

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität Heidelberg

vorgelegt von

Dipl.-Biologin Eva Decker
aus Rotenburg a. d. Fulda

Tag der mündlichen Prüfung:

Identifikation von Zielgenen des Transkriptionsfaktors SHOX in der Gliedmaßenentwicklung

Gutachter Prof. Dr. rer. nat. Herbert Steinbeisser
Institut für Humangenetik, Sektion Entwicklungsgenetik

Prof. Dr. rer. nat. Gudrun Rappold
Institut für Humangenetik, Abteilung Molekulare Humangenetik

„Alles Wissen und alles Vermehren unseres Wissens endet nicht mit einem
Schlusspunkt, sondern mit einem Fragezeichen.“

Hermann Hesse

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Heidelberg, den 27.05.2010

Eva Decker

Im Rahmen dieser Dissertation wurden folgende Publikationen angefertigt:

Durand C, Bangs F, Signolet J, **Decker E**, Tickle C und Rappold G (2010). Enhancer elements upstream of the SHOX gene are active in the developing limb. Eur J Hum Genet 18, 527-32.

Decker E, Bender S, Durand C, Schneider KU und Rappold G. FGFR3 is a transcriptional target of the short stature homeobox gene SHOX in limb development. In Vorbereitung.

Bender S, **Decker E**, Baas M, Röth R, Arens A, Korn B, Zentgraf H, Wolf S und Rappold G. Genome-wide identification of SHOX transcriptional targets in primary human fibroblasts. In Vorbereitung.

Emons JAM, van Gool S, **Decker E**, Yu X, van Houwelingen H, Kleijburg C, Scherjon S, Gretz N, Wit JM, Rappold G und Karperien M. Human mesenchymal stem cells as a model for chondrocyte differentiation. In Vorbereitung.

Emons JAM, **Decker E**, Yu X, Pirzer H, van Gool S, Chagin A, Savendahl L, Gretz N, Wit JM, Rappold G und Karperien M. Genome wide screenings of two human growth plates during pubertal development. In Vorbereitung.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Frau Prof. Dr. Gudrun Rappold für die Möglichkeit, das Projekt in ihrer Gruppe durchführen zu können, die Übernahme der wissenschaftlichen Betreuung und ihre Unterstützung während der gesamten Zeit
 - Herrn Prof. Dr. Herbert Steinbeisser für hilfreiche Kommentare und Anregungen während der Promotionszeit sowie die Übernahme der Aufgabe des Erstgutachters
 - Dr. Jochen Hecht und Dr. Sigmar Stricker, die mich in die Techniken der RCAS- und Hühner-Micromass-Experimente eingeweiht haben
 - Dr. Joyce Emons für ihre Kooperation auf dem Gebiet der MSC-Differenzierung
 - Sebastian Bender für die Überlassung der Microarray- und ChIP-Seq-Daten
 - Der gesamten Arbeitsgruppe Rappold für die gute Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre
 - Dr. Katja Schneider, Anne Glaser und Sandra Puskaric für hilfreiche Diskussionen und Anregungen beim Durchführen und Schreiben dieser Arbeit
 - Claudia Durand für fachliche und moralische Unterstützung während der gesamten Promotionszeit sowie konstruktive Diskussionen beim Verfassen der vorliegenden Arbeit
 - Nicht zuletzt meiner Familie für ihre fortwährende Unterstützung und Motivation. Danke!
-

Zusammenfassung

Das Gen *SHOX* (short stature homeobox gene) codiert für einen Transkriptionsfaktor, der für eine korrekte Entwicklung der Gliedmaßen notwendig ist. So führt eine *SHOX*-Defizienz im Menschen zu verschiedenen Kleinwuchssyndromen, bei denen neben genereller Verkürzung insbesondere des Zeugopodiums (Unterschenkel und Unterarm) auch Fehlbildungen des Handgelenks auftreten können (Leri-Weill-Dyschondrosteosis, Langer-Syndrom, Idiopathischer Kleinwuchs, Turner-Syndrom). Bisher ist mit *BNP* nur ein *SHOX*-Zielgen beschrieben worden, doch die molekularen Konsequenzen dieser Regulation sind noch unklar. Ziel der vorliegenden Arbeit war, weitere von *SHOX* regulierte Gene zu identifizieren, um die Rolle von *SHOX* während der Gliedmaßenentwicklung besser zu verstehen.

In Microarrays und verschiedenen Zellkulturexperimenten wurde ein stark positiver Einfluss von *SHOX* auf die Expression von *FGFR3* und *RUNX3* gefunden. Beide Gene codieren für bekannte Faktoren in Gliedmaßenentwicklung und Knochenbildung. Luciferase-Reportergen-Assays in mehreren Zelllinien zeigten einen stark aktivierenden Effekt von *SHOX* auf den erweiterten *FGFR3*-Promotor. Auf den *RUNX3*-Promotorbereich wirkte *SHOX* ebenfalls moderat aktivierend. ChIP- und EMSA-Ergebnisse lassen vermuten, dass die Regulation von *RUNX3* indirekt ist, während *SHOX* direkt an den erweiterten Promotor von *FGFR3* binden kann. Zur Untersuchung dieser Regulationen in der Gliedmaßenentwicklung wurden Experimente in mehreren Modellsystemen zur Chondrozytendifferenzierung durchgeführt. Für *RUNX3* konnte in diesen Systemen keine reproduzierbare, *SHOX*-abhängige Regulation gezeigt werden; möglicherweise ist die in den Zelllinien gefundene Regulation in anderen Geweben oder zu anderen Entwicklungszeitpunkten relevant. *FGFR3* wurde jedoch in sogenannten Hühner-Micromass-Kulturen, bei denen embryonale Mesenchymzellen aus den sich entwickelnden Gliedmaßen zu Chondrozyten differenzieren, durch virusvermittelte *SHOX*-Überexpression herunterreguliert. Diese negative Regulation konnte mittels qRT-PCR und *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen werden und würde eine Erklärung für die sich überwiegend ausschließenden Expressionsmuster beider Gene in den Extremitäten von Hühnerembryonen bieten. Wenn man davon ausgeht, dass die gefundene negative Regulation vor allem im Zeugopodium stattfindet, wie es anhand des Expressionsmusters von *SHOX* anzunehmen ist, ergibt sich außerdem eine mögliche Erklärung für die bei *FGFR3*- und *SHOX*-Mutationen beobachteten Phänotypen im Menschen. So führen *FGFR3*-Gain-of-Function-Mutationen durch vorzeitige Schließung der Wachstumsfugen zu Zwergwuchs, bei dem vor allem die Knochen des Stylopodiums (Oberschenkel und Oberarm) betroffen sind, während eine *SHOX*-Defizienz eine Verkürzung insbesondere des Zeugopodiums auslöst. Eine *SHOX*-Defizienz würde entsprechend der in dieser Arbeit formulierten Hypothese, dass *SHOX* *FGFR3* im Zeugopodium negativ reguliert, zu einer erhöhten Menge von *FGFR3* in Ulna und Radius sowie Tibia und Fibula führen, was dort eine schnellere Schließung der Wachstumsfuge und damit die relative Verkürzung dieser Knochen bedingen würde. Andererseits würde *SHOX* generell die Expression von *FGFR3* im Zeugopodium niedriger halten als im Stylopodium, weshalb *FGFR3*-Gain-of-Function-Mutationen in Humerus und Femur einen stärkeren Effekt zeigen. Klinische Daten aus Patienten, die Mutationen in *FGFR3* als auch in *SHOX* tragen, unterstützen diese Hypothese.

Abstract

The gene *SHOX* (short stature homeobox gene) encodes a transcription factor important in limb development. In human, *SHOX* deficiency has been associated with different short stature syndromes including Leri-Weill dyschondrosteosis, Langer mesomelic dysplasia, idiopathic short stature and Turner syndrome. A common feature in these syndromes is a disproportionate short stature with a particular shortening of the long bones of the zeugopod (forearm and lower leg) as well as a characteristic abnormality of the forearm called Madelung deformity. To date, *BNP* is the only published target gene of *SHOX*, but the molecular consequences of this regulation are still unclear. The aim of the present study was to identify additional genes that are regulated by *SHOX* during limb development in order to extend our knowledge of this process.

Microarray analyses and different cell culture experiments revealed a strong positive effect of *SHOX* on the expression of *FGFR3* and *RUNX3*. Both genes encode factors that are well known for their role during limb development and ossification. Using luciferase reporter gene assays in different cell lines, *SHOX* was able to strongly activate the extended *FGFR3* promoter. The *RUNX3* promoter was also moderately activated by *SHOX*. Results from ChIP and EMSA experiments suggest an indirect regulation of *RUNX3*, whereas *SHOX* presumably binds directly to the extended *FGFR3* promoter. To investigate these regulations in limb development, different model systems for chondrocyte differentiation were established. *RUNX3* did not show a reproducible *SHOX*-dependent regulation in any of these systems. Thus, the regulation initially found in cell lines may have a role in a different tissue or at a different developmental stage. *FGFR3*, however, was negatively regulated by viral overexpression of *SHOX* in chicken micromass cultures, where embryonic mesenchymal stem cells isolated from limb buds differentiate into chondrocytes. The downregulation in chicken micromass cultures was demonstrated by qRT-PCR and *in situ* hybridization and might explain the almost mutually exclusive expression patterns of *FGFR3* and *SHOX* seen in embryonic chicken limbs. In agreement with the known *SHOX* expression regions in the limb, this negative regulation would occur mainly in the zeugopod and therefore offer a possible explanation for the phenotypes seen in patients with *FGFR3* and *SHOX* mutations. It is known that *FGFR3* gain of function mutations lead to premature fusion of the growth plates and thereby to dwarfism phenotypes which affect particularly the stylopod (upper arm and thighs), whereas *SHOX* deficiency causes a shortening of the zeugopod. According to the hypothesis that *FGFR3* is downregulated by *SHOX* in the zeugopod, *SHOX* deficiency would increase the *FGFR3* expression level in ulna and radius as well as tibia and fibula, which would accelerate the growth plate fusion and lead to a relative shortening of these bones. Normal *SHOX* levels would generate a lower expression of endogenous *FGFR3* in the zeugopod compared to the stylopod; therefore, *FGFR3* gain of functions mutations would be more likely to have a strong effect in humerus and femur. Clinical data from patients carrying mutations in both *FGFR3* and *SHOX* support this hypothesis.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abbildungsverzeichnis.....	4
Tabellenverzeichnis.....	6
Abkürzungsverzeichnis.....	7
1. Einleitung.....	9
1.1. Wachstum und Knochenentwicklung.....	9
1.2. Kleinwuchs: Definition und Ursachen.....	13
1.3. SHOX und SHOX-assoziierte Erkrankungen.....	14
1.4. Die Rolle von SHOX während der Gliedmaßenentwicklung.....	17
1.5. Zielsetzung der Arbeit.....	20
2. Material und Methoden.....	21
2.1. Nährmedien und Zusätze.....	21
2.1.1. Nährmedien und Zusätze für Bakterienkulturen.....	21
2.1.2. Zellkulturmedien und Zusätze.....	21
2.2. Bakterienstämme und Zelllinien.....	22
2.2.1. <i>E.coli</i> -Bakterienstämme.....	22
2.2.2. Zellen.....	22
2.3. Plasmide und Oligonukleotide.....	22
2.3.1. Plasmide.....	22
2.3.2. Oligonukleotide.....	23
2.4. Antikörper.....	27
2.5. Datenbanken und Internetressourcen.....	27
2.6. Kits und Reagenzien.....	28
2.7. DNA-basierte Methoden.....	29
2.7.1. Isolierung genomischer DNA aus Zellen und Geweben.....	29
2.7.2. Plasmidextraktion aus Bakterien.....	30
2.7.3. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	30
2.7.4. Klonierung.....	31
2.7.5. Sequenzierung.....	32
2.7.6. Southern Blot.....	33
2.8. RNA-basierte Methoden.....	35
2.8.1. Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben.....	35

2.8.2.	cDNA Synthese	36
2.8.3.	<i>In vitro</i> -Transkription.....	37
2.9.	Protein-basierte Methoden	37
2.9.1.	Gewinnung von Proteinextrakten aus eukaryotischen Zellen.....	37
2.9.2.	Western Blots.....	38
2.9.3.	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	39
2.9.4.	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	42
2.10.	Zellbasierte Methoden.....	43
2.10.1.	Kultivierung eukaryotischer Zellen	43
2.10.2.	Transfektion verschiedener Zelllinien	44
2.10.3.	Induktion von SHOX-Fusionsproteinen.....	44
2.10.4.	Generierung monoklonaler Zelllinien	44
2.10.5.	Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Chondrozyten	46
2.10.6.	Luciferase-Reportergen-Assays	47
2.10.7.	Herstellung von RCAS-Viren	47
2.11.	Tierexperimentelle Methoden	49
2.11.1.	Gewinnung von Hühnerembryonen	49
2.11.2.	<i>In situ</i> -Hybridisierung von Hühnerembryonen	49
2.11.3.	RCAS-Infektion von Hühnerembryonen.....	52
2.11.4.	Hühner Micromass-Kulturen.....	53
3.	Ergebnisse.....	55
3.1.	Etablierung einer stabilen, induzierbaren SHOX-Knockdown-Zelllinie	55
3.1.1.	Theoretischer Hintergrund.....	55
3.1.2.	Etablierung und Charakterisierung der Parentalzelllinien.....	55
3.1.3.	Rekombination der Parentalzelllinien mit SHOX- und Kontroll-miRNAs	57
3.1.4.	Transiente Transfektion der SHOX-, Kontroll- und LMNA-miRNAs.....	58
3.1.5.	Rekombination der Parentalzelllinien mit SHOX-cDNA.....	59
3.2.	Identifizierung neuer SHOX-Zielgene in transienten Zellkulturexperimenten	59
3.2.1.	Microarray-Analyse nach SHOX-Überexpression in NHDF und U2OS	59
3.2.2.	ChIP-Seq.....	60
3.3.	Expression von FGFR3 und RUNX3 in menschlichen Geweben	60
3.4.	Experimentelle Verifizierung der putativen Zielgene FGFR3 und RUNX3.....	62
3.4.1.	qRT-PCR nach SHOX-Überexpression	62
3.4.2.	qRT-PCR nach <i>SHOX</i> -Knockdown.....	64
3.4.3.	Western Blots.....	65

3.4.4.	Luciferase-Reportergen-Assays	66
3.4.5.	SHOX-Fusionsprotein-Experimente zur Identifizierung direkter Zielgene.....	70
3.4.6.	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	72
3.4.7.	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	74
3.5.	Analyse der Zielgene im Modellsystem MSC-Differenzierung	76
3.5.1.	qRT-PCR-Analyse Differenzierungsmarker	76
3.5.2.	qRT-PCR-Analyse SHOX und SHOX-Zielgene	76
3.6.	Analyse der Zielgene im Modellsystem Hühnerembryo	79
3.6.1.	<i>In situ</i> -Hybridisierungen in Hühnerembryonen	79
3.6.2.	Virale RCAS-Überexpression von SHOX in Hühnerembryonen.....	83
3.6.3.	Virale RCAS-Überexpression von SHOX in Hühner-Micromass-Kulturen.....	86
4.	Diskussion.....	94
4.1.	Verwendete Modellsysteme	94
4.1.1.	Zellkulturexperimente	94
4.1.2.	Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Chondrozyten.....	96
4.1.3.	Hühnerembryonen und Hühner-Micromass-Kulturen.....	97
4.2.	Regulation von RUNX3 durch SHOX	99
4.2.1.	RUNX3 (runt related transcription factor 3).....	99
4.2.2.	Experimentelle Daten zur Regulation von RUNX3 durch SHOX	101
4.2.3.	Biologische Bedeutung der Regulation.....	102
4.3.	Regulation von FGFR3 durch SHOX.....	103
4.3.1.	FGFR3 (fibroblast growth factor receptor 3)	103
4.3.2.	Experimentelle Daten zur Regulation von FGFR3 durch SHOX	105
4.3.3.	Biologische Bedeutung der Regulation.....	109
4.4.	Ausblick.....	112
5.	Literatur	114
Anhang	123

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht enchondrale Ossifikation.....	10
Abb. 2: Aufbau der Wachstumsfuge.....	11
Abb. 3: Schematisches Modell der Zonen in der Gliedmaßenknospe.	11
Abb. 4: Schematische Darstellung der Feedback-Loops und biologischen Aktivitäten in fötalen Wachstumsfugen.....	13
Abb. 5: Struktureller Aufbau von SHOX-mRNA und SHOX-Protein.....	14
Abb. 6: SHOX-Expression in den sich entwickelnden Gliedmaßen im menschlichen Embryo.	17
Abb. 7: Shox-Expression in Hühnerembryonen.....	18
Abb. 8: SHOX-Immunfärbung einer menschlichen Wachstumsfuge.....	19
Abb. 9: Southern Blot einiger getesteter Parentalzellklone.....	56
Abb. 10: FACS-Ergebnisse für Klon pPar2-9.	57
Abb. 11: LacZ-Färbung von U2OS Zellen.	58
Abb. 12: Gewebespezifische Expression von SHOX und SHOX-Zielgenen.	61
Abb. 13: RUNX3-Expression in U2OS und NHDF nach SHOX-Überexpression.	63
Abb. 14: FGFR3-Expression in U2OS und NHDF nach SHOX-Überexpression.....	63
Abb. 15: SHOX-Knockdown in NHDF-Zellen.	64
Abb. 16: Ergebnisse Western Blot RUNX3.	65
Abb. 17: Luciferase-Assay für RUNX3 -703/+1229bp in U2OS.	67
Abb. 18: Ergebnisse Luciferase-Assays FGFR3 in U2OS-Zellen.	68
Abb. 19: Luciferase-Assay putativer SHOX-Bindestellen upstream von FGFR3.	70
Abb. 20: Schema SHOX-Fusionsproteine.	71
Abb. 21: Theoretische Expression von Zielgenen nach SHOX-GR-Fusionsprotein- Überexpression.	71
Abb. 22: EMSA der CHIP-Seq FGFR3-Bindestelle.	73
Abb. 23: EMSA zusätzlicher AT-palindromhaltiger Sequenzen.	74
Abb. 24: qPCR-Ergebnisse einer repräsentativen Chromatin-Immunopräzipitation.....	75
Abb. 25: Expression von Collagen2A1 und Collagen10A1 in zu Chondrozyten differenzierenden MSCs.	77
Abb. 26: Expression von SHOX in zu Chondrozyten differenzierenden MSCs.	77
Abb. 27: Expression von RUNX3 und FGFR3 in zu Chondrozyten differenzierenden MSCs.	78
Abb. 28: Übersicht Whole Mount in situ-Hybridisierungen in Hühnerembryonen.....	80
Abb. 29: Vergleich Shox- und Fgfr3-Expression in Hühnerembryo-WISH.	81
Abb. 30: ISH auf Kryoschnitten von 6 Tage alten Hühnerembryonen.....	82

Abb. 31: Shox-ISH nach RCAS-SHOX-Infektion in Hühnerembryonen.	84
Abb. 32: Einfluss der RCAS-SHOX-Infektion auf die Expression von Shox, Runx3 und Fgfr3 in Hühnerembryonen.	85
Abb. 33: Alcianblau-Färbungen von chMM-Kulturen.	87
Abb. 34: Quantifizierung des inkorporierten Alcianblau in chMM-Kulturen.	88
Abb. 35: Expression verschiedener Chondrozytendifferenzierungsmarker in chMM-Kulturen.	89
Abb. 36: Expression von Shox, Fgfr3 und Runx3 in chMM-Kulturen.	90
Abb. 37: Shox in situ-Hybridisierungen auf chMM-Kulturen.	91
Abb. 38: Runx3 in situ-Hybridisierungen auf chMM-Kulturen.	92
Abb. 39: Fgfr3 in situ-Hybridisierungen auf chMM-Kulturen.	92
Abb. 40: Intrazelluläre Signalkaskade nach Aktivierung von FGFR3.	103
Abb. 41: Einfluss von SHOX- und FGFR3-Mutationen auf die Gliedmaßenentwicklung.	110
Abb. 42: Stammbaum einer Familie mit kombinierten SHOX- und FGFR3-Mutationen.	111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Oligonukleotide für EMSA	23
Tabelle 2: PCR-Primer.....	24
Tabelle 3: qRT-PCR-Primer.....	25
Tabelle 4: ChIP-Primer	25
Tabelle 5: miRNAs.....	26
Tabelle 6: siRNAs	26
Tabelle 7: Primärantikörper.....	27
Tabelle 8: Sekundärantikörper	27
Tabelle 9: Regulation von FGFR3 und RUNX3 in Microarrays nach SHOX- Überexpression.	60
Tabelle 10: Ergebnisse Western Blots FGFR3.....	66
Tabelle 11: Vergleich der Ergebnisse exemplarischer Luciferase-Assay in U2OS und NHDF.	69

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AER	apical ectodermal ridge (Apikale Ektodermale Randleiste)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
cDNA	copyDNA (aus mRNA revers umgeschriebene DNA)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
chMM	chicken micromass (Hühner-Micromass-Kulturen)
CS	Carnegie-Stadium (Einteilung der menschlichen Embryonalentwicklung)
DEPC	Diethyldicarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiotreitol
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
et al.	und andere
ER	Östrogenrezeptor
EtOH	Ethanol
g	je nach Kontext: Gramm oder Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GR	Glukokortikoidrezeptor
h	Stunden
HH	Einteilung der Embryonalstadien beim Huhn nach Hamburger und Hamilton (1951)
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
ISS	Idiopathic Short Stature (Idiopathischer Kleinwuchs)
kb	Kilobasenpaare
LWD	Leri-Weill-Dyschondrosteosis
M	Molar
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minuten

ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure (Boten-RNA)
MSC	Humane fötale mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NLS	nuclear localisation signal (Kernlokalisierungssignal)
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenii (negativer Logarithmus der Protonenkonzentration)
PZ	Progress-Zone
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
sec	Sekunden
TBS	Tris-buffered Saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T _a	Annealing-Temperatur (Anlagerungstemperatur der Primer)
U	Units (Einheit der Aktivität von Enzymen)
UV	ultraviolett
(w/v)	weight per volume (Gewicht-Volumen-Verhältnis)
V	Volt (Maßeinheit für elektrische Spannung)
Vol	Volumen
WISH	<i>Whole Mount in situ</i> -Hybridisierung
ZPA	zone of polarizing activity (Zone polarisierender Aktivität)

1. Einleitung

1.1. Wachstum und Knochenentwicklung

Die Entstehung der Gliedmaßen ist ein komplexer Prozess, der beim menschlichen Embryo bereits vier Wochen nach der Befruchtung beginnt. Ab diesem Zeitpunkt, dem Carnegie-Stadium 12 (CS12), sind die Armanlagen zu erkennen, etwa zwei Tage später folgen die Beinanlagen (CS13). Die Gliedmaßenknospen, die sich an den entsprechenden Stellen entlang der Körperachse bilden, bestehen zunächst aus einem Kern undifferenzierter Mesenchymzellen, die von Ektoderm umgeben sind. Im Verlauf der Embryonalentwicklung vergrößern sich die Gliedmaßenknospen und wachsen in ihre längliche Form. Während des Längenwachstums beginnen die Mesenchymzellen im Zentrum zu kondensieren. Diese verdichteten Mesenchymzellen differenzieren zunächst zu Chondrozyten. Der entstehende Knorpel wird später in der Fötalentwicklung durch Knochengewebe ersetzt und legt daher bereits zu diesem Zeitpunkt fest, wo die Knochen entstehen werden (Hall und Miyake, 2000; Tickle, 2002; Mariani und Martin, 2003). Die diese Chondrozyten-Verdichtungen umgebenden Zellen differenzieren zu Knorpelhaut (Perichondrium). Die Chondrozyten im Knorpelgewebe sekretieren eine extrazelluläre Matrix, die unter anderem reich an Collagen 2 sowie Aggrecan ist. Diese Matrixproduktion sowie die Zellproliferation der Chondrozyten führen zu einer Zunahme des Knorpelgewebes. Chondrozyten im Zentrum des Knorpels stellen schließlich die Proliferation ein, vergrößern sich stark und produzieren große Mengen an Collagen 10. Diese sogenannten hypertrophen Chondrozyten verursachen durch ihr großes Volumen zum einen eine starke Längenzunahme des Knorpels, spielen daneben aber auch noch eine essentielle Rolle für die Knochenbildung. Sie steuern die Mineralisierung des Gewebes und produzieren VEGF und weitere Faktoren, welche für die Entstehung von Blutgefäßen verantwortlich sind. Hypertrophe Chondrozyten leiten schließlich Apoptose ein und ermöglichen es dadurch Osteoblasten, das Knorpelgerüst mit Knochengewebe zu ersetzen. Diese Art der Knochenbildung wird enchondrale Ossifikation genannt (Abb. 1) (Kronenberg, 2003).

An den Enden der sich entwickelnden Röhrenknochen, der Epiphyse, bilden sich sekundäre Ossifikationszentren. Dort lokalisierte Chondrozyten stellen ebenfalls ihre Proliferation ein, werden hypertroph und lösen wie zuvor in den primären Ossifikationszentren die Bildung von Knochengewebe aus. Zwischen diesen beiden Ossifikationszentren verbleibt die Wachstumsfuge (Abb. 1G, Abb. 2). Dieses hochstrukturierte Gewebe, das Chondrozyten verschiedenster Differenzierungsstadien in verschiedenen Zonen enthält, ist für das weitere Längenwachstum des Knochens verantwortlich. Am Epiphysenende befindet sich die Reservezone oder Stammzellzone, in

der ruhende Chondrozyten zu finden sind. Die daran anschließende Zellschicht (Proliferationszone) besteht aus stark proliferierenden Chondrozyten, die sich in Längsrichtung teilen und in charakteristischen, parallel angeordneten Säulen aus 10-20 Zellen vorliegen. Die proliferierenden Chondrozyten verlieren schließlich ihre Fähigkeit zur Zellteilung und beginnen zu differenzieren, zunächst zu prähypertrophen, später zu hypertrophen Chondrozyten, welche die hypertrophe Zone bilden. Analog zum Ablauf in den Ossifikationszentren leiten die mineralisierten, hypertrophen Chondrozyten Apoptose ein und werden in der Folge durch Osteoblasten ersetzt (Kronenberg, 2003; van der Eerden *et al.*, 2003; Burdan *et al.*, 2009).

Das Längenwachstum der Knochen ist folglich das Ergebnis von Proliferation und anschließender Differenzierung der Chondrozyten in den Wachstumsfugen der Röhrenknochen. Diese Prozesse werden durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst, darunter genetische Faktoren, Hormone, Wachstumsfaktoren, Umwelt und Ernährung (van der Eerden *et al.*, 2003; Cohen, 2006; Chagin und Savendahl, 2009). Die Kombination aller Einflüsse bestimmt die endgültige Körpergröße, die am Ende der Pubertät erreicht wird. Zu diesem Zeitpunkt schließen sich die Wachstumsfugen und die Chondrozyten stellen Proliferation und Differenzierung ein.

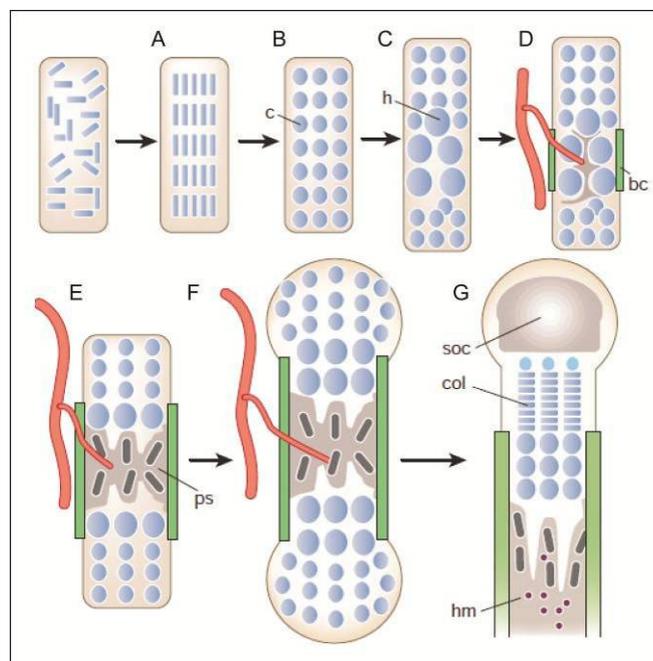


Abb. 1: Übersicht enchondrale Ossifikation. Mesenchymzellen kondensieren (A) und differenzieren zu Chondrozyten (B). Chondrozyten (c) im Zentrum stoppen die Proliferation und differenzieren zu hypertrophen (h) Chondrozyten (C), welche die Bildung eines Knochenmantels (bone collar, bc) und die Invasion von Blutgefäßen auslösen (D). Osteoblasten ersetzen die apoptotischen Chondrozyten und bilden Knochengewebe (primäre Spongiosa, ps) (E). Chondrozytenproliferation führt zum Knochenlängenwachstum (F). Am Knochenende bilden sich sekundäre Ossifikationszentren (soc). Zwischen den verknöcherten Geweben formt sich die Wachstumsfuge, die säulenartig angeordnete Chondrozyten (col) enthält und für das weitere Längenwachstum verantwortlich ist (Kronenberg, 2003).

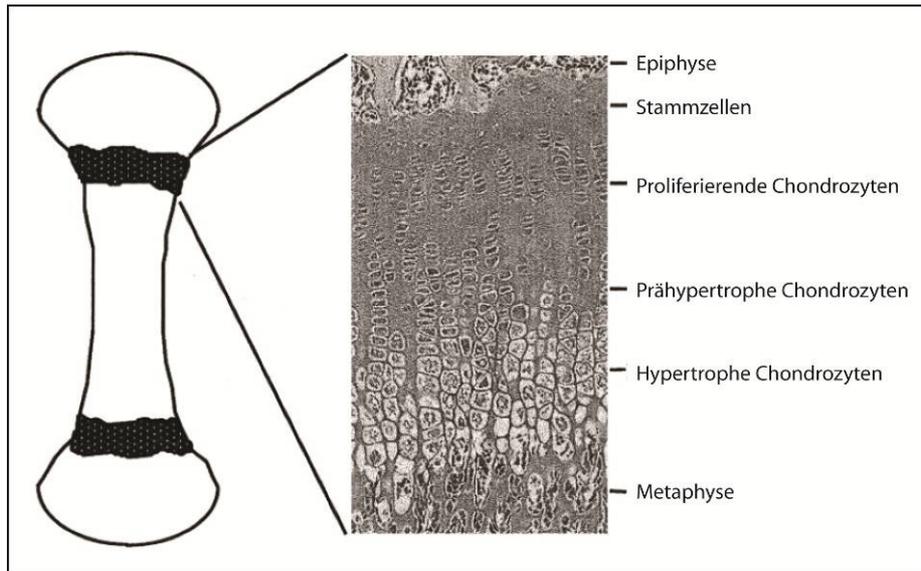


Abb. 2: Aufbau der Wachstumsguge. Abb. verändert aus van der Eerden et al. (2003).

Für den korrekten Ablauf der Gliedmaßenentwicklung ist eine spezifische, koordinierte Expression verschiedener Faktoren notwendig. Beim Auswachsen der Gliedmaßenknospen im Embryo spielen dabei zunächst zwei Zentren eine wichtige Rolle, die Apikale Ektodermale Randleiste (*apical ectodermal ridge*, AER) mit der darunter im Mesoderm liegenden Progress-Zone (PZ) sowie die Zone polarisierender Aktivität (*zone of polarizing activity*, ZPA) im posterioren Mesenchym. AER und ZPA steuern über verschiedene Signalwege und Morphogenexpression die Ausbildung der drei Achsen, die für eine korrekte Bildung der Extremitäten essentiell sind. Diese Achsen sind die proximodistale Achse (Schulter → Finger), die dorsoventrale Achse (Handrücken → Handfläche) sowie die anteroposteriore Achse (Daumen → kleiner Finger) (Abb. 3) (DeLise et al., 2000).

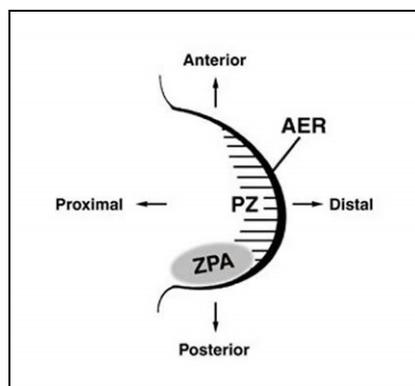


Abb. 3: Schematisches Modell der Zonen in der Gliedmaßenknospe. AER = *apical ectodermal ridge*; PZ = *progress zone*; ZPA = *zone of polarizing activity* (www.cmrbarcelona.eu).

Grundsätzlich wird das Längenwachstum entlang der proximodistalen Achse durch FGF (fibroblast growth factor)-Signale reguliert, die in der AER gebildet werden. Insbesondere FGFR8 ist essentiell für die korrekte Gliedmaßenbildung (Lewandoski et al., 2000). In der ZPA wird über komplexe Regulationsmechanismen SHH (sonic hedgehog) freigesetzt, welches über HOX-Signalwege und andere Faktoren die anteroposteriore Achsenbildung steuern (Riddle *et al.*, 1993). Heute ist bekannt, dass ein komplexes regulatorisches Netzwerk während der embryonalen Gliedmaßenentwicklung über zahlreiche Feedback-Loops selbstregulatorisch arbeitet und so die Bildung und Aufrechterhaltung der verschiedenen Zonen und Achsen ermöglicht (Zeller *et al.*, 2009).

Auch später in der Gliedmaßenentwicklung spielen regulatorische Netzwerke eine große Rolle. Innerhalb der Wachstumsfuge werden die Zonen, die Chondrozyten verschiedener Differenzierungsstadien enthalten, durch Gradienten zahlreicher Wachstumsfaktoren und Morphogene gebildet. Über einen negativen Feedback-Loop regulieren beispielsweise IHH (indian hedgehog, Expression in hypertrophen Chondrozyten) und PTHrP (parathyroid hormone-related protein, Expression in der Epiphyse/Reservezone) den Abstand zwischen Epiphyse und hypertropher Zone (Chung *et al.*, 2001). FGF-Signalwege sind wichtig für die Chondrozytenproliferation und -differenzierung. FGFR3 wird in proliferierenden Chondrozyten gebildet und hat einen negativen Effekt auf die Proliferationsrate. Gain-of-Function-Mutationen in *FGFR3* bewirken folglich eine reduzierte Proliferation und vorzeitige Schließung der Wachstumsfugen, was in Betroffenen zu verschiedenen Zwergwuchssyndromen führt (Deng *et al.*, 1996). Als Gegenspieler der FGF-Signalaktivierung sind BMPs (bone morphogenetic proteins) positive Regulatoren der Zellproliferation und inhibieren die terminale Chondrozytendifferenzierung (Minina *et al.*, 2002). Die Transkriptionsfaktoren RUNX2 (runt-related transcription factor 2) und RUNX3 sind essentiell für die späten Stadien der Chondrozytenreifung. So besitzen *Runx^{2-/-3-/-}*-Knockout-Mäuse keine hypertrophen Chondrozyten (Yoshida *et al.*, 2004). Wie bei der frühen Gliedmaßenentwicklung sind auch die Signalwege in der Wachstumsfuge stark miteinander vernetzt (Abb. 4).

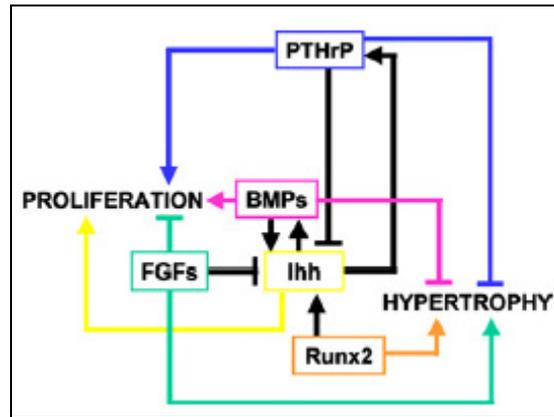


Abb. 4: Schematische Darstellung der Feedback-Loops und biologischen Aktivitäten von PTHrP, IHH, BMPs und FGFS in fötalen Wachstumstagen (Provot und Schipani, 2005).

1.2. Kleinwuchs: Definition und Ursachen

Die menschliche Körpergröße ist ein komplexer Phänotyp und kann zwischen verschiedenen Individuen stark variieren. Neben Umwelteinflüssen spielen dabei vor allem genetische und hormonelle Einflüsse (die wiederum genetisch kontrolliert sein können) eine große Rolle. In verschiedenen genetischen Studien mit mehreren zehntausend Teilnehmern wurden bisher mehr als 50 SNPs (single nucleotide polymorphisms) identifiziert, die mit der Körpergröße assoziiert sind. Diese gefundenen Varianten haben einzeln jedoch nur eine verhältnismäßig geringe Auswirkung (0,2-0,5 cm je SNP) auf die Größe. Es wird vermutet, dass alle bisher identifizierten Varianten zusammen nur maximal 5 % der phänotypischen Varianz in der Körpergröße erklären (Gudbjartsson *et al.*, 2008; Lettre *et al.*, 2008; Weedon *et al.*, 2008; Lettre, 2009; Kim *et al.*, 2010).

„Kleinwuchs“ wird klinisch als Körpergröße unterhalb der dritten Perzentile der altersgleichen Durchschnittspopulation definiert. Demzufolge gelten die kleinsten drei Prozent der Bevölkerung als kleinwüchsig. Im Gegensatz zu den in Assoziationsstudien gefundenen genetischen Varianten mit geringem Einfluss auf die Körpergröße wird Kleinwuchs oft durch einzelne Mutationen verursacht, die, je nach betroffenem Gen, einen moderaten bis sehr starken Effekt haben können.

Kleinwuchs tritt häufig als ein Symptom in klinischen Syndromen auf. Dazu gehören u. a. durch chromosomale Abberationen ausgelöste Syndrome (z.B. Down-Syndrom, Turner-Syndrom) sowie Skelettdysplasie-Syndrome wie Achondroplasie und Hypochondroplasie, die beide durch Mutationen im Gen *FGFR3* verursacht werden (Horton *et al.*, 2007). Weiterhin können verschiedene endokrine Störungen zu Kleinwuchs führen. Dazu zählen unter anderem Wachstumshormonresistenz oder -defizienz sowie IGF-1-Defizienz

(Rosenfeld *et al.*, 2000). Kleinwuchs kann auch isoliert ohne weitere Auffälligkeiten auftreten. Dieser Zustand wird als Idiopathischer Kleinwuchs (ISS; *Idiopathic Short Stature*) bezeichnet (Wit *et al.*, 2008). Die molekularen Ursachen für ISS sind oft unbekannt. In neueren Studien konnten jedoch in bis zu 5 % der untersuchten ISS-Patienten Mutationen im Gen *SHOX* als Ursache des Kleinwuchses gefunden werden (Jorge *et al.*, 2007; Rappold *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009).

1.3. *SHOX* und *SHOX*-assoziierte Erkrankungen

Das Gen *SHOX* (short stature homeobox gene, MIM #312865) liegt in der pseudoautosomalen Region der Geschlechtschromosomen und codiert für einen Transkriptionsfaktor aus der Familie der paired-verwandten Homöoboxproteine. Bisher sind sieben Exons beschrieben, die für zwei unterschiedliche Transkripte codieren, *SHOXa* und *SHOXb* (Rao *et al.*, 1997), vermutlich existieren aber eine Vielzahl weiterer Transkriptvarianten (C. Durand, unpublizierte Daten). Die beiden beschriebenen Varianten entstehen durch alternatives Spleißen des 3'-Exons und führen zu Proteinen bestehend aus 292 (*SHOXa*) bzw. 225 Aminosäuren (*SHOXb*) (Abb. 5).

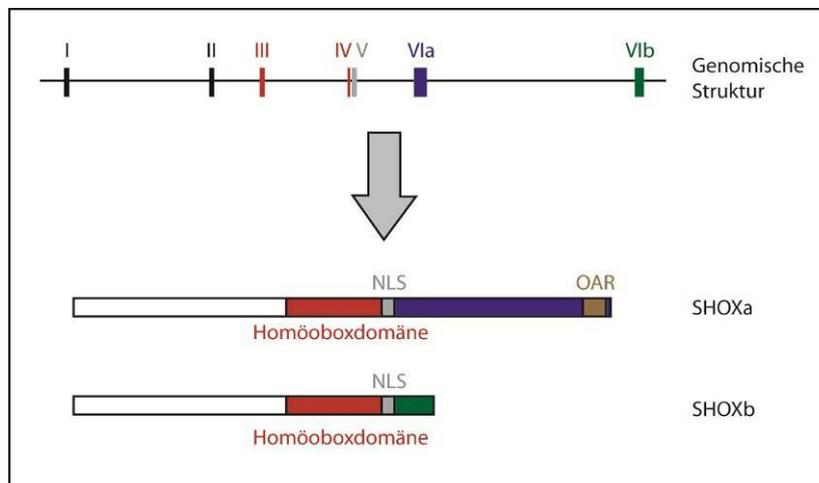


Abb. 5: Struktureller Aufbau von *SHOX*-mRNA (oben) und *SHOX*-Protein (unten). Die Exons sind mit römischen Ziffern bezeichnet. NLS = Kernlokalisierungssignal; OAR = OAR-Transaktivierungsdomäne. Abb. verändert aus Blaschke und Rappold (2006).

SHOXa ist in einer Vielzahl von fötalen und adulten menschlichen Geweben exprimiert, während *SHOXb* nur in fötaler Niere, Muskeln sowie Knochenmarksfibroblasten gefunden wurde (Rao *et al.*, 2001). Beide *SHOX*-Proteine besitzen eine 60 Aminosäuren umfassende Homöodomäne, die aus drei aufeinander folgenden α -Helices besteht.

Mutationen in diesem Bereich von *SHOX* führen in vielen Fällen zu funktionell inaktivem Protein (Schneider *et al.*, 2005). In Kombination mit der für paired-verwandte Homöoboxproteine typischen OAR-Transaktivierungsdomäne ermöglicht die Homöoboxdomäne es SHOXa-Dimeren, an palindromische DNA-Promotor-Sequenzen zu binden und dadurch die transkriptionelle Regulation von Zielgenen zu steuern. SHOXb enthält keine OAR-Domäne; möglicherweise spielt diese Isoform eine Rolle in der Modulierung der SHOXa-Aktivität (Rao *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit ist mit „*SHOX*“ und „*SHOX-WT*“ die funktionell aktive Variante *SHOXa* gemeint, soweit nicht anders gekennzeichnet.

Ebenfalls essentiell für die Funktion von SHOX ist das Kernlokalisierungssignal (NLS; nuclear localization signal). Mutationen oder Deletionen in diesem Bereich verhindern den Transport in den Zellkern und führen daher zu einem funktionslosen Protein (Sabherwal *et al.*, 2004a). Die Aktivität von SHOX wird zudem über Phosphorylierung reguliert. Die Aminosäure 106 (Serin) stellt die Hauptphosphorylierungsstelle dar. Mutation dieser Aminosäure zu Alanin verhindert die Phosphorylierung und führt zu einem transkriptionell inaktiven Protein (Marchini *et al.*, 2006).

Über die molekulare Rolle von SHOX und die Interaktion mit anderen Proteinen ist nur wenig bekannt. Bisher konnte erst ein von SHOX reguliertes Zielgen identifiziert werden, das Gen *BNP* (natriuretic peptide precursor B). Die zellulären Konsequenzen dieser Regulation sind noch unklar (Marchini *et al.*, 2007a).

SHOX-Haploinsuffizienz wurde in frühen Studien zunächst als ursächlich für den Kleinwuchs bei Patienten mit Turner-Syndrom (45,X; Monosomie des X-Chromosoms) identifiziert (Ellison *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 1997). Heute ist bekannt, dass SHOX auch bei weiteren Kleinwuchsformen eine Rolle spielt. So kann eine SHOX-Haploinsuffizienz Leri-Weill-Dyschondrosteosis (LWD) und Idiopathischen Kleinwuchs (ISS) verursachen. Homozygote Deletionen und/oder Mutationen von *SHOX* führen zu Langer-Syndrom.

Bei Patienten mit Leri-Weill-Dyschondrosteosis kann in der Mehrzahl der Fälle eine heterozygote SHOX-Defizienz festgestellt werden (Belin *et al.*, 1998; Shears *et al.*, 1998). Bei Betroffenen sind die distalen Gliedmaßenbereiche (Unterschenkel, Unterarm) im Vergleich zu den proximalen Bereichen verkürzt. Diese Variante des Kleinwuchses wird mesomelischer Kleinwuchs genannt. Oft tritt eine Madelung-Deformität auf, eine Fehlstellung der Knochen im Handgelenk. Weitere Merkmale wie ein stark ausgeprägter Muskelaufbau, ein hoher Gaumenbogen, erhöhter Body Mass Index oder verkürzte Mittelhandknochen können, müssen aber nicht auftreten. Generell treten die Symptome bei Mädchen stärker auf als bei Jungen und verstärken sich in der Pubertät. Die Körpergröße bei Leri-Weill-Patienten reicht von „sehr klein“ bis „niedrig normal“ (Rappold *et al.*, 2007).

Eine homozygote SHOX-Defizienz verursacht Langer-Syndrom. Dabei handelt es sich um eine schwerere Form des mesomelischen Kleinwuchses; die Körpergröße erreicht im Normalfall nicht mehr als 120 bis 130 cm. Insbesondere Unterarm und Unterschenkel sind stark verkürzt, während die Größe von Händen und Füßen relativ normal ist. Bei nahezu allen Patienten tritt eine Madelung-Deformität auf (Zinn *et al.*, 2002).

Abgesehen von diesen syndromalen Formen gibt es auch Betroffene, die trotz SHOX-Defizienz keine weiteren auffälligen Veränderungen des Skeletts aufweisen. Ihre Körpergröße variiert wie beim LWD von „sehr klein“ bis „niedrig normal“. Aufgrund fehlender typischer Charakteristika wird der SHOX-Mangel häufig nicht entdeckt und der Kleinwuchs daher in diesen Patienten als idiopathisch bezeichnet. In umfangreichen Screenings von ISS-Patienten konnte jedoch in bis zu 5 % der Betroffenen eine SHOX-Defizienz gefunden werden (Jorge *et al.*, 2007; Rappold *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009).

Die Gabe von Wachstumshormon an Kinder mit SHOX-Defizienz mildert die Ausprägung des Kleinwuchses. Bisher ist allerdings unklar, weshalb diese Therapie erfolgreich ist, da bei SHOX-defizienten Patienten keine Veränderungen des Wachstumshormonstoffwechsels beobachtet wurden und bislang kein molekularer Zusammenhang zwischen SHOX und Wachstumshormon bekannt ist (Blum *et al.*, 2007).

Nicht nur Gendeletionen und Mutationen der Exons können eine SHOX-Defizienz auslösen. In vielen Patienten wurden Deletionen von konservierten, nichtcodierenden regulatorischen Elementen *downstream* von *SHOX* gefunden. Obwohl im *SHOX*-Gen keine Veränderungen vorlagen, zeigten die Betroffenen die gleichen Symptome wie Patienten mit *SHOX*-Deletion oder -Mutation (Benito-Sanz *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009). In Experimenten in Hühnerembryonen konnte gezeigt werden, dass diese Bereiche ebenso wie *upstream* von *SHOX* gelegene, konservierte Elemente die Expression von *SHOX* in den Gliedmaßen regulieren (Sabherwal *et al.*, 2007; Durand *et al.*, 2010).

Neben *SHOX*-Deletionen wurden vereinzelt auch *SHOX*-Duplikationen beschrieben. *SHOX*-Duplikationen, häufig in Kombination mit Duplikationen größerer Bereiche der Geschlechtschromosomen oder der Geschlechtschromosomen selbst (Klinefelter-Syndrom, Triple-X-Syndrom) oder anderen chromosomalen Auffälligkeiten, scheinen in vielen Patienten die Körpergröße positiv zu beeinflussen (Ogata *et al.*, 2000; Kanaka-Gantenbein *et al.*, 2004; Nishi *et al.*, 2008). Thomas *et al.* (2009) konnten zeigen, dass der positive Einfluss stark davon abhängig ist, ob die zu *SHOX* gehörigen Enhancer, die eine wichtige Rolle für die korrekte Expression von *SHOX* in den Gliedmaßen spielen, ebenfalls dupliziert wurden. In einer aktuellen Studie mit mehr als 300 Patienten mit Geschlechtschromosomaneuploidien wurde statistisch nachgewiesen, dass die SHOX-

Dosis für ein bis vier *SHOX*-Kopien positiv mit der Körpergröße korreliert ist (Ottesen *et al.*, 2010).

1.4. Die Rolle von *SHOX* während der Gliedmaßenentwicklung

Aufgrund der Auswirkungen der *SHOX*-Defizienz in Patienten wurde schon früh vermutet, dass *SHOX* eine Rolle in der Gliedmaßenentwicklung spielen könnte. Mittels *in situ*-Hybridisierungen in menschlichen Embryonen konnte gezeigt werden, dass *SHOX* ab dem Carnegie-Stadium 14 (CS14) in den Gliedmaßen exprimiert wird (Abb. 6A). Zu diesem Zeitpunkt findet man *SHOX* im gesamten mittleren Extremitätenbereich. Im Gegensatz zu vielen anderen Genen in der Gliedmaßenentwicklung zeigt das Expressionsmuster von *SHOX* in diesem Stadium keine Unterschiede zwischen dorsalen und ventralen oder anterioren und posterioren Bereichen. Später in der Entwicklung (CS15-16) konzentriert sich die *SHOX*-Expression vor allem auf das Perichondrium. Eine etwas schwächere Expression ist auch im vom Perichondrium umgebenen, kondensierenden Mesenchym sowie im Ektoderm sichtbar. Zu den Zeitpunkten CS18 und 21 sind die verschiedenen Knochenanlagen in den Extremitäten identifizierbar (Abb. 6B). Die *SHOX*-Expression bleibt weiterhin auf den mittleren Armbereich beschränkt, insbesondere auf das Perichondrium um die sich entwickelnden Knochen (distales Ende des Humerus; Radius, Ulna, einige Knochen des Handgelenks). In der Hand selbst ist *SHOX* nur im Ektoderm vorhanden (Clement-Jones *et al.*, 2000).

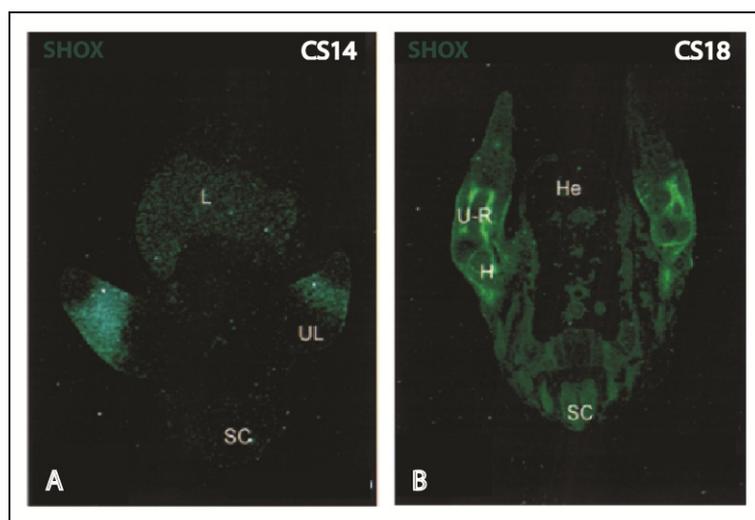


Abb. 6: *SHOX*-Expression in den sich entwickelnden Gliedmaßen im menschlichen Embryo. Dunkelfeldmikroskopie transversaler Schnitte durch die Gliedmaßenknospen menschlicher Embryonen; *in situ*-Hybridisierung mit *SHOX*-Antisense-Sonde. (A) Im Carnegiestadium 14 wird erstmals eine Expression von *SHOX* in den Gliedmaßen detektiert. (B) Im Carnegiestadium 18 erkennt man eine starke Expression im Perichondrium der sich im mittleren Armbereich entwickelnden Knochen (UL = upper limb, L = Leber; SC = Neuralrohr; U-R = Anlagen von Ulna und Radius; He = Herz). Abb. verändert aus Clement-Jones *et al.* (2000).

Zur genaueren Untersuchung der Rolle von SHOX in der Gliedmaßenentwicklung ist ein Modellsystem hilfreich. Die Gliedmaßenentwicklung verläuft in Mensch, Maus und Huhn relativ ähnlich (Martin, 1990). Da kein *SHOX*-Ortholog in der Maus existiert, wurde in verschiedenen Studien das Huhn als Modellsystem verwendet (Tiecke *et al.*, 2006; Sabherwal *et al.*, 2007; Durand *et al.*, 2010). Die Homologie von SHOX liegt bei 95 % auf Proteinebene und 85 % auf Nukleotidebene. Alle funktionellen Domänen des menschlichen Proteins sind im Huhn identisch, was eine funktionelle Konservierung vermuten lässt.

Das in Hühnerembryonen gefundene *Shox*-Expressionsmuster ähnelt der Expression im Menschen. Ab dem Hamburger-Hamilton-Stadium 19 (HH19) ist *Shox* in den Gliedmaßenanlagen detektierbar (Abb. 7A). Zum Zeitpunkt HH22 findet man *Shox* im zentralen Mesenchym der Gliedmaßenknospe (Abb. 7C). Später ist *Shox*, mit Ausnahme eines distalen Streifens, nahezu in der gesamten Extremität exprimiert (HH25, Abb. 7D). In Schnitten der Gliedmaßen (HH25) nach *Shox in situ*-Hybridisierung fällt auf, dass *Shox* in den kondensierenden Chondrozyten deutlich schwächer exprimiert wird als im umgebenden Gewebe. Ab Stadium HH29 sind Finger- und Zehenstrukturen zu erkennen, in denen *Shox* stark exprimiert wird. Wie im menschlichen Embryo wird *Shox* im Ektoderm der Gliedmaßen exprimiert (Tiecke *et al.*, 2006).

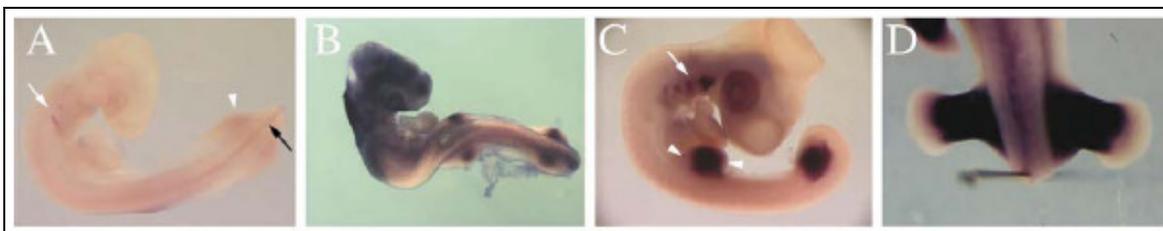


Abb. 7: *Shox*-Expression in Hühnerembryonen. Whole Mount *in situ*-Hybridisierung mit *SHOX*-Antisense-Sonde (A) HH19 (B) HH20 (C) HH22 (D) HH25 (Tiecke *et al.*, 2006).

Neben der Expression in den sich entwickelnden Gliedmaßen wurde SHOX auch in Wachstumsfugen von Föten, Kindern und Jugendlichen gefunden (Marchini *et al.*, 2004; Munns *et al.*, 2004; Marchini *et al.*, 2007a). In Rippenwachstumsfugen von 12 bis 22 Wochen alten Föten wurden mittels Immunfärbung in allen Zonen (Reservezone, Proliferationszone, hypertrophe Zone) große Mengen an SHOX-Protein nachgewiesen. Ältere Föten (Woche 28-40) zeigten in der hypertrophen Zone eine Reduktion und ungleichmäßige Verteilung von SHOX verglichen mit früheren Zeitpunkten (Munns *et al.*, 2004). Im Unterschied zu fötalen Stadien fand man in Tibia-Wachstumsfugen von 12 – 13

Jahre alten Jugendlichen in der hypertrophen Zone deutlich mehr SHOX als im Rest der Wachstumsfuge (Abb. 8) (Marchini *et al.*, 2004; Munns *et al.*, 2004; Marchini *et al.*, 2007a). Beim Vergleich der SHOX-Expression in Tibia-Wachstumsfugen gesunder Jugendlicher und Jugendlicher mit LWD wurden in der Verteilung von SHOX in den verschiedenen Zonen keine Unterschiede gefunden. Über eine mögliche Differenz der Menge von SHOX-Protein konnte aufgrund der geringen Probenzahl keine Aussage getroffen werden (Munns *et al.*, 2004).

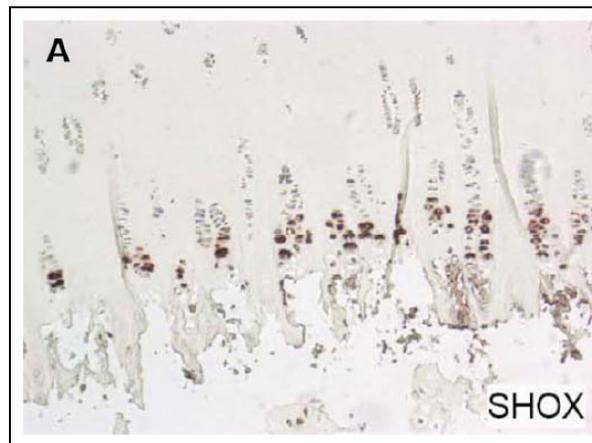


Abb. 8: SHOX-Immunfärbung einer menschlichen Wachstumfuge. Schnitt durch eine Wachstumfuge der Tibia eines 15jährigen Jungen mit Großwuchs. Eine spezifische SHOX-Färbung ist vor allem im Bereich der hypertrophen Chondrozyten erkennbar (Marchini *et al.*, 2007a).

In histologischen Studien an Wachstumfugen von LWD- (Munns *et al.*, 2001) und Langer-Syndrom-Patienten (Evans *et al.*, 1988) wurden Auffälligkeiten in der Chondrozytenorganisation gefunden. Die Säulenanzahl der Chondrozyten war in der Proliferationszone sehr unregelmäßig; in einigen Bereichen war die Säulenstruktur vollständig aufgelöst und Chondrozyten verschiedenster Differenzierungsstadien lagen in direkter Nachbarschaft. Während die Proliferationszone im Vergleich zu gesunden Wachstumfugen bei SHOX-defizienten Patienten deutlich verkleinert war, war die hypertrophe Zone vergrößert. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass SHOX in der Anordnung der Chondrozyten in der Proliferationszone sowie in deren Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten eine Rolle spielt. SHOX scheint die Reifung und Schließung der Wachstumfuge negativ zu regulieren. SHOX-Haploinsuffizienz führt demzufolge vermutlich zu einer schnelleren terminalen Differenzierung der Zellen und somit zur vorzeitigen Schließung der Wachstumfuge (Munns *et al.*, 2001; Marchini *et al.*, 2004; Munns *et al.*, 2004).

1.5. Zielsetzung der Arbeit

SHOX hat im Menschen einen dosisabhängigen Effekt auf die Körpergröße, der vermutlich durch Regulation spezifischer Zielgene in den sich entwickelnden Gliedmaßen und/oder der Wachstumsfuge verursacht wird. Bisher konnte mit *BNP* (natriuretic peptide precursor B) erst ein Gen als (direktes) SHOX-Zielgen identifiziert werden (Marchini *et al.*, 2007a). Es ist noch immer weitgehend unklar, welche molekularen Prozesse und Stoffwechselwege durch SHOX beeinflusst werden, und wie diese das Extremitätenwachstum beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit sollten mithilfe verschiedener Modellsysteme neue, durch SHOX regulierte Zielgene identifiziert und charakterisiert werden. Insbesondere die Regulation von bereits im Zusammenhang mit Gliedmaßenentwicklung oder Knochenbildung bekannten Genen soll helfen, die Rolle von SHOX während dieser Prozesse besser zu verstehen.

2. Material und Methoden

2.1. Nährmedien und Zusätze

2.1.1. Nährmedien und Zusätze für Bakterienkulturen

LB-Medium	1 % (w/v) Trypton-Pepton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen, autoklavieren
Für Agar-Platten:	+15 g Bacto-Agar/l Medium
SOC-Medium	2 % (w/v) Trypton-Pepton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgSO ₄ mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen, autoklavieren 20 mM Glukose (sterilfiltriert hinzufügen)
IPTG/X-Gal-Platten	X-Gal-IPTG-Solution (PAA), 100 µl/Agarplatte
Ampicillin	100 µg/ml Stammlösung in 70 % Ethanol; 1:1000 einsetzen
Kanamycin	30 µg/ml Stammlösung in ddH ₂ O; 1:1000 einsetzen

2.1.2. Zellkulturmedien und Zusätze

Medien	DMEM high Glucose (Gibco) DMEM/HAM'S F12 (Gibco) M199 basal (Gibco) Opti-Mem (Gibco)
Fötale Kälberserum	Fetal Bovine Serum Gold (PAA)
Hühnerserum	Chicken Serum (Sigma)
Pen/Strep	10.000 Units/ml Penicillin; 10.000 µg/ml Streptomycin in Stammlösung (Gibco); 1:100 einsetzen
Doxycyclin	1 mg/ml Stammlösung (Invitrogen), 1:2000 zum Induzieren einsetzen
Zeocin	100 mg/ml Stammlösung (Invitrogen); 1:500 einsetzen
Hygromycin	50 mg/ml Stammlösung (Invitrogen); 1:1000 einsetzen
G418	50 mg/ml Stammlösung (PAA); 1:166 einsetzen

Zusätze MSC-Expansion	5 mg/ml ECGF (Roche) 5000 u/ml Heparin (Biochrome AG)
Zusätze MSC-Differenzierung	40 µg/ml Prolin (Sigma Aldrich) 50 mg/ml IST+ (BD Biosciences) 100 µg/ml Natrium-Pyruvat (Gibco) 50 µg/ml Ascorbin-2-Phosphat (Sigma Aldrich) 10 ⁻⁷ M Dexamethason (Sigma Aldrich) 10 ng/ml TGFβ3 (Promokine) 500 ng/ml BMP6 (R&D Systems)

2.2. Bakterienstämme und Zelllinien

2.2.1. *E.coli*-Bakterienstämme

DH5α	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>
DH10B	F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ(ara,leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL λ-</i>
Nova Blue	<i>endA1 hsdR17(r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F[proA⁺B⁺ lacI^fZΔM15::Tn10 (Tc^R)]</i> (Novagen/Merck)
XL2-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^fZΔ M15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]</i> (Stratagene)

2.2.2. Zellen

U2OS	Humanes Chondrosarkom (ATCC)
NHDF	Normale humane dermale Fibroblasten (Promocell)
DF1	Hühner-Fibroblasten (Himly et al., 1998)
MSCs	Humane fötale mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark

2.3. Plasmide und Oligonukleotide

2.3.1. Plasmide

pcDNA4/TO	Invitrogen
pGL3basic	Promega
pGL3promoter	Promega
pRL-TK	Promega
pSTBlue-1	Novagen/Merck

pEntry	Invitrogen
pDEST-TR	modifiziert von Invitrogen
pcDNA6.2-GW/miR	modifiziert von Invitrogen
pOG44	Invitrogen

2.3.2. Oligonukleotide

Name	Sequenz
ChIP-Seq komplett -3494bp For	GGG GGTGGCCGTGGCGGCACTAGGACCCTTTTGAAA CCAATTTGGCAAATTAGCGGCACCACGGAAATGCTCC
ChIP-Seq komplett -3423bp Rev	GGG GGAGCATTTCCGTGGTGCCGCTAATTTGCCAAA TTGGTTTCAAAGGGTCCTAGTGCCGCCACGGCCACC
Cseq A -3489bp For	GGG CCGTGGCGGCACTAGGACCCTTTTGAAACCA
Cseq A -3489bp Rev	GGG TGGTTTCAAAGGGTCCTAGTGCCGCCACGG
Cseq B -3474bp For	GGG GACCCTTTTGAAACCAATTTGGCAAATTAGC
Cseq B -3474bp Rev	GGG GCTAATTTTGCCAAATTGGTTTCAAAGGGTC
Cseq C -3459bp For	GGG AATTTGGCAAATTAGCGGCACCACGGAAAT
Cseq C -3459bp Rev	GGG ATTTCCGTGGTGCCGCTAATTTTGCCAAATT
Cseq B For Mutation 1	GGG GACCCTTTTGAAACCACGGTGGCAAATTAGC
Cseq B Rev Mutation 1	GGG GCTAATTTTGCCACCGTGGTTTCAAAGGGTC
Cseq B For Mutation 2	GGG GACCCTTTTGAAACCAATTTGGCAACCGTAGC
Cseq B Rev Mutation 2	GGG GCTACGGTTGCCAAATTGGTTTCAAAGGGTC
FGFR3 -3262 EMSA For 91bp	GGG CGTATTTGAAAAAGGATCTTTGCAAATGTAATTAAGGTGAGAATCTT GAGATGGGGGATCCTCTTGGATTATCCAAGTGGGCCCTATATCC
FGFR3 -3262 EMSA Rev 91bp	GGG GGATATAGGGCCCACTTGGATAATCCAAGAGGATCCCCATCTCAA GATTCTCACCTTAATTACATTTGCAAAGATCCTTTTCAAATACG
FGFR3 -2956 EMSA For 72bp	GGG GAAAGTAAATTTAAGTCAATTAGTGTGCAGTAATT TGTGAGGGCAACCTAGAAATACAAGATGCTACTGAAC
FGFR3 -2956 EMSA Rev 72bp	GGG GTTCAGTAGCATCTTGTATTTCTAGGTTGCCCTC ACAAATTAAGTGCACACTAATTGACTTAAATTTACTTTT
FGFR3 -2194 EMSA For 66bp	GGG TCTACTAACAATACAAAATTAGCCGAGTGTGG TGGTGACACCTGTAATCCTAGCTACTTGGGAG
FGFR3 -2194 EMSA Rev 66bp	GGG CTCCAAGTAGCTAGGATTACAGGTGTGCACCA CCACACTCGGCTAATTTTGTATTGTTAGTAGA

Tabelle 1: Oligonukleotide für EMSA

Name	Sequenz	Anmerkung
CMV for	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	Klonierung/Sequenzierung
BGH rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG	Klonierung/Sequenzierung
M13 for	TGTA AACCGCGCCAGT	Klonierung/Sequenzierung
M13 rev	ACAGGAAACAGCTATGA	Klonierung/Sequenzierung
pEntry For Sequence	ACTTAAGCTCGGGCCCAATAA	Klonierung/Sequenzierung
pEntry Rev Sequence	GAGATTTTGAGACACGGGCCAGA	Klonierung/Sequenzierung
RVprimer3	CTAGCAAAATAGGCTGTCCCC	Klonierung/Sequenzierung
GLprimer2	CTTTATGTTTTGGGGTCTTCCA	Klonierung/Sequenzierung
pGL3 Seq Reverse	CAGGGCGTATCTTTCATAGC	Klonierung/Sequenzierung
miRNA forward Seq	TCCCAAGCTGGCTAGTTAAG	Klonierung/Sequenzierung
miRNA reverse Seq	CTCTAGATCAACCACTTTGT	Klonierung/Sequenzierung
ripDESTNew_rev	TTAGGAAGGACAGTGGGAGTG	Klonierung/Sequenzierung
ripDEST_for	CTGTTTTGACCTCCATAGAAGACAC	Klonierung/Sequenzierung
pOG44 Seq For1	TGACATCCACTTTGCCTTTCT	Sequenzierung
pOG44 Seq Rev1	TACCCGCACATACAGTCTCAC	Sequenzierung
pOG44 Seq For2	TTGTGGAAAGTTACAGGATATT	Sequenzierung
pOG44 Seq Rev2	ATCCTACCCTTTGGCTAAA	Sequenzierung
RUNX3 +35 Rev	CCCAGAACAATCTCCAGA	Klonierung/Sequenzierung
RUNX3 -703bp For	TTTTGAGGGGAGAGCAGAGA	Klonierung/Sequenzierung
RUNX3 -1250bp For	CGTTCGTTCCCCAGAGTCTA	Klonierung/Sequenzierung
RUNX3 +408 Rev	ACGGGAATACGCATAACAGC	Klonierung/Sequenzierung
RUNX3 -500 For	AGAATAATGTGCGGGACGAG	Klonierung/Sequenzierung
RUNX3 +303bp Rev	GAGAAGCGGGAAAGCAGAA	Klonierung/Sequenzierung
RUNX3 L +12 Rev	CCCAGAACAATCTCCAGAATCA	Klonierung/Sequenzierung
RUNX3 +34bp For	TTCTGGAGGATTTGTTCTGGG	Klonierung/Sequenzierung
FGFR3 +140bp Rev	GCCTCTCCCGTGCCTAGT	Klonierung/Sequenzierung
FGFR3 -2478bp For	ACTGAGCCCTTCTGCCTACA	Klonierung/Sequenzierung
FGFR3 -1318bp For	GCTCTGTGTCATCCTCCCTC	Klonierung/Sequenzierung
FGFR3 -1788bp For	GGTGGGCTAGGAGGCTTC	Klonierung/Sequenzierung
FGFR3 -1639 Rev	AGGTGCTCATCAGGAAATGG	Klonierung/Sequenzierung
FGFR3 -2998bp For	GCCTACACCTTGATTCAGAC	Klonierung/Sequenzierung
FGFR3 +150bp Rev	GTGCCTAGTGGGTCCTTCT	Klonierung/Sequenzierung
FGFR3 +271bp Rev	CAAGGAGGCAGCGGAATC	Klonierung/Sequenzierung
FGFR3 +343bp Rev	CTCCGACTTGGAGGGTAGC	Klonierung/Sequenzierung
FGFR3 L +464 Rev	GAATAACAACAGCGGAATCGTG	Klonierung/Sequenzierung
FGFR3 L -3430 For	ATGCTCTGCCCTTGACCTAAC	Klonierung/Sequenzierung
FGFR3 L -2610 For	TCCTGGTGAGGAAAGCAGAA	Klonierung/Sequenzierung
FGFR3 L -2516 Rev	TTCCAGTACCTCCAAGAAGGA	Klonierung/Sequenzierung
FGFR3 -1137 L Rev Long	GTGCAGAGGCTGCGTTGACT	Klonierung/Sequenzierung
FGFR3 -561 L Rev Long	CGACCGGCAGCAGGAGC	Klonierung/Sequenzierung
FGFR3 +1189bp Rev cDNA	ACCACCAGGATGAACAGGAA	Klonierung/Sequenzierung
FGFR3 L -618 For	GGCAGCCAGGCTCAGTG	Klonierung/Sequenzierung
FGFR3 L -942 For	ACCTCCCTCTGAGCTCCTG	Klonierung/Sequenzierung
FGFR3 +150bp For	AGAAGGGACCCACTAGGCAC	Klonierung/Sequenzierung
FGFR3 +343bp For	GCTACCCTCCAAGTGGGAG	Klonierung/Sequenzierung
FGFR3 L +464 For	CACGATCCCGCTGTTGTTATC	Klonierung/Sequenzierung
FGFR3 L -3518bp For	CAGATGGGCAGCAACTCCT	Klonierung/Sequenzierung
FGFR3 ChIP2 Rev (+574R)	CACACCACCCTTAGAAGTCC	Klonierung/Sequenzierung
SHOX 5' For HindIII	GGG AAG CTT ATGGAAGAGCTCACGGCTTTT	GR-Fusionsklonierung
SHOXa 3' Rev HindIII	GGG AAG CTT GAGCCCCAGGGCCTCC	GR-Fusionsklonierung
GR For HindIII	GGG AAG CTT ACCTCTGAAATCTGGTAACAAAAC	GR-Fusionsklonierung
GR Rev XhoI	GGG CTC GAG CACTTTTATGAAACAGAAGTT	GR-Fusionsklonierung
SHOX For XbaI ohne ATG	GGG TCT AGA GAAGAGCTCACGGCTTTTGTATC	GR-Fusionsklonierung
SHOXa 3' Rev XbaI bis TGA	GGG TCT AGA TCAGAGCCCCAGGGCCT	GR-Fusionsklonierung
GR For HindIII ATG 5'	GGG AAG CTT ATG ACCTCTGAAATCTGGTAACAAAAC	GR-Fusionsklonierung
GR Rev XbaI 5'	GGG TCT AGA TTTGATGAAACAGAAGTTTGTAT	GR-Fusionsklonierung
GR Mutagenese delA	CCCCGAGATGTTAGCTGAATCATCAACATCAG	GR-Fusionsklonierung
GR Seq For	ACGGTCTGAAGAGCCAAAGAG	GR-Fusionsklonierung
GR Mutagenese delA Rev	CTGATTGGTGATGATTACGCTAACATCTCGGGG	GR-Fusionsklonierung
SHOX Rev BamHI -TGA	GGGGATCCGAGCCCCAGGGCCTCCGCT	ER-Fusionsklonierung
EBD BamHI For -ATG	GGGGATCCAGGGGTGAAGTGGGGTCTGCTG	ER-Fusionsklonierung
EBD BamHI Rev +TGA	GGGGATCCCAATTCGATTCAGACTGTGG	ER-Fusionsklonierung
EBD Seq For	CTGTTTGCCTCACTTGTCTCT	ER-Fusionsklonierung
EBD BamHI For +ATG	GGGGATCCATGAGGGGTGAAGTGGGGTCTGCTGG	ER-Fusionsklonierung
EBD BamHI Rev -TGA	GGGGATCCGACTGTGGCAGGAAACCTCT	ER-Fusionsklonierung
SHOX For BamHI -ATG	GGGGATCCGAAGAGCTCAGGGCTTTGTATCCA	ER-Fusionsklonierung
SHOX Rev XbaI +TGA	GGGTCTAGATCAGAGCCCCAGGGCCTCCG	ER-Fusionsklonierung
RCAS DMF04 rev	ATCTCTGCAATCGGAATTCAGTG	Sequenzierung RCAS
RCAS 5' For	ACGCTTTTGTCTGTGTGCTGC	Sequenzierung RCAS
FRT_Bam_for	GGGATCCCCATGGAGAAGTTACTATTC	Primer für Southern Blot Sonde
egfp_rev	ATTTTATGTTTCAGGTTTCAGG	Primer für Southern Blot Sonde
SHOXa+b 5'For	CCGGTGCAATTTGTTCAAGGA	Expressionsanalyse
SHOXa+b 3'Rev	TGCCCAAGATGACGCCTTTA	Expressionsanalyse
ARF1for	GCCAGTGTCTTCCACCTGTC	Expressionsanalyse
ARF1rev	GCCTGTTTACACGCTCTCTG	Expressionsanalyse
RUNX3 cDNA F1	TACGGTGGTGACTGTGATGG	Expressionsanalyse
RUNX3 cDNA R1	GGTCAGGGTGAACCTTCTCC	Expressionsanalyse
FGFR3 cDNA F1	CGAGGACAACGTGATGAAGA	Expressionsanalyse
FGFR3 cDNA R1	AGCAGGACCCCAAGGAC	Expressionsanalyse
Ch RUNX3 ISH For	CCACCGTGACGTTACTCCTT	Klonierung ISH-Sonde
Ch RUNX3 ISH Rev	AGAGGTGGCTCGGATGATT	Klonierung ISH-Sonde
chFGFR3 ISH For1	CGGATCACTGCTCTCTCCTC	Klonierung ISH-Sonde
chFGFR3 ISH Rev1	ACGTCTCTAGCAAGGCCAAA	Klonierung ISH-Sonde
chFGFR3 ISH For2	AGCTGATTTTGGCCTTGCTA	Klonierung ISH-Sonde
chFGFR3 ISH Rev2	GAACACTGCCTGTCTGTCCA	Klonierung ISH-Sonde
chiSHOX_1_For	GAGCTTGGGAACCTCCGATT	Klonierung ISH-Sonde
chiSHOX_2_Rev	TTACAGACAGTCCCAGCTCT	Klonierung ISH-Sonde

Tabelle 2: PCR-Primer

Name	Sequenz	Anmerkung
Cyclophilin A For	CGGGAGGCCAGGCTCGT	Human
Cyclophilin A Rev	TGAAAGCAGGAACCCCTATAACCAA	Human
SDHA For Mhg 147	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	Human
SDHA Rev Mhg 148	CCACCACTGCATCAAATTCATG	Human
HPRT1 For Mhg 300	TGATAGATCCATTCTATGACTGTAGA	Human
HPRT1 Rev Mhg 301	AAGACATTCTTTCCAGTTAAAGTTGAG	Human
SHOX For Mhg 277	CCCGAAGGGCGGCCGGG	Human
SHOX Rev Mhg 278	CCTACGTCAACATGGGAGCCTTAC	Human
FGFR3 cDNA F1	CGAGGACAACGTGATGAAGA	Human
FGFR3 cDNA R1	AGCAGGACCCCAAGGAC	Human
RUNX3 cDNA F1	TACGGTGGTACTGTGATGG	Human
RUNX3 cDNA R1	GGTCAGGGTGAAACTCTTCC	Human
BNP For Mhg 316a	GATGGTGCAAGGGTCTGG	Human
BNP For Mhg 317a	TAATGCCGCCTCAGCACT	Human
Col2a1 For1	CCCAGAGGTGACAAAGGAGA	Human
Col2a1 Rev1	CAGCAGGACCAGAAGCAC	Human
Col10a1 For3	CAGGCATAAAAAGGCCCACTA	Human
Col10a1 Rev3	GTGGACCAGGAGTACCTTGC	Human
chH6PD cDNA F1	TTTCGAGATCAGAACCGTCA	Chicken
chH6PD cDNA R1	CCGGATGACTCCATACTGCT	Chicken
chSDHA cDNA F1	TTTGGTGGAGACCCCTTGAAC	Chicken
chSDHA cDNA R1	CTCTTCTGTTGGCCTTGGAG	Chicken
chARF1 cDNA F1	AGGCCAGAGAAGAGCTGATG	Chicken
chARF1 cDNA R1	GCCTGGATGTACCAGTTCTCT	Chicken
chSHOX cDNA F1	GCTGAACGAGCTGGAAGAC	Chicken
chSHOX cDNA R1	GTGCCAAGATCACACCTTT	Chicken
chFGFR3 cDNA F1	TTGGCCTTGCTAGAGACGTT	Chicken
chFGFR3 cDNA R1	CAGACATCGCTCTGGTGAGT	Chicken
chRUNX3 cDNA F2	AGCTTCACCCTGACCATCAC	Chicken
chRUNX3 cDNA R2	GAAGGGTTTGGTTTGGTCTTC	Chicken
chAggrecan For	ATCCCTGGAGTGAAGGAAT	Chicken
chAggrecan Rev	TGGAGGAAAAGCAGATGGTC	Chicken
chCol10A1 For	GGTCCAGGGCTTCCAAAC	Chicken
chCol10A1 Rev	CCAGAAAACAGTCCAGCATCA	Chicken
chCol2A1 For	ACCCTCAAATCCCTCAACAA	Chicken
chCol2A1 Rev	GGTTCGGGTCAATCCAGTAA	Chicken

Tabelle 3: qRT-PCR-Primer

Name	Sequenz	Anmerkung
BNP gen For Mhg 519	TGACTCTTCTCAGGGGCATT	ChIP
BNP gen Rev Mhg 520	AGTGCCCTCCTCATCTGACC	ChIP
FGFR3 -6926bp For	GGCGTGAATAGAGTCCCTCA	ChIP
FGFR3 -6815bp Rev	CAAGTGCAAAGCCTGATGTC	ChIP
FGFR3 -5150bp For	CTGCCATATCCAAGACGACA	ChIP
FGFR3 -5040bp Rev	TCCAAAATCCCTAAGCCAAC	ChIP
FGFR3 L -3518bp For	CAGAGTGGGCAGCAACTCCT	ChIP
FGFR3 -3391bp Rev	TCTGAATGGCTTCTCCAGTG	ChIP
FGFR3 -3299bp For	AGTCATGTCTCACCCCTTG	ChIP
FGFR3 -3141bp Rev	TTCCCACTCTGCCATCTTCT	ChIP
FGFR3 -2257bp For	GCAGGTGGATCAGTTGAGGT	ChIP
FGFR3 -2010bp Rev	CTCTGCCTCCCTGATTGAAG	ChIP
FGFR3 +2893bp For	CCTCTACCCCTACCCTCA	ChIP
FGFR3 +3017bp Rev	CTCCACAACCTCTGCCACTCA	ChIP
FGFR3 ChIP3 For (+5185F)	AGATAGAGACCTTTGGCCCTTT	ChIP
FGFR3 ChIP3 Rev (+5292R)	GCACCGTTTACAGACACAGCA	ChIP

Tabelle 4: ChIP-Primer

Name	G/C in %	Target	Sequenz
SHOXa/b1 miRNA Top	33,34	SHOX 5'UTR	TGCTGAAATCTCACTATTTATACGCGGTTTTGGCCA CTGACTGACCGCGTATATAGTGAGATTT
SHOXa/b1 miRNA Bottom			CCTGAAATCTCACTATATACGCGGTCAGTCAGTGGC CAAAACCGCGTATAAATAGTGAGATTTTC
SHOXa/b2 miRNA Top	42,86	SHOX ORF	TGCTGAATGGAATCCTTCTTACCTCCGTTTTGGCCA CTGACTGACGGAGGTAAAGGATTCCATT
SHOXa/b2 miRNA Bottom			CCTGAATGGAATCCTTTACCTCCGTCAGTCAGTGGC CAAAACGGAGGTAAGAAGGATTCCATTC
SHOXa/b3 miRNA Top	33,34	SHOX ORF	TGCTGTTATGCATCTGATTCTTGTGTTTTGGCCAC TGACTGACACAAGAGACAGATGCATAA
SHOXa/b3 miRNA Bottom			CCTGTTATGCATCTGTCTTGTGTCAGTCAGTGGC CAAAACACAAGAGAATCAGATGCATAAC
SHOXa1 miRNA Top	52,39	SHOX 3'UTR	TGCTGTATAGCAGAGGAAGACGCAGCGTTTTGGCC ACTGACTGACGCTGCGTCCCTCTGCTATA
SHOXa1 miRNA Bottom			CCTGTATAGCAGAGGGACGCAGCGTCAGTCAGTGG CCAAAACGCTGCGTCTTCTCTGCTATAC
SHOXa2 miRNA Top	47,62	SHOX 3'UTR	TGCTGATTTCAAGCAACTGTCCAGCCGTTTTGGCCA CTGACTGACGGCTGGACTTGCTTGAAT
SHOXa2 miRNA Bottom			CCTGATTTCAAGCAAGTCCAGCCGTCAGTCAGTGG CCAAAACGGCTGGACAGTTGCTTGAATC
SHOXb1 miRNA Top	47,62	SHOX ORF	TGCTGAACTCCATCTGTTGAAAGGCGTTTTGGCCA CTGACTGACGCCTTTCCAGATGGAGTT
SHOXb1 miRNA Bottom			CCTGAACTCCATCTGGGAAAGGCGTCAGTCAGTGG CCAAAACGCCTTTCCAACAGATGGAGTTC
LacZ miRNA	47,8	LacZ	TGCTGAAATCGCTGATTTGTGTAGTCGTTTTGGCCA CTGACTGACGACTACACATCAGCGATTTTCAGG
Lamin A/C miRNA	56,7	Lamin A/C	TGCTGTGGAAGTCCAGTTCCTCCTTCGTTTTGGCCA CTGACTGACGAAGGAGGCTGGACTTCCACAGG
miR-neg control	52,4	-	TGCTGAAATGTAAGTGCAGTGGAGACGTTTTGGCC ACTGACTGACGTCTCCACGCAGTACATTT

Tabelle 5: miRNAs

Oligo ID	G/C in %	Target
HSS109735	36	SHOXa (NM_000451.3) SHOXb (NM_006883.2)
HSS109737	48	SHOXa (NM_000451.3) SHOXb (NM_006883.2)
HSS185510	56	SHOXa (NM_000451.3) SHOXb (NM_006883.2)
Negative Universal Control medium GC	48	/
Negative Universal Control high GC	68	/

Tabelle 6: siRNAs (Stealth Select RNAi siRNA, Invitrogen)

2.4. Antikörper

Antikörper	Tier	Spezifität	Typ	Immunogen	Hersteller	Katalognr.
α -FGFR3	Kaninchen	Humanes FGFR3	polyklonal	DLLPPAPPSSGGSR (AS 792-806 des humanen FGFR3)	Sigma	F0425
α -RUNX3	Maus	Humanes RUNX3	monoklonal	Fragmente aus AS 191-300 des humanen RUNX3	Abcam	ab40278
α -SHOX-2	Kaninchen	Humanes SHOX	polyklonal	FKDHVDNKEKLKEF (AS 71-85 des humanen SHOX)	Pineda	Eigener Auftrag
α -SHOX-3	Kaninchen	Humanes SHOX	polyklonal	KEKREDVKSEDEDGQ (AS 100-112 des humanen SHOX)	Pineda	Eigener Auftrag
α -Digoxigenin-AP	Schaf	Digoxigenin.		Digoxigenin.	Roche	11 093 274 910
α -Fluorescein-AP	Schaf	Fluorescein		Fluorescein	Roche	1 426 338
AMV-3C2	Maus	RCAS	monoklonal	AMV-Virus	DSHB	AMV-3C2
α -Flag	Maus	Flag	monoklonal	DYKDDDDK	Sigma	F1804
IgG	Maus	unspezifisch	polyklonal	Kein Immunogen	Sigma	I5381

Tabelle 7: Primärantikörper

Antikörper	Tier	Konjugat	Hersteller	Katalognr.
α -Ziege	Kaninchen	Peroxidase	Sigma	A5420
α -Kaninchen	Ziege	Peroxidase	Sigma	A6154
α -Maus	Ziege	Peroxidase	Sigma	A4416
α -Kaninchen	Esel	IRDye 680	Licor	926-32223
α -Kaninchen	Esel	IRDye 800CW	Licor	926-32213
α -Maus	Esel	IRDye 680	Licor	926-32222
α -Maus	Esel	IRDye 800CW	Licor	926-32212
α -Ziege	Esel	IRDye 800CW	Licor	926-32214

Tabelle 8: Sekundärantikörper

2.5. Datenbanken und Internetressourcen

National Center for Biotechnology Information	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
UCSC Genome Bioinformatics	http://genome.ucsc.edu/
ECR Browser	http://ecrbrowser.dcode.org/
Webgestalt	http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/
NEBcutter V2.0	http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php
ClustalW2	http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html
MEME	http://meme.sdsc.edu/meme4_3_0/cgi-bin/meme.cgi
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/primer3/
Netprimer	http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html
UNSW Embryology	http://embryology.med.unsw.edu.au/

2.6. Kits und Reagenzien

Kits zur DNA-Isolierung und -Aufreinigung

- illustra PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare
- illustra Microspin G-50 Säulen, GE Healthcare
- illustra plasmidPrep Mini Spin Kit, GE Healthcare
- PureLink HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit, Invitrogen
- PureYield Plasmid Midiprep System, Promega

Kits und Enzyme für PCRs

- Paq5000 DNA Polymerase, Stratagene, für Standard-PCRs
- Paq5000 Hotstart DNA Polymerase, Stratagene, für diverse Anwendungen
- Taq DNA Polymerase mit ThermoPol Buffer, New England Biolabs, für Colony PCRs
- HotStar HiFidelity Polymerase Kit, Qiagen, für Klonierungen
- FidelityTaq DNA Polymerase, USB, für Klonierungen
- HotStarTaq DNA Polymerase, Qiagen, für diverse Anwendungen
- Absolute SYBR Green ROX Mix, ABgene, für qRT-PCR

Kits zur Sequenzierung

- TempliPhi-Kits, GE Healthcare
- DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham Biosciences

Kits zur Klonierung von DNA-Fragmenten

- pSTBlue-1 AccepTor Vector Kit, Novagen/Merck
- Gateway BP Clonase II Enzyme Mix, Invitrogen
- Gateway LR Clonase II Enzyme Mix, Invitrogen

Kits zur RNA-Isolierung und Aufreinigung

- illustra RNAspin Mini Kit, GE Healthcare
- TRIZOL Reagent, Invitrogen
- DNA-free Kit, Ambion

Kit zur cDNA-Synthese

- SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen

Kits zur *in vitro* RNA-Synthese

- DIG RNA Labeling Mix, Roche

- Fluorescein RNA Labeling Mix, Roche
- MEGAscript® T7 Kit, Ambion
- MEGAscript® SP6 Kit, Ambion

Kits zur Transfektion von eukaryotischen Zellen

- Lipofectamine 2000, Invitrogen
- Cell Line Nucleofector Kit V, Lonza
- Human Dermal Fibroblast Nucleofector Kit, Lonza

Kit zur Messung der Luciferaseaktivität in eukaryotischen Zellen

- Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega

Kit zur Bestimmung der Proteinkonzentration

- BCA Protein Assay Kit, Pierce/Thermo Scientific

2.7. DNA-basierte Methoden

2.7.1. Isolierung genomischer DNA aus Zellen und Geweben

Als Ausgangsmaterial wurden etwa 5×10^6 - 1×10^7 Zellen oder entsprechend kleine Gewebestücke verwendet. Die DNA-Aufarbeitung erfolgte nach folgendem Protokoll:

- Zellpellet/Gewebe in 5 ml SE-Puffer mit Proteinase K (60 µg/ml) und SDS (1 %) resuspendieren
- 12-16 h bei Raumtemperatur über Kopf drehen
- Phenol/Chloroform- Extraktion
- Fällung der DNA in 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat und 1 Volumen 100 % Isopropanol
- DNA-Faden mit Glashaken angeln, in 70 % EtOH waschen, kurz trocknen lassen und in 0,1x TE-Puffer lösen
- Photometrische Messung der Konzentration und Reinheit der isolierten DNA mittels Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific)

SE-Puffer: 75 mM NaCl
25 mM Na₂EDTA
pH 8,0

2.7.2. Plasmidextraktion aus Bakterien

Die das gewünschte Plasmid enthaltenden Bakterienklone wurden in 150 ml (Midiprep) oder 5 ml (Miniprep) LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Die Plasmid-DNA wurde mit den entsprechenden Kits (s. Kap. 2.6) laut Herstellerprotokoll über Säulen isoliert, in ddH₂O resuspendiert und die Konzentration sowie die Reinheit photometrisch mit dem Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific) bestimmt.

2.7.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine Methode zur enzymatischen Amplifikation von DNA-Sequenzen spezifischer Länge und Sequenz *in vitro* (Saiki et al., 1985). PCRs wurden in dieser Arbeit zu verschiedenen Zwecken eingesetzt, z.B. Expressionsnachweis, Generierung von DNA-Fragmenten für anschließende Klonierungen sowie für Kolonie-PCRs zum Test auf erfolgreiche Ligation und Transformationen.

Der Standardansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Reaktionsansatz:	2,5 µl 10x Puffer
	1,5 µl MgCl ₂
	1 µl dNTP-Mix 5 mM
	je 1 µl Primer For und Rev (10 pmol/µl)
	1 µl Template (1-100 ng DNA oder RNA)
	0,5 µl Polymerase
	Ad 25 µl ddH ₂ O

PCR-Programm:	3 min 95°C	
	30 sec 94°C	} 25-40 Zyklen
	30 sec T _a	
	1 min/kb 72°C	
	5 min 72°C	
	4°C bis zur Weiterverwendung	

Die jeweilige Annealingtemperatur T_a richtete sich nach den verwendeten Primern (s. Kap. 2.3.2) sowie der verwendeten Polymerase.

Für einige Anwendungen/Templates wurden andere Polymerasen verwendet, die dann gegebenenfalls mit entsprechend dem Herstellerprotokoll leicht verändertem Ansatz durchgeführt wurden.

Real-Time PCR (qRT-PCR)

Zur quantitativen Bestimmung der Menge eines Transkriptes in cDNA-Proben wurden Real-time PCRs durchgeführt, bei denen das PCR-Gerät (ABI 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems) in Echtzeit die DNA-Amplifikation detektiert. Der verwendete Reaktionsmix (Absolute SYBR Green ROX Mix, ABgene) enthält dabei unter anderem den Farbstoff SYBRGreen, der während der qRT-PCR in die neugebildete doppelsträngige DNA interkaliert und damit die Quantifizierung der entstandenen PCR-Produkte ermöglicht. Alle Proben wurden in Duplikaten oder Triplikaten gemessen. Die relativen Expressionswerte verschiedener Gene wurden entsprechend der delta-delta-CT-Methode (Pfaffl, 2001) durch Normalisierung auf mehrere Housekeeping-Gene (ARF, Cyclophilin A, SDHA, HPRT1) ermittelt. Alle eingesetzten Primerpaare (siehe Tabelle 3) wurden vor Verwendung getestet und auf ihre Eignung für qRT-PCR geprüft.

Reaktionsansatz: 10 µl 2x Reaktionsmix
 0,4 µl Primermix For/Rev, je 10 pmol/µl
 2 µl cDNA
 7,6 µl ddH₂O

qRT-PCR-Programm: 30 min 25 °C
 15 min 95 °C
 15 sec 95 °C } 40 Zyklen
 60 sec 60 °C }

Anschließende Dissoziation der PCR-Produkte durch graduellen Temperaturanstieg auf 95 °C zur Bestimmung des Schmelzpunktes

2.7.4. Klonierung

Aufgereinigte Restriktionsfragmente oder PCR-Produkte wurden nach dem Verdau mit geeigneten Restriktionsenzymen mit kompatibel linearisierten und dephosphorylierten Plasmiden für mindestens 5 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 16 °C über Nacht inkubiert.

Ligationsansatz: 100 ng linearisierter Vektor
 3-5fache molare Menge Insert
 2 µl 10x Ligasepuffer
 1 µl T4 DNA Ligase (Promega)
 ad 20 µl ddH₂O

Die Ligation wurde für 20 min mit einem MF-Membranfilter (Millipore) entsalzt und anschließend nach folgendem Protokoll in *E.coli*-Bakterien transformiert:

- 40 µl Elektrokompente Bakterien auf Eis auftauen (DH5α, DH10B oder XL2-Blue)
- 4 µl Ligationsansatz dazugeben
- Transfer der Bakterienlösung in Elektroporationsküvette
- Puls der Küvette bei 1800 V
- 500 µl SOC-Medium zugeben
- 30 min inkubieren bei 37°C, mit 500 rpm schütteln
- Verschiedene Verdünnungen auf geeignete Selektionsplatten ausplattieren

Für die Klonierung von unverdauten PCR-Produkten in den Vektor pSTBlue-1 wurde das pSTBlue-1 AccepTor Vector Kit (Novagen/Merck) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Außerdem wurde zur Subklonierung verschiedener miRNAs in unterschiedliche pDEST-Vektoren das Gateway-System (Invitrogen) verwendet, das eine Herstellung von Restriktionsfragmenten und linearisierten Plasmiden überflüssig macht. Die Durchführung erfolgte entsprechend dem Herstellerprotokoll.

Der Erfolg der Ligation und Transformation wurde standardmäßig mittels Kolonie-PCR überprüft, bei der die Bakterienklone direkt als Template eingesetzt wurden.

2.7.5. Sequenzierung

Alle Plasmidkonstrukte wurden auf dem MegaBACE1000 Sequenzer (Amersham Biosciences) mithilfe der Kettenabbruchmethode nach Sanger sequenziert (Sanger et al., 1977). Als Ausgangsprodukt wurden dabei entweder PCR-Stücke verwendet, denen die zu analysierenden Plasmidbereiche als Template dienten, oder mithilfe des TempliPhi-Kits (GE Healthcare, Durchführung laut Herstellerprotokoll) amplifizierte, vollständige Plasmide. Während die TempliPhi-Produkte direkt in der Sequenzierreaktion eingesetzt werden können, müssen die PCR-Produkte vorher noch mittels Exonuklease I (*E.coli*) und *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) aufgereinigt werden.

Reaktionsansatz:	PCR-Produkt:	1-3 µl
	SAP (1 U/µl):	0,5 µl
	ExoI (20 U/µl):	0,25 µl
	ddH ₂ O	ad 5 µl
Inkubation:	15 min	37°C
	15 min	85°C

Für die eigentliche Sequenzreaktion wurde das DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences) wie folgt verwendet:

Reaktionsansatz:	PCR-/TempliPhi-Produkt	2 μ l
	Primer (10 pmol/ μ l)	0,5 μ l
	Premix	1 μ l
	ddH ₂ O	ad 5 μ l
Sequenzprogramm:	20 sec	94 °C
	2 min	60 °C; 30 Zyklen

Nach Beendigung der Sequenzreaktion wurden die Proben mit je 15 μ l ddH₂O aufgefüllt, so dass die Sequenzreaktion in einem Endvolumen von 20 μ l vorlag. Die Aufreinigung der Sequenzreaktion geschah über Sephadex-G50 (GE Healthcare) in Millipore Multiscreen-HV-Platten. Dabei werden nicht eingebaute Didesoxynukleotide, überschüssige Primer und Polymerase von den eigentlichen Sequenzprodukten abgetrennt:

- Befüllen einer 96-Well-Multiscreen-HV-Platte mit Sephadex-G50-Pulver.
- Zugabe von je 300 μ l ddH₂O pro Well, Inkubation bei RT für mind. 3 h
- Abzentrifugieren der Flüssigkeit bei 910 g für 5 min
- Erneute Zugabe von 150 μ l ddH₂O pro Well, kurz quellen lassen, abzentrifugieren der Flüssigkeit bei 910 g für 5 min.
- Beladen der so vorbehandelten Multiscreenplatte mit der Sequenzreaktion. Zentrifugation bei 910 g für 5 min, wobei das entstehende Eluat (=aufgereinigte Sequenzreaktion) in einer frischen 96-Well-Platte aufgefangen wird.

Die technische Bedienung des MegaBACE100-Sequenziergerätes erfolgte nach den Herstellerangaben. Die Sequenzierungen wurden standardmäßig unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Injektion der Proben: 3,5 kV für 30 sec

Lauf: 9 kV für 100-150 min je nach Länge der Fragmente, Temperatur 44 °C

Puffer: 1x LPA-Puffer

Die erhaltenen Sequenzen wurden mithilfe der Software Chromas Lite (Technelysium) ausgewertet.

2.7.6. Southern Blot

Mithilfe von Southern Blots wurden Zellklone auf die Anzahl der Rekombinationsereignisse getestet. Die Durchführung erfolgte nach folgendem Protokoll:

Probenvorbereitung

- Verdau von ca. 15 µg genomischer DNA mit 3 µl PstI bei 37°C über Nacht
- Enzym inaktivieren, auf Probeagarosegel Verdau überprüfen
- Wenn Verdau korrekt war, Proben auf 1 % TAE-Agarosegel laden und DNA bei 35 V über Nacht elektrophoretisch auftrennen lassen
- Gel in Ethidiumbromid-Lösung färben, um Auftrennung zu kontrollieren, anschließend Gel in destilliertem Wasser waschen

Transfer der DNA auf Nylonmembran

- Hybond H⁺ Nylonmembran (Amersham Biosciences) passend zurechtschneiden und in destilliertem Wasser inkubieren, dann Gel auf die Membran in eine Vakuumapparatur legen, Ränder luftdicht abschließen
- Gel mit 0,25 M HCl bedecken, für 5 min Vakuum anlegen
- 0,25 M HCl erneuern, für weitere 20 min Vakuum anlegen
- HCl absaugen, Gel mit Denaturierungspuffer bedecken, für 10 min Vakuum anlegen
- Denaturierungspuffer erneuern, dann für 2-3 h bei 55 mBar Vakuumtransfer der DNA auf die Membran
- Gel verwerfen, Membran 10 min mit 2x SSC waschen, dann UV-Behandlung (UV crosslinking) der DNA-Seite des Filters mit dem Stratagene UV-Linker (700 Joule)

Sondenherstellung

- 50 ng Sonden-DNA (über PCR generiert, aufgereinigt), ad 9 µl mit ddH₂O
- 7 min bei 95°C aufkochen, auf Eis geben, dann folgende Reagenzien hinzugeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren:
 - 3 µl 0,5 mM dNTP-Mix ohne dCTP
 - 2 µl Random Hexamere (Amersham), 50 U in 800 µl Reaktionspuffer
 - 1 µl Klenow (Roche), 2 u/µl
 - 5 µl α-[³²P]dCTP, 10 µCi/µl (Hartmann Analytic)
- Aufreinigung über illustra Microspin G-50 Säulen (GE Healthcare)

Hybridisierung

- Membran mit Prähybridisierungspuffer in Glasröhre über Nacht bei 65°C inkubieren
- Radioaktiv markierte Sonde 5 min aufkochen, dann in 5 ml Hybridisierungspuffer (auf 65°C vorgewärmt) geben, Membran über Nacht bei 65°C hybridisieren

- Membran mit Waschpuffer mehrmals je 30 min bei 65 °C waschen
- Filter in Plastikfolie einschweißen, Film auflegen und mehrere Tage bei –80 °C exponieren
- Film entwickeln und auswerten

Pufferlösungen

Denaturierungspuffer:	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
20x SSC:	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat
Prähybridisierungspuffer:	1 M NaCl 1 % Na-Pyrophosphat 50 mM TRIS/Cl pH 7,5 0,2 % BSA 0,2 % Ficoll 400 0,2 % Polyvinylpyrrolidon 1 % SDS 5 mM EDTA Steril filtrieren und bei 37 °C aufbewahren
Hybridisierungspuffer:	4x SET 1 % SDS 1 % NaPP (Na-Pyrophosphat) 0,5 mg/ml Heparin
10x SET:	150 mM NaCl 2 mM EDTA 30 mM Tris/Cl pH 7,4
Reaktionspuffer :	0,5 M Tris 0,1 M MgCl ₂ 1 mM DTE 2 mg/ml BSA
Waschpuffer:	2x SSC mit 1 % SDS

2.8. RNA-basierte Methoden

2.8.1. Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben

Gesamt-RNA aus Zellen wurde standardmäßig mit dem illustra RNAspin Mini Kit (GE Healthcare) entsprechend dem Herstellerprotokoll isoliert und mit DNase verdaut.

Die RNA aus differenzierten mesenchymalen Stammzellpellets wurden mit Trizol (Invitrogen) wie folgt isoliert:

- Zugabe von 1 ml Trizol zu 5-6 Zellpellets
- Gewebe mit Polytron Mixer (10.000 rpm) homogenisieren
- 5 min inkubieren
- 0,2 ml Chloroform zugeben, 15 sec stark schütteln
- 2-3 min bei RT inkubieren
- 15 min zentrifugieren (4°C, 12.000 g)
- Obere wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß geben, 0,5 ml Isopropanol dazugeben
- Vortexen, 10 min bei RT inkubieren
- 10 min zentrifugieren (4°C, 12.000 g)
- Überstand abnehmen
- 1 ml 75 % EtOH dazugeben, vortexen
- 5 min zentrifugieren (4°C, 7.000 g)
- Pellet trocknen lassen, in RNase-freiem Wasser resuspendieren
- DNase-Verdau mit dem DNA-free Kit (Ambion) entsprechend dem Herstellerprotokoll

Alle RNAs wurden anschließend spektrometrisch mit dem Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific) auf Reinheit und Konzentration getestet.

2.8.2. cDNA Synthese

Isolierte Gesamt-RNA wurde mit SuperScript III Reverse Transkriptase (Invitrogen) entsprechend folgendem Protokoll in cDNA umgeschrieben:

Oligo-Anlagerung:	50 mM Oligo dT	0,75 µl
	Random Hexamers	0,75 µl
	10 mM dNTP	1,0 µl
	RNA 100 ng - 1 µg	x µl
	ddH ₂ O	ad 13 µl

65°C	5 min
4°C	2 min

Reverse Transkription:	5 x 1st strand buffer	4 µl
	0,1 M DTT	1 µl
	RNase Out	1 µl
	ddH ₂ O	0,5 µl
	SS III 200 u/µl	0,5 µl

25°C	10 min
50°C	60 min
70°C	15 min

RNaseH-Verdau: + 1 µl RNase H
 37°C 20 min

Für den anschließenden Einsatz in qRT-PCRs wurden die cDNAs 1:3 oder 1:5 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt.

2.8.3. *In vitro*-Transkription

Für *in situ*-Hybridisierungen wurden mittels *in vitro*-Transkription RNA-Sonden hergestellt. Die entsprechenden DNA-Stücke wurden in den Vektor pSTBlue-1 kloniert und können aus dem linearisierten Vektor über die Promotoren SP6 und T7 in *sense*- oder *antisense*-Richtung in RNA transkribiert werden.

1 µg linearisierter Vektor
2 µl 10x Polymerase buffer (Megascript Kit, Ambion)
2 µl 10x DIG oder Fluorescein RNA labeling mix (Roche)
1 µl RNase Out (Invitrogen, 40 u/µl)
1 µl SP6 oder T7 Polymerase (Megascript Kit, Ambion)
ad 20 µl ddH₂O

- 2 Stunden bei 37°C inkubieren
- Zugabe von 2 µl TurboDNase (Megascript Kit, Ambion), 1 h 37°C.
- DNase mit 1 µl 0,5 M EDTA inaktivieren
- RNA fällen durch Zugabe von 1,3 µl 8 M LiCl und 70 µl EtOH; 1 h bei RT
- Abzentrifugieren, Pellet mit 75 % EtOH waschen, abzentrifugieren, Pellet trocknen und in 20 µl 1x SSC/50 % Formamid aufnehmen
- Qualität der Sondenumschreibung auf Agarosegel kontrollieren

2.9. Protein-basierte Methoden

2.9.1. Gewinnung von Proteinextrakten aus eukaryotischen Zellen

Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und dann im entsprechenden Volumen modifizierten RIPA-Puffer (100-300 µl/6-Well-Schale; ca. 500 µl/10 cm-Schale) abgekratzt und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurde das Zelllysat bei 13.000 rpm und 4°C für 20 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Falls notwendig, wurde mithilfe des BCA Protein Assay Kits (Pierce) die Proteinmenge bestimmt. Dazu wurden 5 µl Zelllysat mit 20 µl Lysispuffer verdünnt, 200 µl BCA-Reagenz (A:B = 50:1) dazugegeben, die Probe bei 37°C für 30 min

inkubiert und die Konzentration danach mit dem Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific) anhand einer Referenzkurve bestimmt.

Modifizierter RIPA-Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 8
150 mM NaCl
1 % NP-40
0,25 % Na-Deoxycholat
1 mM EDTA
Proteinase-Inhibitor-Mix G (Serva)

2.9.2. Western Blots

Western Blots wurden mithilfe des Novex MiniCell Systems (Invitrogen) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

SDS-PAGE Elektrophorese

- Proteinproben mit 5 µl 5x SDS Sample Buffer mischen
- Aufkochen bei 95°C, 3 min
- Polyacrylamidgel in der gewünschten Konzentration nach Protokoll (Sambrook et al., 1989) herstellen
- Proben auftragen, Elektrophorese bei 125 V, 35 mA für ca. 2 h

Western Blot

- PVDF-Membran zuschneiden, kurz in Methanol inkubieren
- Blot aufbauen: 3 Blottingpads, 3 Whatman 3M Papiere, Gel, Membran, 3 Whatman 3M Papiere, 3 Blottingpads, alles in 1x Transferpuffer/10 % MeOH getränkt. Blotten mit 125 mA, 25 V für 2,5 h

Detektion

- Geblottete Membran für 1 h blocken in Blocking-Solution (50 % Odyssey Blocking Solution/50 % TBS)
- Primären Antikörper in Blocking-Solution (50 % Odyssey Blocking Solution/50 % TBS-T) verdünnen (1:500-1:5000 je nach Antikörper), Membran über Nacht bei 4°C inkubieren
- 4x 5 min mit TBS-T waschen
- Sekundären Antikörper 1:10.000 in Blocking-Solution (50 % Odyssey Blocking Solution/50 % TBS-T) verdünnen, Membran 1 h bei RT inkubieren
- 4x 5 min mit TBS-T waschen
- Mit Odyssey Scanner (LICOR) auswerten

Puffer und Lösungen:

5x SDS Sample Buffer für WB:	0,225 M Tris / HCl pH 6,8 50 % Glycerol 5 % SDS 0,05 % Bromphenolblau 0,25 M DTT
10x Lämmli-Puffer (Laufpuffer):	0,25 M Tris / HCl pH 8,3 2,5 M Glycin 1 % SDS
10x Transfer-Puffer:	0,25 M Tris / HCl pH 8,3 2,5 M Glycin
10xTBS:	0,5 M Tris 1,5 M NaCl pH 7,5
TBS-T:	1xTBS mit 0,1 % Tween 20

2.9.3. Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)*Transfektion*

- Zellen U2OS in 6-8 15-cm-Zellkulturschalen aussäen
- Zellen mit Nucleofector-Kits (Lonza) laut Protokoll transfizieren (Programm X-01; je Schale 2 µg DNA pcDNA4/TO/SHOX-cDNA-Flag)
- 24 h nach Transfektion Medium ersetzen. 48 h nach Transfektion Beginn der ChIP

Crosslinking und Ernten der Zellen

- Pro IP werden 3-4 dichte (2×10^7 Zellen) 15-cm-Zellkulturschalen verwendet
- Crosslinking: 800 µl 37 % Formaldehyd/Schale (1 % Endkonzentration) tropfenweise ins Medium geben, 10 min bei RT schütteln
- Zugabe von 1,6 ml 2,5 M Glycin (0,125 M Endkonzentration) in ddH₂O/Schale; 5 min bei RT schütteln
- Zellen 2x mit kaltem PBS (Gibco) waschen
- 5 ml PBS zugeben, Zellen abkratzen, restliche Zellen nochmals in 3 ml PBS abkratzen
- 5 min zentrifugieren bei 1000 g, 4 °C
- Überstand verwerfen, Pellet in 1,5 ml Lysis-Puffer/Schale (750 µl/1x10⁷ Zellen) resuspendieren; 10 min auf Eis im Kühlraum inkubieren (Lysis-Puffer vor Gebrauch filtrieren und mit Protease-Inhibitor versetzen)

Sonifizierung

- Je 3 ml Zelllysate auf 15 ml-Reaktionsgefäße verteilen
- 9 Zyklen (1 Zyklus: 30sec ON, 60sec OFF) bei Sonifizierungsstärke 5 sonifizieren (Sonicator/Cell disruptor Model W185F; HeatSystems)
- Zelllysate vereinen, mischen und auf 2 ml-Reaktionsgefäße verteilen
- 1 min zentrifugieren bei 4°C, 10.000 rpm
- Überstände in neue Reaktionsgefäße geben
- 50 µl Input DNA als Kontrolle entnehmen und bis zur DNA-Aufreinigung bei -20°C lagern
- 20 µl Lysat mit 4 µl 5x Sample Buffer versetzen für Western Blot-Kontrolle (-20°C)
- 5 µl Lysat für BCA-Assay entnehmen

Immunopräzipitation

- BCA Protein Assay Kit (Pierce): Messung von 5 µl Lysat + 20 µl Lysis-Puffer, als Referenz 25 µl Lysis-Puffer verwenden; zu beidem je 200 µl BCA-Reagenz (A:B = 50:1) geben, 30 min 37°C, Konzentration mit dem Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific) bestimmen
- Pro IP werden 4 mg Protein eingesetzt werden:
- Pro IP werden 40 µl Beads (Ultralink immobilized Protein A/G Plus Beads, Pierce) 3x mit je 200 µl RIPA + Proteinase Inhibitor Mix G (Serva) gewaschen; die Beads werden jeweils 1 min bei 4.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen (Kühlraum)
- Je 4 mg Proteinlysate werden zur Preabsorption zu den gewaschenen Beads gegeben und 1 h bei 4°C rotiert
- Beads 1 min bei 4.000 rpm zentrifugieren, Überstand in neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß geben, Beads verwerfen
- Zu einer Probe 15 µl = 15 µg Anti-Flag Antikörper (Sigma) zugeben, zur anderen Probe 15 µg IgG aus Maus (Sigma; Negativkontrolle), beide Ansätze 1-2 h bei 4°C rotieren
- In der Zwischenzeit Beads für IP preabsorbieren:
- Pro IP je 40 µl Beads 3x mit 200 µl RIPA waschen
- Zugabe von 3 µg Salmon testis DNA (=75 ng/µl Beads)
- Zugabe von 4 µg BSA
- 40 µl RIPA-Puffer dazugeben, um das Volumen der Beads zu verdoppeln, 30 min bei 4°C rotieren
- Beads 2x mit 200 µl RIPA waschen
- 40 µl RIPA zugeben

- Preabsorbierte Beads zu den Proben geben und über Nacht bei 4°C rotieren
- Beads 1 min bei 4.000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Beads 3x mit je 1 ml Wash-Puffer waschen
- Beads 1x mit je 1 ml Final Wash-Puffer waschen

Elution und Reverse Crosslinking

- Zugabe von je 120 µl Elution Puffer zu den Beads, Elution der DNA von den Beads durch Schütteln (1000 rpm) für 15 min bei 30°C im Thermomixer
- Beads 3 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Überstand in neue 2 ml-Reaktionsgefäße überführen
- 20 µl jeder IP mit 4 µl 5x Sample Buffer versetzen für Western Blot (-20°C)
- Input-DNA auftauen und 400 µl TBS zugeben
- Zu Input-DNA und IPs je 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) geben und über Nacht bei 65°C schütteln (alle 5 min für 15 sec bei 800 rpm)

DNA-Aufreinigung

- Input: Zugabe von 400 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Roth)
- IP: Zugabe von 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Roth)
- Proben gut mischen und 10 min bei 1300 rpm bei RT zentrifugieren
- Überstand in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße und nochmals 400 µl bzw. 100 µl P/C/IA zugeben, mischen und zentrifugieren
- Überstand in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit vorgelegten 2,5 µl Glycogen (20 µg/µl, Fermentas) geben
- Zu Input 800 µl EtOH, zu IP 200 µl EtOH geben und mindestens 30 min bei -20°C fällen
- 10 min zentrifugieren bei 4°C und 13.000 rpm
- Pellets in 1 ml 80 % EtOH waschen und nochmals 5 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugieren
- Pellets trocknen und in 100 µl ddH₂O lösen, mit DNA-Konzentration photometrisch bestimmen
- Mit verschiedenen Primerkombinationen qPCRs durchführen

Puffer

Modifizierter RIPA-Puffer:	50 mM Tris-HCl pH 8
	150 mM NaCl
	1 % NP-40
	0,25 % Na-Deoxycholat
	1 mM EDTA

Lysis-Puffer:	50 mM Tris-HCl pH 7,5 140 mM NaCl 1 % Triton X-100 0,1 % Na-Deoxycholat 0,1 % SDS
Elution Buffer:	1% SDS 100mM NaHCO ₃
Wash-Puffer:	1% Triton X-100 0,1% SDS 20mM Tris-HCl pH 8 150mM NaCl 2mM EDTA pH 8
Final Wash-Puffer:	1% Triton X-100 0,1% SDS 20mM Tris-HCl pH 8 500mM NaCl 2mM EDTA pH 8

2.9.4. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Die spezifische Interaktion zwischen Proteinen und DNA wurde mithilfe von Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs) analysiert. Dazu wurden zunächst doppelsträngige DNA-Fragmente aus einzelsträngigen Oligonukleotiden, die die zu untersuchende Nukleotidsequenz beinhalten, hergestellt, und diese durch Anlagerung von α -[³²P]dCTPs an die DNA-Enden radioaktiv markiert.

Annealing

Je 5 μ l Oligonukleotid For und Rev (500 pmol)
5 μ l 10x PCR-Puffer
35 μ l ddH₂O

5 min bei 95°C kochen, dann langsam abkühlen lassen auf Raumtemperatur, um Einzelstränge zusammenzulagern. Einen Teil abnehmen und auf 0,2 pmol/ μ l verdünnen

Labeling

10 μ l Annealing Reaktion (= 2 pmol annealte Oligos)
2,5 μ l 10x PCR-Puffer
1,5 μ l MgCl₂
1 μ l dNTP-Mix (je 5 mM) ohne dCTP
3 μ l α -[³²P]dCTP, 10 μ Ci/ μ l (Hartmann Analytic)
2 μ l Taq-Polymerase
6 μ l ddH₂O

60 min bei 70°C inkubieren, abkühlen lassen und auf eine Endkonzentration von 20 fmol/μl verdünnen.

Die doppelsträngigen, radioaktiv markierten DNA-Fragmente wurden 10 min mit GST-aufgereinigten Proteinen in EMSA-Puffer inkubiert und die entstehenden DNA-Proteinkomplexe auf nativen SDS-Gele aufgetrennt (1 h, 100 V, 12 mAh; Laufpuffer 0,25x TBE). Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Gele getrocknet und die markierten DNA-Stücke mit einem Röntgenfilm detektiert.

10x TBE:	0,89 M Tris 0,89 M Borsäure 20 mM EDTA pH 8
EMSA-Puffer:	15 mM HEPES pH 7,5 60 mM 3 M NaCl 1 mM EDTA pH 7,5 0,05 % NP-40 7,5 % Glycerol 0,25 mg/ml BSA 4 mM –Spermidin 0,5 mM DTT 0,5 μg/100 μl Poly (dIdC)
Natives 5 % TBE-Polyacrylamidgel:	24,05 ml ddH ₂ O 0,75 ml 10x TBE 5 ml 30% Bis-/Acrylamid-Lösung 0,2 ml 10 % Ammoniumpersulfat 20 μl TEMED

2.10. Zellbasierte Methoden

2.10.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Zellen wurden standardmäßig bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen der Firma Greiner liegend kultiviert. Alle 2-4 Tage wurde der Mediumüberstand entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin von der Kulturflasche abgelöst. Die Zellen wurden anschließend in geeigneten Verdünnungen (1:4 bis 1:20) in frischem Medium ausgesät.

U2OS, NHDF	DMEM high Glucose mit 10 % FCS sowie Penicillin/Streptomycin
DF1	DMEM high Glucose mit 10 % FCS, 2 % Chicken Serum sowie Penicillin/Streptomycin

2.10.2. Transfektion verschiedener Zelllinien

Je nach Experiment wurden die verschiedenen Zelllinien mit unterschiedlichen Transfektionsreagenzien transfiziert. Verwendet wurden Lipofectamine 2000 (Invitrogen) sowie Cell Line Nucleofector Kit V und Human Dermal Fibroblast Nucleofector Kit (Lonza) nach Empfehlung der jeweiligen Hersteller.

2.10.3. Induktion von SHOX-Fusionsproteinen

SHOXa-WT und *SHOX-HM* wurden C-terminal oder N-terminal mit der Hormonbindedomäne des Glukokortikoidrezeptors (GR) oder des Östrogenrezeptors (ER) fusioniert und in pcDNA4/TO kloniert. Die genauen Vektorsequenzen sind im Anhang zusammengestellt. Alle Konstrukte wurden vor Verwendung sequenziert und in Western Blots auf Expression und korrekte Größe des Fusionsproteins getestet.

Die Konstrukte wurden in U2OS transfiziert. Acht Stunden nach Transfektion wurden Cycloheximid (Sigma, 10 µg/ml) und die entsprechenden Rezeptorliganden dazugegeben: Dexamethason (Sigma, 100 µM) für Glukokortikoidrezeptorfusionsproteine, Tamoxifen (Sigma, 1 µM) für Östrogenrezeptorfusionsproteine. 24 Stunden nach Transfektion wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Expressionslevel mittels qRT-PCR bestimmt.

2.10.4. Generierung monoklonaler Zelllinien

Die Generierung monoklonaler, induzierbarer *SHOX*-Knockdown-Zelllinien wurde entsprechend einer von Dr. Jan Mollenhauer, DKFZ Heidelberg, etablierten Methode durchgeführt, die auf dem Invitrogen Pol II- Block-iT RNAi System basiert. In einem ersten Schritt wird eine Parentalzelllinie etabliert und charakterisiert, in die dann in einem zweiten Schritt jedes gewünschte Konstrukt rekombiniert werden kann.

Für die Parentalisierung wurden U2OS-Zellen mit den Vektoren pPar2 (CMV-Promotor) oder pPar3 (EF1α-Promotor) transfiziert. Diese Vektoren integrieren in das Genom der transfizierten Zellen und kodieren für GFP, eine G418-Resistenz sowie einen TET-Repressor. 48 Stunden nach Transfektion wurde 300 µg G418/ml Medium dazugegeben und die Zellen über 14 Tage selektioniert. Zur Gewinnung von monoklonalen Linien wurden die Zellen dann abtrypsinisiert und die Zellsuspension so verdünnt, dass bei Aussaat von 100 µl Suspension in 96-Well-Platten rechnerisch eine Zelle pro Well vorliegt. GFP-positive Klone wurden expandiert, DNA daraus extrahiert (Kap. 2.7.1) und mittels Southern Blot (Kap. 2.7.6) überprüft, ob die Vektoren nur einmal ins Genom eingebaut wurden.

Um auf sogenannte „Leakiness“ zu testen, wurde in die Klone mit nur einer Einbaustelle in das Plasmid pDEST-TR-hcRed rekombiniert (Cotransfektion mit pOG44, codiert für Flp-Rekombinase; Selektion mit Hygromycin, 100 µg/ml). Bei korrektem Einbau des transfizierten Vektors wird die GFP-Expression in den Zellen unterbrochen. Der vom Parentalvektor exprimierte TET-Repressor unterbindet die Expression von hcRed. Durch Zugabe von Doxycyclin (500 ng/ml) wird der TET-Repressor inaktiviert und hcRed-Expression induziert. Für eine gute Zelllinie ist es essentiell, dass ohne Doxycyclin kein hcRed messbar ist. Die Zelllinien wurden daher mittels FACS (*fluorescence activated cell sorting*) auf Expression von GFP und hcRed in Abhängigkeit von Doxycyclin untersucht und die vielversprechendsten Parentalzelllinien für Rekombinationen mit mehreren induzierbaren *SHOX*-miRNA- und Kontroll-miRNA-Konstrukten ausgewählt (s. Tabelle 5). Wegfall der GFP-Expression wurde dort als Hinweis auf korrekte Rekombination angenommen.

Die neu rekombinierten, induzierbaren *SHOX*-Knockdown- und Kontroll-Zelllinien wurden mittels qRT-PCR auf *SHOX*-Expression in Abhängigkeit von Doxycyclinzugabe untersucht. Die verwendeten miRNA-Konstrukte wurden außerdem in transienten Transfektionen auf ihr Knockdown-Potential untersucht.

Da einige Krebszelllinien aufgrund von Mutationen die miRNA-Konstrukte nicht korrekt verarbeiten können (Kumar et al., 2007), wurden die verwendeten U2OS-Zellen außerdem mit pcDNA1.2-GW-LacZ-cDNA und pcDNA6.2-EMGFP-miRNA-control oder pcDNA6.2-EMGFP-miRNA-LacZ transfiziert. Nach 48 Stunden wurde mittels LacZ-Färbung überprüft, ob die verwendete miRNA-LacZ in den Zellen verarbeitet werden konnte und die LacZ-Expression beeinflusste. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, für 2 min in Fixierungslösung inkubiert, 4x mit PBS gewaschen und über Nacht in Färbelösung bei 37°C gefärbt. Die Zellen wurden erneut gewaschen und fotografiert.

Fixierungslösung:

37 % Formaldehyd	541 µl
25 % Glutaraldehyd	40 µl
PBS	ad 10 ml

Färbelösung:

X-Gal (100 mg/ml in Dimethylformamid)	100 µl
MgCl ₂ (2 M)	10 µl
K-Ferricyanid (500 µM in PBS)	100 µl
K-Ferrocyanid (500 µM in PBS)	100 µl
PBS	ad 10 ml

2.10.5. Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Chondrozyten

Humane fötale mesenchymale Stammzellen (MSC; 15. bis 22. Schwangerschaftswoche) wurden in Expansionsmedium vermehrt, bis ausreichend Zellen vorhanden waren (2×10^7 Zellen). Je 2×10^5 Zellen/Well wurden in je 200 μ l Differenzierungsmedium in 96-Well-Plates ausgesät, kurz bei 800 rpm zentrifugiert und bei 37°C/ 5 % CO₂/ 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. 2x pro Woche wurden 50 % des Mediums abgenommen und durch frisches Differenzierungsmedium ersetzt. Die sich differenzierenden Zellen bildeten nach wenigen Tagen Aggregate („Pellets“).

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils mehrere Pellets geerntet, sofort in Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur RNA-Isolierung gelagert. RNA wurde mit Trizol (Gibco) isoliert (s. Kap. 2.8.1), DNase-verdaut (DNAfree, Ambion) und zur cDNA-Synthese eingesetzt (Superscript III, Invitrogen). Quantitative Real-Time-PCR-Messungen für verschiedene Housekeeping-Gene (*ARF*, *Cyclophilin A*, *SDHA*), *SHOX*, *Collagen2A1* und *Collagen10A1* sowie potentielle SHOX-Zielgene wurden mit dem ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Expressionsdaten wurden auf die getesteten Housekeeping-Gene normalisiert.

Proben

- MSC 281 (fötal, 2x differenziert in Passage 6 und 9)
- MSC 279 (fötal, 1x differenziert in Passage 7)
- MSC 38 (fötal, 1x differenziert in Passage 4)
- MSC 269 (fötal, differenziert von Dr. Joyce Emons)

Alle Zellen wurden von Dr. Joyce Emons, Universität Leiden, erhalten.

Materialien

Expansionsmedium	Medium M199 basal (Gibco) 10 % FCS (Gibco) 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco) 5 mg/ml ECGF (Roche) 5000 u/ml Heparin (Biochrome AG)
Differenzierungsmedium	DMEM (Gibco) 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco) 40 μ g/ml Prolin (Sigma Aldrich) 50 mg/ml IST+ (BD Biosciences) 100 μ g/ml Natrium-Pyruvat (Gibco) 50 μ g/ml Ascorbin-2-Phosphat (Sigma Aldrich) 10 ⁻⁷ M Dexamethason (Sigma Aldrich) 10 ng/ml TGF β 3 (Promokine) 500 ng/ml BMP6 (R&D Systems)

2.10.6. Luciferase-Reportergen-Assays

In Luciferase-Reportergen-Assays wurden DNA-Bereiche *upstream* verschiedener SHOX-Zielgene vor eine Firefly-Luciferase in die Vektoren pGL3basic oder pGL3promoter kloniert. Durch Messung der Luciferaseaktivität nach Transfektion der Konstrukte in Zellen in Abhängigkeit von SHOX lassen sich so Aussagen über das Regulationspotential des untersuchten DNA-Stückes treffen. Verwendet wurde das Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) entsprechend folgendem Protokoll:

- U2OS oder NHDF wurden in 24-Well-Plates ausgesät und transfiziert; alle Transfektionen wurden in Triplikaten durchgeführt
- Ansatz je Well:
 - 100 µl Optimem
 - 2 µl Lipofectamine 2000
 - 200 ng pcDNA4/TO/SHOX-cDNA (*SHOXa* Wildtyp, *SHOXa* Y141D, *SHOXa* R168W)
 - 200 ng pGL3basic oder pGL3promoter mit verschiedenen DNA-Stücken *upstream* von SHOX-Zielgenen
 - 100 ng pRL-TK Renilla Luciferase als Transfektions- und Normalisierungskontrolle
- Nach 4-6 h Mediumwechsel
- 24 h nach Transfektion Zellen mit PBS waschen, dann mit 80 µl/Well PLB (Passive Lysis Buffer, Promega) 20 min bei RT lysieren, mind. 2 h bei -80 °C einfrieren und anschließend Luciferaseaktivität in 50 µl des Zellextrakts mit dem Luminometer Lucy2 (Anthos) laut Herstellerangaben messen.
- Normalisierung der Fireflyaktivität auf die Renillaaktivität
- Vergleich des Effektes verschiedener SHOX-Transkripte auf unterschiedliche DNA-Bereiche

2.10.7. Herstellung von RCAS-Viren

Grundlagen

RCASBP-Viren (Replication-Competent avian leukemia virus long terminal repeat (LTR) with a Splice acceptor, Bryan high titer polymerase) bieten die Möglichkeit, jedes gewünschte Gen in Hühnerembryonen zu exprimieren (Bronner-Fraser, 1996). Im Vergleich zu Elektroporationen bietet diese Methode den Vorteil, dass sich die Viruspartikel selbständig um die Injektionsstelle ausbreitet und damit zu gleichmäßigerer und weitläufigerer Überexpression führt. In dieser Arbeit wurden folgende, von Dr. Jochen

Hecht, MPI für Molekulare Genetik, Berlin, zur Verfügung gestellte Viruskonstrukte verwendet:

- RCASBP(A)[5' 3xFLAG-GgShox]
- RCASBP(B)-GFP

Virusherstellung

Für die Virusproduktion wurden die fertigen RCAS-Plasmidkonstrukte mit Lipofectamine 2000 in DF1-Zellen (Hühnerfibroblasten) transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden expandiert, bis je Konstrukt insgesamt 6 15-cm-Zellkulturschalen 100 % konfluent waren. Zur Virusernte wurden die Zellen in 13 ml Harvesting Medium/Schale kultiviert. Nach jeweils 24, 48 und 72 h wurde der mit dem Virus angereicherte Mediumüberstand abgenommen und in Stickstoff eingefroren.

Expansionsmedium	DMEM (Gibco) 10 % FCS (Gibco) 2 % Chicken Serum (Sigma) 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco)
Harvesting Medium	DMEM (Gibco) 1 % FCS (Gibco) 0,2 % Chicken Serum (Sigma) 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco)

Virusaufkonzentrierung

Vor der Aufkonzentrierung des Virus wurde der Überstand über einen Glasfaser-Vorfilter und anschließend über einen Filter mit 0,45 µm Porengröße aufgereinigt. Der Durchfluss wurde in einer Beckmann Ultrazentrifuge bei 22.000 rpm (Rotor SW32Ti) für 3 h bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand dann abgegossen und das Pellet in dem im Zentrifugenbecher verbliebenen Medium 30 min auf Eis geschüttelt. 25 µl-Aliquots wurden bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren.

Virustest/Virustiterbestimmung

Die Konzentration und Funktion des Virus wurde mittels Immunfärbung und qRT-PCR überprüft. Für die Immunfärbungen wurden DF1-Zellen mit einer Verdünnungsreihe des aufkonzentrierten Virus infiziert. Nach 48 h wurden mit dem AMV-3C2-Antikörper und dem Vectastain ABC-Kit PK-6200 (Vector Laboratories) nach Herstellerangaben die RCAS-infizierten Zellen gefärbt und darüber der Virustiter berechnet. Die Konzentration sollte für Hühner-Micromass-Kulturen mindestens 10^7 Viruspartikel/ml, für Infektionen von Hühnerembryonen mindestens 10^8 Viruspartikel/ml betragen. Für qRT-PCRs wurde aus

infizierten DF1-Zellen nach 48 h RNA gewonnen und in der entsprechenden cDNA die Expression von SHOX getestet.

2.11. Tierexperimentelle Methoden

2.11.1. Gewinnung von Hühnerembryonen

Zur Gewinnung von Hühnerembryonen wurden befruchtete Hühnereier (Lohmann Tierzucht) bei 38°C/60 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator (Grumbach) bebrütet. Die Eier wurden während dieser Zeit regelmäßig gewendet. Zum gewünschten Zeitpunkt wurden die Eier geöffnet und die Embryonen entnommen und fixiert. Für *Whole Mount in situ*-Hybridisierungen wurden die Eier über Nacht bei 4°C mit 4 % PFA in PBS fixiert, dann über eine Methanolreihe (25 %, 50 %, 75 %, 2x 100 %) dehydriert und bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert. Embryonen für Kryoschnitte wurden über Nacht bei 4°C fixiert (4 % PFA, 11 % Saccharose in PBS) und dann für 24 – 48h bei 4°C dehydriert (25 % Saccharose in PBS). Anschließend wurden sie mit Tissue freezing medium eingebettet und bei -80°C gelagert. Mittels Kryotom (Leica) wurden 12-16 µm dicke Kryoschnitte angefertigt.

2.11.2. *In situ*-Hybridisierung von Hühnerembryonen

Whole Mount in situ-Hybridisierungen (WISH)

- Rehydrierung der Embryonen durch Methanolreihe
- 3x 5 min mit PBS-T waschen
- Proteinase-K-Behandlung: 10 µg/ml Proteinase in PBS-T für 15-45 min
- Kurz waschen mit 2 mg/ml Glycin in PBS-T
- 3x 5 min mit PBS-T waschen
- 15 min fixieren mit 4 % PFA in PBS-T
- 3x 5 min mit PBS-T waschen
- 3 min waschen mit 50 % PBS-T/50 % Hybridisierungspuffer
- 3 min waschen mit Hybridisierungspuffer
- 1 h inkubieren mit Hybridisierungspuffer bei 65°C
- 3 h inkubieren mit 900 µl Hybridisierungspuffer bei 65°C
- 1 µl RNA-Sonde in 99 µl Hybridisierungspuffer geben, kurz aufkochen, auf Eis abkühlen und zu den Embryonen geben
- Über Nacht bei 70°C hybridisieren
- 2x 30 min waschen mit Hybridisierungspuffer bei 70°C

- 5 min waschen in 800 µl Hybridisierungspuffer bei 70 °C, 3x im Abstand von jeweils 5 min Zugabe von 400 µl 2x SSC pH 4,5
- 2x 30 min waschen mit 2x SSC pH7/0,1% CHAPS bei 70 °C
- 2x 10 min waschen mit MAB-T bei RT
- 2x 30 min waschen mit MAB-T bei 70 °C
- 2x 10 min waschen mit PBS-T bei RT
- 1x 5 min waschen mit PBS-T bei RT
- Embryonen 2 h mit Blocking Reagenz ohne Antikörper bei 4 °C leicht schütteln
- Anti-Digoxigenin- oder Anti-Fluorescein-Antikörper 1:10.000 in Blocking Reagenz verdünnen, 2 h bei 4 °C leicht schütteln
- Antikörpermix zu Embryonen geben, über Nacht bei 4 °C inkubieren
- Embryonen 5x 45 min mit 0,1 % BSA/PBS-T waschen
- 2x 30 min mit PBS waschen
- 2x 10 min mit AP1 waschen
- Embryonen mit BM-Purple Färbelösung (Roche) im Dunkeln bei RT oder 4 °C inkubieren, bis die gewünschte Färbeintensität erreicht ist.
- Gründlich mit PBS-T waschen, fotografieren
- Neben kompletten Embryonen können auch Hühner-Micromass-Kulturen sowie 100 µm Vibratom-Schnitte mit diesem Protokoll gefärbt werden.

Puffer und Lösungen WISH

1x PBS (RNase-frei):	137 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,7 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
1x PBS-T (RNase-frei):	1x PBS mit 0,1 % Tween-20
20x SSC (RNase-frei):	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7
1x MAB:	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl pH 7,5
MAB-T:	1x MAB mit 0,1 % Tween-20
Blocking Reagenz (RNase-frei):	10 % Pferdeserum (hitzeinaktiviert) 1 % Boeringer Blocking Reagenz (BBR) In PBS-T

AP1-Puffer: 100 mM Tris pH 9,5
100 mM NaCl
50 mM MgCl₂

Hybridisierungspuffer (RNase-frei): 1 % BBR
50 % Formamid
1 mg/ml Torula-RNA
100 µg/ml Heparin
0,1 % Tween-20
0,1 % CHAPS
5 mM EDTA
In 5x SSC

In situ-Hybridisierungen auf Kryoschnitten (Schnitt-ISH)

- Objektträger auftauen, bei 50 °C trocknen lassen
- 20 min mit 4 % PFA in PBS-T fixieren
- 2x 5 min waschen mit PBS
- Proteinase-K-Behandlung: 5 µg/ml Proteinase K in PBS, 6 min
- 1x 5 min waschen mit PBS
- 15 min mit 4 % PFA in PBS-T fixieren
- 1x kurz in DEPC-Wasser waschen
- Acetylierung: 10 min auf Schüttler waschen mit 0,25 % Essigsäureanhydrid in 0,1 M Triethanolamin-HCl pH 8
- 1x 5 min waschen mit PBS
- Metallbox für Hybridisierung vorbereiten: Papiertücher mit Boxpuffer tränken und auf dem Boden der Metallschale auslegen
- In Metallbox: Schnitte 3 h mit Hybridisierungspuffer prähybridisieren bei 65 °C
- Je Objektträger 0,5 µl unverdünnte RNA-Sonde in 500 µl Hybridisierungspuffer geben, Schnitte damit über Nacht bei 68 °C hybridisieren
- 15 min waschen mit 2x SSC bei 65 °C
- 5 min waschen mit 2x SSC bei RT
- RNase-Behandlung: 10 µg/ml RNASE A und 1 U/ml RNase T1 in 2x SSC, 40 min 37 °C
- 2x 5 min waschen mit 2x SSC bei RT
- 2x 5 min waschen mit 0,2x SSC bei 65 °C
- 1x 5 min waschen mit 0,2x SSC bei RT
- 2x 20 min waschen mit PBT bei RT
- 1 h Blocken mit 10 % Pferdeserum in PBT
- Anti-Digoxigenin-Antikörper 1:2000 in 10 % Pferdeserum in PBT verdünnen, über Nacht bei 4 °C inkubieren

- 3x 20 min waschen mit PBT bei RT
- 2x 5 min waschen mit Alkaline Phosphatase-Puffer (AP-Puffer)
- NBT/BCIP (Roche) 1:100 in AP-Puffer verdünnen, auf Schnitte geben, im Dunkeln bei RT oder 4°C inkubieren, bis die gewünschte Färbeintensität erreicht ist.
- Gründlich in PBS waschen
- 15 mit 4 % PFA in PBS-T postfixieren
- Mit Kaiser's Glycerolgelatine (Merck) einbetten, fotografieren

Puffer und Lösungen Schnitt-ISH

Boxpuffer:	50 % Formamid 5x SSC
PBT:	1x PBS 2 mg/ml BSA 0,1 % Triton X-100
AP-Puffer:	100 mM Tris pH 9,5 50 mM MgCl ₂ 100 mM NaCl 0,1 % Tween-20

PBS, PBS-T, 20x SSC, Hybridisierungspuffer: siehe Protokoll WISH oben

2.11.3. RCAS-Infektion von Hühnerembryonen

Für RCAS-Infektionen wurden pathogen-freie Hühnereier verwendet und entsprechend Kap. 2.11.1 bebrütet. Die Eier wurden nach 1,5 oder 3,5 Tagen Brut geöffnet und mit dem Virus infiziert, das Loch in der Schale wurde mit Klebeband verschlossen und die Embryonen bis Tag 5,5 weiter bebrütet.

Bei 1,5 Tage alten Embryonen (HH-Stadium 11-12) wurden jeweils 0,1-1 µl 1:1-Mischung von RCAS(A)-SHOX und RCAS(B)-GFP in das rechte Lateralmesenchym injiziert, das sich später zu Hinterbeinen entwickelt. Die 3,5 Tage alten Embryonen (HH-Stadium 21-22) hatten bereits Gliedmaßenanlagen ausgebildet, so dass 0,1-1µl 1:1-Mischung von RCAS(A)-SHOX und RCAS(B)-GFP direkt in den sich entwickelnden rechten Flügel injiziert wurde. Die unbehandelten Gliedmaßen jedes Embryos dienen als interne Kontrolle.

Die Infektion und die Reaktion von Zielgenen auf die SHOX-Überexpression wurde mittels *in situ*-Hybridisierungen von *SHOX* und SHOX-Zielgenen sowie qRT-PCR kontrolliert. Für einige Embryonen wurden Doppel-WISH für *SHOX* und *FGFR3* oder *RUNX3* durchgeführt, andere wurden mit dem Vibratom geschnitten und dann mit dem WISH-

Protokoll gefärbt. Für qRT-PCRs wurden die infizierten und uninfizierten Gliedmaßen abgetrennt, Gesamt-RNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben, in der dann die Expression von *SHOX* und verschiedenen *SHOX*-Zielgenen gemessen wurde.

2.11.4. Hühner Micromass-Kulturen

- 30-50 Hühnereier bis Tag 4,5 (HH-Stadium 24) bebrüten
- Eier öffnen, Embryonen herausnehmen
- Alle vier Gliedmaßen der Embryonen abtrennen; in PBS bei RT aufbewahren, bis alle isoliert sind, in 2 ml-Reaktionsgefäß überführen
- Gliedmaßen 2x mit warmen HBSS (Hanks Balanced Salt Solution, Gibco) waschen
- 15 min mit Dispase (Gibco) in HBSS (3 mg/ml, 250 µl) bei 37°C inkubieren, alle 2 Minuten kurz mischen
- Mehrfach mit warmen HBSS waschen, bis das Ektoderm vollständig entfernt ist
- 30 min mit Digestion Solution bei 37°C verdauen
- In 50 ml-Reaktionsgefäß überführen, Gliedmaßen durch Pipettieren vollständig suspendieren
- 10 ml chMM-Medium dazugeben
- Suspension durch 40 µm-Nylonsieb filtrieren, um Einzelzellsuspension zu erhalten, Sieb mit 10 ml chMM-Medium waschen
- Zellen zählen (1:100 Verdünnung)
- Zellen pelletieren (5 min zentrifugieren, 1000 rpm, RT), mit chMM-Medium auf eine Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml resuspendieren
- Falls gewünscht, RCAS-Virus zu den Zellen geben (1 RCAS-Aliquot 25 µl pro 240 µl Zellen)
- Je 10 µl Zellsuspension in 24-Well-Plates pipettieren, darauf achten, dass sich die Tropfen jeweils luftblasenfrei in der Mitte der Schale befinden
- 2 h bei 37°C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit inkubieren
- Vorsichtig 1- 2 ml chMM-Medium dazugeben; danach alle 2 Tage Medium wechseln
- Zu gewünschten Zeitpunkten Kulturen für Färbungen fixieren oder für qRT-PCR RNA isolieren

Digestion Solution: 0,1 % (w/v) Collagenase type Ia (Sigma)
0,1 % (w/v) Trypsin (Gibco)
5 % FCS
In PBS angesetzt

chMM-Medium: DMEM/HAM'S F12
 10 % FCS
 0,2 % Chicken Serum
 1 % L-Glutamin
 Penicillin/Streptomycin

Whole Mount in situ-Hybridisierungen Hühner Micromass-Kulturen

Die Micromass-Kulturen wurden für 30-60 min bei Raumtemperatur mit 4 % PFA in PBS fixiert, über eine Methanolreihe dehydriert und bis zum Beginn der WISH bei -20°C gelagert. Die WISH wurde entsprechend dem Protokoll für Hühnerembryonen durchgeführt (s. Kapitel 2.11.2).

Alcianblau-Färbung Hühner Micromass-Kulturen

Die Micromass-Kulturen wurden mit PBS gewaschen und mit Kahles Fixierlösung für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Kulturen mit PBS gewaschen und mit einer 0,05 %igen Alcianblau-Lösung (0,05 % Alcianblau in 0,1 M HCl) für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Färbelösung abgenommen und die Kulturen mit destilliertem Wasser gewaschen bis sich kein Alcianblau mehr herauslöste. Die Kulturen wurden vor und nach dem Trocknen fotografiert. Danach erfolgte eine Quantifikation der Alcianblau-Inkorporation mittels Inkubation von 800 µl 6 M Guanidin-HCl für 24 h. Die Absorption des Überstands wird photometrisch bei 600 nm bestimmt. Über eine Standardkurve kann die enthaltene Menge Alcianblau berechnet werden.

Kahles Fixierlösung

150 ml EtOH (30 %)
50ml PFA 4 % (0,4 %)
20m Eisessig (4 %)
Ad 500 ml ddH₂O

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung einer stabilen, induzierbaren SHOX-Knockdown-Zelllinie

3.1.1. Theoretischer Hintergrund

Frühere Experimente zur Identifikation von SHOX-Zielgenen wurden vor allem in induzierbaren, stabilen *SHOX*-Überexpressionszelllinien durchgeführt. Da dieser Ansatz einige methodische Nachteile birgt, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein weiteres Zellsystem zur Identifikation neuer SHOX-Zielgene etabliert werden. Hierfür wurde ein Knockdown-Ansatz gewählt, um unspezifische Effekte zu vermeiden, wie sie bei Überexpression von Transkriptionsfaktoren auftreten können. Um *SHOX* in möglichst allen Zellen gleichzeitig herunterzuregulieren, wurde ein stabiles, über einen TET-Repressor induzierbares System Experimenten mit transienter Überexpression der Transkriptionsfaktoren vorgezogen, da bei diesen die Transfektionseffizienz eine große Rolle spielt und die Ergebnisse stark beeinflussen kann. Die Generierung einer monoklonalen, induzierbaren *SHOX*-Knockdown-Zelllinie wurde entsprechend einer von Dr. Jan Mollenhauer, DKFZ Heidelberg, etablierten Methode durchgeführt, die auf dem Invitrogen Pol II- Block-iT RNAi System basiert. In einem ersten Schritt wird eine Parentalzelllinie etabliert und charakterisiert, in die dann in einem zweiten Schritt jedes gewünschte miRNA- oder cDNA-Konstrukt rekombiniert werden kann. Für die Methode wurden U2OS-Zellen (Osteosarkoma-Zellen) verwendet, da diese Zelllinie eines der wenigen Zellsysteme ist, in dem endogenes *SHOX* auf in qRT-PCRs nachweisbarem Level exprimiert wird.

3.1.2. Etablierung und Charakterisierung der Parentalzelllinien

U2OS-Zellen wurden mit den Parentalvektoren pPar2 oder pPar3 transfiziert, welche für GFP codieren und eine Sequenz enthalten, mit der die Tochtervektoren rekombinieren können. Zusätzlich exprimieren sie einen TET-Repressor. Nach dreiwöchiger G418-Selektion waren von insgesamt 72 untersuchten U2OS-Einzelklonen 51 GFP-positiv, was auf einen Einbau des Parentalvektors in einen transkriptionell aktiven Chromosomenbereich schließen lässt. Von diesen 51 Klonen ließ sich aus 44 ausreichend DNA für einen Southern Blot gewinnen, der die Bestimmung der Einbauhäufigkeit des Vektors ermöglicht. In Abb. 9 ist beispielhaft das Ergebnis eines Southern Blots gezeigt. Um negative Hintergrundeffekte zu vermeiden, die durch mehrere Einbauereignisse auftreten können, werden nur Klone in Betracht gezogen, die eine einzelne Kopie des Parentalvektors in ihr Genom rekombiniert haben. Dies war bei 16 Klonen mit dem Parentalvektor pPar2 und fünf Klonen mit pPar3 der Fall.

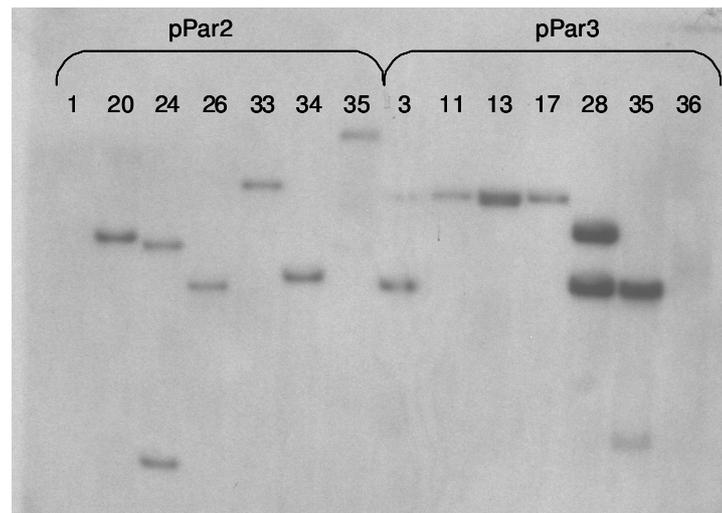


Abb. 9: Southern Blot einiger getesteter Parentalzellklone.

Klone pPar2-20, -26, -33, -34, -35, pPar3-11 und -17 zeigen nur eine Bande und haben daher vermutlich nur eine Kopie des Parentalvektors eingebaut. Bei pPar3-13 ist ebenfalls nur eine Bande sichtbar. Diese ist jedoch im Vergleich zu den Banden der anderen Klone deutlich stärker; möglicherweise sind mehrere Kopien des Parentalvektors tandemartig an die gleiche Stelle rekombiniert.

Insgesamt 13 der Klone mit nur einem Einbau des Parentalvektors wurden mittels Rekombination mit einem durch Doxycyclin induzierbaren hcRed-Konstrukt auf korrekte Expression nach Doxycyclinzugabe getestet. Dazu wurden die Klone mit pDEST-TR-hcRed und pOG44 transfiziert. pOG44 codiert für eine Flp-Rekombinase, die hcRed in allen Klonen in den integrierten Parentalvektor einbaut. Im Promotor vor hcRed befindet sich eine TET-Repressor-Bindestelle, die Expression von hcRed wird in Abwesenheit von Doxycyclin durch den in der Parentalzelllinie exprimierten TET-Repressor verhindert. Die Zugabe von Doxycyclin führt zu einer Konformationsänderung des TET-Repressors, der daraufhin nicht mehr an den Promotor binden kann und die hcRed-Expression nicht mehr inhibiert. Nach erfolgreicher Rekombination und Selektion wurden die erhaltenen hcRed-Tochterzelllinien, die mit bzw. ohne Doxycyclin behandelt worden waren, sowie die dazugehörigen unrekombinierten Parentalzelllinien mittels FACS-Analyse auf die Expression von GFP und hcRed untersucht. Eine „gute“ Parentalzelllinie ist dadurch charakterisiert, dass ohne Rekombination in allen Zellen GFP detektiert wird, während die rekombinierten Tochterzelllinien kein GFP zeigen. HcRed sollte in den Tochterzellen nach Doxycyclinzugabe in allen Zellen vorhanden sein, während ohne Doxycyclin der TET-Repressor die Expression komplett unterdrücken sollte. Eine hcRed-Expression ohne Doxycyclinzugabe deutet auf eine undichte („leaky“) Zelllinie hin.

Für neun der 13 Parentalklone konnten hcRed-Rekombinanten etabliert werden. Von diesen neun rekombinanten Zelllinien zeigten vier (pPar2-9, -13, -31, -33) das oben beschriebene, gewünschte Ergebnis in der FACS-Analyse. Die Auswertung für Klon pPar2-9 ist exemplarisch in Abb. 10 dargestellt. Ohne Doxycyclinzugabe ist kein hcRed

messbar (roter Peak links in Abb. 10E), während nach Induktion durch Doxycyclin eine einheitliche Population hcRed-positiver Zellen vorliegt (Abb. 10F). Die vier oben genannten, vielversprechenden Parentalzelllinien wurden daher für weitere Rekombinationen mit verschiedenen *SHOX*- und Kontroll-miRNAs ausgewählt.

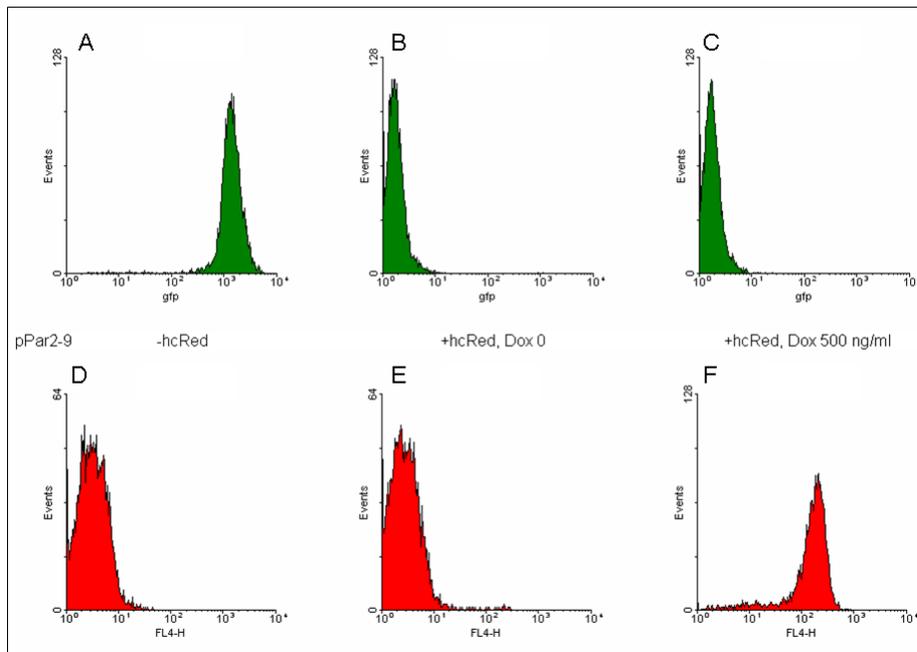


Abb. 10: FACS-Ergebnisse für Klon pPar2-9.

Die GFP-positiven Zellen sind als grüne Peaks dargestellt (A-C), hcRed-positive als rote Peaks (D-F). X-Achse: Signalintensität. Y-Achse: Zellanzahl. (A)+(D), (B)+(E) sowie (C)+(F) zeigen jeweils identische Zellpopulationen. (A, D) Der Parentalklon exprimiert GFP, aber kein hcRed. (B, E): Nach hcRed-Rekombination sind weder GFP noch hcRed messbar. (C, F): Bei Zugabe von Doxycyclin wird die hcRed-Expression induziert, während GFP nicht nachweisbar ist.

3.1.3. Rekombination der Parentalzelllinien mit *SHOX*- und Kontroll-miRNAs

Die Parentalzelllinien pPar2-9, -13, -31 und -33 wurden mit den in Tabelle 5 aufgelisteten pre-miRNAs (mit Ausnahme von LacZ) transfiziert, die in den durch Doxycyclin induzierbaren Vektor pDEST-TR kloniert wurden, und drei Wochen durch Hygromycinzugabe auf Rekombinanten selektioniert. pDEST-TR enthält neben den pre-miRNAs zusätzlich die notwendigen DNA-Sequenzen für die Rekombination in den Parentalvektor sowie eine TET-Repressor-Bindestelle. Der Wegfall der GFP-Expression wurde als Hinweis auf korrekte Rekombination in den Parentalvektor angenommen. Die miRNA-Rekombinanten wurden 48 h mit bzw. ohne Doxycyclin kultiviert, dann wurde die RNA isoliert, cDNA synthetisiert und mittels qRT-PCR analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass bei fast allen *SHOX*-miRNA-Klonen das endogene *SHOX*-Level sehr nah an der Nachweisgrenze lag.

Aus diesem Grund war eine zuverlässige Analyse des Knockdowns der *SHOX*-miRNA-Zelllinien nur schwer möglich und die erhaltenen Daten nicht reproduzierbar.

In Kontrollexperimenten wurden *LMNA*-miRNA-Rekombinanten generiert. *LMNA* (*Lamin A*) ist ein Housekeeping-Gen, dessen Expression durch die verwendeten *LMNA*-miRNA-Konstrukte nach Induzierung zuverlässig herunterreguliert werden sollte. In den getesteten Zellen führte eine Doxycyclinzugabe allerdings nicht zur Abnahme der *LMNA*-Expression (qRT-PCR und Western Blot). Dies ist überraschend, da die verwendete *LMNA*-miRNA ein etabliertes Kontrollkonstrukt ist. Da einige Krebszelllinien aufgrund von Mutationen miRNA-Konstrukte nicht korrekt verarbeiten können (Kumar et al., 2007), wurden die verwendeten U2OS-Zellen in transienten Experimenten auf ihre Fähigkeit zur Verarbeitung von pre-miRNAs getestet.

3.1.4. Transiente Transfektion der *SHOX*-, Kontroll- und *LMNA*-miRNAs

U2OS wurden transient mit pcDNA1.2-GW-LacZ-cDNA und pcDNA6.2-EMGFP-miRNA-control oder pcDNA6.2-EMGFP-miRNA-LacZ transfiziert. Nach 48 h wurde mittels LacZ-Färbung gezeigt, dass die verwendete miRNA-LacZ die LacZ-Expression unterdrücken kann (Abb. 11). U2OS-Zellen haben demzufolge grundsätzlich keine Schwierigkeiten mit der Verarbeitung von miRNAs.

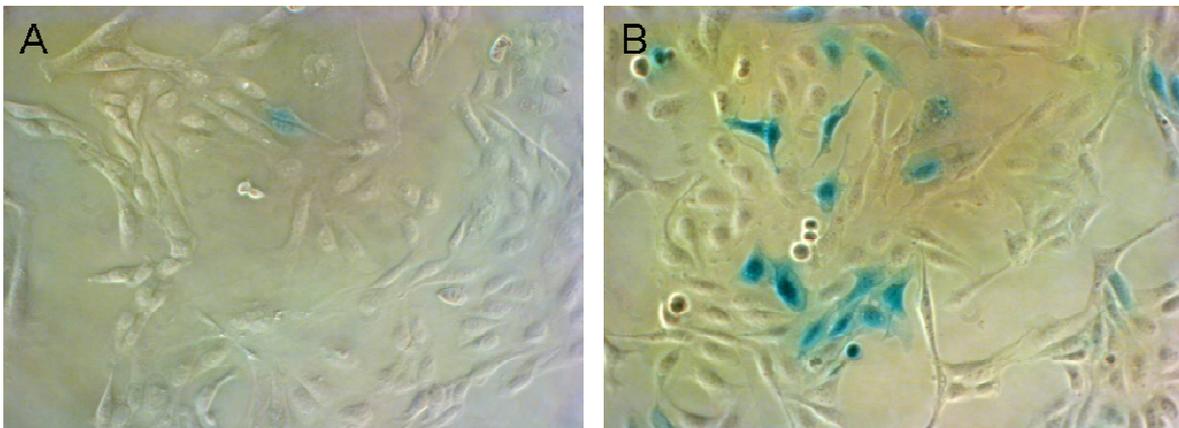


Abb. 11: LacZ-Färbung von U2OS Zellen.

(A) Transfektion mit LacZ-cDNA und LacZ-miRNA führt zu sehr schwacher LacZ-Expression (blaue Färbung).
(B) Transfektion mit LacZ-cDNA und scrambled-miRNA zeigt deutlich stärkere LacZ-Expression.

Die verwendeten *SHOX*- und *LMNA*-miRNA-Konstrukte wurden zusätzlich in transienten Transfektionen auf ihr Knockdown-Potential untersucht. Während *LMNA*-miRNA transient zu einer Herunterregulation von *LMNA* führt, hatten die verwendeten *SHOX*-miRNAs keinen Effekt auf die *SHOX*-Expression.

3.1.5. Rekombination der Parentalzelllinien mit SHOX-cDNA

Als weiteres Kontrollexperiment wurde *SHOX*-cDNA in den durch Doxycyclin induzierbaren Vektor pcDNA-TR kloniert und in die Parentallinien pPar2-9 und pPar2-13 rekombiniert. In qRT-PCR-Messungen stellte sich heraus, dass auch ohne Doxycyclin-Zugabe eine hohe *SHOX*-Expression vorhanden ist; das *SHOX*-Level war uninduziert im Vergleich zu den Parentalzellen bis zu 6000fach erhöht. Nach Doxycyclin-Induktion stieg die *SHOX*-Expression in den Tochterzelllinien nur um den Faktor 10. Der Unterschied der *SHOX*-Level zwischen Parentalzelllinie und uninduzierter Tochterzelllinie ist also um ein Vielfaches größer als zwischen uninduzierter und induzierter Tochterzelllinie.

Zusammengefasst zeigen die Kontrollexperimente, dass die getesteten *SHOX*-miRNAs die *SHOX*-Expression nicht beeinflussen und das induzierbare Zellsystem trotz der vorherigen Tests undicht ist. Zur Identifizierung neuer *SHOX*-Zielgene ist die transiente Knockdown-Zelllinie daher nicht geeignet.

3.2. Identifizierung neuer SHOX-Zielgene in transienten Zellkultur-experimenten

3.2.1. Microarray-Analyse nach SHOX-Überexpression in NHDF und U2OS

Da die oben beschriebene stabile *SHOX*-Knockdown-Zelllinie leider für weitere Experimente nicht verwendbar war, wurden in unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit Sebastian Bender und Dr. Stephan Wolf transiente *SHOX*-Überexpressionen in U2OS und NHDF durchgeführt (Bender *et al.*, in Vorbereitung). Neben pcDNA4/TO mit *SHOXa*-Wildtyp-cDNA (*SHOX-WT*) wurden als Kontrollen pcDNA4/TO mit *SHOXa*-Y141D-cDNA (*SHOX-HM*, funktionslose Homöobox-Mutante) oder der leere Vektor transfiziert. Die Genexpression nach 6, 12 und 24 h wurde mittels Microarray analysiert, um durch *SHOX* regulierte Gene zu finden. Die in den Microarrays am stärksten regulierten Gene sind in Tabelle A-D im Anhang zusammengefasst. In beiden Experimenten wurde *BNP*, das bereits als *SHOX*-Zielgen beschrieben ist (Marchini *et al.*, 2007a), als eines der am stärksten regulierten Gene gefunden; es ist daher davon auszugehen, dass der Versuchsansatz generell erfolgreich war.

In U2OS wurden zu allen Zeitpunkten vor allem positiv regulierte Gene gefunden, während in NHDF nach 6 und 24 h überwiegend negativ regulierte, nach 12 h mehr positiv regulierte Gene identifiziert werden. Ein weiterer Unterschied fällt bei der Anzahl der regulierten Gene auf: In U2OS sinkt ihre Zahl von frühen zu späteren Zeitpunkten, während in NHDF nach 24 h die meisten regulierten Gene gefunden werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von SHOX in der Gliedmaßenentwicklung näher analysiert werden, daher wurden für weitere Untersuchungen potentielle Zielgene ausgewählt, die in diesen Prozessen wichtige Funktionen übernehmen. Ein interessantes Zielgen stellte dabei *FGFR3* dar, das in mutierter Form unter anderem zu Achondroplasie führt (Horton et al., 2007). *FGFR3* ist zu den Zeitpunkten 12 h und 24 h nach der Transfektion sowohl in NHDF als auch in U2OS nach *SHOX-WT*-Überexpression stark hochreguliert (Tabelle 9). Neben *FGFR3* wurde *RUNX3* als potentielles Zielgen für weitere Untersuchungen ausgewählt. *RUNX3* spielt eine wichtige Rolle bei der Chondrozytendifferenzierung (Soung do et al., 2007) und ist wie *FGFR3* zu den Zeitpunkten 12 h und 24 h nach der Transfektion in beiden Zelllinien reguliert (Tabelle 9).

FGFR3	6h	12h	24h	RUNX3	6h	12h	24h
U2OS	1,4	3	4,9	U2OS	1,8	2,6	2,4
NHDF	1,7	7,1	10,5	NHDF	-1,2	1,8	3,6

Tabelle 9: Regulation von *FGFR3* und *RUNX3* in Microarrays nach *SHOX*-Überexpression.

3.2.2. ChIP-Seq

In unserer Arbeitsgruppe wurden von Sebastian Bender und Dr. Stephan Wolf ChIP-Seq-Experimente durchgeführt. Flag-*SHOX* wurde in U2OS und NHDF überexprimiert, und über Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) wurden DNA-Bereiche, an die SHOX gebunden ist, isoliert und sequenziert (Bender *et al.*, in Vorbereitung). Die dabei identifizierten Bindestellen zeigten nur wenige Überschneidungen mit den Daten der Überexpressions-Microarrays (Kapitel 3.2.1) und auch nur schwache Reproduzierbarkeit. Es wurden 5 *SHOX-WT*-ChIP-Experimente sequenziert, als Kontrollen außerdem ChIP-Experimente mit *SHOX-HM* und ChIP-Experimente ohne Antikörper. In einem der *SHOX*-ChIP-Experimente wurde eine Bindestelle 3,5 kb *upstream* von *FGFR3* gefunden (43 Reads, 3489 bp → 3429 bp vor Beginn Exon 1), die jedoch in weiteren ChIP-Seq-Experimenten nicht reproduziert werden konnte.

Für *RUNX3* wurde keine *SHOX*-Bindestelle im Bereich von 10 kb vor und nach dem Transkriptionsstart identifiziert.

3.3. Expression von *FGFR3* und *RUNX3* in menschlichen Geweben

In verschiedenen menschlichen Geweben wurde die Expression von *SHOX*, *FGFR3* und *RUNX3* mittels semiquantitativer PCR untersucht. Als Kontrolle wurde zusätzlich das Housekeeping-Gen *ARF1* gemessen.

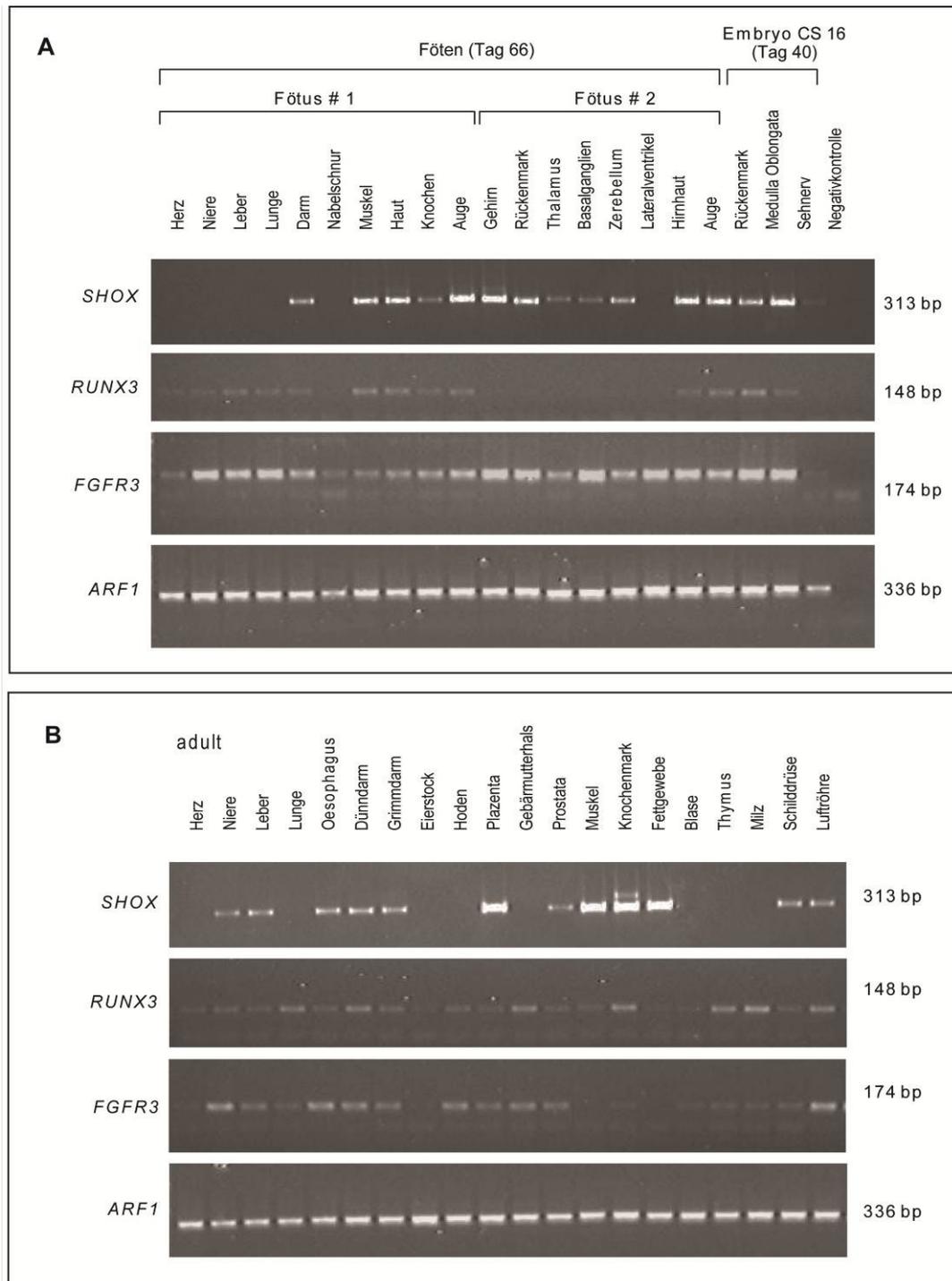


Abb. 12: Gewebespezifische Expression von *SHOX* und *SHOX*-Zielgenen. Semiquantitative PCR aus fötalem (A) und adultem (B) Gewebe nach 40 (*SHOX*) bzw. 35 (*FGFR3*, *RUNX3*, *ARF1*) Zyklen. Als Kontrolle wurde das Housekeeping-Gen *ARF1* gemessen.

In fötalem Gewebe ist *SHOX* vor allem in Muskeln, Haut, Knochen sowie in neuronalen Geweben exprimiert (Abb. 12A). *RUNX3* ist generell schwächer exprimiert und zeigt Coexpression mit *SHOX* in Muskel, Haut, Knochen und Auge. In embryonalen neuronalen Geweben sind sowohl *RUNX3* als auch *SHOX* exprimiert. *FGFR3* ist im Embryo und

Fötus ubiquitär exprimiert, die höchsten Expressionslevel finden sich in Niere, Leber, Lunge sowie neuronalem Gewebe.

In adultem Gewebe ist *SHOX* am stärksten in Plazenta, Muskel, Knochenmark und Fettgewebe exprimiert, schwächer in Niere, Leber und dem Verdauungstrakt. *RUNX3* ist in der Mehrzahl der getesteten Gewebe schwach exprimiert und zeigt im Verdauungstrakt und Knochenmark eine starke Coexpression mit *SHOX*. Auch *FGFR3* ist im Verdauungstrakt exprimiert, zusätzlich in den Geschlechtsorganen, der Niere und der Luftröhre (Abb. 12B). Beide getesteten potentiellen Zielgene zeigen demzufolge in einer Vielzahl von menschlichen Geweben verschiedener Altersstufen eine mit *SHOX* übereinstimmende Expression.

3.4. Experimentelle Verifizierung der putativen Zielgene FGFR3 und RUNX3

3.4.1. qRT-PCR nach SHOX-Überexpression

SHOXa-cDNA wurde in den Expressionsvektor pcDNA4/TO kloniert und in verschiedene Zellen transfiziert, was dort zu einer starken *SHOX*-Überexpression führte. Neben *SHOXa*-Wildtyp-cDNA (*SHOX-WT*) wurden in Negativkontrolllexperimenten pcDNA4/TO mit *SHOXa*-Y141D-cDNA (*SHOX-HM*, Homöobox-Mutation, gefunden in ISS-Patienten) sowie *SHOXa*-p.R168W-cDNA (*SHOX-DM*, Dimerisierungs-Mutation, gefunden in LWD-Patienten) oder der Leervektor ohne Insert verwendet. Für beide verwendeten Mutationen wurde in früheren Experimenten gezeigt, dass sie essentielle *SHOX*-Funktionen wie zum Beispiel Dimerisierung und DNA-Bindung nicht ausüben können (Schneider et al., 2005). In unabhängigen Kontrolllexperimenten zur Spezifität der Regulation wurde außerdem das *SHOX*-Paralog *SHOX2* in U2OS-Zellen überexprimiert.

Die im Microarray gefundene Hochregulation von *RUNX3* ließ sich in qRT-PCR-Experimenten bestätigen. In U2OS erhöht *SHOX-WT* im Vergleich zu den Negativkontrollen das *RUNX3*-Expressionslevel auf das Doppelte (6 h, 12 h und 48 h nach Transfektion), zum Zeitpunkt 24 h zeigt *RUNX3* mit 5fachem Anstieg die stärkste Regulation (Abb. 13A). Die Regulation von *RUNX3* ist in NHDF generell stärker als in U2OS; 3fach zum Zeitpunkt 12 h und 20fach nach 24 h (Abb. 13B). Die Überexpression von *SHOX2* in U2OS hatte keinen Einfluss auf die *RUNX3*-Expression (Daten nicht gezeigt).

In U2OS führt die Überexpression von *SHOX* zu einer starken Hochregulation von *FGFR3*. 6 h nach Transfektion ist noch keine Regulation sichtbar, während zum Zeitpunkt 12 h nach *SHOX-WT*-Überexpression eine 5fache Hochregulation von *FGFR3* im Vergleich zu *SHOX-HM*- und *SHOX-DM*-Überexpression gemessen wird. Am stärksten ist

die Hochregulation nach 24 h (14fach); die Werte für 48 h sind vergleichbar mit den nach 12 h gemessenen (Abb. 14A). In NHDF-Experimenten ist eine noch stärkere Hochregulation von *FGFR3* messbar. 12 h nach Transfektion ist *FGFR3* 11fach höher exprimiert, zum Zeitpunkt 24 h sogar 55fach (Abb. 14B). *SHOX2*-Überexpression hatte keinen Effekt auf das *FGFR3*-Expressionslevel (Daten nicht gezeigt). Die *FGFR3*-Daten der Microarrays konnten mittels qRT-PCR demzufolge ebenfalls durchgängig bestätigt werden.

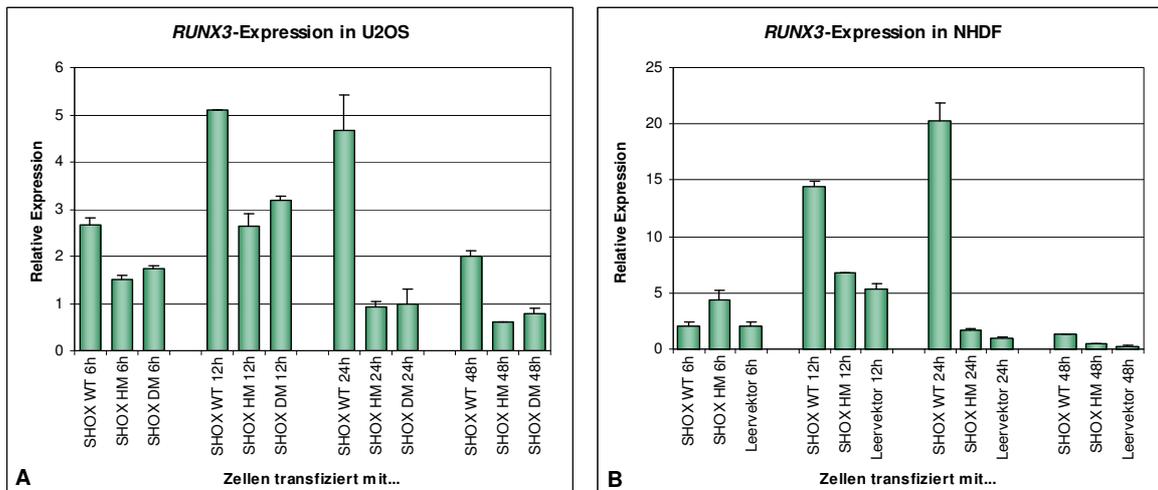


Abb. 13: *RUNX3*-Expression in U2OS (A) und NHDF (B) nach *SHOX*-Überexpression. Die relative Expression zum Zeitpunkt 24 h, *SHOX DM* (A) bzw. Leervektor (B), wurde auf 1 gesetzt.

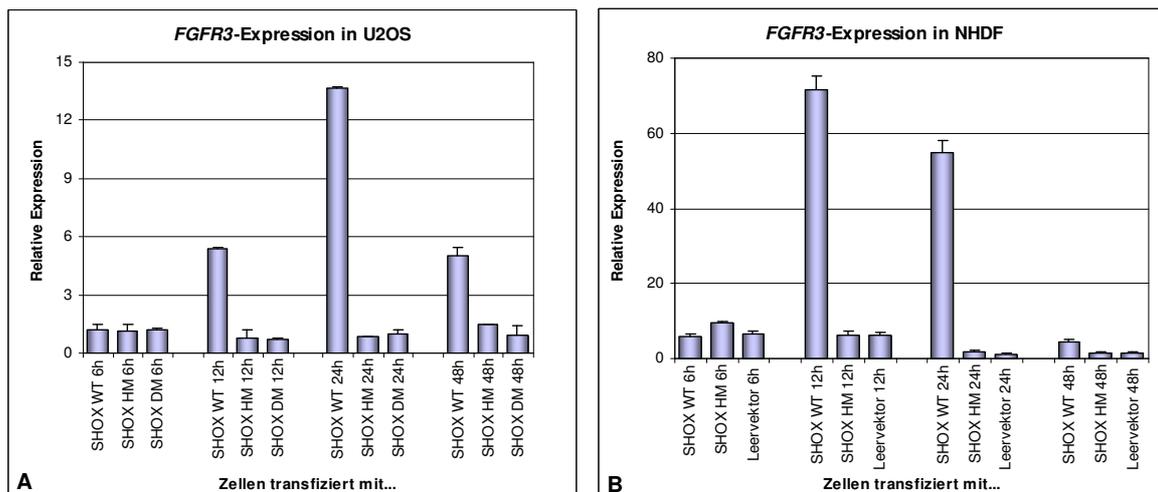


Abb. 14: *FGFR3*-Expression in U2OS (A) und NHDF (B) nach *SHOX*-Überexpression. Die relative Expression zum Zeitpunkt 24 h, *SHOX DM* (A) bzw. Leervektor (B), wurde auf 1 gesetzt.

3.4.2. qRT-PCR nach *SHOX*-Knockdown

Starke Überexpression von Transkriptionsfaktoren kann zu unspezifischen Regulationseffekten führen. Um zu belegen, dass die nach *SHOX-WT*-Überexpression gefundene Regulation von *FGFR3* und *RUNX3* spezifisch ist, wurden zusätzlich siRNA-Knockdown-Experimente in NHDF durchgeführt. Die verwendeten siRNAs sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Die Zellen wurden in 6-Well-Plates kultiviert und mit insgesamt 150 pmol siRNA/Well transfiziert. Für den *SHOX*-Knockdown wurden dabei immer alle 3 *SHOX*-siRNAs in equimolaren Mengen in Kombination eingesetzt. Nach 24, 48 und 72 h wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert, zu cDNA umgeschrieben und die Expressionslevel von *SHOX* und den potentiellen *SHOX*-Zielgenen mittels qRT-PCR ermittelt.

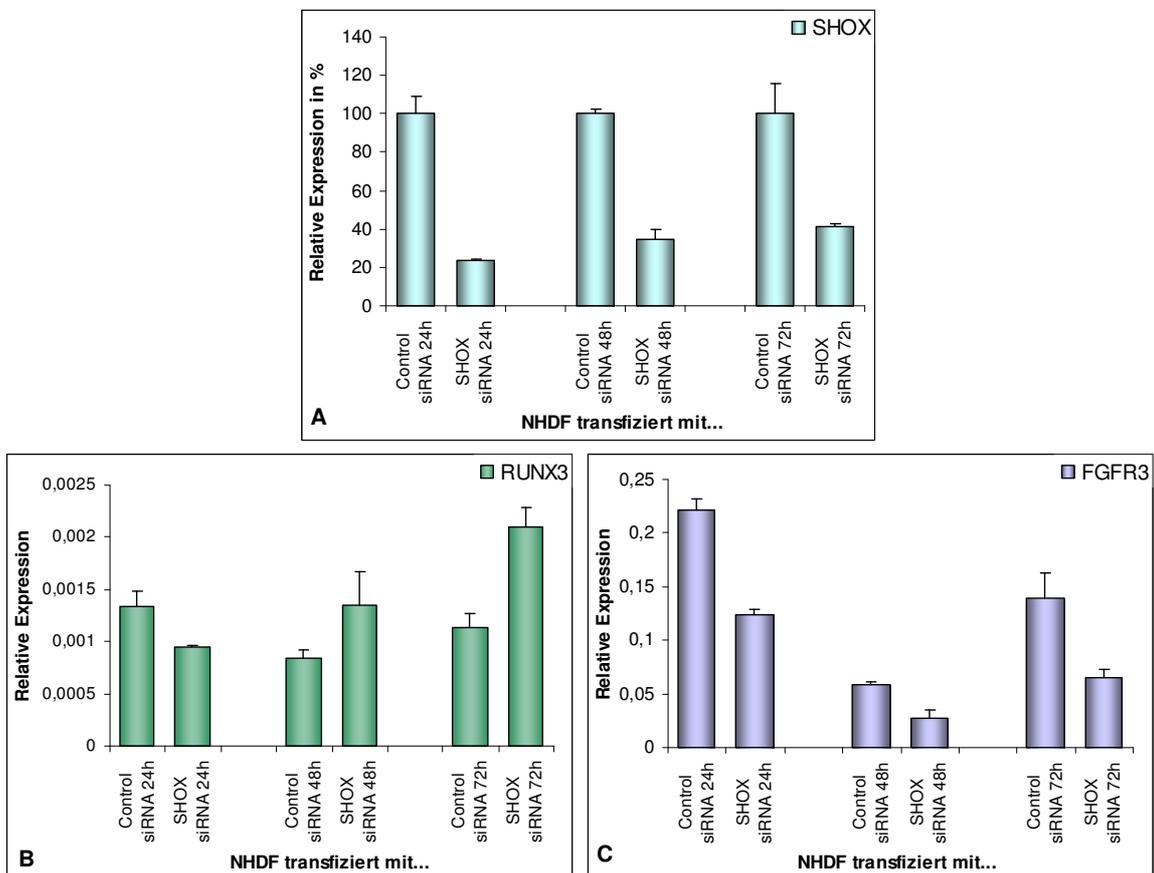


Abb. 15: *SHOX*-Knockdown in NHDF-Zellen. Ergebnisse qRT-PCRs. (A) *SHOX*-Expression. (B) *RUNX3*-Expression. (C) *FGFR3*-Expression.

In Abb. 15 ist das Ergebnis eines repräsentativen *SHOX*-Knockdowns dargestellt. Durch Zugabe von *SHOX*-siRNAs sinkt das *SHOX*-Expressionslevel je nach Zeitpunkt um 60 - 80 %. *RUNX3* zeigt nach dem *SHOX*-Knockdown keinen konsistenten Effekt. Das Expressionslevel in den Zellen schwankt stark und ist je nach Zeitpunkt bei *SHOX*-

Knockdown teilweise niedriger, teilweise höher als in der Kontrolle. Auch in Wiederholungsexperimenten ist keine eindeutige Tendenz zur Regulation erkennbar.

Im Gegensatz dazu war bei *FGFR3* eine Herunterregulation der Expression durch SHOX-siRNA-Transfektion auf etwa 50 % im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen zu beobachten. Diese Herunterregulation konnte in Wiederholungsexperimenten reproduziert werden.

3.4.3. Western Blots

In den bisher gezeigten qRT-PCR-Messungen wurde der Einfluss von SHOX auf *FGFR3* und *RUNX3* auf RNA-Ebene gezeigt. Um zu testen, ob auch die Proteinmenge der potentiellen Zielgene durch SHOX reguliert wird, wurden zusätzlich Western Blots durchgeführt. Sowohl für FGFR3- als auch für RUNX3-Antikörper konnten Western Blot-Protokolle etabliert werden. Als interne Kontrolle wurde auf den gleichen Blots parallel zu FGFR3 oder RUNX3 immer zusätzlich β -Tubulin als Housekeeping-Protein detektiert, worauf dann die Zielgenproteinmenge normalisiert wurde.

In Western Blots wurde die RUNX3-Proteinmenge in U2OS-Zellen 24 und 48 h nach *SHOX*-Überexpression bestimmt. Dabei wurde eine SHOX-abhängige Erhöhung von RUNX3 gemessen. 24 h nach *SHOX-WT*-Transfektion ist das RUNX3-Proteinlevel im Vergleich zu *SHOX-HM* und *SHOX-DM* um 70 %, nach 48 h noch um 50 % erhöht. Die Ergebnisse sind reproduzierbar und für den Zeitpunkt 24 h statistisch signifikant, bei 48 h aufgrund der großen Standardabweichung nicht mehr (Abb. 16). Die Western Blot-Daten für RUNX3 bestätigen damit die qRT-Ergebnisse.

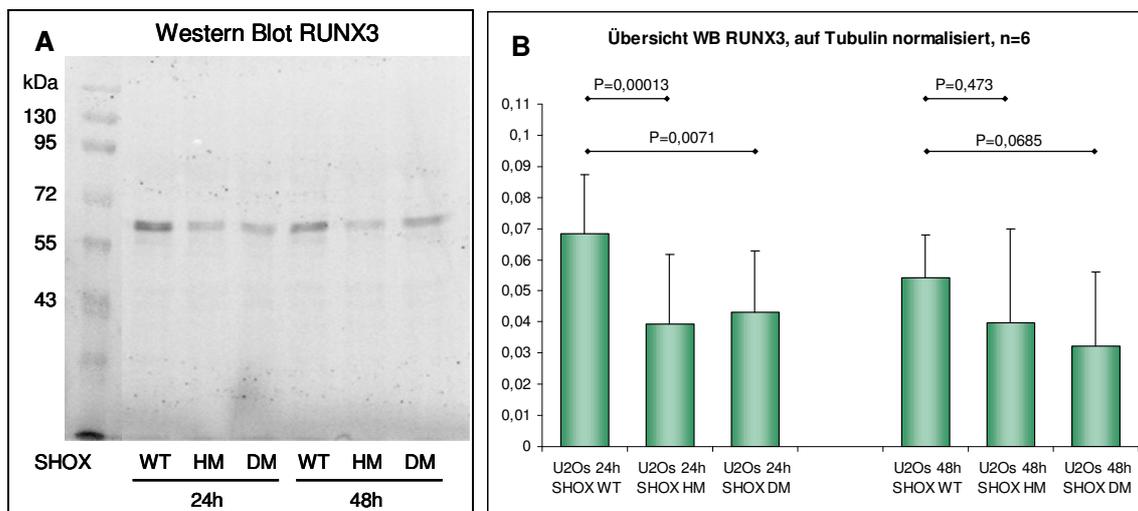


Abb. 16: Ergebnisse Western Blot RUNX3.

(A) Darstellung eines repräsentativen RUNX3-Western Blots. (B) Zusammenfassung von sechs RUNX3-Western Blots mit statistischer Auswertung (Studentscher t-Test).

Die FGFR3-Proteinmenge wurde in NHDF und U2OS nach *SHOX*-Überexpression zu verschiedenen Zeitpunkten (8-48 h) bestimmt. In den meisten Experimenten wurde keine oder nur eine sehr schwache Änderung der Proteinmenge festgestellt. Vereinzelt schien die FGFR3-Proteinmenge sogar zu sinken, was sich aber nicht reproduzierbar bestätigen ließ (Tabelle 10). Auf Proteinlevel lassen sich daher die Ergebnisse der qRT-PCR nach *SHOX*-Überexpression nicht bestätigen.

Zellen	Zeit nach Transfektion	Unterschied FGFR3 Protein bei Überexpression <i>SHOX-WT</i> zu <i>HM/DM</i>
U2OS	8h	+/- 0 %
U2OS	12h	-30 %
U2OS	24h	+/- 0 %
U2OS	24h	+25 %
U2OS	28h	-50 %
U2OS	28h	-70 %
U2OS	28h	+/- 0 %
U2OS	30h	+/- 0 %
U2OS	30h	+/- 0 %
U2OS	48h	+/- 0 %
NHDF	8h	+/- 0 %
NHDF	12h	-20 %
NHDF	24h	-80 %
NHDF	48h	+/- 0 %

Tabelle 10: Ergebnisse Western Blots FGFR3.

3.4.4. Luciferase-Reportergen-Assays

In Luciferase-Reportergen-Assays wurden DNA-Bereiche *upstream* von *RUNX3* und *FGFR3* vor eine Firefly-Luciferase in die Vektoren pGL3basic oder pGL3promoter kloniert. Durch Messung der Luciferaseaktivität nach Transfektion der Konstrukte in Zellen lassen sich so Aussagen über das Regulationspotential des untersuchten DNA-Stückes treffen. Cotransfiziert wurde in allen Experimenten der Vektor pRL-TK, der für eine Renilla-Luciferase codiert, die als Transfektionskontrolle zur Normalisierung verwendet wird. Zusätzlich wurde *SHOX-WT*, *SHOX-HM* oder *SHOX-DM* transfiziert.

Für *RUNX3* wurden zwei verschiedene Konstrukte getestet: pGL3basic *RUNX3* -1250/+35bp und pGL3promoter *RUNX3* -703/+1229bp. Die Benennung der pGL3-Klone erfolgte in Abhängigkeit der ersten Base von Exon 1 von *RUNX3* (Isoform 2, NM_004350.2.). -1250bp/+35bp bedeutet beispielsweise, dass dieser Klon 1250 bp vor Exon 1 beginnt und 35 bp nach Base 1 von Exon 1 endet.

Der Bereich -1250/+35bp zeigt in U2OS-Zellen kein Regulationspotential nach *SHOX-WT*-Transfektion im Vergleich zu den beiden *SHOX*-Mutationen (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu wirkte die Sequenz -703/+1229bp leicht aktivierend (Abb. 17). Die Luciferaseaktivität des leeren Vektors pGL3promoter wird durch *SHOX-WT* unspezifisch auf die Hälfte herunterreguliert (vgl. auch Abb. 19), während *SHOX-WT* bei *RUNX3* -703/+1229bp in pGL3promoter 3fach hochregulierend wirkt; *SHOX* hat demzufolge einen positiven Einfluss auf das Regulationspotential dieses Bereiches. Aufgrund des eher schwachen Effektes wurde das getestete Stück jedoch nicht für weitere Luciferase-Assays unterteilt, da bei kürzeren Fragmenten vermutlich keine Regulation mehr erkennbar wäre.

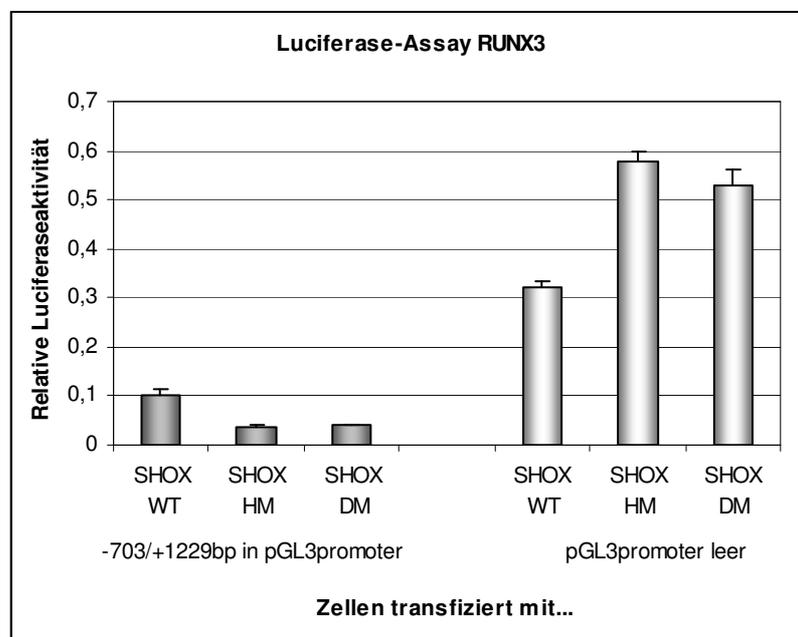


Abb. 17: Luciferase-Assay für *RUNX3* -703/+1229bp in U2OS.

Auch für *FGFR3* wurden Luciferase-Reportergen-Assays durchgeführt. Die Benennung der getesteten Klone bezieht sich hier auf die erste Base von Exon 1 der Isoform *FGFR3-IIIc* (NM_000142). Die Klonierungen wurden begonnen, bevor Ergebnisse der ChIP-Seq-Experimente (siehe Abschnitt 3.2.2) vorlagen, daher wurde die dort gefundene, potentielle Bindestelle zunächst nicht berücksichtigt. Eine Übersicht der Ergebnisse aller getesteten Konstrukte ist in Abb. 18 zusammengestellt.

Das zuerst klonierte Konstrukt pGL3basic *FGFR3* -3430bp/+485bp, das neben der 5'-DNA-Sequenz auch noch Exon 1 und einen Teil von Intron 1 enthält, zeigte in einem Pilotexperiment eine mehr als 60fache Erhöhung der Luciferaseaktivität nach *SHOX-WT*-

Transfektion im Vergleich zu *SHOX-HM* und *SHOX-DM*. Da dieser Bereich direkt neben der später identifizierten ChIP-Seq-Bindestelle (-3489bp/-3429bp) liegt, wurde in nachfolgenden Experimenten ein 88 bp längeres Konstrukt generiert, das diesen Bereich zusätzlich enthält (-3518/+485bp). Überraschenderweise führt dies zu einer deutlich schwächeren Luciferaseaktivitätsänderung (24fache Erhöhung durch *SHOX-WT*). Auch der Klon -1318/+485bp, die 3'-Hälfte des zuerst getesteten Bereichs, lässt die Luciferaseaktivität nur halb so stark steigen. Klone aus der 5'-Hälfte des im Pilotexperiments verwendeten Klons (-3430/-2495bp, -2610/-544bp) allein zeigen beinahe keine regulatorische Funktion nach *SHOX*-Transfektion. Eine weitere Aufteilung der 3'-Hälfte des Ursprungsklons führt zu überwiegend proportional zur Konstruktlänge sinkendem Regulationspotential. Eine Ausnahme bilden die Konstrukte -1318/-544bp und -618/+485bp, die im Vergleich zu ihrer Länge ein geringer als erwartetes Regulationspotential zeigen.

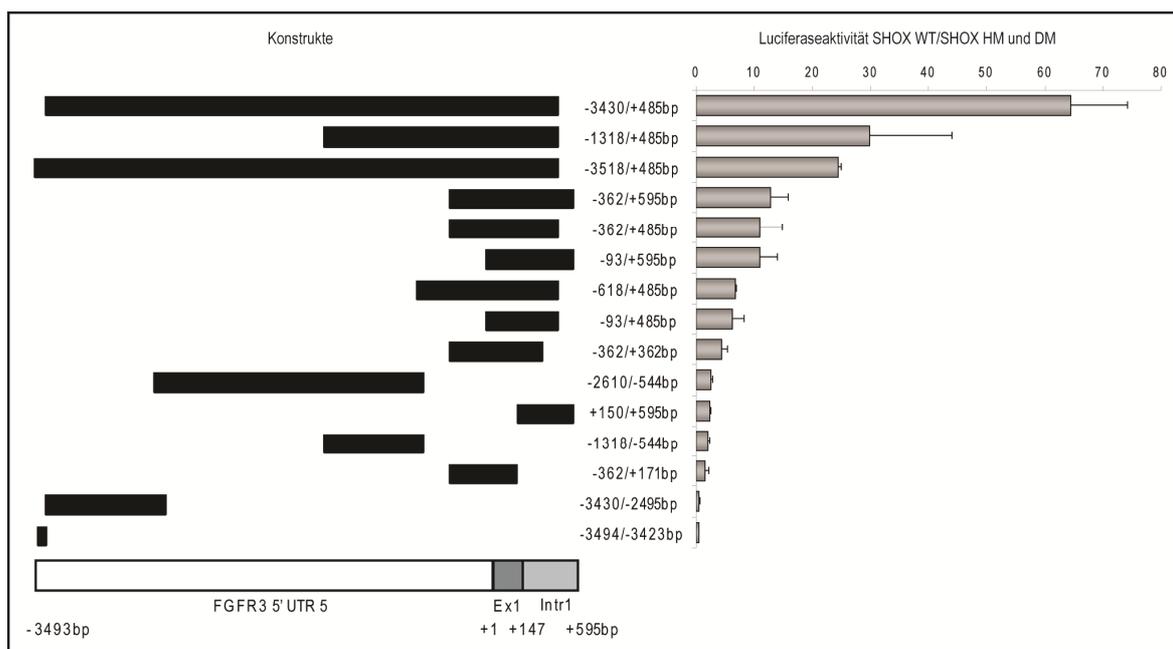


Abb. 18: Ergebnisse Luciferase-Assays *FGFR3* in U2OS-Zellen.

Auf der linken Seite sind die DNA-Bereiche dargestellt, die vor eine Firefly-Luciferase kloniert und auf ihre regulatorischen Fähigkeiten getestet wurden. Rechts gezeigt ist die entsprechende Erhöhung der Luciferaseaktivität nach Cotransfektion mit *SHOX-WT* im Vergleich zu *SHOX-HM* und *SHOX-DM*. Für jedes Konstrukt wurden mindestens drei unabhängige Triplikattmessungen durchgeführt. Alle Konstrukte wurden in *pGL3basic* kloniert, mit Ausnahme von -3494/-3423bp, welches in *pGL3promoter* kloniert wurde (Ex = Exon, Intr = Intron).

Die Luciferase-Assays wurden standardmäßig in U2OS-Zellen durchgeführt. Zur Verifizierung wurden drei Konstrukte zusätzlich in NHDF getestet. Alle drei führen in NHDF ebenfalls zu einer Erhöhung der Luciferaseaktivität nach *SHOX-WT*-

Überexpression, allerdings ist der Anstieg geringer als in U2OS. Interessanterweise ist der große Unterschied in der Regulation zwischen den Klonen -3430bp/+485bp und -1318bp/+485bp verschwunden; beide Konstrukte wirken ähnlich stark aktivierend (Tabelle 11).

	U2OS: SHOX WT/HM	NHDF: SHOX WT/HM
pGL3 basic FGFR3 -3430bp/+485bp	63,6 x	9,5 x
pGL3 basic FGFR3 -1318bp/+485bp	29,9 x	11,8 x
pGL3 basic FGFR3 -93bp/+595bp	10,9 x	3,8 x

Tabelle 11: Vergleich der Ergebnisse exemplarischer Luciferase-Assay in U2OS und NHDF. Angegeben ist jeweils die Änderung der Luciferase-Aktivität nach SHOX-WT-Transfektion im Vergleich zu SHOX-HM-Transfektion.

Die in den ChIP-Seq-Experimenten identifizierte SHOX-Bindestelle vor *FGFR3* (-3489bp/-3429bp) wurde in EMSAs (Electrophoretic Mobility Shift Assays) geprüft, mit denen die Bindung an zwei AT-Palindromsequenzen innerhalb dieser Sequenz nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 3.4.6; Abb. 22B). Mutagenese dieser putativen Bindestelle führt zum Ausbleiben der SHOX-Bindung. Neben dieser Stelle wurden noch drei weitere kurze *FGFR3* *upstream*-Bereiche getestet, die ähnliche AT-Palindrome enthalten (-3262/-3171, -2956/-2884, -2194/-2128) und ebenfalls in EMSA-Experimenten eine Bindung an SHOX zeigten (Abb. 23).

Diese vier SHOX-Bindestellen (Länge 60-91 bp) wurden in den Vektor pGL3promoter kloniert und in Luciferase-Assays auf ihr Regulationspotential getestet (Abb. 19). Alle analysierten Konstrukte zeigen keinen Unterschied in der Luciferaseaktivität im Vergleich zum leeren Vektor, der unspezifisch leicht negativ auf SHOX-WT reagiert (in hellgrau dargestellt). Die mutierte Bindestelle im Bereich -3489bp/-3429bp, die in EMSA-Experimenten zum Ausbleiben der SHOX-Bindung führt, führt in Luciferase-Assays zu den gleichen Ergebnissen wie die unveränderte Sequenz (Daten nicht gezeigt). In den getesteten Bereichen hat die Bindung von SHOX demzufolge keinen Einfluss auf die Luciferaseaktivität.

Die Luciferase-Ergebnisse zeigen, dass der Bereich *upstream* von *FGFR3* nach SHOX-WT-Zugabe insgesamt stark aktivierend auf die Genexpression wirkt. Für eine hohe Regulation scheint eine Kombination verschiedener Bereiche notwendig zu sein, da das Regulationspotential nicht auf ein kleines Gebiet eingegrenzt werden kann. Die in anderen Experimenten identifizierten putativen SHOX-Bindestellen haben in Luciferase-Assays allein keinen Effekt.

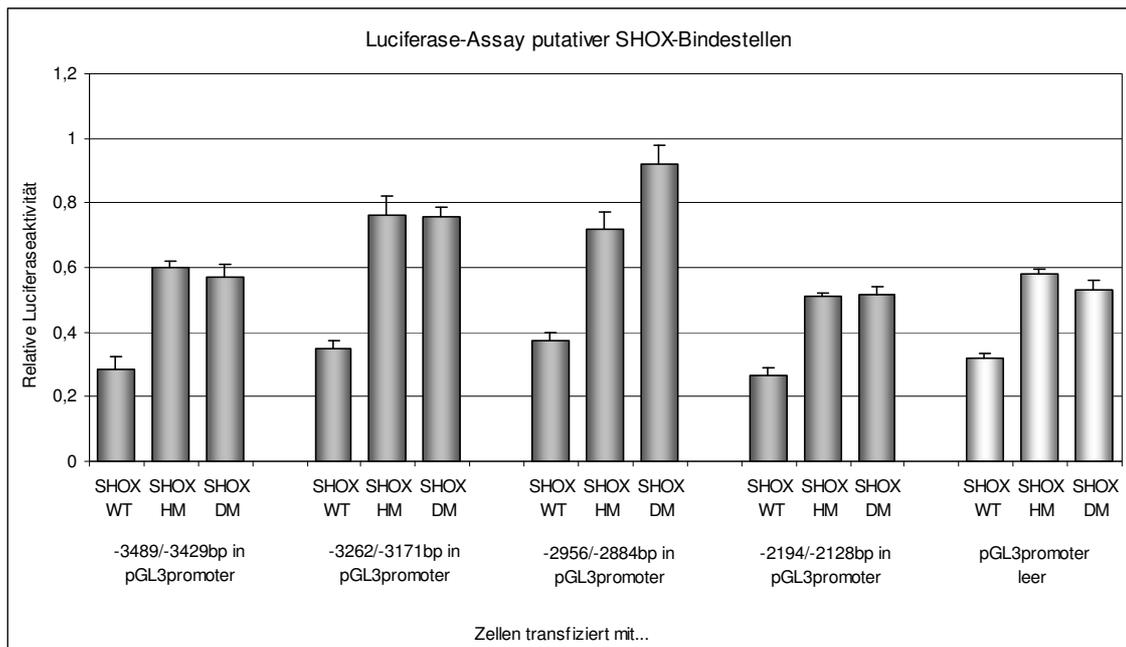


Abb. 19: Luciferase-Assay putativer SHOX-Bindestellen upstream von *FGFR3*.

3.4.5. SHOX-Fusionsprotein-Experimente zur Identifizierung direkter Zielgene

Ein etabliertes Instrument zur Identifizierung direkter Zielgene sind Fusionsproteine. Der zu testende Transkriptionsfaktor wird dabei mit der Hormonbindedomäne des Glukokortikoidrezeptors (GR) (Becker et al., 1989) oder des Östrogenrezeptors (ER) (Superti-Furga et al., 1991; Littlewood et al., 1995) fusioniert und in Zellen transfiziert. Das Fusionsprotein wird in den Zellen synthetisiert, ohne den entsprechenden Liganden bleibt es aber inaktiv. Durch Zugabe des Liganden (Dexamethason beim Glukokortikoidrezeptor, Tamoxifen beim Östrogenrezeptor) einige Stunden nach der Transfektion kann die Aktivität des Fusionsproteins und damit die des zu testenden Transkriptionsfaktors induziert werden. Wenn zeitgleich Cycloheximid, ein Antibiotikum, das die Proteinsynthese unterdrückt, zu den Zellen gegeben wird, werden im Folgenden nur direkte Zielgene reguliert, da keine Zwischenprodukte gebildet werden.

Zur Untersuchung, ob *RUNX3* und *FGFR3* direkt oder indirekt von SHOX reguliert werden, wurden verschiedene SHOX-Fusionsproteine kloniert (Abb. 20). *SHOX-WT* und *SHOX-HM* wurden C-terminal oder N-terminal mit einer der beiden Rezeptorbindedomänen fusioniert und in den Expressionsvektor pcDNA4/TO kloniert. Die genauen Vektorsequenzen sind im Anhang angegeben.

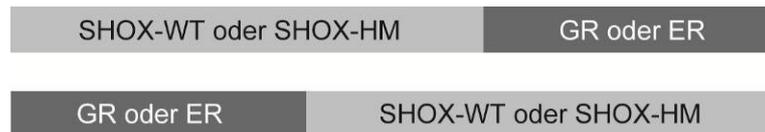


Abb. 20: Schema SHOX-Fusionsproteine.

Abb. 21 zeigt die theoretisch erwarteten Expressionsveränderungen für direkt und indirekt regulierte Zielgene nach SHOX-GR-Fusionsprotein-Überexpression. Bei Überexpression von SHOX-ER-Fusionsproteinen wird statt Dexamethason Tamoxifen zu den Zellen gegeben, die theoretische Expression der Zielgene entspricht ansonsten ebenfalls diesem Schema. SHOX-WT-Fusionsprotein allein oder in Kombination mit Cycloheximid hat keinen Einfluss auf die Expression möglicher Zielgene, da es inaktiv ist. Zugabe von Dexamethason bzw. Tamoxifen aktiviert das Protein und ermöglicht dadurch die Regulation direkter und indirekter Zielgene. Wenn zusätzlich zum Liganden noch Cycloheximid dazugegeben wird, werden nur direkte Zielgene reguliert, da keine Proteinzwischenprodukte synthetisiert werden. SHOX-HM-Fusionsprotein sollte weder allein noch in Kombination mit Cycloheximid und/oder Ligand einen Einfluss auf Zielgene haben. Um unspezifische Effekte ausschließen zu können, wurden in Kontrollexperimenten mit pcDNA4/TO-Leervektor transfizierte Zellen mit Liganden oder Cycloheximid behandelt.

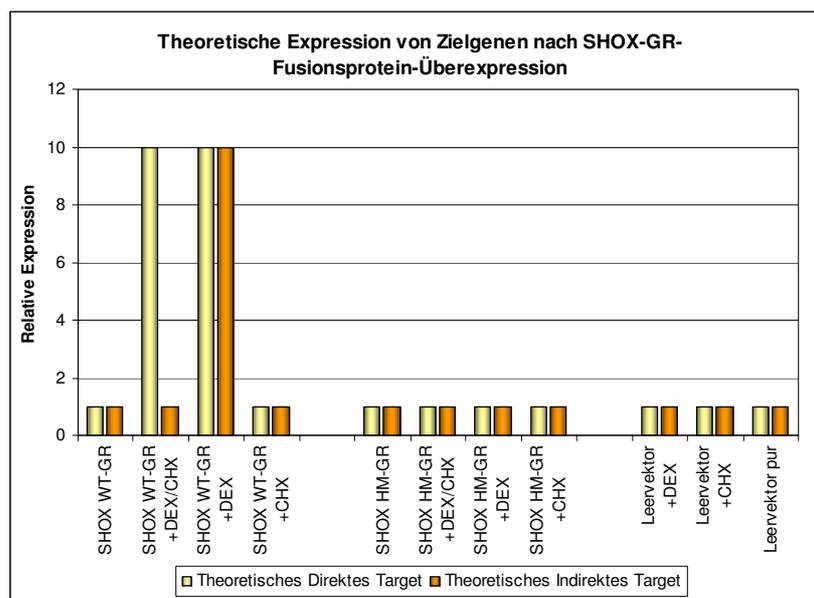


Abb. 21: Theoretische Expression von Zielgenen nach SHOX-GR-Fusionsprotein-Überexpression. DEX = Zugabe Dexamethason 8 h nach Transfektion. CHX= Zugabe Cycloheximid 8 h nach Transfektion. Die erwartete Expression eines direkt regulierten Zielgens ist in gelb dargestellt, die eines indirekt regulierten Zielgens in orange.

Verschiedene SHOX-Fusionskonstrukte (GR N-terminal von SHOX, ER N-terminal von SHOX, GR C-terminal von SHOX, ER C-terminal von SHOX) wurden getestet, aber keines hatte einen reproduzierbaren Einfluss auf mögliche Zielgene. Bei Transfektion von SHOX-WT-Fusionsprotein und Zugabe des entsprechenden Liganden sollten alle Zielgene eine Regulation wie nach *SHOX-WT*-Überexpression zeigen. Dieses Ergebnis wurde für keines der Fusionskonstrukte erhalten. Schwache Regulation (max. 3fach) wurde in einzelnen Experimenten gemessen, diese Daten waren jedoch nicht reproduzierbar. Das einzige bisher publizierte direkte SHOX-Zielgen *BNP* (Marchini *et al.*, 2007a) reagiert stark unspezifisch auf Zugabe von Cycloheximid, daher ließ sich der Versuchsansatz nicht grundsätzlich validieren.

Da SHOX als Fusionsprotein mit den getesteten Bedingungen nur stark eingeschränkte Transaktivierungsfähigkeiten besitzt, konnte demzufolge dieser Versuchsansatz nicht zur Unterscheidung direkter und indirekter Regulation von Zielgenen verwendet werden.

3.4.6. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

In den bisher durchgeführten Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass *RUNX3* und *FGFR3* durch SHOX reguliert werden. ChIP-Seq-Experimente deuten darauf hin, dass die Regulation von *FGFR3* über direkte SHOX-Bindung an *upstream* Bereiche von *FGFR3* stattfinden könnte. Zur Überprüfung der durch die ChIP-Seq identifizierten Sequenz (-3489bp/-3429bp) auf SHOX-Bindung wurden EMSA-Experimente durchgeführt, bei denen radioaktiv markierte Oligonukleotide zum Teil mit SHOX-Protein inkubiert wurden und die Reaktionsgemische über nicht-denaturierende PAA-Gele aufgetrennt wurden.

Das Oligonukleotid „ChIP-Seq komplett“ (-3493/-3423bp) zeigt nach Inkubation mit SHOX-WT-Protein einen „Shift“ im Vergleich zur Negativkontrolle, der durch Bindung von SHOX an die getestete Sequenz verursacht wird (Abb. 22B). Um die SHOX-Bindestelle näher eingrenzen zu können, wurde die „ChIP-Seq komplett“-Sequenz in drei je 32-33 bp lange, sich überlappende Oligonukleotide unterteilt: CSeq A (-3489/-3458bp), CSeq B (-3474/-3442bp) und CSeq C (-3459/-3428bp). SHOX bindet nicht an CSeq A, schwach an CSeq C und sehr stark an CSeq B (Abb. 22B). Dieses Ergebnis lässt die Bindestelle von SHOX im Bereich von CSeq B vermuten, wahrscheinlich im Überlappungsbereich mit CSeq C. In diesem Bereich findet man zwei AT-Palindrome. Ähnliche Palindrome wurden bereits als mögliche SHOX-Bindestellen beschrieben (Rao *et al.*, 2001). In Kontrollexperimenten wurden daher je drei Basen der AT-Palindrome mutiert und der Einfluss auf die SHOX-Bindung getestet. Sowohl Mutation 1 als auch Mutation 2 in CSeq B verhindern eine Bindung von SHOX (Abb. 22C). Die getesteten Palindrome sind demzufolge notwendig für die Bindung von SHOX in diesem DNA-Bereich.

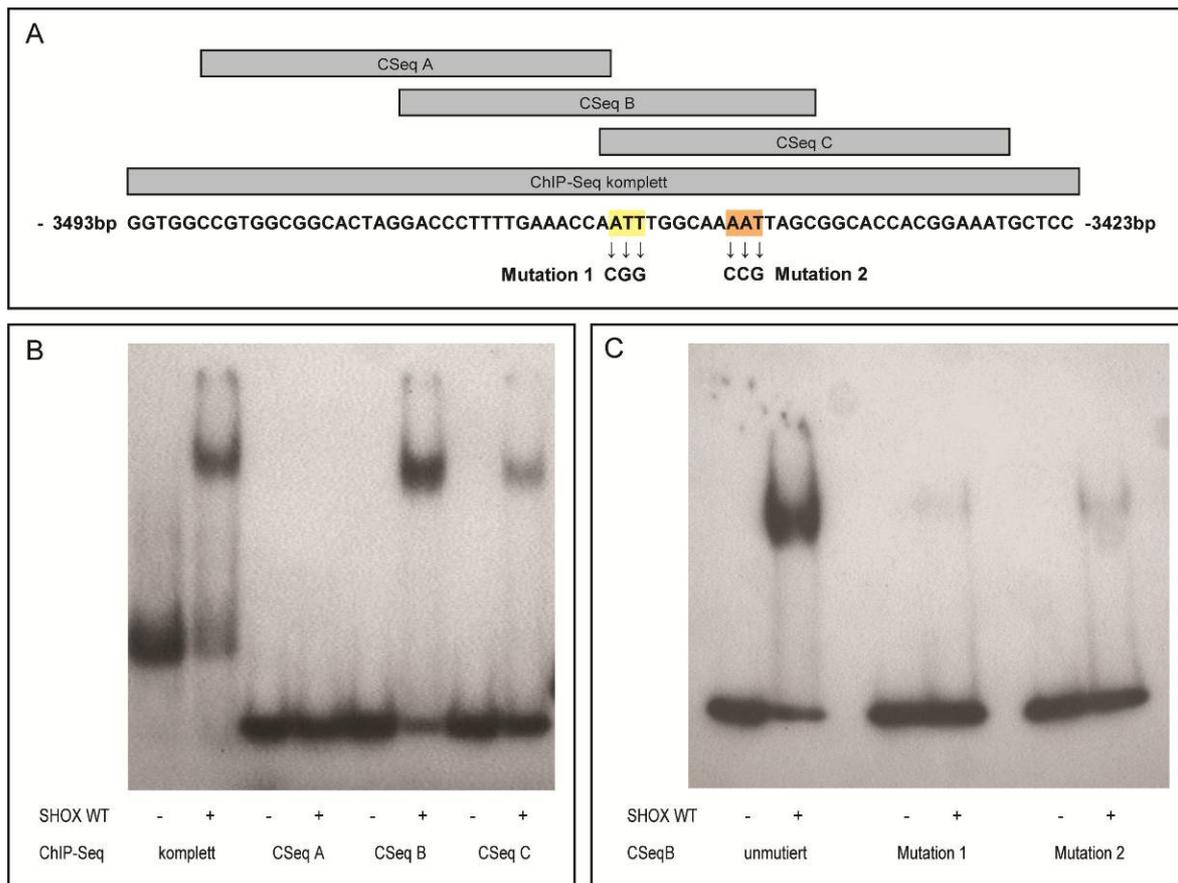


Abb. 22: EMSA der ChIP-Seq *FGFR3*-Bindestelle.

(A) In EMSAs verwendete DNA-Sequenzen. „ChIP-Seq komplett“ entspricht dem in der ChIP-Seq gefundenen Bereich. Zur Eingrenzung der Bindestelle wurde die Ursprungssequenz in drei ca. 32 bp lange Stücke unterteilt (CSeq A, B und C). (B) EMSA-Ergebnisse für ChIP-Seq komplett, CSeq A, B und C. (C) EMSA-Ergebnisse für CSeq B. Mutationen in AT-Palindromen dieser Sequenz verhindern die SHOX-Bindung.

Der *FGFR3* *upstream*-Bereich ist generell sehr GC-reich (67 % GC), trotzdem findet man dort einige wenige weitere AT-Palindrome, die den oben beschriebenen ähneln. Möglicherweise kann SHOX auch an diesen Stellen an die DNA binden. Es wurden daher drei 60-90 bp lange, palindromhaltige DNA-Sequenzen ausgewählt und mittels EMSA auf SHOX-Bindung getestet. Bezogen auf den Beginn von Exon 1 handelt es sich um die Bereiche -3262/-3171bp, -2956/-2884bp und -2194/-2128bp. Die genauen Sequenzen und ihre Position sind im Anhang zusammengestellt.

SHOX bindet im EMSA an alle drei Oligonukleotide. Die stärkste Bindung findet man an die Sequenz -2956/-2884bp, die anderen beiden Fragmente binden SHOX etwas schwächer (Abb. 23). Möglicherweise spielen auch diese Bereiche für die Regulation von *FGFR3* durch SHOX eine Rolle.

Als Negativkontrolle wurden für alle hier beschriebenen Oligonukleotide parallel EMSA-Experimente mit SHOX-HM durchgeführt. In keinem Fall wurde dabei ein Shift beobachtet (Daten nicht gezeigt).

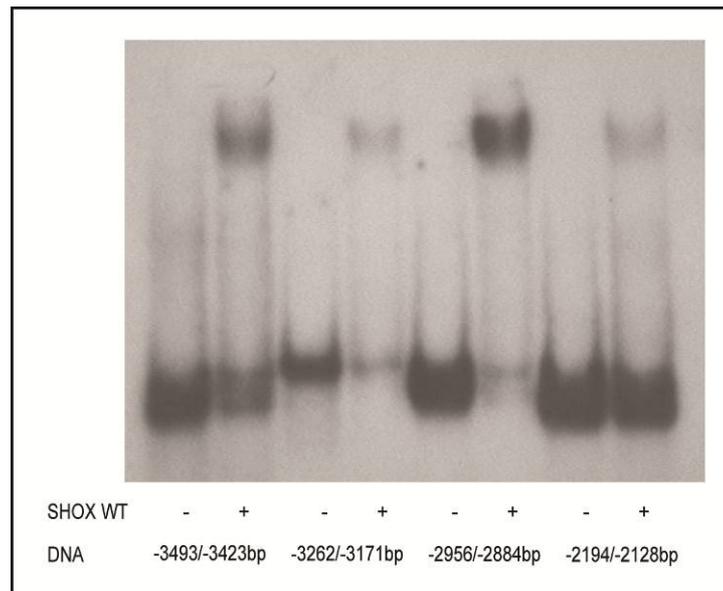


Abb. 23: EMSA zusätzlicher AT-palindromhaltiger Sequenzen.
-3493/-3423bp entspricht dem Stück „ChIP-Seq komplett“ und wurde als Kontrolle mitgetestet (links).

3.4.7. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

In ChIP-Experimenten wurde überprüft, ob sich die im EMSA gezeigten Bindestellen *in vivo* bestätigen lassen. Dazu wurde Flag-markiertes *SHOX* in U2OS-Zellen überexprimiert und die DNA-Proteinbindungen fixiert. Die genomische DNA wurde über Sonifizierung in bis zu maximal 1 kb große Stücke zerlegt. Mit einem Flag-Antikörper wurde *SHOX* und die an *SHOX* gebundene DNA immunopräzipitiert, anschließend wurde die DNA aufgereinigt und über qPCR die Anreicherung der Bindestellen gemessen. In Negativkontrollen wurde statt Flag-Antikörper unspezifisches Maus-Immunglobulin G (IgG) verwendet, das nicht an *SHOX* bindet und somit den Background des Experiments misst. Die *SHOX*-abhängige Anreicherung der DNA in den Flag-ChIPs ergibt sich durch den Vergleich mit den IgG-Kontrollen. In vielen ChIP-Experimenten war jedoch in den IgG-Kontrollen für keines der getesteten Primerpaare ein PCR-Produkt messbar, so dass eine Quantifizierung nicht möglich war. Aus diesem Grund wurde die immunopräzipitierte DNA-Menge mit dem DNA-Input verglichen, der vor Beginn der IP entnommen wurde. Je größer die in der ChIP extrahierte DNA-Menge im Vergleich zum Input ist, desto wahrscheinlicher ist eine *SHOX*-Bindung an dieser Stelle.

Für drei der im EMSA identifizierten Bindestellen konnten Primer etabliert werden, welche die entsprechende Sequenz enthalten. Lediglich für den Bereich -2956/-2884bp ließen sich keine geeigneten Primer etablieren. In Kontrollmessungen wurden zusätzlich Primer für Sequenzen im Abstand von 1,5 bis 7 kb zu den EMSA- Bindestellen verwendet. Als Positivkontrolle wurde für jede ChIP außerdem die Anreicherung der *SHOX*-Bindestelle

upstream von *BNP* gemessen, für die in EMSA- und ChIP-Experimenten bereits eine direkte Bindung gezeigt wurde (Marchini *et al.*, 2007a).

Das Ergebnis einer repräsentativen ChIP ist in Abb. 24 dargestellt. Die drei DNA-Sequenzen, welche die FGFR3-EMSA-Bindestellen enthalten (-3518bpF/-3391bpR, -3299bpF/-3141bpR, -2257bpF/-2010bpR) sind im Vergleich zu drei von vier Negativkontrollen (-6926bpF/-6815bpR, +2893bpF/+3017bpR, +5185bpF/+5292bpR) deutlich stärker angereichert. Nur der Bereich -5150bpF/-5040bpR, für den bisher keine EMSA-Experimente durchgeführt wurden, zeigt überraschenderweise ebenfalls eine stärkere Anreicherung. Bei genauerer Analyse dieser AT-reichen DNA-Sequenz wurde ein ATTA-Palindrom identifiziert; möglicherweise handelt es sich hierbei daher um eine weitere SHOX-Bindestelle.

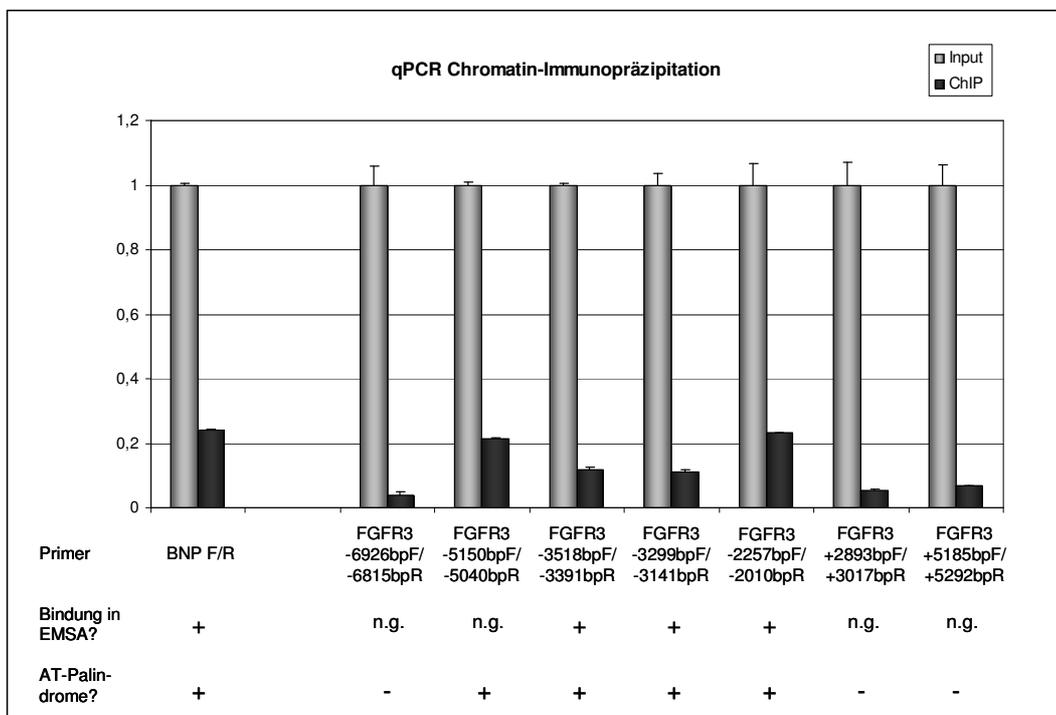


Abb. 24: qPCR-Ergebnisse einer repräsentativen Chromatin-Immunopräzipitation. In hellgrau ist die DNA-Menge des Inputs, in dunkelgrau die der Flag-SHOX-ChIP dargestellt. Die Input-DNA-Menge wurde zur besseren Vergleichbarkeit für alle Primerpaare auf „1“ gesetzt. AT-Palindrome = ATTA oder TAAAT in der Sequenz vorhanden; n.g. = nicht getestet. Die bp-Angaben der Primer beziehen sich auf die erste Base von Exon 1.

Die in der ChIP erhaltenen Daten bestätigen demzufolge die Bindung von SHOX an mehrere DNA-Sequenzen *upstream* des Gens *FGFR3*.

3.5. Analyse der Zielgene im Modellsystem MSC-Differenzierung

3.5.1. qRT-PCR-Analyse Differenzierungsmarker

Humane fötale mesenchymale Stammzellen (MSC) wurden in Pelletkulturen unter spezifischen Bedingungen zu Chondrozyten differenziert (s. Kap. 2.10.5). Dieses System ermöglicht eine detaillierte Untersuchung der Vorgänge während der Chondrogenese (Sekiya *et al.*, 2002; Emons *et al.*, in Vorbereitung). Das Experiment wurde mit MSCs aus drei verschiedenen Embryonen durchgeführt (2x MSC 281, je 1x MSC 279, MSC 38). Als Kontrolle wurden außerdem MSC 269 getestet, die von Dr. Joyce Emons, Universität Leiden, differenziert wurden.

Die Differenzierung wurde zunächst mittels qRT-PCR für *Collagen2A1* und *Collagen10A1* überprüft. Während einer korrekten Differenzierung sollte zunächst die Expression von *COL2A1*, dann von *COL10A1* stark ansteigen. Die besten Ergebnisse wurden für die Proben MSC 269 und MSC 281.1 erhalten; bei beiden Experimenten ist ein deutlicher Anstieg von *COL2A1* und *COL10A1* im Verlauf der Differenzierung messbar. Die Differenzierung von MSC 38 führte ebenfalls zu einem Anstieg der Expression der getesteten Collagene, der aber erst sehr spät ab Tag 21 eintrat (Abb. 25). Bei MSC 281.2 war keine Änderung der Collagenexpression vorhanden, bei MSC 279 nur ein Anstieg der Expression von *COL2A1*, nicht aber für *COL10A1*, was darauf hindeutet, dass in diesen Experimenten die Differenzierung nicht vollständig erfolgt ist. Diese beiden Experimente wurden daher in den weiteren Analysen nicht berücksichtigt.

3.5.2. qRT-PCR-Analyse SHOX und SHOX-Zielgene

Neben der *Collagen2A1*- und *Collagen10A1*-Expression wurde auch die Expression von *SHOX*, *RUNX3* und *FGFR3* in qRT-PCRs gemessen. Frühere Arbeiten hatten Hinweise auf ein hohes *SHOX*-Expressionslevel an Tag 0 gegeben, das dann während der Differenzierung deutlich absinkt (Dr. A. Marchini, persönliche Mitteilung). Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Während für MSC 269 und MSC 281.1 ein im Vergleich zu späteren Zeitpunkten leicht höheres *SHOX*-Expressionslevel an Tag 0 gemessen wurde, ist das Ergebnis für MSC 38 genau umgekehrt (Abb. 26). Ein genereller Trend ist nicht erkennbar. *SHOX* wird während der gesamten Differenzierung relativ gleichmäßig mit geringen Schwankungen exprimiert

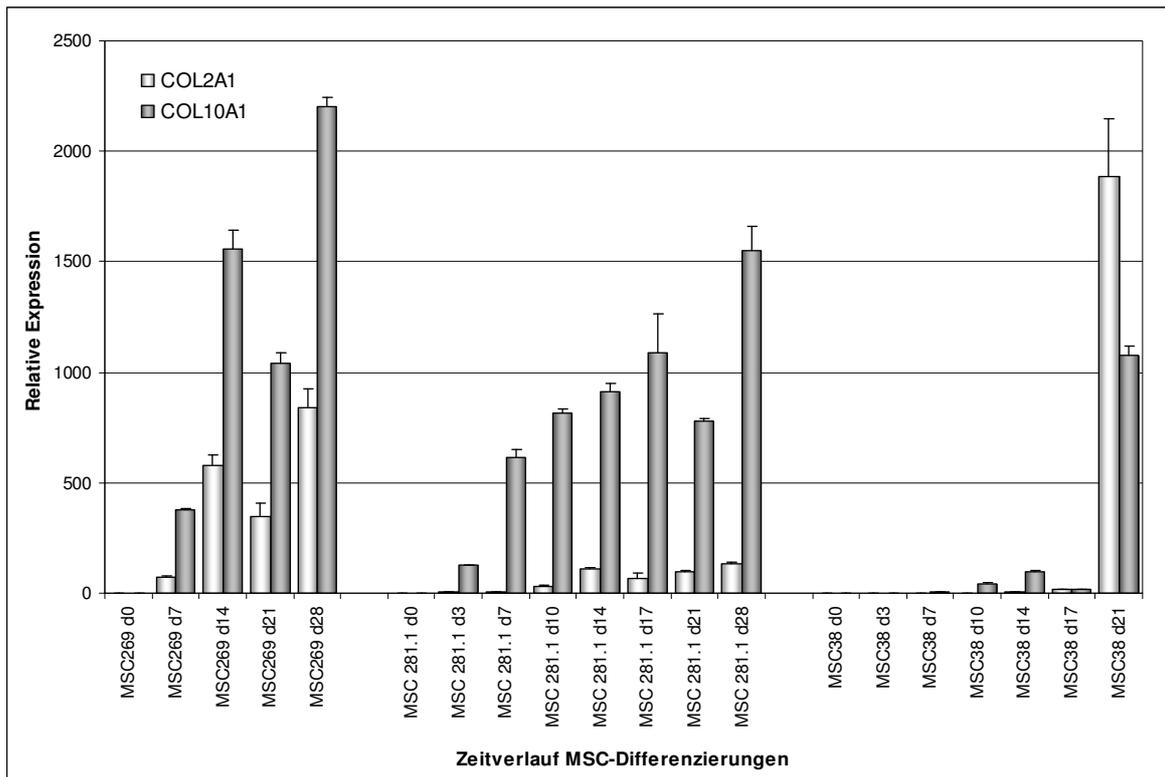


Abb. 25: Expression von Collagen2A1 und Collagen10A1 in zu Chondrozyten differenzierenden MSCs. Collagen2A1 ist in hellgrau, Collagen10A1 in dunkelgrau dargestellt. Die jeweiligen relativen Expressionswerte für Tag 0 wurden auf 1 gesetzt. d=Tag der Differenzierung.

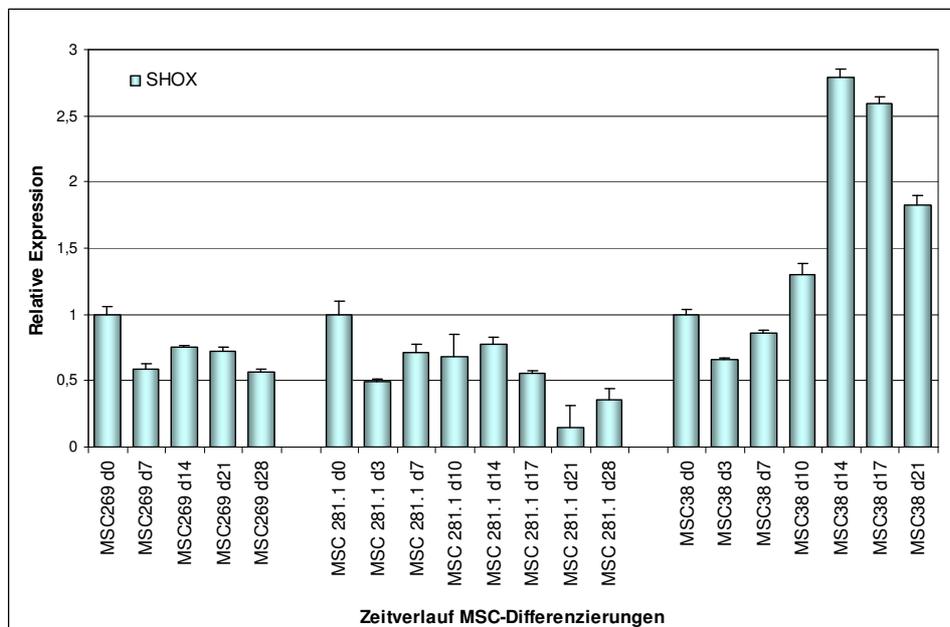


Abb. 26: Expression von SHOX in zu Chondrozyten differenzierenden MSCs. Die jeweiligen relativen Expressionswerte für Tag 0 wurden auf 1 gesetzt. d=Tag der Differenzierung.

Auch die Expression von *RUNX3* schwankt während der Differenzierung nur wenig. Generell ist der Wert zu Beginn relativ niedrig, steigt dann bis Tag 14 an (7,5fach bei MSC 269, 2-3fach bei MSC 281.1 und MSC 38) und sinkt bei MSC 281.1 und 38 wieder auf das Anfangslevel an Tag 21 ab; bei MSC 269 bleibt die Expression im Gegensatz dazu bis Tag 28 durchgehend hoch (Abb. 27B). Es ist eine schwach negative Korrelation der Expression von *SHOX* und *RUNX3* zu beobachten: Zu den Zeitpunkten, an denen die *SHOX*-Expression geringer ist (v.a. Tag 3-7), steigt das *RUNX3*-Level an. Im Gegensatz dazu steigt zwischen Tag 14 und 21 die *SHOX*-Expression wieder leicht an, während *RUNX3* abnimmt.

Die Expression von *FGFR3* zeigt zwischen den verschiedenen Experimenten große Unterschiede (Abb. 27A). So ist bei der Differenzierung von MSC 269 ein mehr als 3000facher Anstieg von *FGFR3* von Tag 0 bis Tag 28 zu beobachten, während bei MSC 281.1 praktisch keine Änderung auftritt. Dort ist die maximale Veränderung zu Tag 0 an Tag 14 zu beobachten (15facher Anstieg). Bei MSC 38 ist ein mehr als 500facher Anstieg erst ab Tag 21 messbar. Die Änderungen der Expressionslevel zeigen leichte Übereinstimmungen mit *Collagen2A1* (vgl. Abb. 25). Im Gegensatz dazu ist keine erkennbare Korrelation zwischen *SHOX*- und *FGFR3*-Expression vorhanden.

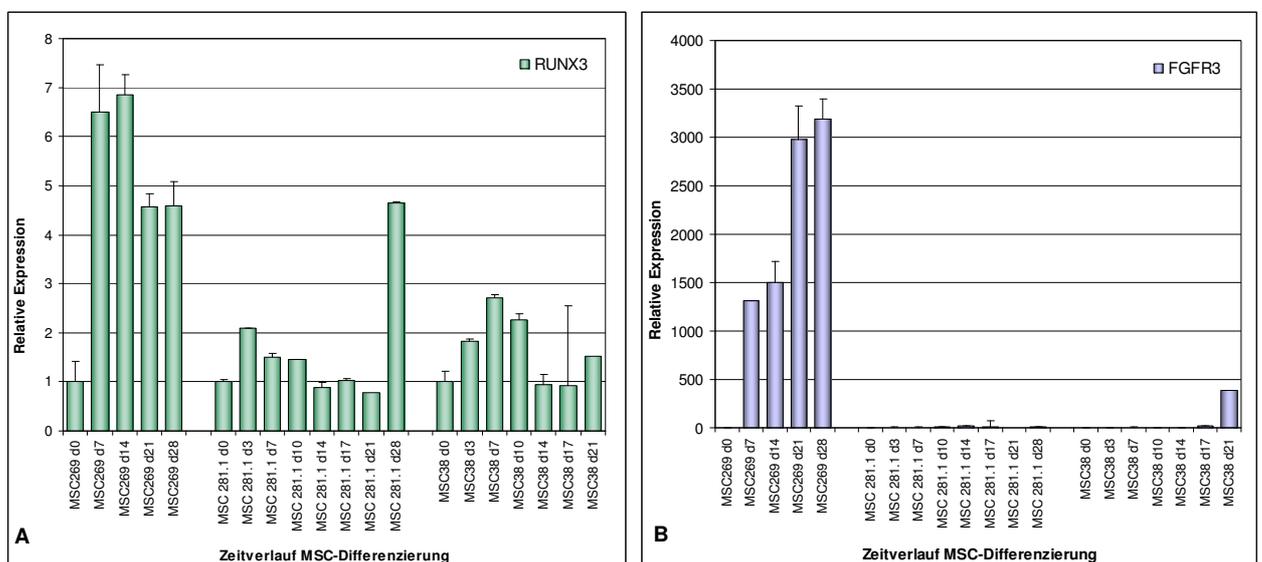


Abb. 27: Expression von *RUNX3* (A) und *FGFR3* (B) in zu Chondrozyten differenzierenden MSCs. Die jeweiligen relativen Expressionswerte für Tag 0 wurden auf 1 gesetzt. d=Tag der Differenzierung.

3.6. Analyse der Zielgene im Modellsystem Hühnerembryo

3.6.1. *In situ*-Hybridisierungen in Hühnerembryonen

Mittels *Whole Mount in situ*-Hybridisierungen (WISH) wurde das Expressionsmuster von *Shox*, *Runx3* sowie *Fgfr3* in für drei bis sieben Tage bebrüteten Hühnerembryonen untersucht und verglichen (Abb. 28). Insbesondere wurde die Expression in den sich entwickelnden Gliedmaßen beobachtet.

Shox ist ab Tag 3,25 (HH-Stadium 19-20) in den Gliedmaßenanlagen exprimiert (Abb. 28A). Während an Tag 4 (HH24) beinahe in den kompletten Gliedmaßen *Shox* detektiert wird, ist die Expression an Tag 5 (HH26/27) und 6 (HH28/29) auf das mittlere Segment beschränkt. An Tag 7 (HH30/31) ist *Shox* weiterhin im mittleren Gliedmaãensegment sowie zusätzlich in den sich entwickelnden Fingern und Zehen exprimiert (Abb. 28M).

Runx3 wird an Tag 3,25, 4 und 5 ubiquitär exprimiert, eine besonders starke Expression findet man dabei in den sich entwickelnden Extremitäten (Abb. 28 B, E, H). Ab Tag 6 ist die Expression auf Gliedmaßen und neuronale Gewebe begrenzt (Abb. 28 K, N). In den Gliedmaßen wird *Runx3* in den mittleren und distalen Bereichen exprimiert.

Fgfr3 ist an Tag 3,25 mit Ausnahme der Gliedmaßenanlage ubiquitär exprimiert (Abb. 28C). Bis Tag 7 ist durchgehend eine sehr starke Expression in den sich entwickelnden neuronalen Geweben zu beobachten. An Tag 4 findet man nur sehr schwache Expression im proximalen Bereich der Gliedmaßen am Übergang zum Körper. Ab Tag 5 ist die Expression dagegen fast ausschließlich im distalen Bereich der Gliedmaßen detektierbar. Zu den Zeitpunkten Tag 6 und 7 zeigt *Fgfr3* eine starke Expression in den distalen Bereichen und den Interdigitalräumen (Abb. 28 L, O).

Beim Vergleich der Expression von *Shox* und *Fgfr3* in Hühnerembryonen fällt auf, dass sich die Expressionsmuster beider Gene in den Gliedmaßen nahezu ausschließen. An Tag 3,25 ist *Fgfr3* fast im ganzen Körper exprimiert, nur in der *Shox*-exprimierenden Gliedmaßenanlage ist kein *Fgfr3* detektierbar (Abb. 29 A, B; markiert durch Pfeile). An Tag 5 erkennt man an der Unterseite der Beine eine Art Grenzlinie zwischen der proximalen *Shox*-Expression und der distalen *Fgfr3*-Expression (Abb. 29 C, D; Pfeile). Zu späteren Zeitpunkten ist *Shox* in den sich entwickelnden Zehen detektierbar, während *Fgfr3* vor allem im Interdigitalraum auftritt (Abb. 29 E, F, schwarze Pfeile). Im Flügel ist *Shox* im Gegensatz zu *Fgfr3* distal nicht exprimiert (Abb. 29 E, F, weiße Pfeile).

Anders als *Fgfr3* zeigt *Runx3* in vielen Bereichen eine Coexpression mit *Shox*. Zu frühen Zeitpunkten (Tag 3,25, Tag 4) sind beide Gene in den gesamten sich entwickelnden

Gliedmaßen zu finden, danach konzentriert sich die *Runx3*-Expression auf den mittleren und distalen Bereich der Extremitäten. Im mittleren Gliedmaßenbereich überlappt das Expressionsmuster dabei deutlich mit dem von *Shox*.

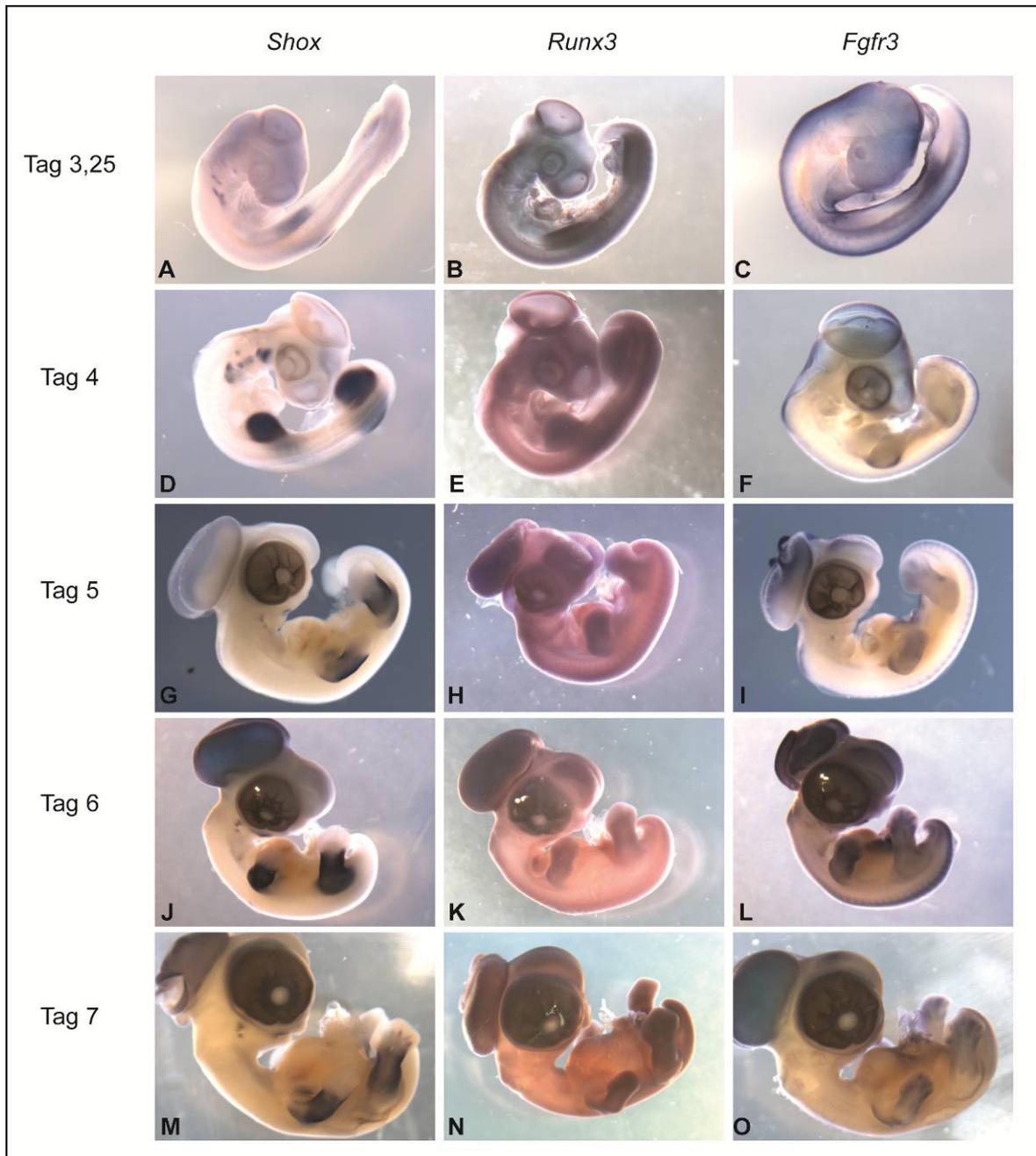


Abb. 28: Übersicht Whole Mount in situ-Hybridisierungen in Hühnerembryonen. (A, D, G, J, M): *Shox*-Antisense-Sonde. (B, E, H, K, N): *Runx3*-Antisense-Sonde. (C, F, I, L, O): *Fgfr3*-Antisense-Sonde. Bebrütung für 3, 25 (A, B, C), 4 (D, E, F), 5 (G, H, I), 6 (J, K, L) oder 7 Tage (M, N, O).

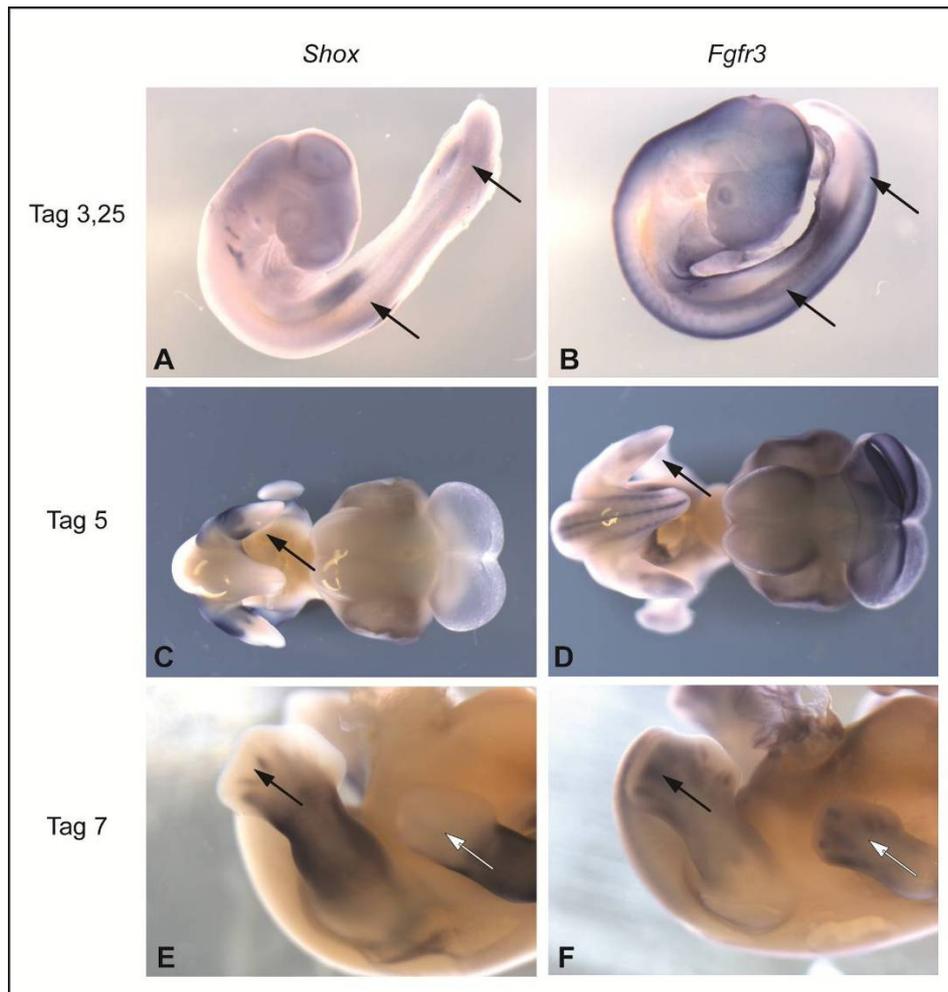


Abb. 29: Vergleich *Shox*- und *Fgfr3*-Expression in Hühnerembryo-WISH. (A, C, E): *Shox*-Antisense-Sonde. (B, D, F): *Fgfr3*-Antisense-Sonde. Bebrütung für 3,25 (A, B), 5 (C, D) oder 7 Tage (E, F).

Da die verwendeten Sonden in den *Whole Mount in situ*-Hybridisierungen das Gewebe nur schwach penetrieren, spiegelt das dort gefundene Expressionsmuster überwiegend die Genexpression an der Körperoberfläche wieder. Zur Untersuchung der Expression innerhalb der Gliedmaßen wurden daher zusätzliche *in situ*-Hybridisierungen (ISH) auf Kryoschnitten durchgeführt. Die Ergebnisse für 6 Tage alte Embryonen sind in Abb. 30 zusammengestellt. Ab Tag 6 beginnen im Bereich, den später die Knochen einnehmen, die dort kondensierten Mesenchymzellen mit der Differenzierung zu Chondrozyten. *Shox* ist stark außen um diese sich bildenden Chondrozyten herum exprimiert, im inneren Bereich ist die Expression nur schwach. Im Gegensatz dazu findet man *Fgfr3* fast ausschließlich im Zentrum der differenzierenden Zellkondensate. An der Körperoberfläche im mittleren Gliedmaßenbereich ist *Shox* ebenfalls sehr stark exprimiert, was in Übereinstimmung mit den Daten aus den WISH ist. *Shox* ist außerdem schwach im die Chondrozyten umgebenden Gewebe exprimiert. *Runx3* ist ähnlich wie *Shox* außerhalb

der Chondrozytenkondensate exprimiert. Das Expressionsmuster zeigt aber im Gegensatz zu *Shox* keine starke Anreicherung am Rand der Chondrozyten oder in den Hautschichten (Abb. 30). Die analysierten Schnitt-ISH zeigen dementsprechend sich mehrheitlich gegenseitig ausschließende Expressionsmuster von *Shox* und *Fgfr3*, während *Runx3* in den gleichen Bereichen wie *Shox* exprimiert ist.

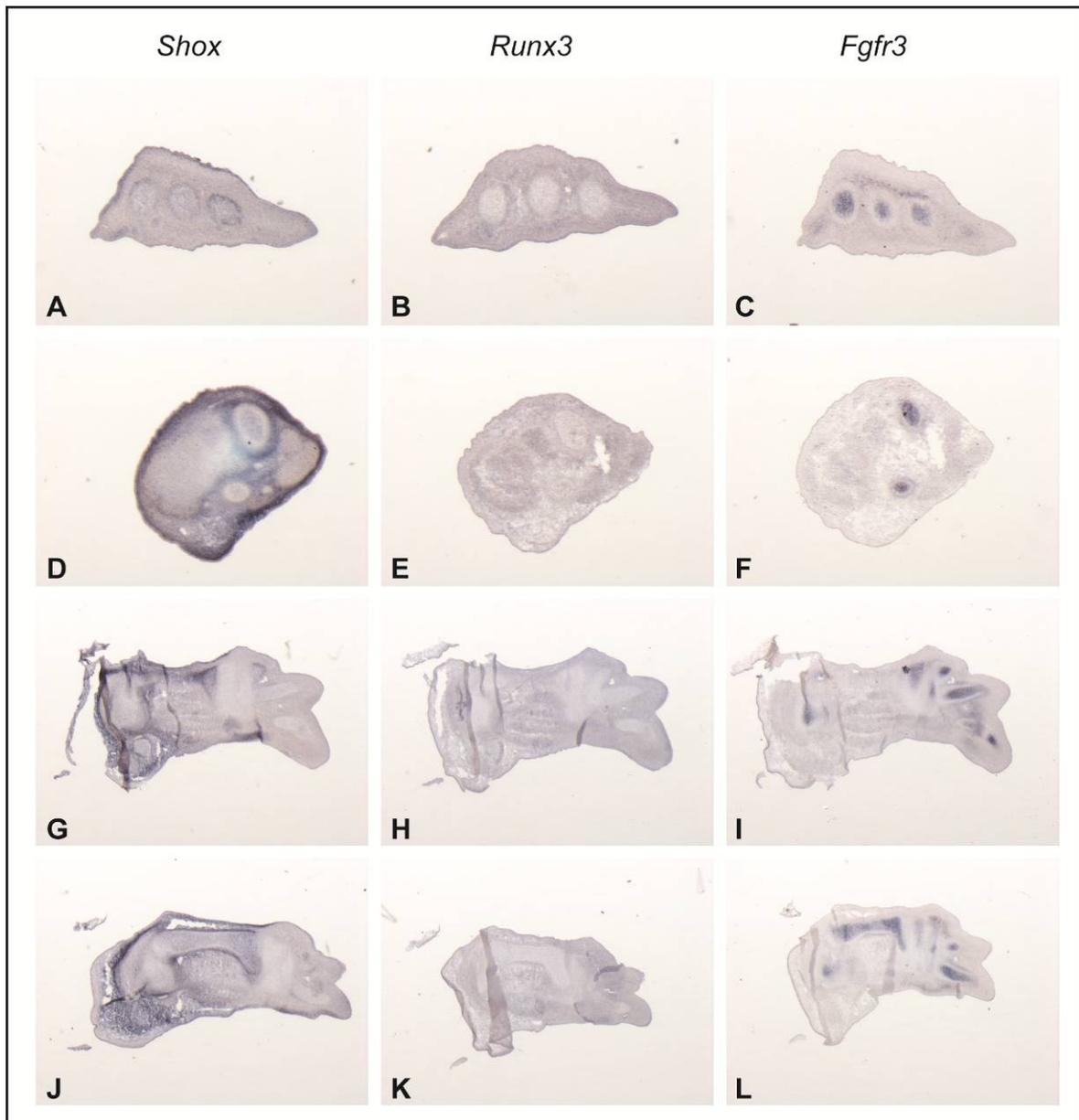


Abb. 30: ISH auf Kryoschnitten von 6 Tage alten Hühnerembryonen. (A, D, G, J): *Shox*-Antisense-Sonde. (B, E, H, K): *Runx3*-Antisense-Sonde. (C, F, I, L): *Fgfr3*-Antisense-Sonde. (A, B, C): Transversal-Schnitte durch den Fuß. Im Querschnitt sieht man drei sich entwickelnde Zehenknochen. (D, E, F): Transversal-Schnitte durch den Unterschenkel mit den sich entwickelnden Tibia und Fibula. (G, H, I, J, K, L): Sagittal-Schnitte durch Unterschenkel und Fuß. Die Zehenknochen sowie der Metatarsus sind in Längsschnitten zu erkennen.

Zusammenfassend konnte mittels verschiedener *in situ*-Hybridisierungen gezeigt werden, dass *Shox* und *Runx3* in vielen Bereichen der sich entwickelnden Gliedmaßen coexprimiert sind. Im Gegensatz dazu schließen sich die Expressionsmuster von *Shox* und *Fgfr3* in den Gliedmaßen zu allen untersuchten Zeitpunkten überwiegend aus.

3.6.2. Virale RCAS-Überexpression von SHOX in Hühnerembryonen

Über Infektion mit RCAS-Viren kann in Hühnerembryonen ein gewünschtes Gen überexprimiert und dessen Effekt während der Gliedmaßenentwicklung untersucht werden (Gordon et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden RCAS-Konstrukte verwendet, die für *Shox* und *GFP* kodieren. Hühnereier wurden 1,5 oder 3,5 Tage nach Brutbeginn geöffnet, mit den Viren (1:1-Mischung RCASBP(A)-SHOX und RCASBP(B)-GFP) infiziert und die Embryonen bis Tag 5,5 weiter bebrütet. Bei 1,5-Tage alten Embryonen (HH-Stadium 11-12) erfolgte die Virusinjektion in das rechte Lateralmesenchym, das sich später zu Hinterbeinen entwickelt. In 3,5-Tage alten Embryonen (HH-Stadium 21-22) wurde die Virusmischung in den sich entwickelnden rechten Flügel injiziert. Die unbehandelten Gliedmaßen jedes Embryos dienten als interne Negativkontrolle. Die GFP-Coinfektion sollte eine einfache optische Auswertung des Injektionserfolgs ermöglichen. Die Signalstärke des GFP war allerdings in den Hühnerembryonen generell sehr schwach, und eine zuverlässige Analyse der GFP-Expression war mit den zur Verfügung stehenden Binokularen und Lichtquellen nur eingeschränkt möglich. Daher kann für die behandelten Embryonen keine exakte Aussage über die Stärke und den Bereich der GFP-Expression und damit den der *Shox*-Expression getroffen werden.

An Tag 5,5 wurde ein Teil der behandelten Embryonen durch WISH oder ISH analysiert, bei anderen wurden die infizierten und Kontrollgliedmaßen abgetrennt, die RNA isoliert und in qRT-PCRs die Expressionslevel von *Shox*, *Fgfr3*, *Runx3* sowie verschiedener Housekeeping-Gene bestimmt. Morphologische Differenzen oder Unterschiede in der Länge zwischen infizierten und nicht infizierten Extremitäten wurden zu diesem Zeitpunkt nicht beobachtet.

Abb. 31 zeigt *Shox*-WISH von Hühnerembryonen, die an Tag 1,5 (Abb. 31 A, B) bzw. Tag 3,5 (Abb. 31 C, D) mit RCAS-SHOX und RCAS-GFP infiziert wurden. Die infizierten Gliedmaßen zeigen im Gegensatz zu den uninfizierten Kontrollen eine *Shox*-Expression der gesamten Extremität inklusive der distalen Elemente. Diese Ergebnisse belegen, dass eine *Shox*-Überexpression mittels der verwendeten Methode grundsätzlich möglich ist.

Neben *Shox*-WISH wurden *Fgfr3*- und *Runx3*-WISH durchgeführt. Diese Experimente zeigten weder in Expressionsstärke noch -muster konsistente Unterschiede zwischen

infizierten und uninfizierten Gliedmaßen (n=4 Embryonen je Gen). Da nicht alle in *Shox*-WISH getesteten Embryonen eine Abb. 31 entsprechende, perfekte Überexpression in der infizierten Extremität zeigen, kann allerdings für die in *Fgfr3*- und *Runx3*-WISH verwendeten Embryonen nicht nachgewiesen werden, dass die *Shox*-Überexpression erfolgreich war. Durchgeführte Doppel-WISH-Experimente mit *Shox* und *Fgfr3* oder *Runx3* scheiterten an der im Vergleich zu *Shox* schwächeren Expression der Zielgene, deren Expressionsstärke und -muster sich mit diesem Ansatz nicht eindeutig nachweisen ließ.

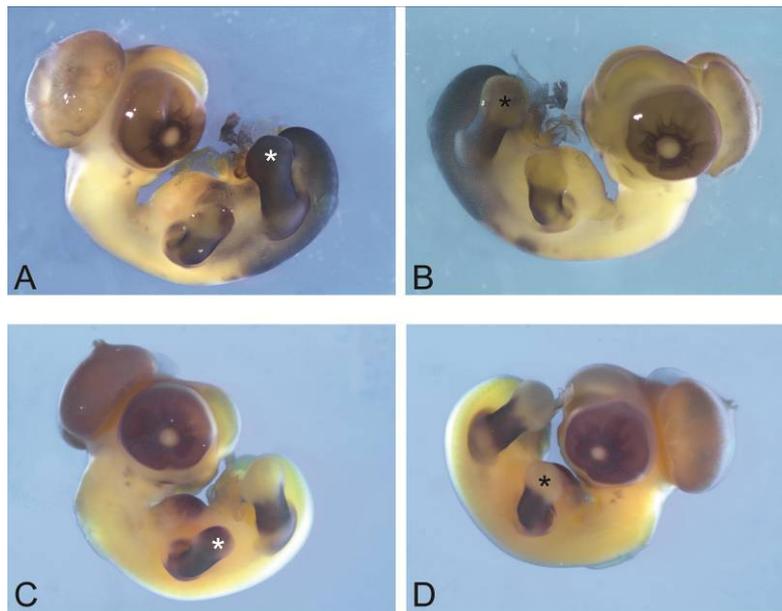


Abb. 31: *Shox*-ISH nach RCAS-SHOX-Infektion in Hühnerembryonen. (A, B): Injektion von RCAS-SHOX ins Lateralmesenchym an Tag 1,5. (C, D): Injektion von RCAS-SHOX in die Gliedmaßenanlage an Tag 3,5. Die weißen Sterne links markieren die infizierten (A, C), die schwarzen Sterne rechts die uninfizierten (B, D) Gliedmaßen, welche als Negativkontrollen dienen. A+B sowie C+D zeigen jeweils dasselbe Tier. Die Embryonen wurden an Tag 5,5 für die ISH fixiert.

Neben WISH wurden zusätzlich Schnitt-ISH durchgeführt. Die infizierten und uninfizierten Extremitäten des gleichen Embryos wurden nebeneinander eingebettet und mit dem Vibratom in 100µm dicke Schnitte geschnitten. Aneinander angrenzende Schnitte wurden mit *Shox*-, *Fgfr3*- und *Runx3*-Sonden entsprechend dem WISH-Protokoll gefärbt. Ein Problem bei der Auswertung war, dass in einigen der Schnitte die zu vergleichenden Gliedmaßen nicht exakt auf der gleichen Ebene durchtrennt wurden, was einen direkten Vergleich der Expressionsstärke verhinderte. Andere Schnitte zeigten vergleichbare Ebenen, allerdings war in *Shox*-WISH kein Unterschied zwischen infizierten und Kontrollgliedmaßen zu erkennen. Bei den Tieren mit korrekter *Shox*-Überexpression und guten Schnitten war kein eindeutiger Unterschied in der Expression von *Fgfr3* und *Runx3* zu erkennen. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch in ISH auf Kryoschnitten gefunden.

Für acht behandelte Embryonen wurden qRT-PCRs durchgeführt. Embryonen #1-4 wurden an Tag 1,5, Embryonen #5-8 an Tag 3,5 mit der Virusmischung infiziert. An Tag 5,5 wurden bei allen Tieren die infizierten und Kontrollgliedmaßen abgetrennt und die Expressionslevel von *Shox*, *Fgfr3*, *Runx3* sowie der Housekeeping-Gene *Arf1*, *H6pd* und *Sdha* bestimmt. Die normalisierten Expressionswerte zeigten bei allen getesteten Tieren einen Anstieg von *Shox* in den infizierten Gliedmaßen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 32A). Bei den für zwei Tage infizierten Tieren 5-8 war der Anstieg mit 6-84 % relativ gering, während nach 4 Tagen Infektion (Tiere 1-4) ein Anstieg von 100-800 % erreicht wurde. Die großen Schwankungen im *Shox*-Anstieg zeigen, dass sich der Infektionserfolg zwischen verschiedenen, gleich behandelten Tieren stark unterscheidet.

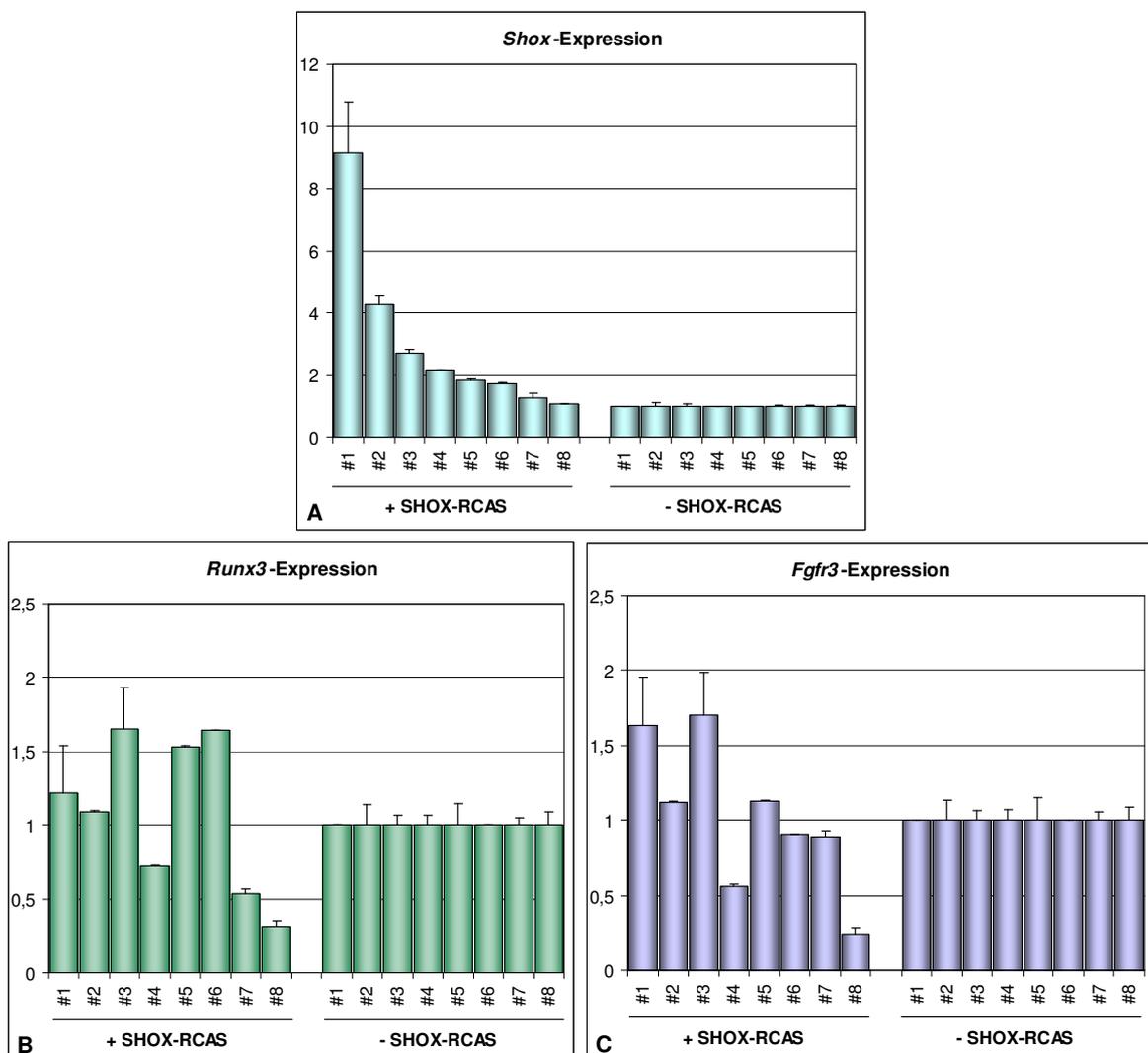


Abb. 32: Einfluss der RCAS-SHOX-Infektion auf die Expression von *Shox*, *Runx3* und *Fgfr3* in Hühnerembryonen.

Ergebnisse qRT-PCRs. (A) *Shox*-Expression. (B) *Runx3*-Expression. (C) *Fgfr3*-Expression. Hühner #1-4: Injektion des Virus an Tag 1,5; RNA-Isolierung an Tag 5,5. #5-8: Injektion des Virus an Tag 3,5; RNA-Isolierung an Tag 5,5. Die Werte für die uninfizierten Gliedmaßen wurden auf 1 gesetzt.

Runx3 reagierte in den verschiedenen Tieren unterschiedlich auf die *Shox*-Infektion (Abb. 32B). Die Expressionslevel schwankten von 30 % (#8) bis 165 % (#3) im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollgliedmaßen. Auch die *Fgfr3*-Expression zeigte keine einheitliche Reaktion (Abb. 32C). Bei einigen Tieren war ein leichter Anstieg (max. 70 %) zu sehen, bei anderen hingegen führte die *Shox*-Überexpression zu einem 75 % niedrigeren *Fgfr3*-Level. Weder für *Runx3* noch für *Fgfr3* ist eine Korrelation mit der Stärke der *Shox*-Überexpression vorhanden.

Die Überexpression von *Shox* in Gliedmaßen ist grundsätzlich ein interessanter Ansatz, erbringt aber aufgrund der Schwierigkeiten der Analyse für die hier untersuchten potentiellen SHOX-Zielgene keine verwertbaren Ergebnisse.

3.6.3. Virale RCAS-Überexpression von SHOX in Hühner-Micromass-Kulturen

Hühner-Micromass-Kulturen („chMM“) sind ein Modellsystem zur embryonalen Chondrogenese (Ahrens et al., 1977). Die Gliedmaßen von Hühnerembryonen der Stadien HH24 werden dafür isoliert, der Zellverband aufgelöst, ein kleines Volumen der erhaltenen dichten Zellsuspension in Micromass-Kulturen ausgesät und in Zellkultur gehalten. Die Zellen differenzieren in verschiedene Gewebearten, darunter überwiegend Chondrozyten, aber auch Fibroblasten und Osteoblasten. Mittels Virusinfektion kann in den Kulturen ein gewünschtes Gen überexprimiert werden und der Effekt auf die Differenzierung untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde *SHOX* in das virale RCAS-Expressionssystem kloniert, die Viruspartikel aufgereinigt und RCAS-SHOX zu den chMM-Kulturen gegeben. Als Kontrolle wurde RCAS-GFP oder kein Virus zu den Zellen gegeben. Der Einfluss von SHOX auf die Differenzierung wurde mit Alcianblau-Färbung, *in situ*-Hybridisierung sowie qRT-PCR untersucht.

Alcianblau-Färbungen

Zunächst wurden Alcianblau-Färbungen durchgeführt. Alcianblau ist ein Farbstoff, der die Sulphatgruppen der Mucopolysaccharide in der extrazellulären Matrix von Knorpelgewebe blau färbt (Lev und Spicer, 1964). Dies ermöglicht die selektive Färbung von Chondrozyten. Nach drei Tagen ist in den Alcianblau-Färbungen noch kein Unterschied zwischen SHOX-infizierten und Kontrollkulturen erkennbar. In allen Kulturen haben sich sogenannte „*Nodules*“ gebildet, Aggregate aus sich differenzierenden Chondrozyten (Ahrens et al., 1977), die anhand ihrer blauen Färbung sichtbar gemacht werden. Ab Tag 6 treten dann deutliche Abweichungen auf. Während in den Kontrollen eine kompakte Zellmasse beobachtet wird, die bis zum Rand relativ dicht ist, erkennt man bei RCAS-

SHOX die Bildung von „Satelliten-Kolonien“ am äußeren Rand. Von diesen Satelliten abgesehen scheinen die RCAS-SHOX-Kulturen generell einen etwas kleineren Durchmesser zu haben und etwas höher zu sein als die Kontrollen (Abb. 33).

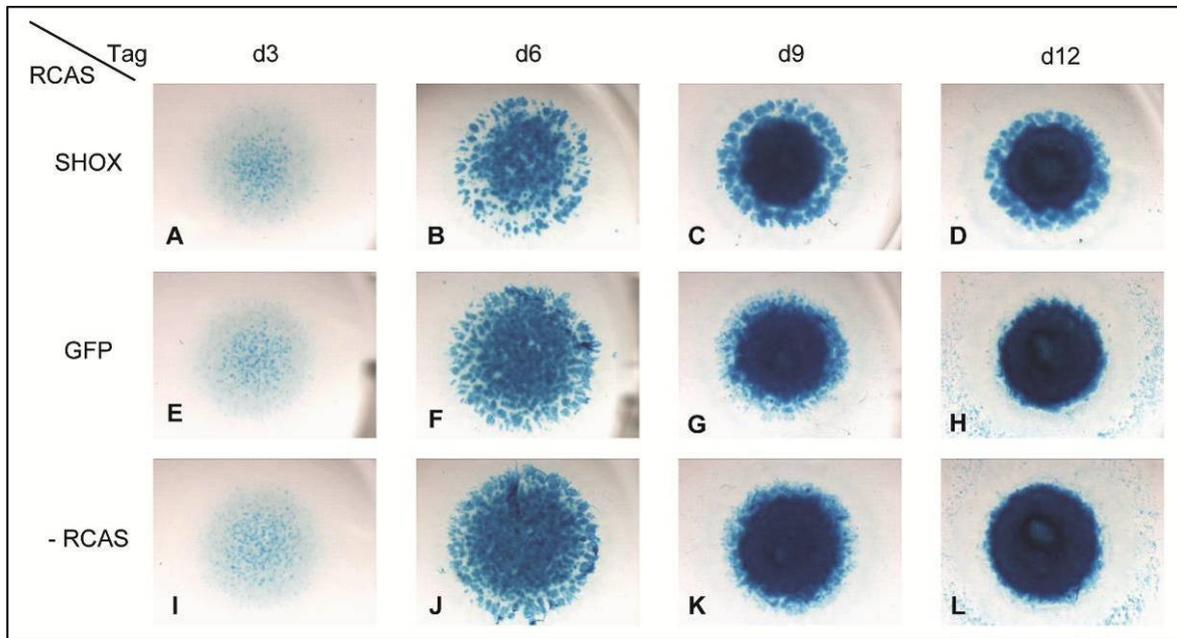


Abb. 33: Alcianblau-Färbungen von chMM-Kulturen. Kulturen infiziert mit RCAS-SHOX (A, B, C, D), RCAS-GFP (E, F, G, H) oder nicht infiziert (I, J, K, L). Übersichtsaufnahmen Tag 3 (A, E, I), Tag 6 (B, F, J), Tag 9 (C, G, K) und Tag 12 (D, H, L). 10fache Vergrößerung.

Das in den Färbungen inkorporierte Alcianblau kann durch Zugabe von 6 M Guanidin-HCl wieder herausgelöst und das Absorptionsvermögen der Lösung bei 600 nm im Photometer gemessen werden, was eine indirekte Quantifizierung der extrazellulären Matrix in den Kulturen ermöglicht. Die RCAS-Infektion scheint grundsätzlich einen schwach negativen Einfluss auf die Alcianblau-Färbung zu haben, da die RCAS-GFP-behandelten Kulturen im Vergleich zu den virusfreien Zellen 10 – 15 % weniger Alcianblau aufweisen. Die RCAS-SHOX-infizierten Kulturen zeigen von Tag 6 bis 12 durchgehend eine um circa 30 % geringere Alcianblau-Menge im Vergleich zu der Kontrolle ohne RCAS; der Effekt ist damit deutlich stärker als in der RCAS-GFP-Kontrolle (Abb. 34). SHOX erzeugt demzufolge im Vergleich zu den Kontrollen neben der veränderten Struktur eine Reduzierung der extrazellulären Matrix in den chMM-Kulturen während der Differenzierung.

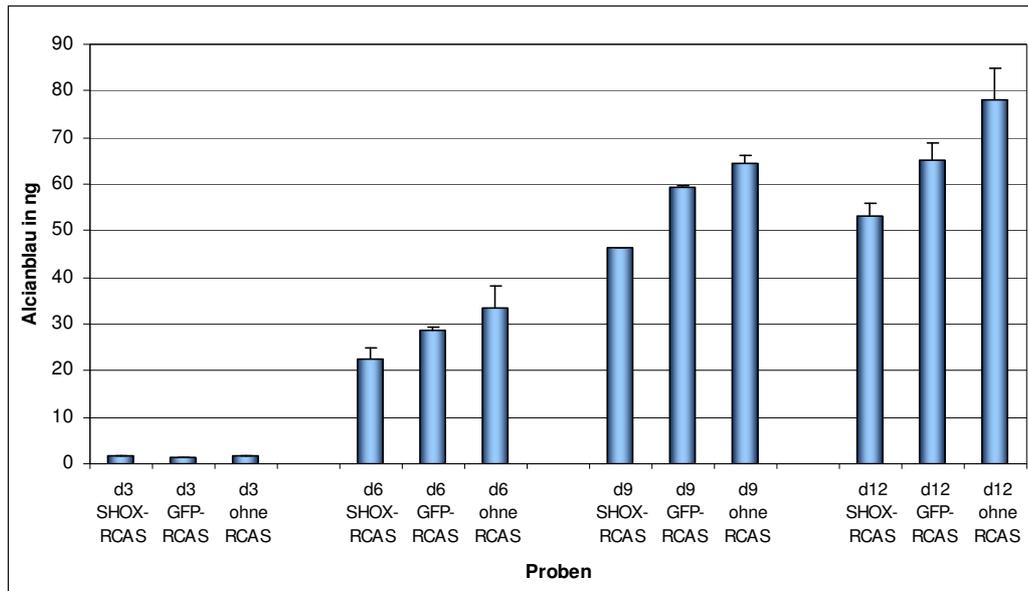


Abb. 34: Quantifizierung des inkorporierten Alcianblau in chMM-Kulturen. Messung des Absorptionsvermögens bei 600 nm; Mittelwerte und Standardabweichungen aus je drei Kulturen.

qRT-PCR

An Tag 3, 6, 9 und 12 der Differenzierung wurde RNA isoliert, diese zu cDNA umgeschrieben und in qRT-PCRs die Expressionslevel von *Shox*, verschiedener Differenzierungsmarker zur Kontrolle der durchlaufenen Differenzierungsstadien (*Agc*, *Col2a1*, *Col10a1*) sowie von *Runx3* und *Fgfr3* bestimmt.

Die Expression von *Collagen2a1*, einem Marker für kondensierte Mesenchymzellen und frühe Chondrozytenstadien (Kosher *et al.*, 1986), steigt von Tag 3 bis Tag 12 auf das Doppelte. Der Anstieg erfolgt bei RCAS-SHOX-infizierten Kulturen deutlich langsamer als in den Kontrollen, an Tag 12 sind die Unterschiede jedoch verschwunden (Abb. 35A). *Collagen10a1* wird vor allem in hypertrophen Chondrozyten und Osteoblasten exprimiert (Shen, 2005). Im Verlauf der chMM-Differenzierung von Tag 3 bis Tag 12 erhöht sich das Expressionslevel in den Kontrollen auf das 130fache, während *Shox*-Überexpression nur zu einem 35fachen Anstieg führt (Abb. 35B). *Aggrecan* ist ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix und findet sich daher vorwiegend in Knorpelgewebe (Mundlos *et al.*, 1991). Während der chMM-Differenzierung erhöht sich die *Aggrecan*-Expression in allen Kulturen auf das 5fache. RCAS-SHOX-Infektion hat an Tag 6 und 9 einen schwach negativen Einfluss auf die Expression von *Aggrecan*, der aber an Tag 12 verschwunden ist (Abb. 35C).

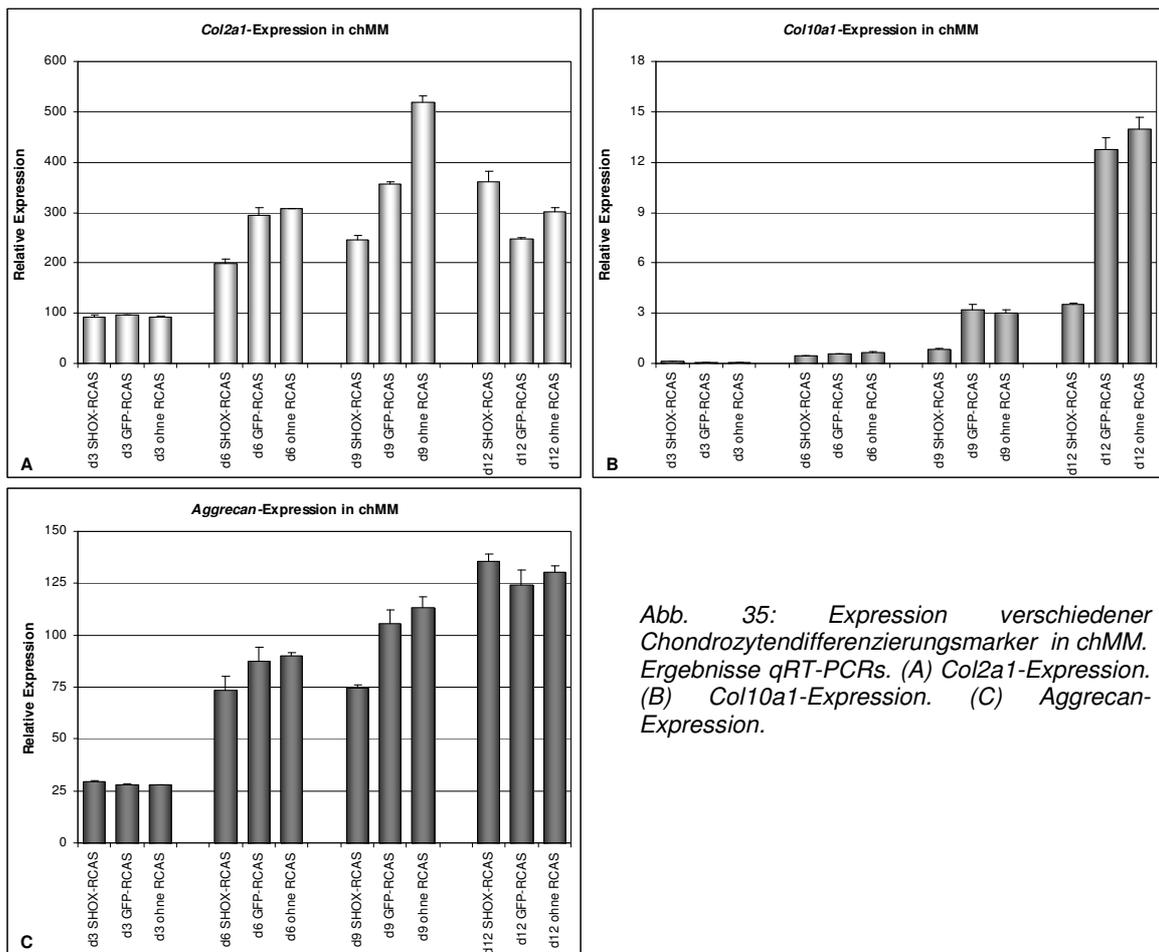


Abb. 35: Expression verschiedener Chondrozytendifferenzierungsmarker in chMM. Ergebnisse qRT-PCRs. (A) *Col2a1*-Expression. (B) *Col10a1*-Expression. (C) *Aggrecan*-Expression.

Neben der allgemeinen Chondrozytendifferenzierung wurde der Einfluss von *Shox* auf *Fgfr3*- und *Runx3*-Expression analysiert. Die RCAS-SHOX-Infektion führt zu allen Zeitpunkten zu einer deutlich stärkeren *Shox*-Expression im Vergleich zu den Kontrollexperimenten. An Tag 3 ist eine etwa 50fache, an Tag 12 eine 250fache Anreicherung der *Shox*-Transkripte messbar (Abb. 36A). Dies bestätigt die erfolgreiche RCAS-Infektion der Zellen. Die nicht infizierten Kulturen zeigen nur schwache Änderungen der *Shox*-Expression: Im Vergleich zu Tag 3 und 6 sinkt die Expression an Tag 9 und 12 auf ca. 50 %.

Die Regulation von *Runx3* ließ sich nicht reproduzierbar bestimmen. In einem Experiment schien auch *Runx3* durch *Shox* negativ reguliert zu werden (Abb. 36C), in einem anderen war dieser Effekt nicht zu sehen (Abb. 36D).

Im Gegensatz dazu ist das *Fgfr3*-Expressionslevel zu allen untersuchten Zeitpunkten nach *Shox*-Überexpression deutlich geringer als in den Kontrollen. Während die *Fgfr3*-Expression in den Kontrollkulturen im Verlauf der chMM-Differenzierung ansteigt, bleibt sie nach RCAS-SHOX-Infektion relativ konstant (Abb. 36B).

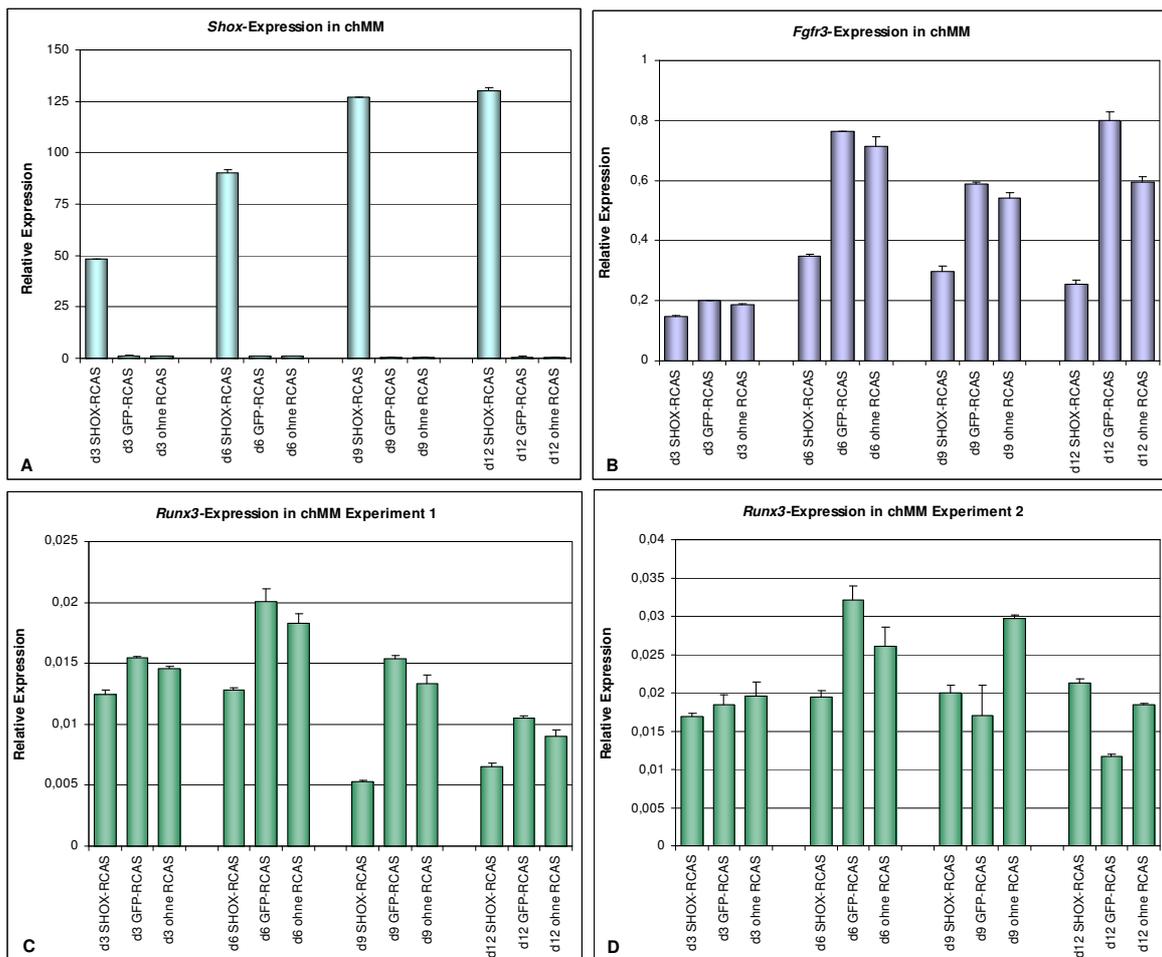


Abb. 36: Expression von *Shox*, *Fgfr3* und *Runx3* in chMM-Kulturen. Ergebnisse qRT-PCRs. (A) *Shox*-Expression. (B) *Fgfr3*-Expression. (C, D) *Runx3*-Expression in unterschiedlichen Experimenten.

In situ-Hybridisierung

Die Expression von *Shox*, *Fgfr3* und *Runx3* in Hühner-Micromass-Kulturen verschiedener Zeitpunkte wurde neben qRT-PCRs auch mittels WISH untersucht. Nach RCAS-SHOX-Infektion zeigen WISH-Ergebnisse wie erwartet einen sehr starken Anstieg der *Shox*-Expression (Abb. 37). Endogenes *Shox* ist an Tag 3 in den meisten Zellen der Kultur schwach exprimiert, in einigen Einzelzellen ist die Expression deutlich stärker (Abb. 37 D, F). An Tag 6 ist *Shox* in den meisten Zellen mittelstark exprimiert, zusätzlich erkennt man einige Bereiche mit deutlich erhöhtem *Shox*-Level (Abb. 37 J, L).

Eine Expression von *Runx3* findet man an Tag 3 sehr schwach in allen Zellen, es gibt nur geringe Unterschiede in der Expressionsstärke innerhalb der Kultur. An Tag 6 ist die

Expression stärker und etwas ungleichmäßiger in den Kulturen verteilt (Abb. 38). Es ist kein klarer Einfluss der *Shox*-Überexpression auf *Runx3* zu erkennen.

Fgfr3 ist an Tag 3 vor allem in kleinen Zellverbänden exprimiert; das Expressionsmuster ähnelt stark den „Nodules“, die bei der Alcianblau-Färbung beobachtet wurden (Abb. 39 A-F; Abb. 33 A, E, I). Im Vergleich zu den Kontrollen ist die Expression nach RCAS-SHOX-Infektion deutlich schwächer. An Tag 6 ist *Fgfr3* in den meisten Zellen exprimiert, auch hier erinnert die Färbung an die Alcianblau-positiven Zellen (Abb. 39 G-L; Abb. 33 B, F, J). Die RCAS-SHOX-Infektion hat einen leicht negativen Einfluss auf die *Fgfr3*-Expression.

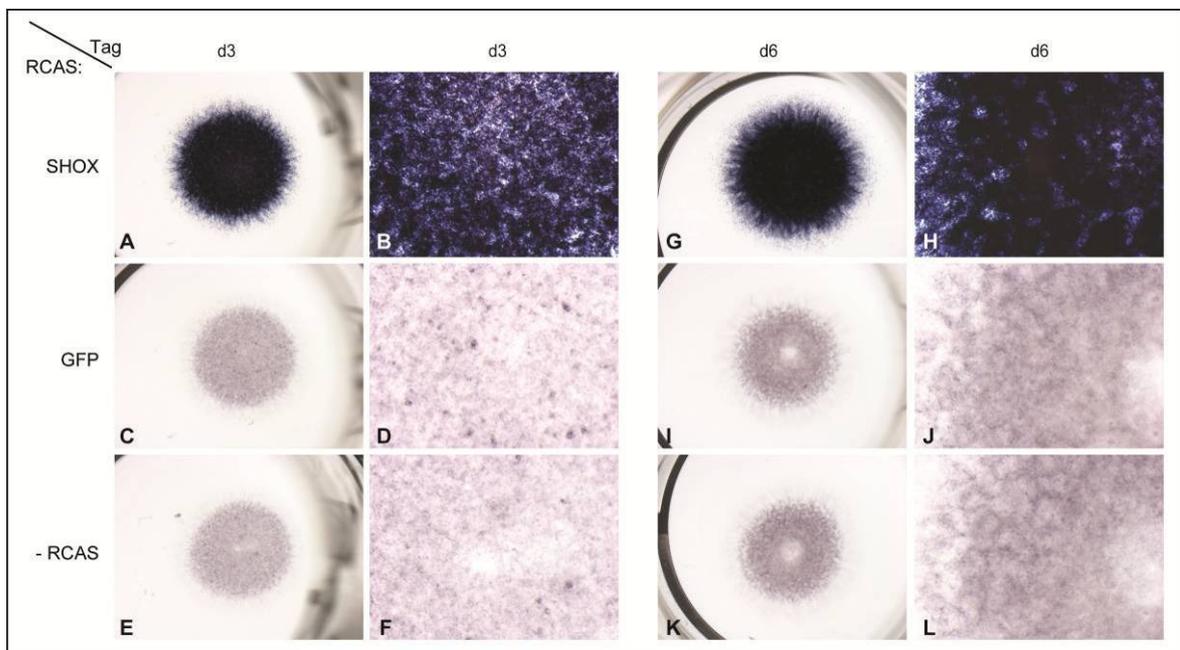


Abb. 37: *Shox* in situ-Hybridisierungen auf chMM-Kulturen.

(A-F): *Shox*-Expression an Tag 3. (G-L): *Shox*-Expression an Tag 6. Kulturen infiziert mit RCAS-SHOX (A, B, G, H), RCAS-GFP (C, D, I, J) oder nicht infiziert (E, F, K, L). Übersichtsbilder 10x-Vergrößerung (A, C, E, G, I, K). Detailansichten 25x-Vergrößerung (B, D, F, H, J, L).

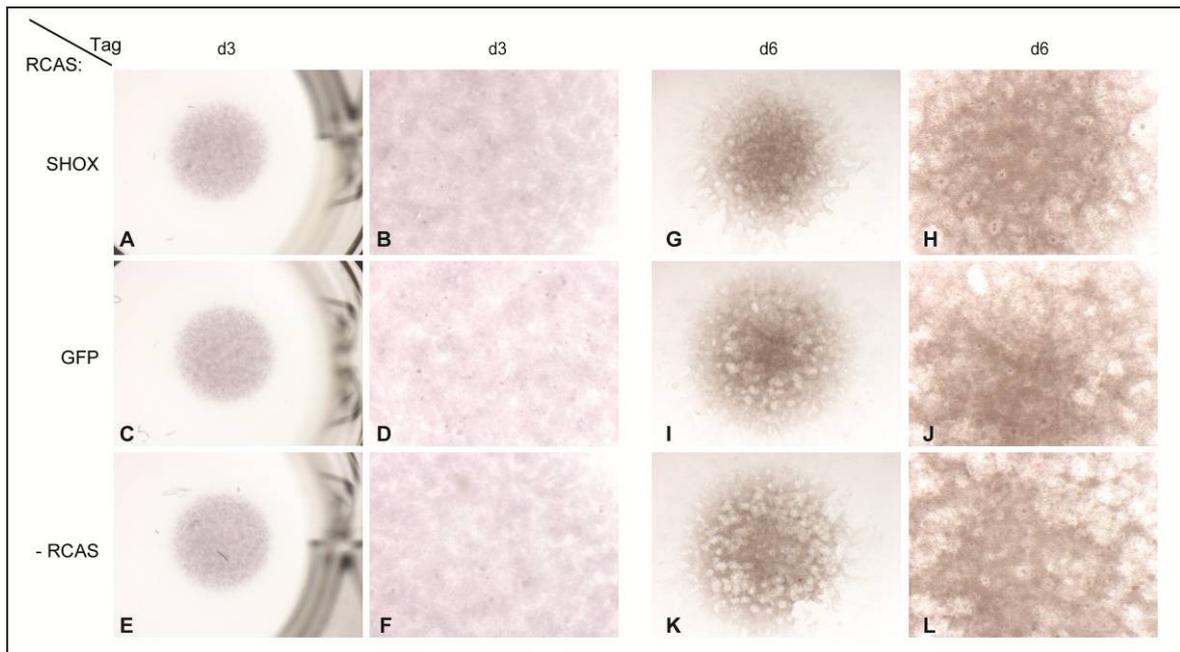


Abb. 38: Runx3 in situ-Hybridisierungen auf chMM-Kulturen.

(A-F): Runx3-Expression an Tag 3. (G-L): Runx3-Expression an Tag 6. Kulturen infiziert mit RCAS-SHOX (A, B, G, H), RCAS-GFP (C, D, I, J) oder nicht infiziert (E, F, K, L). Übersichtsbilder 10x-Vergrößerung (A, C, E) 12,5x-Vergrößerung (G, I, K). Detailansichten 25x-Vergrößerung (B, D, F), 32x-Vergrößerung (H, J, L).

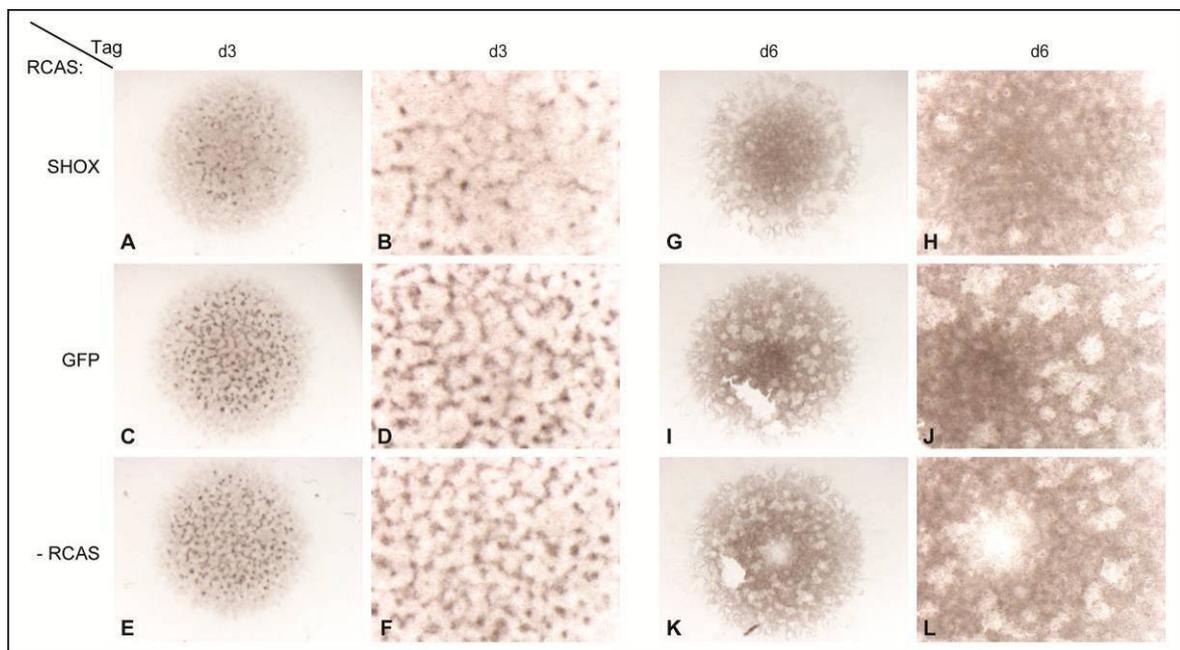


Abb. 39: Fgfr3 in situ-Hybridisierungen auf chMM-Kulturen.

(A-F): Fgfr3-Expression an Tag 3. (G-L): Fgfr3-Expression an Tag 6. Kulturen infiziert mit RCAS-SHOX (A, B, G, H), RCAS-GFP (C, D, I, J) oder nicht infiziert (E, F, K, L). Übersichtsbilder 12,5x-Vergrößerung (A, C, E, G, I, K). Detailansichten 32x-Vergrößerung (B, D, F, H, J, L).

Zusammenfassend erhält man aus der chMM-Differenzierungs-Experimenten folgende Ergebnisse: Shox beeinflusst vor allem die hypertrophe Differenzierung von Chondrozyten, da die *Collagen10a1*-Expression durch Shox stark negativ reguliert wird. Auf die Expression von *Collagen2a1* und *Aggrecan*, Markern für frühe Chondrozytenstadien, wirkt sich die RCAS-SHOX-Infektion im Vergleich deutlich schwächer aus. Die *Collagen2a1*-Daten deuten auf eine leichte Verzögerung früher Stadien der Chondrogenese hin.

Runx3 zeigt weder in *Whole Mount in situ*-Hybridisierungen noch in qRT-PCR eine eindeutige und reproduzierbare Reaktion auf *Shox*-Überexpression. *Fgfr3* hingegen wird während der chMM-Differenzierung durch Shox negativ reguliert, was mittels *Whole Mount in situ*-Hybridisierungen und qRT-PCR gezeigt werden konnte. Eine negative Regulation in diesem System könnte die sich gegenseitig ausschließenden Expressionsmuster erklären, die in Hühnerembryonen beobachtet wurden.

.

4. Diskussion

4.1. Verwendete Modellsysteme

Der Homöobox-Transkriptionsfaktor SHOX spielt eine wichtige Rolle in der Gliedmaßenentwicklung. So verursachen *SHOX*-Defizienzen verschiedene Kleinwuchssyndrome und sind mit Fehlbildungen der Wachstumsfuge assoziiert (Marchini *et al.*, 2007b). Bisher ist jedoch erst wenig darüber bekannt, welche Gene durch SHOX gesteuert werden. In der vorliegenden Arbeit sollten daher durch SHOX regulierte Gene in der Gliedmaßenentwicklung identifiziert werden, um besser verstehen zu können, wie SHOX zum korrekten Ablauf dieses Prozesses beiträgt.

Dafür wurden zunächst verschiedene Zelllinien verwendet. Unter den in diesen Systemen erhaltenen, potentiellen Zielgenen wurde nach bekannten Faktoren der Gliedmaßenentwicklung gesucht. Da die Funktion von Transkriptionsfaktoren meist gewebespezifisch ist und von der zellulären Umgebung abhängt, wurde die Regulation dieser Faktoren im Anschluss in verschiedenen Modellsystemen zur Gliedmaßenentwicklung, Chondrogenese und enchondralen Ossifikation getestet.

4.1.1. Zellkulturexperimente

In einem ersten Ansatz sollte eine induzierbare *SHOX*-Knockdown-Zelllinie etabliert werden, um über einen Vergleich der Genexpression in induzierten und nicht induzierten Zellen einen Überblick über *SHOX*-Zielgene zu erhalten. Für dieses Experiment wurde die Chondrosarkom-Zelllinie U2OS verwendet, die als eine von wenigen Zelllinien überhaupt *SHOX* exprimiert. Überdies ist diese Zelllinie in der Mehrzahl der Publikationen, die funktionelle *SHOX*-Analysen beschreiben, verwendet worden, und erlaubt daher eine gute Vergleichbarkeit (Marchini *et al.*, 2004; Sabherwal *et al.*, 2004a; Sabherwal *et al.*, 2004b; Schneider *et al.*, 2005; Marchini *et al.*, 2006; Marchini *et al.*, 2007a). Rao *et al.* (2001) konnten zudem zeigen, dass das Transaktivierungspotential von SHOX in den osteogenen U2OS deutlich stärker ist als in anderen Zelllinien, darunter beispielsweise die embryonalen Nierenzellen HEK-293. Die Autoren mutmaßten daher, dass U2OS-Zellen für SHOX essentielle Cofaktoren exprimieren und daher ein geeignetes Modellsystem zur Identifizierung neuer Zielgene darstellen.

Die Überexpression von Transkriptionsfaktoren kann aufgrund der großen Proteinmenge unspezifische Reaktionen in der Zelle auslösen. Eine transiente Transfektion von Zellen führt generell, abhängig von den Transfektionsreagenzien, zu einer verhältnismäßig großen Zahl von unspezifischen Regulationen (Jacobsen *et al.*, 2009). Aus diesem Grund wurde zunächst eine stabile, induzierbare Knockdown-Zelllinie transienten Experimenten

vorgezogen. Ein weiterer Vorteil dieses Versuchsansatzes war, dass neben einem *SHOX*-Knockdown durch einfache Rekombination eines *SHOX*-cDNA-Konstruktes in die Parentalzellen eine Überexpression im gleichen System zur Verifizierung der Knockdown-Daten möglich ist. Durch strenge Selektion und Kontrolle der Parentalzelllinie sollte ausgeschlossen werden, dass die induzierbaren Konstrukte ohne Doxycyclinzugabe exprimiert werden und das System undicht ist. So wurde in verschiedene Parentalzelllinien ein induzierbares, *hcRed*-exprimierendes Konstrukt (pDEST-TR-*hcRed*) rekombiniert und über FACS analysiert. Die *hcRed*-Rekombinanten von vier verschiedenen Parentalzelllinien zeigten dabei sehr gute Ergebnisse; *hcRed* wurde ausschließlich nach Doxycyclinzugabe exprimiert. Dies zeigt, dass der durch den Parentalvektor exprimierte TET-Repressor in diesen Zelllinien zur Unterdrückung der Expression der induzierbaren Konstrukte ausreichend war. Die Rekombination dieser geeigneten Parentalzelllinien mit verschiedenen induzierbaren *SHOX*-miRNA-Vektoren ergab jedoch zahlreiche Probleme. So war eine *SHOX*-Expression in vielen Klonen durch qRT-PCRs nicht mehr messbar, was eine Quantifizierung des Knockdowns verhinderte. Bei Klonen mit ausreichend starker *SHOX*-Expression war nach Doxycyclin-Induktion kein Unterschied vorhanden. In Kontrolleexperimenten mit einem etablierten *LMNA*-miRNA-Konstrukt konnte ebenfalls kein Effekt nachgewiesen werden. Rekombination mit einem induzierbaren *SHOX*-cDNA-Konstrukt zeigte schließlich, dass das Zellsystem trotz aller vorhergegangenen Kontrollen sehr undicht war. Möglicherweise liegt dies daran, dass die Analyse der *hcRed*-Rekombinanten über FACS weniger sensitiv war als die späteren qRT-PCR-Messungen für *SHOX* und *LMNA*.

Da die stabile Zelllinie nicht die geforderten Ansprüche erfüllte, wurden transiente Experimente durchgeführt. Zur Vermeidung der vorher erwähnten unspezifischen Ergebnisse wurden zahlreiche Kontrolleexperimente durchgeführt. In Überexpressions-Experimenten wurden neben *SHOX-WT* auch *SHOX*-Mutanten, *SHOX2* oder der leere Expressionsvektor transfiziert. Außerdem wurden verschiedene Transfektionsmethoden (Lipofectamine2000, Lonza Nucleofector Kits) verwendet. Aufgrund aller genannten Kontrollen ist davon auszugehen, dass die in den transienten Zellkulturexperimenten erhaltenen Ergebnisse spezifisch sind.

Neben U2OS wurden in den transienten Experimenten zusätzlich humane Fibroblasten (NHDF) verwendet. Dabei handelt es sich um Primärzellen, die im Gegensatz zur Chondrosarkom-Zelllinie U2OS deutlich weniger chromosomale Veränderungen aufweisen. Zudem ist das Expressionslevel von *SHOX* in NHDF verhältnismäßig hoch (ca. 5x höher als in U2OS), weshalb *SHOX*-Knockdown-Experimente zuverlässig möglich

sind. In den Microarrays der Überexpressionsexperimente konnte für 15 % der Gene, die in U2OS SHOX-abhängig reguliert waren, auch in NHDF eine Regulation gezeigt werden. Umgekehrt waren sogar 30 % der Gene der NHDF-Experimente in U2OS ebenfalls reguliert. Die für weitere Analysen ausgewählten Gene *FGFR3* und *RUNX3* wurden in beiden Zellsystemen SHOX-abhängig reguliert.

Einige der in den Zellmodellen gefundenen Zielgene spielen eine Rolle in der Gliedmaßenentwicklung. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass weitere wichtige Gene, die ebenfalls in diesem Prozess eine Rolle spielen, in den verwendeten Zellsystemen nicht identifiziert wurden, da die Regulation auf das entsprechende Gewebe beschränkt ist.

4.1.2. Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Chondrozyten

Die Differenzierung von humanen fötalen, mesenchymalen Stammzellen (MSCs) ist ein etabliertes Modellsystem zur Chondrogenese (Sekiya *et al.*, 2002; Bernardo *et al.*, 2007; Emons *et al.*, in Vorbereitung). Über die Messung der Expression spezifischer Chondrozytenmarker lässt sich dabei der Differenzierungsverlauf kontrollieren. So sollte während einer korrekten Differenzierung zunächst die Expression von *COL2A1*, dann von *COL10A1* stark ansteigen. Diese Ergebnisse wurden prinzipiell in drei der fünf durchgeführten Experimente beobachtet, allerdings war der exakte Differenzierungsverlauf in allen Ansätzen unterschiedlich. Das Differenzierungspotential hing dabei stark vom Zelldonor und der Passage ab, in der die Differenzierung gestartet wurde.

Frühere Arbeiten hatten Hinweise auf ein hohes *SHOX*-Expressionslevel an Tag 0 gegeben, das dann während der Differenzierung deutlich absinkt (Dr. A. Marchini, persönliche Mitteilung). Aufgrund dieser Daten sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die Expressionsänderungen von *SHOX* mit der Expression putativer Zielgene korrelieren. Falls dies der Fall sein sollte, würde das auf eine Rolle der Regulation in der Chondrozytendifferenzierung hinweisen. Entgegen der Ausgangshypothese ließ sich jedoch keine starke Änderung der *SHOX*-Expression nachweisen. Eine gleichmäßige Expression in diesem System wurde auch für zahlreiche andere, in der Differenzierung wichtige Gene gezeigt (Sekiya *et al.*, 2002). Die Autoren geben zwei denkbare Erklärungen an: Möglicherweise reichen bereits kleine Änderungen auf mRNA-Ebene für einen starken Effekt in der Entwicklung aus, oder das System ist zu simpel, und die für starke Expressionsänderungen notwendige Gradienten sind nicht vorhanden.

Die Expression von *RUNX3* schwankt während der Differenzierung etwas stärker als die von *SHOX*. So ist in allen Experimenten ein Anstieg von *RUNX3* während der ersten Woche der Differenzierung messbar, welcher danach wieder zurückgeht. Es ist generell

eine leicht negative Korrelation von *SHOX* und *RUNX3* zu beobachten. In MSC-Microarray-Experimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass insbesondere zu frühen Differenzierungszeitpunkten viele Gene signifikante Änderungen ihrer Expression zeigen: Zwischen Tag 0 und 7 handelt es sich dabei um 1452 Gene, zwischen Tag 0 und 14 sogar um 2041 Gene (Emons *et al.*, in Vorbereitung). Aufgrund der nicht komplett identischen Resultate und der begrenzten Anzahl reproduzierbarer Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit kann daher keine sichere Aussage darüber gemacht werden, ob und inwiefern die geringen Änderungen des *SHOX*-Expressionslevels für die Änderungen der *RUNX3*-Expression verantwortlich sind.

Im Gegensatz zu *RUNX3* zeigt *FGFR3* keine Korrelation mit *SHOX*. Generell steigt die Expression von Tag 0 zu Tag 21 oder 28 gleichmäßig an. Problematisch ist jedoch, dass der Anstieg der *FGFR3*-Expression zwischen diesen beiden Zeitpunkten in verschiedenen Experimenten Werte von 15fach bis 3000fach erreicht und damit nicht reproduzierbar ist.

Die Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen zu Chondrozyten ist in dieser Form kein geeignetes Modellsystem zur Verifizierung von *SHOX*-Zielgenen. Das Differenzierungspotential und der Verlauf schwanken je nach Zellentnahmezeitpunkt, Zelldonor und Passage sehr stark, und *SHOX* zeigt zu keinen Zeitpunkt wesentliche Änderungen des Expressionslevels, wodurch ein Bezug zur Zielgenexpression schwierig ist. Ein weiteres Problem ist, dass die *SHOX*-Expression in diesem System nur schwer manipulierbar ist. Daher wurden in anschließenden Experimenten unter anderem Hühner-Micromass-Kulturen verwendet, die ein weiteres Modell zur Chondrogenese darstellen, in dem viele der in der MSC-Differenzierung auftretenden Probleme vermieden werden können.

4.1.3. Hühnerembryonen und Hühner-Micromass-Kulturen

Im Gegensatz zur Mehrzahl aller menschlichen Gene kommt *SHOX* nicht in der Maus vor. In verschiedenen *Shox*-Studien wurden daher Hühnerembryonen als Modellsystem verwendet (Tiecke *et al.*, 2006; Sabherwal *et al.*, 2007; Durand *et al.*, 2010). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die endogene Expression von *Shox* und von *Shox*-Zielgenen in den sich entwickelnden Gliedmaßen analysiert und verglichen.

Hühner haben im Vergleich zum Mausmodell den Nachteil, dass experimentell keine klassischen Knockout-Tiere generiert werden können. Da es jedoch verhältnismäßig einfach ist, die sich entwickelnden Gliedmaßen während der Embryonalentwicklung zu manipulieren, haben Hühnerexperimente viel zum Verständnis der Prozesse während der Gliedmaßenentwicklung beigetragen (Tickle, 2004). Neben Transplantationsexperimenten und Behandlung mit in bestimmten Faktoren getränkten Beads spielte dabei auch das

RCAS-Retrovirussystem eine wichtige Rolle. RCAS-Viren (Replication-Competent avian leukemia virus long with a Splice acceptor) bieten die Möglichkeit, jedes gewünschte Gen in Gliedmaßen von Hühnerembryonen zu exprimieren (Bronner-Fraser, 1996; Gordon *et al.*, 2009). Diese virusvermittelte Überexpression bietet gegenüber Elektroporationen den Vorteil, dass sich das Virus selbstständig um die Injektionsstelle ausbreitet und damit zu gleichmäßigerer und weitläufigerer Überexpression führt. In dieser Arbeit wurden Hühnerembryonen an Tag 1,5 oder Tag 3,5 mit einem RCAS-SHOX-Virus infiziert und an Tag 5,5 analysiert. Dafür wurden jeweils die infizierten Flügel bzw. Beine mit den entsprechenden nicht infizierten Gliedmaßen des gleichen Embryos verglichen. Generell war dabei eine Zeitabhängigkeit zu beobachten; so war die *Shox*-Überexpression in den für vier Tage infizierten Embryonen im infizierten Körperteil deutlich stärker als nach nur zwei Tagen Infektion. Für zukünftige Experimente sollte daher vorzugsweise die frühe Infektion durchgeführt werden, um an Tag 5,5 einen messbaren Effekt zu erreichen. Eine weitere Möglichkeit wäre, an Tag 3,5 infizierte Embryonen erst zu einem späteren Zeitpunkt zu analysieren.

Die Auswirkungen der RCAS-SHOX-Infektion auf die Zielgenexpression in den Hühnerembryonen waren verhältnismäßig schlecht zu quantifizieren. So schwankte die Effizienz der Infektion zwischen verschiedenen Tieren innerhalb der Gruppen relativ stark, wie sowohl in *in situ*-Hybridisierungen als auch mittels qRT-PCRs gezeigt werden konnte (Abb. 32). Zur Kontrolle der Infektionseffizienz wurden in allen Experimenten SHOX- und GFP-Viruspartikel coinfiziert. Da die GFP-Signale jedoch generell sehr schwach und aufgrund von Problemen mit den vorhandenen Binokularen und Lichtfiltern nur schlecht auswertbar waren, konnte nicht für jedes Tier die Effizienz der Infektion nachgewiesen werden. *Whole Mount in situ*-Hybridisierungen für potentielle Zielgene waren daher schwierig zu interpretieren, da keine Informationen über die Infektionseffizienz im jeweiligen Tier vorhanden waren (n=4 je Zielgen). Doppel-WISH für *Shox* und *Fgfr3* oder *Runx3* ließen sich nicht etablieren, so dass kein direkter Vergleich der *SHOX*- und Zielgenexpression im gleichen Tier möglich war. In qRT-PCRs gab es große Unterschiede in der Regulation der Zielgene zwischen verschiedenen Tieren (n=8). Dies hängt möglicherweise damit zusammen, dass bei der Entfernung der Gliedmaßen schon kleinste Unterschiede darin, an welcher Stelle die Gliedmaßen vom Körper abgetrennt werden, große Auswirkungen auf die Expressionsmessungen haben können.

Prinzipiell ist die Überexpression von *Shox* in den sich entwickelnden Gliedmaßen im Hühnerembryo ein sinnvoller Ansatz. Die Quantifizierung der Zielgenregulation war in den durchgeführten Experimenten jedoch schwierig. Aufgrund der geringen Anzahl getesteter Tiere ist keine statistische Auswertung der Unterschiede möglich. In zukünftigen Studien

sollten daher spätere Zeitpunkte nach längerer Infektionsdauer sowie mehr Embryonen analysiert werden, um eindeutige Effekte zu erhalten.

Neben Experimenten in Hühnerembryonen wurden zusätzlich Hühner-Micromass-Kulturen („chMM“) verwendet. Diese sind, ähnlich wie die MSC-Differenzierung, ein Modellsystem für Chondrogenese und enchondrale Ossifikation (Ahrens *et al.*, 1977; Mello und Tuan, 1999). Im Vergleich zu den MSCs hat dieses System jedoch einige Vorteile. So differenzieren die aus Gliedmaßen von 4,5 Tage alten Hühnerembryonen gewonnenen Zellen ohne Zugabe spezifischer Faktoren überwiegend automatisch zu Chondrozyten. Die Differenzierungsergebnisse mehrerer Versuchsdurchführungen waren reproduzierbar. Außerdem kann durch Infektion mit RCAS-SHOX das *Shox*-Expressionslevel beeinflusst werden. Mit *in situ*-Hybridisierungen und qRT-PCRs konnte nachgewiesen werden, dass alle Zellen der Kultur nach Infektion eine starke *Shox*-Expression aufweisen. Die Messung der Expression potentieller Zielgene durch qRT-PCR und *in situ*-Hybridisierungen ist deutlich zuverlässiger als in den Embryonen.

Interessanterweise ändert sich die endogene Expression von *Shox* in den chMM während der Differenzierung nur wenig. Sie ist an Tag 3 und 6 am höchsten und sinkt an Tag 9 und 12 auf ca. 50 % des Ausgangslevels ab. *Shox* scheint demzufolge in allen Stadien der Chondrogenese relativ gleichmäßig vorzuliegen.

Tiecke *et al.* (2006) hatten ebenfalls *Shox* in chMM überexprimiert. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnten sie zeigen, dass eine RCAS-SHOX-Infektion zu schwächerer Alcianblau-Färbung an Tag 4 bis 7 im Vergleich zu RCAS-GFP-Kontrollen führte. Hühner-Micromass-Kulturen stellen demnach ein einfaches, zuverlässiges Zellmodell zur Untersuchung der Rolle von *Shox* während der Chondrogenese dar.

4.2. Regulation von RUNX3 durch SHOX

4.2.1. RUNX3 (runt related transcription factor 3)

RUNX3 gehört zusammen mit RUNX1 und RUNX2 zur Familie der Runt-related Transkriptionsfaktoren (Bangsow *et al.*, 2001). Alle drei Transkriptionsfaktoren sind wichtige Regulatoren während der Embryogenese und Organogenese. RUNX1 reguliert die Hämatopoese und ist in der Bildung vieler Arten von Lymphomen involviert (Okuda *et al.*, 2001), RUNX2 ist notwendig für eine korrekte Knochenbildung (Komori *et al.*, 1997). RUNX3 spielt eine wichtige Rolle bei Bildung und Wachstum des Magenepithels (Li *et al.*, 2002), im peripheren Nervensystem (Inoue *et al.*, 2002; Inoue *et al.*, 2008) und bei der Bildung von Immunzellen (Taniuchi *et al.*, 2002; Whiteman und Farrell, 2006). In ca. 45 – 60 % aller Magenkrebsfälle ist die *RUNX3*-Expression durch Deletion oder

Hypermethylierung reduziert, weshalb RUNX3 als wichtiger Tumorsuppressor in vielen Geweben gilt (Subramaniam *et al.*, 2009). Mutationen von *RUNX3* im Menschen im Zusammenhang mit Knochenbildung sind bisher noch nicht beschrieben.

Über die Expression und Funktion von *Runx3* in der Gliedmaßenentwicklung gibt es bisher vergleichsweise wenige Veröffentlichungen, die ausschließlich auf Experimenten in Mäusen basieren (Stricker *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2004; Soung do *et al.*, 2007). So konnte durch verschiedene Kombinationen von *Runx2*- und *Runx3*-Knockout-Mäusen gezeigt werden, dass die Proteine essentiell für die Reifung der Chondrozyten sind; in Doppel-Knockout-Mäusen (*Runx2^{-/-}Runx3^{-/-}*) fand keine Differenzierung zu terminalen hypertrophen Chondrozyten und anschließende Mineralisierung statt. Die Funktionen von *Runx2* und *Runx3* waren hier teilweise redundant und die Gliedmaßen abhängig von der verbliebenen *Runx2*- und/oder *Runx3*-Dosis verkürzt (Yoshida *et al.*, 2004).

Runx3 ist in den Gliedmaßen von Mäusen der Stadien E11.5 bis E18.5 in den prähypertrophen und frühen hypertrophen Chondrozyten sowie dem Perichondrium exprimiert. Im distalen Bereich ist in den sich entwickelnden Fingerknochen ab Tag 13,5 eine spezifische Färbung zu erkennen (Stricker *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2004). Diese Daten stimmen nicht vollständig mit den Expressionsdaten im Hühnerembryo überein, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben werden. Die hier gezeigte *Runx3*-Expression in *Whole Mount in situ*-Hybridisierungen ist im Bereich der Finger und des Unterarms deutlich unspezifischer als in der Maus in vergleichbaren Stadien (Abb. 28) (Stricker *et al.*, 2002). Das liegt möglicherweise daran, dass die Sonden in den *Whole Mount in situ*-Hybridisierungen im Huhn das Gewebe nur schlecht penetrieren und daher die verschiedenen Knorpelstadien in der Mitte der Extremitäten nicht korrekt gefärbt werden. Auch die Schnitt-ISH an Tag 6 im Huhn (Abb. 30) zeigt nicht exakt das in Mäusen vergleichbarer Stadien (E13.5) gefundene Expressionsmuster. In den Längsschnitten von Metatarsus und Zehenknochen ist im gesamten sich entwickelnden Knochengewebe eine sehr schwache Färbung vorhanden, es ist allerdings kein Unterschied in Bezug auf verschiedene Chondrozytenstadien vorhanden. Ähnlich wie in der Maus ist eine *Runx3*-Expression im Huhn im Perichondrium zu finden. Es bleibt unklar, ob die gefundenen Unterschiede methodisch bedingt sind oder auf Unterschieden in den Modellsystemen Maus und Huhn basieren.

In Experimenten in immortalisierten Maus-Gliedmaßenknospenzellen konnte gezeigt werden, dass *Runx3*-Überexpression einen inhibierenden Effekt auf frühe Chondrozytenmarker (*Collagen2a1*) und einen induzierenden Effekt auf späte Chondrozytenmarker (*Collagen10a1*, *Alkalische Phosphatase*) hat. Als Modell der Chondrozytendifferenzierung wurden Micromass-Kulturen aus Maus-Gliedmaßenknospen verwendet, in denen während der gesamten Differenzierungsdauer *Runx3* nachgewiesen werden konnte. So

stieg das *Runx3*-Expressionslevel während der Differenzierung von Tag 3 bis Tag 14 gleichmäßig auf das 12fache an, um dann an Tag 21 wieder den Ausgangswert zu erreichen (Soung do *et al.*, 2007). Die Maus-Micromass-Kulturen basieren auf dem gleichen Ansatz wie die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Hühner-Micromass-Kulturen. In diesen Hühner-Micromass-Kulturen blieb das *Runx3*-Expressionslevel jedoch während der für 12 Tage durchgeführten Chondrozytendifferenzierung von leichten Schwankungen abgesehen gleich (Abb. 36). Auch hier ist noch unklar, ob die Unterschiede durch die Methodik oder die verschiedenen Modellsysteme bedingt sind.

4.2.2. Experimentelle Daten zur Regulation von RUNX3 durch SHOX

In der vorliegenden Arbeit konnte in verschiedenen Experimenten eine positive Regulation von *RUNX3* durch *SHOX* gezeigt werden. So führt *SHOX*-Überexpression in zwei verschiedenen Zellsystemen (U2OS und NHDF) jeweils zu einem Anstieg von *RUNX3*-mRNA und *RUNX3*-Protein. Im Gegensatz dazu ist kein eindeutiger Effekt nach *SHOX*-Knockdown zu erkennen. Dies könnte bedeuten, dass *SHOX* zwar *RUNX3* regulieren kann, aber für eine korrekte Expression nicht essentiell ist und bei *SHOX*-Mangel andere Faktoren ausreichend sind. Mittels Luciferase-Reportergen-Assays konnte ein positiver Effekt von *SHOX* auf den Bereich *RUNX3* -703/ +1229bp nachgewiesen werden. Es ist unklar, ob diese Regulation durch eine direkte Bindung von *SHOX* ausgelöst wird. In ChIP-Seq-Experimenten in NHDF und U2OS wurde keine Bindestelle von *SHOX* im *RUNX3*-Promotor identifiziert, was aber nicht ausschließt, dass eine Bindung möglich ist. Zurzeit werden in Kooperation mit Dr. J. Hecht, MPI für Molekulare Genetik, Berlin, Shox-ChIP-Seqs aus chMM-Kulturen durchgeführt, deren Ergebnisse aber noch ausstehen. Möglicherweise ergeben diese Experimente neue Hinweise auf den Regulationsprozess. In den *SHOX*-Überexpressionsexperimenten wurde jedoch erst nach 24 Stunden eine starke *RUNX3*-Regulation gefunden, was eher auf eine indirekte Steuerung der *RUNX3*-Expression durch *SHOX* hinweist.

Neben Experimenten in Zellkultur wurde die Regulation in verschiedenen Modellsystemen untersucht. Nach RCAS-*SHOX*-Infektion von Hühnerembryonen und Micromass-Kulturen wurde kein reproduzierbarer Effekt auf *Runx3* gefunden (Abb. 32, Abb. 36). In diesen Experimenten zeigte *Runx3* generell ein leicht schwankendes, von *Shox* unabhängiges Expressionslevel. In den uninfizierten Micromass-Kontroll-Kulturen war ein Anstieg der *Runx3*-Expression um maximal 50 % von Tag 3 zu Tag 6 messbar; bis Tag 12 sank sie wieder auf den Ausgangswert von Tag 3 oder etwas darunter ab (Abb. 36). Ähnlich wie *Shox* zeigt *Runx3* in diesem System endogen nur geringe Schwankungen.

Während der Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen ist eine negative Korrelation von *RUNX3* zum *SHOX*-Expressionslevel zu sehen. Die

vorhandenen Daten reichen allerdings nicht aus, um sicher sagen zu können, ob diese Korrelation zufällig ist oder durch *SHOX* verursacht wird.

Ein Zusammenhang von *SHOX* und *RUNX3* wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Es wurde jedoch ein Zusammenhang zwischen dem *SHOX*-Paralog *Shox2* und *Runx3* beobachtet. In Experimenten mit *Shox2*-Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die *Runx2*- und *Runx3*-Expression in proximalen Gliedmaßelementen stark reduziert ist. Folglich reguliert *Shox2* die Gene *Runx2* und *Runx3* positiv und ist notwendig für die korrekte Expression von *Runx2* und *Runx3* (Cobb *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2007). In Kontrollexperimenten hatte eine Überexpression von *SHOX2* in U2OS-Zellen jedoch keinen Effekt auf die *RUNX3*-Expression, daher ist davon auszugehen, dass die Regulation durch *SHOX* spezifisch ist und *SHOX* und *SHOX2* in diesem System keine Redundanz zeigen. Möglicherweise hat *Shox2* in Nagern, die kein endogenes *Shox* besitzen, die Rolle von *Shox* bei der Regulation von *Runx3* übernommen.

4.2.3. Biologische Bedeutung der Regulation

Shox und *Runx3* sind in vielen Bereichen der sich entwickelnden Gliedmaßen in Hühnerembryonen coexprimiert. Eine Regulation von *Runx3*, welches eine Rolle in der Chondrozytenreifung und Wachstumsfugenorganisation spielt, würde eine Erklärung für den Einfluss von *Shox* auf die Gliedmaßenentwicklung bieten. In Experimenten in Hühnerembryonen und Hühner-Micromass-Kulturen war jedoch keine eindeutige Korrelation von *Shox*-Expression und *Runx3*-Expression zu beobachten. Dies kann mehrere Gründe haben. Viele Homöobox-Transkriptionsfaktoren benötigen Cofaktoren, um gewebespezifisch Zielgene zu regulieren (Mann und Affolter, 1998). Vermutlich sind auch für eine korrekte Regulation von *Runx3* in den Gliedmaßen ein oder mehrere endogene Cofaktoren notwendig, die nach *Shox*-Überexpression möglicherweise nur in begrenzter Menge zur Verfügung stehen und daher den *Shox*-Effekt einschränken können. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass einige Faktoren ihre Expression in der Gliedmaßenentwicklung selbst über komplexe Feedback-Loops steuern, die stark zeit- und ortsabhängig sind (Benazet *et al.*, 2009; Zeller *et al.*, 2009). Insbesondere in den Micromass-Kulturen werden aufgrund der Methodik jedoch sämtliche normalerweise während der Gliedmaßenentwicklung vorhandenen Gradienten zunächst zerstört, so dass sich eine gewebespezifische Regulation, die von einem oder mehreren Faktoren abhängig ist, nur schwer einpendeln kann. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Regulation zu einem späteren Zeitpunkt in der Gliedmaßenentwicklung stattfindet und die dafür benötigten zellulären Bedingungen in den durchgeführten Experimenten nicht vorlagen.

Möglicherweise spielt die Regulation aber auch keine Rolle in der Gliedmaßenentwicklung, sondern ist in anderen Geweben relevant. In RT-PCRs konnte gezeigt werden,

dass *RUNX3* und *SHOX* in einer Vielzahl von menschlichen Geweben coexprimiert werden (Abb. 12). Daher ist es denkbar, dass eine spezifische Regulation von *RUNX3* durch *SHOX* beispielsweise im Muskel, im Verdauungstrakt oder im Neuralgewebe eine Rolle spielt.

4.3. Regulation von FGFR3 durch SHOX

4.3.1. FGFR3 (fibroblast growth factor receptor 3)

FGFR3 codiert für einen von vier eng verwandten Rezeptoren für Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (fibroblast growth factor receptor, FGFR1-4), die alle ähnlich aufgebaut sind. Sie bestehen aus einer extrazellulären Liganden-Bindungsdomäne, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne, die eine Tyrosin-Kinase enthält. Die Bindung spezifischer Liganden bewirkt eine Dimerisierung des Rezeptors, die anschließend zur Autophosphorylierung wichtiger Tyrosine in der intrazellulären Domäne führt. Als Ligand von FGFR3 können verschiedene FGFs (fibroblast growth factors) dienen, darunter FGF1, -2, -4, -8, -9, -17, -18 und -23 (Eswarakumar *et al.*, 2005). Über Adaptor- und Signalproteine, welche direkt an die phosphorylierten Stellen von FGFR3 binden, können innerhalb der Zelle verschiedene Signalwege aktiviert werden. Dabei handelt es sich um die MAPK-, STAT-, PKC- und P13K/AKT-Pathways. Diese Signalwege regulieren unter anderem Matrixbildung, Zellproliferation, Calciumkonzentration in der Zelle sowie das Überleben der Zelle (Abb. 40) (Harada *et al.*, 2009).

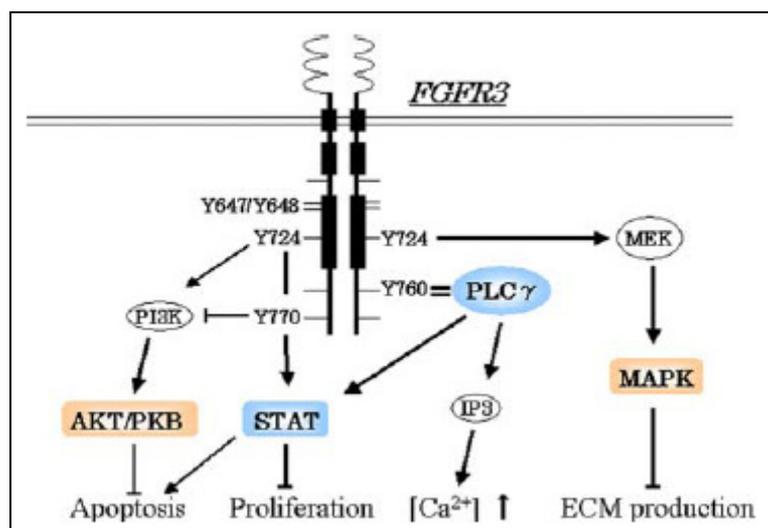


Abb. 40: Intrazelluläre Signalkaskade nach Aktivierung von FGFR3. Schematische Darstellung der verschiedenen Signalwege downstream des aktivierten FGFR3. AKT/PKB = Proteinkinase B; STAT = Signal Transducers and Activators of Transcription; MAPK = Mitogen-aktivierte Proteinkinase; PLC γ = Phospholipase C-gamma; PI3K = Phosphoinositid-3-Kinase; IP3 = Inositoltriphosphat; MEK = MAPK/ERK Kinase; ECM = Extrazelluläre Matrix (Harada *et al.*, 2009).

Die Rolle von *FGFR3* ist eng mit der Gliedmaßenentwicklung verknüpft. Mutationen in *FGFR3* verursachen, abhängig von der betroffenen Aminosäure, unter anderem Achondroplasie, die häufigste Form menschlichen Zwergwuchses, sowie Hypochondroplasie und Thanatophore Dysplasie (Passos-Bueno *et al.*, 1999; Horton *et al.*, 2007). Alle diese mit Skelettfehlbildungen assoziierten Kleinwuchssyndrome werden durch Gain-of-Function-Mutationen ausgelöst; je höher die Aktivität des Rezeptors, umso ausgeprägter ist der Phänotyp (Naski *et al.*, 1996). Loss-of-Function-Mutationen von *FGFR3* im Menschen verursachen dagegen Großwuchs (Toydemir *et al.*, 2006). Dieser Effekt konnte auch in *Fgfr3*-Knock-Out-Mäusen (Deng *et al.*, 1996; Eswarakumar und Schlessinger, 2007) und Schafen mit einer *Fgfr3*-Loss-of-Function-Mutation (Smith *et al.*, 2006) bestätigt werden. Aufgrund dieser Beobachtungen gilt *FGFR3* als negativer Regulator des Knochenwachstums.

FGFR3 wird in menschlichen Gliedmaßenknospen ab CS13 bis CS16 diffus und schwach im Mesenchym exprimiert. Ab CS17 differenzieren die Mesenchymzellen zu Chondrozyten, und *FGFR3* wird im gesamten Knorpelgewebe exprimiert. Zu Beginn der Ossifikation (CS18) findet man *FGFR3* überwiegend in den proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten. Die Expression in hypertrophen Chondrozyten ist noch in späten Fötalstadien (Woche 33) vorhanden, während die proliferierenden Zellen nur noch wenig *FGFR3* exprimieren (Delezoide *et al.*, 1998).

Das *Fgfr3*-Expressionsmuster im Huhn ähnelt dem im Menschen. In den Gliedmaßenknospen ist in frühen Stadien zunächst kein *Fgfr3* exprimiert (Wilke *et al.*, 1997; Walshe und Mason, 2000), ab HH21/22 ist eine diffuse mesenchymale Expression zu beobachten (Noji *et al.*, 1993; Szebenyi *et al.*, 1995). Bei Beginn der Knorpelbildung (HH26) konzentriert sich die Expression von *Fgfr3* auf die entstehenden Chondrozyten. Im Stadium HH36 ist das Knorpelgerüst des Skeletts vollständig ausgebildet. *Fgfr3* wird nun vor allem in ruhenden und proliferierenden Chondrozyten exprimiert (Szebenyi *et al.*, 1995), was einen Gegensatz zur Expression in hypertrophen Chondrozyten im Menschen darstellt. Auch in Mäuseembryonen wird *Fgfr3* vor allem in ruhenden und proliferierenden Chondrozyten exprimiert (Peters *et al.*, 1993; Yu und Ornitz, 2007).

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Expression von *Fgfr3* im Huhn entspricht den publizierten Daten. In frühen Gliedmaßenknospen ist *Fgfr3* nicht vorhanden, (Abb. 28, Abb. 29), später (HH28/29, Tag 6) wird eine Expression im Bereich der differenzierenden Chondrozyten beobachtet (Abb. 30).

Die postnatale Rolle von *FGFR3* ist bisher nur wenig untersucht worden. So ist über die Expression von *FGFR3* in Wachstumsfugen von Kindern oder Jugendlichen nichts bekannt. In Wachstumsfugen von jungen Ratten wurde *Fgfr3* sowohl in proliferierenden

als auch in hypertrophen Chondrozyten in großer Menge nachgewiesen (Lazarus *et al.*, 2007).

Szebenyi *et al.* (1995) haben die Expression von *Fgfr3* in Hühner-Micromass-Kulturen untersucht. Für Tag 3 der Differenzierung wurde nachgewiesen, dass die Alcianblau-gefärbten Chondrozyten-*Nodules* *Fgfr3* exprimieren. Diese Beobachtung konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Abb. 33, Abb. 39).

4.3.2. Experimentelle Daten zur Regulation von FGFR3 durch SHOX

In verschiedenen Zellsystemen konnte gezeigt werden, dass die *FGFR3*-Expression durch SHOX reguliert wird. *SHOX*-Überexpression in U2OS- und NHDF-Zellen führte zu einem Anstieg, *SHOX*-Knockdown in NHDF-Zellen zu einem Rückgang der *FGFR3*-Expression. Überexpression funktionsloser *SHOX*-Mutanten sowie des *SHOX*-Paralogs *SHOX2* hatte keinen Effekt auf *FGFR3*. Die Microarray-Ergebnisse zeigten keine Änderung der *FGFR1*, -2 und -4-Expression nach *SHOX*-Überexpression. Diese Ergebnisse in Kombination mit der Reaktion auf den *SHOX*-Knockdown zeigen, dass die *FGFR3*-Regulation durch SHOX sehr spezifisch ist. Allerdings konnten diese auf mRNA-Level gezeigten Unterschiede nach *SHOX*-Überexpression nicht auf Proteinebene bestätigt werden.

Eine virusvermittelte *Shox*-Überexpression in den Gliedmaßen von Hühnerembryonen zeigte keinen konsistenten Effekt. Allerdings ist in diesem System eine Quantifizierung der *Fgfr3*-Regulation relativ schwierig (vgl. Abschnitt 4.1.3). In Hühner-Micromass-Kulturen führte *Shox*-Überexpression hingegen zu einer deutlichen und reproduzierbaren Reduktion des *Fgfr3*-Expressionslevels in qRT-PCR-Messungen. An Tag 3 der Differenzierung wurde in *in situ*-Hybridisierungen gezeigt, dass *Fgfr3* überwiegend in den Chondrozyten-*Nodules* exprimiert wird. Auch zu späteren Zeitpunkten findet man *Fgfr3* vor allem in den Chondrozyten. Die RCAS-*SHOX*-Infektion führt zu einem leicht verlangsamten Ablauf der Chondrozytendifferenzierung im Vergleich zu Kontrollen. Es wäre daher theoretisch möglich, dass die Reduktion der *Fgfr3*-Expression ausschließlich darauf zurückzuführen ist, dass die *Fgfr3*-exprimierenden Zellen in geringerer Zahl vorliegen und *Fgfr3* damit nur indirekt von *Shox* reguliert wird. Allerdings ist der Effekt von *Shox* auf die Anzahl der differenzierten Chondrozyten, welche über Alcianblau-Färbung der extrazellulären Matrix und qRT-PCR von *Collagen2a1* bestimmt wurde, mit im Durchschnitt 30 % weniger Zellen deutlich schwächer als die Unterschiede der *Fgfr3*-Expression mit bis zu 60 % Reduktion von *Fgfr3*. Gegen einen indirekten, zellabhängigen Effekt sprechen auch die Ergebnisse der RCAS-GFP-Infektion. Wie in Abb. 34 für RCAS-GFP gezeigt, führt eine RCAS-Infektion unspezifisch zu 10-15 % weniger extrazellulärer

Matrix als in uninfizierten Kontrollen. Auch die *Collagen2a1*-Expression wird durch RCAS-GFP leicht reduziert (Abb. 35). Trotz der geringeren Anzahl an Chondrozyten ist die *Fgfr3*-Expression jedoch nach RCAS-GFP-Infektion gleich stark oder etwas stärker als in den Kontrollen (Abb. 36).

Auch die *in situ*-Hybridisierungen zeigen eine schwächere Expression von *Fgfr3* nach *Shox*-Infektion und bestätigen damit die Daten der qRT-PCR. Insbesondere an Tag 3 ist der Effekt sehr auffällig; dort ist die *Fgfr3*-Expression in den *Nodules* in den Kontrollen deutlich stärker als nach *Shox*-Überexpression. Interessanterweise ist zu diesem Zeitpunkt noch kein Unterschied in der Alcianblau-Färbung und *Collagen2a1*-Expression zwischen *Shox*-Infektion und Kontrollen messbar. *Fgfr3* unterdrückt die Proliferation und fördert die Differenzierung von Chondrozyten (Davidson *et al.*, 2005). Möglicherweise spielt bei der in den Hühner-Micromass-Kulturen beobachteten Verzögerung der Chondrogenese nach *Shox*-Überexpression die *Shox*-abhängige Herunterregulation von *Fgfr3* eine Rolle.

In den Gliedmaßen von Hühnerembryonen verschiedener Entwicklungsstadien zeigten *Shox* und *Fgfr3* überwiegend sich gegenseitig ausschließende Expressionsmuster (Abb. 28, Abb. 29, Abb. 30). Diese Beobachtung ist schwer mit einer positiven Regulation in Einklang zu bringen. Der negative Effekt von *Shox* auf *Fgfr3* in den Micromass-Kulturen lässt jedoch auf eine Repression der *Fgfr3*-Expression durch *Shox* in embryonalem Extremitätengewebe schließen. In diesem Fall ist es plausibel, dass in Bereichen mit starker *Shox*-Expression kein *Fgfr3* vorhanden ist.

Grundsätzlich konnte in Experimenten in verschiedenen Zell- und Modellsystemen gezeigt werden, dass SHOX die *FGFR3*-Expression gewebespezifisch positiv oder negativ regulieren kann. Interessanterweise ist *FGFR3* nicht das einzige Gen, für das dies zutrifft. So konnte auch für *IL8* beobachtet werden, dass *SHOX*-Überexpression in NHDF-Zellen (normalen humanen Hautfibroblasten) negativ regulierend wirkt, während das gleiche Experiment in synovialen Fibroblasten, die aus Gelenkflüssigkeit isoliert wurden, die *IL8*-Expression erhöht (Bender *et al.*, in Vorbereitung). Beim Vergleich der Microarray-Ergebnisse nach *SHOX*-Überexpression fällt außerdem auf, dass in U2OS 80 % der unterschiedlich exprimierten Gene positiv reguliert wurden, während in NHDF der Anteil positiver und negativer Regulation fast ausgeglichen war (Tabelle A-D im Anhang). Diese Daten bestätigen die gewebeabhängige Funktion von SHOX als Aktivator oder Repressor der Transkription.

Die Daten der CHIP und CHIP-Seq sowie die EMSA-Ergebnisse lassen vermuten, dass die Regulation der *FGFR3*-Expression durch direkte Bindung von SHOX vermittelt wird.

Die EMSA-Ergebnisse implizieren, dass mehrere SHOX-Bindestellen nebeneinander vorliegen. In einer aktuellen Veröffentlichung wurde gezeigt, dass das gehäufte Auftreten mehrerer Bindestellen eines spezifischen Transkriptionsfaktors in vielen Promotoren und Enhancern auftritt. Diese Cluster sind evolutiv konserviert, was auf eine wichtige Rolle in der Regulierung der spezifischen Genexpression hinweist (Gotea *et al.*, 2010). Die Existenz mehrerer SHOX-Bindestellen für die Regulation von *FGFR3*, einem wichtigen Gen in der Gliedmaßenentwicklung, erscheint in diesem Zusammenhang zweckmäßig. In EMSA-Experimenten konnte eine Bindung von SHOX an vier verschiedene DNA-Sequenzen gezeigt werden, die über einen Bereich von 1300 bp verstreut liegen (Abb. 23). Die Mutation von drei Basen innerhalb der AT-Palindrome in einem der getesteten Oligonukleotide verhinderte diese Bindung (Abb. 22). Beim Vergleich der vier EMSA-positiven Sequenzen fällt jedoch auf, dass die als wichtig für die SHOX-Bindung vermuteten AT-Palindrome (TAAT und ATTA) nicht konserviert sind. Von insgesamt acht Palindromen in den vier Bindestellen ist beispielsweise zwischen Mensch und Maus nur ein Palindrom konserviert, was jedoch aufgrund der Tatsache, dass Shox endogen nicht in Mäusen vorhanden ist, nicht überraschend ist. Für Hühner liegen in diesem Bereich keine vergleichbaren Sequenzinformationen vor, aber ein Vergleich zwischen Mensch und Hund zeigt ebenfalls keine Konservierung der Palindrome. Interessanterweise liegen jedoch alle EMSA-Bindestellen in zu mindestens 60 % konservierten Bereichen (Vergleich Mensch mit Maus oder Hund; ECR-Browser), was unabhängig von den AT-Palindromen auf eine funktionelle Konservierung dieser Bereiche hinweist.

Es ist bekannt, dass EMSA-Ergebnisse von der verwendeten Methodik abhängig sind und sich nicht immer *in vivo* bestätigen lassen (Roder und Schweizer, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch auch in CHIP-Experimenten eine Anreicherung verschiedener DNA-Bereiche nachgewiesen werden. Auch die in Luciferase-Reportergen-Assays erhaltenen Daten unterstützen die Hypothese, dass mehrere DNA-Bereiche für eine Regulation notwendig sind, die allerdings nicht komplett mit den im EMSA gezeigten Sequenzen übereinstimmen. In Luciferase-Reportergen-Assays ließ sich kein minimaler Bereich eingrenzen, der ausreichend für die SHOX-abhängige Transaktivierung ist, wie es beispielsweise für ein 90 bp kurzes DNA-Fragment im erweiterten Promotor des SHOX-Zielgens *BNP* gezeigt wurde (Marchini *et al.*, 2007a). Jede der im EMSA gezeigten SHOX-Bindestellen ist allein nicht ausreichend für eine SHOX-abhängige Regulation: Die 60-91 bp langen, in EMSAs positiv getesteten DNA-Sequenzen mit der jeweiligen SHOX-Bindestelle wurden vor ein Luciferasegen kloniert, eine Überexpression von *SHOX* hatte in diesem Experiment jedoch keinen Effekt auf deren Aktivität. Ähnliche Beobachtungen wurden auch schon für andere Bindestellen beschrieben, wie z.B. der Cbfa1-abhängigen Regulation von *Dmp1* (Jian *et al.*, 2002) oder auch für die Bindung von Runx3 an den *Ihh*-

Promotor im EMSA, die in Luciferase-Reportergen-Assays keine Auswirkungen hatte (Yoshida *et al.*, 2004). In diesen Publikationen wurden jedoch jeweils 900-1300 bp lange Sequenzen in den Reportergenkonstrukten verwendet, im Gegensatz zur Beschränkung auf die tatsächliche Bindestelle in der vorliegenden Arbeit. Eine der in früheren Luciferase-Reportergen-Assays getesteten Sequenzen, die eine vergleichbare Länge mit den publizierten Daten hatte und zwei der vier potentiellen SHOX-Bindestellen enthielt (FGFR3 -3430 bp/+2495 bp), zeigte jedoch ebenfalls keine Transaktivierung nach SHOX-Überexpression und bestätigt damit, dass eine Bindung von SHOX an diese Sequenzen alleine nicht ausreichend für eine Regulation ist. Die Transaktivierungsfähigkeit des Konstruktes FGFR3 -1318bp/+485bp (enthält keine SHOX-Bindestelle) ist in U2OS allerdings nur halb so stark wie die von FGFR3 -3430bp/+485bp (enthält drei SHOX-Bindestellen) und belegt damit, dass der Bereich, der die SHOX-Bindestellen enthält, zumindest zur Regulation beitragen kann.

Eine mögliche Erklärung für die Luciferase-Ergebnisse ist, dass SHOX für die Regulation mit einem Cofaktor interagieren muss, der an eine andere, etwas entfernt liegende DNA-Sequenz bindet, weshalb sich keine Minimalsequenz eingrenzen lässt. Für die Notwendigkeit von Cofaktoren spricht auch, dass SHOX gewebeabhängig positiv oder negativ regulierend auf *FGFR3* wirken kann. Über mögliche Cofaktoren von SHOX ist bisher noch nichts bekannt.

Interessanterweise wurde für die Regulation von *Fgfr3* schon gezeigt, dass *in vitro*-Bindung nicht quantitativ mit der *in vivo*-Aktivität einer Bindestelle korreliert sein muss. Reinhold *et al.* (2004) identifizierten im Promotor von *Fgfr3* in der Maus eine 49 bp umfassende Sequenz, die putative Erkennungssequenzen für mehrere transkriptionelle Regulatoren enthält. Die Sequenz entspricht im menschlichen Genom den Basen -3278 bis -3229 bp vor FGFR3 (60 % Konservierung, 29/49 bp) und enthält damit Teile der SHOX-bindenden Sequenz FGFR3 -3262/-3171bp. In EMSA-Experimenten konnten die Autoren unter anderem die Bindung eines unbekanntes Proteinkomplexes zeigen, die durch Mutation der Bindestelle verhindert wurde. Diese Mutation hatte jedoch keinen Einfluss auf die Transkriptionsaktivität in Luciferase-Assays.

SHOX-Überexpression führte in Zellkulturexperimenten zu einem Anstieg der FGFR3-Expression, der sich aber nicht auf die Proteinmenge übertragen ließ. Dies deutet darauf hin, dass auf Translationsebene zusätzliche Regulationsmechanismen stattfinden, die vermutlich durch die sehr hohe Menge an *FGFR3*-mRNA ausgelöst werden. Die Daten des Hühner-Modellsystems zeigen jedoch eine Herunterregulation von *Fgfr3* durch Shox. In zukünftigen Experimenten sollte auch in diesem System die Proteinmenge bestimmt

werden, um sicherzustellen, dass Shox nicht nur die *Fgfr3*-mRNA-Menge, sondern auch die Proteinmenge beeinflusst.

Die in verschiedenen Experimenten erhaltenen Daten zeigen, dass *FGFR3* in verschiedenen Zellsystemen (U2OS, NHDF, chMM) spezifisch durch SHOX reguliert wird. Diese Regulation wird wahrscheinlich durch eine direkte Bindung von SHOX an eine oder mehrere verschiedene Sequenzen upstream von *FGFR3* vermittelt. Unterschiede zwischen EMSAs und Luciferase-Reporter-Gen-Assays sind möglicherweise durch Bindung zusätzlich benötigter Cofaktoren bedingt.

4.3.3. Biologische Bedeutung der Regulation

FGFR3 inhibiert die Proliferation und fördert die Differenzierung von Chondrozyten, weshalb es als negativer Regulator des Knochenwachstums gilt (Deng *et al.*, 1996; Davidson *et al.*, 2005). Gain-of-Function-Mutationen führen folglich zu einer desorganisierten Wachstumsfuge und zu Zwergwuchs (Legeai-Mallet *et al.*, 2004; Horton *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu ist SHOX ein positiver Regulator der Knochenlänge (Rao *et al.*, 1997; Ottesen *et al.*, 2010). Eine positive Regulation von *FGFR3* durch SHOX, wie sie in Zellkultur gefunden wurde, ist daher in den Gliedmaßen mit den bekannten menschlichen Phänotypen prinzipiell nicht vereinbar. Wenn man jedoch anhand der im Hühnersystem gefundenen Daten schlussfolgert, dass die *FGFR3*-Expression durch SHOX reprimiert wird, findet man eine gute Korrelation der Phänotypen. Durch *SHOX*-Defizienz ausgelöster Kleinwuchs betrifft überwiegend die Knochen des Zeugopodiums (mesomelischer Kleinwuchs, Verkürzung von Ulna/Radius und Tibia/Fibula), während *FGFR3*-Gain-of-Function-Mutationen stärker das Stylopodium beeinflussen (rhizomelischer Zwergwuchs; Verkürzung von Ulna/Radius und Tibia/Fibula, sehr starke Verkürzung von Humerus und Femur) (Abb. 41).

Eine mögliche Hypothese zur Erklärung der menschlichen Phänotypen ist, dass die Regulation von *FGFR3* durch SHOX vor allem im Zeugopodium relevant ist. *SHOX*-Defizienz würde demzufolge zu einer erhöhten Menge von *FGFR3* in Ulna und Radius sowie Tibia und Fibula führen, was dort eine schnellere Schließung der Wachstumsfuge und damit die relative Verkürzung dieser Knochen bedingen würde. Im Normalfall würde SHOX generell die Expression von *FGFR3* im Zeugopodium niedriger halten als im Stylopodium. *FGFR3*-Gain-of-Function-Mutationen würden daher im Stylopodium einen stärkeren Effekt zeigen. Zur Unterstützung dieser Hypothese ist es notwendig die Expressionslevel von *FGFR3* in Wachstumsfugen verschiedener Knochen zu analysieren, was bisher noch nicht untersucht wurde. Für *SHOX* ist bereits bekannt, dass die Expression im Embryo vor allem im Zeugopodium, weniger im Stylopodium vorhanden ist

(Clement-Jones *et al.*, 2000), aber auch hier fehlen noch quantitative Daten aus Wachstumsfugen von Kindern und Jugendlichen.

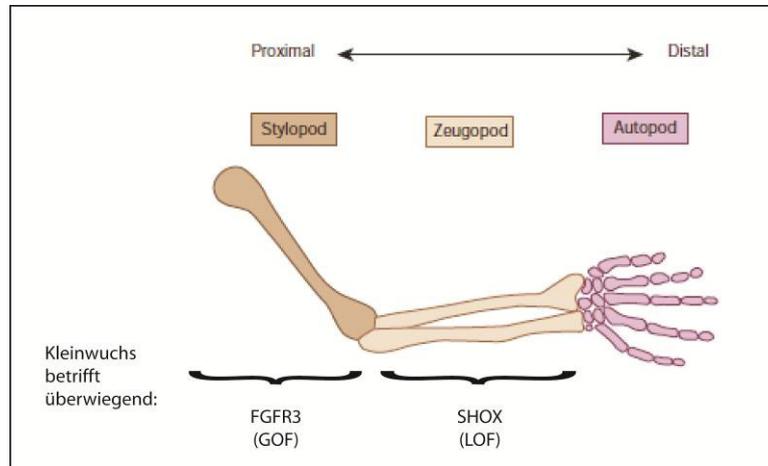


Abb. 41: Einfluss von *SHOX*- und *FGFR3*- Mutationen auf die Gliedmaßenentwicklung. GOF = Gain-of-Function-Mutationen; LOF = Loss-of-Function-Mutationen. Abbildung verändert aus Mariani und Martin (2003).

SHOX-Defizienz und *FGFR3*-Gain-of-Function-Mutationen verursachen einen ähnlichen Phänotyp in der Wachstumsfuge. In beiden Fällen ist die Säulenordnung der proliferierenden Chondrozyten gestört, und Chondrozyten verschiedenster Stadien befinden sich direkt nebeneinander. Es gibt jedoch kleine Unterschiede. *SHOX*-Defizienz führt zu einer verkleinerten Proliferationszone und einer vergrößerten hypertrophen Zone, während *FGFR3*-Gain-of-Function-Mutationen mit kleineren und weniger hypertrophen Chondrozyten assoziiert werden konnten (Evans *et al.*, 1988; Iwata *et al.*, 2000; Munns *et al.*, 2001; Legeai-Mallet *et al.*, 2004). Trotz dieser Unterschiede würde aber auch in diesem Gewebe die Repression der *FGFR3*-Expression durch *SHOX* den beschriebenen Phänotypen entsprechen.

Neben der Knochenlänge beeinflusst *Fgfr3* auch die Dicke des kortikalen Knochens. So konnte in *Fgfr3*^{-/-}-Mäusen gezeigt werden, dass die Knochen länger und der kortikale Knochen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren des gleichen Wurfes deutlich dünner waren (Eswarakumar und Schlessinger, 2007). Interessanterweise erhält man ähnliche Daten auch in transgenen Mäusen, die menschliches *SHOX* unter der Kontrolle eines *Col2a1*-Promotors exprimieren. Das in Mäusen endogen nicht vorhandene *SHOX* führt in den transgenen Tieren zu längeren Gliedmaßenknochen und einer geringeren Dicke des kortikalen Knochens (K. U. Schneider, unpublizierte Daten). Auch in diesem Modellsystem

würde eine negative Regulation von *Fgfr3* durch SHOX die beobachteten Phänotypen erklären. Diese Hypothese wird zusätzlich durch Daten gestärkt, die zeigen, dass die *Fgfr3*-Expression in den Gliedmaßen von *SHOX*-transgenen Tieren im Vergleich zum Wildtyp verringert ist (K. U. Schneider, unpublizierte Daten). Die im EMSA identifizierten AT-Palindrome, an die SHOX im Menschen bindet, sind jedoch in der Maus nicht konserviert. Falls menschliches SHOX in der Maus über Regulation von *Fgfr3* den Phänotyp beeinflussen kann, sind die dafür verantwortlichen Mechanismen noch ungeklärt.

Ross et al. (2003) beschreiben den außergewöhnlichen Fall der Kombination von *FGFR3*-Gain-of-Funktion-Mutationen mit *SHOX*-Deletionen im Menschen. Zu den in dieser Studie untersuchten Patienten gehören zwei Geschwister mit Langer-Syndrom, die jeweils einen Partner mit Achondroplasie (ACH) oder Hypochondroplasie (HYP) geheiratet haben. Die Kinder beider Paare leiden entweder unter Leri-Weill-Dyschondrosteosis (II 1 und II 4) oder einer Kombination aus LWD und ACH (II 2) oder LWD und HYP (II 3) (Abb. 42).

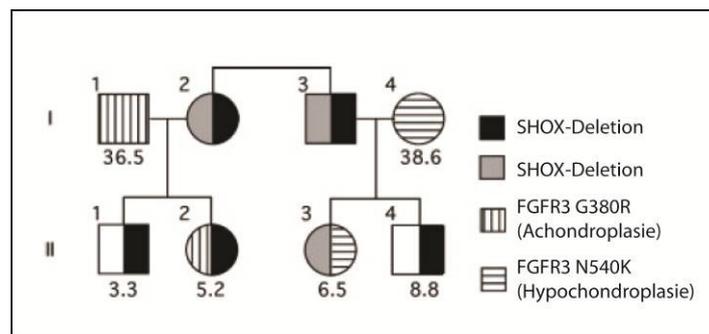


Abb. 42: Stammbaum einer Familie mit kombinierten *SHOX*- und *FGFR3*-Mutationen. Abbildung verändert aus Ross et al. (2003).

Bei den Kindern, die sowohl Mutationen in *FGFR3* als auch in *SHOX* geerbt hatten, wurde dabei die überraschende Entdeckung gemacht, dass der Kleinwuchs weniger stark ausgeprägt war als bei dem Elternteil, welches nur die entsprechende *FGFR3*-Mutation trug. Dieser Effekt spiegelte sich am stärksten in der Tibia-Länge wider, die deutlich länger war als aufgrund der Daten der Eltern erwartet. Generell wäre bei einer Kombination von rhizomelischem und mesomelischem Kleinwuchs anzunehmen, dass die Phänotypen sich addieren. Die Autoren schließen jedoch aus ihren Beobachtungen in dieser Familie, dass die Phänotypen sich teilweise aufheben, und spekulieren, dass *FGFR3* und *SHOX* in sich überschneidenden Pathways aktiv sind (Ross et al., 2003). Diese klinischen Daten stimmen perfekt mit der in der vorliegenden Arbeit vorgeschlagenen Herunterregulation von *FGFR3* durch SHOX überein.

4.4. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels verschiedener experimenteller Ansätze eine spezifische Regulation von *RUNX3* und *FGFR3* durch *SHOX* gezeigt werden.

Zellkulturexperimente in U2OS und NHDF zeigen dabei einen deutlichen Einfluss von *SHOX* auf *RUNX3*, der aber in Modellen zur Gliedmaßenentwicklung nicht nachgewiesen werden konnte. Das Fehlen einer Regulation und die generellen Schwankungen der *RUNX3*-Expression in chMM-Kulturen und MSC-Differenzierung könnten darauf beruhen, dass für die Regulation von *RUNX3* neben *SHOX* zeit- und ortsspezifische Faktoren essentiell sind. In diesem Fall könnte man weitere RCAS-*SHOX*-Infektionen in Hühnerembryonen durchführen, die länger als die in dieser Arbeit gezeigten 2 bis 4 Tage dauern. Falls auch dieser Ansatz keinen Effekt zeigt, ist es wahrscheinlich, dass die Regulation in der Gliedmaßenentwicklung eine untergeordnete Rolle spielt. Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass in zahlreichen menschlichen Geweben eine Coexpression von *RUNX3* und *SHOX* vorliegt, wären weiterführende Untersuchungen in diesen Geweben sinnvoll.

Sehr interessant in Bezug auf die Gliedmaßenentwicklung ist die Regulation von *FGFR3* durch *SHOX*. Die *FGFR3*-Expression zeigte in U2OS- und NHDF-Zellen sowie in Hühner-Micromass-Kulturen eine starke Abhängigkeit von *SHOX*. Die in der vorliegenden Arbeit vorgeschlagene Hypothese zur negativen Regulation von *FGFR3* in den Gliedmaßen stimmt sehr gut mit vorhandenen Patientendaten überein. Die bisher erhaltenen Daten sind jedoch noch nicht ausreichend, um diese Hypothese zweifelsfrei beweisen zu können. In zukünftigen Arbeiten sollte daher gezeigt werden, dass auch die Aktivität von *FGFR3* durch *SHOX* beeinflusst wird, da bisher nur eine Regulation auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden konnte. In NHDF und U2OS war die *FGFR3*-Proteinmenge nach Überexpression nicht nachweislich verändert. In weiteren Experimenten sollte man daher das Proteinlevel nach *SHOX*-Knockdown in Zellen sowie nach RCAS-*SHOX*-Infektion im Hühnersystem untersuchen, um einen möglichen Feedback-Effekt auf die Translation durch eine stark erhöhte Menge von *FGFR3*-mRNA, wie er in Zellkulturexperimenten möglicherweise auftritt, zu vermeiden. Zusätzlich wäre ein *SHOX*-Knockdown in Hühnerembryonen und chMM-Kulturen ein interessanter Ansatz.

Weiterhin wäre es wichtig, die Expression von *FGFR3* und *SHOX* in postnatalen Wachstumsfugen zu analysieren. Über eine Kooperation mit Prof. M. Karperien, Universität Twente, wurden bereits Paraffinschnitte von menschlichen Wachstumsfugen erhalten, die aber aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr untersucht werden konnten. Insbesondere der Vergleich von Wachstumsfugen aus LWD-Patienten

und gesunden Kontrollpersonen wäre in Bezug auf die *FGFR3*-Expression aufschlussreich.

Es ist ebenfalls noch unklar, ob und wie SHOX an den erweiterten *FGFR3*-Promotor bindet. SHOX-Bindestellen aus EMSAs und ChIP-Seq haben keine nachweisliche regulatorische Aktivität, außerdem sind sie nur schwach konserviert. Neben der SHOX-Bindung ist demzufolge vermutlich noch die Bindung von Cofaktoren für die *FGFR3*-Regulation notwendig. Sobald SHOX-Cofaktoren bekannt werden, sollten diese daher auf ihr Regulationspotential in Bezug auf *FGFR3* getestet werden, um damit ein noch besseres Verständnis des gesamten Regulationsprozesses zu erhalten.

5. Literatur

Ahrens, P. B., Solursh, M. und Reiter, R. S. (1977). Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. *Dev Biol* **60**, 69-82.

Bangsow, C., Rubins, N., Glusman, G., Bernstein, Y., Negreanu, V., Goldenberg, D., Lotem, J., Ben-Asher, E., Lancet, D., Levanon, D. et al. (2001). The RUNX3 gene--sequence, structure and regulated expression. *Gene* **279**, 221-32.

Becker, D. M., Hollenberg, S. M. und Ricciardi, R. P. (1989). Fusion of adenovirus E1A to the glucocorticoid receptor by high-resolution deletion cloning creates a hormonally inducible viral transactivator. *Mol Cell Biol* **9**, 3878-87.

Belin, V., Cusin, V., Viot, G., Girlich, D., Toutain, A., Moncla, A., Vekemans, M., Le Merrer, M., Munnich, A. und Cormier-Daire, V. (1998). SHOX mutations in dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome). *Nat Genet* **19**, 67-9.

Benazet, J. D., Bischofberger, M., Tiecke, E., Goncalves, A., Martin, J. F., Zuniga, A., Naef, F. und Zeller, R. (2009). A self-regulatory system of interlinked signaling feedback loops controls mouse limb patterning. *Science* **323**, 1050-3.

Bender, S., Decker, E., Baas, M., Röth, R., Arens, A., Korn, B., Zentgraf, H., Wolf, S. und Rappold, G. (in Vorbereitung). Genome-wide identification of SHOX transcriptional targets in primary human fibroblasts.

Benito-Sanz, S., Thomas, N. S., Huber, C., Gorbenko del Blanco, D., Aza-Carmona, M., Crolla, J. A., Maloney, V., Rappold, G., Argente, J., Campos-Barros, A. et al. (2005). A novel class of Pseudoautosomal region 1 deletions downstream of SHOX is associated with Leri-Weill dyschondrosteosis. *Am J Hum Genet* **77**, 533-44.

Bernardo, M. E., Emons, J. A., Karperien, M., Nauta, A. J., Willemze, R., Roelofs, H., Romeo, S., Marchini, A., Rappold, G. A., Vukicevic, S. et al. (2007). Human mesenchymal stem cells derived from bone marrow display a better chondrogenic differentiation compared with other sources. *Connect Tissue Res* **48**, 132-40.

Blaschke, R. J. und Rappold, G. (2006). The pseudoautosomal regions, SHOX and disease. *Curr Opin Genet Dev* **16**, 233-9.

Blum, W. F., Crowe, B. J., Quigley, C. A., Jung, H., Cao, D., Ross, J. L., Braun, L. und Rappold, G. (2007). Growth hormone is effective in treatment of short stature associated with short stature homeobox-containing gene deficiency: Two-year results of a randomized, controlled, multicenter trial. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 219-28.

Bronner-Fraser, M. (1996). *Methods in Avian Embryology*. San Diego: Academic Press.

Buridan, F., Szumilo, J., Korobowicz, A., Farooquee, R., Patel, S., Patel, A., Dave, A., Szumilo, M., Solecki, M., Klepacz, R. et al. (2009). Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate. *Folia Histochemica et Cytobiologica* **47**, 5-16.

Chagin, A. S. und Savendahl, L. (2009). Genes of importance in the hormonal regulation of growth plate cartilage. *Horm Res* **71 Suppl 2**, 41-7.

Chen, J., Wildhardt, G., Zhong, Z., Roth, R., Weiss, B., Steinberger, D., Decker, J., Blum, W. F. und Rappold, G. (2009). Enhancer deletions of the SHOX gene as a

frequent cause of short stature: the essential role of a 250 kb downstream regulatory domain. *J Med Genet* **46**, 834-9.

Chung, U. I., Schipani, E., McMahon, A. P. und Kronenberg, H. M. (2001). Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. *J Clin Invest* **107**, 295-304.

Clement-Jones, M., Schiller, S., Rao, E., Blaschke, R. J., Zuniga, A., Zeller, R., Robson, S. C., Binder, G., Glass, I., Strachan, T. et al. (2000). The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum Mol Genet* **9**, 695-702.

Cobb, J., Dierich, A., Huss-Garcia, Y. und Duboule, D. (2006). A mouse model for human short-stature syndromes identifies Shox2 as an upstream regulator of Runx2 during long-bone development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 4511-5.

Cohen, M. M., Jr. (2006). The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am J Med Genet A* **140**, 2646-706.

Davidson, D., Blanc, A., Filion, D., Wang, H., Plut, P., Pfeffer, G., Buschmann, M. D. und Henderson, J. E. (2005). Fibroblast growth factor (FGF) 18 signals through FGF receptor 3 to promote chondrogenesis. *J Biol Chem* **280**, 20509-15.

Delezoide, A. L., Benoist-Lasselien, C., Legeai-Mallet, L., Le Merrer, M., Munnich, A., Vekemans, M. und Bonaventure, J. (1998). Spatio-temporal expression of FGFR 1, 2 and 3 genes during human embryo-fetal ossification. *Mech Dev* **77**, 19-30.

DeLise, A. M., Fischer, L. und Tuan, R. S. (2000). Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage* **8**, 309-34.

Deng, C., Wynshaw-Boris, A., Zhou, F., Kuo, A. und Leder, P. (1996). Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* **84**, 911-21.

Durand, C., Bangs, F., Signolet, J., Decker, E., Tickle, C. und Rappold, G. (2010). Enhancer elements upstream of the SHOX gene are active in the developing limb. *Eur J Hum Genet* **18**, 527-32.

Ellison, J. W., Wardak, Z., Young, M. F., Gehron Robey, P., Laig-Webster, M. und Chiong, W. (1997). PHOG, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome. *Hum Mol Genet* **6**, 1341-7.

Emons, J., van Gool, S., Decker, E., Yu, X., van Houwelingen, H., Kleijburg, C., Scherjon, S., Gretz, N., Wit, J., Rappold, G. et al. (in Vorbereitung). Human mesenchymal stem cells as a model for chondrocyte differentiation.

Eswarakumar, V. P., Lax, I. und Schlessinger, J. (2005). Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**, 139-49.

Eswarakumar, V. P. und Schlessinger, J. (2007). Skeletal overgrowth is mediated by deficiency in a specific isoform of fibroblast growth factor receptor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3937-42.

Evans, M. I., Zador, I. E., Qureshi, F., Budev, H., Quigg, M. H. und Nadler, H. L. (1988). Ultrasonographic prenatal diagnosis and fetal pathology of Langer mesomelic dwarfism. *Am J Med Genet* **31**, 915-20.

- Gordon, C. T., Rodda, F. A. und Farlie, P. G.** (2009). The RCAS retroviral expression system in the study of skeletal development. *Developmental Dynamics* **238**, 797-811.
- Gotea, V., Visel, A., Westlund, J. M., Nobrega, M. A., Pennacchio, L. A. und Ovcharenko, I.** (2010). Homotypic clusters of transcription factor binding sites are a key component of human promoters and enhancers. *Genome Res.*
- Gudbjartsson, D. F., Walters, G. B., Thorleifsson, G., Stefansson, H., Halldorsson, B. V., Zusmanovich, P., Sulem, P., Thorlacius, S., Gylfason, A., Steinberg, S. et al.** (2008). Many sequence variants affecting diversity of adult human height. *Nat Genet* **40**, 609-15.
- Hall, B. K. und Miyake, T.** (2000). All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays* **22**, 138-47.
- Hamburger, V. und Hamilton, H.** (1951). A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo. *J. Morphology* **88**, 49 - 92.
- Harada, D., Yamanaka, Y., Ueda, K., Tanaka, H. und Seino, Y.** (2009). FGFR3-related dwarfism and cell signaling. *J Bone Miner Metab* **27**, 9-15.
- Himly, M., Foster, D. N., Bottoli, I., Iacovoni, J. S. und Vogt, P. K.** (1998). The DF-1 chicken fibroblast cell line: transformation induced by diverse oncogenes and cell death resulting from infection by avian leukosis viruses. *Virology* **248**, 295-304.
- Horton, W. A., Hall, J. G. und Hecht, J. T.** (2007). Achondroplasia. *Lancet* **370**, 162-72.
- Inoue, K., Ozaki, S., Shiga, T., Ito, K., Masuda, T., Okado, N., Iseda, T., Kawaguchi, S., Ogawa, M., Bae, S. C. et al.** (2002). Runx3 controls the axonal projection of proprioceptive dorsal root ganglion neurons. *Nat Neurosci* **5**, 946-54.
- Inoue, K., Shiga, T. und Ito, Y.** (2008). Runx transcription factors in neuronal development. *Neural Dev* **3**, 20.
- Iwata, T., Chen, L., Li, C., Ovchinnikov, D. A., Behringer, R. R., Francomano, C. A. und Deng, C. X.** (2000). A neonatal lethal mutation in FGFR3 uncouples proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes in embryos. *Hum Mol Genet* **9**, 1603-13.
- Jacobsen, L., Calvin, S. und Lobenhofer, E.** (2009). Transcriptional effects of transfection: the potential for misinterpretation of gene expression data generated from transiently transfected cells. *Biotechniques* **47**, 617-24.
- Jian, Q. F., Jianghong, Z., Sarah, L. D., Yongbo, L., Shuo, C., Xiaoyu, T., Michael, O., Stephen, E. H. und Mary, M.** (2002). Dentin Matrix Protein 1, a Target Molecule for Cbfa1 in Bone, Is a Unique Bone Marker Gene. *Journal of Bone and Mineral Research* **17**, 1822-1831.
- Jorge, A. A., Souza, S. C., Nishi, M. Y., Billerbeck, A. E., Liborio, D. C., Kim, C. A., Arnhold, I. J. und Mendonca, B. B.** (2007). SHOX mutations in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis: frequency and phenotypic variability. *Clin Endocrinol (Oxf)* **66**, 130-5.
- Kanaka-Gantenbein, C., Kitsiou, S., Mavrou, A., Stamoyannou, L., Kolialexi, A., Kekou, K., Liakopoulou, M. und Chrousos, G.** (2004). Tall stature, insulin resistance, and disturbed behavior in a girl with the triple X syndrome harboring three SHOX genes:

offspring of a father with mosaic Klinefelter syndrome but with two maternal X chromosomes. *Horm Res* **61**, 205-10.

Kim, J. J., Lee, H. I., Park, T., Kim, K., Lee, J. E., Cho, N. H., Shin, C., Cho, Y. S., Lee, J. Y., Han, B. G. et al. (2010). Identification of 15 loci influencing height in a Korean population. *J Hum Genet* **55**, 27-31.

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.

Kosher, R. A., Kulyk, W. M. und Gay, S. W. (1986). Collagen gene expression during limb cartilage differentiation. *J Cell Biol* **102**, 1151-6.

Kronenberg, H. M. (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature* **423**, 332-6.

Kumar, M. S., Lu, J., Mercer, K. L., Golub, T. R. und Jacks, T. (2007). Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* **39**, 673-7.

Lazarus, J. E., Hegde, A., Andrade, A. C., Nilsson, O. und Baron, J. (2007). Fibroblast growth factor expression in the postnatal growth plate. *Bone* **40**, 577-86.

Legeai-Mallet, L., Benoist-Lasselin, C., Munnich, A. und Bonaventure, J. (2004). Overexpression of *FGFR3*, *Stat1*, *Stat5* and *p21Cip1* correlates with phenotypic severity and defective chondrocyte differentiation in *FGFR3*-related chondrodysplasias. *Bone* **34**, 26-36.

Lette, G., Jackson, A. U., Gieger, C., Schumacher, F. R., Berndt, S. I., Sanna, S., Eyheramendy, S., Voight, B. F., Butler, J. L., Guiducci, C. et al. (2008). Identification of ten loci associated with height highlights new biological pathways in human growth. *Nat Genet* **40**, 584-91.

Lette, G. (2009). Genetic regulation of adult stature. *Curr Opin Pediatr* **21**, 515-22.

Lev, R. und Spicer, S. S. (1964). Specific Staining of Sulphate Groups with Alcian Blue at Low Ph. *J Histochem Cytochem* **12**, 309.

Lewandoski, M., Sun, X. und Martin, G. R. (2000). *Fgf8* signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nat Genet* **26**, 460-3.

Li, Q. L., Ito, K., Sakakura, C., Fukamachi, H., Inoue, K., Chi, X. Z., Lee, K. Y., Nomura, S., Lee, C. W., Han, S. B. et al. (2002). Causal relationship between the loss of *RUNX3* expression and gastric cancer. *Cell* **109**, 113-24.

Littlewood, T. D., Hancock, D. C., Danielian, P. S., Parker, M. G. und Evan, G. I. (1995). A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res* **23**, 1686-90.

Mann, R. S. und Affolter, M. (1998). Hox proteins meet more partners. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 423-9.

- Marchini, A., Marttila, T., Winter, A., Caldeira, S., Malanchi, I., Blaschke, R. J., Hacker, B., Rao, E., Karperien, M., Wit, J. M. et al.** (2004). The short stature homeodomain protein SHOX induces cellular growth arrest and apoptosis and is expressed in human growth plate chondrocytes. *J Biol Chem* **279**, 37103-14.
- Marchini, A., Daeffler, L., Marttila, T., Schneider, K. U., Blaschke, R. J., Schnolzer, M., Rommelaere, J. und Rappold, G.** (2006). Phosphorylation on Ser106 modulates the cellular functions of the SHOX homeodomain protein. *J Mol Biol* **355**, 590-603.
- Marchini, A., Hacker, B., Marttila, T., Hesse, V., Emons, J., Weiss, B., Karperien, M. und Rappold, G.** (2007a). BNP is a transcriptional target of the short stature homeobox gene SHOX. *Hum Mol Genet* **16**, 3081-7.
- Marchini, A., Rappold, G. und Schneider, K. U.** (2007b). SHOX at a glance: from gene to protein. *Arch Physiol Biochem* **113**, 116-23.
- Mariani, F. V. und Martin, G. R.** (2003). Deciphering skeletal patterning: clues from the limb. *Nature* **423**, 319-25.
- Martin, P.** (1990). Tissue patterning in the developing mouse limb. *International Journal of Developmental Biology* **34**, 323-36.
- Mello, M. A. und Tuan, R. S.** (1999). High density micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: an in vitro model of endochondral skeletal development. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **35**, 262-9.
- Minina, E., Kreschel, C., Naski, M. C., Ornitz, D. M. und Vortkamp, A.** (2002). Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev Cell* **3**, 439-49.
- Mundlos, S., Meyer, R., Yamada, Y. und Zabel, B.** (1991). Distribution of cartilage proteoglycan (aggrecan) core protein and link protein gene expression during human skeletal development. *Matrix* **11**, 339-46.
- Munns, C. F., Glass, I. A., LaBrom, R., Hayes, M., Flanagan, S., Berry, M., Hyland, V. J., Batch, J. A., Philips, G. E. und Vickers, D.** (2001). Histopathological analysis of Leri-Weill dyschondrosteosis: disordered growth plate. *Hand Surg* **6**, 13-23.
- Munns, C. J., Haase, H. R., Crowther, L. M., Hayes, M. T., Blaschke, R., Rappold, G., Glass, I. A. und Batch, J. A.** (2004). Expression of SHOX in human fetal and childhood growth plate. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 4130-5.
- Naski, M. C., Wang, Q., Xu, J. und Ornitz, D. M.** (1996). Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nat Genet* **13**, 233-7.
- Nishi, M. Y., Correa, R. V., Costa, E. M., Billerbeck, A. E., Cruzes, A. L., Domenice, S., Carvalho, L. R. und Mendonca, B. B.** (2008). Tall stature and poor breast development after estrogen replacement in a hypergonadotrophic hypogonadic patient with a 45,X/46,X,der(X) karyotype with SHOX gene overdosage. *Arq Bras Endocrinol Metabol* **52**, 1282-7.
- Noji, S., Koyama, E., Myokai, F., Nohno, T., Ohuchi, H., Nishikawa, K. und Taniguchi, S.** (1993). Differential expression of three chick FGF receptor genes, FGFR1, FGFR2 and FGFR3, in limb and feather development. *Prog Clin Biol Res* **383B**, 645-54.

- Ogata, T., Kosho, T., Wakui, K., Fukushima, Y., Yoshimoto, M. und Miharu, N.** (2000). Short stature homeobox-containing gene duplication on the der(X) chromosome in a female with 45,X/46,X, der(X), gonadal dysgenesis, and tall stature. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 2927-30.
- Okuda, T., Nishimura, M., Nakao, M. und Fujita, Y.** (2001). RUNX1/AML1: a central player in hematopoiesis. *Int J Hematol* **74**, 252-7.
- Ottesen, A. M., Aksglaede, L., Garn, I., Tartaglia, N., Tassone, F., Gravholt, C. H., Bojesen, A., Sorensen, K., Jorgensen, N., Rajpert-De Meyts, E. et al.** (2010). Increased number of sex chromosomes affects height in a nonlinear fashion: a study of 305 patients with sex chromosome aneuploidy. *Am J Med Genet A* **152A**, 1206-12.
- Passos-Bueno, M. R., Wilcox, W. R., Jabs, E. W., Sertie, A. L., Alonso, L. G. und Kitoh, H.** (1999). Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations. *Hum Mutat* **14**, 115-25.
- Peters, K., Ornitz, D., Werner, S. und Williams, L.** (1993). Unique expression pattern of the FGF receptor 3 gene during mouse organogenesis. *Dev Biol* **155**, 423-30.
- Pfaffl, M. W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
- Provot, S. und Schipani, E.** (2005). Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **328**, 658-65.
- Rao, E., Weiss, B., Fukami, M., Rump, A., Niesler, B., Mertz, A., Muroya, K., Binder, G., Kirsch, S., Winkelmann, M. et al.** (1997). Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet* **16**, 54-63.
- Rao, E., Blaschke, R. J., Marchini, A., Niesler, B., Burnett, M. und Rappold, G. A.** (2001). The Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX encodes a cell-type specific transcriptional activator. *Hum Mol Genet* **10**, 3083-91.
- Rappold, G., Blum, W. F., Shavrikova, E. P., Crowe, B. J., Roeth, R., Quigley, C. A., Ross, J. L. und Niesler, B.** (2007). Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of SHOX haploinsufficiency. *J Med Genet* **44**, 306-13.
- Reinhold, M. I., McEwen, D. G. und Naski, M. C.** (2004). Fibroblast growth factor receptor 3 gene: regulation by serum response factor. *Mol Endocrinol* **18**, 241-51.
- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E. und Tabin, C.** (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* **75**, 1401-16.
- Roder, K. und Schweizer, M.** (2001). Running-buffer composition influences DNA-protein and protein-protein complexes detected by electrophoretic mobility-shift assay (EMSA). *Biotechnol Appl Biochem* **33**, 209-14.
- Rosenfeld, R., Allen, D. B., MacGillivray, M. H., Alter, C., Saenger, P., Anhalt, H., Hintz, R. und Katz, H. P.** (2000). Growth hormone use in pediatric growth hormone deficiency and other pediatric growth disorders. *Am J Manag Care* **6**, S805-16.
- Ross, J. L., Bellus, G., Scott, C. I., Jr., Abboudi, J., Grigelioniene, G. und Zinn, A. R.** (2003). Mesomelic and rhizomelic short stature: The phenotype of combined Leri-Weill

dyschondrosteosis and achondroplasia or hypochondroplasia. *Am J Med Genet A* **116A**, 61-5.

Sabherwal, N., Blaschke, R. J., Marchini, A., Heine-Suner, D., Rosell, J., Ferragut, J., Blum, W. F. und Rappold, G. (2004a). A novel point mutation A170P in the SHOX gene defines impaired nuclear translocation as a molecular cause for Leri-Weill dyschondrosteosis and Langer dysplasia. *J Med Genet* **41**, e83.

Sabherwal, N., Schneider, K. U., Blaschke, R. J., Marchini, A. und Rappold, G. (2004b). Impairment of SHOX nuclear localization as a cause for Leri-Weill syndrome. *J Cell Sci* **117**, 3041-8.

Sabherwal, N., Bangs, F., Roth, R., Weiss, B., Jantz, K., Tiecke, E., Hinkel, G. K., Spaich, C., Hauffa, B. P., van der Kamp, H. et al. (2007). Long-range conserved non-coding SHOX sequences regulate expression in developing chicken limb and are associated with short stature phenotypes in human patients. *Hum Mol Genet* **16**, 210-22.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. und Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-4.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.

Schneider, K. U., Marchini, A., Sabherwal, N., Roth, R., Niesler, B., Marttila, T., Blaschke, R. J., Lawson, M., Domic, M. und Rappold, G. (2005). Alteration of DNA binding, dimerization, and nuclear translocation of SHOX homeodomain mutations identified in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis. *Hum Mutat* **26**, 44-52.

Sekiya, I., Vuoristo, J. T., Larson, B. L. und Prockop, D. J. (2002). In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4397-402.

Shears, D. J., Vassal, H. J., Goodman, F. R., Palmer, R. W., Reardon, W., Superti-Furga, A., Scambler, P. J. und Winter, R. M. (1998). Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene SHOX cause Leri-Weill dyschondrosteosis. *Nat Genet* **19**, 70-3.

Shen, G. (2005). The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. *Orthod Craniofac Res* **8**, 11-7.

Smith, L. B., Dally, M. R., Sainz, R. D., Rodrigue, K. L. und Oberbauer, A. M. (2006). Enhanced skeletal growth of sheep heterozygous for an inactivated fibroblast growth factor receptor 3. *J Anim Sci* **84**, 2942-9.

Soung do, Y., Dong, Y., Wang, Y., Zuscik, M. J., Schwarz, E. M., O'Keefe, R. J. und Drissi, H. (2007). Runx3/AML2/Cbfa3 regulates early and late chondrocyte differentiation. *J Bone Miner Res* **22**, 1260-70.

Stricker, S., Fundele, R., Vortkamp, A. und Mundlos, S. (2002). Role of Runx genes in chondrocyte differentiation. *Dev Biol* **245**, 95-108.

- Subramaniam, M. M., Chan, J. Y., Yeoh, K. G., Quek, T., Ito, K. und Salto-Tellez, M.** (2009). Molecular pathology of RUNX3 in human carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1796**, 315-31.
- Superti-Furga, G., Bergers, G., Picard, D. und Busslinger, M.** (1991). Hormone-dependent transcriptional regulation and cellular transformation by Fos-steroid receptor fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5114-8.
- Szebenyi, G., Savage, M. P., Olwin, B. B. und Fallon, J. F.** (1995). Changes in the expression of fibroblast growth factor receptors mark distinct stages of chondrogenesis in vitro and during chick limb skeletal patterning. *Dev Dyn* **204**, 446-56.
- Taniuchi, I., Osato, M., Egawa, T., Sunshine, M. J., Bae, S. C., Komori, T., Ito, Y. und Littman, D. R.** (2002). Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell* **111**, 621-33.
- Thomas, N. S., Harvey, J. F., Bunyan, D. J., Rankin, J., Grigelioniene, G., Bruno, D. L., Tan, T. Y., Tomkins, S. und Hastings, R.** (2009). Clinical and molecular characterization of duplications encompassing the human SHOX gene reveal a variable effect on stature. *Am J Med Genet A* **149A**, 1407-14.
- Tickle, C.** (2002). Vertebrate limb development and possible clues to diversity in limb form. *Journal of Morphology* **252**, 29-37.
- Tickle, C.** (2004). The contribution of chicken embryology to the understanding of vertebrate limb development. *Mech Dev* **121**, 1019-29.
- Tiecke, E., Bangs, F., Blaschke, R., Farrell, E. R., Rappold, G. und Tickle, C.** (2006). Expression of the short stature homeobox gene Shox is restricted by proximal and distal signals in chick limb buds and affects the length of skeletal elements. *Dev Biol* **298**, 585-96.
- Toydemir, R. M., Brassington, A. E., Bayrak-Toydemir, P., Krakowiak, P. A., Jorde, L. B., Whitby, F. G., Longo, N., Viskochil, D. H., Carey, J. C. und Bamshad, M. J.** (2006). A novel mutation in FGFR3 causes camptodactyly, tall stature, and hearing loss (CATSHL) syndrome. *Am J Hum Genet* **79**, 935-41.
- van der Eerden, B. C., Karperien, M. und Wit, J. M.** (2003). Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocrine Reviews* **24**, 782-801.
- Walshe, J. und Mason, I.** (2000). Expression of FGFR1, FGFR2 and FGFR3 during early neural development in the chick embryo. *Mech Dev* **90**, 103-10.
- Weedon, M. N., Lango, H., Lindgren, C. M., Wallace, C., Evans, D. M., Mangino, M., Freathy, R. M., Perry, J. R., Stevens, S., Hall, A. S. et al.** (2008). Genome-wide association analysis identifies 20 loci that influence adult height. *Nat Genet* **40**, 575-83.
- Whiteman, H. J. und Farrell, P. J.** (2006). RUNX expression and function in human B cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **16**, 31-44.
- Wilke, T. A., Gubbels, S., Schwartz, J. und Richman, J. M.** (1997). Expression of fibroblast growth factor receptors (FGFR1, FGFR2, FGFR3) in the developing head and face. *Dev Dyn* **210**, 41-52.

- Wit, J. M., Clayton, P. E., Rogol, A. D., Savage, M. O., Saenger, P. H. und Cohen, P.** (2008). Idiopathic short stature: definition, epidemiology, and diagnostic evaluation. *Growth Horm IGF Res* **18**, 89-110.
- Yoshida, C. A., Yamamoto, H., Fujita, T., Furuichi, T., Ito, K., Inoue, K., Yamana, K., Zanma, A., Takada, K., Ito, Y. et al.** (2004). Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev* **18**, 952-63.
- Yu, K. und Ornitz, D. M.** (2007). The FGF ligand-receptor signaling system in chondrogenesis, osteogenesis and vascularization of the endochondral skeleton. *International Congress Series* **1302**, 67-78.
- Yu, L., Liu, H., Yan, M., Yang, J., Long, F., Muneoka, K. und Chen, Y.** (2007). Shox2 is required for chondrocyte proliferation and maturation in proximal limb skeleton. *Dev Biol* **306**, 549-59.
- Zeller, R., Lopez-Rios, J. und Zuniga, A.** (2009). Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis. *Nat Rev Genet* **10**, 845-58.
- Zinn, A. R., Wei, F., Zhang, L., Elder, F. F., Scott, C. I., Jr., Marttila, P. und Ross, J. L.** (2002). Complete SHOX deficiency causes Langer mesomelic dysplasia. *Am J Med Genet* **110**, 158-63.

Anhang

Tabelle A: Zusammenfassung positiv regulierter Gene im Microarray nach transientser SHOX-Überexpression in U2OS. Die angegebene Regulation bezeichnet die Änderung der Genexpression nach *SHOX-WT*-Überexpression im Vergleich zu *SHOX-HM*-Überexpression.

6 h nach Transfektion				12 h nach Transfektion				24 h nach Transfektion			
#	Gen	Änderung > 2,5	Bead Standard error	#	Gen	Änderung > 2	Bead Standard error	#	Gen	Änderung > 2	Bead Standard error
1	SHOX	355,34	29,8	1	NPPB	14,86	30,9	1	NPPB	20,44	24,5
2	IL1B	16,21	27,8	2	IL1B	13,40	28,4	2	IL1B	17,01	28,4
3	FLJ25801	16,15	22,8	3	SOX8	10,19	29,7	3	PRSS8	13,51	33,2
4	HSPA6	15,60	27,9	4	EDN2	8,28	33,6	4	SOX8	13,03	16,5
5	DDIT4	12,67	34,8	5	PRSS8	8,16	27,1	5	AQP1	10,04	18,8
6	KCNF1	12,45	27,1	6	PTGS1	7,37	27,9	6	SBSN	9,64	17,1
7	PLAU	11,81	23,6	7	PDGFRB	6,62	20,5	7	PTGS1	9,46	24,7
8	IL24	10,61	22,9	8	CX3CL1	6,49	26,9	8	HBA1	8,97	20,4
9	IL8	9,96	20,6	9	KCNF1	6,24	23,2	9	GCGR	8,12	18,3
10	PLEKHF1	9,67	27,8	10	FZD10	6,13	27,2	10	PDGFRB	7,53	15,6
11	ARC	9,41	22,1	11	SCNN1D	5,99	18,4	11	SCNN1D	6,68	16,5
12	KIAA1754	9,30	20,9	12	SBSN	5,81	23,0	12	PFKFB4	6,45	15,9
13	IL1A	8,75	20,7	13	AQP1	5,76	25,4	13	EDN2	6,14	17,3
14	DUSP5	8,74	24,5	14	PSCD4	5,38	26,6	14	CRABP2	5,96	14,5
15	TNFRSF9	8,64	25,2	15	GPR162	5,34	24,0	15	CRYAB	5,56	16,3
16	PTGS1	8,57	27,8	16	PFKFB4	5,00	27,2	16	DDIT4	5,53	17,6
17	IL11	8,35	22,1	17	GCGR	4,31	23,7	17	C9orf58	5,21	18,1
18	CD55	8,18	21,7	18	RGS16	4,17	22,3	18	FGFR3	4,87	15,7
19	C8orf13	7,95	20,9	19	DDIT4	4,16	18,0	19	KCNF1	4,85	13,5
20	IRAK2	7,75	21,3	20	IL23A	3,95	17,1	20	CX3CL1	4,67	15,5
21	RIS1	7,63	21,8	21	PLEKHF1	3,79	16,1	21	NTSR1	4,39	14,9
22	HMOX1	7,62	12,8	22	SLITL2	3,66	22,3	22	PDGFB	4,34	14,7
23	CCL20	7,50	19,0	23	CRABP2	3,65	17,6	23	K6HF	4,33	12,3
24	IL6	7,44	17,8	24	PNCK	3,64	20,7	24	GPR162	4,28	16,0
25	DDIT3	6,99	26,2	25	LRRCL15	3,61	21,6	25	GPR56	4,26	18,8
26	KLHL21	6,67	26,4	26	C8orf13	3,52	21,2	26	LRRCL15	4,20	16,1
27	KCNG1	6,43	20,3	27	CRYAB	3,51	18,2	27	PNCK	4,18	15,3
28	RELB	6,16	22,8	28	CACNA1G	3,42	16,3	28	C8orf13	4,15	15,0
29	TRIB3	6,15	19,6	29	HBA1	3,41	17,1	29	NES	4,14	13,2
30	HK2	5,52	19,8	30	CPNE6	3,40	17,1	30	IL23A	4,11	14,9
31	UPP1	5,50	23,3	31	CMYA1	3,40	19,5	31	KREMEN2	4,04	11,7
32	PPP1R3C	5,49	17,9	32	E2F2	3,36	20,5	32	KIF1A	3,95	15,3
33	NTNG2	5,39	25,2	33	LEMD1	3,29	17,4	33	ANXA8	3,88	14,9
34	FOSL1	5,38	23,5	34	HPCAL4	3,28	18,8	34	VCX	3,85	13,7
35	C8orf4	5,33	17,0	35	TNFSF14	3,28	13,9	35	CDKN1C	3,77	13,8
36	VEGFA	5,19	19,0	36	RAP1GA1	3,28	20,7	36	ARHGAP16	3,76	16,7
37	BIRC3	5,19	22,6	37	GATA5	3,24	17,4	37	CITED1	3,68	14,1
38	MSX1	4,98	14,3	38	CITED1	3,14	15,0	38	RAP1GA1	3,67	16,2
39	TNFAIP3	4,90	15,8	39	CDKN1C	3,12	19,5	39	PTP4A3	3,67	14,9
40	NDRG1	4,86	23,9	40	CGNL1	3,08	16,6	40	HPCAL4	3,62	13,8
41	SPHK1	4,81	17,7	41	C9orf58	3,04	21,0	41	CASZ1	3,59	14,9
42	SGNE1	4,68	23,6	42	DUSP2	2,96	19,0	42	SLITL2	3,55	14,1
43	TSC22D3	4,63	15,8	43	FGFR3	2,96	14,1	43	TNF	3,54	14,6
44	ISG20	4,62	20,8	44	HES6	2,89	15,2	44	GALR2	3,54	15,7
45	DGKD	4,62	15,0	45	ARHGAP16	2,86	19,0	45	IFI30	3,54	13,5
46	DKFZp451A21	4,48	18,8	46	KCNJ4	2,85	12,6	46	FAM90A1	3,54	10,1
47	KIAA0690	4,47	16,9	47	PDGFB	2,82	15,1	47	GATA5	3,51	13,2
48	IRF1	4,43	17,9	48	POU2F2	2,80	17,6	48	PLEKHF1	3,47	18,0
49	LAMB3	4,42	16,0	49	TMEM121	2,78	15,5	49	IL11	3,46	11,4
50	CD59	4,41	18,7	50	NTSR1	2,75	12,4	50	HES6	3,44	9,8
51	MAFF	4,39	16,8	51	TUBB3	2,75	16,7	51	CPNE6	3,38	13,5
52	CEBPB	4,34	14,1	52	CXXC5	2,73	14,3	52	OLFM1	3,37	11,4
53	LNK	4,34	18,2	53	RHBDL3	2,69	14,6	53	DUSP2	3,36	12,4
54	EPAS1	4,32	15,8	54	MLLT7	2,66	14,0	54	RUNX3	3,35	11,6
55	NGFB	4,30	13,6	55	VANGL2	2,63	11,9	55	KCNQ2	3,31	13,2
56	MMP3	4,28	15,6	56	OTUB2	2,59	14,0	56	CLIC3	3,31	14,0
57	TNFRSF10B	4,28	19,1	57	SOX18	2,59	18,0	57	PSCD4	3,27	16,2
58	MICALCL	4,26	19,1	58	CHD5	2,57	13,6	58	MGC59937	3,26	14,0
59	IL4R	4,25	22,8	59	RUNX3	2,55	12,9	59	KRT16	3,03	10,4
60	SERPINA3	4,15	16,4	60	KREMEN2	2,55	12,2	60	ARC	2,98	11,6

61	CEBPG	4,02	20,1
62	PSCD4	3,97	14,5
63	CD83	3,96	21,1
64	OSBP2	3,96	16,2
65	CSF2	3,96	20,8
66	GOS2	3,94	14,5
67	CTH	3,92	14,9
68	FZD10	3,84	17,8
69	SLC3A2	3,80	20,2
70	ACHE	3,78	11,8
71	KIAA1199	3,76	15,0
72	PRSS8	3,74	17,0
73	SERPINE1	3,73	16,7
74	TNC	3,73	16,7
75	TM4SF1	3,72	14,3
76	SLC3A2	3,68	19,2
77	JARID2	3,67	16,5
78	GDF15	3,66	15,6
79	CRISPLD2	3,65	15,9
80	PAQR3	3,65	17,9
81	SDC4	3,64	21,5
82	PLA2G4C	3,61	20,1
83	DSCR1	3,58	20,0
84	GEM	3,58	18,7
85	PHLDA2	3,57	16,2
86	OAF	3,56	20,4
87	SOD2	3,55	15,8
88	TMEM22	3,54	11,1
89	HBEGF	3,52	15,5
90	PTX3	3,51	14,3
91	BMP6	3,49	13,7
92	IL23A	3,49	15,8
93	ASB1	3,48	15,4
94	SMOX	3,47	17,3
95	GPR137B	3,44	13,9
96	ZFP36	3,43	14,5
97	FAM43A	3,41	15,3
98	ARHGEF16	3,38	18,2
99	PPP1R15A	3,38	17,2
100	MAD1L1	3,38	16,2
101	CD44	3,37	19,3
102	ETS1	3,30	14,2
103	INHBE	3,29	14,2
104	FLT4	3,29	12,5
105	TRIB1	3,29	17,5
106	SLC20A1	3,28	20,0
107	NFKB2	3,27	16,8
108	LRRFIP1	3,27	14,1
109	HPCAL1	3,23	19,0
110	IFRD1	3,22	11,4
111	ABCG1	3,21	16,5
112	SQSTM1	3,20	18,8
113	ARHGEF2	3,20	18,1
114	PDLIM4	3,20	14,7
115	WDR21A	3,17	19,8
116	SES2	3,16	14,9
117	C12orf35	3,16	17,0
118	VEGF	3,14	15,1
119	AVPI1	3,12	19,4
120	FAM107B	3,09	16,4
121	MT1X	3,07	15,2
122	TM4SF19	3,06	16,6
123	FLNC	3,05	17,0
124	FOXO1A	3,05	13,5
125	SLC38A1	3,02	16,4
126	CHAC1	3,02	14,3
127	TACC2	3,02	12,4
128	ADM2	3,00	18,1
129	CX3CL1	3,00	14,3
130	NOV	3,00	9,8
131	GPR56	2,99	17,2
132	HEY1	2,98	13,2
133	BAIAP2	2,96	12,5

61	NGFR	2,55	13,3
62	CRISPLD2	2,55	14,7
63	APEG1	2,54	11,5
64	GOS2	2,54	14,9
65	SYNGR1	2,53	11,9
66	K6HF	2,52	14,3
67	KIF1A	2,52	14,4
68	IL2RB	2,52	14,2
69	CA12	2,52	15,2
70	LHX6	2,50	13,5
71	TSPAN9	2,49	13,6
72	ANXA8	2,49	13,3
73	FLT4	2,48	10,2
74	RIMS3	2,47	11,7
75	ATP2B4	2,47	15,1
76	WISP1	2,47	16,1
77	ITPKA	2,47	13,2
78	KIAA0182	2,46	12,3
79	FHOD1	2,45	16,2
80	OLFM1	2,43	11,8
81	COL16A1	2,42	10,8
82	COL7A1	2,41	12,6
83	LOC402573	2,39	13,9
84	RASSF2	2,37	12,7
85	MGC3101	2,36	11,6
86	C9orf116	2,36	12,0
87	DHDH	2,36	13,8
88	CBX4	2,35	12,7
89	LILRA3	2,34	14,9
90	IL11	2,33	10,9
91	NDRG2	2,31	12,0
92	SLC26A6	2,31	14,7
93	WNT3A	2,30	11,6
94	NES	2,28	12,0
95	OKL38	2,28	14,7
96	IFI30	2,26	11,8
97	TNFRSF1B	2,25	13,6
98	MYBPH	2,22	13,6
99	SFRP1	2,22	11,7
100	SORCS2	2,22	14,5
101	CXorf6	2,22	11,0
102	ENO3	2,21	12,3
103	FADS3	2,20	11,4
104	SERPINA3	2,19	12,1
105	IL17RB	2,19	10,6
106	SLC30A3	2,19	11,4
107	SLC24A6	2,19	12,3
108	MSX1	2,18	11,6
109	NRBP2	2,16	12,5
110	C9orf19	2,16	11,0
111	LFNG	2,15	10,9
112	COL1A1	2,14	14,4
113	SBK1	2,13	13,0
114	SH3PXD2A	2,13	13,0
115	GPR56	2,13	12,5
116	ANKDD1A	2,12	11,5
117	LMCD1	2,12	10,2
118	ABCG1	2,10	12,4
119	C10orf56	2,10	9,5
120	ADARB1	2,10	10,9
121	FLJ37538	2,09	11,1
122	FAM57B	2,09	11,9
123	FOXA2	2,09	13,6
124	FLJ37078	2,09	9,7
125	SPARC	2,08	9,5
126	IQCG	2,07	8,7
127	PDZK3	2,06	10,4
128	FAM90A1	2,06	9,0
129	KCNQ2	2,06	8,3
130	MGC59937	2,05	9,5
131	RTN4R	2,05	13,7
132	CASZ1	2,05	13,1
133	NTNG2	2,05	10,5

61	CD300C	2,97	11,6
62	PHLDA2	2,97	12,5
63	COL7A1	2,96	10,8
64	CMYA1	2,96	8,6
65	CRISPLD2	2,93	11,1
66	SOX18	2,92	13,6
67	SBK1	2,87	13,8
68	NGFR	2,84	9,4
69	POU2F2	2,84	13,0
70	SLC30A3	2,82	11,2
71	IL32	2,79	12,2
72	IGFL1	2,78	12,8
73	CDH15	2,75	14,8
74	HES4	2,75	13,8
75	CDKN1A	2,73	13,9
76	UCN2	2,72	11,7
77	FZD10	2,71	10,7
78	SYNGR1	2,71	8,3
79	COL16A1	2,69	11,6
80	CNN1	2,69	9,2
81	DHDH	2,68	12,0
82	SFRP1	2,66	11,9
83	MLLT7	2,60	12,2
84	RGS16	2,58	10,4
85	GSTM3	2,58	10,8
86	LILRA3	2,57	12,7
87	SPARC	2,56	9,9
88	ATP6V0A4	2,55	8,4
89	FLT4	2,54	9,8
90	MYLC2PL	2,54	9,7
91	CGNL1	2,53	11,2
92	TIMP2	2,51	8,2
93	RTN4R	2,51	9,8
94	IL2RB	2,51	8,9
95	APOBEC3B	2,50	12,1
96	FLJ37538	2,50	9,9
97	OLFM1	2,49	9,6
98	CKB	2,48	9,5
99	C10orf10	2,47	10,8
100	IQCG	2,44	8,8
101	KIAA0182	2,44	11,5
102	FOXJ1	2,43	8,8
103	GZMB	2,41	9,4
104	CCL3	2,40	9,2
105	C1orf116	2,40	10,7
106	TSPAN9	2,38	9,1
107	WNT3A	2,38	10,0
108	GP1BB	2,37	10,3
109	LCP1	2,34	9,8
110	NKD2	2,34	9,6
111	LMCD1	2,32	8,2
112	SH3PXD2A	2,32	8,6
113	TMC6	2,29	8,7
114	FAM57B	2,29	10,1
115	HPCAL1	2,26	9,8
116	SERPINE1	2,26	8,3
117	SERPINA3	2,26	9,5
118	SORCS2	2,25	9,5
119	SERPINA1	2,24	8,1
120	CXXC5	2,24	8,6
121	CHD5	2,23	9,4
122	IL1A	2,23	10,0
123	COL1A1	2,22	10,6
124	RIMS3	2,22	9,4
125	C9orf157	2,22	9,5
126	CNTFR	2,21	12,0
127	LCN2	2,20	8,9
128	FADS3	2,19	9,0
129	GABBR2	2,19	9,7
130	SEMA3F	2,19	8,0
131	SLC26A6	2,18	11,0
132	ALPL	2,16	10,3
133	STMN3	2,16	10,1

134	SHB	2,95	14,6
135	TMEM51	2,95	17,0
136	SLC39A14	2,95	15,8
137	COL5A3	2,95	14,9
138	PCK2	2,94	12,9
139	MMP10	2,94	12,6
140	HSPB8	2,93	11,1
141	SMAD3	2,93	10,2
142	DNAJC12	2,91	12,6
143	BTG1	2,91	15,9
144	ACRC	2,90	12,8
145	POU2F2	2,90	13,4
146	TBX3	2,89	10,7
147	SLC6A9	2,89	13,4
148	USP36	2,88	14,7
149	SPAG9	2,84	14,5
150	CSPG4	2,84	17,0
151	LIF	2,84	16,4
152	HERPUD1	2,83	16,3
153	KIF1A	2,83	12,5
154	C1orf116	2,82	14,7
155	ALOXE3	2,81	12,8
156	ZNF239	2,80	13,4
157	MARCH4	2,80	17,1
158	CALB2	2,79	18,4
159	MAP2K3	2,78	13,9
160	GPT2	2,77	21,4
161	MLPH	2,76	17,1
162	CXorf6	2,76	13,2
163	HSPA1B	2,76	16,5
164	LETM2	2,75	11,6
165	PIK3CD	2,75	14,2
166	CLCF1	2,74	15,8
167	CRY1	2,73	17,9
168	STC1	2,71	11,3
169	MTHFD2	2,71	12,3
170	GFOD1	2,71	16,8
171	NFKBIE	2,70	14,8
172	SLC7A5	2,70	15,6
173	HMFN0839	2,68	13,2
174	PBEF1	2,67	11,1
175	PEO1	2,66	9,9
176	PRKCE	2,66	11,2
177	NEU1	2,66	17,0
178	C11orf24	2,65	13,6
179	DNAJC12	2,65	12,8
180	IRXL1	2,64	12,8
181	TRIM47	2,63	11,9
182	MYC	2,63	12,2
183	CYP4F11	2,62	13,2
184	NPC1	2,62	12,5
185	C3orf52	2,61	13,9
186	NFATC1	2,59	12,0
187	GRM2	2,59	8,7
188	SYNJ2	2,59	13,6
189	RRAD	2,59	12,5
190	LAT	2,58	14,9
191	NAV2	2,58	10,7
192	CYLN2	2,57	14,5
193	ATXN7L2	2,57	13,1
194	CREB5	2,57	15,4
195	MGLL	2,56	11,8
196	PTPRN	2,56	13,6
197	SLC7A1	2,56	15,6
198	DSCR1	2,55	13,0
199	PTHLH	2,55	10,4
200	DNAJC12	2,55	10,9
201	ZC3H12A	2,54	12,0
202	TNFRSF1A	2,53	11,5
203	GPR3	2,52	13,5
204	NFKB1	2,52	13,8
205	ZFAND2A	2,51	13,1

134	EML2	2,04	10,1
135	LCN2	2,04	11,7
136	EFNB3	2,02	11,6
137	FOXF1	2,02	8,9
138	ARC	2,02	10,6
139	GP1BB	2,01	12,7
140	RHOJ	2,01	9,9
141	ZFP36	2,01	11,7
142	IL32	2,01	11,2
143	CALB2	2,01	8,9

134	ISG20	2,14	8,0
135	IGFL2	2,13	8,2
136	TMEM40	2,12	9,5
137	NALP5	2,12	9,0
138	RRAD	2,11	8,2
139	CACNA1G	2,11	8,4
140	SYP	2,11	9,3
141	MXD4	2,11	8,2
142	HMOX1	2,10	9,6
143	SLC24A6	2,10	10,6
144	CCL3L3	2,10	10,6
145	CD82	2,10	8,0
146	MGC26885	2,10	8,3
147	SH2D2A	2,10	10,1
148	HSF2BP	2,09	8,9
149	DYSFIP1	2,09	8,2
150	SLC26A11	2,08	8,8
151	KRT17	2,08	10,6
152	JAG2	2,07	9,7
153	MGC15476	2,07	9,4
154	CYP4F11	2,07	8,2
155	CSPG4	2,04	8,5
156	CYLN2	2,04	8,1
157	SEPT3	2,03	8,4
158	GOS2	2,02	9,3
159	FHOD1	2,01	8,8
160	NDRG2	2,01	10,2
161	MGC3101	2,01	10,2

Tabelle C: Zusammenfassung positiv regulierter Gene im Microarray nach transienter SHOX-Überexpression in NHDF. Die angegebene Regulation bezeichnet die Änderung der Genexpression nach *SHOX-WT*-Überexpression im Vergleich zu *SHOX-HM*-Überexpression.

6 h nach Transfektion			
#	Gen	Änderung > 2	Bead Standard error
1	SOX8	6,41	31,0
2	HES5	2,53	15,3
3	NUAK2	2,27	12,9
4	RGS16	2,19	12,1
5	BCOR	2,12	13,1
6	SNF1LK	2,11	13,6
7	HSPA6	2,08	12,5

12 h nach Transfektion			
#	Gen	Änderung > 2	Bead Standard error
1	HES5	20,18	45,5
2	SOX8	16,24	37,7
3	RRAD	11,52	37,1
4	ARC	11,26	38,2
5	CYP26B1	8,34	34,8
6	VGf	7,40	31,8
7	FGFR3	7,12	36,4
8	SOX18	6,45	38,3
9	KRT17	5,13	29,4
10	RASD1	4,40	26,9
11	TNF	4,22	24,8
12	BTG2	4,16	23,6
13	SNF1LK	4,07	20,7
14	CMYA1	3,81	23,6
15	KCNN4	3,71	17,2
16	LFNG	3,66	17,7
17	TNFSF9	3,49	21,0
18	RGS16	3,32	22,0
19	GADD45B	3,20	23,9
20	DES	3,17	18,1
21	EPHA2	2,96	19,8
22	DLK1	2,93	19,3
23	FZD9	2,87	22,1
24	CDKN1A	2,87	15,6
25	MN1	2,82	17,5
26	FHOD1	2,82	16,6
27	BHLHB2	2,82	17,2
28	CACNA1G	2,77	17,6
29	NUAK2	2,68	15,0
30	TNFRSF25	2,68	15,7
31	PFKFB4	2,64	20,9
32	NPTX1	2,59	14,0
33	HBA1	2,57	12,8
34	TUBB2B	2,55	14,3
35	GPR56	2,45	13,0
36	BAIAP2	2,42	15,8
37	SLC25A37	2,41	16,5
38	CKB	2,39	17,1
39	STMN3	2,36	14,5
40	ANKRD38	2,35	14,6
41	MEF2D	2,33	15,5
42	RHBDL3	2,31	14,8
43	KRT19	2,29	14,1
44	LAMA5	2,29	13,0
45	SLC20A1	2,27	13,2
46	SLC9A3R1	2,25	13,8
47	FAM46B	2,24	12,8
48	CEBPA	2,22	13,9
49	PIM3	2,21	12,5
50	LOC402573	2,16	14,2
51	GAL	2,13	11,4
52	FGFRL1	2,13	13,9
53	PTPNS1	2,12	14,7
54	EEF1A2	2,12	13,8
55	NPTX1	2,11	10,7
56	EML2	2,08	11,9
57	NPAS1	2,07	12,6
58	C9orf132	2,06	12,4
59	SMAD3	2,05	13,0
60	PLCXD1	2,05	12,1

24 h nach Transfektion			
#	Gen	Änderung > 2,5	Bead Standard error
1	SOX8	44,59	31,7
2	HES5	36,14	23,5
3	VGf	22,04	34,8
4	ARC	19,78	24,3
5	RRAD	17,68	23,4
6	CYP26B1	17,33	23,7
7	RASD1	15,18	27,8
8	NPPB	12,19	26,8
9	FGFR3	10,52	26,5
10	KRT17	9,91	26,0
11	SOX18	8,96	21,8
12	GADD45B	7,64	28,3
13	HBA1	6,88	18,9
14	CKB	6,81	23,2
15	GPR56	6,73	20,4
16	KCNF1	6,43	23,0
17	MYEOV	6,37	21,1
18	PRSS8	6,34	19,8
19	RAC2	6,28	24,2
20	TNF	6,24	19,9
21	BTG2	6,17	22,9
22	STMN3	6,00	20,3
23	DES	5,98	17,7
24	EEF1A2	5,86	19,7
25	SNF1LK	5,70	17,7
26	CMYA1	5,65	17,2
27	TSPAN9	5,53	21,3
28	TNFSF9	5,48	16,3
29	CDKN1A	5,44	20,2
30	RAP1GA1	5,24	20,4
31	KIF1A	5,18	24,2
32	CDKN1C	5,12	23,3
33	CRABP2	4,70	20,1
34	DLK1	4,54	18,6
35	LFNG	4,47	16,5
36	CBX4	4,43	18,9
37	KRT18	4,25	14,2
38	PIM3	4,22	21,0
39	FAM46B	4,01	14,8
40	C1QTNF5	4,00	14,9
41	CYGB	3,98	17,4
42	SBSN	3,96	17,9
43	TUBB2B	3,85	11,5
44	CPNE6	3,85	15,1
45	INA	3,83	13,9
46	PDGFRB	3,83	15,7
47	HES6	3,79	14,1
48	INHBB	3,78	16,8
49	AQP1	3,73	14,4
50	HAPLN4	3,65	19,7
51	RUNX3	3,57	13,4
52	GALNT9	3,55	12,7
53	LOC144501	3,45	18,2
54	FOS	3,42	14,7
55	C9orf111	3,40	12,8
56	KCNN4	3,36	10,9
57	ART5	3,33	14,0
58	TNFRSF25	3,28	16,9
59	FZD9	3,28	16,3
60	GDF15	3,22	14,2

61	PDXP	2,05	15,0
62	HES6	2,05	9,8
63	HPCAL1	2,03	10,5
64	ASGR1	2,03	11,0
65	IL11	2,03	11,9
66	THBD	2,02	12,0
67	MLPH	2,01	13,4
68	GGA2	2,00	14,0

61	HMOX1	3,21	12,6
62	SLC9A3R1	3,20	10,1
63	LOC402573	3,18	11,1
64	FZD10	3,14	11,9
65	HAND1	3,12	13,3
66	MSX1	3,11	15,8
67	EPHA2	3,08	14,2
68	EML2	3,07	11,5
69	BHLHB2	3,07	13,5
70	FOSB	3,06	15,3
71	PHLDA2	3,06	14,7
72	SDC1	3,06	17,0
73	HSPB8	3,01	8,3
74	JUND	3,01	19,0
75	FLT4	3,00	13,1
76	FDXR	3,00	19,2
77	IRX4	2,92	14,0
78	LAMA5	2,91	13,6
79	CLIC3	2,88	9,6
80	CRIP1	2,86	11,7
81	SCD	2,85	14,1
82	CCR7	2,84	11,4
83	CEBPA	2,80	13,2
84	CACNA1G	2,77	11,5
85	CST6	2,77	9,7
86	GPR162	2,76	14,2
87	ZFP36	2,76	13,7
88	MRPL41	2,75	13,5
89	JUP	2,75	15,4
90	HEYL	2,73	10,3
91	ERN1	2,73	15,3
92	ASGR1	2,73	10,1
93	SLCO2A1	2,70	12,8
94	RKHD3	2,69	12,2
95	AXUD1	2,69	11,4
96	CDKN2D	2,68	15,0
97	NPTX2	2,67	14,1
98	HIP1R	2,67	12,9
99	C6orf15	2,67	13,0
100	SLC30A3	2,67	12,9
101	RASSF2	2,66	10,7
102	MEF2D	2,64	13,5
103	CXCL14	2,64	11,9
104	KCTD17	2,63	14,1
105	PTHR1	2,62	17,1
106	WDR58	2,62	10,1
107	EFNA1	2,58	14,0
108	SCNN1D	2,58	11,0
109	CXXC5	2,57	9,2
110	KRT19	2,56	9,8
111	PTGES	2,55	12,9
112	NES	2,54	11,8
113	SNAI1	2,54	14,2
114	PFKFB4	2,53	13,7
115	ANKDD1A	2,52	12,0
116	KRT14	2,52	12,5
117	KLF2	2,51	13,2
118	SMAD3	2,50	12,3
119	NDRG1	2,50	12,5
120	CDSN	2,50	11,4

Tabelle D: Zusammenfassung negativ regulierter Gene im Microarray nach transienter SHOX-Überexpression in NHDF. Die angegebene Regulation bezeichnet die Änderung der Genexpression nach *SHOX-WT*-Überexpression im Vergleich zu *SHOX-HM*-Überexpression.

6 h nach Transfektion				12 h nach Transfektion				24 h nach Transfektion			
#	Gen	Änderung > -2	Bead Standard error	#	Gen	Änderung > -2	Bead Standard error	#	Gen	Änderung > -2,5	Bead Standard error
1	CCL8	-5,24	21,9	1	IFNB1	-8,60	13,4	1	CCL8	-11,12	19,2
2	IFNB1	-5,03	26,6	2	CCL8	-5,28	23,2	2	GBP1	-5,25	17,9
3	CXCL10	-4,83	27,0	3	INDO	-4,85	15,0	3	IFNB1	-4,81	18,8
4	INDO	-4,48	21,0	4	CH25H	-4,19	22,9	4	GBP4	-4,68	16,9
5	CXCL11	-4,42	21,1	5	ARL4	-4,10	29,4	5	CXCL11	-4,44	20,6
6	GBP4	-3,51	20,5	6	CXCL11	-3,83	15,0	6	IFI44L	-4,28	16,9
7	GBP1	-3,26	15,4	7	LRRN3	-3,83	26,0	7	IFIT3	-4,01	18,4
8	IL8	-3,08	18,3	8	NFKBIZ	-3,81	27,5	8	GMMPR	-3,67	11,9
9	IFI44L	-2,84	20,0	9	CCL5	-3,69	24,5	9	NCOA7	-3,55	14,0
10	LOC129607	-2,83	15,2	10	AIM2	-3,64	24,5	10	PRIC285	-3,51	14,3
11	AIM2	-2,62	16,5	11	CXCL10	-3,63	21,7	11	OAS1	-3,45	18,3
12	NCOA7	-2,49	14,4	12	CORN4L	-3,27	17,9	12	LOC129607	-3,44	14,0
13	RIPK2	-2,44	15,4	13	GBP4	-3,27	20,0	13	ARL4	-3,38	13,9
14	TNFSF10	-2,43	13,6	14	TNFSF10	-3,26	17,6	14	CXCL10	-3,36	14,5
15	BATF2	-2,42	14,5	15	CPEB3	-3,24	24,4	15	SAMD9L	-3,32	13,5
16	LOC389289	-2,31	14,2	16	GBP1	-3,14	20,8	16	DDX58	-3,21	15,7
17	NFKBIZ	-2,24	11,2	17	IFIT1L	-3,13	18,6	17	CCL7	-3,17	12,6
18	IRF7	-2,21	14,8	18	PTGER4	-3,11	14,9	18	SP110	-3,10	16,1
19	GCA	-2,20	12,8	19	SRPK2	-3,08	17,0	19	IFIT1	-3,10	11,5
20	TRIM38	-2,19	15,4	20	ISL1	-3,00	24,8	20	OAS1	-3,09	17,6
21	CXCL1	-2,17	13,1	21	NCOA7	-2,96	15,8	21	FLJ11000	-3,04	14,8
22	FLJ20035	-2,17	12,8	22	UTX	-2,91	18,0	22	TNFAIP6	-2,95	13,5
23	SAMD9L	-2,16	10,4	23	GCG	-2,85	14,3	23	INDO	-2,94	15,9
24	BCL2L13	-2,07	12,2	24	CDKN2C	-2,76	13,4	24	ARID5B	-2,90	16,7
25	WARS	-2,07	13,6	25	JAK2	-2,75	12,3	25	TRIM22	-2,86	12,8
26	RNF36	-2,04	8,9	26	SLC2A12	-2,72	11,5	26	IFIT3	-2,86	14,8
27	CH25H	-2,03	12,5	27	GCA	-2,71	11,3	27	TRIM5	-2,86	12,6
28	MLKL	-2,02	12,9	28	FZD4	-2,65	13,0	28	IFI16	-2,75	10,0
29	CCL5	-2,01	10,9	29	RORA	-2,64	27,0	29	FAM46A	-2,73	15,8
				30	RTP4	-2,59	19,6	30	OASL	-2,73	10,1
				31	EFNB2	-2,56	10,7	31	NFKBIZ	-2,71	11,9
				32	IFI44L	-2,56	18,7	32	IFI35	-2,69	13,2
				33	ARL5B	-2,56	16,7	33	BST2	-2,68	12,5
				34	ABCC2	-2,56	13,2	34	IFI27	-2,68	10,8
				35	TRIM38	-2,53	10,9	35	EPSTI1	-2,64	14,8
				36	FLJ20035	-2,53	16,4	36	CPEB3	-2,59	10,4
				37	TRIM24	-2,49	10,3	37	CCL5	-2,59	9,8
				38	PEL1	-2,49	18,1	38	SLC15A3	-2,58	11,6
				39	TRIM5	-2,49	11,2	39	IFIT3	-2,58	13,9
				40	CASP4	-2,48	15,6	40	IFI44	-2,57	12,5
				41	LOC389289	-2,47	24,9	41	OASL	-2,57	10,9
				42	CDKN2C	-2,43	19,8	42	TRIM21	-2,55	11,9
				43	PPM2C	-2,42	16,0	43	LRRN3	-2,54	10,1
				44	JMJD1C	-2,41	16,1				
				45	FLJ11000	-2,40	14,2				
				46	IFI16	-2,40	15,2				
				47	HIST1H4H	-2,39	9,7				
				48	GBP7	-2,37	10,0				
				49	TSC22D1	-2,35	16,2				
				50	MGC20470	-2,34	12,2				
				51	BCL2L13	-2,34	20,3				
				52	WARS	-2,34	15,4				
				53	DLX5	-2,34	12,2				
				54	TNFAIP3	-2,33	20,0				
				55	LGP2	-2,32	20,5				
				56	EPHA4	-2,32	10,7				
				57	SP110	-2,32	9,2				
				58	FAM111A	-2,31	18,1				
				59	FBXO32	-2,30	9,6				
				60	FLJ33814	-2,28	15,8				

61	PTGS2	-2,27	8,2
62	CASP4	-2,27	16,2
63	CFH	-2,26	12,7
64	SPINK1	-2,25	13,4
65	LOC129607	-2,24	17,4
66	GBP2	-2,24	17,9
67	WTAP	-2,22	10,9
68	RASAL2	-2,21	12,5
69	GADD45A	-2,19	18,7
70	FBXO32	-2,19	8,8
71	TRAF3IP2	-2,19	14,9
72	ABL2	-2,18	13,5
73	IL1R2	-2,17	11,6
74	SLC1A3	-2,17	17,7
75	USP52	-2,17	9,0
76	STAMBPL1	-2,17	14,6
77	HSC20	-2,17	15,6
78	C10orf78	-2,16	14,4
79	IFIT1	-2,16	14,7
80	CD38	-2,15	15,0
81	CREB5	-2,15	16,8
82	ABL2	-2,14	12,9
83	FAM46A	-2,13	9,1
84	SLC25A28	-2,12	15,4
85	RIPK2	-2,12	10,0
86	SLC8A2	-2,12	16,0
87	MAP4K5	-2,12	17,9
88	TYSND1	-2,11	16,2
89	PIK3R1	-2,10	9,6
90	RARRES3	-2,10	14,7
91	KIAA1797	-2,09	16,2
92	ABL2	-2,08	14,3
93	ATF3	-2,08	16,4
94	SAMD4A	-2,07	13,6
95	C2orf11	-2,07	10,8
96	ECT2	-2,06	11,8
97	ESR1	-2,06	11,3
98	C1orf26	-2,06	8,3
99	PIGA	-2,05	15,3
100	L2HGDH	-2,04	12,8
101	C6orf32	-2,04	14,2
102	CHORDC1	-2,04	8,9
103	KIAA1414	-2,03	9,3
104	TRAFD1	-2,02	10,0
105	CITED2	-2,02	11,8
106	IL6	-2,01	15,7
107	TNFSF13B	-2,01	16,9
108	KITLG	-2,01	11,7
109	RGAG1	-2,01	9,8
110	IFIT3	-2,00	13,5
111	IL15	-2,00	13,2

Sequenz upstream von FGFR3 (NM_000142): chr4:1,792,105-1,796,107

FGFR3 -3518 bp → + 485 bp

CAGAGTGGGCAGCACTCCTTGGTGGCCGGTGGCCAGGGCTGCGGGGACAAAGGAGGGAGTGGTGTGAAAGTCCCTGGTCCCAGTCCCCTCCTCTG
CGGAAATGCTCCTGCCCTTTGACCTAACTGCTCCCAGACAGTGCCTGGAGAAGCCATTCAGAATGTGGAGGGCGCCAGAGG
AGGCAGCTGCCACGCAGTGCCTAGTGGGCAGAACCGCGCCCTCCAAAAGACATAGTCATGTCTCACCCCTGACGCCTGTGA
ACGTGACCGTATTTGGAAAAGGATCTTTGCAAATGTAATTAAGGTGAGAATCTTGAGATGGGGGATCCTCTTGATTATCCAA
GTGGGCCCTATATCCAACGACAAGTGTCTGTATAAGAGATGGAAGAGAAGATGGCAGAGTGGGAAGCAGATGCTGGAGCAATG
AGGCTGCGAGCCAAGGGACTTGGAGCCCTGGGACACTTGGAGCCCCAGGAGCTGGAAAAGGCAGGAAAAGATCTTCCCTGGAG
CCTTCAGAGGCAGTGCAGCCCTGCCTACACCTTGATTCCAGACATCTGCTCTTCCAGACTATGAAAGTAAATTTAAGTCAA
TTAGTGTGCAGTAATTTGTGAGGGCAACCTAGAAATACAAGATGCTACTGAACTAAGGAAATCCCCGGCTGCTACTGGAGGGAG
AGGTGGTGGCCCTGGGCCAGGGCTGCGGGGACAAAGGAGGGAGTGGTGTGAAAGTCCCTGGTCCCAGTCCCCTCCTCTCTG
CCAGCACTGCCACTGGTCAAACCCACCCAGAAGCTGGAGAGCAAGGGACCCTCAGAGATAGGGTCTGTAGGATCAGGCTTTC
AAGGACAAATGGGAGAGGGGCTGGGGAAGGGACACATGGGGACCAGACCCTACTGGGCATTTCTGCCAAGGAGAGGATCCTG
GTGAGGAAGAAAGCAGAAAGCTATGTGTTACAGATGCACGGATGCTCCCCTCCAGAGACCCGTGGCCGTGGGTGCAGAGGG
AGTCAGTCTTCTTGGAGGTACTGGGAAAGGAGCCACAGCTCCACTGAGCCCTTCTGCCTACAGGAGGGGGCCCCACTCAGCA
GCTGTTCCCTGAGGGAGACCTGTCCACGCGTGAGCTCCTTCCCACAGTCCCATCCAGTCCCCAGGGGAAGGGGCAAGACGGT
CAGTTCAGGACCCACACGCATGCTGGTGTCTTTCAGAACCTGATGACTTAGTTGGTTAAGAGAGCTCACACCTGCAATCCCAGC
ACTTGGGAGGCTGAGGCAGGTGGATCAGTTGAGGTGAGGTCAGCCAGGGACACCCCTGGCCCAACATGGTGAAGCCCCGCTCTA
CTAACAAACAAAAATTAGCCGAGTGTGGTGGTGCACACCTGTAATCCTAGCTACTTGGGAGGCTGAGACAGGAGAATCACTT
CAATCAGGGAGGCAGAGATTGCTTGGAGCTGAGACTGTGCCACTGCCTCCAGCCTGGGTGACAGAGCGAGACTCCCTCTCAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAGCAGGGCCAATGTCTGCTGTGCCCTTGGGGAACGGTGTCTGGGAGCGGACCTGGCTGGC
AGTGACCTGGGGCTGTGCACTGGAGGGGGCTGGACAGTGCCTTGGAGGTGGGTGAGCCTGGGCCCCAGACGGTCTGGGGAC
ATGGGCTTGGCCAGAGCAGAAATGAGGGTGGCCAAAGGACAGGTGCTGAGCCACCGAGTCGGCACAGAGGGGTGGGCATGAGG
GCTTCCCTGGGAGCAGGGCCCTTCCAAGTCCCTGAGGTGAGGTCAGCCAGGGACACCCCTGGCCCTTGGGAGATTATGGTGGGGCTGT
GCATGGGCTGGGTGGGGTTCAGCAGGCAGCCAGTCACTGAGGGGCTTTCAGCGCCATTTTCTGATGAGCACCTCCAGTCTGT
GAAGCCACAAGCCAGGCAGCAGCCACCCGCGCCGCTCCTCCGCGCAGCTCACTGGCTCCCATGGGCCCCGACCTCCTTGG
GCTTTGCCTGAAGGTGGGAGCAGATGGCCTTTTCTTGTGAGGGTGGACACAGAAGCCAACAGTCATGTGGGGTGAGGGGACC
CAGGCACCTCCAGCTTCCCCCGCAGGGCAGCACCTTCCCCTCCTGGGAACCCACCCCTCTCAGCTGGACTCTGAGCCACCC
CGTGGAGCCCAGAACCTCGGGCCAGCTCAGGCTCTGCCACCAGCTCTCTGTATCCTCCCTCAGAGCCGGGCTGTGTCTCCCA
AGCCAGGGGTATCCAGCCCCGCTCTCATCTAGGCCGGGCAGGCAGCCAGCCAGGCTGTGTCTCCTTGGGGGGCGGG
GGTAGGGACCCCTCGCGCGGGGCTCTCAGCGGGCTTAGCTGCGTGGCGCCAGGTCAGTCAACGCAGCTCTGCACCTCGC
CGGTACAGGTACGCAGGCCGCGCGGGCTGCCAGACCTGCGGCGCACACGGGAGGCTCAGCCTGGAATGCCGTCTGCCCTC
CTCCACCTGAGGAATTGCCGCTCACACCACAGGGTTCAGTCCGCGGCATCTCGGCGAAGCCTCCTGACATCCCGACCCCGC
CGAGACCTCCCCCTGAGCTCCTGAGCACAGCCCCAGGGACCCGAGCTGCGCGCTATGCAAACACAGGCCTGCCCTCGCCCT
CGGTGCGCCCCGTGCCCGCCGCCCTTGGGCCGCCCGCGGTGCGACTAGGGGCTTAGCCCGCTGCCCGGCTCCCACGCC
TCGAGACCGCGGGCGCCCCCGCCGCGCCCTCGGATGCCCGCTCCGCCCCGAGGGGGCTGCCCTGCGCGCCCCCGC
GAGCCGGGCGGGGACCGGGCGGGAGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGACCGTCCCCACTGGCTGCGCGCGGGGCA
GCCAGGCTCAGTGCAGCGGTGGCGGGCGGCTCGCGGCAGCTGGCGCGCGCGGTCTGCTCTGCCGGTGCACAGGACGCACC
GGCGGGCGCGGGCGGAGGGACGGGGCGGGAGCTGGGCCGCGGACAGCGAGCCGGAGCGGGAGCCGCGCGTAGCGAGCCGG
GCTCCGGCGCTCGCCAGGTCCGTGCTTGGGGCCGGGACGCTCGCGGAGGGGTCCAACGGTGTCTCGCGGAGGGGTGCGGGCGC
GGCTGTCGCGGAACACAGAGGTCCCTGCAGCGGGCGGGCGGGGCGGGGCTTCCGCTCCGAAAGTTTGCCGCGCGCGC
CGCCCTGGGAGGGCTTTGAGCAGCCAGGGAGGGAAGGGGAGGAGGGAGGACCGCGCGGGGAGGAGCGGGCGGGCGCCAG
GCGGCCCGGGAGCCCTGGGCGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGGCTGGGGTTCGGAGGGGTCCGGACGCAGGAGCCGGCCACCG
CCGTTTCTGCTCCCTGTCGCCCTTAAACGAGTGCCTTCTCCTCTGTAAGTCTCCGAGCGCGCCGCCCTCCCGCCGGTG
CCCGCGCGGGCGGTGGGGGACAGCATGCCCGCGCGCTGCTGAGGACGCGCGGGCCCCCGCCCCGCCATGGGCGCCCT
GCCTGCGCCCTCGCGCTCTGCGTGGCCGTGGCCATCGTGGCCGGCGCTCCTCGGAGTCTTGGGACGGAGCAGCGGCTCGT
GGGGCGAGCGGCAAGTAAGAAGGGACCCACTAGGCACGGGAGAGGCCGCCCCGTGCGGGCAGAGGCGTTGGGACGGGAACCG
GCCCGGGTTCGGAGGGGCGCGGGTGTGAGTGACGCCCGGGGTTAGAGCCCGGATTCCGCTGCCTCCTTGGCGGAGAGCGC
GGCCAGAGCTAGCGCGGCACTTGTGGTGCGCCCGGAGCCGACGCTACCCTCCAAGTGCAGGGCCACCACGGGGAGCCAGGCT
GGGGTTGGCGTCCGACGCCCTGCGACTCCCTAGCCCTGGCTGTGCGGAGGGCGCGGGGGGCCCATTTCCAGC
ATTCCGCTGTTGTTATTC

Blau markiert: Exon 1

Rot markiert: In EMSA getestete Sequenzen. Von oben nach unten: -3493/-3423bp („ChIP-Seq komplett“), -3262/-3171bp, -2956/-2884bp und -2194/-2128bp.

Fusionsprotein GR (N-terminal)-SHOX über XbaI-Schnittstelle in pcDNA4/TO; DNA-Sequenz

ATGACCTCTGAAAATCCTGGTAACAAAACAATAGTTCCTGCAACGTTACCACAACCTACCCCTACCCTGGTGTCACTGTTGGA
GGTTATTGAACCTGAAGTGTATATGCAGGATATGATAGCTCTGTTCCAGACTCAACTGGAGGATCATGACTACGCTCAACA
TGTTAGGAGGGCGCAAGTGATTGCAGCAGTGAAATGGGCAAAGGCAATACCAGGTTTCAGGAACTTACACCTGGATGACCAA
ATGACCCTACTGCAGTACTCCTGGATGTTTCTTATGGCATTGCTCTGGGGTGGAGATCATATAGACAATCAAGTGCAAACCT
GCTGTGTTTTGCTCCTGATCTGATTATTAATGAGCAGAGAATGACTCTACCCTGCATGTACGACCAATGTAACACATGCTGT
ATGTTTCCCTCTGAGTTACACAGGCTTCAGGTATCTTATGAAGAGTATCTCTGTATGAAAACCTTACTGCTTCTCTCTCAGTT
CCTAAGGACGGTCTGAAGAGCCAAGAGCTATTTGATGAAATAGAATGACCTACATCAAAGAGCTAGGAAAAGCCATTGTCAA
GAGGAAGGAAACTCCAGCCAGAACTGGCAGCGGTTTTATCAACTGACAAAACCTCTGGATTCTATGCATGAAGTGGTTGAAA
ATCTCCTTAACTATTGCTTCCAAACATTTTTGGATAAGACCATGAGTATTGAATTCGCCGAGATGTTAGCTGAATCATCACCA
ATCAGATACAAAATATTCAAATGGAAATATCAAAAACTTCTGTTTCATCAAACTAGAGAAGAGCTCACGGCTTTTGTATC
CAAGTCTTTTGACCAGAAAAGCAAGGACGGTAACGGCGGAGGGCGGAGGGCGGAGGTAAGAAGGATTCCATTACGTACCGGG
AAGTTTGGAGAGCGGACTGGCGCGCTCCCGGGAGCTGGGGACGTCGGATTCCAGCCTCCAGGACATCACGGAGGGCGGCGGC
CACTGCCCGGTGCATTTGTTCAAGGACCACGTAGACAATGACAAGGAGAAAAGTAAAGAAATTCGGCACCAGGAGTGGCAGA
AGGGATTTATGAATGCAAAGAGAAGCGCGAGGACGTGAAGTGGAGGACGAGGACGGGACGACCAAGCTGAAACAGAGGCGCA
GCCGACCAACTTCACGCTGGAGCAGCTGAACGAGCTCGAGCGACTTTCGACGAGACCCATTACCCGACGCCTTCATGCGC
GAGGAGCTCAGCCAGCGCTGGGGCTCTCCGAGGCGCGCTGCAGGTTTGGTTCCAGAACCGGAGAGCCAAGTCCCGCAACA
AGAGAATCAGATGCATAAAGGCGTCATCTTGGGCACAGCCAACCACCTAGACGCTGCGGAGTGGCACCCCTACGTCAACATGG
GAGCTTACGGATGCCTTTCCAACAGTCCAGGCTCAGCTGCAGCTGGAAGGCGTGGCCACGCGCACCCGACCTGCACCCG
CACCTGGCGGCGCACGCGCCTACCTGATGTTCCCCCGCCGCCCTTCGGGCTGCCCATCGCGTGCCTGGCCGAGTCCGCCCTC
GGCCGCCCGTGGTGCGCCGCCGCCCAAAAGCAACAGCAAGAATTCCAGCATCGCCGACCTGCGGCTCAAGGCGCGGAAGC
ACGCGGAGGCCCTGGGGCTCTGA

Fusionsprotein SHOX-GR (C-terminal) über HindIII-Schnittstelle in pcDNA4/TO; DNA-Sequenz

ATGGAAGAGCTCACGGCTTTTGTATCCAAGTCTTTTGACCAGAAAAGCAAGGACGGTAACGGCGGAGGGCGGAGGGCGGAGG
TAAGAAGGATTCCATTACGTACCGGAAAGTTTTGGAGAGCGGACTGGCGCGCTCCCGGAGCTGGGGACGTCGGATTCCAGCC
TCCAGGACATCACGGAGGGCGGCGCCACTGCCCGTGCATTTGTTCAAGGACCACGTAGACAATGACAAGGAGAAAAGTAAA
GAATTCGGCACCAGGAGAGTGGCAGAAGGGATTTATGAATGCAAAGAGAAGCGCGAGGACGTGAAGTCCGAGGACGAGGACGG
GCAGACCAAGCTGAAACAGAGGGCGCAGCCGACCAACTTCACGCTGGAGCAGCTGAACGAGCTCGAGCGACTTTCGACGAGA
CCCATTACCCGACGCCTTCATGCGGAGGAGCTAGCCAGCGCCTGGGGCTCTCCGAGGCGCGCTGCAGGTTTGGTTCCAG
AACCGGAGACCAAGTGGCCGAAACAAGAGAATCAGATGCATAAAGGCGTCATCTTGGGCACAGCCAACCACCTAGACGCTG
CCGAGTGGCACCCCTACGTCAACATGGGAGCCTTACGGATGCCTTTCCAACAGGTCCAGGCTCAGCTGCAGCTGGAAGGCGTGG
CCCACGCGCACCCGACCTGCACCCGACCTGGCGGCGCACGCGCCTACCTGATGTTCCCCCGCCGCCCTTCGGGCTGCC
ATCGCGTGCCTGGCCGAGTCCGCCCGCCCGCTGGTGCGCCGCCGCCCAAAAGCAACAGCAAGAATTCCAGCATCGC
CGACCTGCGGCTCAAGGCGCGGAAGCACGCGGAGGCCCTGGGGCTCAAGCTTACCTCTGAAAATCCTGGTAACAAAACAATAG
TTCCTGCAACGTTACCACAACCTACCCCTACCCTGGTGTCACTGTTGGAGGTTATTGAACCTGAAGTGTATATGCAGGATAT
GATAGCTCTGTTCCAGACTCAACTTGGAGGATCATGACTACGCTCAACATGTTAGGAGGGCGGCAAGTATTGCAGCAGTGAA
ATGGGCAAAGGCAATACCAGTTTTAGGAACTTACACCTGGATGACCAATGACCCTACTGCAGTACTCCTGGATGTTTCTTA
TGGCATTGCTCTGGGGTGGAGATCATATAGACAATCAAGTGCAAACCTGCTGTGTTTTGCTCCTGATCTGATTATTAATGAG
CAGAGAATGACTCTACCCTGCATGTACGACCAATGTAACACATGCTGTATGTTTCCCTCTGAGTTACACAGGCTTCAGGTATC
TTATGAAGAGTATCTCTGTATGAAAACCTTACTGCTTCTCTTTCAGTTCTTAAGGACGGTCTGAAGAGCCAAGAGCTATTTG
ATGAAATAGAATGACCTACATCAAAGAGCTAGGAAAAGCCATTGTCAAGAGGGAAAGGAAACTCCAGCCAGAACTGGCAGCGG
TTTTATCAACTGACAAAACCTTGGATTCTATGCATGAAGTGGTTGAAAATCTCCTTAACTATTGCTTCCAAACATTTTTGGA
TAAGACCATGAGTATTGAATTCGCCGAGATGTTAGCTGAATCATCAACCAATCAGATACCAAAAATATTCAAATGGAAATATCAA
AAAACCTTCTGTTTCATCAAAAAGTGCTCGAGTTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAA

Blau: GR, Rot: SHOX-WT, Schwarz: Linkerregion

Fusionsprotein EBD (N-terminal)-SHOX über BamHI-Schnittstelle in pcDNA4/TO; DNA-Sequenz

ATGAGGGGTGAAGTGGGGTCTGCTGGAGACATGAGAGCTGCCAACCTTTGGCCAAGCCCGCTCATGATCAAACGCTCTAAGAA
 GAACAGCCTGGCCCTTGTCCCTGACGGCCGACCAGATGGTCAGTGCCTTGTGGATGCTGAGCCCCCATACTCTATTCCGAGT
 ATGATCCTACCAGACCCTTCAGTGAAGCTTCGATGATGGGCTTACTGACCAACCTGGCAGACAGGGAGCTGGTTCACATGATC
 AACTGGGCGAAGAGGGTGCCAGGCTTGTGGATTTGACCCCTCCATGATCAGGTCCACCTTCTAGAATGTGCCTGGCTAGAGAT
 CCTGATGATTGGTCTCGTCTGGCGCTCCATGGAGACCCAGTGAAGCTACTGTTTGTCTCTAACTTGTCTTTGGACAGGAACC
 AGGAAAAATGTGTAGAGGGCATGGTGGAGATCTTCGACATGCTGCTGGTACATCATCTCGGTTCCGCATGATGAATCTGCAG
 GGAGAGGAGTTTGTGCCTCAAATCTATTATTTTGTCTAATTTCTGGAGTGTACACATTTCTGTCCAGCACCTGAAGTCTCT
 GGAAGAGAAGGACCATATCCACCGAGTCTGGACAAGATCACAGACACTTTGATCCACCTGATGGCCAAGGCAGGCCTGACCC
 TGCAGCAGCAGCACCAGCGGCTGGCCAGCTCCTCCTCATCTCTCCACATCAGGCACATGAGTAACAAAGGCATGGAGCAT
 CTGTACAGCATGAAGTGAAGAAGCTGGTGGCCCTCTATGACCTGCTGCTGGAGGCGGGACGCCACCGCTACATGGCC
 CACTAGCCGTGGAGGGGCATCCGTGGAGGAGACGGACCAAGCCACTTGGCCACTGCGGGCTCTACTTCATCGCATTCCCTTG
 AAAAGTATTACATCACGGGGGAGGCAGAGGGTTTCCCTGCCACAGTGGATCCGAAGAGCTCACGGCTTTTGTATCCAAGTCT
 TTTGACCAGAAAAGCAAGGACGGTAACGGCGGAGCGGAGGCGGGAGGTAAGAAGGATTCCATTACGTACCGGGAAGTTTT
 GGAGAGCGGACTGGCGCTCCCGGAGCTGGGGACGTCGGATTCCAGCCTCCAGGACATCACGGAGGCGGGCGCCACTGCC
 CGGTGCATTTGTTCAAGGACCACGTAGACAATGACAAGGAGAACTGAAAGAATTCGGCACCGCAGAGTGGCAGAAGGGATT
 TATGAATGCAAAGAGAAGCGGAGGACGTGAAGTCGGAGGACGAGGACGGGACGACCAAGCTGAAACAGAGGCGCAGCCGCAC
 CAACCTCACGCTGGAGCAGCTGAACGAGCTCGAGCGACTCTTCGACGAGACCATTACCCCGACGCTTCATGCGCGAGGAGC
 TCAGCCAGCGCCTGGGGCTCTCCGAGGCGCGCTGCAGGTTTGGTTCGAGAACCGGAGAGCAAGTGGCCAAACAAGAGAAT
 CAGATGCATAAAGCGTCACTTTGGGCACAGCAACCACTAGACGCTGCCGAGTGGCACCTACGTCAACATGGGAGCCTT
 ACGGATGCCTTTCCAAACAGGTCAGGCTCAGCTGCAGTGGAAAGGCTGGCCACGCGCACCCGACCTGCACCCGACCTGG
 CGGCGCAGCGCCCTACCTGATGTTCCCCCGCCGCTTCCGGCTGCCATCGCGTGCCTGGCCGAGTCCGCCTCGGCCGCC
 GCCGTGGTGCAGCCGCCGCAAAAGCAACAGCAAGAATTCAGCATCGCCGACTGCGGCTCAAGGCGGGAAGCACGCGGA
 GGCCCTGGGGCTCTGA

Fusionsprotein SHOX-EBD (C-terminal) über BamHI-Schnittstelle in pcDNA4/TO; DNA-Sequenz

ATGGAAGAGCTCACGGCTTTTGTATCCAAGTCTTTTGACCAGAAAAGCAAGGACGGTAACGGCGGAGGCGGAGGCGGGGAGG
 TAAGAAGGATTCCATTACGTACCGGGAAGTTTTGGAGAGCGGACTGGCGCTCCCGGAGCTGGGGACGTCGGATTCCAGCC
 TCCAGGACATCACGAGGGCGGCGCCACTGCCCGTGCATTTGTTCAAGGACCAGTAGACAATGACAAGGAGAACTGAAA
 GAATTCGGCACCGCAGAGTGGCAGAAGGGATTTATGAATGCAAAGAGAAGCGCGAGGACGTGAAGTCCGAGGACGAGGACGG
 GCAGACCAAGCTGAAACAGAGGCGCAGCCGACCAACTTCACGCTGGAGCAGCTGAACGAGCTCGAGCGACTCTTCGACGAGA
 CCCATTACCCCGACGCTTCATGCGGAGGAGCTCAGCCAGCGCCTGGGGCTCTCCGAGGCGCGCTGCAGGTTTGGTCCAG
 AACCGGAGAGCCAAGTGGCCGAAACAAGAGAATCAGATGCATAAAGGCGTCACTTTGGGCACAGCAACCACTAGACGCTG
 CCGAGTGGCACCTACGTCAACATGGGAGCCTTACGGATGCCTTTCCAACAGGTCAGGCTCAGCTGCAGCTGGAAGGCGTGG
 CCCAGCGCACCCGACCTGCACCCGACCTGGCGGCGCACGCGCCCTACCTGATGTTCCCCCGCCGCTTCCGGCTGCC
 ATCGCTGCTGGCCGAGTCCGCCTCGGCCGCCGCGTGGTCCGCCGCGCCGCAAAAGCAACAGCAAGAATTCAGCATCGC
 CGACCTGCGGCTCAAGGCGGGAAGCACGCGGAGGCCCTGGGGCTGGATCCAGGGGTGAAGTGGGGTCTGCTGGAGACATGAG
 AGTGCCAACCTTTGGCCAAGCCCGCTCATGATCAAACGCTCTAAGAAGAACAGCCTGGCCTTGTCCCTGACGGCCGACCAGA
 TGGTCAGTGCCTTGTGGATGCTGAGCCCCCATACTCTATTCCGAGTATGATCCTACCAGACCCTTCAGTGAAGCTTCGATG
 ATGGGCTTACTGACCAACCTGGCAGACAGGGAGCTGGTTCACATGATCAACTGGGCGAAGAGGGTGCCAGGCTTTGTGGATTT
 GACCTCCATGATCAGGTCCACCTTCTAGAATGTGCCTGGCTAGAGATCCTGATGATTGGTCTCGTCTGGCGCTCCATGGAGC
 ACCAGTGAAGCTACTGTTTGTCTCTAAGTGTCTTGGACAGGAACCAGGGAAAAATGTGTAGAGGGCATGGTGGAGATCTTC
 GACATGCTGCTGGTACATCATCTCGGTTCCGCATGATGAATCTGCAGGGAGAGGAGTTTGTGTGCCTCAAATCTATTATTT
 GCTTAATTCTGGAGTGTACACATTTCTGTCCAGCACCTGAAGTCTCTGGAAGAGAAGGACCATATCCACCGAGTCTGGACA
 AGATCACAGACACTTTGATCCACCTGATGGCCAAGGACGCGCTGACCTGCAGCAGCAGCACCAGCGGCTGGCCAGCTCCTC
 CTCATCCTCTCCACATCAGGCACATGAGTAACAAAGGCATGGAGCATCTGTACAGCATGAAGTGAAGAAGCTGGTGGCCCT
 CTATGACCTGCTGCTGGAGGCGGGACGCCCACCGCTACATGCGCCACTAGCCGTGGAGGGGCATCCGTGGAGGAGACGG
 ACCAAAGCCACTTGGCCACTGCGGGCTCTACTTCATCGCATTCTTGGAAAAGTATTACATCACGGGGGAGGCAGAGGGTTTC
 CTGCCACAGTCTGA

Blau: EBD, Rot: SHOX-WT, Schwarz: Linkerregion