -Proliferationsassay.	75
Abb. 4.20. Einfluss des autoaktiven PDGFR α auf Differenzierungsprozess der Osteoblasten.	77
Abb. 4.21. Ermittlung der Expressionsprofile verschiedener Marker mittels RT-PCR.....	78
Abb. 4.22. <i>in-situ</i> -Hybridisierung von Mauskalvarien.	80
Abb. 4.23. Western-Blot-Analyse der Osteoblasten.	81
Abb. 4.24. Inhibition des PLC γ -Signalweges in Osteoblasten.....	83
Abb. 4.25. Basenpaarsubstitution im Exon 10 des PDGFR α	84

Diskussion

Abb. 5.1. Schematische Darstellung der PDGFR α -abhängigen molekularen Mechanismen in der Differenzierung von Osteoblasten.	96
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabellenverzeichnis

Einleitung

Tabelle 1.1. Expressionsspektrum der PDGF-Familie in der Wirbeltierentwicklung am Beispiel der Maus.....	4
Tabelle 1.2. Auswahl einiger osteoblastärer Marker und ihr Expressionsmuster in den verschiedenen Differenzierungsphasen von Mesenchymzellen zu reifen Osteoblasten.....	12

1. Einleitung

1.1. PDGF- Familie

In einer 1974 durchgeführten Studie konnten Blutplättchen als Reservoir für ein hoch wirksames Mitogen identifiziert werden (Ross et al., 1974). In dieser Studie zeigten glatte Muskelzellen, die *in-vitro* mit Blutserum kultiviert wurden, eine erhöhte Wachstumsrate, während Zellen, die lediglich mit Blutplasma behandelt wurden, eine dazu verminderte Wachstumsrate aufwiesen. Fügt man dem Plasma aufgereinigte Blutplättchen hinzu, stieg die Wachstumsrate auf das Level, welches mit dem Serum erreicht wurde. Dieses Ergebnis zeigte, dass die Blutplättchen einen mitogenen Faktor produzieren, der entsprechend seinem Vorkommen „platelet -derived growth factor“ (PDGF) genannt wurde.

Bis heute sind insgesamt vier verschiedene Polypeptide (PDGFA-D) bekannt, welche die Aktivität zwei nah verwandter Rezeptortyrosinkinasen (RTK) Typ III (PDGFR α , PDGFR β) regulieren. Dabei bilden die Polypeptide über zwei Disulfidbrücken jeweils Homodimere. PDGFA und B können sich zudem zu Heterodimeren zusammenlagern (Heldin and Westermark, 1999). Die fünf Isoformen binden mit unterschiedlicher Affinität an die „platelet-derived growth factor receptor“ (PDGFR) Untereinheiten. Die Rezeptoren sind durch eine extrazelluläre Domäne, die aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Wiederholungen besteht, einer einzigen hydrophoben Transmembran- α -Helix und einer zytosolischen Domäne mit der Aktivität einer tyrosinspezifischen Proteinkinase charakterisiert. Nach Bindung eines dimeren PDGF-Liganden kommt es zur Dimerisierung und Autophosphorylierung der Rezeptoren (Bishayee et al., 1989; Eriksson et al., 1992), d.h. jede der auf den Monomeren befindlichen Proteinkinasen phosphoryliert spezifische Tyrosinreste innerhalb der cytosolischen Domäne des jeweiligen Dimerpartners (Abb.1.1.). Die entstehenden Phosphotyrosinreste dienen als Bindestellen für weitere Proteine (Adapterproteine), die an der Signalübertragung beteiligt sind. Die aktivierten RTKs übertragen ihr Signal durch eine Signal-Kaskade auf Substratproteine. Auf diese Weise werden zelluläre Mechanismen wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Adhäsion reguliert. Im speziellen Fall von PDGFR α werden hauptsächlich der MAPK (engl. mitogen-activated protein)-, PI3K (Phosphatidylinositol-3-kinase)- und PLC (Phospholipase

C) γ - Signalweg aktiviert (Bazenet et al., 1996; Eriksson et al., 1995; Klinghoffer et al., 1996; Valius et al., 1993; Yu et al., 2000).

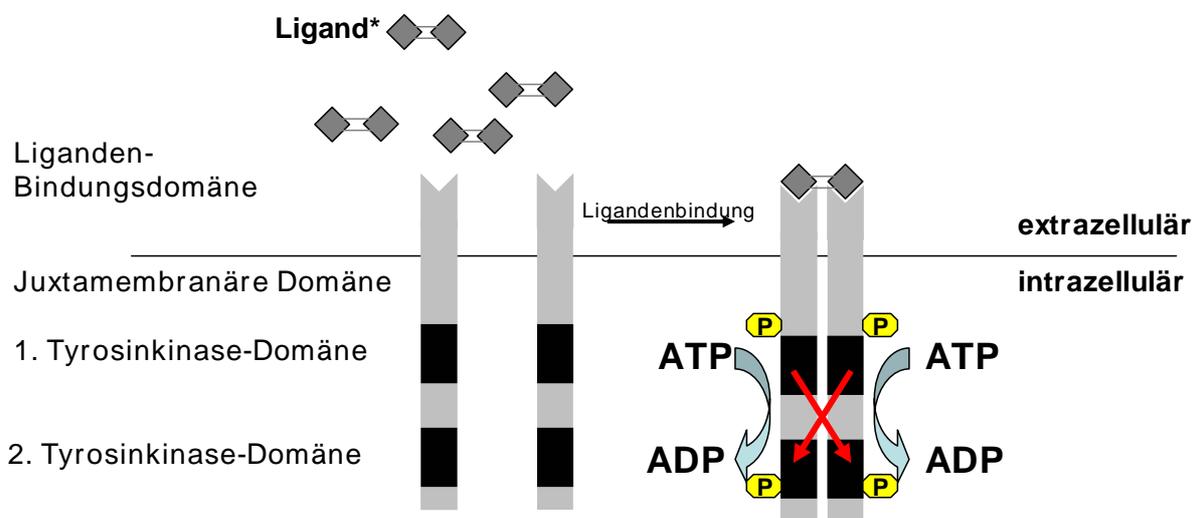


Abb. 1.1. Mechanismus einer Rezeptortyrosinkinase Typ III (PDGFR α/β)

* = PDGFAA, PDGFBB, PDGFCC, PDGFDD oder PDGFAB

Die katalytische Aktivität der RTK wird durch verschiedene Kontrollmechanismen sehr stringent reguliert, wodurch eine Spezifität der einzelnen RTK erreicht wird. Hierzu tragen die zellspezifische Expression der Rezeptoruntereinheiten bzw. der Liganden, die Aktivierung individueller Signalwege sowie ein Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Zielproteinen bei (Fletcher, 2004; Heinrich et al., 2002). Weiterhin wird die katalytische Aktivität durch die juxtamembranäre Domäne gesteuert (Chan et al., 2003; Hubbard, 2004; Mol et al., 2004; Roskoski, 2005), die im inaktiven Zustand des Rezeptors durch ihre Konformation die ligandenunabhängige Dimerisierung sterisch verhindert. Auch die verschiedenen Interaktionsmöglichkeiten zwischen den PDGF-Dimeren und den Rezeptor-Untereinheiten tragen zu einer Spezifität bei (Abb. 1.2.). Alle PDGF-Dimere, ausgenommen PDGF-DD, homodimerisieren PDGFR α -Untereinheiten (PDGFR α/α). Im Gegensatz dazu vermitteln nur PDGF-BB und PDGF-DD die Homodimerisierung von PDGFR β (PDGFR β/β). Zu einer Heterodimerisierung (PDGFR α/β) kommt es, wenn eine der PDGF-Isoformen außer PDGF-AA gebunden wird.

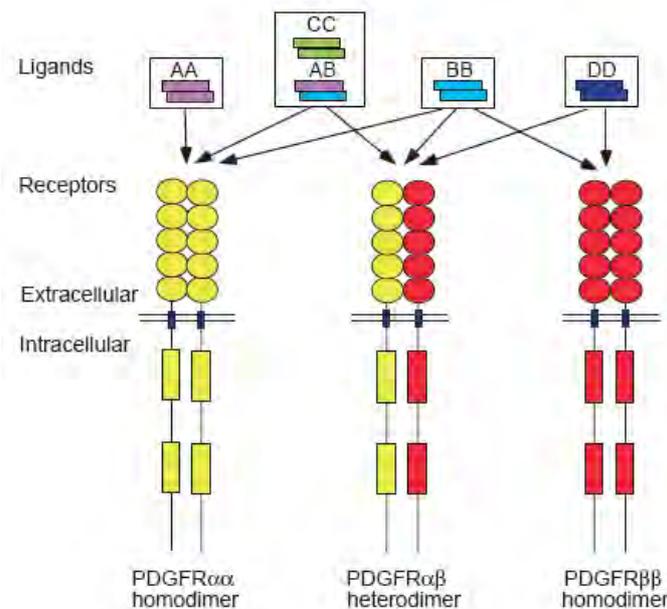


Abb. 1.2. Interaktionen zwischen PDGF-Dimeren und PDGF-Rezeptoren.

Die möglichen Bindemöglichkeiten der fünf PDGF-Dimere sind durch Pfeile zu dem jeweiligen Rezeptor-Dimer symbolisiert (aus Hoch R.V. and Soriano P., 2003).

1.2. Rolle des PDGFR α während der frühen Wirbeltierentwicklung

Die Mitglieder der PDGF-Familie werden während der frühen Wirbeltierentwicklung breit gefächert exprimiert und spielen daher eine wichtige Rolle in der Embryogenese. Dabei sind PDGF-B und PDGFR β essentiell für die Entwicklung des Vaskularsystems, während PDGF-A und PDGFR α ein breiteres Expressionsspektrum aufweisen und eine wichtige Rolle bei der Bildung des zentralen Nervensystems, der Neuralleiste und verschiedener Organe spielen. Tabelle 1.1. gibt einen Überblick über die Expression der PDGF-Liganden und -Rezeptoren während der Entwicklung der Wirbeltiere am Beispiel der Maus.

Die Rolle des PDGFR α in der Mausentwicklung wurde intensiv anhand der durch Spontanmutation entstandenen patch (Ph)-Mutante untersucht, die auf Grund einer extensiven Deletion von Chromosom 5 durch das Fehlen des PDGFR α charakterisiert ist (Smith et al., 1991; Stephenson et al., 1991). Heterozygote Ph/+ Mäuse weisen einen Defekt in der Melanozyten-Wanderung auf, welcher sich in einem weiß gefleckten Fell widerspiegelt. Homozygote Ph/Ph-Mäuse sind embryonal-letal. Die Embryonen weisen Defekte in der Entwicklung der Lunge, des Kardiovaskularsystems, des Neuralrohrs und der kranialen Neuralleiste auf und entwickeln dadurch z.B. ein erweitertes Perikard, eine Spina bifida und eine

Gaumenspalte (Morrison-Graham et al., 1992; Orr-Urtreger et al., 1992; Payne et al., 1997; Schatteman et al., 1992; Sun et al., 2000).

Tissue/cell type	Mouse	Tissue/cell type	Mouse
Hematopoietic and vascular cells	PDGFB -vascular endothelium PDGFC - vascular smooth muscle cells PDGFD - fibroblastic adventitia PDGFRβ -vascular mural cells	Neural crest and neural crest migration route	PDGFA,C - surface ectoderm PDGFRα - subset of non-neuronal cardiac and cranial neural crest
Lung	PDGFA -lung epithelium PDGFC - trachea, lung epithelium and mesenchyme, bronchial smooth muscle PDGFRα - lung mesenchyme	Somites	PDGFA,C - myotome PDGFRα - throughout early somites, then restricted to sclerotome, dermatome
Gonads	PDGFA - testis cords PDGFB - endothelial cells, late embryogenesis testis cords and Leydig cells PDGFC - mesonephros/testis border PDGFRα/β - interstitial cells PDGFRβ - perimyoid cells	Gut	PDGFA,C - intestinal epithelium PDGFC - smooth muscle layers PDGFRα - mesenchyme, including villus clusters
Nervous system	PDGFA - neurons, astrocytes PDGFC - ventral horn of spinal cord, floor plate, olfactory placode and epithelium PDGFRα - astrocytes, oligodendrocyte precursors, subset of developing neurons PDGFb, PDGFRβ - postnatal neurons	Kidney	PDGFA - early nephron epithelium, Henle's loop PDGFB - glomerular capillary endothelium, nephron epithelium (?) PDGFC - metanephric mesenchyme, early nephron epithelium PDGFD - fibrous capsule around kidney PDGFRα - mesenchyme PDGFRβ - metanephric mesenchyme, glomerular mesangial/endothelial precursors

Tabelle 1.1. Expressionsspektrum der PDGF-Familie in der Wirbeltierentwicklung am Beispiel der Maus (verändert nach Hoch R.V. und Soriano P., 2003).

Die veränderten Strukturen spiegeln dabei das natürliche Expressionsmuster des Rezeptors wider. Eine gezielter Mutation des PDGFR α entspricht weitgehend dem Phänotyp der Ph/Ph-Mutanten, besonders im Bezug auf die Defekte im Kopfbereich (Soriano, 1997). Dieses Ergebnis weist auf eine essentielle Funktion des PDGFR α in der embryonalen Entwicklung des kranialen Mesenchyms hin. Die frühe embryonale Letalität und das breite Expressionsspektrum des PDGFR α während der Embryogenese erschweren jedoch eine intensive Untersuchung der Funktion des Rezeptors in der kranialen Neuralleiste. Mit Hilfe eines konditionalen PDGFR α -knock-out (PDGFR $\alpha^{fl/fl}$)-Mausmodells konnte im Jahr 2003 die spezifische Rolle des

PDGFR α in Neuralleistenzellen untersucht werden. Dafür wurden die PDGFR $\alpha^{fl/fl}$ -Mäuse mit einer Wnt1Cre-Mauslinie verpaart, die spezifisch in den Neuralleistenzellen die Cre-Rekombinase exprimiert (Tallquist and Soriano, 2003). Diese Mäuse zeigten neben Defekten im Aortabogen eine Gaumenspalte und wiesen eine unvollständige Verknöcherung der Schädelknochen auf, die von Neuralleistenzellen abstammen. Daraus lässt sich schließen, dass PDGFR α bei der Entwicklung von kraniofacialen Strukturen eine wichtige Rolle spielt.

1.3. PDGF-Familie als onkogene Faktoren

Als Wachstumsfaktoren und –rezeptoren gehört die PDGF-Familie zu den Protoonkogenen, die an der Entstehung verschiedener Tumore beteiligt ist. Es sind mehrere Mechanismen bekannt, in denen die Liganden bzw. Rezeptoren eine pathogenetische Rolle spielen:

Durch *chromosomale Translokationen* können überexprimierte Fusionsgene entstehen. Der mesenchymale Tumor DFSP (Dermatofibrosarcoma protuberans) ist z.B. durch eine Translokation zwischen den Chromosomenabschnitten 17q22 und 22q13 gekennzeichnet (Pedeutour et al., 1996; Simon et al., 1997). In dieser Region liegen die Gene COL1A1 (Collagen Typ 1A1) bzw. PDGFB. Es entsteht das Fusionsprotein COL1A1/PDGFB, das die gleiche Funktion wie PDGF besitzt. Durch autokrine Mechanismen wirkt es als kontinuierlicher Proliferationsstimulus auf DFSP-Zellen. Im MPS (myeloproliferatives Syndrom) findet man konstitutiv aktivierte Fusionsproteine mit Tyrosinkinaseaktivität. Ein Beispiel ist das TEL-PDGFR β Fusionsprotein in Patienten mit CMML (chronische myelomonozytäre Leukämie). Dieses Protein entsteht durch eine Translokation (t(5;12)), wodurch die Kinase-Domäne des PDGFR β mit der Dimerisierungsdomäne des Transkriptionsfaktors TEL fusioniert (Carroll et al., 1996; Sjoblom et al., 1999). Auf diese Art und Weise kommt es zu einer liganden-unabhängigen Dimerisierung der Rezeptoren und damit zur konstitutiven Rezeptoraktivierung.

In bestimmten Neoplasien, wie z.B. dem Glioblastom und Sarkomen der Aorta, konnten *Amplifikationen* von PDGFR-Genen nachgewiesen werden. So ist im Glioblastom das PDGFR α -Gen amplifiziert, wodurch es zu einer Überexpression des Proteins kommt (Fleming et al., 1992).

Eine pathogenetische Rolle spielen „*gain-of-function*“-Mutationen im PDGFR α -Gen bei der Entstehung von Gastrointestinalen Stromatumoren (GISTs). Hauptsächlich sind diese Mutationen im Exon 18 (Tyrosinkinasedomäne), seltener im Exon 12 (juxtamembranäre Domäne) lokalisiert (Heinrich et al., 2003; Hirota et al., 2001; Hirota et al., 2003; Lasota et al., 2004; Medeiros et al., 2004).

Krankheiten, bei denen es aus verschiedenen Gründen zu einer autoaktivierten Tyrosinkinase kommt, können in den meisten Fällen durch den synthetischen Wirkstoff Imatinib (STI571) behandelt werden. Der Wirkmechanismus von Imatinib besteht in der kompetitiven und selektiven Blockade der ATP-Bindungsstelle spezifischer Tyrosinkinasen, wie z. B. PDGF-Rezeptoren, wodurch die Übertragung eines Phosphatrestes auf das Substrat verhindert wird (Druker and Lydon, 2000). Die Ansprechrate auf das Medikament ist jedoch von Fall zu Fall unterschiedlich und scheint z.B. abhängig von der Lokalisation der Mutation zu sein. So sind in GISTs PDGFR α -Mutationen im Exon 12 sensitiver für Imatinib als im Exon 18 (Corless et al., 2005; Heinrich et al., 2003). Im seltenen Fall gibt es sogar Mutationen, die resistent für eine Imatinib-Behandlung sind, so z.B. in GISTs die Punktmutation D842V im PDGFR α (Coreless et al., 2005). In anderen Fällen können auch sekundär Resistenzmechanismen erworben werden, wenn es durch eine weitere Mutation zu einer Konformationsänderung der enzymatischen Domäne des Rezeptors kommt und dadurch die Affinität zwischen Imatinib und Rezeptor abnimmt (Chen et al., 2004).

1.4. Abstammung und Bildung der Schädelknochen

Die Entwicklung der Wirbeltiere ging mit der Bildung des Schädels einher. Anatomisch unterscheidet man bei den Säugetieren zwischen dem Hirnschädel (Neurocranium) und dem Gesichtsschädel (Viscerocranium), die sich im Bereich der Nasenwurzel, des oberen Randes der Augenhöhlen und der äußeren Gehörgänge abgrenzen. Dabei bildet sich das Knochengewebe aus zwei verschiedenen Geweben mesenchymalen Ursprungs, dem Mesoderm und der Neuralleiste. Schon früh konnte durch Analysen von Wachtel-Huhn-Chimären (quail-chick Chimären) das Viscerocranium in Vögeln der Neuralleiste als Ursprungsgewebe zugeordnet werden (Le Douarin and Kalcheim, 1999). Bei dieser Strategie macht man sich zunutze, dass Wachtelzellen einen Kernmarker besitzen, der sich von Hühnerzellen unterscheidet.

Daher kann man nach der Transplantation eines Neuralrohres von einem Wachtelembryo auf einen Hühnerembryo die Migration der Neuralleistenzellen untersuchen. Durch die eingeschränkten technischen Möglichkeiten mit derartigen Chimären gestalteten sich jedoch Langzeitstudien als schwierig, zudem die Anatomie eines Vogelschädels von der eines Säugetieres zum Teil abweicht. Zudem wurden Ergebnisse von Studien an Wachtel-Küken-Chimären unterschiedlich interpretiert. Eine Gruppe von Wissenschaftlern vermutete, das Neurocranium stammt aus einem gemischten Pool von Zellen aus Mesoderm und Neuralleiste ab, wobei eine andere Gruppe aus ihren Studien einen uniformen Ursprung des Neurocraniums aus der Neuralleiste postulierte (Couly et al., 1993; Noden, 1988). Erst die Analyse von Mausembryonen konnte einen klaren entwicklungsbiologischen Überblick geben. Es wurde eine transgene Mauslinie generiert (Wnt1Cre/R26R), die sowohl die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Wnt1-Promotors exprimiert, als auch die konditionale Expression eines β -Galaktosidase-Gens unter der Kontrolle eines ubiquitären Promotors ermöglicht (Jiang et al., 2002). Da die Cre-Rekombinase in diesen Mäusen nur in der Neuralleiste und deren Derivaten exprimiert wird, gelang durch eine X-Gal-Färbung der Mausembryonen eine Differenzierung zwischen den Schädelementen mit Ursprung in der Neuralleiste bzw. dem Mesoderm. Das Ergebnis ist in Abbildung 1.3. zusammengefasst und auf den Menschen übertragen. Die Experimente mit den Wnt1Cre/R26R-Mäusen konnten die Ergebnisse der Analysen der Wachtel-Küken-Chimären im Bezug auf die Abstammung des Viscerocraniums von der Neuralleiste bestätigen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass im Bereich des Neurocraniums die Stirnknochen (Ossa frontale) von der Neuralleiste abstammen, wobei das Scheitelbein (Os parietale) und das Hinterhauptsbein (Os occipitale) mesodermalen Ursprungs sind.

Während die langen Röhrenknochen des Rumpfes und der Extremitäten aus einer chondralen Ossifikation hervorgehen, entwickeln sich die Geflechtknochen des Schädels mit wenigen Ausnahmen durch desmale Ossifikation (Hall, 1999). Dabei differenzieren die Mesenchymzellen zu Präosteoblasten, die zu Osteoblasten ausreifen und die Bestandteile der Knochenmatrix synthetisieren. Die zunächst unverkalkte Knochensubstanz (Osteoid) mineralisiert anschließend durch die Einlagerung von Kalziumapatit, das den Hauptbestandteil ausgereifter Knochen bildet. Während der Embryonalentwicklung geht das Knochenwachstum im Schädel

von so genannten Verknöcherungspunkten strahlenartig nach allen Seiten aus. Dabei verbleiben bei der Geburt zwischen den einzelnen Knochen noch größere bindegewebige Areale, die als Fontanellen bezeichnet werden. Durch das weitere Wachstum der Knochen werden diese Areale kleiner und es bilden sich zwischen den Knochen die so genannten Schädelnähte (Suturae). Die wichtigsten Schädelnähte sind in Abbildung 1.3.B. markiert.

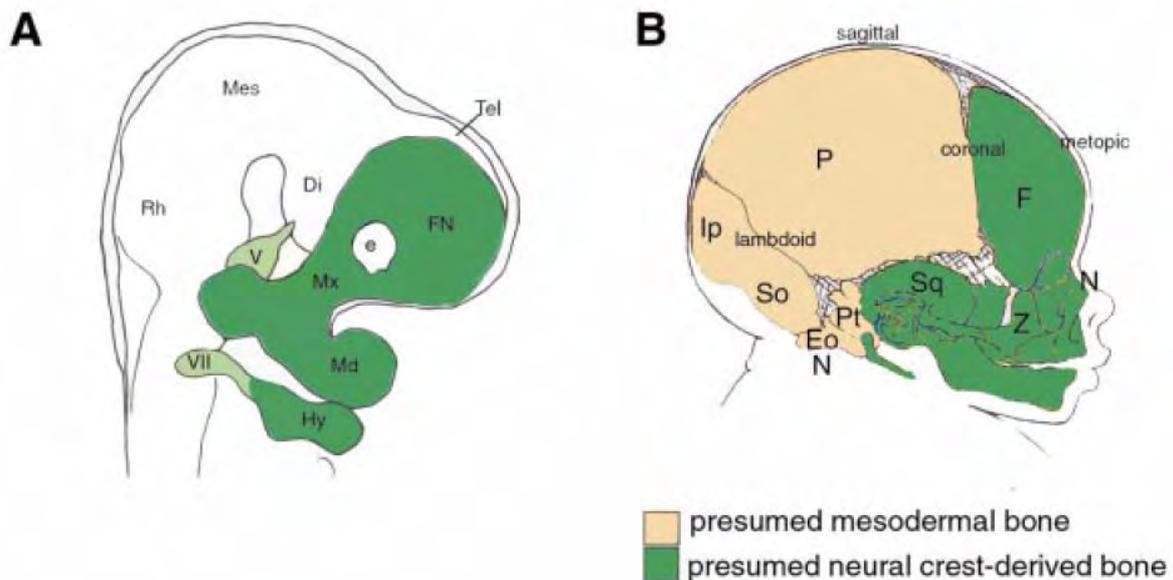


Abb. 1.3. Die entwicklungsbiologische Abstammung der Schädelknochen. (A) Schema vom Kopfbereich eines Mausembryos (E 9). (B) Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen. Gewebe mit Abstammung von der Neuralleiste ist grün, Gewebe mesodermalen Ursprungs ist beige gekennzeichnet (aus Morris-Kay G.M. 2001). Coronal = Sutura coronalis; Eo = Exoccipital; Hy = Os hyoideum; F = Os frontale; FN = frontal-nasal Mesenchym; Ip = Os occipitale; lamboid = Sutura lamboidea; Md = Mandibula; metopic = Sutura metopica; Mx = Maxilla; N = Os nasale; P = Os parietale; PT = Pars petrosa, Teil vom Os temporale; sagittal = Sutura sagittalis; So = Supraoccipital; Sq = Pars squamosa, Teil vom Os temporale; Z = Os zygomaticum; V = Ganglion trigeminale; VII = Ganglion geniculi.

Dabei verhält es sich bei der Abstammung der Schädelnähte wie bei den Schädelknochen. Das Mesenchym der Sutura frontalis (oder metopica) ist ein Derivat der Neuralleiste, während das Mesenchym der Sutura sagittalis vom Mesoderm abstammt. Ein Sonderfall ist die Sutura coronalis. Da sie zwischen zwei Knochen mit unterschiedlicher Abstammung liegt, besteht sie aus einem gemischten Pool von Mesenchymzellen mit Ursprung aus der Neuralleiste und aus dem Mesoderm (Jiang et al., 2002).

Aus dem in den Schädelnähten liegenden Bindegewebe geht das sekundäre Dickenwachstum des Schädels hervor. Erst wenn alle Schädelnähte durch Ossifikation fusioniert sind, ist das Schädelwachstum abgeschlossen. Im Allgemeinen verschließen sich die Schädelnähte beim Menschen erst zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr. Eine Ausnahme bildet die Sutura frontalis, die schon während des 1.-2. Lebensjahres verknöchert. Bei Mäusen hingegen fusioniert die Sutura frontalis schon innerhalb der ersten 45 Tage, wohingegen alle anderen Schädelnähte patent bleiben (Moss, 1958; Warren et al., 2001).

1.5. Kraniosynostose

Bei einer Dysregulation der Schädelossifikation kann es zu einer vorzeitigen Verknöcherung einer oder mehrerer Schädelnähte kommen. Man spricht dann von einer Kraniosynostose, die mit einer Gesamthäufigkeit von 1:2000 auftritt (Cohen, 1988). Bei einer Kraniosynostose ist das normale Wachstum des Schädels nicht möglich und es kommt zu einem kompensatorischen Wachstum, durch das es zu Schäfeldysmorphien kommt. Je nachdem welche Schädelnaht betroffen ist, unterscheidet man fünf Formen der Dismorphie: Skaphozephalus (Kahnschädel), Brachyzephalus (Kurzschädel), Oxyzephalus (Turmschädel), Plagiozephalus (Schiefschädel) und Trigonozephalus (Dreiecksschädel) (Abb. 1.4.).

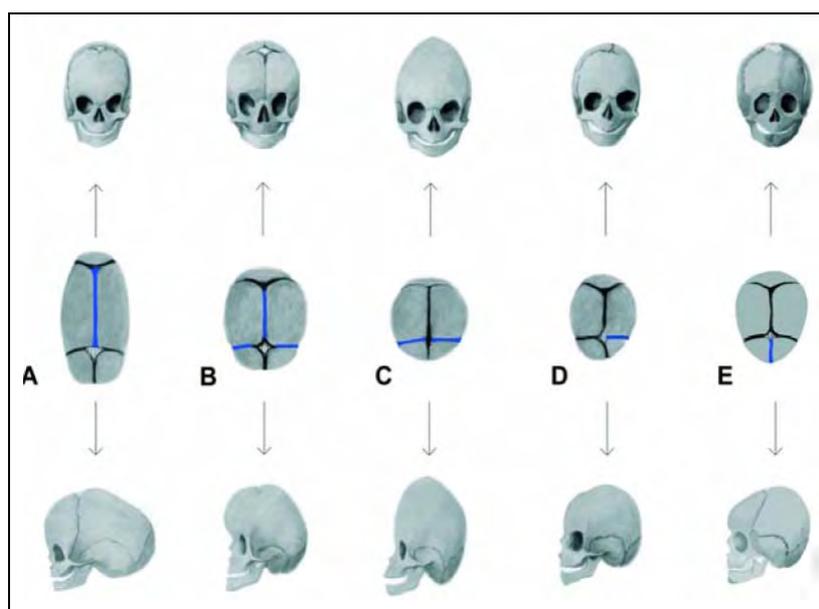


Abb. 1.4.

Formen der Kraniosynostose.

(A) Skaphozephalus

(B) Brachyzephalus

(C) Oxyzephalus

(D) Plagiozephalus

(E) Trigonozephalus

Blau kennzeichnet die frühzeitig verknöcherte/n Schädelnaht bzw. Schädelnähte.

(Nitsche et al., 2003)

Durch den entstehenden Hirninnendruck kann es zu Entwicklungsschäden kommen. Daher ist eine operative Korrektur erforderlich. Oftmals ist die Kraniosynostose

angeboren und tritt isoliert auf. In mehr als 150 genetisch bedingten Syndromen ist sie jedoch zusätzlich als Teilsymptom zu beobachten (Cohen, 1995). In den meisten Fällen konnte die mit einem Syndrom assoziierte Kraniosynostose mit einer Mutation in den „fibroblast growth factor receptors 1-3“ (*FGFR1-3*) in Verbindung gebracht werden, bei denen es sich um Rezeptortyrosinkinasen vom Typ III handelt. Die Mutationen führen in jedem Fall zu einem konstitutiv aktiven Rezeptor und sind in der Pathogenese des Apert-, Crouzon-, Pfeiffer- und Jackson-Weiss-Syndroms involviert (Jabs et al., 1994; Lomri et al., 1998; Mansukhani et al., 2000; Muenke et al., 1997). Weitere Gene die an der Entstehung von Kraniosynostose beteiligt sind, sind die beiden Transkriptionsfaktoren *MSX2* und *TWIST*, die in der Boston-Typ Kraniosynostose bzw. dem Saethre-Chotzen Syndrom eine Mutation aufweisen (el Ghouzzi et al., 1997; Howard et al., 1997; Jabs et al., 1993; Liu et al., 1999; Ma et al., 1996). Während die *MSX2*-bedingte Kraniosynostose lediglich innerhalb einer Familie nachgewiesen werden konnte, sind 20% der klinischen Fälle mit Mutationen in *FGFR1-3* und *TWIST* assoziiert (Wilkie and Morriss-Kay, 2001). Obwohl mittlerweile verschiedene Gene mit einer Kraniosynostose in Verbindung gebracht werden können, konnte die Pathogenese der Kraniosynostose bislang noch nicht vollständig geklärt werden. Dies liegt vor allem daran, dass über den normalen molekularbiologischen Mechanismus, der die geordnete Ossifikation des Schädels reguliert, wenig bekannt ist. Deswegen kann die Identifikation weiterer Gene und Signalwege, die bei der desmalen Verknöcherung des Schädels eine Rolle spielen, zum Verständnis dieses Krankheitsbildes beitragen.

1.6. Osteoblastäre Differenzierung in Kultur

Osteoblasten sind knochenbildende Zellen, die sich aus undifferenzierten Mesenchymzellen entwickeln. Der komplexe Prozess der osteoblastären Differenzierung wurde intensiv mit Hilfe von Zellkulturmodellen untersucht. Schon früh gelang es, aus Ratten- und Mauskalvarien primäre Osteoblasten zu gewinnen und in Kultur zu nehmen (Bhargava et al., 1988; Ecarot-Charrier et al., 1983; Nefussi et al., 1985). Dabei stellte man fest, dass Osteoblasten auch *in-vitro* in der Lage sind, in Anwesenheit von Vitamin C und β -Glycerophosphat zu reifen Osteoblasten zu differenzieren, die die Bestandteile einer mineralisierten Matrix synthetisieren. Dabei spielt Vitamin C eine wichtige Rolle bei der Synthese von Kollagenen und der

Induktion von Knochen-spezifischen Markern, wobei β -Glycerophosphat nach der Degradation zu anorganischem Phosphat essentiell für die Bildung von Kalziumapatit ist (Bellows et al., 1992; Franceschi, 1992; Franceschi and Iyer, 1992).

Weitere Studien belegten eine sequentielle Differenzierung der Osteoblasten, die durch drei Phasen charakterisiert werden kann: Proliferation, Matrixmaturation und Mineralisation. Dieses Osteoblastendifferenzierungsmodell resultierte hauptsächlich aus Untersuchungen an primären Osteoblasten, die aus Rattenkalvarien isoliert wurden (Owen et al., 1990) und konnte nicht nur in Mäuseosteoblasten (Quarles et al., 1992), sondern auch in Hühnerosteoblasten (Gerstenfeld et al., 1987) und in verschiedenen *in-vivo*-Systemen bestätigt werden (Mundlos, 1994).

Die verschiedenen Reifungsstufen innerhalb des Differenzierungsprozesses sind durch die Expression verschiedener osteoblastärer Marker determiniert, bei denen es sich entweder um Strukturproteine des Osteoids oder um Enzyme und Signalmoleküle handelt, die verschiedene Auf- und Abbauprozesse im Knochenstoffwechsel koordinieren. Bei den Strukturproteinen unterscheidet man zwischen kollagenen und nicht-kollagenen Proteinen. Dabei machen die kollagenen Bestandteile, die hauptsächlich aus tripelhelikalen Kollagenfibrillen bestehen, etwa 90-95% des Osteoids aus und übernehmen mechanische Aufgaben (Collin et al., 1992; McKee and Nanci, 1996; Nefussi et al., 1997). Zu den nicht-kollagenen Bestandteilen gehören Osteocalcin, Osteonectin, Bone sialoprotein 2 (Bsp2), Osteopontin und Fibronectin (Anselme, 2000). Ihnen werden besonders integrative Aufgaben zugeschrieben, da sie Bindungsmotive für andere Matrixproteine, Zellen und Kalziumapatit aufweisen (Malaval et al., 1994; McKee and Nanci, 1996). Zu den wichtigsten Enzymen gehört die alkalische Phosphatase 2 (ALP2), die den Prozess der Matrixkalzifizierung katalysiert und deren Nachweis häufig mit dem osteogenen Potential von Zellen gleichgesetzt wird (Halvorsen et al., 2001; Kuznetsov et al., 2001; Pittenger et al., 1999). Zu den für die Osteogenese essentiellen Transkriptionsfaktoren gehört Runx2, auch als CBFA1, OSF2 und AML-3 bekannt. Der Schädel Runx2-defizienter Mäuse besteht nur aus einer dünnen Bindegewebsschicht, da es zu einem Verlust der Differenzierung von Mesenchymzellen zu Osteoblasten kommt. Auch der enchondrale Knochen des restlichen Skeletts fehlt komplett (Komori et al., 1997; Otto et al., 1997).

	Mesenchymzelle 	Präosteoblast 	Osteoblast 
ALP2	-	-/+	+
Bsp2	-	-	+
Kollagen-1	-	+	+
Msx1	+	+	-
Msx2	+	+	-
Osteoclastin	-	-	+
Osteopontin	+	+	+
Runx2	+	+	+
TWIST	+	+	-

Tabelle 1.2. Auswahl einiger osteoblastärer Marker und ihr Expressionsmuster in den verschiedenen Differenzierungsphasen von Mesenchymzellen zu reifen Osteoblasten. (basierend auf (Aubin, 1998; Liu et al., 2003); Abb. aus (Kobayashi and Kronenberg, 2005)).

Da die Expression der verschiedenen osteoblastären Marker spezifisch für ein entsprechendes Reifestadium ist, lässt sich der Differenzierungsprozess von Osteoblasten durch den Nachweis dieser Marker charakterisieren. Tabelle 1.2. zeigt eine Auswahl verschiedener Marker mit dem jeweiligen Expressionsmuster während der Differenzierung. Um Osteoblasten zu identifizieren, die sich in der Mineralisationsphase befinden, wird als Standardnachweis eine histologische von-Kossa-Färbung durchgeführt, die den Kalknachweis in der extrazellulären Matrix ermöglicht (Chaplin and Grace, 1975).

Da sich nicht alle Zellen während der osteoblastären Differenzierung im selben Reifestadium befinden, gibt eine solche Analyse einen Überblick des Reifegrades einer Gesamtkultur, nicht aber einer Einzelzelle.

1.7. Gene-Targeting

Unter Gene-Targeting versteht man die gezielte Modifikation von Genen, indem man veränderte genetische Information durch ortsspezifische homologe Rekombination in ein Genom einführt. Schon in den 70er und frühen 80er Jahren wurden die Prinzipien der gezielten Genmodifikation in Experimenten mit Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) ausgearbeitet (Gietz and Woods, 2001). Diese Ideen wurden dann Mitte der 80er Jahre in der Anwendung auch auf eukaryotische Zellen übertragen. Der eigentliche Durchbruch als etabliertes genetisches Werkzeug für die gezielte Genmodifikation gelang jedoch erst Thomas und Cappechi 1987 durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus (Thomas and Capecchi, 1987). Seither sind weltweit zahlreiche Mutanten erzeugt worden. Das Ziel ist das Verständnis der genetischen Kontrollmechanismen und Steuerung aller grundlegenden Lebensvorgänge durch *in-vivo*-Analyse der Funktion von Genen. Inzwischen wird in den verschiedenen Bereichen der biologischen und medizinischen Grundlagenforschung mit Mausmutanten gearbeitet.

Im Gegensatz zur Herstellung von konventionellen transgenen Tieren durch DNA-Injektion in den Vorkern befruchteter Oozyten, bei der das fremde genetische Material (Transgen) zufällig in das Genom inseriert, erfolgt beim Gene-Targeting die Integration des Transgens zielgerichtet in den homologen Lokus einer ES-Zelle.

Zur Herstellung solcher *in-vitro* manipulierten ES-Zellen wird ein Targeting-Vektor benötigt (Abb. 1.5.). Im einfachsten Fall setzt sich ein solcher Vektor aus zwei zum Zielgen homologen Sequenzen zusammen (*short and long arm of homology*), die ein positives Selektionsmarkergen flankieren (Mansour et al., 1988). Der Targeting-Vektor wird linearisiert und durch Elektroporation in die ES-Zellen transfiziert. Das Ziel ist die homologe Rekombination, d.h. die gezielte Einführung der exogenen DNA in den entsprechenden endogenen Genlokus. Der Vorgang der homologen Rekombination wird durch die Rekombinationsenzyme der Zelle katalysiert. Sie ist jedoch ein sehr seltenes Ereignis und die Häufigkeit ist je nach Genlokus unterschiedlich.

Der positive Selektionsmarker dient dazu, die seltenen, stabil transfizierten ES-Zellklone anzureichern. Ein Beispiel für einen positiven Selektionsmarker ist das prokaryotische Aminoglycosid-Phosphotransferase-Gen (Neomycin-Resistenz-Gen = *neo*-Gen). Das Genprodukt der bakteriellen Aminoglycosid-Phosphotransferase inaktiviert Antibiotika wie G418 durch Phosphorylierung. Werden die ES-Zellen nach

der Elektroporation mit G418-haltigem Medium gefüttert, überleben dadurch nur die Zellen, die den Targeting-Vektor und damit das *neo*-Gen integriert haben.

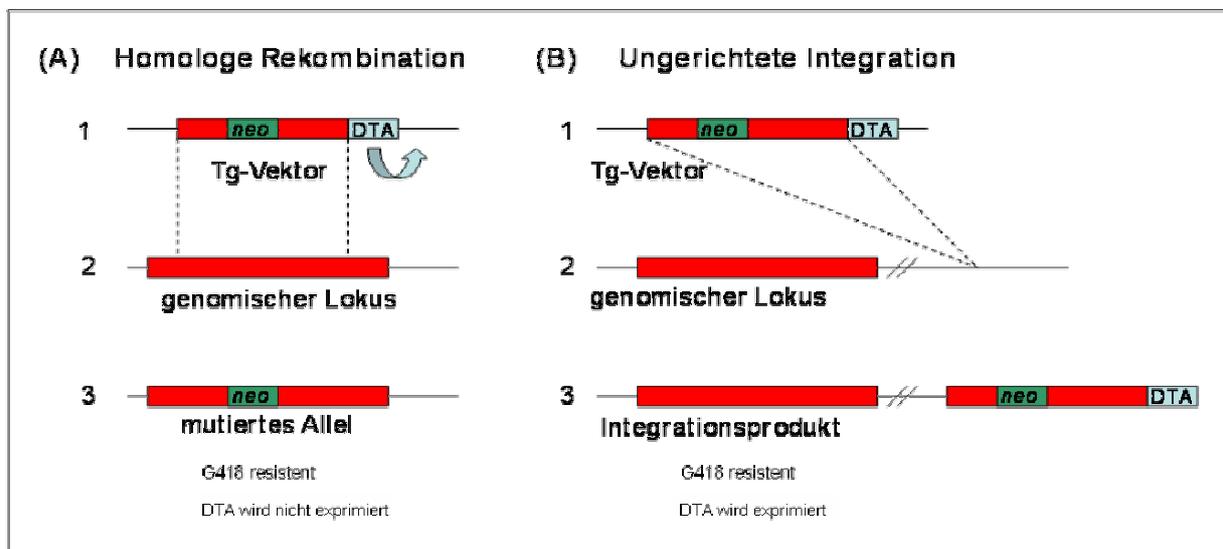


Abb. 1.5. Gene-Targeting Schema

(A): Der Targeting-Vektor (1) besitzt einen positiven Selektionsmarker (*neo*), der von zwei zum Zielgen homologen Sequenzen flankiert ist (rot). Am Ende des 3'-Arms, außerhalb des zum Zielgen homologen Bereichs, ist zusätzlich ein negativer Selektionsmarker (DTA) lokalisiert, der bei der homologen Rekombination verloren geht (angedeutet durch den Pfeil). Zellen mit mutiertem Allel (3) sind G418 resistent.

(B): Bei zufälliger Integration des Targeting-Vektors (1) in das Genom (2) bleibt der DTA-Selektionsmarker erhalten. Zellen mit diesem Integrationsprodukt sind G418 resistent, aber exprimieren DTA.

neo = Aminoglycosid-Phosphotransferase-Gen, DTA = DiphterietoxinA-Gen, Tg-Vektor = Targeting-Vektor.

Zusätzlich kann außerhalb des zum Zielgen homologen Bereichs ein negatives Selektionsmarker-Gen, wie das DiphterietoxinA(DTA)-Gen, kloniert werden. Wenn der Targeting-Vektor homolog in den endogenen Locus der ES-Zelle integriert, geht das DTA-Gen verloren, da es außerhalb des homologen Bereichs liegt (Abb. 1.5. A). Bei ungerichteter Integration dagegen wird es mit in die genomische DNA eingebaut. Das hat zur Folge, dass das Toxin exprimiert wird und die ES-Zelle stirbt (Abb.1.5. B).

Die Zellklone, die eine Kultivierung im Selektionsmedium überleben, werden anschließend mit Hilfe molekularbiologischer Methoden (PCR, Southern Blot) auf das Ereignis der homologen Rekombination hin analysiert.

Die *in-vitro* manipulierten ES-Zellen werden durch Mikroinjektion in das Blastocoel 3,5 Tage alter Mausembryonen (Blastozyste) transferiert. Hierbei werden die ES-Zellen gewissermaßen an ihren Herkunftsort zurückverpflanzt, da diese Zelllinien ursprünglich aus den Zellen der inneren Zellmasse von Blastozysten in Kultur etabliert wurden. ES-Zellen sind undifferenziert und pluripotent und können sich an der Bildung aller Gewebe eines Organismus beteiligen.

Die manipulierten Blastozysten werden anschließend in den Uterus von scheinsschwangeren Tieren transplantiert und von diesen ausgetragen.

Mit der Methode des Gene-Targeting lassen sich Gene gezielt inaktivieren (*Knock-out* oder *Loss-of-Funktion*), aber es können auch Gene ausgetauscht (*Knock-in*) oder gezielte aktivierende Mutationen in ein Gen eingeführt werden (*Gain-of-Function*). Gezielte Mutationen werden durch die Methode der *in-vitro* Mutagenese in ein Gen von Interesse eingeführt, bevor dieses mit Hilfe eines Targeting-Vektors in das Genom von ES-Zellen integriert wird.

1.8. Konditionales Gene-Targeting: das Cre/loxP-Rekombinasesystem

Durch konditionales Gene-Targeting können genetische Modifikationen auf ein bestimmtes Entwicklungsstadium oder auf einen bestimmten Gewebetyp beschränkt werden. Dazu verwendet man häufig das Cre/loxP-System, ein Rekombinationssystem aus dem Bakteriophagen P1.

Das 38-kDa-Enzym Cre (causes rekombination) ist eine lokus-spezifische Rekombinase und schneidet bzw. religiert die DNA an spezifischen Zielsequenzen, den sog. loxP-Elementen (locus of crossover (x) in P1). Jedes loxP-Element besteht aus zwei umgekehrten Sequenzwiederholungen (*inverted repeats*) von 13 bp, die ein asymmetrisches Zwischenelement (*spacer*) flankieren, das dem gesamten Element seine Orientierung gibt (Abb.1.6.) (Abremski and Hoess, 1984). Wenn die loxP-Elemente gleich orientiert sind (*head to tail*), wird die dazwischen liegende Sequenz als zirkuläres Molekül ausgeschnitten. Ein intaktes loxP-Element bleibt auf jedem Rekombinationsprodukt erhalten. Ein DNA-Bereich, der von zwei loxP-Elementen flankiert ist, nennt man „gefloxt“. Cre allein ist ausreichend, um die Rekombination zwischen den loxP-Elementen zu katalysieren (Hoess and Abremski, 1984).

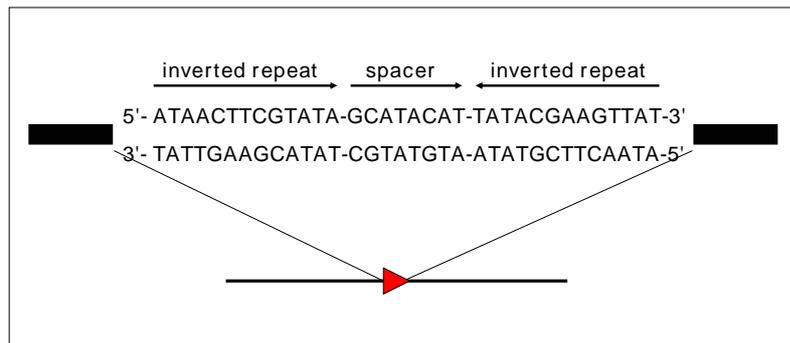


Abb. 1.6. Struktur eines loxP-Elements.

Zwei umgekehrte Sequenzwiederholungen (inverted repeats) flankieren ein asymmetrisches Zwischen-element (spacer)

Da das Cre/loxP-System leicht auf andere Spezies übertragen werden kann, wird es häufig als Genschalter verwendet. Dafür müssen zunächst zwei loxP-Elemente durch Gene-Targeting so in ES-Zellen eingebracht werden, dass nach Aktivierung durch die Cre-Rekombinase das gewünschte DNA-Rearrangement stattfindet.

Aus ES-Zellen mit diesem „gefloxten“ Allel entstehen nach einer Blastozysten-Injektion transgene Tiere. Diese Tiere werden mit einer Cre-Maus, in der die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines entwicklungspezifischen oder gewebe-spezifischen Promotors exprimiert wird, verpaart. Auf diese Weise kann bestimmt werden, in welchem Gewebe und in welchem Entwicklungsstadium die genetischen Modifikationen herbeigeführt werden.

1.9. ROSA26-Lokus und R26R- Mauslinie

Der ROSA26-Genlocus wurde durch die Genfallentechnologie (Gene trap) detektiert, bei der es sich um die ungerichtete Einbringung von Vektoren in das Genom von ES-Zellen handelt. Der klassische Genfallenvektor besteht aus einer Splice-Akzeptor(SA)-Sequenz und einem Reporter-gen, z.B. dem β -geo-Reporter-gen, welches aus einer kodierenden Sequenz für eine β -Galactosidase und einem *neo*-Gen besteht (Abb. 1.7.). Integriert ein solcher Vektor in ein Intron eines aktiven Gens, dann wird das im Vektor enthaltene promotorlose Reporter-gen von den Promotorelementen des „gefangenen“ Gens abgelesen und als Fusionsprotein exprimiert, das durch einen Farbttest nachgewiesen werden kann (Friedrich and Soriano, 1991; Gossler et al., 1989). Durch den positiven Selektionsmarker können die für ein Integrationsereignis positiven ES-Zellklone angereichert werden. Gleichzeitig führt die Integration des Vektors zur Mutation des Gens, da das gebildete Fusionsprotein am Polyadenylierungssignal des Reporterproteins beendet wird. Das durch diese Methode mutierte Gen lässt sich anschließend durch eine

5'RACE-PCR identifizieren, bei welcher der integrierte Vektor als Startpunkt verwendet wird (Geiger et al., 1993). Das RACE-Produkt enthält die Sequenzinformation des davor liegenden 5'-Exons und kann direkt sequenziert werden.

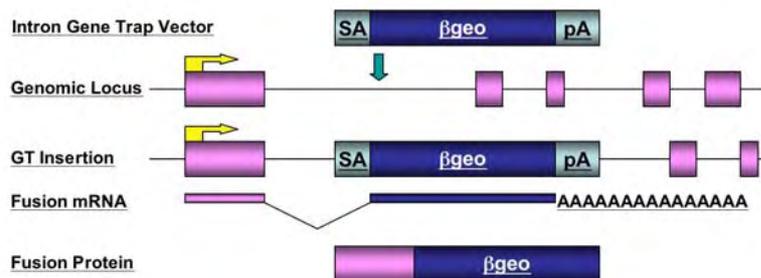


Abb. 1.7.
Prinzip der Genfallentechnologie mit einem klassischen Genfallenvektor.
 SA = Splice-Akzeptor-Sequenz
 pA = Polyadenylierungssignal
 βgeo = β-Galactosidase- + neo-Gen
 (www.IGTC.ca)

Wenn auf diese Art und Weise ein Gen von Interesse detektiert wurde, werden aus den ES-Zellen Mäuse gezüchtet, die das veränderte Gen in allen Körperzellen tragen.

Ein häufig verwendeter Genfallenvektor ist der ROSAβgeo-Vektor (ROSA = reverse orientated splice acceptor), bei dem es sich um einen retroviralen Vektor handelt, der aus einem, von zwei LTR (*long terminal repeats*)-Elementen flankierten, βgeo-Reporter gen besteht (Abb. 1.8.).



Abb. 1.7. Der Genfallenvektor ROSAβgeo.

β-geo = β-Galactosidase- + Neo-Gen; LTR = long terminal repeats; pA = Polyadenylierungssignal; SA = Splice-Akzeptor-Sequenz (www.genetrapp.de).

Durch Genfallenexperimente mit diesem Vektor wurde der ROSA26-Lokus identifiziert, dessen Expression von einem ubiquitär aktiven Promotorelement gesteuert wird (Friedrich and Soriano, 1991; Zambrowicz et al., 1997). Wie in vielen Beispielen gezeigt werden konnte, ist dieser Locus sehr gut für Gene-Targeting Experimente zugänglich (Possemato et al., 2002; Soriano, 1999; Srinivas et al., 2001). Das erste Gene-Targeting in den ROSA26-Lokus wurde 1999 im Labor von P. Soriano durchgeführt, wodurch die Cre-Reporterlinie R26R (ROSA26-Cre-Reporter) generiert wurde (Soriano, 1999). Diese Linie trägt ein Reporter-Konstrukt, welches

aus einem 5,3-Kb-genomischen-ROSA26-Fragment besteht, in welches über die XbaI-Schnittstelle eine SA-Sequenz, identisch zu der im ursprünglichen retroviralen Vektor, eine geflochte *neo*-Kassette, ein β -Galactosidase (*lacZ*-) Gen und eine Polyadenylsequenz (Stoppsequenz) inseriert sind. Zusätzlich ist am 3'-Ende der *neo*-Kassette eine 3-fache Polyadenylsequenz kloniert, die die Transkription des *lacZ*-Gens verhindert. Durch Verpaarung der R26R-Linie mit einer Cre-Mauslinie wird in allen Cre-Rekombinase exprimierenden Zellen die geflochte *neo*-Kassette mit der Stoppsequenz ausgeschnitten. Die Konsequenz ist die Expression des *lacZ*-Gens in diesen Zellen, welche durch eine X-gal-Färbung nachgewiesen werden kann. P. Soriano verpaarte in seiner Studie die R26R-Linie mit einer R26Cre-Mauslinie, in der die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des ROSA26-Promotors exprimiert wird. Als Resultat wiesen die Nachkommen nach einer X-gal-Färbung eine komplette Blaufärbung auf (Abb. 1.8.).

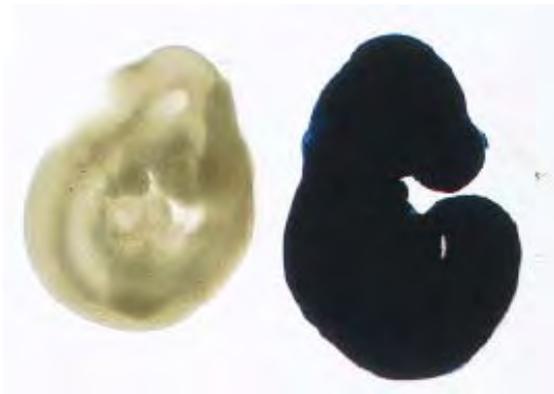


Abb. 1.8. X-gal-Färbung von Mausembryonen (E 9).

Links = Heterozygoter R26R-Embryo

Rechts = Heterozygoter R26R/R26Cre-Embryo

(aus Soriano 1999)

1.10. Generierung der R26^{hPDGFR α PM}-ES-Zellen

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurden rekombinante ES-Zellklone generiert, die über einen Knock-in eine mutierte Form des humanen PDGFR α im Genom integriert haben. Als Targeting-Vektor wurde eine modifizierte Form des ROSAMER-Plasmids verwendet, der sich vom R26R-Konstrukt ableitet (Jager et al., 2004; Soriano, 1999). Im Einzelnen wurde zunächst eine Splice-Akzeptor-Sequenz, gefolgt von einer einzelnen Polyadenylsequenz, in eine singuläre XbaI-Schnittstelle eines 5,3-Kb-genomischen ROSA26-Fragments, gefolgt von einer DTA-Kassette, inseriert. Eine Stoppkassette, bestehend aus einer geflochten Puromycin-N-acetyltransferase (PAC) mit drei SV40 Polyadenylsequenzen, wurde an das 3'-Ende vom Splice-Akzeptor gesetzt, um das Plasmid ROSApuro herzustellen. Anschließend wurde die

singuläre KpnI-Schnittstelle durch eine PacI-Schnittstelle ersetzt, um später das Plasmid für die Elektroporation in ES-Zellen linearisieren zu können. Dieses Plasmid wurde für das Gene-Targeting verwendet (Abb.1.9.). Es wurde RPP genannt und enthält eine singuläre Sall-Schnittstelle am 5`-Ende der einzelnen Polyadenylsequenz, in die eine beliebige DNA inseriert werden kann.



Abb. 1.9. Schematische Darstellung des Targeting-Vektors RPP. Schwarze Linie = genomische ROSA26-DNA; SA = Splice-Akzeptor; rote Pfeile = loxP-Elemente; pA = Polyadenylsequenz; PAC-tpA = Puromycin-N-acetyltransferase (PAC) mit drei SV40 Polyadenylierungssequenzen; pBSK = pBluescript KS (+/-).

Während meiner Diplomarbeit erfolgte die Insertion eines humanen autoaktiven PDGFR α in das Plasmid RPP. Dafür wurde zuerst über *in-vitro*-Mutagenese die Punktmutation (PM) D846V in eine humane PDGFR α -cDNA eingeführt, welche in die BamHI-Schnittstelle eines pcDNA3 Plasmids kloniert worden war. Die eingebrachte Mutation geht mit einem Aminosäureaustausch von Asparagin durch Valin in der enzymatischen Domäne (Exon 18) des Rezeptors einher und ist die häufigste Mutation in GISTs, in deren Pathogenese PDGFR α -Mutationen involviert sind (Heinrich et al., 2003; Hirota et al., 2003; Lasota et al., 2004; Medeiros et al., 2004; Wardelmann et al., 2004).

Nachdem die singuläre HindIII-Schnittstelle der multiplen Klonierungsregion des pcDNA3-Plasmids durch eine Sall-Schnittstelle ersetzt worden war, konnte die mutierte PDGFR α -cDNA in das Plasmid RPP inseriert werden, um den Targeting-Vektor RPP-hPDGFR α PM zu generieren (Abb. 1.10.).

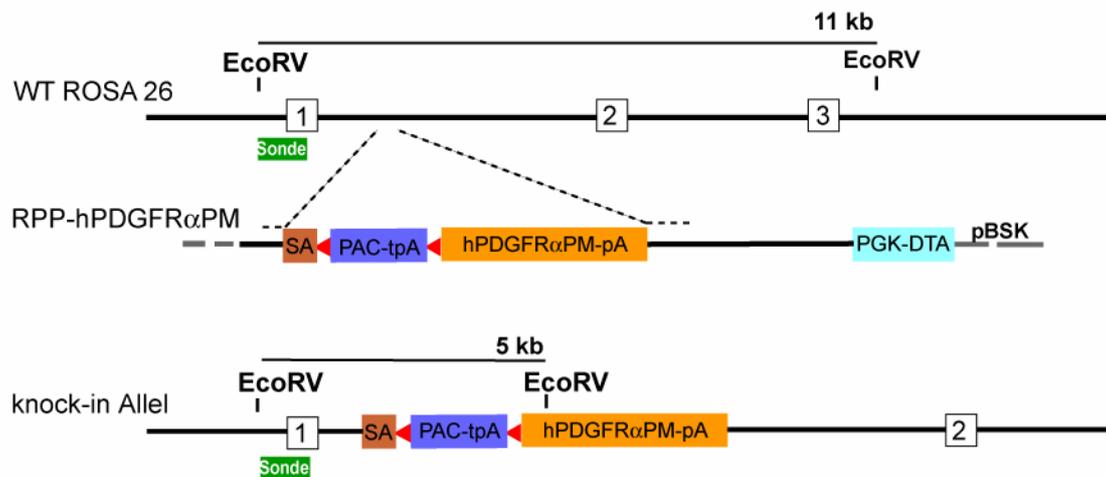


Abb. 1.10. Schematische Darstellung der Generierung von R26^{hPDGFRαPM}-ES-Zellen und Southern-Blot-Strategie. Offene Kästchen = Exone des endogenen ROSA26-Allels; grün = Sonde140; hPDGFRαPM = humane PDGFRα-cDNA mit Punktmutation (PM) D846V (weitere Abkürzungen siehe Abb. 1.9.).

Zur Herstellung von R26^{hPDGFRαPM}-ES-Zellen wurden 25 µg des linearisierten Vektors mittels Elektroporation in Knut1-ES-Zellen (Peitz et al., 2007) transfiziert (Werling and Schorle, 2002). Die stabil transfizierten ES-Zellklone wurden mit Puromycin (1,4 µg/ml) über 48 Stunden selektioniert, bevor eine Southern-Blot-Analyse der positiven Klone erfolgte. Im Fall einer erfolgreichen homologen Rekombination wurde durch die PDGFRα-cDNA eine zusätzliche EcoRV-Schnittstelle in das knock-in Allel eingeführt (Abb. 1.10, unten). Nachdem die genomische DNA der rekombinaten ES-Zellklone einer EcoRV-Restriktion unterzogen worden war, konnte mit Hilfe der Sonde140 ein 11-Kb-Fragment für das wildtyp ROSA26-Allel (WT ROSA 26) und ein 5-Kb-Fragment für das knock-in Allel detektiert werden. Dabei hybridisierte die Sonde außerhalb des Bereiches des integrierten Vektors, damit das Ereignis der homologen Rekombination von einer zufälligen Integration unterschieden werden konnte. Insgesamt wurden 50 ES-Zellklone auf das Ereignis der homologen Rekombination analysiert, von denen vier Klone die erwarteten Fragmentgrößen aufwiesen (Abb. 1.11.).

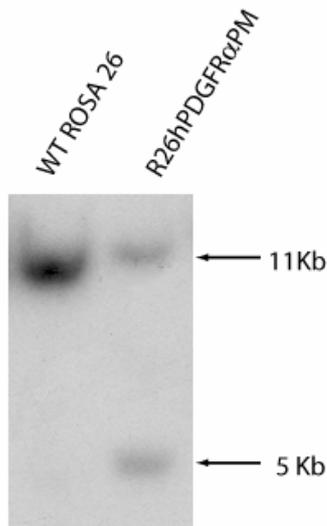


Abb. 1.11. Nachweis der homologen Rekombination mittels Southern-Blot-Analyse.

Es ist beispielhaft das Ergebnis der Southern-Blot-Analyse nach EcoRV-Restriktion der genomischen DNA von einem Wildtyp- (Spur 1) und einem rekombinanten (Spur 2) ES-Zellklon gezeigt.

Die Verwendung des Plasmids RPP ermöglicht ein konditionales Gene-Targeting, da die Expression des mutierten PDGFR α in den R26^{hPDGFR α PM}-ES-Zellen solange verhindert wird, bis eine Exzision der geflochtenen Stopp-Kassette durch eine Cre-Rekombinase erfolgt (Abb.1.12.). Nachdem aus den rekombinanten ES-Zellklonen transgene Mäuse erzeugt wurden, kann durch eine Verpaarung dieser Mäuse mit einer Cre-Mauslinie bestimmt werden, in welchem Gewebe und in welchem Entwicklungsstadium der autoaktive PDGFR α exprimiert werden soll.

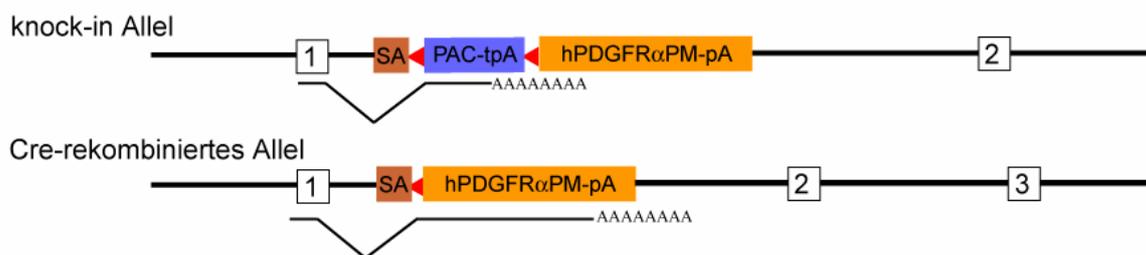


Abb. 1.12. Schema des konditionalen Gene-Targeting mit Hilfe des Plasmids RPP.

Die geflochte Stoppkassette (PAC-tpA) verhindert die Expression der mutierten PDGFR α -cDNA (oben) solange, bis sie durch Cre-Rekombination ausgeschnitten wird (unten).

1.11. Zielsetzung

Bisherige PDGFR α knock-out Studien belegen eine wichtige Funktion des Rezeptors bei der Entwicklung des kranialen Mesenchyms. So entwickeln Ph/Ph-Mutante eine Gaumenspalte, während NLZ-spezifische knock-out Mäuse zusätzlich eine unvollständige Verknöcherung der Schädelknochen aufweisen. Da die Ph/Ph-Mutanten spätestens am Tag 10 während der Embryogenese sterben und die konditionalen Mäuse tot geboren werden, konnte man bislang die genaue Rolle des PDGFR α in der Entwicklung der Schädelknochen, speziell im kompensatorischen Wachstum, das nach der Geburt aus den Schädelnähten hervorgeht, nicht untersuchen. Durch die Generierung NLZ-spezifischer PDGFR α knock-in Mäuse könnten lebensfähige Tiere erzeugt werden, anhand derer die Rolle des PDGFR α in kranialen Strukturen untersucht werden kann.

Das Ziel dieser Arbeit war die Herstellung transgener Mäuse aus den R26^{hPDGFR α PM}-ES-Zellklonen, um ein Tiermodell zu etablieren, das die konditionale Expression eines autoaktiven PDGFR α erlaubt. Diese Tiere sollten anschließend mit einer Wnt1Cre-Mauslinie verpaart werden, die spezifisch in den Neuralleistenzellen und ihren Derivaten die Cre-Rekombinase exprimiert. Der Phänotyp der Nachkommen sollte mit geeigneten Methoden analysiert werden, um die Rolle des PDGFR α in der Schädelentwicklung zu bestätigen und die molekularen Mechanismen zu identifizieren.

2. Material

2.1. Chemikalien

2.1.1. Allgemein

AEC	Dako, Hamburg
Agar	Merck, Darmstadt
Agarose	Biozym, Essig Oldendorf
Akrylamid Mix (Rotiphorese Gel 30)	Invitrogen, Karlsruhe
Alizarinsulfonsäure Natriumsalz	Merck, Darmstadt
Alzianblau 8 GX	Sigma-Aldrich, München
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Aquatex	Merck, Darmstadt
BM Block	Roche, Mannheim
BM Purpel AP Substrat	Roche, Mannheim
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU)	Sigma-Aldrich, München
[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylamonio]- 1- Propan-Sulfonat (CHAPS)	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
Deoxycholat	Sigma-Aldrich, München
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, München
DIG RNA Labeling Mix	Roche, Penzberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Neu-Ulm
Dinatriumhydrogensulfat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe
Dodecylsulfatnatriumsalz (SDS)	Merck, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt

Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Sigma-Aldrich, München
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Glycerin	KMF, Lohmar
Hefe-Extrakt	Merck, Darmstadt
Heparin	Sigma-Aldrich, München
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Lämmli 4x	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Maleinsäure	Sigma-Aldrich, München
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Natriumacetat, 3M, pH 4,6	Applied Biosystems, Warrington GB
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogensulfat	Merck, Darmstadt
Natronlauge 5 M	Merck, Darmstadt
Oligonukleotide (Primer)	Sigma-Aldrich, München
Ölrot O	Sigma-Aldrich, München
PCR-Nukleotid-Mix	Roche, Penzberg
PCR-Puffer (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
PCR-MgCl ₂ (50 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Schafserum	Sigma-Aldrich, München
Sephadex G-50	Amersham, Freiburg
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Spermidine	Sigma-Aldrich, München
Sucrose	Fluka, Neu-Ulm
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	BioRad, München
Template Suppression Reagent (TSR)	Applied Biosystems, Warrington GB

Transkriptionspuffer (10x)	Roche, Penzberg
Tris-Base	Merck, Darmstadt
Triton X 100	Serva, Heidelberg
tRNA (Hefe)	Sigma-Aldrich, München
Trypton	Merck, Darmstadt
Tween 20	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe

2.1.2. Zellkultur

U73122 (PLC γ Inhibitor)	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Dulbecco`s MEM + Glutamax-1	GibcoBRL, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, München
L-Glutamin	GibcoBRL, Karlsruhe
PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	GibcoBRL, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Biochrome, Berlin
Vitamin C	Sigma-Aldrich, München

2.1.3. Radiochemikalien

[α - ³² P]-Desoxy-Cytidintriphosphat	Amersham, Freiburg
---------------------------------------------------------	--------------------

2.2. Geräte

Abzug	Maxxima	WRT
Autoklav	3870	tuttnauer
Bakterienschüttler	Innova 4000	New Brunswick Scientific
Brutschrank	Cytoperm 2	Heraeus
Entwickler	X-OMAT 1000 Processor	Kodak
Geiger-Müller-Zähler	LB122	berthold
Gelkammer		Peqlab
Heizblock	DIGI-Block JR	Laboratory Devices Inc. USA

Hybridisierungssofen	Hybaid Shak`n Stack	Thermo Electron
Magnetrührplatte	MR 3001	Heidolf
Microplate Reader	ELx800	Bio-Tek
Mikroskop	Fluoert	Leitz
Naßblo-Kammer	Trans-Blot-Cell	BioRad
Netzgerät	E143	Consort
PCR-Haube	Clene Cab Plus	Herolab
pH-Meter		Knick
Photometer	Bio-Photometer	Eppendorf
Pipetten	Research	Eppendorf
Sequenzierer	ABI Prism310 Genetic Analyser	Applied Biosystems
Speed-Vac	Concentrator 5301	Eppendorf
Stereomikroskop	MS5	Leica
Sterilbank	Hera Safe	Kendro
Thermocycler	PTC-200 Gene Amp PCR System 2700 Gene Amp PCR System 9700	MJ Research Applied Biosystems Applied Biosystems
Thermoschüttler	Thermomixer Compact	Eppendorf
Trockenschrank		Heraeus
UV-System/Kamera	Classic Uno	Intas
Vortex	Vortex-genie2	Scientific Industries
Waage		Sartorius
Wasserbad		GFL
Zell-Inkubator	Cytoperm 2	Heraeus
Zentrifugen	Biofuge fresco Biofuge pico Minifuge RF Minifuge 1s 5417R 5415D	Heraeus Heraeus Heraeus Heraeus Eppendorf Eppendorf

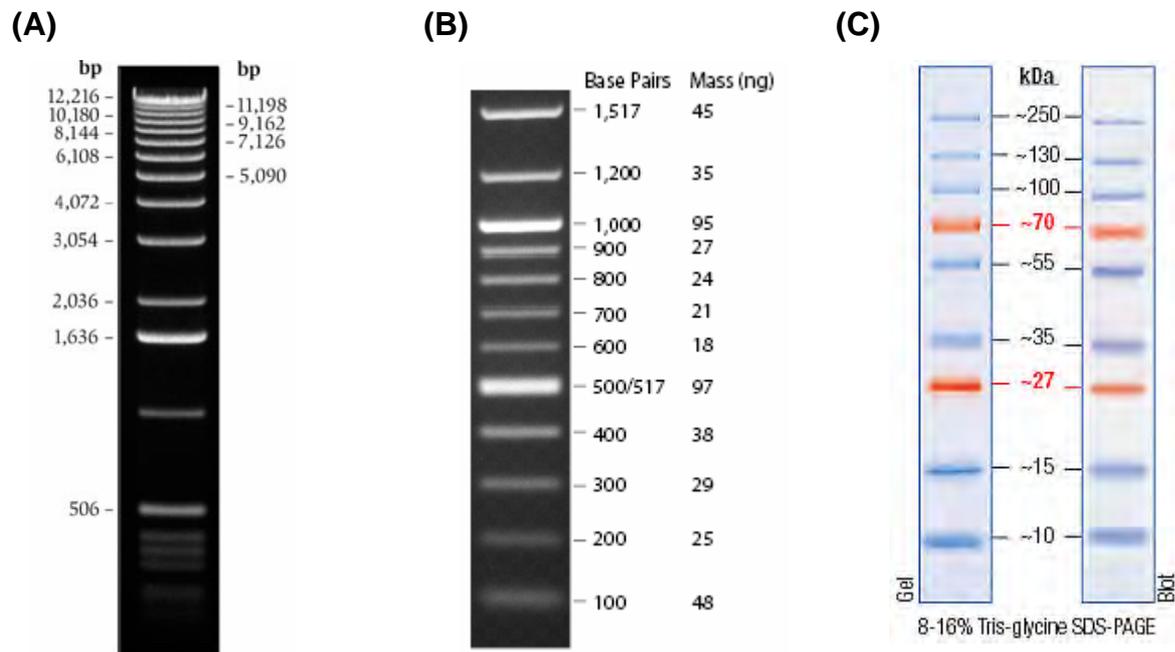
2.3. Lösungen, Puffer und Medien

Die benötigten Lösungen, Puffer und Medien werden am Ende der jeweiligen Methode aufgeführt. Alle wässrigen Lösungen werden mit destilliertem Wasser (MilliQ biocel, Millipore, Eschborn) angesetzt. Sterilisiert werden die Lösungen durch Autoklavieren (30 min/121°C/2 bar). Thermoinstabile Bestandteile werden sterilfiltriert (0,2 µm) und nach dem Autoklavieren zugegeben.

2.4. Verbrauchsmaterialien

96-Loch-Platten	Becton Dickinson, Frankreich
2-Kammer-Objektträger (Chamber Slide)	NUNc, Roskilde
Blaukappenröhrchen 15 ml	Greiner Labortechnik, Solingen
Blaukappenröhrchen 50 ml	Greiner Labortechnik, Solingen
Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Dialyseschläuche	Merck, Darmstadt
Einstreu	Ssniff, Soest
Gel-Blotting-Papier (Whatmann Papier)	Schleicher-Schuell, Dassel
Hybond XL (Nylonmembran)	Amersham, Freiburg
Kulturschalen	Greiner Labortechnik, Solingen
Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Pasteurpipetten aus Glas	Brand, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäße 100 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf
PVDF-Membran	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme (BioMax Light-1)	Kodak, Rochester, USA
Spritzen 10 ml	Becton Dickinson, Frankreich
Tierfutter	Ssniff, Soest
Tierkäfige und Zubehör	Techniplast, Hohenpleissenberg
Zellfilter (Rotrand, 0,2 µm, Celluloseacetat)	Schleicher-Schuell, Dassel
Zellkulturschalen	Becton Dickinson, Frankreich
Zellschaber	TPP, Schweiz
Zellsiebe (40µm, Nylon)	Becton Dickinson, Frankreich

2.5. Größenstandards



(A) 1kb DNA-Leiter

Invitrogen, Karlsruhe

(B) 100 bp DNA-Leiter

New England Biolabs, Schwalbach

(C) PageRuler Prestained Protein

Fermentas, St. Leon-Rot

2.6. Kits

ApopTag Peroxidase *In Situ*
Apoptosis Detection Kit

Chemicon, Atlanta, USA

BCA Protein Assay Kit

PIERCE, Rockfort, USA

BrdU Immunhistochemie System

Merck, Darmstadt

Big Dye Terminator v1.1

Applied Biosystems, Warrington, GB

Cycle Sequencing Kit

HiSpeed Plasmid Purifikation Kit

Qiagen, Hilden

Rediprime Labelling Kit

Amersham, Freiburg

Rneasy Kit

Qiagen, Hilden

SuperSignal West Femto Maximum
Sensitivity Substrate

PIERCE, Rockfort, USA

TOPO-Cloning Kit

Invitrogen, Karlsruhe

Vectastain Alkaline Phosphatase

Vector Laboratories, Burlingame, USA

Substrate Kit III

2.7. Plasmide

pBlueskript II KS +/-	Stratagene, Heidelberg
pCRII	Invitrogen, Karlsruhe
pCRII-Bsp2	Prof. Andrea Vortkamp Insitut für Biologie, ZMB, Essen
pcDNA3-PDGFR α	Dr. Rainer Heuchel Ludwig Institut für Krebsforschung Uppsala, Schweden
R26-hPDGFR α PM	Mönning et al. (eingereicht)

2.8. Oligonukleotide

2.8.1. Zweitstrangsynthese (RT-PCR)

Gen	Primersequenz (5' → 3')	AT* (°C)	Grö- ße (Bp)	evtl. Referenz
ALP2	F: ACTGCCACTGCCTACTTGTGTG R: CCTCTGGTGGCATCTCGTTATC	61	250	
Bsp2	F: CGGCCACGCTACTTTCTTTA R: GCCGTCTCCATTTTCTTCTG	60	100	
Msx1	F: CTCATGGCCGATCACAGGAA R: GTACTGCTTCTGGCGGAACT	57	390	(Mizuseki et al., 2003)
Msx2	F: CCTCGGTCAAGTCGGAAAAT R: TCTTTTCGCCTTAGCCCTTC	58	300	
Osteocalcin	F: CTCTGTCTCTCTGACCTCACAG R: CAGGTCCTAAATAGTGTAACCG	52	200	(Salinçarnbori boon et al., 2006)
Osteopontin	F: CGACGATGATGACGATGATGAT R: CTGGCTTTGGAACCTTGCTTGAC	63	490	(Salinçarnbori - boon et al., 2006)
Runx2	F: GAACCAAGAAGGCACAGACA R: AACTGCCTGGGGTCTGAAAA	57	450	(Salinçarnbori - boon et al., 2006)
hPDGFR α	F: TGTGCCAGACCCAGATGTAG R: TGCCTTTGCCTTTCACTTCT	60	400	
mPDGFR α	F: GAGCACAAGAAGTTATGTGATTTTG R: CCATGATCTCATAGACTTCACTGGT	60	650	

GAPDH	F: GAAGCTTGTCATCAACGGCAAGCCC R: GCATCGAAGGTGGAAGAGTGGCAGT	60	700	
-------	--------------------------------------------------------------	----	-----	--

2.8.2. Genotypisierung

Name	Primersequenz (5' → 3')	AT* (°C)	Zyklen	Größe (bp)
3-Primer-PCR	F: CTCCCAAAGTCGCTCTGAGTTGTTA R1: CCCATTTTCCTTATTTGCCCTATT R2: GACATCCATCAAGGAAACCCTGGACT	60	35	370 250
Cre+	F: ATTTGCCTGCATTACCGGTC R: ATCAACGTTTTGTTTTCGGA	57	35	350

2.8.3. Sequenzierung

Name	Primersequenz (5' → 3')	AT (°C)*
PDGFR α -Exon-10	F: CACTCATTGCCATGACTCTC R: TGC GGCTCAGCTGATGAG	60
PDGFR α -Exon-12	F: GTGAAGCTCTGGTGCACTG R: GTAAAGTTGTGTGCAAGGG	55
PDGFR α -Exon-14	F: GTAGCTCAGCTGGACTGATA R: CACATGTGTCCAGTGAA	55
PDGFR α -Exon-18	F: CATGGATCAGCCAGTCTTGC R: TGAAGGAGGATGAGCCTGACC	60

*= Annealing-Temperatur

2.9. Enzyme

2.9.1. Polymerasen

SP6 RNA-Polymerase	Roche, Mannheim
T7 RNA-Polymerase	Roche, Mannheim
M-MuLV Reverse Transkriptase	New England Biolabs, Schwalbach
Taq-DNA-Polymerase	Roche, Mannheim

2.9.2. Restriktionsendonukleasen

BamHI	20 U/ μ l	New England Biolabs, Schwalbach
NotI	2,5 U/ μ l	New England Biolabs, Schwalbach

2.9.3. Sonstige Enzyme

Cre-Rekombinase	13 mg/ml	Michael Peitz Institut für rekonstruktive Neurobiologie Unikliniken Bonn
Collagenase Typ IV	0,1%	Calbiochem, Darmstadt
Proteinkinase K	10 mg/ml	Merck, Darmstadt
RNase A	100 mg/ml	Qiagen, Penzberg
RNase Out	40 U/ μ l	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	0,05%	PAN Biotech, Wien, Österreich

2.10. Antikörper

2.10.1. Primäre Antikörper

Akt	1: 1000	Cell Signaling, Frankfurt am Main
Phospho-Akt	1: 1000	Cell Signaling, Frankfurt am Main
β -Actin	1: 5000	Dako, Hamburg
DIG-AP-Antikörper	1:10000	Roche, Mannheim
PDGFR α	1: 200	Spring Bioscience, Fremont, USA
Phospho-PDGFR α	1: 150	Santa Cruz, Heidelberg
PLC γ 1	1: 1000	Cell Signaling, Frankfurt am Main
Phospho-PLC γ 1	1: 1000	Cell Signaling, Frankfurt am Main
P44/42 MAPK	1: 1000	Cell Signaling, Frankfurt am Main
Phospho-p44/42 MAPK	1: 1000	Cell Signaling, Frankfurt am Main

2.10.2. Sekundäre Antikörper

anti-mouse-HRP	1:2000	Dako, Hamburg
anti-rabbit-HRP	1:2000	Dako, Hamburg

2.11. Bakterien

E.coli TOP10	Rekombinationsdefekter, suppressiver Bakterienstamm; $\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 ara\Delta 139 \Delta (ara-leu)7697 galU$ $galK rpsL (Str^R) endA1 nupG$ $F^{\prime}mcrA\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$
--------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

2.12. Mauslinien

Balb/c	Harlan, Indianapolis, USA
C57/Bl6J	Jackson Laboratory, Maine, USA
C57/Bl6J -Wnt1Cre	
R26 ^{hPDGFRαPM} (genetischer Hintergrund C57/Bl6J)	selbst generiert

2.13. Zellen

Knut1	murine embryonale Stammzellen, generiert von Angela Egert, Institut für Pathologie, Unikliniken Bonn
NIH/3T3	immortalisierte murine embryonale Fibroblasten (Todaro and Green, 1963)
MEF	primäre murine embryonale Fibroblasten
Primäre Knochenzellen	selbst generiert (siehe 3.3.4.)

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Präparation kompetenter Zellen

Eine Bakterienkultur wird über Nacht in 50 ml LB-Medium bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert. Von dieser Kultur wird am folgenden Morgen 1 ml in 100 ml LB-Medium transferiert und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,3 (Beginn der logarithmischen Teilungsphase) wachsen gelassen. Dann werden die Zellen auf 4°C abgekühlt und bei 2000 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 50 ml 50 mM CaCl₂ resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 2000rpm für 5 min wird das Zellpellet in 10ml eiskalter CaCl₂-Lösung mit 15% Glycerol resuspendiert. Die Zellsuspension wird auf Eis aliquotiert (100 µl), in flüssigen Stickstoff eingefroren und kann dann bei -80°C aufbewahrt werden.

3.1.2. Hitzeschock-Transformation von *E.coli*

Zunächst werden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, bevor sie vorsichtig mit 10-100 ng Plasmid-DNA gemischt werden. Nach einer Inkubationszeit von 30 min erfolgt ein Hitzeschock von 30 sec bei 42°C. Anschließend wird der Transformationsansatz für 2 min auf Eis abgekühlt. Dann werden die Bakterien zur Regeneration und zur Entwicklung der Antibiotikaresistenz in 0.5 ml LB-Medium aufgenommen und bei 37°C auf einem Thermoschüttler bei 300 Upm inkubiert. Nach 40 min werden die Bakterien in verschiedenen Konzentrationen auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag können Einzelkolonien mittels Minipräparation (3.1.3.) auf das Vorhandensein der transformierten DNA untersucht werden.

Medien

	Flüssig LB (5x)	LB für Agarplatten (5x)
H ₂ O	500 ml	500 ml
Bacto-Tryptone/Peptone	25 g	5 g
Bacto-Yeast-Extract	12,5 g	2,5 g

NaCl	12,5 g	2,5 g
Agar-Agar	-	8,0 g

- ⇒ Autoklavieren: 120°C, 20 min
- ⇒ LB für Agarplatten mit 500 µl Antibiotika versetzen (nach Abkühlung auf 60°C)
Danach gleichmäßig auf Petrischalen (Ø10) verteilen und nach Aushärtung bei 4°C lagern.

3.1.3. Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA („Mini-Präp“)

Die Minipräparation von Plasmid-DNA dient zur schnellen Analyse von zuvor transformierten Bakterien. Bei dieser Methode wird die Plasmid-DNA von bakterieller DNA und Zellresten getrennt und anschließend gefällt und aufgereinigt. Danach kann sie mittels Restriktionsverdau (3.1.5.) analysiert werden.

Von einer 3 ml Übernachtskultur werden 1,5 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und für 1 min bei 8000 rpm pelletiert. Nachdem der Überstand vollständig abgesaugt wurde, wird das Pellet in 150 µl Puffer 1 resuspendiert. Anschließend werden die Bakterien durch Zugabe von 300 µl Puffer 2 lysiert, bevor der Ansatz durch 150 µl kaltem Puffer 3 neutralisiert wird. Nach 10-minütiger Zentrifugation setzt sich das Lysat als Pellet ab. Der Plasmid-haltige Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µl Phenol/Chloroform vermischt. Zur Trennung der Phasen wird der Ansatz für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wird mit 1 ml eiskaltem Ethanol versetzt und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und mit 70%igem Ethanol versetzt. Es erfolgt nochmals ein Zentrifugationsschritt von 2 min bei 13000 rpm. Danach wird der Überstand abpipettiert und das Pellet im Speed-Vac für 5 min bei 37°C getrocknet. Anschließend kann das Pellet in 20 ml H₂O gelöst werden.

Puffer P1: 50 mM Tris-HCl pH8; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RnaseA

Puffer P2: 200 mM NaOH; 1% SDS

Puffer P3: 3,0 M KAc pH 5,5

3.1.4. Präparation großer Mengen Plasmid-DNA („Maxi-Präp“)

Zur Präparation größerer Mengen von Plasmid-DNA wird das „HiSpeed Plasmid Purifikation Kit“ von Qiagen verwendet. Die Lyse der Bakterienzellen erfolgt auch hier durch die Strategie der Minipräparation; es wird aber durch den Einsatz größerer Kulturvolumina sowie Reinigungssäulen eine größere Menge bzw. höhere Reinheit der isolierten Plasmid-DNA erreicht. Der Versuchsablauf erfolgt gemäß den Herstellerangaben. Die Quantität der isolierten, aufgereinigten Plasmid-DNA kann photometrisch gemessen werden (3.1.10.). Die Qualität wird durch Restriktionsanalyse (3.1.5.) bestimmt.

3.1.5. Restriktionsverdau

Die Spaltung von DNA erfolgt mit Hilfe von Restriktionsenzymen. Dabei handelt es sich um Endonucleasen bakteriellen Ursprungs. Sie spalten die Phosphodiesterbindung beider Stränge eines DNA-Moleküls hydrolytisch und unterscheiden sich in der Erkennungssequenz, ihrer Spaltstelle und ihrem Ursprungsorganismus. Für den Restriktionsverdau verwendet man in der Regel Restriktionsenzyme vom TypII. Ihre Erkennungsstellen sind 4-8 Basen lang und meist palindromisch. Sie schneiden innerhalb oder nahe dieser Erkennungssequenz. Für den Restriktionsverdau wird 1 U Restriktionsendonuklease pro 1 µg DNA in den mitgelieferten Puffersystemen bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur eingesetzt. Für analytische Verdaus wird ein Gesamtvolumen von 20 µl, für präparative Verdaus ein Gesamtvolumen von 70 µl angesetzt. Die Inkubationszeit beträgt mindestens eine Stunde für den analytischen und 12 Stunden für den präparativen Verdau.

Dabei darf in allen Restriktionsansätzen die eingesetzte Enzymmenge 1/10 des Reaktionsvolumens nicht überschreiten, da ansonsten die zu hohe Glycerolkonzentration die Reaktion inhibiert.

3.1.6. Präparation von Dialyse-Schläuchen

Dialyseschläuche von 25 mm Breite werden in etwa 7 cm lange Stücke geschnitten und in 2%Na₂CO₃; 1mM EDTA 10 min gekocht. Anschließend werden die Stücke zwei Mal in destilliertem Wasser gewaschen, in 1 mM EDTA autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

3.1.7. Elektroelution von DNA-Fragmenten

Die gewünschte Bande wird unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und in einen mit H₂Odd gespülten und am unteren Ende mittels einer Klammer verschlossenen Dialyseschlauch überführt. Zu dem Gelstück werden 350 µl TE gegeben und der Schlauch oben mit einer weiteren Klammer luftblasenfrei verschlossen. In eine Gelkammer mit 1x TAE wird dieser Schlauch so platziert, dass die DNA aus dem Gel in den Puffer wandern kann. Es wird eine Spannung von 90V angelegt. Nach 45 min wird die Polrichtung für 1 min umgekehrt, um die DNA von den Schlauchwänden zu lösen. Die DNA-haltige Lösung wird aus dem Schlauch herauspipettiert, Phenol-/Chloroform-extrahiert (3.1.8.) und Ethanol-präzipitiert (3.1.9.).

3.1.8. Phenol-/Chloroform-Extraktion von DNA-Lösungen

Eine Nukleinsäurelösung wird mit dem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Der Ansatz wird gemischt und 5 min bei 13,000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem das gleiche Volumen Chloroform vorgelegt worden ist. Es erfolgt erneut eine Zentrifugation für 5 min bei 13,000 rpm. Die obere, wässrige Phase wird wieder in ein Reaktionsgefäß überführt und die DNA schließlich Ethanol-präzipitiert (3.1.9.).

3.1.9. Ethanol-Präzipitation von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäuren aufzukonzentrieren und aufzureinigen, werden sie mit 1 Volumen 100%igem Ethanol und 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung versetzt. Der Ansatz wird mehrmals invertiert und danach für 25 min bei -20°C gelagert. Anschließend erfolgt eine 20-minütige Zentrifugation bei 4°C und 13000 rpm, bei der sich die Nukleinsäuren am Boden des Reaktionsgefäßes absetzen. Der Überstand wird abgenommen, das Pellet in 100 µl 70%igem Ethanol aufgenommen und zentrifugiert (20 min/ 4°C/ 13000 rpm). Danach kann das Pellet getrocknet und anschließend in H₂Odd gelöst werden.

3.1.10. Photometrische Messung

Die Konzentration einer bestimmten DNA bzw. RNA-Lösung lässt sich mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmen, indem man die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm misst (Sambrook et al., 1989). Dabei entspricht eine

Absorption von 1 OD bei 260 nm einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml und einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

Mit Hilfe der photometrischen Messung lässt sich zusätzlich der Reinheitsgrad der jeweiligen Probe bestimmen. Dieser lässt sich durch die Bildung des Quotienten aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermitteln (Müller et al., 1993). Ein Verhältnis von 1,8 spricht für eine reine DNA-Isolierung, ein Verhältnis von 2,0 für eine reine RNA-Isolierung. Ist die Nukleinsäure-Lösung mit Proteinen oder Phenol kontaminiert, so ist der Wert signifikant kleiner.

3.1.11. Polymerase-Kettenreaktion

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR = Polymerase Chain Reaction) kann ein bestimmter DNA-Abschnitt *in-vitro* vervielfältigt werden (Mullis et al., 1986).

Der PCR-Prozess besteht aus einer Serie von 20 bis 30 Zyklen. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten. Im Denaturierungsschritt wird die doppelsträngige DNA auf 96°C erhitzt, um die Stränge zu trennen. Die Wasserstoff-Brückenbindungen werden dabei aufgebrochen. Nach der Trennung der Stränge wird die Temperatur gesenkt, so dass sich die Oligonukleotide (Primer) an homologe Sequenzen der einzelnen DNA-Stränge anlagern können. Dieser Schritt heißt Annealing. Die Temperatur während dieser Phase hängt von den Primern ab und liegt normalerweise 5°C unter ihrem Schmelzpunkt. Im abschließenden Elongations-Schritt synthetisiert eine thermostabile DNA-Polymerase, ausgehend von den 3'-Enden der Primer, nach Vorgabe der DNA-Matrizen neue komplementäre DNA-Stränge. Die Temperatur hängt jetzt von der DNA-Polymerase ab und liegt zwischen 69°C und 72°C. Die entstandenen DNA-Stränge bilden die Vorlage für den nächsten Zyklus. Die Menge der DNA wird während der PCR exponentiell amplifiziert. Anschließend kann das PCR-Produkt mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.1.13.) analysiert werden.

3.1.12. Herstellung von cDNA

3.1.12.1. Erststrangsynthese

Die Reaktion der Erststrangsynthese zur Herstellung von cDNA aus RNA erfolgt mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) aus dem *Moloney murine leukemia virus* (M-MuLV). Dadurch können Transkripte bis zu 7 Kb synthetisiert werden. Als Primer für diese Reaktion dient ein Oligo(dT)-Primer, der spezifisch an die Poly-A-Enden

der Boten-RNA (mRNA) hybridisiert und so die Kopie der in der Gesamt-RNA unterrepräsentierten mRNA ermöglicht.

Als Template werden 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt, die mit 1 µl Oligo (dT)-Primer und 2 µl dNTPs gemischt und auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt werden. Um Sekundärstrukturen der RNA zu denaturieren, wird der Ansatz 5 min bei 65 °C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Anschließend wird ein Mix aus 2 µl 10x Puffer, 1 µl RNase-Out, 1 µl M-MuLV-RT und 6 µl DEPC-H₂O hinzugefügt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Danach wird der Ansatz 1h bei 42°C inkubiert. Das Heteroduplex aus RNA und cDNA kann direkt für die Zweitstrangsynthese eingesetzt werden oder bei -20 °C gelagert werden.

3.1.12.2. Zweitstrangsynthese

Die Zweitstrangsynthese erfolgt durch Amplifikation des Erststrangs durch PCR (3.1.11.). Das Produkt der Zweitstrangsynthese ist abhängig von der Wahl der Oligonukleotide. Zur Abschätzung der Qualität der neu synthetisierten cDNA kann eine PCR zur Amplifikation eines konstitutiv exprimierten Gens (GAPDH) durchgeführt werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer zur Synthese eines Zweitstranges mit den zugehörigen Annealing-Temperaturen und Zykluszahlen sind unter 2.8.1. aufgeführt.

3.1.13. Agarosegel-Elektrophorese

Die Analyse von Nukleinsäuren erfolgt in den meisten Fällen durch die Agarosegel-Elektrophorese. Sie kann zur relativ genauen und reproduzierbaren Größenbestimmung von linearen DNA-Fragmenten genutzt werden. Man verwendet 0,5 bis 2 %ige Agarosegele, um Fragmentlängen von 0,2 bis 20 kb aufzutrennen. Für die Herstellung eines Agarosegels wird die entsprechende Menge Agarose mit 1x TAE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle aufgeköcht. Die flüssige Agarose wird mit Ethidiumbromid versetzt, bevor sie in eine Gelkammer gegossen wird. Das erhärtete Gel wird mit 1x TAE-Puffer überschichtet, bevor die mit 1x Ladepuffer versetzte Nukleinsäure aufgetragen wird. Die Elektrophorese wird in einem elektrischen Feld von konstanter Stärke und Orientierung durchgeführt. Dabei ergibt sich für DNA-Fragmente (≤2kb) eine gute Auftrennung, wenn die angelegte Spannung 5 V/cm

nicht überschreitet. Die Detektion der Ethidiumbromid-markierten Nukleinsäure erfolgt durch Fluoreszenz unter UV-Licht (320nm).

Puffer und Lösungen:

50x TAE-Puffer:	242 g Tris B
	57 ml konz. Essigsäure
	37,2 g Na ₂ EDTAx 2H ₂ O
Ethidiumbromidstammlösung:	0,5 µg/ml
Ladepuffer:	0,25% Bromphenolblau
	0,25% Xylencyanol
	15% Glycerin
	in TAE

3.1.14. Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzierung von DNA wird das „BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit“ von Applied Biosystems verwendet. Das System beruht auf der Kettenabbruchreaktion von F. Sanger (Sanger et al., 1977). Die zu sequenzierende DNA wird mit nur einem Primer in Gegenwart von dNTPs und fluoreszent markierten ddNTPs amplifiziert. Die Reaktion wird durch AmpliTaq-FS katalysiert. Dabei handelt es sich um eine gentechnisch veränderte, thermostabile DNA- Polymerase, die den Einbau von ddNTPs ermöglicht sowie eine geringe 5'-3'-Nukleaseaktivität aufweist. Der Einbau von ddNTPs in den neu synthetisierten DNA-Strang bewirkt den Abbruch der Synthese und es entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge. Diese Fragmente können mit Hilfe des ABI Prism310 Genetic Analyser analysiert werden. Die Proben wandern durch eine mit einem Polymer gefüllte Glaskapillare und werden entsprechend ihrer Länge aufgetrennt. Die Fluoreszenz der ddNTPs wird von einem Laserstrahl angeregt und mit einer Kamera detektiert. Die Daten werden mit entsprechender Software weiterverarbeitet.

Ansatz der Sequenzierreaktion:

30-90 ng Template*
 2 µl Terminator Ready Mix
 3 µl Puffer
 1 µl Primer 10 pmol (forward oder reverse)**
 ad 20 µl H₂O

Sequenzier-Bedingungen:

96 °C	1 min	} 25x
96°C	10 sec	
55/60°C	5 sec	
60°C	4 min	
4°C bis zur Fällung		

* aufgereinigtes PCR-Produkt oder aufgereinigte Plasmid-DNA

** siehe 2.8.3.

Zur Umpufferung und zur Entfernung überschüssiger fluoreszenzmarkierter ddNTPs wird die Sequenzierreaktion Ethanol-präzipitiert (3.1.9.). Anschließend wird das Pellet in 25 µl TSR (Template Suppression Reagent) resuspendiert und in ein Sequenziergefäß überführt. Nachdem die DNA 5 min bei 97°C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt wurde, erfolgt die Analyse mit dem ABI Prism310 Genetic Analyser.

3.1.15. Southern-Blot

Die Methode des Southern-Blots wird angewendet, um im Gel aufgetrennte DNA auf Membranen zu transferieren. Dazu wird DNA, die zuvor einem Restriktionsverdau unterzogen wurde (3.1.5.), in einem 0.7%igem Agarosegel für 4-5 Stunden bei 70 V aufgetrennt. Um die Transfereffizienz der DNA auf die Membran zu erhöhen, wird die DNA vor dem Transfer partiell depuriniert. Dafür wird das Gel für 20 min in verdünnter Salzsäure (0.2 M) geschwenkt. Anschließend erfolgt eine Denaturierung in verdünnter Natronlauge (0.4. N) für 30 min, um die Phosphordiesterbindungen an den apurinischen Stellen des DNA-Rückrats zu spalten. Dadurch kommt es zu einer Fragmentierung der DNA. Der Transfer erfolgt bei RT, Ü.N. mittels eines Kapillarblots. Durch die Verwendung einer positiv geladenen Nylonmembran und einem alkalischen Blotpuffers wird die DNA während des Transfers kovalent an die Membran gebunden. Am nächsten Tag wird die Membran zur Neutralisation in 5x SSC geschwenkt, auf Whatmann-Papier getrocknet und bis zur weiteren Behandlung in Folie eingeschweißt. Im nächsten Schritt erfolgt die Prähybridisierung. Dazu wird die Membran mit der Seite, auf der die DNA gebunden ist, nach innen zusammengerollt und in ein verschließbares Glasröhrchen gegeben. In dieses werden 15-20 ml vorgewärmter Church-Puffer gegeben. Die Prähybridisierung erfolgt

für mindestens 4 h bei 65°C in einem Hybridisierungssofen. Vor der Hybridisierung wird der Church-Puffer erneuert und zusätzlich die radioaktiv markierte Sonde (3.1.16.) hinzugegeben. Die Hybridisierung erfolgt bei 65°C Ü.N.

Anschließend werden unspezifisch absorbierte Sonden gewaschen. Die Waschschrte erfolgen in einem Schüttelwasserbad bei 65°C. Dabei wird die Membran zweimal mit Waschlösung 1 für 10 min, einmal mit Waschlösung 2 für 15 min und zweimal mit Waschlösung 3 für 10 min gewaschen. Zum Schluss wird die Membran in eine Folie eingeschlagen und in einer Filmkassette für 1-7 Tage exponiert.

Puffer und Lösungen:

0.2 M HCl	200 ml 1 M HCl + 800 ml H ₂ O
0.4 N NaOH	80 ml NaOH (5N) + 920 ml H ₂ O
20 x SSC	175.3 gr NaCl (3M) 88.2 gr NaCitrat (0.3 M) ad 1000 ml H ₂ O pH = 7.0
Church-Puffer	1 mM EDTA 0.5 M NaPO ₄ pH = 7.2 7 % SDS
NaPO ₄ (1 M) pH = 7.2	171 ml Na ₂ HPO ₄ + 79 ml NaH ₂ PO ₄
Waschlösung 1	2x SSC + 0.1 % SDS
Waschlösung 2	1 x SSC + 0.1 % SDS
Waschlösung 3	0.1 x SSC + 0.1 % SDS

3.1.16. Herstellung radioaktiv markierter Sonden

2 µl (25 ng) der zu markierenden DNA-Probe werden mit 45 µl TE versetzt. Die Probe wird anschließend für 5-10 min bei 95°C denaturiert und für 5 min auf Eis gekühlt, bevor sie mit dem „Rediprime-Kit“ von Stratagene weiter aufbereitet wird. Dabei wird der Ansatz im blauen Lyophilisat eines Redprime Tubes gelöst, bevor 5 µl 32p-dCTP hinzugegeben werden. Der Ansatz wird für 10 min bei 37°C inkubiert, um die DNA-Probe radioaktiv zu markieren. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1.5 µl 0.5 M EDTA gestoppt und das Volumen mit 148.5 µl TE auf 200 µl gebracht.

Anschließend wird der Ansatz auf die zuvor vorbereitete Sephadex-Säule (3.1.17.) gegeben, die für 2 min bei 1000 rpm zentrifugiert wird, um die Probe von freien Nukleotiden zu reinigen. Nachdem mit 200 µl TE noch einmal nachgewaschen wurde, beträgt das finale Volumen 400 µl und reicht für zwei Hybridisierungen. Vor der Hybridisierung wird die markierte DNA-Sonde für 5-10 min bei 100°C denaturiert und anschließend für 5 min auf Eis gekühlt.

Lösungen:

TE:	10 ml 1M TrisCl, pH 7.4
pH 7.4	2 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0
0.5 M EDTA:	186.1 g EDTA*2H ₂ O
pH 8.0	20 g NaOH

3.1.17. Herstellung einer Sephadex-Säule

Eine 1 ml- Spritze wird mit etwas Glaswolle verstopft und mit Sephadex-G50 (in TE) gefüllt. Anschließend wird sie in ein 15 ml Reaktionsgefäß gehängt und 2 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Danach wird die Spritze noch einmal mit Sephadex-G50 gefüllt und für 2 min zentrifugiert. Durch Zugabe von 200 ml TE und anschließender Zentrifugation (2 min, 1000 rpm) wird die Säule gewaschen.

3.1.18. *In-vitro* Transkription DIG-markierter RNA-Sonden

Das Plasmid, das die zu transkribierende DNA enthält, wird über Hitzeschock-Transformation in *E.coli* und anschließender Maxi-Präparation aufkonzentriert. Generell können alle Plasmide für die Transkriptionsreaktion eingesetzt werden, die einen Polylinker enthalten, der von den Promotoren SP6, T3 oder T7 flankiert ist. Von dem jeweiligen Plasmid werden 10 µg mit Hilfe eines Restriktionsverdau linearisiert. Nach Agarosegel-Elektrophorese (3.1.13.) und Gelelution (3.1.7.) folgt die Aufreinigung der linearisierten Plasmid-DNA mittels Phenol-Chloroform Extraktion (3.1.8.) und Ethanol-Präzipitation (3.1.9.).

Der Transkriptionsansatz wird wie folgt angesetzt und für 2 h bei 37°C inkubiert:

1 µg	Linearisierte Plasmid-DNA
2 µl	10x DIG RNA Labeling Mix
2 µl	10x Transkriptionspuffer
2 µl	SP6 oder T7 RNA Polymerase (Roche)
20 µl	Gesamtvolumen

Anschließend wird der Ansatz durch Zugabe von 2,5 µl LiCL und 75 µl kaltem Ethanol bei -80°C für mindestens 30 min gefällt und durch Zentrifugation (15 min, 13000 rpm, 4°C) pelletiert. Das Pellet wird mit 50 µl eiskalten 70%igem Ethanol gewaschen und in 40 µl Formamid, 40 µl DEPC-H₂O und 2 µl Rnase Inhibitor gelöst. Um die Konzentration der DIG-markierten RNA-Sonde zu kontrollieren, werden 2 µl in einem Agarosegel aufgetrennt. Die Sonde kann sofort für die in situ Hybridisierung (3.4.11.) eingesetzt oder bei -80°C gelagert werden.

3.2. Proteinchemische Methoden

3.2.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgt photometrisch mit dem BCA (bicinchoninic acid) Proteinbestimmungs-Kit (BCA Protein Assay Kit, Pierce) nach der Biuret-Reaktion. Dabei wird im alkalischen Milieu Cu²⁺ durch Protein zu Cu¹⁺ reduziert (Smith, 1985). Ein Cu¹⁺-Molekül wird von zwei BCA-Molekülen gebunden. Dieser wasserlösliche Chelatkomplex ist lila und zeigt eine starke Lichtabsorption bei 562 nm. Diese Absorption steigt in einem Bereich von 20-2000 µg/ml linear mit steigender Proteinkonzentration an.

3.2.2. Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Geleelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt unter denaturierenden Bedingungen mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE nach der Methode von Lämmli (Laemmli, 1970). Es werden 15 µg der zu analysierenden Proteinproben im Verhältnis 1:4 mit 4-fach konzentriertem Lämmli-Probenpuffer versetzt, und anschließend für 10 min auf 95°C denaturiert. Die Proben werden anschließend in die Taschen des vorbereiteten Gels geladen und bei einer Stromstärke von 30 mA und einer Spannung von ca. 170 Volt

für etwa 2 h elektrophoretisch aufgetrennt. Nach diesem Vorgang kann das Gel für den Western-Blot eingesetzt werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten SDS-Polyakrylamid-Gele setzten sich aus 8%igen Trenngelen und 5%igen Sammelgelen zusammen, die nach folgender Tabelle pipettiert wurden:

Stammlösungen	Sammelgel	Trenngel
30% Akrylamidmix	5% Gesamtakrylamid	8% Gesamtakrylamid
0,75 M Tris (pH 6,8)	125 mM	-
0,75 M Tris (pH 8,8)	-	375 mM
10% SDS	0,1%	0,1%
10% APS	0,1%	0,1%
TEMED	0,01%	0,01%

Lösungen:

Laufpuffer: 50 mM Tris
 384 mM Glycin
 0,1% SDS

3.2.3. Immunoblotanalyse (Western-Blot)

Proteine können nach elektrophoretischer Auftrennung mit der Methode des Elektrotransfers (Towbin et al., 1979) auf Polyvinylidenfluorid- (PVDF-) Membranen übertragen und anschließend mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Der Transfer kann mit Hilfe einer Naßblot-Kammer (Trans-Blot-Cell; BioRad) durchgeführt werden. Die PVDF-Membran wird vor dem Transfer für 3 min in Methanol aktiviert und anschließend für 2 min in Transferpuffer äquilibriert. Das SDS-Polyakrylamid-Gel wird für 10 min in Transpuffer gewaschen und anschließend luftblasenfrei auf die PVDF-Membran gelegt. Auf beiden Seiten werden jeweils zwei in Transferpuffer getränkte Whatmann-Papiere, sowie jeweils ein in Transferpuffer getränkter Schwamm platziert. Diese Transfereinheit wird so in die Kammer gestellt, dass die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld zur Anode wandern und durch die hydrophoben Wechselwirkungen an die Membran binden. Der Transfer wird in gekühltem Transferpuffer über Nacht bei 30 V und 4°C

durchgeführt. Nach dem Transfer wird die Membran 5 min in PBS geschwenkt. Anschließend werden unspezifische Bindungsstellen der Membran für 1 h bei RT in PBSTM geblockt. Dann wird die Membran Ü.N. bei 4°C mit einem spezifischen Primärantikörper inkubiert. Dabei wird der Antikörper je nach Protokoll entweder in PBSTM oder PBSTB verdünnt. Nach Inkubation wird die Membran dreimal für jeweils 5 min mit PBST gewaschen. Der sekundäre, mit *horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelte Antikörper (IgG Maus und IgG Kaninchen) wird 1:2000 in PBSTM verdünnt und für 1 h auf die Membran gegeben. Er erkennt den Fc-Teil des ersten Antikörpers und kann durch Chemilumineszenz detektiert werden. Abschließend erfolgen drei Waschschriffe mit PBST für jeweils 5 min bevor eine Chemilumineszenz Detektion folgt.

Puffer und Lösungen:

PBST:	PBS plus 0,1% Tween 20
PBSTM:	PBST plus 5% Magermilchpulver
PBSTB:	PBST plus 5% BSA
Transferpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% Methanol

3.2.4. Chemilumineszenz-Detektion

Die an die Sekundärantikörper konjugierte Peroxidase katalysiert unter alkalischen Bedingungen die Oxidation von Luminol. Als direktes Reaktionsprodukt entsteht eine elektronisch angeregte Form des 3-Aminophthalats, das bei Relaxation in den elektronischen Grundzustand Strahlung abgibt. Diese reicht aus, um einen Röntgenfilm zu belichten. Die Chemolumineszenz-Reaktion wird mit dem SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (PIERCE) durchgeführt. Die Membran wird für 2 min in der Lösung inkubiert und anschließend in eine Fotokassette mit Röntgenfilm gelegt, der nach einer entsprechenden Expositionszeit entwickelt wird.

3.2.5. Entfernen von Antikörpern und Reaktionslösung („strippen“)

Nach der Chemilumineszenz-Detektion kann die PVDF-Membran mit den immobilisierten Proteinen einer weiteren Detektion mit Antikörpern unterzogen

werden. Dafür wird die Membran 30 min bei 60°C mit Stripping-Puffer gewaschen, um Reaktionslösung sowie Primär- und Sekundärantikörper zu entfernen. Nach der Inkubation mit Stripping-Puffer wird die Membran zweimal für jeweils 10 min mit PBST gewaschen und kann danach wie gewohnt mit PBSTM geblockt werden.

Puffer:

Stripping-Puffer: 100mM Mecaptoethanol
2% SDS
62,5 mM Tris pH 6,6

3.3. Tierpräparation und Zellkultur

3.3.1. Tierhaltung

Die Mäuse werden in Plastikkäfigen auf Streu gehalten und erhalten Trockenfutter und Wasser *ad libitum*. Tag- und Nachtzyklus betragen jeweils 12 h. Zur Identifikation werden die Tiere im Alter von vier Wochen mit nummerierten Ohrmarken versehen und es wird eine Schwanzbiopsie zur DNA-Gewinnung durchgeführt (3.3.3.). Zur Gewinnung von Embryonen werden die Mäuse verpaart und am nächsten Morgen auf den Vaginalpropf untersucht, der eine erfolgreiche Verpaarung anzeigt. Der Mittag des Tages nach der Verpaarung ist Tag 0,5 nach Konzeption (E 0,5).

3.3.2. Entnahme von Geweben

Neugeborene Mäuse werden durch Enthauptung, adulte Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Die Gewebe werden unmittelbar entnommen und entweder in geeigneten Gefäßen gelagert oder sofort weiterverarbeitet. Für die RNA Isolation oder Proteinextraktion werden entsprechende Gewebe in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße oder Plastikröhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert. Gewebe für histologische Analysen werden in entsprechende Fixierlösungen überführt.

3.3.3. DNA-Isolation aus Schwanzbiopsien der Maus

Die Maus wird durch Anbringen einer Ohrmarke markiert und etwa 0,5 cm der Schwanzspitze wird abgeschnitten. Die Schwanzspitze wird über Nacht in 710 µl

Lyse-Puffer und 40 µl Proteinase K Lösung (10 mg/ml) bei 55°C im Brutschrank lysiert. Am nächsten Morgen wird die Probe zunächst 5 min bei RT gemischt. Danach wird der Probe 300 µl 5 M NaCl zugegeben, bevor sie erneut 5 min gemischt und 10 min bei 13000 rpm und 10°C zentrifugiert wird. In ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß werden 500 µl Isopropanol vorgelegt und 750 µl des Probenüberstandes werden überführt. Die Fällung der DNA erfolgt durch 10-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C. Das so erhaltene Pellet wird zweimal mit 500 µl 80%igem Ethanol gewaschen, bei 37°C 30 min getrocknet und anschließend in 400 µl H₂O aufgenommen. Abschließend wird die DNA 2 h bei 37°C gelöst und kann danach für eine PCR eingesetzt werden. Die Sequenzen der Oligonukleotide, die eingesetzt wurden, um die in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien zu genotypisieren, sind in 2.8.2. aufgeführt.

Lyse-Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 8,0
100 mM EDTA
100 mM NaCl
1% SDS

3.3.4. Isolierung von primären Knochenzellen aus Mauskalvarien

Fünf Tage alte Mäuse werden durch Enthauptung getötet, der Schädel wird für 5 min in 70%igem Ethanol desinfiziert und dann unter einem Stereomikroskop freigelegt. Um Knochenzellen aus Gewebe zu isolieren, das von Neuralleistenstammzellen abstammt, werden die Nasen- und Stirnknochen aus dem Schädel herausgeschnitten, von umgebenem Gewebe freipräpariert und in PBS überführt. Die nachfolgenden Schritte finden unter einer Sterilbank statt. Zunächst werden die Knochen zweimal für jeweils 7 min bei 37°C in 1 ml EDTA (4mM) entmineralisiert. Nach drei kurzen Waschsritten in PBS werden die Knochen einmal mit 1 ml 0,1%iger Collagenase Typ IV inkubiert. Der Überstand wird verworfen und es folgt eine weitere Inkubation mit 5 ml Collagenase für 20 min bei 37°C. Der Überstand wird mit 5 ml Medium durch ein Zellsieb in ein 50 ml Blaukappenröhrchen gespült. Dieser Vorgang wird zwei weitere Male wiederholt, bei denen mit dem Kolben einer 10 ml Spritze auf das Sieb gedrückt wird, bevor mit Medium nachgespült wird, um eventuell hängengebliebene Zellen zu lösen. Die Zellsuspension wird für 5 min bei

1200 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wird im 10 ml Wachstumsmedium gelöst und auf eine 10 cm Kulturschale ausplattiert.

3.3.5. Kultivierung von primären Knochenzellen

Die primären Knochenzellen werden im Wachstumsmedium in einem Inkubator bei 5-10% CO₂, 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Es werden nur einmal passagierte Zellen für die Versuche verwendet. Das Medium wird alle 2-3 Tage gewechselt.

Wachstumsmedium: DMEM; 10% FCS; 2 mM Glutamin; Penicillin, Streptomycin

3.3.6. Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wird ein Tropfen einer Einzelzellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unter dem Lichtmikroskop werden vier Großquadrate ausgezählt. Der Mittelwert (X) entspricht einer Gesamtzellzahl von $X \times 10^4$ /ml.

3.3.7. Passagieren der Zellen

Eine Kulturschale wird zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit Trypsin bedeckt und für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von Medium gestoppt. Das Ablösen der Zellen von der Kulturschale wird unter einem Mikroskop kontrolliert. Danach wird das Medium auf- und abpipettiert, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, mit der die Zellzahl bestimmt wird. Jetzt werden die Zellen für 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird durch Schnippen gelöst und in der entsprechenden Mediummenge resuspendiert, die notwendig ist, um die Zellen in der erwünschten Konzentration auf Kulturschalen zu verteilen.

3.3.8. Induktion osteogener Differenzierung

Es werden je 5×10^4 Zellen in ein Loch einer 6-Lochplatte ausplattiert. Nachdem die Zellen für 48 h in Wachstumsmedium kultiviert wurden, wird das Medium durch Differenzierungsmedium ersetzt. Dieser Zeitpunkt wird auf Tag 0 gesetzt. Die Differenzierung der Zellen verläuft über einen Zeitraum von 15 Tagen.

Differenzierungsmedium: Wachstumsmedium plus 50 µg Vitamin C
10 mM β-Glycerophosphat

3.3.9. Behandlung der Zellen mit U73122

Die Zellen werden, wie in 3.3.8. beschrieben, kultiviert. Um den PLC γ Signalweg zu hemmen, wird dem Differenzierungsmedium zusätzlich der PLC γ -spezifische Inhibitor U73122 (5 µM in DMSO) zugefügt und die Zellen jeden Tag mit diesem Medium gefüttert.

3.3.10. Fixieren von Zellen

Die Zellen werden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend für 5 min auf Eis in Fixierungslösung inkubiert.

Fixierungslösung: 40 µl Glutaraldehyd (25%)
270 µl Formaldehyd (30%)
10 µl MgCl₂
ad 5 ml PBS

3.3.11. Isolierung von RNA aus Gewebe und Zellen

Die RNA-Isolierung aus Gewebe und Zellen erfolgt mit dem Rneasy Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Dabei wird dem Lysispuffer für jede Isolation frisch 1% β-Mercaptoethanol hinzugefügt.

Lyse von Gewebe

Nicht mehr als 30 mg Gewebe wird in ein 15 ml Blaukappenröhrchen mit 600 µl Lysispuffer gegeben und im Ultrawrax zerkleinert. Es folgt eine Zentrifugation für 3 min bei 13000 rpm. Der Überstand mit dem Zelllysat wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Lyse von Zellen

Die Zellen werden zweimal kurz mit PBS gewaschen und mit 350 µl Lysispuffer versetzt. Das so entstandene zähflüssige Zelllysat wird mit einem Zellschaber abgekratzt, in ein Reaktionsgefäß überführt und mit einem Vortex Mischer gemischt.

Anschließend wird das Lysat auf eine „Qia-Shredder-Spinsäule“ überführt und 2 min bei 13,000 rpm zentrifugiert.

Das Lysat wird mit einem Volumen 70%igem Ethanol gemischt, in eine „Rneasy-Mini-Säule“ pipettiert und 15 sec bei 10000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, werden 700 µl Puffer RW1 auf die Säule pipettiert und es folgt erneut eine Zentrifugation für 15 sec bei 10000 rpm. Die Säule wird in ein neues Gefäß überführt, mit 500 µl Puffer RPE beladen und wieder für 15 sec bei 10000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wird für 1 min bei 13000 rpm wiederholt. Zur Elution der RNA wird die Säule in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 30 µl DEPC-H₂O 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Die Konzentration der RNA-Lösung wird im Photometer bestimmt. Die RNA wird bei -80°C aufbewahrt.

3.3.12. Isolierung von Proteinen aus Zellen

Die Zellen werden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, bevor sie mit 100 µl RIPA-Puffer (pro Loch einer 6-Lochplatte) bedeckt werden. Dann werden die Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturschale gelöst und im RIPA-Puffer in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Ansatz wird für 10 min auf Eis inkubiert und dabei einige Male gemischt. Anschließend folgt ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 13.000 rpm für 10 min. Der Überstand, der den Proteinextrakt enthält, wird abgenommen, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

RIPA-Puffer: 10 mM Tris pH 7,2
 5 mM EDTA
 150 mM NaCl
 0,1% SDS
 1% TritonX 100
 1% Deoxychlat
 1Tablette/10ml Protease Inhibitor Cocktail (Roche)

3.3.13. Cre-Transduktion von ES-Zellen

Es werden $2 \cdot 10^3$ ES-Zellen auf eine 10cm Kulturschale ausplattiert. Nach Adhäsion der Zellen wird das Medium durch frisches Medium ersetzt, welchem zuvor das in

Glycerin gelöste Cre-Protein in einer Endkonzentration von 5 μ M zugegeben wurde. Nach 18 h erfolgt erneut ein Mediumwechsel.

3.4. Histologische und Immunhistochemische Untersuchungen

3.4.1. Gewebefixierung

Das frisch präparierte Gewebe wird Ü.N. bei 4°C in einer 4%igen neutral gepufferten Formalinlösung fixiert, um die Proteine quervernetzen und so das Gewebe vor Zersetzung zu schützen.

3.4.2. Entmineralisierung

Das Gewebe wird mit der schonenden EDTA-Methode entmineralisiert, wobei EDTA mit den Ca_{2+} -Ionen einen Komplex eingeht. Dabei wird das fixierte Präparat in EDTA-Lösung überführt und bei Schaukeln je nach Größe 30 min bis mehrere Stunden darin inkubiert.

3.4.3. Paraffineinbettung

Nach Fixierung und eventueller Entmineralisierung werden die Präparate zugeschnitten, in Einbettkassetten überführt und unter fließendem Wasser ausgiebig gewässert, bevor sie in die Einbettmaschine gelegt werden. Hier durchlaufen die Präparate zuerst eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 60%, 70%, jeweils 1 h 35 min; 80%, 96%, 2x 100%, jeweils 1 h), werden dann in Xylol (1 h, 2x 30 min) und schließlich in Paraffin überführt (3x 1 h) und in diesem bis zur weiteren Verwendung gelagert. Am nächsten Tag werden die Präparate aus den Einbettkassetten genommen und in Paraffinblöcke gegossen. Die Paraffinblöcke werden bei RT aufbewahrt.

3.4.4. Herstellung von Paraffinschnitten

Die Paraffinblöcke werden in ein Mikrotom eingespannt und Schnitte von 1-3 μ m Dicke werden angefertigt. Die Schnitte werden bei 45°C im Wasserbad geglättet, auf fettfreie Objektträger aufgezogen und bei 50°C über Nacht im Brutschrank getrocknet.

3.4.5. Entparaffinierung

Zur vollständigen Entparaffinierung werden die Objektträger mit den Gewebeschnitten in folgenden Lösungen bei RT inkubiert:

Xylol:	2x 10 min	
Ethanol-Reihe: 100%	}	jeweils 5 min
96%		
70%		
50%		
H ₂ Odd:	5 min	

3.4.6. Hematoxilin Eosin (H/E) Färbung

Die H/E Färbung wird als Übersichtsfärbung von Gewebeschnitten angewendet. Dabei werden basophile Zellstrukturen (Chromatin der Zellkerne) blau und azidophilen Strukturen (Zytoplasma) rot angefärbt. Die Schnitte werden zunächst entparaffiniert (3.4.5). Anschließend folgt eine Färbung in Hämalaun für 3 min mit nachfolgendem Bläuen im warmen Leitungswasser für 10 min. Die Färbung mit Eosin erfolgt danach für 30 sec. Über eine aufsteigende Alkoholreihe werden die Schnitte rehydriert bevor sie mit Aquatex und Deckgläsern eingedeckelt werden.

Saures Hämalaun nach Mayer: (Stammlösung)	1g Hämatoxylin in 1000 ml H ₂ Odd lösen + 0.2g NaJO ₃ 50g Kalialaun
Hämalaun Gebrauchslösung:	100 ml Stammlösung 5 g Chloralhydrat 0,1 g Zitronensäure vor Gebrauch filtrieren
Wässrige Eosinlösung:	1% Eosin-Y in 100ml Aqua.Dest. 1 Tropfen Eisessig

3.4.7. Giemsa-Färbung

Die Präparate werden mit Giemsa gefärbt, um den Knochenaufbau deutlich darstellen zu können. Giemsa liefert einen sehr guten Farbkontrast zwischen weichem und hartem Bindegewebe, wodurch sich neugebildetes Osteoid sehr gut

von mineralisierter Matrix unterscheiden lässt. Dabei färben sich Zellkerne dunkelblau, Osteoid blassblau und mineralisierte Matrix rosa.

3.4.8. Von-Kossa-Färbung von Zellen

Eine Standardmethode zum Nachweis ungelöster Calciumsalze im Knochengewebe oder mineralisierter Kultur ist die Methode nach von-Kossa. Dabei wird das Calcium in der extrazellulären Matrix gegen Silberionen ausgetauscht, die anschließend zu metallischem Silber reduziert werden. Die Färbung wurde in einer modifizierten Form nach (Chaplin and Grace, 1975) durchgeführt. Die fixierten Zellen (3.3.10.) werden zweimal mit H_2O_{dd} gewaschen, mit Silbernitratlösung bedeckt und unter Lichtabschluss für 30 min bei RT inkubiert. Im Anschluss werden die Zellen erneut zweimal mit sterilem Wasser gewaschen. Durch Zugabe von Natriumcarbonatlösung erfolgt innerhalb von zwei Minuten die Reduktion, die durch Waschen mit H_2O_{dd} gestoppt wird. Kalziumablagerungen in der extrazellulären Matrix färben sich durch die Reduktion des Silbers je nach Stärke der Mineralisierung braun bis schwarz.

Lösungen:

Silbernitratlösung: 5% $AgNO_3$ in H_2O_{dd}
filtrieren und unter Lichtabschluss aufbewahren

Natriumcarbonatlösung: 5% Na_2CO_3 in H_2O_{dd}
100 μ l Formaldehyd

3.4.9. Alkalische-Phosphatase-Färbung von Zellen

Die Zellen werden fixiert (3.3.10.) und anschließend zweimal kurz mit PBS gewaschen. Danach erfolgt die Färbung mit dem „Vectastain Alkaline Phosphatase Substrate Kit III“ (Vector). Zu 5 ml 100 mM Tris-HCl pH 8,5 werden 2 Tropfen Lösung A zugegeben und geschüttelt. Das Gleiche wird nacheinander mit Lösung B und Lösung C wiederholt. Diese Gebrauchslösung wird auf die Zellen gegeben, welche jetzt 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert werden. Danach werden die Zellen mit H_2O_{dd} gewaschen und können bei 4°C aufbewahrt werden. Die Auswertung der Färbung erfolgt mit einem Lichtmikroskop.

3.4.10. Proliferationsassay

Die Proliferationsrate von Zellen wird durch einen BrdU-Assay (Merck) bestimmt. Dabei inkorporieren Zellen, die sich in der S-Phase befinden, das Thymidinanalog Bromdeoxyuridin (BrdU), welches durch eine Antikörperreaktion nachgewiesen werden kann.

BrdU-Inkorporation in Mäusen

Ammenmütter werden intraperitoneal mit BrdU injiziert (10mg/Maus). Nach 2 h werden die Mäuse getötet und die Embryonen wie in 3.3.4. beschrieben präpariert. Die freigelegten Schädelknochen werden Ü.N. fixiert (3.3.4.), für 30 min entmineralisiert, eingebettet, mit dem Mikrotom geschnitten und kurz vor dem BrdU-Assay schließlich entparaffiniert.

BrdU-Inkorporation in Zellen

Für die *in-vitro* BrdU-Inkorporation in Zellen werden 2×10^4 Zellen auf einen 2-Kammer Objektträger ausplattiert. Nach 24 h erfolgt eine Inkubation mit BrdU (10 μ M) für 6 h. Anschließend werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 70%igen Ethanol für 15 min bei 4°C fixiert und luftgetrocknet.

Der Nachweis der BrdU-Inkorporation erfolgt mit dem BrdU Immunhistochemie System (Merck) nach Angaben des Herstellers. Dabei werden das Gewebe oder die Zellen zuerst mit einem Biotin-markierten Anti-BrdU-Antikörper inkubiert, an den in einem zweiten Schritt ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat bindet. Durch eine abschließende Färbereaktion mit AEC (Chromagen-Substratgemisch) werden die BrdU-positiven Zellen rot gefärbt. Anschließend erfolgt eine Gegenfärbung mit Hämalaun bevor die Proben mit Aquatex eingedeckelt werden. Die Auswertung erfolgt unter dem Lichtmikroskop.

3.4.11. Apoptose-Assay

Der Nachweis von apoptotischen Zellen erfolgt mit dem ApopTag Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit von Chemicon basierend auf der TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling). Dabei werden an die freien Hydroxylgruppen der DNA-Strang-Brüche, die während der Apoptose durch Endonukleasen erzeugt werden, Digoxigenin-markierte dNTPs gebunden. Dieser Vorgang wird durch

das Enzym TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) katalysiert. In einem zweiten Schritt werden die markierten dNTPs durch einen Peroxidase-gekoppelten anti-DIG-Antikörper gebunden. Durch die Zugabe von AEC (Chromagen-Substratgemisch) werden die apoptotischen Zellen rot gefärbt. Abschließend erfolgt eine Gegenfärbung mit Hämalaun bevor die Proben mit Aquatex eingedeckelt werden. Die Auswertung erfolgt unter dem Lichtmikroskop.

3.4.12. *In-situ* Hybridisierung

Für die Darstellung des Expressionsmusters einzelner Gene während der Entwicklung im Mausembryo kann die Methode der Hybridisierung von DIG-markierten antisense RNA-Sonden eingesetzt werden (*in-situ*-Hybridisierung). In dieser Arbeit wurde durch diese Methode die Expression von Bone-Sialoprotein-2 (Bsp2) in den Schädelknochen E 16,5 bzw. E 19,5 Mausembryonen nachgewiesen. Dabei werden die Embryonen zu den entsprechenden Zeiten aus dem Uterus einer Ammenmutter entnommen und wie in 3.3.4. beschrieben präpariert. Die Knochen werden Ü.N. in 4% Paraformaldehyd(PFA)/PBS bei 4°C fixiert und dann in einer aufsteigenden Methanolreihe (25%, 50%, 75%, 100% MeOH/DEPC-H₂O) dehydriert. Die Knochen können bei -20°C gelagert werden.

Die *in situ* Hybridisierung erfolgt in folgenden Schritten:

1. Tag (Prozessierung, Prähybridisierung, Hybridisierung)

Die in Methanol gelagerten Knochen werden in einer absteigenden Methanolreihe (100%, 75%, 50%, 25% MeOH/DEPC-H₂O) jeweils für 10 min und anschließend dreimal in PBSw jeweils für 5 min gewaschen. RNA assoziierte Proteine werden durch einen Verdau mit ProteinaseK (4,5 µg/ml) in PBSw beseitigt. Dabei werden die Schädelknochen von E 16,5 für 5 min und von E 19,5 für 10 min bei RT inkubiert. Der Verdau wird mit 2mg/ml Glycin gestoppt und die Knochen danach zweimal für 5 min mit PBSw gewaschen. Es folgt eine Refixierung der Knochen mit 4% PFA und 0,2% Glutaraldehyd in PBSw für 15 min und drei Waschschrte mit PBSw für jeweils 5 min. Die Knochen werden zuerst in 1ml 50%PBSw/50% HybMix und anschließend in 100% HybMix überführt. Dabei wird immer gewartet bis die Knochen abgesunken sind. Nachdem der HybMix durch frischen HybMix ersetzt wurde, erfolgt eine Prähybridisierung von 3 h bei 50°C. Für einen Hybridisierungsansatz werden 200 ng DIG-markierter RNA-Sonde (3.1.18.) in 100 µl HybMix aufgenommen und für 5 min

bei 95°C denaturiert. Die Sonde und weitere 900 µl HybMix werden zu der Probe gegeben und die Hybridisierung erfolgt Ü.N. bei 50°C.

2. Tag (Waschschritte, Antikörper-Inkubation)

Die Knochen werden mit eiskaltem HybMix für 5 min bei 50°C gewaschen. Zu den Knochen werden dreimal jeweils 400 µl 2x SSC pH 4,5 zugegeben, ohne beim ersten Mal den HybMix zu entfernen. Danach wird die Lösung durch 2xSSC pH 7,0 ersetzt und für 30 min bei 50°C gewaschen. Dieser Schritt wird wiederholt, bevor die Knochen zweimal für 10 min bei RT mit MAB-Puffer gewaschen werden. Danach erfolgen zwei Waschschritte mit MAB-Puffer für jeweils 30 min bei 50°C und dann drei Waschschritte mit MAB-Puffer jeweils 10 min bei RT. Die Knochen werden anschließend in BM-Block-Puffer für 2 h bei 4°C und bei leichtem Schaukeln inkubiert. Zeitgleich wird der DIG-AP-Antikörper geblockt, indem der Antikörper 1/10000 in BM-Block-Puffer verdünnt und auch für 2 h bei 4°C inkubiert wird. Anschließend wird der BM-Block-Puffer durch die Antikörperlösung ersetzt und der Ansatz Ü.N. bei 4°C und leichtem Schaukeln inkubiert.

3. Tag (Waschschritte, Entwicklung)

Die Knochen werden zuerst kurz und anschließend fünfmal für 45 min in BSA/PBSw gewaschen. Es folgen zwei Waschschritte in PBSw für jeweils 30 min. Dann werden die Knochen in 24-well Platten überführt, in die AP1-Puffer vorgelegt wurde. Nach 10 min wird der AP1-Puffer ersetzt und die Knochen werden noch einmal für 10 min gewaschen. Dann wird der AP1-Puffer gegen BM purpel ausgetauscht und es folgt eine Inkubation im Dunkeln bei leichtem Schaukeln. Die Färbereaktion wird dabei häufiger unter dem Mikroskop kontrolliert, um eine Überfärbung zu verhindern. Die Färbung wird gestoppt, indem die Knochen dreimal mit PBSw gewaschen werden. Bei der Durchführung der *in situ* Hybridisierung mit der antisense Bsp2-Sonde kann die Färbereaktion nach 1 h gestoppt werden. Um unspezifische Färbung auszuschließen, wird parallel eine *in situ* Hybridisierung mit einer sense Bsp2-Sonde durchgeführt.

Puffer und Lösungen:

PBSw:	PBS plus 0,1% Tween 20
PFA:	4 g PFA in 90 ml DEPC-H ₂ O erhitzen auf 60°C 10 N NaOH bis Lsg. klar wird 10 ml 10x PBS pH 7 mit 5M HCl einstellen
Hybridisierungsmix (HybMix):	5 g Boehringer Block 25 ml Formamid 12,5 ml 20xSSC pH 7 5 ml Hefe tRNA (10mg/ml) 100 µl Heparin (50 mg/ml) 250 µl Tween 20 500 µl CHAPS (10%) 500 µl EDTA (0,5 M) ad 50 ml H ₂ O
MAB-Puffer:	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl pH 7,5 in PBSw
BM-Block-Puffer:	10% Schafserum 1% Boehringer Block in PBSw erhitzen auf 60°C
BSA/PBSw:	0,1% BSA in PBSw
AP1-Puffer:	100 mM Tris pH 9,5 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂

3.4.13. Schädelpräparation

Die Mäuse werden getötet und die Köpfe Ü.N. in Leitungswasser gelagert. Am nächsten Tag werden die Köpfe für 1 min bei 65°C erhitzt. Danach werden die Schädel ordentlich freipräpariert, bevor sie Ü.N. in 100%igen Ethanol fixiert werden. Dann werden die Schädel in Alcian-Blau-Lösung überführt, um Knorpelstrukturen anzufärben. Es folgt ein Waschschrift mit 100%igen Ethanol für 24 h. Anschließend werden die Knochen mit Alizarin-Rot-Lösung Ü.N. gefärbt. Dabei werden weiche

Gewebe durch die KOH-haltige Lösung verdaut. Die Schädel werden danach in einer 1%igen KOH-Lösung geklärt und abschließend in einer steigenden Glyzerinreihe (25%, 50%, 75% in H₂O, 100%) überführt, wobei sie in 100% Glyzerin gelagert werden. Die Auswertung der Färbung erfolgt an einem Stereomikroskop.

Alcian-Blau-Lösung: 150 mg/l Alizarin-Blau in 80% Ethanol

Alizarin-Rot-Lösung: 50 mg/l Alizarin-Rot in 2% KOH

3.5. Quantitative Auswertung

Die quantitative Auswertung der Western-Blot-Analysen und der von-Kossa-Färbung erfolgt mit dem Java Programm ImageJ (Image Processing and Analysis in Java).

4. Ergebnisse

4.1. Funktionalitätstest der loxP- Elemente in R26^{hPDGFR α PM}-ES-Zellklonen

Im Rahmen meiner Diplomarbeit hatte ich bereits R26^{hPDGFR α PM}-ES-Zellklone hergestellt. Bevor diese zur Generierung eines transgenen Mausmodells verwendet wurden, sollte durch eine Cre-Transduktion die Funktionalität der loxP-Elemente in den insgesamt vier positiven R26^{hPDGFR α PM}-ES-Zellklonen überprüft werden. Dafür wurden die Klone mit einem HTN-Cre-Fusionsprotein für 18 Stunden inkubiert (Peitz et al., 2007) (Abb. 4.1. A). Dieses besteht aus einem His-Tag, welcher die Aufreinigung des Proteins aus einem Bakterienstamm ermöglicht, sowie einer Protein-Transduktions-Domäne (PTD) und einem Kernerkennungssignal (NLS).

A



B

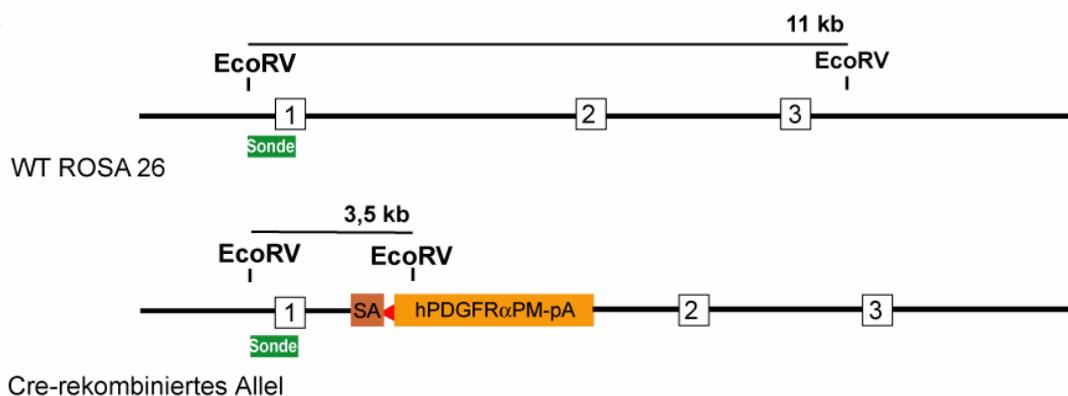


Abb. 4.1. Aufbau des HTN-Cre-Fusionsproteins und Southern-Blot-Strategie nach Cre-Transduktion. (A) H = His-Tag; TAT = basisches Peptid aus HIV-TAT (transactivator of transduktion); NLS = Kernerkennungssequenz. (B) Offene Kästchen = Exone des endogenen ROSA26-Allels; grün = Sonde140; SA = Splice-Akzeptor-Sequenz; rote Pfeile = loxP-Elemente; pA = Polyadenylsequenz.

Bei der PTD handelt es sich um ein basisches Peptid aus dem HIV-TAT-Protein (TAT = transactivator of transcription) und ermöglicht die Aufnahme des Fusionsproteins über Endozytose in das Zytoplasma einer Zelle. Die NLS-Domäne transloziert

anschließend das Protein in den Nukleus, wo die Cre-Rekombinase die Exzision der Stoppkassette katalysiert.

Bei einer korrekten Insertion der loxP-Elemente in den ROSA26-Lokus und gleichzeitiger Funktionalität der Elemente, wird nach der Cre-Transduktion die EcoRV-Schnittstelle innerhalb der PDGFR α -cDNA im knock-in Allel zum 5`-Ende verlagert (Abb. 4.1. B). Nach anschließender EcoRV-Restriktion der genomischen DNA und Southern-Blot-Analyse der rekombinanten ES-Zellklone, kann mit Hilfe der Sonde140 ein 11-Kb-Fragment für das wildtyp ROSA26-Allel (WT ROSA 26) und anstatt eines 5-Kb-Fragments ein 3,5-Kb-Fragment für das knock-in Allel detektiert werden (vergl. Abb. 1.10.).

Alle vier R26^{hPDGFR α PM}-ES-Zellklone wiesen die erwarteten Fragmentgrößen auf (Abb. 4.2.).

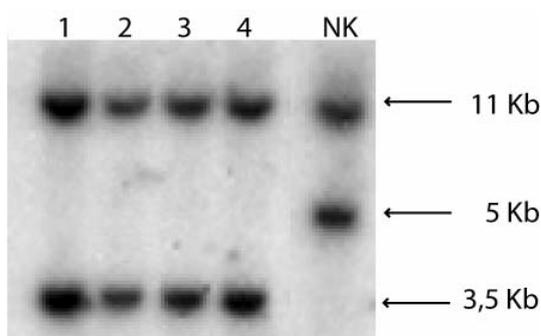


Abb. 4.2. Nachweis der Funktionalität der loxP-

Elemente mittels Southern-Blot-Analyse.

1 – 4 = Ergebnis der Southern-Blot-Analyse nach Cre-Transduktion und EcoRV-Restriktion der vier positiven R26^{hPDGFR α PM}-ES-Zellklone

NK = Cre-unbehandelter Klon als Negativkontrolle

4.2. Generierung der R26^{hPDGFR α PM}- Mauslinie

Die R26^{hPDGFR α PM}-ES-Zellklone wurden im nächsten Schritt dazu verwendet, ein transgenes Mausmodell zu generieren, das die konditionale Expression eines autoaktiven PDGFR α ermöglicht. Dafür wurden die rekombinanten ES-Zellklone in das Blastozoele von E 3.5 Mausembryonen (Blastozysten) injiziert, welche in den Uterus von seit 60 Stunden scheinchwangeren Ammenmüttern transferiert und von diesen ausgetragen wurden. Die Blastozysten stammten aus einem Balb/c-Mausstamm mit weißer Fellfarbe. Da die ES-Zellen ursprünglich aus einem C57/Bl6J;129Sv-Hybridmausstamm mit brauner (agouti) Fellfarbe isoliert wurden, ließ sich an Hand der Fellfarbe der Nachkommen (Chimäre) abschätzen, zu welchem Anteil die mutierten ES-Zellklone am Aufbau der Gewebe beteiligt waren.

Es wurden zwei $R26^{hPDGFR\alpha PM}$ -ES-Zellklone für die Herstellung von insgesamt 68 manipulierten Blastozysten verwendet. Nach dem Transfer in den Uterus wurden von den Ammenmüttern 20 Nachkommen ausgetragen, unter denen sich 7 Chimären befanden. Nach Abschätzung der Fellfarbe lag der Anteil der mutierten ES-Zellen am Aufbau der Gewebe in den einzelnen Chimären bei 5% -90% (Abb. 4.3.).



Abb. 4.3. Chimären nach Blastozysteninjektion.

Das Photo zeigt 3 Chimären mit unterschiedlichem Beitrag der $R26^{hPDGFR\alpha PM}$ -ES-Zellklone am Aufbau der Gewebe: Links = 90%; Mitte = 5%; Rechts = 30%.

Zur Etablierung des $R26^{hPDGFR\alpha PM}$ -Mausstammes mussten die mutierten ES-Zellklone an der Bildung der Keimzellen beteiligt sein. Als Test auf Keimbahntransmission wurden die Chimären mit Balb/c-Wildtypmäusen verpaart. Nur die aus dieser Verpaarung stammenden Nachkommen mit brauner Fellfarbe konnten eine Keimbahntransmission für die genetische Veränderung auf einem Allel tragen. Von insgesamt 99 Nachkommen hatten 78 Tiere ein braunes Fell und mussten mittels der 3-Primer-PCR auf das Vorhandensein des knock-in Allels genotypisiert werden (Abb. 4.4.).

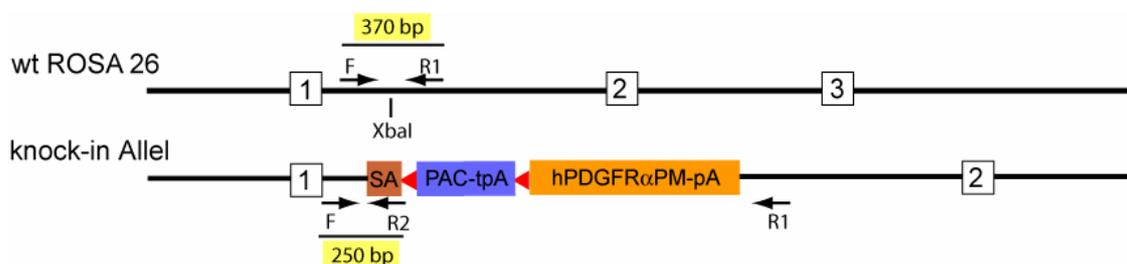


Abb. 4.4. Schema der 3-Primer-PCR. Primer F amplifiziert mit Primer R1 ein 370-bp-Fragment und mit Primer R2 ein 250-bp-Fragment. Somit lässt sich das Wildtypallel (wt ROSA 26) von einem knock-in Allel unterscheiden.

Bei dieser PCR grenzen die Primer F und R1 die XbaI-Schnittstelle im Intron1 des wildtyp ROSA26-Lokus ein und amplifizieren ein 370-bp-Fragment. Im knock-in Allel, welches durch die Insertion des Targeting-Vektors in die XbaI-Schnittstelle charakterisiert ist, ist die Bindestelle für den Primer R1 zum 3^{Pi}-Ende verlagert. Durch die Wahl einer geeigneten Elongationszeit wird in diesem Fall kein Amplifikat durch die Primer F und R1 gebildet. Stattdessen bildet Primer R2, der in der Splice-Akzeptor-Sequenz des Targeting-Vektors bindet, mit Primer F ein 250-bp-Fragment.

Analysiert man das PCR-Produkt mit einer Agarosegel-Elektrophorese erhält man eine einzelne 370-bp-Bande bei einer Wildtypmaus und zusätzlich eine 250-bp-Bande bei einer heterozygoten R26^{hPDGFR α PM}-Maus (Abb. 4.5.).

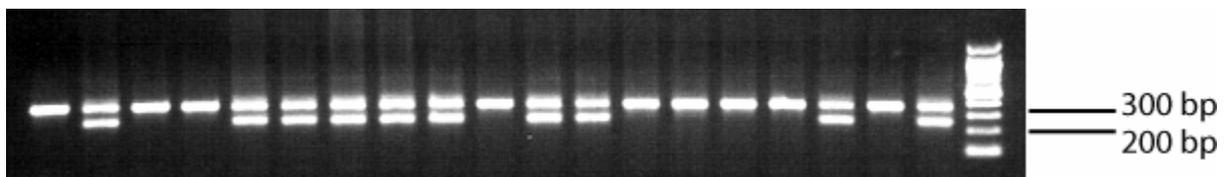


Abb. 4.5. Ergebnis der 3-Primer-PCR nach Auftrennung im Agarosegel. Es ist beispielhaft das Ergebnis der 3-Primer-PCR von 19 Mäusen dargestellt. Einzelne 370-bp-Bande = Wildtypmaus; 370-bp + 250-bp Bande = heterozygote R26^{hPDGFR α PM}-Maus.

Von den 78 Mäusen konnten mittels der 3-Primer-PCR insgesamt 19 Tiere positiv für eine Keimbahntransmission identifiziert werden. Damit war die Generierung der R26^{hPDGFR α PM}-Mauslinie erfolgreich abgeschlossen. Während der Zeit der Doktorarbeit wurde diese Mauslinie bis in die neunte Generation in den C57/Bl6J-Hintergrund zurückgekreuzt.

4.3. Generierung der Wnt1Cre;R26^{hPDGFR α PM}-Mauslinie

Die R26^{hPDGFR α PM}-Mäuse wurden in die Wnt1Cre-Mauslinie (Chai et al., 2000; Danielian et al., 1998) eingekreuzt, die ab dem Zeitpunkt E 8 eine gewebsspezifische Expression des autoaktiven PDGFR α in den Neuralleistenzellen und deren Derivaten ermöglicht (Abb. 4.6. A).

Da sowohl die Wnt1Cre-, als auch die R26^{hPDGFR α PM}-Mauslinie für das gewünschte Allel heterozygot ist, mussten die Nachkommen zusätzlich zu der 3-Primer-PCR, mit einer Cre-spezifischen PCR genotypisiert werden. Nur in den Mäusen, die beide

Transgene tragen (Abb. 4.6. B), kommt es zu einer Exzision der Stoppkassette und zu einer Expression des autoaktiven PDGFR α .

Die transgenen Tiere wurden Wnt1Cre;R26^{hPDGFR α PM}-Mäuse genannt.

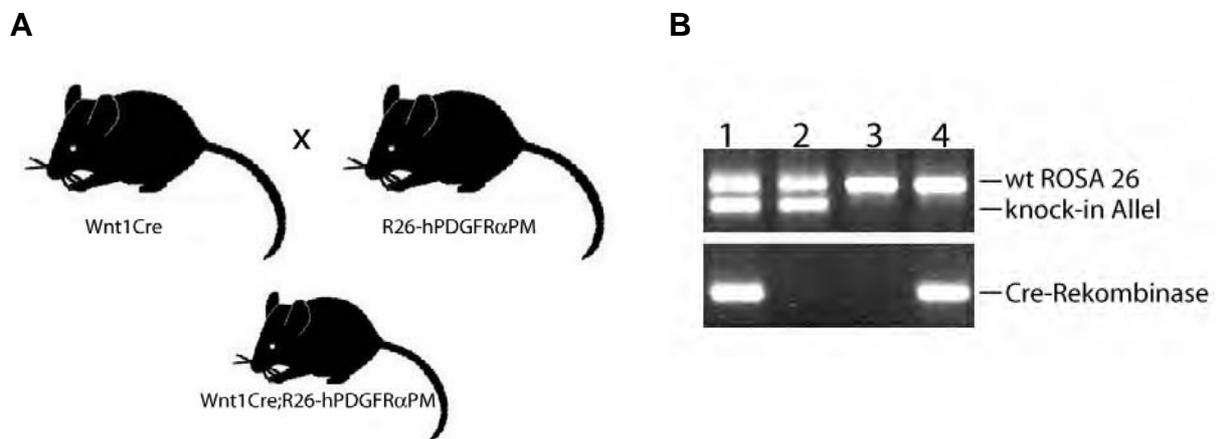


Abb. 4.6. (A) Verpaarungsschema zur Generierung einer Wnt1Cre;R26^{hPDGFR α PM}-Mauslinie, (B) Mögliche Genotypen der Nachkommen. Nur Maus 1 ist positiv für das knock-in Allel und die Cre-Rekombinase und exprimiert den autoaktiven PDGFR α in den Neuralleistenzellen und deren Derivaten.

4.4. Morphologie der Wnt1Cre;R26^{hPDGFR α PM}- Mäuse

Alle Wnt1Cre;R26^{hPDGFR α PM}-Mäuse waren lebensfähig und konnten zunächst nicht von den Wildtypmäusen unterschieden werden. Wenige Tage nach der Geburt entwickelten die transgenen Mäuse eine Schädeldysmorphie, die zuerst nicht sehr auffällig war (Abb. 4.7. A), sich jedoch bei mehreren Wochen alten Mäusen stark ausprägte. Im Gegensatz zu den Wildtypmäusen (Abb. 4.7. B, C) bildeten die Mutanten (Abb. 4.7. D, E) eine Verkürzung der frontonasalen Strukturen aus, welche mit einer Fehlstellung der Nagezähne und einer fehlenden Abnutzung dieser durch den gegenseitigen Abrieb einherging. Dies hatte zur Folge, dass die unteren Nagezähne nach vorne und oben aus der Mundhöhle herauswuchsen und dabei vollständig unbenutzbar wurden. Die oberen Nagezähne dagegen krümmten sich um sich selbst, was langfristig zu einem vollständigen Verschluss der Mundhöhle und zum Tod des Tieres durch mangelnde Nahrungsaufnahme führen könnte. Um das zu verhindern, mussten den Wnt1Cre;R26^{hPDGFR α PM}-Mäusen einmal in der Woche die Nagezähne gekürzt werden. Zusätzlich wurden die Mäuse mit Nassfutter gefüttert.



Abb. 4.7. Morphologie der $Wnt1Cre;R26^{hPDGFR\alpha PM}$ -Maus. (A) 5 Tage alte Wildtypmaus (WT) und $Wnt1Cre;R26^{hPDGFR\alpha PM}$ -Maus (PM). (B - E) Lateral- und ventral-Ansicht einer 4 Wochen alten Wildtypmaus bzw. Mutanten. Es ist deutlich die Verkürzung der frontonasalen Strukturen (D) und eine Fehlstellung der Schneidezähne zu erkennen (E). (F + G) Gaumen einer 4 Wochen alter Wildtypmaus bzw. Mutanten.

Da die NLZ-spezifischen $PDGFR\alpha$ -knock-out-Mäuse eine Gaumenspalte entwickeln (Tallquist and Soriano, 2003), wurde der Gaumen der Mutanten untersucht. Wie in Abbildung 4.7. F und G gezeigt, konnten im Vergleich zum Wildtyp keine auffälligen Veränderungen beobachtet werden.

Die $Wnt1Cre;R26^{hPDGFR\alpha PM}$ -Mäuse hatten eine durchschnittliche Lebensdauer von 6 Monaten. Histologische Untersuchungen demonstrierten eine normale Entwicklung der inneren Organe, so dass die begrenzte Lebensdauer wahrscheinlich eine Folge der Schädeldysmorphie darstellte.

4.5. Analyse der NLZ-abstammenden Schädelnähte

Um den Phänotyp der Schädeldysmorphie näher zu untersuchen, wurden Schädelpräparationen von unterschiedlich alten Wildtyp- und $Wnt1Cre;R26^{hPDGFR\alpha PM}$ -Mäusen durchgeführt und Alizarin-Rot bzw. Alzian-Blau gefärbt (Abb. 4.8.).

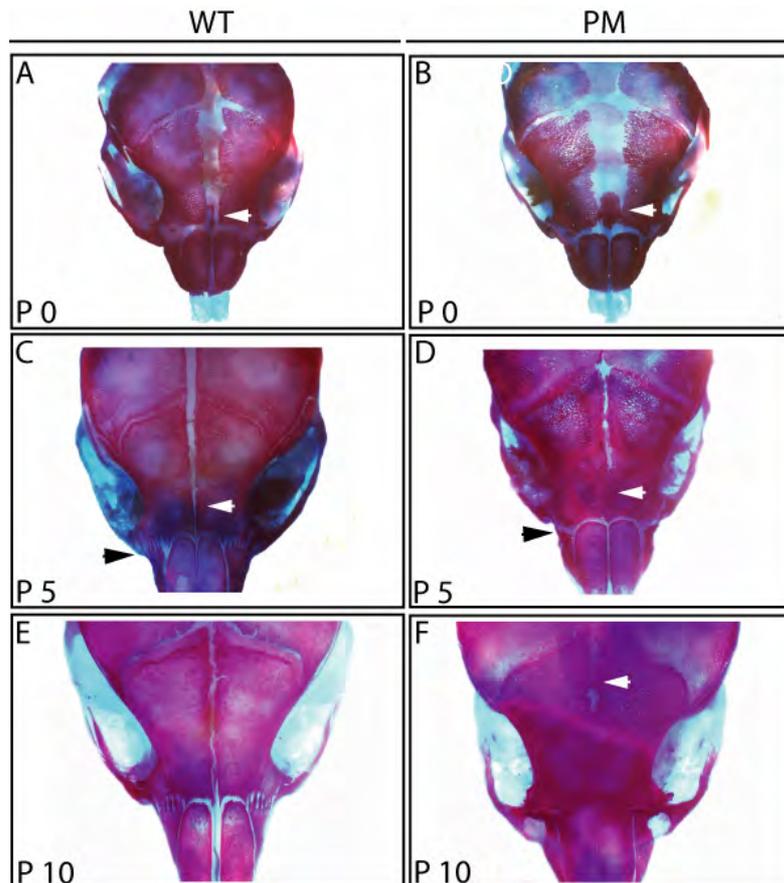


Abb. 4.8. Alizarin-Rot- und Alcian-Blau-Färbung von Schädelpräparationen. Alizarin-Rot- bzw. Alcian-Blau-Färbung von Schädelpräparationen von Wildtyp- (WT) und $Wnt1Cre;R26^{hPDGFR\alpha PM}$ -Mäusen (PM) wurde an den angegebenen Tagen nach der Geburt durchgeführt. Weiße Pfeile in A + B = Interfrontalknochen; weiße Pfeile in C, D, F = Sutura frontalis; Schwarzer Pfeil in C, D = Sutura frontomaxillaris; Originalvergrößerung A – F = 5,8x.

Am Tag der Geburt (P 0) konnte im Vergleich zu den Wildtypmäusen (Abb.4.8.A, Pfeil) ein stark verbreiteter Interfrontalknochen bei den $Wnt1Cre;R26^{hPDGFR\alpha PM}$ -Mäusen (Abb. 4.8. B, Pfeil) beobachtet werden. Innerhalb der ersten 5 Tage nach der Geburt verwuchsen innerhalb dieses Bereichs die Stirnknochen, so dass es zu einer verfrühten Fusion der Sutura frontalis kam (Kraniosynostose) (Abb. 4.8. D, weißer Pfeil). Die Sutura frontomaxillaris, die in den Wildtypmäusen zu diesem Zeitpunkt eine gezackte Morphologie besitzt (Abb. 4.8. D, schwarzer Pfeil), wies in den Mutanten am Tag P 5 eine aberrante, glatte Struktur auf (Abb. 4.8. D, schwarzer Pfeil). Auch die Stirnknochen der Mutanten zeigten am Tag P 5 eine veränderte Struktur. Im Gegensatz zu der glatten Morphologie in den Wildtypmäusen besaßen diese Geflechtknochen in der Aufsicht des Schädels eine porige Struktur.

Die prämatüre Fusion der Sutura frontalis weitete sich beginnend am Tag P 10 auch auf den anterior liegenden Bereich der Stirnknochen aus (Abb. 4.8. F, Pfeil).

Insgesamt wurden mit Hilfe der Schädelpräparation Veränderungen in allen Schädelgeweben festgestellt, die von den Neuralleistenzellen abstammen. Die Gewebe, die ihren Ursprung nicht in diesen Zellen haben, zeigten keine Veränderungen.

Histologische Untersuchungen der Stirnknochen und der Sutura frontalis des posterior liegenden Bereichs wurden durchgeführt, um den zeitlichen Beginn der morphologischen Veränderungen festzustellen (Abb. 4.9.). Da die Ossifikation der Knochenanlagen während der Embryogenese nicht vor Tag E 14.5 stattfindet, wurden die Untersuchungen beginnend ab diesem Zeitpunkt durchgeführt. Dabei wurden Querschnitte der Knochen, wie in Abb. 4.9. (oben), angedeutet angefertigt und H/E gefärbt.

Am Tag E 14.5 waren keine Unterschiede zwischen Wildtypmäusen und Mutanten zu erkennen (Abb. 4.9. A, B). Ab Tag E 16.5 konnte man dagegen im Vergleich zu den Wildtypkontrollen (Abb. 4.9. C, Pfeil) einen verbreiterten Interfrontalknochen in den $\text{Wnt1Cre;R26}^{\text{hPDGFR}\alpha\text{PM}}$ -Mäusen beobachten (Abb. 4.9. D, Pfeil), der sich im Laufe der Zeit immer weiter ausdehnte (Abb. 4.9. vergl. E/G mit F/H, Pfeil). Die histologischen Untersuchungen belegten, dass es erst wenige Tage nach der Geburt zu einer vollständigen Fusion der Sutura frontalis kam (Abb. 4.9. J, L).

Am Tag P 5 konnte auch im Querschnitt der Stirnknochen eine veränderte Knochenstruktur in den mutanten Mäusen beobachtet werden, die im Gegensatz zu der kompakten Struktur im Wildtyp einen trabekulären Charakter besaß.

Die Sutura frontalis blieb wie erwartet in den Wildtypkontrollen zunächst patent (Abb. 4.9. I, K, Pfeile) und fusionierte erst in ausgewachsenen Tieren (Abb. 4.9. M).

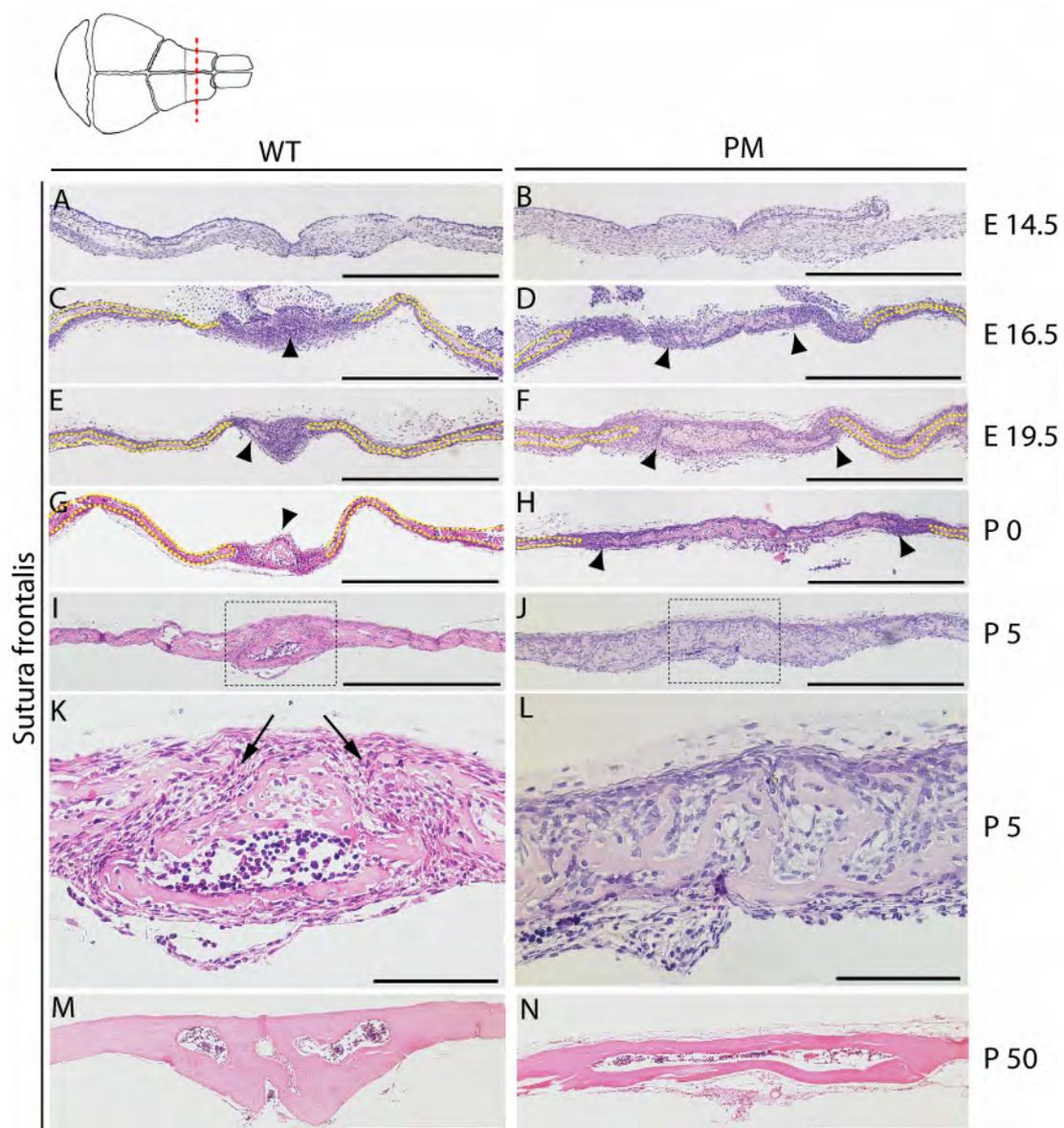


Abb. 4.9. Histologische Untersuchungen der Sutura frontalis. Querschnitte im Bereich der Stirnknochen (oben, rot-gestrichelte Linie) von Wildtyp- (WT) und $Wnt1Cre;R26^{hPDGFR\alpha PM}$ -Mäusen (PM) wurden an den angegebenen Tagen während der Embryogenese und nach der Geburt angefertigt und H/E gefärbt. Pfeile in C- H = Interfrontalknochen; gelb-gestrichelte Linie in C- H = Stirnknochen; K, L = Vergrößerung des in I bzw. J markierten Bereichs; Pfeile in K = Sutura frontalis. Maßstabballen: A – J und M, N = 500 μ m; K, L = 100 μ m.

Es wurden zusätzlich histologische Untersuchungen der im Bereich zwischen den Stirnknochen und Scheitelbeinen verlaufenden Sutura coronalis durchgeführt, indem, wie in Abbildung 4.10. (oben) angedeutet, Querschnitte angefertigt und H/E gefärbt wurden. Stirnknochen („f“) und Scheitelbeine („p“) sind in Abbildung 4.10. gekennzeichnet. Es ist deutlich zu erkennen, dass im Unterschied zur Sutura frontalis die Knochen in diesem Bereich nicht nebeneinander sondern übereinander liegen.

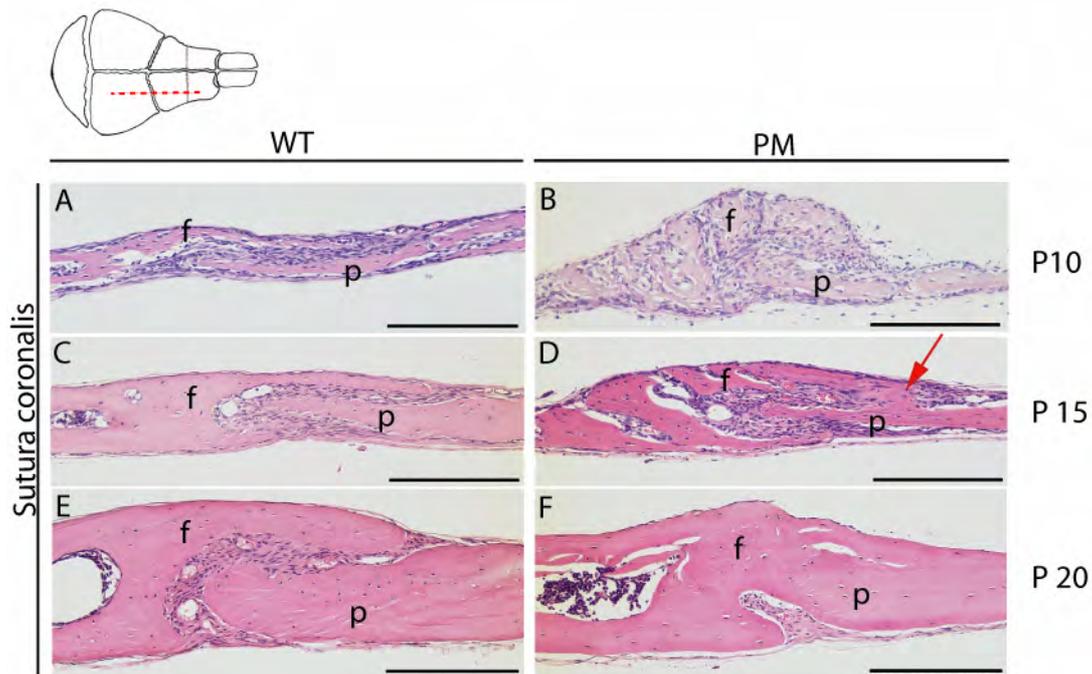


Abb. 4.10. Histologische Untersuchungen der Sutura coronalis. Querschnitte im Bereich der Sutura coronalis (oben, rot-gestrichelte Linie) von Wildtyp- (WT) und $Wnt1Cre;R26^{hPDGFR\alpha PM}$ -Mäusen (PM) wurden an den angegebenen Tagen nach der Geburt angefertigt und H/E gefärbt. f = Stirnknochen (Os frontale); p = Scheitelbein (Os parietale); roter Pfeil in D = beginnende Fusion der Sutura coronalis. Maßstabballen: A – F = 200 μ m.

Am Tag P 10 waren keine Veränderungen im Bezug auf die Schädelnaht zu erkennen. Allerdings war zu diesem Zeitpunkt im Gegensatz zum Wildtyp (Abb. 4.10. A) in den mutanten Mäusen wieder deutlich eine aberrante, trabekuläre Knochenstruktur der Stirnknochen zu beobachten (Abb. 4.10. B). Ab Tag P 15 konnte eine beginnende Fusion der Sutura coronalis detektiert werden (Abb. 4.10. D, Pfeil), die sich 5 Tage später über den kompletten Bereich der Schädelnaht erstreckte (Abb. 4.10. F). Wie zuvor in der Literatur beschrieben, blieb die Sutura coronalis in den Wildtypmäusen zu jedem Zeitpunkt patent (Abb. 4.10. C, E).

Um die Knochenstruktur detaillierter zu untersuchen, wurde mit Querschnitten von Stirnknochen 5 Tage alter Mäuse eine Färbung nach Giemsa durchgeführt. Dabei konnte durch den Farbkontrast zwischen weichem und hartem Bindegewebe festgestellt werden, dass in den Stirnknochen von Wildtypmäusen das neu gebildete Osteoid (blau-violett) auf der mineralisierten Knochenmatrix (lila) aufliegt (Abb. 4.11. A). In den Knochen von $Wnt1Cre;R26^{hPDGFR\alpha PM}$ -Mäusen gab es im Gegensatz dazu keine klare Grenze zwischen mineralisierter Matrix und Osteoid (Abb. 4.11. B).

Zusätzlich enthielt der Knochen der mutanten Mäuse viel mehr Hohlräume, wodurch sich eine trabekuläre Struktur entwickelte und sich der Knochen stark verbreiterte.

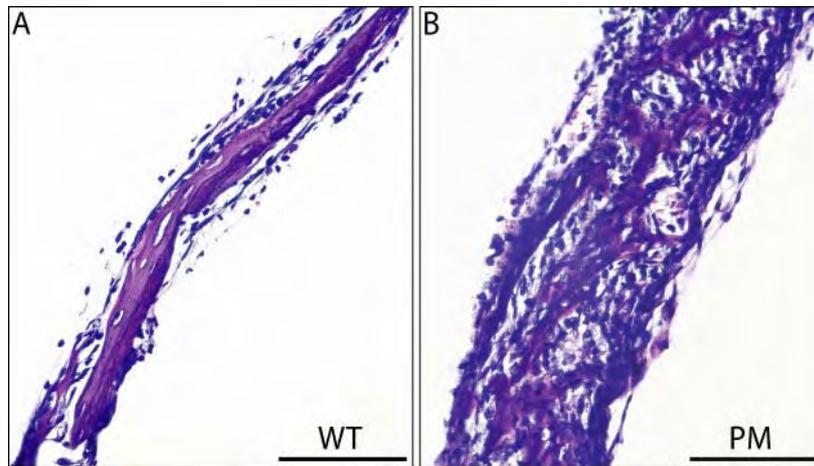


Abb. 4.11. Giemsa-Färbung. Die Querschnitte der Stirnknochen 5 Tage alter Wildtypmäuse (WT) und $Wnt1Cre;R26^{hPDGFR\alpha PM}$ -Mäuse (PM) wurden nach Giemsa gefärbt. Blau-violett = Osteoid; Lila = kalzifizierte Knochenmatrix. Maßstabballen = 100 µm.

Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass die $Wnt1Cre;R26^{hPDGFR\alpha PM}$ -Mäuse eine Kraniosynostose der Sutura frontalis und Sutura coronalis entwickelten und dass die Knochenstruktur der NLZ-abstammenden Stirnknochen verändert war. Da es sich bei PDGFs um mitogene Faktoren handelt, welche die Proliferation von undifferenzierten Mesenchymzellen und bestimmten Vorläuferzellpopulationen während der Entwicklung stimulieren (Betsholtz et al., 2001), wurde in einem nächsten Versuch der Einfluss des transgenen $PDGFR\alpha$ in den $Wnt1Cre;R26^{hPDGFR\alpha PM}$ -Mäusen auf die Proliferationsrate der Knochenvorläuferzellen untersucht. Insgesamt wurden von Tag E 16.5 und E 19.5 jeweils 800 Zellen aus drei unabhängigen Experimenten ausgezählt, um den durchschnittlichen Anteil der proliferierenden Zellen in der Schädelnaht zu bestimmen. In Abbildung 4.12. ist exemplarisch ein Ergebnis von Wildtypkontrollen (Abb. 4.12. A) und $Wnt1Cre;R26^{hPDGFR\alpha PM}$ -Mäusen (Abb. 4.12. B) am Tag E 16.5 dargestellt. Wie deutlich zu erkennen, konnte zu diesem Zeitpunkt ein Anstieg der proliferativ aktiven Zellen im Bereich der Sutura frontalis in den transgenen Mäusen detektiert werden. Das Gesamtergebnis des Proliferationsassays ist in Abb. 4.12. C graphisch dargestellt. Am Tag E 16.5 war die Proliferationsrate der Knochenvorläuferzellen in den Mutanten um 12% und am Tag E 19.5 um 21% im Vergleich zu den Wildtypkontrollen erhöht.

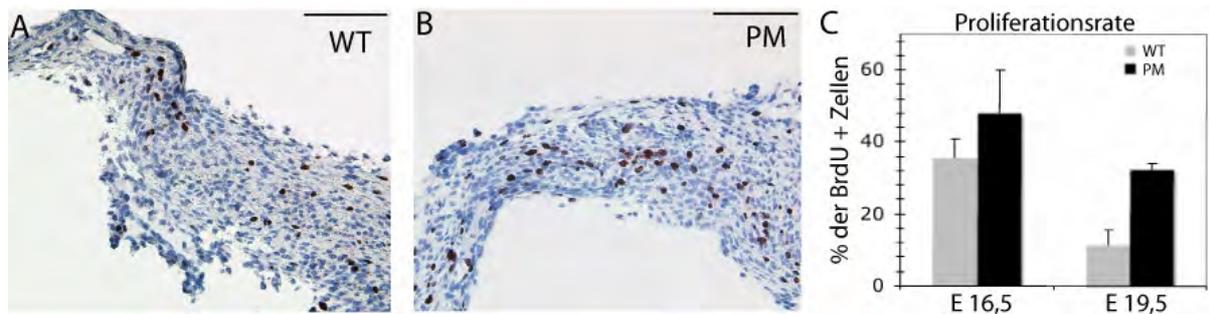


Abb. 4.12. Effekt des autoaktiven PDGFR α auf die Proliferation von Knochenvorläuferzellen. In einem Proliferationsassay wurde die Proliferationsrate der Zellen innerhalb der Sutura frontalis in E 16.5 und E 19.5 Mäusen untersucht. A, B = repräsentatives Ergebnis einer Wildtyp- (WT) und einer Wnt1Cre;R26^{hPDGFR α PM}-Maus (PM) am Tag E 16.5; C = graphische Darstellung des Anteils der proliferativ aktiven Zellen (BrdU+) innerhalb der Sutura frontalis am Tag E 16.5 bzw. E 19.5 in WT und PM in Prozent. Rote Zellen = BrdU positiv; blaue Zellen = BrdU negativ. Maßstabballen = 100 μ m.

Es wurde zusätzlich der Einfluss des autoaktiven PDGFR α in den Wnt1Cre;R26^{hPDGFR α PM}-Mäusen auf die Apoptose ermittelt. Das Ergebnis des TUNEL-Assays zeigte, dass es keinen Unterschied in der Apoptoserate zwischen Wildtyp- (Abb. 4.13. A) und transgenen-Mäusen (Abb. 4.13. B) im Bereich der Sutura frontalis und Stirnknochen 5 Tage alter Mäuse gab.

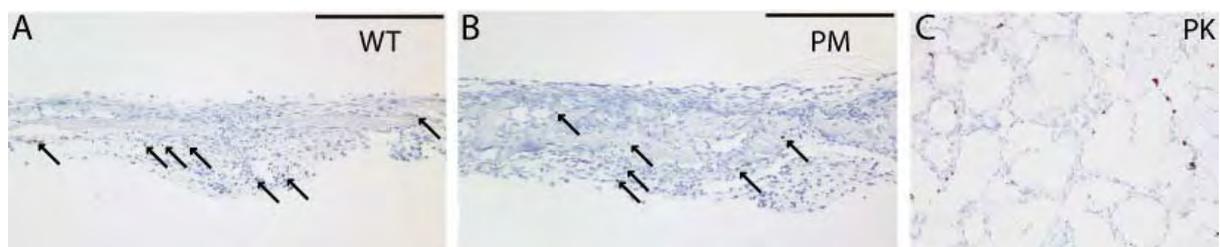


Abb. 4.13. Effekt des autoaktiven PDGFR α auf die Apoptose. A, B = Apoptotische Zellen innerhalb der Sutura frontalis und im Bereich der Stirnknochen 5 Tage alter Wildtyp- (WT) und Wnt1Cre;R26^{hPDGFR α PM}-Mäuse (PM) wurden mittels TUNEL-Assay detektiert. C = Brustgewebe als Positivkontrolle (PK). Rote Zellen = apoptotisch, blaue Zellen = nicht apoptotisch; Pfeile = apoptotische Zellen. Maßstabballen = 100 μ m.

4.6. Etablierung eines Zellkultursystems

Bei einer Kraniosynostose kommt es zu einer vorzeitigen Fusion einer oder mehrerer Schädelnähte durch eine Dysregulation der Schädelossifikation. Da die desmale Ossifikation im Schädel von den Osteoblasten reguliert wird, die sich beim sekundären kompensatorischen Wachstum direkt aus den Mesenchymzellen in den

Schädelnähte differenzieren, müssen grundlegende biologische Prozesse dieser Zellen gestört sein. Um die Rolle des $PDGFR\alpha$ in der Pathogenese der Kraniosynostose zu analysieren, sollte in einem nächsten Schritt ein Zellkultursystem etabliert werden, in dem die Mesenchymzellen kontrolliert zu reifen Osteoblasten ausdifferenziert werden konnten. Mit Hilfe dieses Systems sollten die veränderten molekularen Prozesse in den mutierten Mesenchymzellen bzw. Osteoblasten analysiert werden, die zu einer verfrühten Fusion der Sutura frontalis und zusätzlich zu einer aberranten Fusion der Sutura coronalis führten.

Da der autoaktive $PDGFR\alpha$ nur in den Schädelstrukturen exprimiert wird, die sich aus der kranialen Neuralleiste entwickeln, wurden lediglich die Nasen- und Stirnkochen für die Isolierung primärer Zellpopulationen aus Mauskalvarien verwendet (Abb. 4.14).

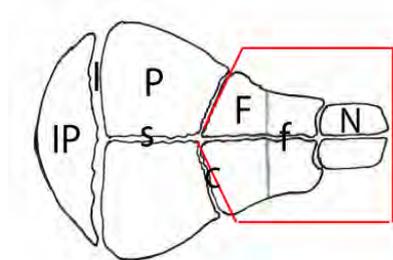


Abb. 4.14. Schematische Darstellung der Mauskalvarien.

Es sind die Schädelstrukturen rot umrandet, die für die Isolierung primärer Zellpopulationen verwendet wurden.

c = Sutura coronalis; F = Os frontale; f = Sutura frontalis; IP = Os occipitale; I = Sutura lamboidea; N = Os nasale; s = Sutura sagittalis.

Als Kontrolle, dass es in den isolierten Zellen tatsächlich zu einer Exzision der Stoppkassette und zur Expression des mutierten $PDGFR\alpha$ kommt, wurde die R26R-Mauslinie in die Wnt1Cre-Mauslinie eingekreuzt. Die Nachkommen wurden mit der 3-Primer- und der Cre-spezifischen-PCR genotypisiert. Die Knochenvorläuferzellen aus Nasen- und Stirnkochen der Wnt1Cre;R26R-Mäuse wurden in Kultur genommen und X-Gal gefärbt. Als Negativkontrolle wurden zusätzlich Zellen aus einer R26R-Maus gefärbt.

Nur die Zellen aus den doppelt-positiven Tieren wiesen eine Blaufärbung auf (Abb. 4.15.). Dieses Ergebnis bestätigte erstens die mögliche *in-vitro*-Expression eines Transgens unter der Kontrolle des ROSA26-Promotors und zweitens eine spezifische Expression des Transgens nach einer Cre-vermittelten Exzision der Stoppkassette in den aus Nasen- und Stirnknochen isolierten Zellen.

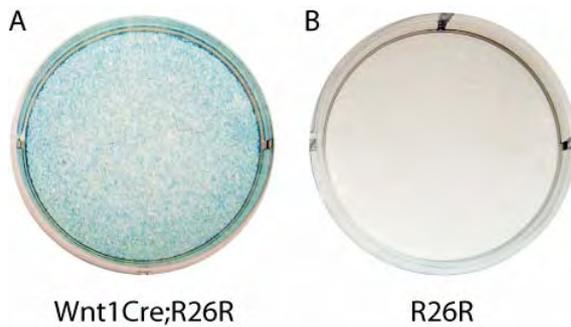


Abb. 4.15. X-Gal-Färbung primärer Zellen.

A = Die Knochenvorläuferzellen aus Nasen- und Stirnkochen von Wnt1Cre;R26R Mäusen wurden in Kultur genommen und X-Gal gefärbt. B = Als Negativkontrolle wurden zusätzlich Zellen aus einer R26R-Maus gefärbt.

Die isolierten Zellpopulationen bestanden anfänglich aus spindelförmigen, Fibroblasten-ähnlichen Zellen (Abb. 4.16. Oben). Nach dem Beginn der Differenzierung konnte man nach etwa 5 Tagen eine Zunahme von kleinen, runden Zellen beobachten, die auf einem Monolayer aus den Fibroblasten-ähnlichen Zellen wuchsen (Abb. 4.16. Mitte).

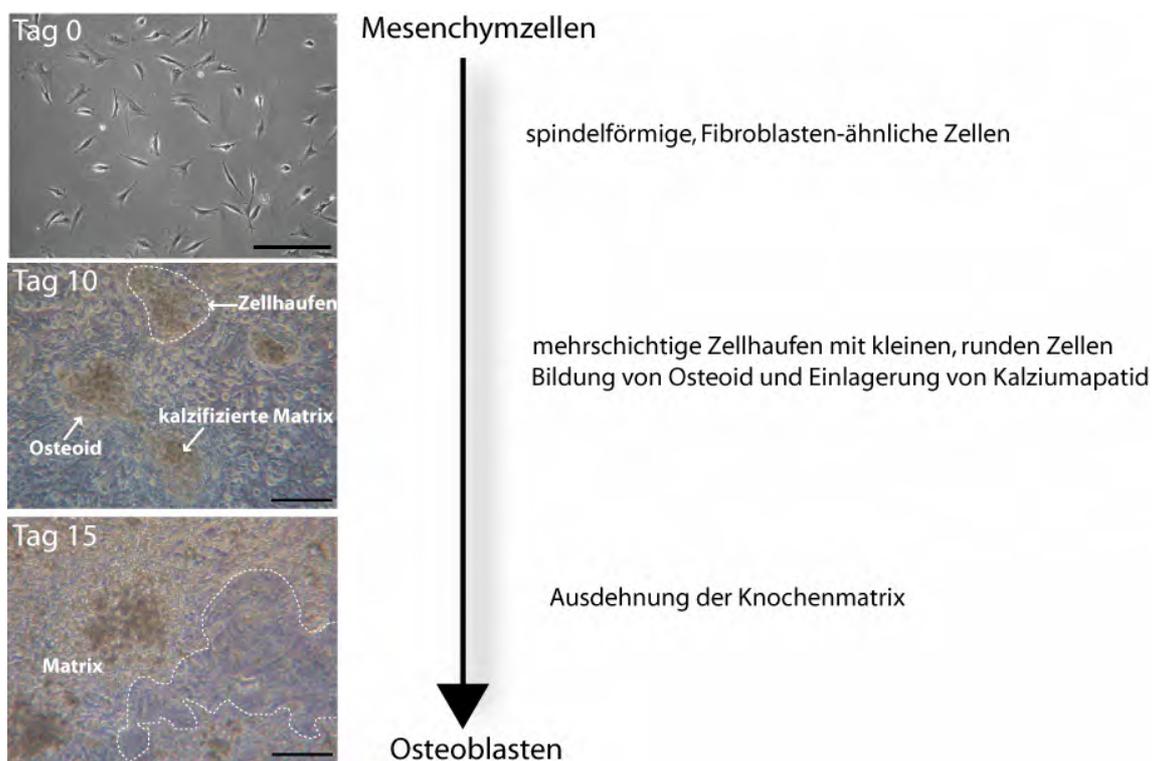
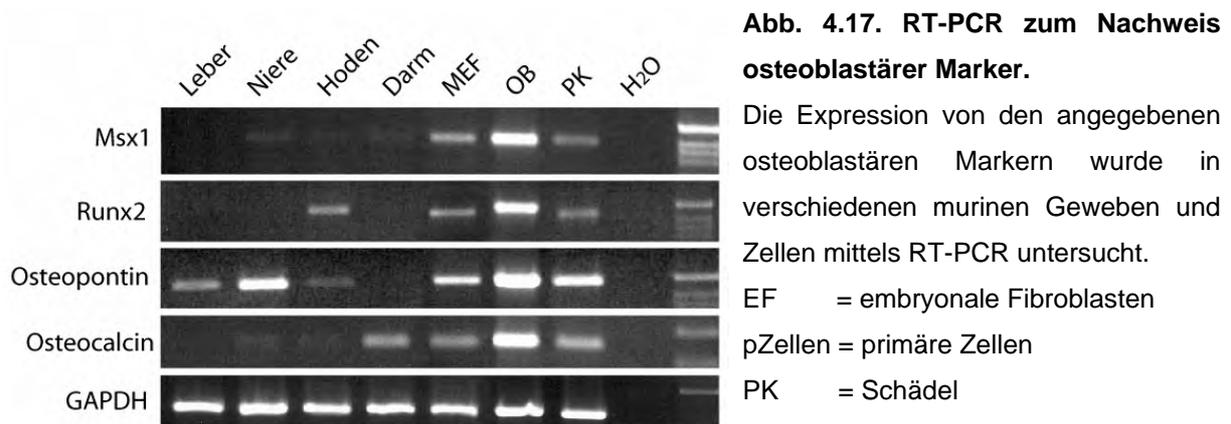


Abb. 4.16. Veränderung der Zellmorphologie während der Differenzierung der Mesenchymzellen zu Osteoblasten. Es sind verschiedene Zeitpunkte während der Differenzierung der Zellen gezeigt und interessante Strukturen markiert. Gestrichelte Linie (Tag 15) = Markierung der Knochenmatrix. Maßstabbalken = 200 μm .

Nach einer Anreicherung dieser Zellen lagerten sie sich zu Zellhaufen zusammen, aus denen mit fortschreitender Differenzierung die Bildung des Osteoids ausging, das sich stellenweise braun verfärbte. Diese Verfärbung war mit bloßem Auge zu erkennen und war wahrscheinlich eine Folge der Einlagerung von Kalziumapatid, da sich diese Areale mit der von-Kossa-Färbung schwarz anfärben ließen. An Tag 15 der Differenzierung dehnte sich die synthetisierte Knochenmatrix über einen großen Bereich der Kulturschale aus und schloss die kleinen, runden Zellen größtenteils mit ein (Abb. 4.16. Unten). Da in mehreren Ansätzen ab diesem Zeitpunkt keine Veränderungen in der Kultur beobachtet werden konnten, wurden die nachfolgenden Versuche bis Tag 15 durchgeführt.

Um die Spezifität der Zellpopulation weiter zu verifizieren, wurden die differenzierten Zellen mittels RT-PCR auf die Expression osteoblastärer Marker hin untersucht (Abb. 4.17.).



Alle Marker wurden in den differenzierten primären Zellen stark exprimiert (Abb. 4.17., pZellen). Um zu überprüfen, dass diese Marker tatsächlich Knochen-spezifisch sind, wurde ihre Expression in anderen murinen Geweben und in embryonalen Fibroblasten analysiert. Dabei wurde Osteopontin in fast allen Geweben in unterschiedlicher Quantität detektiert, während die Marker Msx1, Runx2 und Osteocalcin entweder gar nicht oder nur vereinzelt in den Geweben exprimiert wurden. Im Gegensatz dazu konnten alle Marker, wenn auch schwächer als in den primären Zellen, in embryonalen Fibroblasten beobachtet werden. Um auszuschließen, dass in dem etablierten Zellkultursystem zusätzlich zu den Mesenchymzellen auch Fibroblasten zu Osteoblasten ausdifferenzieren, wurde der Differenzierungsassay mit primären Zellen, embryonalen Fibroblasten und 3T3-

Zellen wiederholt. Parallel wurde ein Ansatz mit Normalmedium durchgeführt, um auch eine spontane Differenzierung der Zellen auszuschließen. Am Tag 15 wurden alle Zellen von-Kossa gefärbt (Abb. 4.18.).

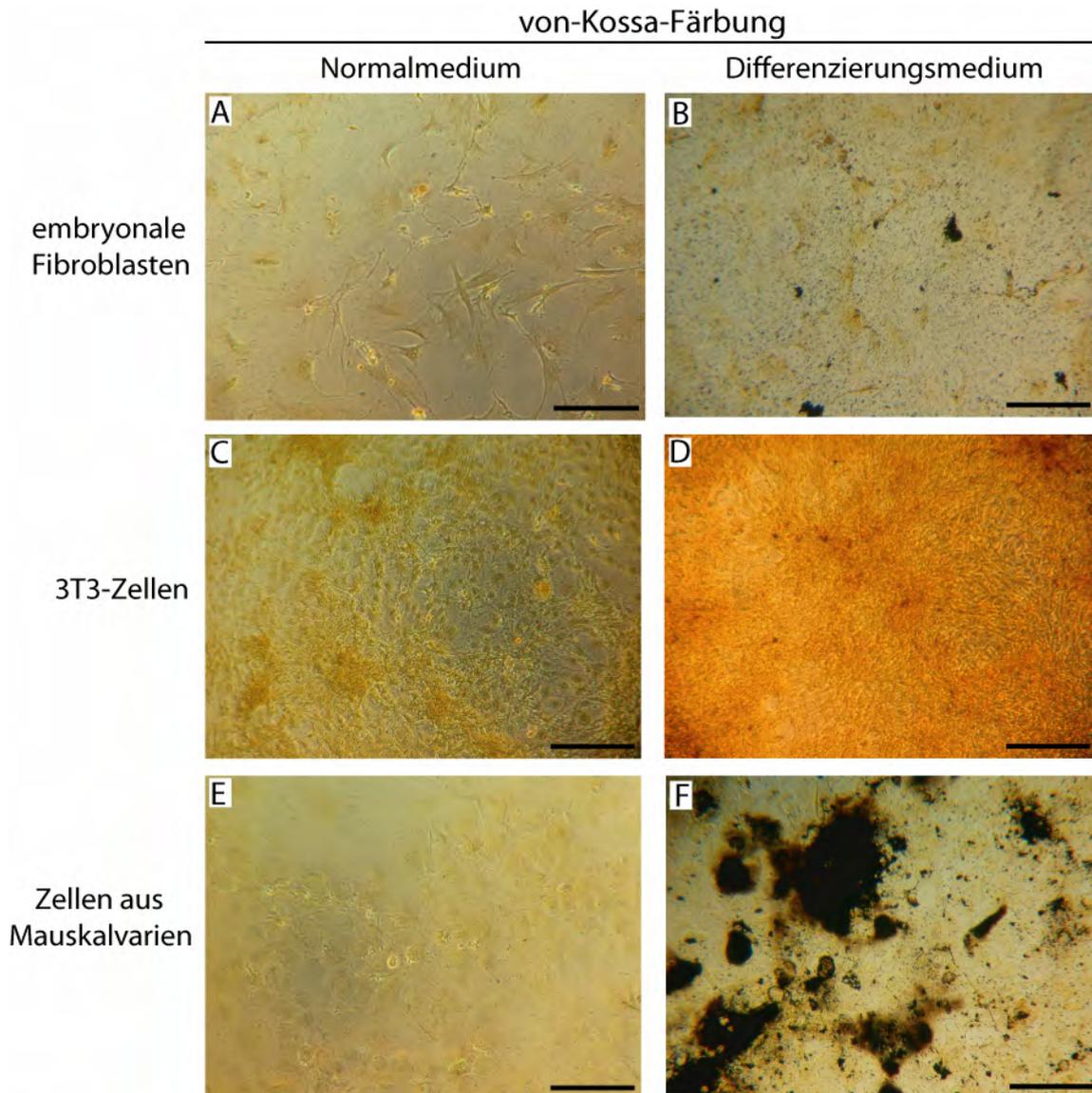


Abb. 4.18. Kontrolle der Differenzierungsspezifität der primären Zellen aus Mauskalvarien. Die angegebenen Zellen wurden mit Normalmedium bzw. Differenzierungsmedium kultiviert und an Tag 15 von-Kossa gefärbt. Maßstabballen = 50 μ M.

In keinem Fall konnte eine spontane Differenzierung der Zellen zu reifen Osteoblasten beobachtet werden, wie die von-Kossa-Färbung der im Normalmedium kultivierten Zellen beweisen konnte (Abb. 4.18. A, C, E). Im Gegensatz zu den 3T3-Zellen, die auch im Differenzierungsmedium keine Färbung zeigten (Abb. 4.18. D), waren die embryonalen Fibroblasten bedingt fähig, zu Knochenmatrix-

synthetisierenden Zellen zu differenzieren, was durch vereinzelte kleine Areale mit Braunfärbung sichtbar wurde (Abb. 4.18. B). Dieses Ergebnis war jedoch nicht vergleichbar mit der Färbung der primären Zellen aus Mauskalvarien, die über die gesamte Kulturschale große Bereiche mit einer intensiven Braunfärbung aufwiesen (Abb. 4.18. F).

Die durchgeführten Versuche bestätigten ein Zell-spezifisches und Medium-spezifisches Differenzierungspotential der primären Zellpopulation zu reifen Osteoblasten, die fähig sind, eine kalzifizierte Knochenmatrix zu synthetisieren. Damit war die Etablierung eines Zellkultursystems, das eine kontrollierte Differenzierung von Mesenchymzellen aus Mauskalvarien zu reifen Osteoblasten erlaubt, erfolgreich und konnte benutzt werden, um die Aufgabe des PDGFR α in der Osteogenese von Knochenvorläuferzellen *in-vitro* zu analysieren.

4.7. *in-vitro*-Proliferationsassay

Zuerst wurde die Funktion des PDGFR α in der Proliferation von Osteoblasten untersucht. Dafür wurde mit primären Zellen aus Wildtypkontrollen (Abb. 4.19. A) und Wnt1Cre;R26^{hPDGFR α PM}-Mäusen (Abb. 4.19. B) ein Proliferationsassay durchgeführt.

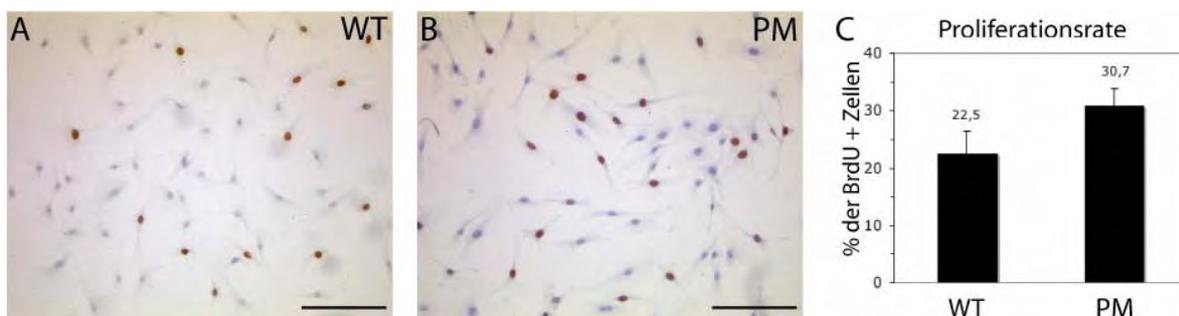


Abb. 4.19. *in-vitro*-Proliferationsassay. A, B = Knochenvorläuferzellen aus Wildtypkontrollen (WT) bzw. Wnt1Cre;R26^{hPDGFR α PM}-Mäusen (PM). C = graphische Darstellung der Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten. Der Anteil der proliferierenden Zellen (BrdU+) an der Gesamtzellzahl in WT und PM ist in Prozent angegeben. Rote Zellen = BrdU positiv; blaue Zellen = BrdU negativ. Maßstab Balken = 200 μ m.

Es wurden 5 Tage alte Zellen verwendet, die permanent in Normalmedium kultiviert wurden, damit davon ausgegangen werden konnte, dass sich die Zellen zu diesem Zeitpunkt noch in der Proliferationsphase befanden. Insgesamt wurden 1000 Zellen

aus drei unabhängigen Ansätzen ausgewertet, um den durchschnittlichen Anteil der proliferierenden Zellen an der Gesamtzellzahl zu bestimmen.

In Abbildung 4.19. ist exemplarisch ein Ergebnis des Proliferationsassays von Wildtypkontrollen (Abb. 4.19. A) und $Wnt1Cre;R26^{hPDGFR\alpha PM}$ -Mäusen (Abb. 4.19. B) dargestellt. Wie zu erkennen, konnte ein deutlicher Anstieg der Anzahl an proliferativ aktiven Zellen im Fall der $Wnt1Cre;R26^{hPDGFR\alpha PM}$ -Mäuse detektiert werden. Abbildung 4.19. C zeigt die graphische Auswertung des Gesamtexperiments. Die Proliferationsrate in den mutanten Zellen war 1,4-fach im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen erhöht.

Der *in-vitro*-Proliferationsassay konnte damit die *in-vivo*-Ergebnisse bestätigen (s. Abb. 4.12.) und demonstrierte einen mitogenen Effekt des $PDGFR\alpha$ auf die Knochenvorläuferzellen.

4.8. Funktionelle Rolle des autoaktiven $PDGFR\alpha$ in Osteoblastendifferenzierung

In weiteren Versuchen wurde ermittelt, ob der autoaktive $PDGFR\alpha$ zusätzlich einen Einfluss auf den Differenzierungsprozess der Osteoblasten besitzt.

Die primären Zellen wurden unter Differenzierungsbedingungen gehalten und zu verschiedenen Zeitpunkten auf das Vorhandensein osteoblastärer Marker untersucht, durch die einzelne Reifungsstufen determiniert sind.

Zunächst erfolgte der Nachweis der ALP2-Aktivität (Abb. 4.20. A, A', A''), welche die abgeschlossene Reifung der Mesenchymzellen zu Präosteoblasten kennzeichnet (Zernik et al., 1990). Während vor Beginn der Differenzierung (Abb. 4.20. A, Tag 0) ungefähr gleich viele Wildtyp- und mutante Zellen positiv für diesen Marker waren, war schon am Tag 3 ein deutlicher Unterschied der ALP-Aktivität zu detektieren (Abb. 4.20. A, Tag 3). Für eine quantitative Auswertung zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen mit Hämatoxylin gegengefärbt, bevor jeweils 3 Gesichtsfelder bei 20-facher Vergrößerung ausgezählt wurden. Die Gesichtsfelder wurden dabei aus zwei zufällig gewählten randnahen und einem zentralen Bereich ausgewählt. In Abbildung 20 A' und A'' sind repräsentativ Wildtyp- bzw. mutante Zellen aus einem randnahen Gesichtsfeld dargestellt. Als Ergebnis konnten ~50% der Wildtyp-Zellen und ~95% der mutanten Zellen an Tag 3 der Differenzierung positiv für eine ALP2-Aktivität bestimmt werden.

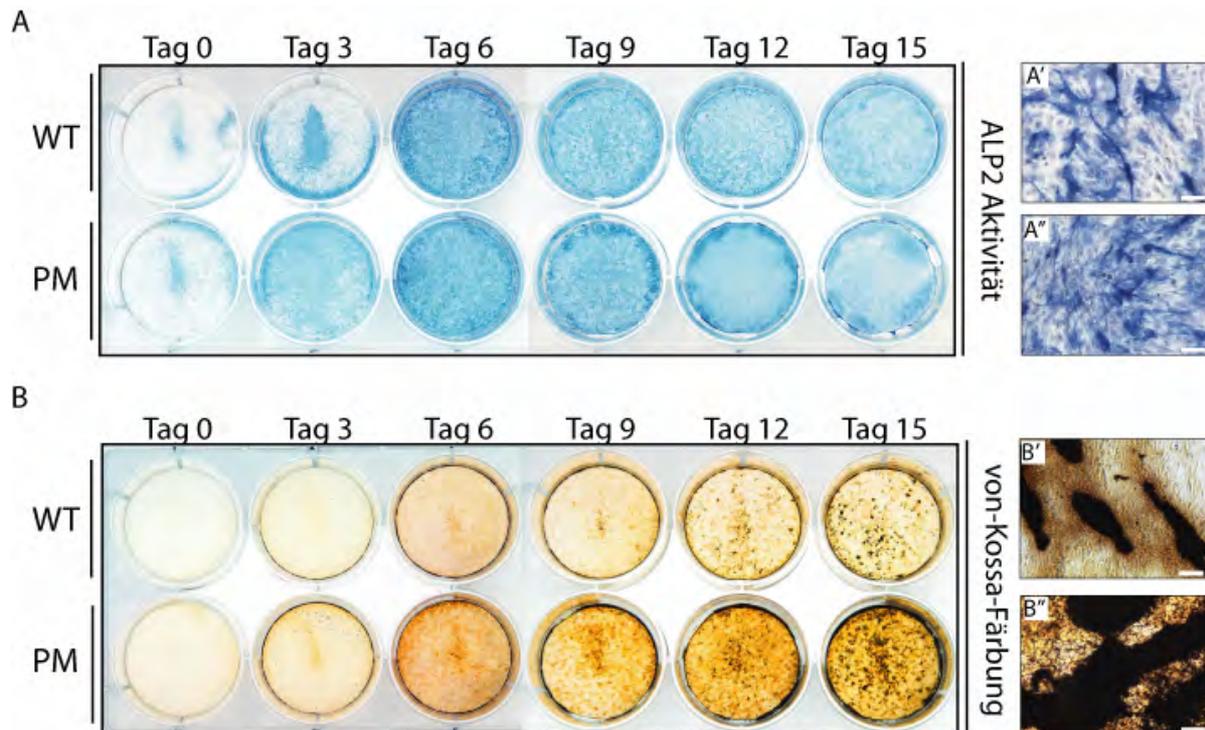


Abb. 4.20. Einfluss des autoaktiven PDGFR α auf Differenzierungsprozess der Osteoblasten.

A, B = Wildtyp- (WT) und mutante (PM) Osteoblasten wurden differenziert und zu den angegebenen Zeitpunkten auf ALP-Aktivität getestet oder von-Kossa gefärbt; A', A'' = repräsentative Fotos von Wildtyp- bzw. mutanten Zellen aus dem randnahen Bereich an Tag 3; B', B'' = repräsentative Fotos von Wildtyp- bzw. mutanten Zellen aus dem randnahen Bereich an Tag 15. Maßstabbalken = 50 μ m.

Als Marker für ausgereifte Osteoblasten, welche die Bestandteile der Knochenmatrix synthetisieren, wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten während der Differenzierung mit von-Kossa gefärbt (Abb. 4.20. B, B', B''), wodurch die Kalziumablagerungen in der extrazellulären Matrix sichtbar wurden (Chaplin and Grace, 1975). Am Tag 3 konnte man eine leicht verstärkte Färbung in den Kulturschalen mit den mutanten Zellen beobachten (Abb. 4.20. B, vergl. WT mit PM, Tag 3). Der Unterschied wurde im Laufe der Differenzierung immer deutlicher und erreichte am Tag 15 sein Maximum, wie deutlich in der Übersicht (Abb. 20. B, vergl. WT mit PM, Tag 6- 15) und in der Vergrößerung repräsentativer Areale (Abb. 4.20. B', B'') erkennbar ist.

Die Ergebnisse der zwei spezifischen Färbungen wurden durch die Ermittlung der Expressionsprofile verschiedener osteoblastärer Marker durch RT-PCR manifestiert (Abb. 4.21.).

In der frühen Differenzierungsphase (Abb. 4.21, ALP2/ Tag 0 - 4) war die Expression der ALP2 in den Wildtyp- und mutanten Zellen ähnlich. Aber während in den mutanten Zellen schon am Tag 6 die maximale Expression erreicht war, konnte eine vergleichbare Quantität an ALP2-Transkript in den Wildtyp-Zellen erst am Tag 10 beobachtet werden (Abb. 4.21, vergl. ALP2/ WT/ Tag 6 mit ALP2/ PM/ Tag 10).

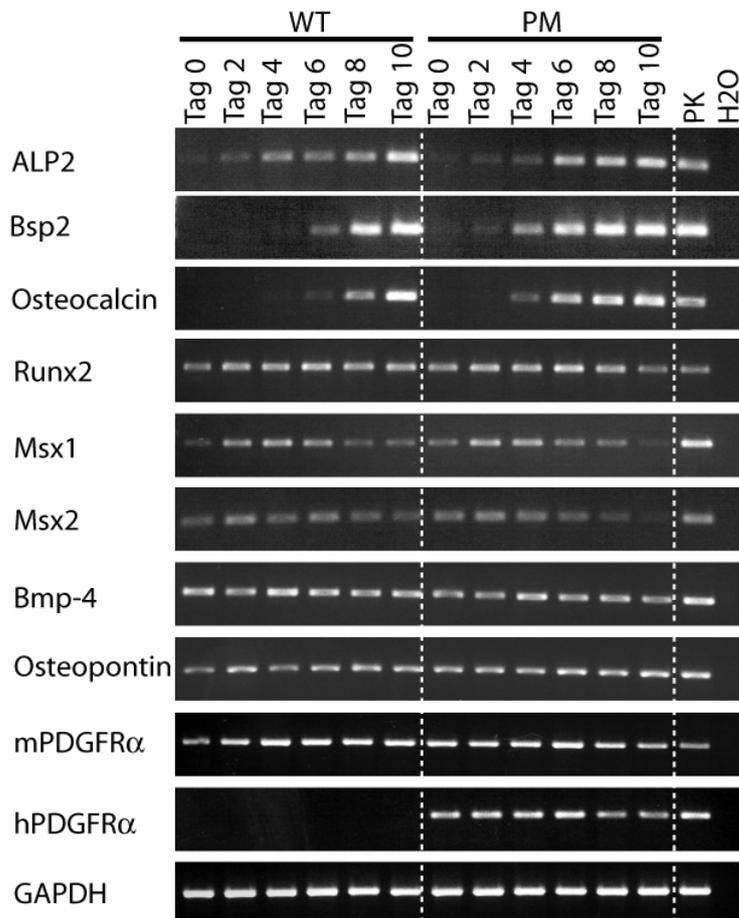


Abb. 4.21. Ermittlung der Expressionsprofile verschiedener Marker mittels RT-PCR. Wildtyp- (WT) und mutante (PM) Osteoblasten wurden differenziert und die Expression verschiedener Marker (links) zu den angegebenen Zeitpunkten mittels RT-PCR analysiert. PK = cDNA aus murinen Schädelknochen als Positivkontrolle.

Ein Marker für reife Osteoblasten ist Bsp2, dessen Expression in den Wildtyp-Zellen erstmalig ab Tag 6 detektierbar war und bis zum Tag 10 stetig hochreguliert wurde (Abb. 4.21., Bsp2/ WT/ Tag 6- 10). Im Gegenteil dazu konnte in den mutanten Zellen schon ab Tag 4 ein Bsp2-Transkript nachgewiesen werden und das Expressionsmaximum war schon am Tag 6 erreicht (Abb. 4.21., Bsp2/ PM/ Tag 4, 6). Ein vergleichbares Ergebnis wurde für Osteocalcin erhalten, bei dem es sich um einen weiteren Marker für reife Osteoblasten handelt (Abb. 4.21., Osteocalcin).

Während der Transkriptionsfaktor Runx2 in Wildtyp- und mutanten Zellen in gleicher Menge exprimiert wurde (Abb. 4.21., Runx2, vergl. WT mit PM), konnte im Fall für die beiden Transkriptionsfaktoren Msx1 und Msx2 eine vorzeitige Herabregulation in den mutanten Zellen beobachtet werden (Abb. 4.21., Msx1, Msx2, vergl. WT/ Tag 15 mit PM/ Tag 15). Die Expression von weiteren Markern wie Bmp4 und Osteopontin unterschied sich nicht in Wildtyp- und mutanten Zellen (Abb. 4.21., Bmp4, Osteopontin).

Eine transgenspezifische RT-PCR bestätigte, dass nur in den aus Wnt1Cre;R26^{hPDGFR α PM}-Mäusen isolierten Zellen der autoaktive, humane PDGFR α exprimiert wurde (Abb. 4.21., hPDGFR α , vergl. WT mit PM). Das Transkript des endogenen PDGFR α konnte dagegen in wildtyp und mutanten Zellen zu jedem Zeitpunkt der Differenzierung in vergleichbarer Menge detektiert werden (Abb. 4.21., mPDGFR α , vergl. WT mit PM).

Die vorzeitige Expression, besonders der späten osteoblastären Marker, sollte mittels *in-situ* Hybridisierung *in-vivo* bestätigt werden. Dafür wurden die Kalvarien von E 16.5 und E 19.5 Wildtypmäusen (Abb. 4.22. A, C) und Wnt1Cre;R26^{hPDGFR α PM}-Mäusen (Abb. 4.22. B, D) mit einer digoxigenin markierten antisense-RNA gegen Bsp2 (antisense-Bsp2-Sonde) hybridisiert.

In Abbildung 4.22. sind die Bereiche der Nasen- („n“,) bzw. Stirnknochen („f“) und Scheitelbeine („p“) dargestellt. Zur Kontrolle einer unspezifischen Färbung wurden die Kalvarien mit einer digoxigenin markierten sense-RNA gegen Bsp2 (sense-Bsp2-Sonde) behandelt, bei der es lediglich zu einer leichten Färbung der Schnittränder kam (Abb. 4.22. E).

Am Tag E 16.5 konnte in den Wildtypkontrollen und den Wnt1Cre;R26^{hPDGFR α PM}-Mäusen das gleiche Expressionsmuster ermittelt werden (Abb. 4.22. A, B). Dieses war gekennzeichnet durch eine starke Expression in den Stirnknochen und Scheitelbeinen und keiner Expression im Bereich des Mesenchyms der Schädelnähte. Am Tag E 19.5 dagegen war die Expression von Bsp2 in den Stirnknochen der transgenen Mäuse im Gegensatz zum Wildtyp deutlich hochreguliert (Abb. 4.22., vergl. C, f mit D, f), wobei sie in den von den Mesoderm-abstammenden Scheitelbeinen gleich stark war (Abb. 4.22., vergl. C, p mit D, p).

Deutlich konnte man in diesem Experiment wieder den extrem verbreiterten Interfrontalknochen in den E 19.5 alten transgenen Mäusen erkennen (Abb. 4.22. C, D, Sternchen).

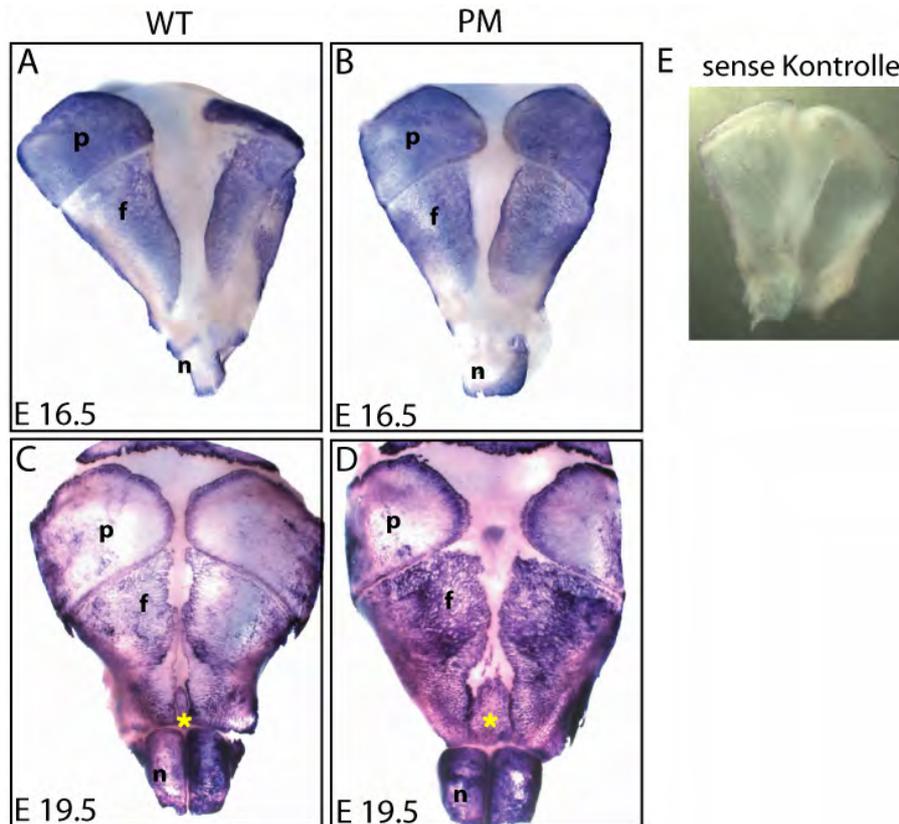


Abb. 4.22. *in-situ*-Hybridisierung von Mauskalvarien. A - D = Die Kalvarien von Wildtypmäusen (WT) und $Wnt1Cre;R26^{hPDGFR\alpha PM}$ -Mäusen (PM) wurden im angegebenen Alter mit einer antisense-Bsp2-Sonde *in-situ* hybridisiert. E = *in-situ*-Hybridisierung mit einer sense-Bsp2-Sonde als Negativkontrolle. f = Stirnknochen (Os frontale); n = Nasenknochen (Os nasale); p = Scheitelbein (Os parietale); Sternchen = Interfrontalknochen. Originalvergrößerung: A, B, E = 7x; C, D = 5,8x.

4.9. Untersuchung des Aktivierungsstatus PDGFR α -assoziierter Signalwege mittels Western-Blot-Analyse

Die bisherigen Versuche demonstrierten, dass PDGFR α eine regulatorische Funktion in der Differenzierung von Mesenchymzellen zu Osteoblasten besitzt. Um einen Einblick in den molekularen Mechanismus zu bekommen, wurden im nächsten Schritt die PDGFR α -abhängigen Signalwege durch Western-Blot-Analysen durchgeführt.

Eine Untersuchung von Proteinlysaten aus Wildtyp- und mutanten Zellen am Tag 0 und 10 während der Differenzierung mit einem PDGFR α -spezifischen Antikörper

demonstrierte eine Verdoppelung der PDGFR α -Menge in den mutanten Zellen (Abb. 4.23. A, vergl. WT mit PM). Die Analyse mit einem phospho-spezifischen PDGFR α -Antikörper bewies zudem eine Zunahme an phosphoryliertem Rezeptor zu diesen Zeitpunkten (Abb. 4.23. B, vergl. WT mit PM). Dieses Ergebnis bestätigte nicht nur die Expression des autoaktiven PDGFR α auf Proteinlevel, sondern auch die Fähigkeit des mutanten Rezeptors zu dimerisieren und autophosphorylieren.

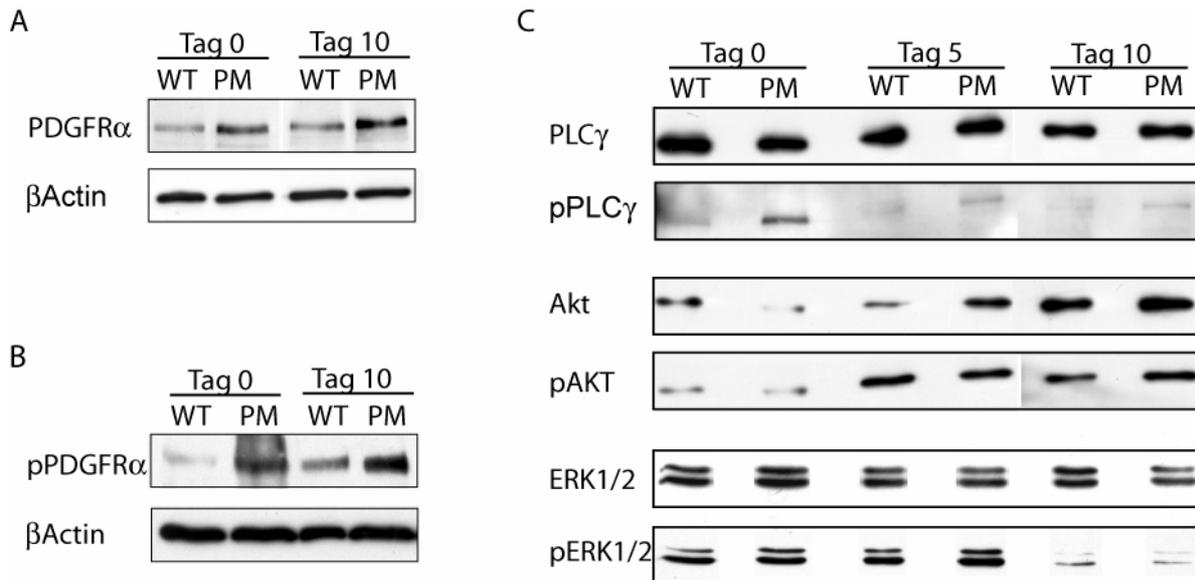


Abb. 4.23. Western-Blot-Analyse der Osteoblasten. A, B, C = Western-Blot-Ergebnisse der Untersuchung von Proteinlysaten aus Wildtyp- (WT) und mutanten (PM) Zellen an den angegebenen Tagen während der Differenzierung mit spezifischen Antikörpern (links).

PDGFR α aktiviert hauptsächlich den MAPK-, PI3K- und PLC γ - Signalweg, die alle eine wichtige Rolle in der Biologie von Osteoblasten spielen (Chaudhary and Avioli, 1998; Zhen et al., 1997). Aus diesem Grund wurde die Aktivierung dieser Signalwege in Wildtyp- und mutanten Zellen analysiert. Die an Tag 0, 5 und 10 isolierten Proteinlysate wurden auf die Expression des jeweiligen Gesamtproteins bzw. phosphorylierten Proteins mit spezifischen Antikörpern untersucht. Ein PLC γ -spezifischer Antikörper diente zur Detektion des PLC γ -Signalweges, wohingegen der PI3K-Signalweg mit einem Akt-spezifischen Antikörper und der MAPK-Signalweg mit einem ERK1/2-spezifischen Antikörper untersucht wurden (Abb. 4.23. C).

Das Gesamtprotein jedes einzelnen Signalweges wurde in Wildtyp- sowie mutanten Zellen in ungefähr gleicher Menge exprimiert (Abb. 4.23., PLC γ , Akt, ERK1/2). Die

Analyse des Phosphorylierungsstatus zeigte eine gleiche Aktivierung des PI3K- und MAPK-Signalweges in Wildtyp- und mutanten Zellen (Abb. 4.23., pAkt, pERK1/2). Dabei war der PI3K-Signalweg während der Differenzierung konstant aktiviert, während der MAPK-Signalweg in der späten Differenzierungsphase herabreguliert wurde.

Die Phosphorylierung des PLC γ -Signalweges hingegen war in den mutanten Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen am Tag 0 um das 1,2-fache, am Tag 5 um das 1,4-fache und am Tag 10 um das 1,8-fache erhöht, dabei konnte in den Wildtyp-Zellen zu jedem Zeitpunkt nur eine schwache Aktivierung des PLC γ -Signalweges detektiert werden (Abb. 4.23., pPLC γ , vergl. WT mit PM).

Die Western-Blot-Experimente belegten insgesamt eine spezifische Hochregulation des PLC γ -Signalweges in den Osteoblasten, die den autoaktiven PDGFR α exprimieren, und wiesen damit auf eine essentielle Funktion dieses Signalweges auf die Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten hin.

4.10. Hemmung des PLC γ -Signalweges in Osteoblasten

Es ist bekannt, dass eine PDGF-vermittelte Aktivierung des PLC γ -Signalweges die Synthese von Phosphatcarrier und deren Insertion in die Plasmamembran verstärkt (Zhen et al., 1997). Da der Phosphattransport in die Zelle eine wichtige Rolle bei der Kalzifizierung der Knochenmatrix spielt (Anderson, 1995), sollte untersucht werden, ob die spezifische Inhibition des PLC γ -Signalweges in dem etablierten Zellkultursystem eine Differenzierung der Mesenchymzellen zu Osteoblasten blockiert.

Wildtyp- und mutante Zellen wurden für 15 Tage in Differenzierungsmedium kultiviert, wobei in je einem Ansatz dem Medium entweder vor Matrixkalzifizierung (Tag 5) oder nach fortgeschrittener Matrixkalzifizierung (Tag 10) 5 μ M des PLC γ -spezifischen Inhibitors U73122 zugefügt wurde (Abb.4.24. A, B). U73122 wurde in DMSO gelöst. Als Kontrolle, dass dieses organische Lösungsmittel keinen Einfluss auf den Differenzierungsprozess besitzt, wurden die Zellen in einem weiteren Ansatz mit der gleichen Konzentration DMSO ohne U73122 behandelt (Abb. 4.24. C). Nach 15 Tagen erfolgte eine von-Kossa-Färbung.

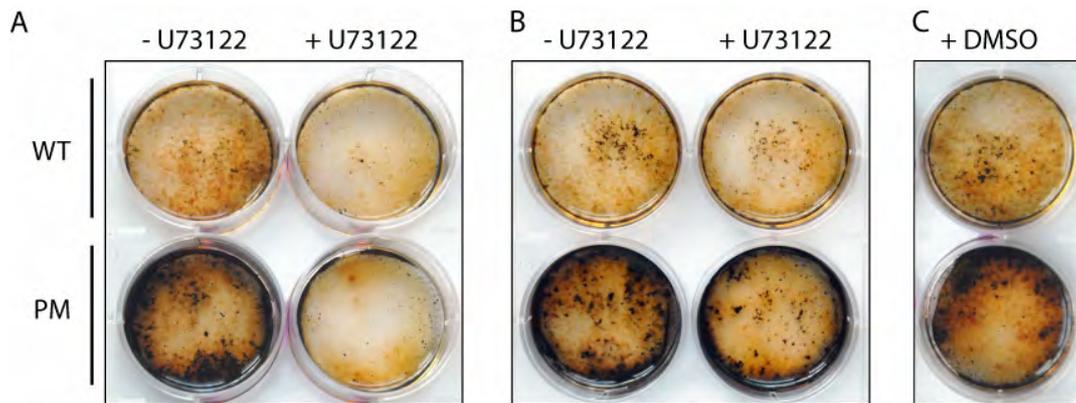


Abb. 4.24. Inhibition des PLC γ -Signalweges in Osteoblasten. A, B = Osteoblasten aus Wildtyp- (WT) und Wnt1Cre;R26^{hPDGFR α PM}-Mäusen (PM) wurden für 15 Tage differenziert und in je einem Ansatz entweder ab Tag 5 (A) oder Tag 10 (B) mit 5 μ M U73122 behandelt. C = Kontrollansatz nur mit DMSO.

Eine Inhibition des PLC γ -Signalweges ab Tag 5 verhinderte fast vollkommen eine Kalzifizierung der Matrix sowohl in den Wildtyp-, als auch in den mutanten Zellen (Abb. 4.24., A, vergl. – mit + U73122). Die Kalzifizierung war dagegen lediglich reduziert, wenn die Zellen erst ab Tag 10 mit U73122 behandelt wurden (Abb. 4.24, vergl. – mit + U73122). Im Kontrollansatz differenzierten die Zellen identisch zu den unbehandelten Zellen (Abb. 4.24, vergl. C mit – U73122 in A, B).

Die mikroskopische Auswertung des Versuchs zeigte, dass die U73122 behandelten Zellen weiterhin in der Lage waren, eine Matrix zu synthetisieren (nicht gezeigt).

Der PLC γ -Signalweg scheint demnach eine Rolle bei der Differenzierung der Osteoblasten zu spielen, indem er spezifisch die Kalzifizierung der Knochenmatrix reguliert.

Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass der PDGFR α eine funktionelle Rolle in der Osteogenese von NLZ-abstammenden Osteoblasten spielt, indem er die Aktivierung des PLC γ -Signalweges reguliert.

4.11. Sequenzanalyse des PDGFR α in Kraniosynostose Patienten

Die Expression des autoaktiven PDGFR α führt in den Wnt1Cre;R26^{hPDGFR α PM}-Mäusen zu einer verfrühten Fusion der Sutura frontalis und zusätzlich zu einer Fusion der Sutura coronalis. Dieser Phänotyp spiegelt das Krankheitsbild der Kraniosynostose wider. Um PDGFR α -Mutationen als eine mögliche Ursache für die

Entstehung von Kraniosynostose im Menschen zu untersuchen, wurde eine Sequenzanalyse des Rezeptors in 15 nicht miteinander verwandten Patienten durchgeführt. Dabei wurden die Fälle so ausgewählt, dass die Patienten eine Fusion der Sutura frontalis oder coronalis und keine Mutationen in den mit Kraniosynostose am häufigsten assoziierten Genen *FGFR1-3* und *TWIST* aufwiesen. Die DNA von diesen Patienten wurde benutzt, um Exon 10 (5. Immunglobulin-ähnliche Domäne), Exon 12 (Juxtamembranäre Domäne), Exon 14 (1. Tyrosinkinase-Domäne) und Exon 18 (2. Tyrosinkinase-Domäne) des *PDGFR α* zu sequenzieren. Dabei stellen Exon 12 und 18 Hotspot-Regionen für aktivierende *PDGFR α* -Mutationen in GISTs dar. Zudem sind alle Exone homolog zu Regionen des cKit-Rezeptors, die weitere Hotspot-Regionen für „Gain-of-Function“-Mutationen in GISTs sind.

In einer DNA-Probe wurde eine heterozygote Basenpaarsubstitution von Thymin durch Cytosin detektiert (Abb. 4.24.), die mit einem Aminosäureaustausch von Prolin nach Serin in Codon 478 einhergeht (P478S). Dabei handelt es sich um einen Missense-SNP (Short nucleotide polymorphism), der in 17,9% der Afro-Amerikanischen Bevölkerung gefunden wird (www.ncbi.nlm.nih.gov). Dieser SNP konnte nicht mit der Pathogenese von Kraniosynostose in Verbindung gebracht werden, da in der DNA von gesunden Familienmitgliedern die gleiche Punktmutation detektiert werden konnten.

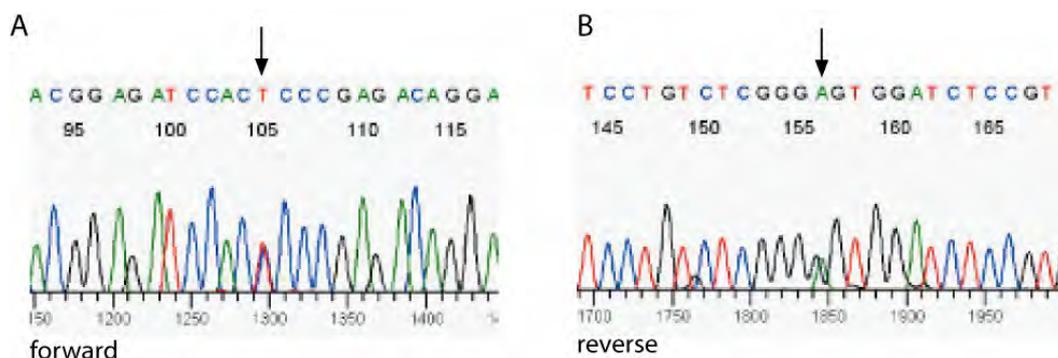


Abb. 4.25. Basenpaarsubstitution im Exon 10 des *PDGFR α* . A, B = In einer DNA-Probe wurde eine heterozygote Basenpaarsubstitution von Thymin durch Cytosin detektiert, die in der „forward“ (A) und „reverse“ (B) Sequenzierreaktion nachgewiesen werden konnte.

In einer weiteren DNA-Probe wurde eine Deletion von 11 bp im Intron 17 festgestellt, welche mit einer zusätzlichen Basenpaarsubstitution von Cytosin nach Thymin innerhalb des Exons 18 einhergeht. Da es sich dabei um einen stummen Polymorphismus (V824V) handelt, wurde dieser mit keinem Phänotyp assoziiert.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sequenzanalysen konnten keinen Zusammenhang von PDGFR α -Mutationen und der Pathogenese von Kranio-synostose belegen.

5. Diskussion

Zur Generierung eines transgenen Mausmodells, das die konditionale Expression eines autoaktiven PDGFR α erlaubt, wurden die während meiner Diplomarbeit hergestellten R26^{hPDGFR α PM}-ES-Zellklone verwendet, um die transgene R26^{hPDGFR α PM}-Mauslinie herzustellen. Diese Mäuse wurden anschließend in die Wnt1Cre-Mauslinie (Chai et al., 2000; Danielian et al., 1998) eingekreuzt, die ab dem Zeitpunkt E 8 eine Expression des transgenen, autoaktiven Rezeptors in den Neuralleistenzellen und deren Derivaten ermöglicht. Die NLZ-spezifische Expression des PDGFR α führte nach der Geburt zu einer Kraniosynostose, welche die Sutura frontalis und Sutura coronalis betraf. Durch nachfolgende Experimente konnte eine Hyperproliferation der NL-abstammenden Knochenvorläuferzellen und eine frühzeitige Differenzierung dieser in reife Osteoblasten detektiert werden. Western-Blot-Analysen demonstrierten eine gesteigerte Aktivierung des PLC γ -Signalweges in Osteoblasten, die den autoaktiven PDGFR α exprimieren. Eine Behandlung der Zellen mit einem PLC γ -spezifischen Inhibitor blockierte eine Kalzifizierung der Knochenmatrix. Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig eine Rolle des PDGFR α in der NLZ-abhängigen Osteogenese durch die Regulation des PLC γ -Signalweges nachgewiesen werden (Moenning et al. eingereicht).

5.1. Rolle des PDGFR α in der Entwicklung kranialer Neuralleistenzellen

Schon frühere Studien wiesen darauf hin, dass PDGFR α eine Funktion bei der Entwicklung von kranialen Neuralleistenzellen besitzt. Das erste Mal konnte dies in der Ph/Ph-Mutante nachgewiesen werden (Morrison-Graham et al., 1992; Orr-Urtreger et al., 1992; Payne et al., 1997; Schatteman et al., 1992; Sun et al., 2000). Da jedoch diese Mutante durch eine extensive Deletion des Chromosoms 5 charakterisiert ist, die neben dem PDGFR α noch weitere Bereiche umfasst, konnte der Phänotyp der Ph/Ph-Mäuse nicht spezifisch dem Rezeptor zugeschrieben werden. Erst die Untersuchung einer konditionalen PDGFR α -knock-out-Maus konnte eine spezifische Rolle des PDGFR α in Neuralleistenzellen festigen (Tallquist and Soriano, 2003). Diese Tiere entwickelten neben der Gaumenspalte zusätzlich eine unvollständige Verknöcherung der Schädelknochen. Die Neuralleistenzellen in diesem Tiermodell wiesen dabei keinen Defekt in ihrem Migrationsverhalten auf.

Deshalb wurde spekuliert, dass in Neuralleistenzellen die Aktivierung von PDGFR α -abhängigen Signalwegen keine Rolle während der Migration, sondern erst nach Ankunft der Zellen am Bestimmungsort spielt.

Der embryonal-letale Phänotyp der Ph/Ph-Mutanten, sowie der konditionalen PDGFR α -knock-out-Mäuse verhinderte bislang jedoch eine eingehende Studie des PDGFR α in der Schädelentwicklung. Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Etablierung eines Mausmodells, mit dem eine Untersuchung der Rolle des PDGFR α in der Entwicklung der NLZ-abstammenden Schädelstrukturen auch noch nach der Geburt möglich war. Diese Tiere entwickelten postnatal eine Kraniosynostose, was auf eine Dysregulation der Schädelossifikation hinweist. Dabei waren, wie erwartet, nur die Schädelnähte betroffen, bei denen es sich um Derivate der Neuralleistenzellen handelt. Während die Sutura frontalis in den transgenen Tieren innerhalb der ersten 5 Tage fusionierte, kam es im Fall der Sutura coronalis erst nach 20 Tagen zu einer kompletten Fusion der Schädelnaht. Der zeitliche Unterschied der Fusion könnte damit erklärt werden, dass das Mesenchym der Sutura frontalis ein Derivat der Neuralleiste ist, während das der Sutura coronalis seinen Ursprung in der Neuralleiste sowie im Mesoderm hat (Jiang et al., 2002). Deshalb besteht die Sutura coronalis in den R26^{hPDGFR α PM}-Mäusen aus einem gemischten Pool von Wildtyp- und genetisch veränderten Zellen, die den transgenen, autoaktiven PDGFR α exprimieren. Das Vorhandensein von einer Anzahl von Knochenvorläuferzellen, die im normalen Rahmen zu Osteoblasten differenzieren, könnte die zeitliche Verschiebung der Fusion der Sutura coronalis im Vergleich zur Sutura frontalis erklären.

Neben den Schädelnähten konnte zusätzlich eine aberrante Entwicklung der Struktur der Stirnknochen beobachtet werden, die deutlich im Querschnitt der Knochen zu erkennen war. Mit Hilfe einer Giemsa-Färbung konnte gezeigt werden, dass in den Stirnknochen der transgenen Mäuse der Anteil an synthetisierter Matrix erhöht war und somit das Modell einer Hyperossifikation unterstützte.

Diese Resultate spiegeln in umgekehrter Weise die Ergebnisse der PDGFR α -knock-out-Studie wider. Denn während ein knock-out des Rezeptors zu einer unvollständigen Ossifikation führt, resultiert ein autoaktiver PDGFR α in einer Hyperossifikation.

5.2. Funktion von PDGF in der Knochenentwicklung

Frühere Studien, die den Effekt von PDGF auf die Knochenentwicklung untersucht haben, führten zu unterschiedlichen Resultaten. Mitlak et al. demonstrierten in einem Kaninchenmodell, dass die Dichte und Stärke des Skeletts bei konstanter PDGF-Zugabe signifikant erhöht wird und es in diesem Modell zu einem frühzeitigen Verschluss der Wachstumsfuge kommt (Mitlak et al., 1996). Weiterhin beobachteten Lynch et al., dass eine Behandlung mit IGF1 (insulin-like growth factor) und PDGF die Heilung von Knochenbrüchen im Kaninchen fördert (Lynch et al., 1994). Horner et al. schließlich analysierten die Verteilung von PDGF-A und PDGFR α in schnell wachsenden Knochen im Menschen und konnten eine spezifische regionale Verteilung des Rezeptors in den knochenbildenden Zellen detektieren (Horner et al., 1996). Zusammenfassend demonstrierten diese Studien eine PDGF-abhängige Stimulation der Knochenentwicklung und –regeneration und reflektieren damit die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

In anderen Studien konnte dagegen ein inhibitorischer Effekt von PDGF im Prozess der Osteogenese beobachtet werden. So wurde in verschiedenen *in-vitro*-Studien, denen entweder Untersuchungen an primären Osteoblasten aus Mauskalvarien (Yu et al., 1997) oder menschlichen Knochenmarkstammzellen (hMSC) (Chaudhary et al., 2004; Kratchmarova et al., 2005) zu Grunde liegen, gezeigt, dass PDGF zwar die Proliferation von Osteoblasten, jedoch nicht ihre Differenzierung und Mineralisierung stimuliert. Kratchmarova et al. demonstrierten weiterhin, dass die Differenzierung von hMSC in Osteoblasten zwar von EGF (epidermal growth factor), aber nicht von PDGF gefördert wird, und dass dieser inhibitorische Effekt von PDGF durch die spezifische Aktivierung des PI3K-Signalweges abhängig ist.

Die genannten Studien verwendeten PDGF-BB, um die Funktion von PDGF-abhängigen Signalwegen in der Knochenentwicklung zu untersuchen (Chaudhary et al., 2004; Horner et al., 1996; Kratchmarova et al., 2005; Lynch et al., 1994; Yu et al., 1997). Da dieser Ligand alle möglichen Formen von PDGFR-Homo- und Heterodimeren aktiviert, können in derartigen Studien die molekularen Mechanismen, die einem beobachteten Phänotyp zu Grunde liegen, keinem spezifischen PDGFR zugeordnet werden. Der Vorteil des in dieser Arbeit etablierten Mausmodells besteht in der spezifischen Autoaktivierung des PDGFR α , die es ermöglicht, die Konsequenzen der von diesem Rezeptor aktivierten Signalwege in der

Knochenentwicklung zu untersuchen, ohne dass es zu einer Interferenz von Signalwegen kommt, die aus einer PDGFR β -Aktivierung hervorgehen. Dies könnte der Grund dafür sein, weshalb Kratchmarova et al. in ihren Experimenten eine Aktivierung des PI3K-Signalweges feststellen, wohingegen in dieser Arbeit eine spezifische Aktivierung des PLC γ -Signalweges detektiert werden konnte.

Weiterhin stimuliert PDGF-BB neben PDGF-AB und PDGF-AA zwar die Proliferation von potentiellen Knochen-synthetisierenden Zellen (Centrella et al., 1991; Pfeilschifter et al., 1992), jedoch sind die Isoformen PDGF-BB und PDGF-AB hauptsächlich in Blutplättchen und Serum lokalisiert (Hammacher et al., 1988; Hart et al., 1990), wobei PDGF-AA von Knochenzellen sezerniert wird (Rydzial et al., 1992; Zhang et al., 1991). Daraus resultiert, dass Osteoblasten unter normalen Bedingungen gar nicht dem Liganden PDGF-BB ausgesetzt sind. Deshalb sollten Studien, bei denen die Knochenentwicklung lediglich mit Hilfe von PDGF-BB induziert wird, kritisch beurteilt werden, wenn die Ergebnisse mit physiologischen Prozessen verglichen werden.

Da PDGF-AA nachweislich von Knochenzellen sezerniert wird und spezifisch den PDGFR α aktiviert, könnten die Ergebnisse der vorliegenden Studie die normalen Vorgänge der Osteogenese in naturgetreuer Weise widerspiegeln.

5.3. Biphasischer Effekt von PDGFR α in Osteoblasten

Die hier durchgeführten *in-vivo*- und *in-vitro*-Versuche demonstrierten einen biphasischen Effekt von PDGFR α auf den Metabolismus von Osteoblasten. Als Erstes konnte beobachtet werden, dass die Expression des autoaktiven Rezeptors die Proliferation der Knochenvorläuferzellen verstärkt. Dieses Ergebnis stimmt mit vorherigen Untersuchungen überein, die eine Rolle von PDGFR α in der Proliferation verschiedener Tumore demonstrierten (Matei et al., 2006; Xie et al., 2001).

In einem zusätzlich durchgeführten Apoptoseassay konnte gezeigt werden, dass die Hyperproliferation der mutanten Knochenvorläuferzellen nicht durch einen Anstieg der Apoptoserate ausgeglichen wurde. Die verfrühte Fusion der Schädelnähte ist demzufolge zumindest zum Teil auf eine Vergrößerung des Pools an potentiellen Osteoblasten, die zukünftig die Bestandteile der Knochenmatrix synthetisieren, zurückzuführen.

Zusätzlich konnte eine Funktion des Rezeptors während der Differenzierung der Knochenvorläuferzellen zu Osteoblasten bewiesen werden. Der Einfluss von PDGFR α auf den Differenzierungsprozess der Osteoblasten wurde größtenteils anhand des im Rahmen dieser Arbeit etablierten Zellkultursystems durchgeführt, mit dem eine kontrollierte Differenzierung von primären Mesenchymzellen zu Osteoblasten möglich war. In Kontrollexperimenten konnte dabei eine Zell-spezifische und Medium-spezifische Differenzierung der primären Zellen bestätigt werden. Zwar wiesen embryonale Fibroblasten im Gegensatz zu 3T3-Zellen ein geringes Differenzierungspotential auf. Das könnte aber daran liegen, dass die Fibroblasten frisch aus ganzen Embryonen gewonnen wurden und es sich deshalb eher um eine Mischpopulation handelt, in der sich neben ausgereiften Fibroblasten zusätzlich mesenchymale Zellen mit Stammzellpotential befinden können. Bei den 3T3-Zellen handelt es sich dagegen um eine immortalisierte, stabile Zelllinie, die schon 1963 etabliert worden ist (Todaro and Green, 1963), und daher das Vorkommen von Zellen mit Stammzellcharakter in dieser Kultur ausgeschlossen werden kann. Im Gegensatz zu den beiden Kontrollzelllinien besaßen die aus Mauskalvarien isolierten Zellen ein eindeutig nachweisbares Differenzierungspotential. Denn diese Zellen waren fähig eine kalzifizierte Knochenmatrix zu synthetisieren, wenn sie mit Differenzierungsmedium kultiviert wurden.

Das Zellkultursystem wurde genutzt, um verschiedene osteoblastäre Marker zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung nachzuweisen. Dadurch konnte eindeutig eine vorzeitige Differenzierung der aus R26^{hPDGFR α PM}-Mäusen stammenden Zellen zu reifen Osteoblasten demonstriert werden. Untersuchungen von Proteinlysaten mittels Western-Blot-Analyse konnten weiterhin eine verstärkte Aktivierung des PLC γ -Signalweges in den mutanten Osteoblasten nachweisen. Zhen et al. beobachteten, dass dieser Signalweg eine wichtige Funktion bei der Regulation des Phosphattransports in Knochenzellen spielt und durch PDGF stimuliert wird (Zhen et al., 1997). Der Phosphat-Transport in die Zelle spielt neben der Rolle im Zellmetabolismus eine essentielle Funktion in der Kalzifizierung der Knochenmatrix. Während der frühen Phase der Matrixkalzifizierung spalten sich von den Osteoblasten durch Exozytose so genannte Matrixvesikel (MV) ab, in denen sich die ersten Prozesse der Kalziumapatidsynthese abspielen (Anderson, 1995). Dieser Prozess ist biphasisch. Phase 1 ist mit der Formation des ersten Knochenminerals assoziiert und geht mit dem Transport von Ca²⁺ und anorganischem Phosphat (Pi)

in die MVs einher. Dabei spielen MV-assoziierte Phosphatasen, darunter ALP2, eine wichtige Rolle, indem sie das β -Glycerophosphat im Differenzierungsmedium zu Pi degradieren (Bellows et al., 1992; Garimella et al., 2004). Phase 2 ist mit der Penetration der MV-Membran durch die wachsenden Kalziumapatidkristalle verbunden. Ab diesem Zeitpunkt ist die Proliferationsrate der Kristalle von der extrazellulären Ca^{2+} - und Pi-Konzentration abhängig und verläuft in einem autokatalytischen Prozess.

Die essentielle Rolle der $\text{PLC}\gamma$ -abhängigen Pi-Aufnahme für die Differenzierung der Osteoblasten wurde durch die Behandlung der reifenden Osteoblasten mit einem $\text{PLC}\gamma$ -spezifischen Inhibitor zu verschiedenen Zeitpunkten während der Differenzierung deutlich. Als dieser Signalweg vor Beginn der Matrixkalzifizierung inhibiert wurde, konnte zwar die Bildung einer Knochenmatrix, jedoch nicht deren Kalzifizierung beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte lediglich eine leichte Reduzierung der Matrixkalzifizierung detektiert werden, als der $\text{PLC}\gamma$ -Signalweg erst nach fortschreitender Reifung der Knochenmatrix blockiert wurde. Dieser zeitabhängige Effekt der $\text{PLC}\gamma$ -Inhibition kann durch das Phänomen der biphasischen Mineralbildung erklärt werden. Zu einem frühen Zeitpunkt der Matrixmaturation befinden sich nur Phase 1 MVs in der Kultur. In diesem Fall verhindert eine Hemmung des $\text{PLC}\gamma$ -Signalweges schon die Bildung erster Knochenkristalle bzw. die Verlängerung der Minerale, so dass es zu keiner Penetration der MV-Membran kommt. Eine Blockierung des $\text{PLC}\gamma$ -Signalweges zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt kann dagegen eine Proliferation der Kristalle nicht verhindern, da die Kristalle zuvor in die extrazelluläre Umgebung freigesetzt wurden und deshalb die Proliferation unabhängig von einem Pi-Transport in die MVs verläuft. Da Phase 1 und Phase 2 nicht getrennt voneinander ablaufen, resultiert eine $\text{PLC}\gamma$ -Inhibition zu dem späteren Zeitpunkt also nur in einer verminderten Kalzifizierung der Knochenmatrix, da zwar die Bildung neuer Kristalle, aber nicht die Verlängerung der extrazellulär lokalisierten Kristalle unterdrückt wird.

5.4. ALP2 und Stoffwechselaktivität

In *in-vitro*-Experimenten konnte durch einen immunhistochemischen Nachweis und eine RT-PCR eine vorzeitige Hochregulation von ALP2 in den mutanten Osteoblasten nachgewiesen werden. Diese könnte zu einer gesteigerten Degradation von β -Glycerophosphat zu Pi führen, welches anschließend durch den

aktivierten PLC γ -Signalweg in die MVs transportiert würde. Dieser Prozess würde zusätzlich zu einer verfrühten Kalzifizierung der Knochenmatrix beitragen.

Ein Indiz für diesen Vorgang könnte der schnelle Farbumschlag von Phenolrot im Differenzierungsmedium im Fall der mutanten Osteoblasten sein. Phenolrot ist ein Bestandteil des Zellkulturmediums und dient zur Kontrolle des pH-Wertes. Es ist bei pH 7,4 rot und wird über orange (pH 7,0) schließlich gelb (pH 6,5). Da die Zellkultur in einem geschlossenen System durchgeführt wurde, sank der pH-Wert in Abhängigkeit von der Stoffwechselaktivität der Zellen. Während der Differenzierungsexperimente konnte beobachtet werden, dass das Medium der Osteoblasten aus R26^{hPDGFR α PM}-Mäusen schon nach einem Tag gelb verfärbt war, während das Medium der Zellen aus Kontrollmäusen bei dreimaligem Wechsel in der Woche konstant eine rote Farbe aufwies, weshalb von einer erhöhten Stoffwechselaktivität in den mutanten Osteoblasten auszugehen ist. Es kann spekuliert werden, dass die Erhöhung der Stoffwechselaktivität auf die Degradation von β -Glycerophosphat zu Pi in Abhängigkeit von ALP2 zurückzuführen ist.

5.5. Der transkriptionelle Repressor Msx2

Die Expression der osteoblastären Marker Osteocalcin, Bsp2 und ALP2 ist durch den Transkriptionsfaktor Runx2 reguliert (Barnes et al., 2003; Gutierrez et al., 2002; Harada et al., 1999; Paredes et al., 2004; Roca et al., 2005; Zaidi et al., 2001). Die Aktivität von Runx2 wiederum wird durch das Homeoboxprotein Msx2 gesteuert, bei dem es sich um einen transkriptionellen Repressor handelt (Barnes et al., 2003; Newberry et al., 1998; Shirakabe et al., 2001; Sierra et al., 2004). In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten RT-PCR-Experimenten wurde in den mutanten Osteoblasten eine vorzeitige Expression von Osteocalcin, Bsp2 und ALP2 zwischen Tag 4 und Tag 6 detektiert. Dagegen konnte eine konstante Runx2 Expression während der Differenzierung beobachtet werden, die sich zwischen Wildtyp- und mutanten Zellen nicht unterschied. Um zu prüfen, ob sich die frühe Expression der Knochenmarker durch eine vorzeitige Herabregulation der Msx2-Expression erklären lässt, wurde eine Msx2-spezifische RT-PCR zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Differenzierung durchgeführt. Tatsächlich war im Gegensatz zu den Wildtyp-Zellen die Msx2-Expression in den mutanten Zellen zu einem früheren Zeitpunkt herabreguliert. Da dieser Unterschied jedoch nicht vor Tag 10 detektierbar

war, kann vermutet werden, dass die frühe Expression der osteoblastären Marker zwar ein verändertes Expressionsmuster von Msx2 beinhaltet, jedoch nicht darauf beschränkt sein kann.

5.6. MAPK-Signalweg in Osteoblasten

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des MAPK-Signalweges in verschiedenen Zelltypen durch die Zugabe von PDGF stimuliert werden kann (Graves et al., 1993; Lubinus et al., 1994; Schramek et al., 1996; Thommes et al., 1996). Obwohl in seltenen Fällen eine PDGFR α -spezifische Stimulation des MAPK-Signalweges mittels PDGF-AA erfolgte, wurde in den meisten Versuchen der Signalweg mit PDGF-BB und dadurch PDGFR-unspezifisch induziert. Die Western-Blot-Analysen der vorliegenden Arbeit demonstrierten einen vergleichbaren Phosphorylierungsstatus des MAPK-Signalweges in Osteoblasten aus Kontrollmäusen und R26^{hPDGFR α PM}-Mäusen. Da der autoaktive PDGFR α keinen Einfluss auf die Aktivierung dieses Signalweges zu haben schien, kann spekuliert werden, dass in Osteoblasten eine PDGFR β -abhängige Regulation des MAPK-Signalweges erfolgt.

Die physiologische Rolle des MAPK-Signalweges in der Entwicklung von Osteoblasten ist umstritten. Während in einigen Studien ein stimulierender Effekt dieses Signalweges in der Differenzierung von Osteoblasten beobachtet werden konnte, demonstrierten andere Studien eine inhibitorische Wirkung des Signalweges auf die Differenzierung von Osteoblasten (Schindeler and Little, 2006). So generierten Ge et al. transgene Mäuse, die entweder eine konstitutiv-aktive oder eine dominant-negative Form der MAPK unter der Kontrolle des Osteocalcinpromotors exprimieren. Die *in-vivo* und *in-vitro*-Analyse des jeweiligen Phänotyps verdeutlichte einen stimulierenden Effekt des MAPK-Signalweges auf die Knochenentwicklung, da es im Fall der Expression der konstitutiv-aktiven Form zu einer Hyperossifikation kam, wohingegen die Expression der dominant-negativen Form eine Ossifikation unterdrückte (Ge et al., 2007). Im Gegensatz dazu zeigten Kono et al. in ihrer Studie, dass die Injektion eines Virus in Mauskalvarien, das eine dominant-negative Form der MAPK exprimiert, eine Ossifikation der Knochen fördert, währenddessen die Injektion eines Virus mit einer konstitutiv-aktiven Form die Osteogenese blockt (Kono et al., 2007).

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Western-Blot-Analysen unterstützen einen inhibitorischen Effekt des MAPK-Signalweges auf die Differenzierung von Osteoblasten, da dieser Signalweg im Laufe der Differenzierung herabreguliert wurde.

5.7. PDGFR α -Sequenzanalyse

Die Expression des autoaktiven PDGFR α in Neuralleistenzellen und deren Derivaten resultierte in einem Phänotyp, der das Krankheitsbild der Kraniosynostose im Menschen widerspiegelt. Um PDGFR α -Mutationen als eine mögliche Ursache für die Entstehung von Kraniosynostose zu untersuchen, wurde eine PDGFR α -Sequenzanalyse von 15 nicht verwandten Kraniosynostose-Patienten durchgeführt. Dabei wurden die aus GISTs bekannten hotspot-Regionen analysiert, die mit aktivierenden PDGFR α -Mutationen in Verbindung gebracht werden können. Im Rahmen dieser Studie konnten zwei verschiedene Polymorphismen in der DNA von zwei Patienten detektiert werden, die jedoch mit keinem Phänotyp in Verbindung gebracht werden konnten.

In zusätzlichen Untersuchungen mit einem erweiterten Patientenkollektiv und einer Sequenzierung des gesamten Rezeptors könnten existierende PDGFR α -assoziierte Kraniosynostose-Fälle identifiziert werden. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Kraniosynostose mit der Aktivierung des PLC γ -Signalweges in Verbindung gebracht werden konnte, würde eine Sequenzanalyse der Mitglieder dieses Signalweges von Interesse sein.

5.8. Molekulare Mechanismen der PDGFR α -abhängigen Schädel-ossifikation

In der von M. Tallquist und P. Soriano durchgeführten konditionalen PDGFR α -knock-out-Studie konnte eine Rolle des PDGFR α in der Entwicklung von kranialen Neuralleistenzellen ermittelt werden. Der embryonal-letale Phänotyp dieser transgenen Mäuse verhinderte jedoch eine nähere Beschreibung der Funktion des Rezeptors in der Entwicklung der Schädelknochen. Es wurde lediglich gemutmaßt, dass PDGFR α in der Differenzierung von einer NLZ-abstammenden Zellpopulation involviert sein könnte (Tallquist and Soriano, 2003).

Mit Hilfe der R26^{hPDGFR α PM}-ES-Zellklone gelang in dieser Arbeit die Generierung eines Mausmodells, das eine konditionale Expression eines autoaktiven PDGFR α erlaubt. Nach Einkreuzung dieser Mauslinie in den Wnt1Cre-Mausstamm konnte eine gewebsspezifische Expression des mutierten Rezeptors in den Nasen- bzw. Stirnknochen und Scheitelbeinen des Schädels erzielt werden. Die durchschnittliche Lebensdauer dieser Mäuse von 6 Monaten ermöglichte eine intensive Studie der Funktion des PDGFR α in der Bildung der Schädelknochen. Es konnte nicht nur eine Rolle des Rezeptors in der Entwicklung von kranialen Neuralleistenzellen bestätigt, sondern zusätzlich eine Funktion des Rezeptors in der Proliferation der Mesenchymzellen und deren Differenzierung zu Osteoblasten identifiziert werden. Die Etablierung eines Zellkultursystems, das eine kontrollierte Differenzierung von primären Zellen aus Mauskalvarien zu Osteoblasten erlaubt, ermöglichte eine detaillierte Studie der molekularen Mechanismen, die einer PDGFR α -abhängigen Ossifikation der Schädelknochen zu Grunde liegen. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 5.1. schematisch zusammengefasst.

Die Aktivierung des PDGFR α führt zu einer Signalübertragung auf Substratproteine des PLC γ -Signalweges im Zytoplasma der Zellen. Dadurch kommt es unter anderem zur Synthese von Phosphatcarrier und deren Insertion in die Plasmamembran. Aus dieser schnüren sich in der frühen Phase der Matrixkalzifizierung durch Exozytose die Matrixvesikel ab, in denen die anfänglichen Prozesse der Kalziumapatidsynthese stattfinden. Durch die membrangebundene ALP2 wird organisches Phosphat (R-O-PO₄) zu Pi (PO₄³⁻) degradiert, welches über die Phosphatcarrier in das Innere der Matrixvesikel transportiert wird. Zusammen mit Ca²⁺ reagiert es dort zu Kalziumapatid.

Im Zellkern kommt es zu einer Herabregulation der Msx2 Transkript-Menge, wodurch die transkriptionelle Inhibition von Msx2 auf Runx2 gehemmt wird. Dieser und andere Vorgänge führen zu einer gesteigerten Expression der osteoblastären Marker Osteocalcin, Bsp2 und ALP2, die eine Kalzifizierung der Knochenmatrix fördern.

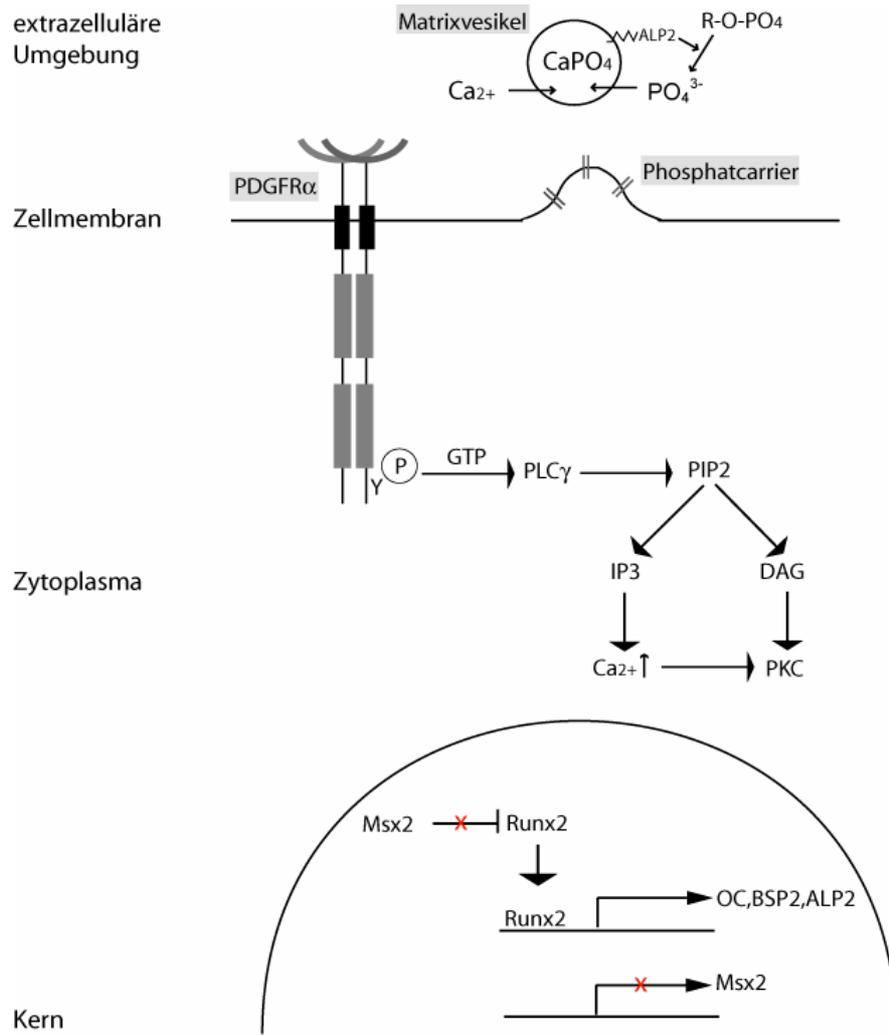


Abb. 5.1. Schematische Darstellung der PDGFR α -abhängigen molekularen Mechanismen in der Differenzierung von Osteoblasten.

6. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig eine Funktion des PDGFR α in der NLZ-abhängigen Osteogenese durch die Regulation des PLC γ -Signalweges nachgewiesen werden.

Um dieses Ergebnis in einem weiteren Versuch zu bestätigen, könnten Zellen aus den Nasen- und Stirnknochen von Wildtypmäusen in Kultur genommen werden und in diesen die PDGFR α -abhängigen Signalwege durch die Zugabe von PDGF-AA induziert werden. Dadurch könnte eine Aktivierung des Rezeptors ähnlich der Autoaktivierung in den mutanten Zellen erreicht werden. Wenn die Zellen *in-vitro* zu Osteoblasten differenziert werden, sollten in dem Fall, dass die premature Differenzierung der Osteoblasten in den mutanten Zellen eine Folge des autoaktiven PDGFR α ist, die PDGF-AA behandelten Wildtypzellen im Gegensatz zu unbehandelten Wildtypzellen vorzeitig differenzieren. Wenn dies der Fall wäre, könnte man die Zellen in einem weiteren Versuch zusätzlich zu PDGF-AA mit dem PLC γ -spezifischen Inhibitor U73122 behandeln. Falls dadurch eine Kalzifizierung der Knochenmatrix entfällt, würde dieses Ergebnis die Rolle einer PDGFR α -spezifischen Regulation des PLC γ -Signalweges in der Osteogenese von NLZ-abstammenden Osteoblasten bestätigen.

Die in dieser Arbeit verwendeten R26^{hPDGFR α PM}-Mäuse wurden durch konditionales Gene-Targeting unter Verwendung des Cre/loxP-Rekombinasesystems generiert. Diese Strategie ermöglicht eine exakte zeitliche und räumliche Kontrolle der Expression des mutanten PDGFR α . Voraussetzung ist lediglich die Verpaarung der Mäuse mit einer entsprechenden Cre-Maus, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines entwicklungspezifischen oder gewebespezifischen Promotors exprimiert. Die Kombination von spezifischen Promotoren mit induzierbaren Varianten der Cre-Rekombinase hat bis heute etwa 80 verschiedene Cre-Mausstämme hervorgebracht. Durch die stetige Weiterentwicklung der Gene-Targeting-Methoden ist abzusehen, dass in Zukunft für praktisch alle Fragestellungen eine geeignete transgene Cre-Maus zur Verfügung stehen wird.

Unter Verwendung der derzeit existierenden Cre-Mausstämme könnte die hier etablierte R26^{hPDGFR α PM} Mauslinie dazu genutzt werden, um die Rolle des PDGFR α

in folgenden entwicklungsbiologischen oder pathogenetischen Kontexten zu untersuchen.

Entwicklung:

1. des axialen Skeletts

Während der frühen Embryogenese kann eine gewebsspezifische Expression des PDGFR α in den Derivaten des Mesoderms, besonders im paraxialen Mesoderm und nach der Somitogenese im Sklerotom, beobachtet werden (Orr-Urtreger et al., 1992; Schatteman et al., 1992; Takakura et al., 1997).

Die Somiten von PDGFR α knock-out-Mäusen sind größenretardiert, und verschiedene Elemente des axialen Skeletts weisen in der fortschreitenden Entwicklung Fusionen auf (Soriano, 1997). Weitere Analysen anhand von Micromass-Kulturen demonstrierten, dass PDGF-AA ein potenter Induktor der Chondrogenese ist und die Reifung der Chondrozyten in Osteoblasten fördert (Tallquist et al., 2000).

Die gewebsspezifische Expression von PDGFR α während der Embryogenese und die Ergebnisse vorgenannter Studien weisen auf eine funktionelle Rolle des PDGFR α in der Entwicklung des axialen Skeletts hin.

Um die Rolle des Rezeptors in diesem entwicklungsbiologischen Zusammenhang näher zu untersuchen, könnten die R26^{hPDGFR α PM}-Mäuse in einen Col2a1Cre- (Sakai et al., 2001) oder Col1a1Cre- (Dacquin et al., 2002; Kim et al., 2004) Mausstamm eingekreuzt werden, um eine Chondrozyten- bzw. Osteoblasten-spezifische Expression des autoaktiven PDGFR α zu erlangen.

2. von Mammakarzinomen

Als Onkogen ist PDGFR α bei der Entstehung verschiedener Tumore beteiligt. So konnte in einer früheren Studie gezeigt werden, dass in einer Anzahl von duktal invasiven Mammakarzinomen eine Überexpression des Rezeptors vorliegt, die mit einem malignen Verlauf des Tumors einhergeht (Carvalho et al., 2005). In einer weiteren Studie konnte beobachtet werden, dass eine autokrine PDGF/PDGFR-Schleife in Mammakarzinomen mit Tumorprogression und Metastasierung korreliert (Jechlinger et al., 2006).

In unserem Labor wurden in Zusammenarbeit mit Dr. R. Jäger die R26^{hPDGFR α PM}-Mäuse in den MMTVCre-Mausstamm (Wagner et al., 1997) eingekreuzt, um eine brustspezifische Expression des mutanten PDGFR α zu erzielen. In den Nachkommen, die sowohl die Cre-Rekombinase als auch das knock-in Allel tragen, kann nach 8-9 Monaten die Entstehung von Mammakarzinomen beobachtet werden. Dieses Ergebnis bestätigt einen Einfluss des PDGFR α in der Pathogenese dieser Tumore und diese Mäuse können dafür verwendet werden, um die Rolle von PDGFR α in der Entwicklung von Mammakarzinomen weiter zu spezifizieren.

3. von testikulären Keimzelltumoren

Während der Entwicklung des männlichen Geschlechtsorgans in Wirbeltieren können die Mitglieder der PDGF-Familie sowie pränatal als auch postnatal nachgewiesen werden, wobei sie hauptsächlich in den Sertolizellen, den perimyoid Zellen und in den Ledyigzellen exprimiert werden (Basciani et al., 2002; Gnessi et al., 1995). PDGFR α spielt dabei eine essentielle Rolle bei der Differenzierung von embryonalen und adulten Leydigzellen (Brennan et al., 2003; Gnessi et al., 2000).

PDGFR α knock-out-Mäuse weisen vergrößerte Hodenkanälchen auf (Brennan et al., 2003). Dieser Phänotyp kann auch beobachtet werden, wenn embryonale Hoden mit PDGFR-Inhibitoren behandelt werden (Uzumcu et al., 2002).

Während das Vollängentranskript von PDGFR α 6,4 kb groß ist, konnte in testikulären Keimzelltumoren (TKZT) ein alternatives 1,5 kb Transkript detektiert werden, das von einem Promotor innerhalb des Introns 12 abgelesen wird. Dieses Transkript wird als putativer Marker für die frühe molekulare Diagnose von TKZT diskutiert (Palumbo et al., 2002).

Um eine Rolle des PDGFR α in der Pathogenese von TKZT zu untersuchen, wurden die R26^{hPDGFR α PM}-Mäuse in den TNAPCre-Mausstamm (Lomeli et al., 2000) eingekreuzt. Dadurch konnte eine Expression des mutierten Rezeptors in primordialen Keimzellen erzielt werden. Es gab keine Nachkommen, die sowohl die Cre-Rekombinase als auch den mutierten PDGFR α im Genom tragen, was auf einen embryonal-letalen Phänotyp hinweist. Da es bei der Verwendung der TNAPCre-Mäuse auch zu einer Expression der Cre-Rekombinase in der Labyrinthregion der Placenta, im Darm und im Neuralrohr kommen kann (Lomeli et al., 2000), kann dieser Phänotyp ohne weitere Untersuchungen dieser Organe nicht exklusiv einem Keimzelldefekt zugeschrieben werden. Deshalb wurden die Mäuse in einem zweiten

Ansatz mit dem PrpCre-ER^T-Mausstamm verpaart, der eine spezifische Expression einer Tamoxifen-induzierbaren Cre-Rekombinase im Hoden unter der Kontrolle des murinen Prion-Protein-Promotors erlaubt (Weber et al., 2003). Die Nachkommen wurden genotypisiert und die Induktion der Cre-Rekombinase nach der Geburt durch intraperitoneale Tamoxifengabe über 5 Tage erzielt. Die Mäuse befinden sich derzeit unter Beobachtung in unserem Tierstall.

4. von Gastrointestinale Stromatumoren

Gastrointestinale Stromatumoren (GISTs) sind die häufigsten mesenchymalen Tumore des Gastrointestinaltrakts. Wurden sie in den 90er-Jahren den glattmuskulären Tumoren zugerechnet, konnten sie Anfang dieses Jahrhunderts durch den Nachweis des immunhistochemischen Markers CD117 (Kit-Rezeptor) endgültig als eigenständige Tumorenität identifiziert werden (Sarlomo-Rikala et al., 1998). Heute gilt der Nachweis von CD177 als „gold-standard“ für die Diagnose von GISTs (de Silva and Reid, 2003). Als potentielle Vorläuferzellen von GISTs gelten die interstiellen Cajal-Zellen (ICZ) (Kindblom et al., 1998), die wahrscheinlich nicht, wie früher angenommen, vom Neuroektoderm, sondern von den Mesenchymzellen des Darms abstammen (Lecoin et al., 1996; Young et al., 1996) und als spezialisierte glatte Muskelzellen eine Schrittmacherfunktion ausüben. Während mehr als 80% der GISTs eine aktivierende Mutation im *KIT*-Gen tragen (Hirota et al., 1998), konnte 2004 erstmalig nachgewiesen werden, dass in etwa 5% der Fälle dem Tumor eine aktivierende Mutation im *PDGFR α* -Gen zugrunde liegt (Heinrich et al., 2003). Die häufigste identifizierte *PDGFR α* -Mutation ist die missense Mutation D842V, die in der vorliegenden Arbeit genutzt wurde, um ein konditionales Mausmodell mit einem konstitutiv aktiven *PDGFR α* zu generieren (R26^{hPDGFR α PM}).

Nach Einkreuzung der R26^{hPDGFR α PM}-Mäuse in den Wnt1Cre-Mausstamm, wurden die transgenen Mäuse auch auf das Vorhandensein von GISTs untersucht. Dabei konnten in keinem Fall aberrante Veränderungen des Gastrointestinaltrakts beobachtet werden, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass die Vorläuferzellen der GISTs ihren Ursprung nicht in den Neuralleistenzellen, sondern in den Mesenchymzellen des Darms haben. Um zu prüfen, ob eine spezifische Expression des mutierten *PDGFR α* in den glatten Muskelzellen des Darms zu der Entstehung von GISTs führen kann, wurden die R26^{hPDGFR α PM}-Mäuse in den SM22CreER^T-Mausstamm eingekreuzt, der die gewebespezifische Expression einer mit Tamoxifen

induzierbaren Cre-Rekombinase in glatten Muskelzellen ermöglicht (Kühbandner et al., 2000). Die Nachkommen wurden genotypisiert und die Induktion der Cre-Rekombinase nach der Geburt durch intraperitoneale Tamoxifengabe über 5 Tage erzielt. Anschließend wurden die Mäuse für ein Jahr beobachtet. Innerhalb dieses Zeitraums konnte kein Phänotyp beobachtet werden.

Um die Rolle des $PDGFR\alpha$ in der Entstehung von GISTs zukünftig untersuchen zu können, könnten die $R26^{hPDGFR\alpha PM}$ -Mäuse mit einem Cre-Mausstamm verpaart werden, durch den eine spezifische Expression der Cre-Rekombinase in den Vorläuferzellen von GISTs erzielt werden könnte. Für diesen Zweck würde sich die im Jahr 2007 generierte $c\text{-KitCre-ER}^T$ -Mauslinie eignen, die eine gewebsspezifische und induzierbare Aktivierung von Genen in ICZ und Mastzellen ermöglicht (Nagl et al., 2007).

5. von Glioblastomen

In der Pathogenese von Glioblastomen stellt die Amplifikation von Onkogenen eine wichtige genetische Veränderung dar. Dabei ist in 30-40% der Glioblastome das *EGFR*-Gen betroffen, wohingegen man in einem geringeren Prozentsatz (<10%) Amplifikationen des *PDGFR α* -Gens findet (Ekstrand et al., 1991; Fleming et al., 1992).

Ein wichtiger Marker für Glioblastome stellt das Protein Nestin dar. Dabei handelt es sich um ein Intermediärfilament-Protein, das während der Entwicklung des zentralen Nervensystems nur in neuroepithalen Stammzellen, nicht aber in ausdifferenzierten Neuronen und Gliazellen exprimiert wird (Tohyama et al., 1992). In Gliomen ist Nestin lediglich in den Tumorzellen detektierbar, wobei die Expression des Gens während der Entwicklung des Glioms zum Glioblastom zunimmt (Rani et al., 2006; Thomas et al., 2004). Die Gliom- und Glioblastom-spezifische Expression von Nestin war die Voraussetzung für die Generierung eines NestinCre-Mausstammes (Tronche et al., 1999), der die Untersuchung der Funktion eines beliebigen Gens in Gehirntumoren ermöglicht. So könnte dieser Mausstamm beispielsweise dazu genutzt werden, um die Rolle des $PDGFR\alpha$ in der Pathogenese von Glioblastomen zu untersuchen.

7. Literaturverzeichnis

Abremski, K. and Hoess, R. (1984). Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J Biol Chem* **259**, 1509-14.

Anderson, H. C. (1995). Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop Relat Res*, 266-80.

Anselme, K. (2000). Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* **21**, 667-81.

Aubin, J. E. (1998). Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol* **76**, 899-910.

Barnes, G. L., Javed, A., Waller, S. M., Kamal, M. H., Hebert, K. E., Hassan, M. Q., Bellahcene, A., Van Wijnen, A. J., Young, M. F., Lian, J. B. et al. (2003). Osteoblast-related transcription factors Runx2 (Cbfa1/AML3) and MSX2 mediate the expression of bone sialoprotein in human metastatic breast cancer cells. *Cancer Res* **63**, 2631-7.

Basciani, S., Mariani, S., Arizzi, M., Ulisse, S., Rucci, N., Jannini, E. A., Della Rocca, C., Manicone, A., Carani, C., Spera, G. et al. (2002). Expression of platelet-derived growth factor-A (PDGF-A), PDGF-B, and PDGF receptor-alpha and -beta during human testicular development and disease. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 2310-9.

Bazenet, C. E., Gelderloos, J. A. and Kazlauskas, A. (1996). Phosphorylation of tyrosine 720 in the platelet-derived growth factor alpha receptor is required for binding of Grb2 and SHP-2 but not for activation of Ras or cell proliferation. *Mol Cell Biol* **16**, 6926-36.

Bellows, C. G., Heersche, J. N. and Aubin, J. E. (1992). Inorganic phosphate added exogenously or released from beta-glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules in vitro. *Bone Miner* **17**, 15-29.

Betsholtz, C., Karlsson, L. and Lindahl, P. (2001). Developmental roles of platelet-derived growth factors. *Bioessays* **23**, pp. 494-507.

Bhargava, U., Bar-Lev, M., Bellows, C. G. and Aubin, J. E. (1988). Ultrastructural analysis of bone nodules formed in vitro by isolated fetal rat calvaria cells. *Bone* **9**, 155-63.

Bishayee, S., Majumdar, S., Khire, J. and Das, M. (1989). Ligand-induced dimerization of the platelet-derived growth factor receptor. Monomer-dimer interconversion occurs independent of receptor phosphorylation. *J Biol Chem* **264**, 11699-705.

- Brennan, J., Tilmann, C. and Capel, B.** (2003). Pdgfr-alpha mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad. *Genes Dev* **17**, 800-10.
- Carroll, M., Tomasson, M. H., Barker, G. F., Golub, T. R. and Gilliland, D. G.** (1996). The TEL/platelet-derived growth factor beta receptor (PDGF beta R) fusion in chronic myelomonocytic leukemia is a transforming protein that self-associates and activates PDGF beta R kinase-dependent signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14845-50.
- Carvalho, I., Milanezi, F., Martins, A., Reis, R. M. and Schmitt, F.** (2005). Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha in breast cancer is associated with tumour progression. *Breast Cancer Res* **7**, R788-95.
- Centrella, M., McCarthy, T. L., Kusmik, W. F. and Canalis, E.** (1991). Relative binding and biochemical effects of heterodimeric and homodimeric isoforms of platelet-derived growth factor in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. *J Cell Physiol* **147**, 420-6.
- Chai, Y., Jiang, X., Ito, Y., Bringas, P., Jr., Han, J., Rowitch, D. H., Soriano, P., McMahon, A. P. and Sucov, H. M.** (2000). Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development* **127**, 1671-9.
- Chan, P. M., Ilangumaran, S., La Rose, J., Chakrabarty, A. and Rottapel, R.** (2003). Autoinhibition of the kit receptor tyrosine kinase by the cytosolic juxtamembrane region. *Mol Cell Biol* **23**, 3067-78.
- Chaplin, A. J. and Grace, S. R.** (1975). Calcium oxalate and the von Kossa method with reference to the influence of citric acid. *Histochem J* **7**, 451-8.
- Chaudhary, L. R. and Avioli, L. V.** (1998). Activation of c-Jun NH2-terminal kinases by interleukin-1 beta in normal human osteoblastic and rat UMR-106 cells. *J Cell Biochem* **69**, 87-93.
- Chaudhary, L. R., Hofmeister, A. M. and Hruska, K. A.** (2004). Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. *Bone* **34**, 402-11.
- Chen, L. L., Trent, J. C., Wu, E. F., Fuller, G. N., Ramdas, L., Zhang, W., Raymond, A. K., Prieto, V. G., Oyedeji, C. O., Hunt, K. K. et al.** (2004). A missense mutation in KIT kinase domain 1 correlates with imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* **64**, 5913-9.
- Cohen, M. M., Jr.** (1988). Craniosynostosis update 1987. *Am J Med Genet Suppl* **4**, 99-148.
- Cohen, M. M., Jr.** (1995). Craniosynostosis: phenotypic/molecular correlations. *Am J Med Genet* **56**, 334-339.

- Collin, P., Nefussi, J. R., Wetterwald, A., Nicolas, V., Boy-Lefevre, M. L., Fleisch, H. and Forest, N.** (1992). Expression of collagen, osteocalcin, and bone alkaline phosphatase in a mineralizing rat osteoblastic cell culture. *Calcif Tissue Int* **50**, 175-83.
- Corless, C. L., Schroeder, A., Griffith, D., Town, A., McGreevey, L., Harrell, P., Shiraga, S., Bainbridge, T., Morich, J. and Heinrich, M. C.** (2005). PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. *J Clin Oncol* **23**, 5357-64.
- Couly, G. F., Coltey, P. M. and Le Douarin, N. M.** (1993). The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras. *Development* **117**, 409-29.
- Dacquin, R., Starbuck, M., Schinke, T. and Karsenty, G.** (2002). Mouse alpha1(I)-collagen promoter is the best known promoter to drive efficient Cre recombinase expression in osteoblast. *Dev Dyn* **224**, 245-51.
- Danielian, P. S., Muccino, D., Rowitch, D. H., Michael, S. K. and McMahon, A. P.** (1998). Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr Biol* **8**, 1323-6.
- de Silva, C. M. and Reid, R.** (2003). Gastrointestinal stromal tumors (GIST): C-kit mutations, CD117 expression, differential diagnosis and targeted cancer therapy with Imatinib. *Pathol Oncol Res* **9**, 13-9.
- Druker, B. J. and Lydon, N. B.** (2000). Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* **105**, 3-7.
- Ecarot-Charrier, B., Glorieux, F. H., van der Rest, M. and Pereira, G.** (1983). Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J Cell Biol* **96**, 639-43.
- Ekstrand, A. J., James, C. D., Cavenee, W. K., Seliger, B., Pettersson, R. F. and Collins, V. P.** (1991). Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res* **51**, 2164-72.
- el Ghouzzi, V., Le Merrer, M., Perrin-Schmitt, F., Lajeunie, E., Benit, P., Renier, D., Bourgeois, P., Bolcato-Bellemin, A. L., Munnich, A. and Bonaventure, J.** (1997). Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet* **15**, 42-6.
- Eriksson, A., Nanberg, E., Ronnstrand, L., Engstrom, U., Hellman, U., Rupp, E., Carpenter, G., Heldin, C. H. and Claesson-Welsh, L.** (1995). Demonstration of functionally different interactions between phospholipase C-gamma and the two types of platelet-derived growth factor receptors. *J Biol Chem* **270**, 7773-81.

- Eriksson, A., Rorsman, C., Ernlund, A., Claesson-Welsh, L. and Heldin, C. H.** (1992). Ligand-induced homo- and hetero-dimerization of platelet-derived growth factor alpha- and beta-receptors in intact cells. *Growth Factors* **6**, 1-14.
- Fleming, T. P., Saxena, A., Clark, W. C., Robertson, J. T., Oldfield, E. H., Aaronson, S. A. and Ali, I. U.** (1992). Amplification and/or overexpression of platelet-derived growth factor receptors and epidermal growth factor receptor in human glial tumors. *Cancer Res* **52**, 4550-3.
- Fletcher, J. A.** (2004). Role of KIT and platelet-derived growth factor receptors as oncoproteins. *Semin Oncol* **31**, 4-11.
- Franceschi, R. T.** (1992). The role of ascorbic acid in mesenchymal differentiation. *Nutr Rev* **50**, 65-70.
- Franceschi, R. T. and Iyer, B. S.** (1992). Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* **7**, 235-46.
- Friedrich, G. and Soriano, P.** (1991). Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev* **5**, 1513-23.
- Garimella, R., Bi, X., Camacho, N., Sipe, J. B. and Anderson, H. C.** (2004). Primary culture of rat growth plate chondrocytes: an in vitro model of growth plate histotype, matrix vesicle biogenesis and mineralization. *Bone* **34**, 961-70.
- Ge, C., Xiao, G., Jiang, D. and Franceschi, R. T.** (2007). Critical role of the extracellular signal-regulated kinase-MAPK pathway in osteoblast differentiation and skeletal development. *J Cell Biol* **176**, 709-18.
- Geiger, M. J., Bull, M., Eckels, D. D. and Gorski, J.** (1993). Amplification of complementary DNA from mRNA with unknown 5' ends by one-way polymerase chain reaction. *Methods Enzymol* **218**, 321-35.
- Gerstenfeld, L. C., Chipman, S. D., Glowacki, J. and Lian, J. B.** (1987). Expression of differentiated function by mineralizing cultures of chicken osteoblasts. *Dev Biol* **122**, 49-60.
- Gietz, R. D. and Woods, R. A.** (2001). Genetic transformation of yeast. *Biotechniques* **30**, 816-20, 822-6, 828 passim.
- Gnessi, L., Basciani, S., Mariani, S., Arizzi, M., Spera, G., Wang, C., Bondjers, C., Karlsson, L. and Betsholtz, C.** (2000). Leydig cell loss and spermatogenic arrest in platelet-derived growth factor (PDGF)-A-deficient mice. *J Cell Biol* **149**, 1019-26.

Gnessi, L., Emidi, A., Jannini, E. A., Carosa, E., Maroder, M., Arizzi, M., Ulisse, S. and Spera, G. (1995). Testicular development involves the spatiotemporal control of PDGFs and PDGF receptors gene expression and action. *J Cell Biol* **131**, 1105-21.

Gossler, A., Joyner, A. L., Rossant, J. and Skarnes, W. C. (1989). Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes. *Science* **244**, 463-5.

Graves, L. M., Bornfeldt, K. E., Raines, E. W., Potts, B. C., Macdonald, S. G., Ross, R. and Krebs, E. G. (1993). Protein kinase A antagonizes platelet-derived growth factor-induced signaling by mitogen-activated protein kinase in human arterial smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10300-4.

Gutierrez, S., Javed, A., Tennant, D. K., van Rees, M., Montecino, M., Stein, G. S., Stein, J. L. and Lian, J. B. (2002). CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) beta and delta activate osteocalcin gene transcription and synergize with Runx2 at the C/EBP element to regulate bone-specific expression. *J Biol Chem* **277**, 1316-23.

Hall, B. K. (1999). *Bone* Caldwell; NJ: Telford Press.

Halvorsen, Y. D., Franklin, D., Bond, A. L., Hitt, D. C., Auchter, C., Boskey, A. L., Paschalis, E. P., Wilkison, W. O. and Gimble, J. M. (2001). Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* **7**, 729-41.

Hammacher, A., Hellman, U., Johnsson, A., Ostman, A., Gunnarsson, K., Westermark, B., Wasteson, A. and Heldin, C. H. (1988). A major part of platelet-derived growth factor purified from human platelets is a heterodimer of one A and one B chain. *J Biol Chem* **263**, 16493-8.

Harada, H., Tagashira, S., Fujiwara, M., Ogawa, S., Katsumata, T., Yamaguchi, A., Komori, T. and Nakatsuka, M. (1999). Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J Biol Chem* **274**, 6972-8.

Hart, C. E., Bailey, M., Curtis, D. A., Osborn, S., Raines, E., Ross, R. and Forstrom, J. W. (1990). Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets. *Biochemistry* **29**, 166-72.

Heinrich, M. C., Corless, C. L., Demetri, G. D., Blanke, C. D., von Mehren, M., Joensuu, H., McGreevey, L. S., Chen, C. J., Van den Abbeele, A. D., Druker, B. J. et al. (2003). Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* **21**, 4342-9.

Heinrich, M. C., Corless, C. L., Duensing, A., McGreevey, L., Chen, C. J., Joseph, N., Singer, S., Griffith, D. J., Haley, A., Town, A. et al. (2003). PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* **299**, 708-10.

- Heinrich, M. C., Rubin, B. P., Longley, B. J. and Fletcher, J. A.** (2002). Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations. *Hum Pathol* **33**, 484-95.
- Heldin, C. H. and Westermark, B.** (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* **79**, 1283-316.
- Hirota, S., Isozaki, K., Moriyama, Y., Hashimoto, K., Nishida, T., Ishiguro, S., Kawano, K., Hanada, M., Kurata, A., Takeda, M. et al.** (1998). Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* **279**, 577-80.
- Hirota, S., Nishida, T., Isozaki, K., Taniguchi, M., Nakamura, J., Okazaki, T. and Kitamura, Y.** (2001). Gain-of-function mutation at the extracellular domain of KIT in gastrointestinal stromal tumours. *J Pathol* **193**, 505-10.
- Hirota, S., Ohashi, A., Nishida, T., Isozaki, K., Kinoshita, K., Shinomura, Y. and Kitamura, Y.** (2003). Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* **125**, 660-7.
- Hoess, R. H. and Abremski, K.** (1984). Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1026-9.
- Horner, A., Bord, S., Kemp, P., Grainger, D. and Compston, J. E.** (1996). Distribution of platelet-derived growth factor (PDGF) A chain mRNA, protein, and PDGF-alpha receptor in rapidly forming human bone. *Bone* **19**, 353-62.
- Howard, T. D., Paznekas, W. A., Green, E. D., Chiang, L. C., Ma, N., Ortiz de Luna, R. I., Garcia Delgado, C., Gonzalez-Ramos, M., Kline, A. D. and Jabs, E. W.** (1997). Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet* **15**, 36-41.
- Hubbard, S. R.** (2004). Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 464-71.
- Jabs, E. W., Li, X., Scott, A. F., Meyers, G., Chen, W., Eccles, M., Mao, J. I., Charnas, L. R., Jackson, C. E. and Jaye, M.** (1994). Jackson-Weiss and Crouzon syndromes are allelic with mutations in fibroblast growth factor receptor 2. *Nat Genet* **8**, 275-9.
- Jabs, E. W., Muller, U., Li, X., Ma, L., Luo, W., Haworth, I. S., Klisak, I., Sparkes, R., Warman, M. L., Mulliken, J. B. et al.** (1993). A mutation in the homeodomain of the human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. *Cell* **75**, 443-50.
- Jager, R., Maurer, J., Jacob, A. and Schorle, H.** (2004). Cell type-specific conditional regulation of the c-myc proto-oncogene by combining Cre/loxP recombination and tamoxifen-mediated activation. *Genesis* **38**, 145-50.

- Jechlinger, M., Sommer, A., Moriggl, R., Seither, P., Kraut, N., Capodiecci, P., Donovan, M., Cordon-Cardo, C., Beug, H. and Grunert, S.** (2006). Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *J Clin Invest* **116**, 1561-70.
- Jiang, X., Iseki, S., Maxson, R. E., Sucov, H. M. and Morriss-Kay, G. M.** (2002). Tissue origins and interactions in the mammalian skull vault. *Dev Biol* **241**, 106-16.
- Kim, J. E., Nakashima, K. and de Crombrughe, B.** (2004). Transgenic mice expressing a ligand-inducible cre recombinase in osteoblasts and odontoblasts: a new tool to examine physiology and disease of postnatal bone and tooth. *Am J Pathol* **165**, 1875-82.
- Kindblom, L. G., Remotti, H. E., Aldenborg, F. and Meis-Kindblom, J. M.** (1998). Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* **152**, 1259-69.
- Klinghoffer, R. A., Duckworth, B., Valius, M., Cantley, L. and Kazlauskas, A.** (1996). Platelet-derived growth factor-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase is regulated by receptor binding of SH2-domain-containing proteins which influence Ras activity. *Mol Cell Biol* **16**, 5905-14.
- Kobayashi, T. and Kronenberg, H.** (2005). Minireview: transcriptional regulation in development of bone. *Endocrinology* **146**, 1012-7.
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. H., Inada, M. et al.** (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **89**, 755-64.
- Kono, S. J., Oshima, Y., Hoshi, K., Bonewald, L. F., Oda, H., Nakamura, K., Kawaguchi, H. and Tanaka, S.** (2007). Erk pathways negatively regulate matrix mineralization. *Bone* **40**, 68-74.
- Kratchmarova, I., Blagoev, B., Haack-Sorensen, M., Kassem, M. and Mann, M.** (2005). Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation. *Science* **308**, 1472-7.
- Kühbandner, S., Brummer, S., Metzger, D., Chambon, P., Hofmann, F. and Feil, R.** (2000). Temporally controlled somatic mutagenesis in smooth muscle. *Genesis* **28**, 15-22.
- Kuznetsov, S. A., Mankani, M. H., Gronthos, S., Satomura, K., Bianco, P. and Robey, P. G.** (2001). Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* **153**, 1133-40.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.

- Lasota, J., Dansonka-Mieszkowska, A., Sobin, L. H. and Miettinen, M.** (2004). A great majority of GISTs with PDGFRA mutations represent gastric tumors of low or no malignant potential. *Lab Invest* **84**, 874-83.
- Le Douarin, N. M. and Kalcheim, C.** (1999). *The Neural Crest Cambridge, UK: Cambridge University Press.*
- Lecoin, L., Gabella, G. and Le Douarin, N.** (1996). Origin of the c-kit-positive interstitial cells in the avian bowel. *Development* **122**, 725-33.
- Liu, F., Malaval, L. and Aubin, J. E.** (2003). Global amplification polymerase chain reaction reveals novel transitional stages during osteoprogenitor differentiation. *J Cell Sci* **116**, 1787-96.
- Liu, Y. H., Tang, Z., Kundu, R. K., Wu, L., Luo, W., Zhu, D., Sangiorgi, F., Snead, M. L. and Maxson, R. E.** (1999). Msx2 gene dosage influences the number of proliferative osteogenic cells in growth centers of the developing murine skull: a possible mechanism for MSX2-mediated craniosynostosis in humans. *Dev Biol* **205**, 260-74.
- Lomeli, H., Ramos-Mejia, V., Gertsenstein, M., Lobe, C. G. and Nagy, A.** (2000). Targeted insertion of Cre recombinase into the TNAP gene: excision in primordial germ cells. *Genesis* **26**, 116-7.
- Lomri, A., Lemonnier, J., Hott, M., de Parseval, N., Lajeunie, E., Munnich, A., Renier, D. and Marie, P. J.** (1998). Increased calvaria cell differentiation and bone matrix formation induced by fibroblast growth factor receptor 2 mutations in Apert syndrome. *J Clin Invest* **101**, 1310-7.
- Lubinus, M., Meier, K. E., Smith, E. A., Gause, K. C., LeRoy, E. C. and Trojanowska, M.** (1994). Independent effects of platelet-derived growth factor isoforms on mitogen-activated protein kinase activation and mitogenesis in human dermal fibroblasts. *J Biol Chem* **269**, 9822-5.
- Lynch, S. E., Trippel, S. B., Finkelman, R. D., Hernandez, R. A., Kiritsy, C. P. and Antoniades, H. N.** (1994). The combination of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-I stimulates bone repair in adult Yucatan miniature pigs. *Wound Repair Regen* **2**, 182-90.
- Ma, H. W., Lajeunie, E., de Parseval, N., Munnich, A., Renier, D. and Le Merrer, M.** (1996). Possible genetic heterogeneity in the Saethre-Chotzen syndrome. *Hum Genet* **98**, 228-32.
- Malaval, L., Modrowski, D., Gupta, A. K. and Aubin, J. E.** (1994). Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol* **158**, 555-72.

- Mansour, S. L., Thomas, K. R. and Capecchi, M. R.** (1988). Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* **336**, 348-52.
- Mansukhani, A., Bellosta, P., Sahni, M. and Basilico, C.** (2000). Signaling by fibroblast growth factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. *J Cell Biol* **149**, 1297-308.
- Matei, D., Emerson, R. E., Lai, Y. C., Baldrige, L. A., Rao, J., Yiannoutsos, C. and Donner, D. D.** (2006). Autocrine activation of PDGFRalpha promotes the progression of ovarian cancer. *Oncogene* **25**, 2060-9.
- McKee, M. D. and Nanci, A.** (1996). Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. *Microsc Res Tech* **33**, 141-64.
- Medeiros, F., Corless, C. L., Duensing, A., Hornick, J. L., Oliveira, A. M., Heinrich, M. C., Fletcher, J. A. and Fletcher, C. D.** (2004). KIT-negative gastrointestinal stromal tumors: proof of concept and therapeutic implications. *Am J Surg Pathol* **28**, 889-94.
- Mitlak, B. H., Finkelman, R. D., Hill, E. L., Li, J., Martin, B., Smith, T., D'Andrea, M., Antoniades, H. N. and Lynch, S. E.** (1996). The effect of systemically administered PDGF-BB on the rodent skeleton. *J Bone Miner Res* **11**, 238-47.
- Mizuseki, K., Sakamoto, T., Watanabe, K., Muguruma, K., Ikeya, M., Nishiyama, A., Arakawa, A., Suemori, H., Nakatsuji, N., Kawasaki, H. et al.** (2003). Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5828-33.
- Mol, C. D., Dougan, D. R., Schneider, T. R., Skene, R. J., Kraus, M. L., Scheibe, D. N., Snell, G. P., Zou, H., Sang, B. C. and Wilson, K. P.** (2004). Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase. *J Biol Chem* **279**, 31655-63.
- Morrison-Graham, K., Schatteman, G. C., Bork, T., Bowen-Pope, D. F. and Weston, J. A.** (1992). A PDGF receptor mutation in the mouse (Patch) perturbs the development of a non-neuronal subset of neural crest-derived cells. *Development* **115**, 133-42.
- Moss, M. L.** (1958). Fusion of the frontal suture in the rat. *Am J Anat* **102**, 141-65.
- Muenke, M., Gripp, K. W., McDonald-McGinn, D. M., Gaudenz, K., Whitaker, L. A., Bartlett, S. P., Markowitz, R. I., Robin, N. H., Nwokoro, N., Mulvihill, J. J. et al.** (1997). A unique point mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene (FGFR3) defines a new craniosynostosis syndrome. *Am J Hum Genet* **60**, 555-64.

- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-73.
- Mundlos, S.** (1994). Expression patterns of matrix genes during human skeletal development. *Prog Histochem Cytochem* **28**, 1-47.
- Nagl, F., Schneider, G., Seidler, B., Schmid, R. M. and Saur, D.** (2007). Generierung und initiale Charakterisierung einer c-Kit Cre-ERT2 Mauslinie. *Z Gastroenterol* **45**.
- Nefussi, J. R., Boy-Lefevre, M. L., Boulekbache, H. and Forest, N.** (1985). Mineralization in vitro of matrix formed by osteoblasts isolated by collagenase digestion. *Differentiation* **29**, 160-8.
- Nefussi, J. R., Bami, G., Modrowski, D., Oboeuf, M. and Forest, N.** (1997). Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation in vitro. *J Histochem Cytochem* **45**, 493-503.
- Newberry, E. P., Latifi, T. and Towler, D. A.** (1998). Reciprocal regulation of osteocalcin transcription by the homeodomain proteins Msx2 and Dlx5. *Biochemistry* **37**, 16360-8.
- Nitsche, M., Pinzer, T., Roesner, D. and Eckelt, U.** (2003). Kraniosynostosen: Behandlung mit interdisziplinärem Konzept. *Ärzteblatt Sachsen* **5**.
- Noden, D. M.** (1988). Interactions and fates of avian craniofacial mesenchyme. *Development* **103 Suppl**, 121-40.
- Orr-Urtreger, A., Bedford, M. T., Do, M. S., Eisenbach, L. and Lonai, P.** (1992). Developmental expression of the alpha receptor for platelet-derived growth factor, which is deleted in the embryonic lethal Patch mutation. *Development* **115**, 289-303.
- Osborn M. and Weber K.** (1989). Cytoskeletal proteins in tumor diagnosis. Curr. Comm. in Mol. Biol., Cold Spring Harbour Press, 1989.
- Otto, F., Thornell, A. P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K. C., Rosewell, I. R., Stamp, G. W., Beddington, R. S., Mundlos, S., Olsen, B. R. et al.** (1997). Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* **89**, 765-71.

- Owen, T. A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L. M., Wilming, L., Tassinari, M. S., Kennedy, M. B., Pockwinse, S., Lian, J. B. and Stein, G. S. (1990). Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* **143**, 420-30.
- Palumbo, C., van Roozendaal, K., Gillis, A. J., van Gurp, R. H., de Munnik, H., Oosterhuis, J. W., van Zoelen, E. J. and Looijenga, L. H. (2002). Expression of the PDGF alpha-receptor 1.5 kb transcript, OCT-4, and c-KIT in human normal and malignant tissues. Implications for the early diagnosis of testicular germ cell tumours and for our understanding of regulatory mechanisms. *J Pathol* **196**, 467-77.
- Paredes, R., Arriagada, G., Cruzat, F., Villagra, A., Olate, J., Zaidi, K., van Wijnen, A., Lian, J. B., Stein, G. S., Stein, J. L. et al. (2004). Bone-specific transcription factor Runx2 interacts with the 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 receptor to up-regulate rat osteocalcin gene expression in osteoblastic cells. *Mol Cell Biol* **24**, 8847-61.
- Payne, J., Shibasaki, F. and Mercola, M. (1997). Spina bifida occulta in homozygous Patch mouse embryos. *Dev Dyn* **209**, 105-16.
- Pedeutour, F., Simon, M. P., Minoletti, F., Barcelo, G., Terrier-Lacombe, M. J., Combemale, P., Sozzi, G., Ayraud, N. and Turc-Carel, C. (1996). Translocation, t(17;22)(q22;q13), in dermatofibrosarcoma protuberans: a new tumor-associated chromosome rearrangement. *Cytogenet Cell Genet* **72**, 171-4.
- Peitz, M., Jager, R., Patsch, C., Jager, A., Egert, A., Schorle, H. and Edenhofer, F. (2007). Enhanced purification of cell-permeant Cre and germline transmission after transduction into mouse embryonic stem cells. *Genesis* **45**, 508-17.
- Pfeilschifter, J., Krempien, R., Naumann, A., Gronwald, R. G., Hoppe, J. and Ziegler, R. (1992). Differential effects of platelet-derived growth factor isoforms on plasminogen activator activity in fetal rat osteoblasts due to isoform-specific receptor functions. *Endocrinology* **130**, 2059-66.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. and Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-7.
- Possemato, R., Eggan, K., Moeller, B. J., Jaenisch, R. and Jackson-Grusby, L. (2002). Flp recombinase regulated lacZ expression at the ROSA26 locus. *Genesis* **32**, 184-6.
- Quarles, L. D., Yohay, D. A., Lever, L. W., Caton, R. and Wenstrup, R. J. (1992). Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res* **7**, 683-92.

- Rani, S. B., Mahadevan, A., Anilkumar, S. R., Raju, T. R. and Shankar, S. K.** (2006). Expression of nestin--a stem cell associated intermediate filament in human CNS tumours. *Indian J Med Res* **124**, 269-80.
- Roca, H., Phimphilai, M., Gopalakrishnan, R., Xiao, G. and Franceschi, R. T.** (2005). Cooperative interactions between RUNX2 and homeodomain protein-binding sites are critical for the osteoblast-specific expression of the bone sialoprotein gene. *J Biol Chem* **280**, 30845-55.
- Roskoski, R., Jr.** (2005). Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 1307-15.
- Ross, R., Glomset, J., Kariya, B. and Harker, L.** (1974). A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 1207-10.
- Rydziel, S., Ladd, C., McCarthy, T. L., Centrella, M. and Canalis, E.** (1992). Determination and expression of platelet-derived growth factor-AA in bone cell cultures. *Endocrinology* **130**, 1916-22.
- Sakai, K., Hiripi, L., Glumoff, V., Brandau, O., Eerola, R., Vuorio, E., Bosze, Z., Fassler, R. and Aszodi, A.** (2001). Stage-and tissue-specific expression of a Col2a1-Cre fusion gene in transgenic mice. *Matrix Biol* **19**, 761-7.
- Salingcarnboriboon, R., Tsuji, K., Komori, T., Nakashima, K., Ezura, Y. and Noda, M.** (2006). Runx2 is a target of mechanical unloading to alter osteoblastic activity and bone formation in vivo. *Endocrinology* **147**, 2296-305.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
- Sarlomo-Rikala, M., Kovatich, A. J., Barusevicius, A. and Miettinen, M.** (1998). CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Mod Pathol* **11**, 728-34.
- Schatteman, G. C., Morrison-Graham, K., van Koppen, A., Weston, J. A. and Bowen-Pope, D. F.** (1992). Regulation and role of PDGF receptor alpha-subunit expression during embryogenesis. *Development* **115**, 123-31.
- Schindeler, A. and Little, D. G.** (2006). Ras-MAPK signaling in osteogenic differentiation: friend or foe? *J Bone Miner Res* **21**, 1331-8.
- Schramek, H., Schumacher, M. and Pfaller, W.** (1996). Sustained ERK-2 activation in rat glomerular mesangial cells: differential regulation by protein phosphatases. *Am J Physiol* **271**, F423-32.

- Shirakabe, K., Terasawa, K., Miyama, K., Shibuya, H. and Nishida, E.** (2001). Regulation of the activity of the transcription factor Runx2 by two homeobox proteins, Msx2 and Dlx5. *Genes Cells* **6**, 851-6.
- Sierra, O. L., Cheng, S. L., Loewy, A. P., Charlton-Kachigian, N. and Towler, D. A.** (2004). MINT, the Msx2 interacting nuclear matrix target, enhances Runx2-dependent activation of the osteocalcin fibroblast growth factor response element. *J Biol Chem* **279**, 32913-23.
- Simon, M. P., Pedeutour, F., Sirvent, N., Grosgeorge, J., Minoletti, F., Coindre, J. M., Terrier-Lacombe, M. J., Mandahl, N., Craver, R. D., Blin, N. et al.** (1997). Deregulation of the platelet-derived growth factor B-chain gene via fusion with collagen gene COL1A1 in dermatofibrosarcoma protuberans and giant-cell fibroblastoma. *Nat Genet* **15**, 95-8.
- Sjoblom, T., Boureux, A., Ronnstrand, L., Heldin, C. H., Ghysdael, J. and Ostman, A.** (1999). Characterization of the chronic myelomonocytic leukemia associated TEL-PDGFB fusion protein. *Oncogene* **18**, 7055-62.
- Smith, E. A., Seldin, M. F., Martinez, L., Watson, M. L., Choudhury, G. G., Lalley, P. A., Pierce, J., Aaronson, S., Barker, J., Naylor, S. L. et al.** (1991). Mouse platelet-derived growth factor receptor alpha gene is deleted in W19H and patch mutations on chromosome 5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 4811-5.
- Smith, P. K.** (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.
- Soriano, P.** (1997). The PDGF alpha receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites. *Development* **124**, 2691-700.
- Soriano, P.** (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* **21**, 70-1.
- Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C. S., Williams, C. M., Tanabe, Y., Jessell, T. M. and Costantini, F.** (2001). Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol* **1**, 4.
- Stephenson, D. A., Mercola, M., Anderson, E., Wang, C. Y., Stiles, C. D., Bowen-Pope, D. F. and Chapman, V. M.** (1991). Platelet-derived growth factor receptor alpha-subunit gene (Pdgfra) is deleted in the mouse patch (Ph) mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6-10.
- Sun, T., Jayatilake, D., Afink, G. B., Ataliotis, P., Nister, M., Richardson, W. D. and Smith, H. K.** (2000). A human YAC transgene rescues craniofacial and neural tube development in PDGFRalpha knockout mice and uncovers a role for PDGFRalpha in prenatal lung growth. *Development* **127**, 4519-29.

- Takakura, N., Yoshida, H., Ogura, Y., Kataoka, H., Nishikawa, S. and Nishikawa, S.** (1997). PDGFR alpha expression during mouse embryogenesis: immunolocalization analyzed by whole-mount immunohistostaining using the monoclonal anti-mouse PDGFR alpha antibody APA5. *J Histochem Cytochem* **45**, 883-93.
- Tallquist, M. D. and Soriano, P.** (2003). Cell autonomous requirement for PDGFRalpha in populations of cranial and cardiac neural crest cells. *Development* **130**, 507-18.
- Tallquist, M. D., Weismann, K. E., Hellstrom, M. and Soriano, P.** (2000). Early myotome specification regulates PDGFA expression and axial skeleton development. *Development* **127**, 5059-70.
- Thomas, K. R. and Capecchi, M. R.** (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51**, 503-12.
- Thomas, S. K., Messam, C. A., Spengler, B. A., Biedler, J. L. and Ross, R. A.** (2004). Nestin is a potential mediator of malignancy in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **279**, 27994-9.
- Thommes, K. B., Hoppe, J., Vetter, H. and Sachinidis, A.** (1996). The synergistic effect of PDGF-AA and IGF-1 on VSMC proliferation might be explained by the differential activation of their intracellular signaling pathways. *Exp Cell Res* **226**, 59-66.
- Todaro, G. J. and Green, H.** (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* **17**, 299-313.
- Tohyama, T., Lee, V. M., Rorke, L. B., Marvin, M., McKay, R. D. and Trojanowski, J. Q.** (1992). Nestin expression in embryonic human neuroepithelium and in human neuroepithelial tumor cells. *Lab Invest* **66**, 303-13.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4.
- Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P. C., Bock, R., Klein, R. and Schutz, G.** (1999). Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* **23**, 99-103.
- Uzumcu, M., Dirks, K. A. and Skinner, M. K.** (2002). Inhibition of platelet-derived growth factor actions in the embryonic testis influences normal cord development and morphology. *Biol Reprod* **66**, 745-53.
- Valius, M., Bazenet, C. and Kazlauskas, A.** (1993). Tyrosines 1021 and 1009 are phosphorylation sites in the carboxy terminus of the platelet-derived growth factor

receptor beta subunit and are required for binding of phospholipase C gamma and a 64-kilodalton protein, respectively. *Mol Cell Biol* **13**, 133-43.

Wagner, K. U., Wall, R. J., St-Onge, L., Gruss, P., Wynshaw-Boris, A., Garrett, L., Li, M., Furth, P. A. and Hennighausen, L. (1997). Cre-mediated gene deletion in the mammary gland. *Nucleic Acids Res* **25**, 4323-30.

Wardelmann, E., Hrychuk, A., Merkelbach-Bruse, S., Pauls, K., Goldstein, J., Hohenberger, P., Losen, I., Manegold, C., Buttner, R. and Pietsch, T. (2004). Association of platelet-derived growth factor receptor alpha mutations with gastric primary site and epithelioid or mixed cell morphology in gastrointestinal stromal tumors. *J Mol Diagn* **6**, 197-204.

Warren, S. M., Greenwald, J. A., Spector, J. A., Bouletreau, P., Mehrara, B. J. and Longaker, M. T. (2001). New developments in cranial suture research. *Plast Reconstr Surg* **107**, 523-40.

Weber, P., Schuler, M., Gerard, C., Mark, M., Metzger, D. and Chambon, P. (2003). Temporally controlled site-specific mutagenesis in the germ cell lineage of the mouse testis. *Biol Reprod* **68**, 553-9.

Werling, U. and Schorle, H. (2002). Transcription factor gene AP-2 gamma essential for early murine development. *Mol Cell Biol* **22**, 3149-56.

Wilkie, A. O. and Morriss-Kay, G. M. (2001). Genetics of craniofacial development and malformation. *Nat Rev Genet* **2**, 458-68.

Xie, J., Aszterbaum, M., Zhang, X., Bonifas, J. M., Zachary, C., Epstein, E. and McCormick, F. (2001). A role of PDGFRalpha in basal cell carcinoma proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9255-9.

Young, H. M., Ciampoli, D., Southwell, B. R. and Newgreen, D. F. (1996). Origin of interstitial cells of Cajal in the mouse intestine. *Dev Biol* **180**, 97-107.

Yu, J., Deuel, T. F. and Kim, H. R. (2000). Platelet-derived growth factor (PDGF) receptor-alpha activates c-Jun NH2-terminal kinase-1 and antagonizes PDGF receptor-beta -induced phenotypic transformation. *J Biol Chem* **275**, 19076-82.

Yu, X., Hsieh, S. C., Bao, W. and Graves, D. T. (1997). Temporal expression of PDGF receptors and PDGF regulatory effects on osteoblastic cells in mineralizing cultures. *Am J Physiol* **272**, C1709-16.

Zaidi, S. K., Javed, A., Choi, J. Y., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Lian, J. B. and Stein, G. S. (2001). A specific targeting signal directs Runx2/Cbfa1 to subnuclear domains and contributes to transactivation of the osteocalcin gene. *J Cell Sci* **114**, 3093-102.

Zambrowicz, B. P., Imamoto, A., Fiering, S., Herzenberg, L. A., Kerr, W. G. and Soriano, P. (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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3789-94.

Zernik, J., Twarog, K. and Upholt, W. B. (1990). Regulation of alkaline phosphatase and alpha 2(I) procollagen synthesis during early intramembranous bone formation in the rat mandible. *Differentiation* **44**, 207-15.

Zhang, L., Leeman, E., Carnes, D. C. and Graves, D. T. (1991). Human osteoblasts synthesize and respond to platelet-derived growth factor. *Am J Physiol* **261**, C348-C354.

Zhen, X., Bonjour, J. P. and Caverzasio, J. (1997). Platelet-derived growth factor stimulates sodium-dependent Pi transport in osteoblastic cells via phospholipase Cgamma and phosphatidylinositol 3' -kinase. *J Bone Miner Res* **12**, 36-44.

8. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Amp.	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
cDNA	Komplementäre DNA
CsCl	Caesiumchlorid
d.h.	das heißt
ddNTPs	Didesoxynukleotid-Triphosphate
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ES	Embryonale Stamm(zelle)
et al.	Et altera
FBS	fötal bovine Serum
FCS	fötales Kälberserum
h	Stunde
H ₂ O _d	destilliertes Wasser
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LIF	Leukaemia Inhibiting Factor
M	Molar

Mg ²⁺	Magnesium-Ionen
min	Minute(n)
ml	Mililiter
mM	Milimolar
mm	Milimeter
NaAc	Natriumacetat
NaOH	Natronlauge
NLZ	Neuralleistenzellen
NL	Neuralleiste
ng	Nanogramm
nm	Nanomolar
OD	optische Dichte
pBS	Plasmid Bluescript
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PK	Positivkontrolle
pM	Pikomolar
PM	Punktmutation
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen/Minute
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
s.	siehe
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
U	Enzymeinheiten

Ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
Vergl.	vergleiche
WT	Wildtyp
X-gal	5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- β -Galactosid
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mich während dieser Zeit hilfreich unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Hubert Schorle gilt mein ganz besonderer Dank, nicht nur für die Ermöglichung dieser Dissertation durch die Bereitstellung des interessanten Themas, sondern auch für seine hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dieter O. Fürst danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Ich möchte Prof. Dr. Karl-Heinz Scheidtmann und Prof. Dr. Reinhard Büttner für die Bereitschaft danken, als Mitglieder meiner Prüfungskommission zu fungieren.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Andrea Vortkamp für die anfängliche Hilfe bei der Isolation von Osteoblasten aus Mauskalvarien und Dr. mult. Wolfgang Kress für die Bereitstellung der DNA-Proben.

Ebenso bedanke ich mich bei allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe für ihre großen und kleinen Hilfen im Laboralltag. Besonders möchte ich Dr. Richard Jäger für zahlreiche praktische und theoretische Tipps, Inge Heim und Mathilde Hau-Liersch für ihre Hilfe am Mikrotom, sowie Angela Egert, Andrea Jäger, Renate Gammel und Olaf Babczyński für die Arbeiten rund um die Maus danken.

Meinen Eltern danke ich für ihre moralische und finanzielle Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich möchte meinen Freunden für ihr großes Interesse an meiner Arbeit danken, besonders aber meinem Freund Michael Schäfer, der mir in besonders schwierigen Phasen durch seine aufmunternden Worte immer wieder Mut gemacht hat.