

Aus dem Institut für Medizinische Molekularbiologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. P. K. Müller

**Die Funktion des Transkriptionsfaktors Sox9 während der
Knorpelzellendifferenzierung**

-

**Analyse Sox9-defizienter embryonaler Stammzellen
der Maus *in vitro***

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

Aus der Medizinischen Fakultät

vorgelegt von

Gunnar Hargus

aus Eutin

Lübeck 2004

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Jürgen Rohwedel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Werner Solbach

Tag der mündlichen Prüfung: 08.04.2005

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 08.04.2005

gez. Prof. Dr. med. Peter Dominiak

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis**A Inhaltsverzeichnis****B Abkürzungen**

1	Einleitung	1
	1.1 Mechanismen der Knorpelzellendifferenzierung.....	1
	1.2 Zur Bedeutung des Transkriptionsfaktors Sox9.....	4
	1.3 Analyse der Funktion von Sox9 <i>in vivo</i> – 'Knockout'-Strategien.....	7
	1.4 Ein alternativer Weg – Die <i>in vitro</i> -Differenzierung embryonaler Stammzellen.....	10
2	Zielsetzung	12
3	Material und Methoden	13
	3.1 Kultivierung und Differenzierung von ES-Zellen	13
	3.1.1 Material, Medien und Lösungen.....	13
	3.1.1.1 Material.....	13
	3.1.1.2 Medien und Lösungen.....	13
	3.1.1.2.1 PBS.....	13
	3.1.1.2.2 Trypsin / EDTA-Lösung.....	14
	3.1.1.2.3 Gelatine-Lösung.....	14
	3.1.1.2.4 Nährmedien und Additive.....	14
	3.1.2 Allgemeine Techniken der Zellkultivierung.....	15
	3.1.2.1 Beschichten der Gewebekulturmateriale mit Gelatine.....	15
	3.1.2.2 Ablösen der Zellen zum Passagieren oder Einfrieren.....	15
	3.1.2.3 Kryokonservierung von Zellen.....	16
	3.1.2.4 Auftauen der Zellen.....	16
	3.1.2.5 Ermittlung der Zellzahl.....	16
	3.1.3 Präparation, Kultivierung und Mitomycin C-Behandlung embryonaler Fibroblasten.....	17
	3.1.3.1 Präparation und Kultivierung embryonaler Fibroblasten.....	17
	3.1.3.2 Mitomycin C-Behandlung embryonaler Fibroblasten.....	17
	3.1.4 Kultivierung embryonaler Stammzellen.....	18
	3.1.5 Differenzierung embryonaler Stammzellen.....	19
	3.1.5.1 Kultivierung der ES-Zellen als „hängende Tropfen“ (0d-2d).....	19
	3.1.5.2 Kultivierung der EBs in Suspension (2d-5d).....	20
	3.1.5.3 Plattieren und weitere Kultivierung der EBs (5d-5+33d).....	20
	3.1.6 ES-Zell-Klonierung.....	20
	3.1.7 Stimulierung der EBs mit Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie.....	21
	3.2 Reverse Transkription (RT) und Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	21
	3.2.1 RNA-Isolierung.....	22
	3.2.1.1 Geräte, Materialien und Lösungen.....	22
	3.2.1.2 Durchführung.....	22
	3.2.2 Reverse Transkription (RT).....	23
	3.2.2.1 Geräte, Lösungen, Puffer, Nukleotide und Enzyme.....	23
	3.2.2.2 Durchführung.....	23

3.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	24
3.2.3.1 Ansätze und Enzyme.....	24
3.2.3.2 Durchführung.....	25
3.2.4 Agarosegelelektrophorese.....	25
3.2.4.1 Geräte, Chemikalien und Puffer.....	26
3.2.4.2 Durchführung.....	26
3.2.5 Densitometrische Auswertung.....	26
3.3 Klonierung von RT-PCR-Produkten	27
3.3.1 Aufreinigung der RT-PCR-Produkte.....	27
3.3.1.1 Material und Lösungen.....	27
3.3.1.2 Durchführung.....	27
3.3.2 Klonierung der RT-PCR-Produkte in einem Plasmidvektor.....	27
3.3.2.1 Vektor, Lösungen, Enzyme, Geräte, Material und Medien.....	28
3.3.2.2 Durchführung der Ligation.....	29
3.3.2.3 Durchführung der Transformation und Selektion von E.coli-Bakterien.....	29
3.3.3 Isolation und Restriktionsverdau der Plasmid-DNAs.....	29
3.3.3.1 Material, Lösungen, Puffer und Enzyme.....	30
3.3.3.2 Durchführung.....	30
3.3.4 DNA-Sequenzierung.....	30
3.4 Histochemischer Nachweis von knorpelspezifischen Proteoglykanen	31
3.4.1 Lösungen und Puffer.....	31
3.4.2 Durchführung.....	31
3.5 Nachweis der Protein-Verteilung in EBs mittels indirekter Immunfluoreszenz	31
3.5.1 Lösungen und Puffer.....	32
3.5.2 Durchführung.....	32
3.6 Darstellung der Verteilung von knorpelspezifischen Gentranskripten und Proteinen in EBs mittels <i>in situ</i>-Hybridisierung in Kombination mit indirekter Immunfluoreszenz	33
3.6.1 Herstellung einer RNA-Sonde mittels <i>in vitro</i> -Transkription.....	33
3.6.1.1 Lösungen, Puffer und Enzyme.....	34
3.6.1.2 Durchführung.....	34
3.6.2 <i>In situ</i> -Hybridisierung.....	34
3.6.2.1 Chemikalien und Lösungen.....	35
3.6.2.2 Durchführung.....	36
3.7 Nachweis des Bindungsvermögens von PNA in differenzierenden EBs	37
3.7.1 Lösungen und Medien.....	37
3.7.2 Durchführung.....	38
3.8 Nachweis von Kollagen II-Protein mittels Westernblot	38
3.8.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	38
3.8.1.1 Lösungen und Puffer.....	38
3.8.1.2 Durchführung.....	39
3.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
3.8.2.1 Geräte, Material, Lösungen und Puffer.....	39
3.8.2.2 Durchführung.....	40
3.8.3 Western-Blot im Semi-Dry-Verfahren.....	41
3.8.3.1 Geräte, Lösungen und Puffer.....	41
3.8.3.2 Durchführung.....	42
3.9 Elektronenmikroskopie	43
3.10 Statistische Auswertung	43

4	<i>Ergebnisse</i>	44
	4.1 Charakterisierung von Sox9-defizienten ES-Zellen	44
	4.2 Auswirkungen des Verlustes von Sox9 auf die ES-Zell-Differenzierung in Knorpelzellen	48
	4.2.1 Expression knorpelspezifischer Marker in Wildtyp-, Sox9 ^{+/-} - und Sox9 ^{-/-} -EBs während der ES-Zell-Differenzierung.....	48
	4.2.2 Differenzierende Wildtyp-, Sox9 ^{+/-} - und Sox9 ^{-/-} -ES-Zellen bilden mesenchymale Knorpelvorläuferkondensationen.....	51
	4.2.3 Sox9 ^{-/-} -ES-Zellen durchlaufen im Gegensatz zu Wildtyp- und Sox9 ^{+/-} -ES-Zellen nicht das Stadium der späten Knorpelzellendifferenzierung.....	60
	4.3 Einfluß von Wachstumsfaktoren der TGF-β-Familie auf die Knorpelzellendifferenzierung Sox9-defizienter ES-Zellen	69
	4.4 Auswirkung des Sox9-Funktionsverlustes auf die kardiale und neuronale Differenzierung <i>in vitro</i>	70
5	<i>Diskussion</i>	72
	5.1 Die verwendeten Sox9-defizienten ES-Zellen besitzen ein funktionsloses Sox9-Gen	72
	5.2 Der Verlust von Sox9 hat keine Auswirkungen auf die Bildung mesenchymaler Knorpelvorläuferkondensationen <i>in vitro</i>	74
	5.3 Die Knorpelmarker Kollagen II und Aggrecan werden in Sox9-defizienten EBs exprimiert	78
	5.4 Der Verlust von Sox9 bewirkt eine gestörte späte Knorpelzellendifferenzierung <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	80
	5.5 Die Blockade der Knorpelzellendifferenzierung in Sox9-defizienten EBs kann durch Wachstumsfaktoren der TGF-β-Familie nicht aufgehoben werden	82
	5.6 Erste Hinweise auf eine Rolle von Sox9 während der kardiogenen und neuronalen Differenzierung	83
	5.7 Stammzellen in der Medizin – ein Ausblick	84
6	<i>Zusammenfassung</i>	86
7	<i>Literaturverzeichnis</i>	89
	 <i>Danksagung</i>	105
	 <i>Lebenslauf</i>	106
	 <i>Veröffentlichungen</i>	108

Abkürzungen

A	Ampère
Abb	Abbildung
AER	Apical Ectodermal Ridge
α -SG	alpha-Sarcoglycan
AS	Aminosäure
BCIP	Bromo-Chloro-Indoylphosphat
bHLH	basic Helix Loop Helix
β -ME	beta-Mercaptoethanol
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaare
BJ	Blue Juice
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CD-RAD	Cartilage-Derived Retinoic Acid-Sensitive Protein
cm	Zentimeter
CMP	Cartilage Matrix Protein
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
CSEP	Chondrocyte-Specific Enhancer-Binding Proteins
Cy	Indocyanin
d	Tag(e)
Da	Dalton
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles`-Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynucleosidtriphosphate
DTAF	Dichlorotriazinylaminofluorescein
DTT	Dithiotreitol

dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EBs	Embryoid Bodies
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FGF	Fibroblast Growth Factor
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
HMG	High Mobility Group
kb	Kilobasen
l	Liter
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
µl	Mikroliter
M	Mol
min	Minuten
MMC	Mitomycin C
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
NBT	Nitrotetrazoliumblauchlorid
N-CAM	Neural Cell Adhesion Molecule
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
p.c.	post conceptionem
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PNA	Peanut-Agglutinin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkription
sec	Sekunden
SF	Steroid Factor
Shh	Sonic Hedgehog

Sox	Sry-related High Mobility Group Box
SRF	Serum Response Factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
TGF	Transforming Growth Factor
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Mechanismen der Knorpelzellendifferenzierung

Die Entwicklung von Geweben, Organen und Organsystemen während der Embryogenese ist ein sehr komplexer Prozeß, bei dem Zellen der drei Keimblätter ein spezifisches Differenzierungsprogramm durchlaufen. Das Skelettsystem, das zur Stabilität und Struktur des werdenden Organismus entscheidend beiträgt, entwickelt sich größtenteils aus dem Mesoderm. So leitet sich das Axialskelett mit seinen Wirbelkörpern und Rippen von dem Sklerotom der Somiten ab, während das Extremitätenskelett seinen Ursprung im lateralen Plattenmesoderm hat (Erlebacher et al., 1995). Neuroektodermalen Ursprungs sind hingegen viele Schädelknochen, die von auswandernden Neuralleistenzellen gebildet werden.

Die meisten Knochen des Säugetierskeletts werden über eine Knorpelvorstufe gebildet. Beispielsweise werden die langen Röhrenknochen der Gliedmaßen als Knorpel angelegt, der schrittweise von Knochengewebe ersetzt wird, ein Vorgang, der als enchondrale Ossifikation bezeichnet wird. Die Skelettentwicklung setzt demnach eine erfolgreiche Bildung von Knorpelgewebe während der Embryogenese voraus. Das Aufdecken von Regulationsmechanismen, die die Knorpelzellendifferenzierung bzw. Chondrogenese betreffen, ist daher in den Mittelpunkt vieler Forschungsbemühungen gerückt.

Das erste Ereignis der Chondrogenese besteht darin, daß mesenchymale Zellen, also Zellen des embryonalen Bindegewebes, ihre Multipotenz verlieren und einen ersten Differenzierungsschritt in Richtung Knorpelvorläuferzelle durchlaufen (Abb.1). Haben die mesenchymalen Zellen diesen, als 'Commitment' bezeichneten Vorgang vollzogen, beginnen sie, sich zusammenzulagern und mesenchymale Knorpelvorläuferkondensationen auszubilden (Thorogood und Hinchliffe, 1975; Poole, 1991). Dies ist das erste morphologische Ereignis während der Knorpelzellendifferenzierung, welches seine Bedeutung darin hat, daß hier Form, Position und Anzahl späterer skelettaler Elemente festgelegt werden. In dieser frühen Phase treten die Knorpelvorläuferzellen sowohl über 'gap junctions' als auch über Zelladhäsionsmoleküle in Verbindung (Kelley und Fallon, 1978; Coelho und Kosher, 1991). Im weiteren Verlauf differenzieren die mesenchymalen Knorpelvorläuferzellen in proliferierende Chondroblasten, die sich in hypertrophe Chondrozyten umwandeln. Diese terminal differenzierten Chondrozyten liegen eingebettet in extrazellulärer Matrix und werden schließlich apoptotisch. Diese späte Phase der Knorpelzellendifferenzierung findet man charakteristischerweise in den Wachstumsfugen

langer Röhrenknochen, in denen die hypertrophen Chondrozyten schließlich von einwandernden Osteoblasten ersetzt werden. Auch eine direkte Transdifferenzierung hypertropher Chondrozyten in Osteoblasten wurde beschrieben (Cancedda et al., 1992).

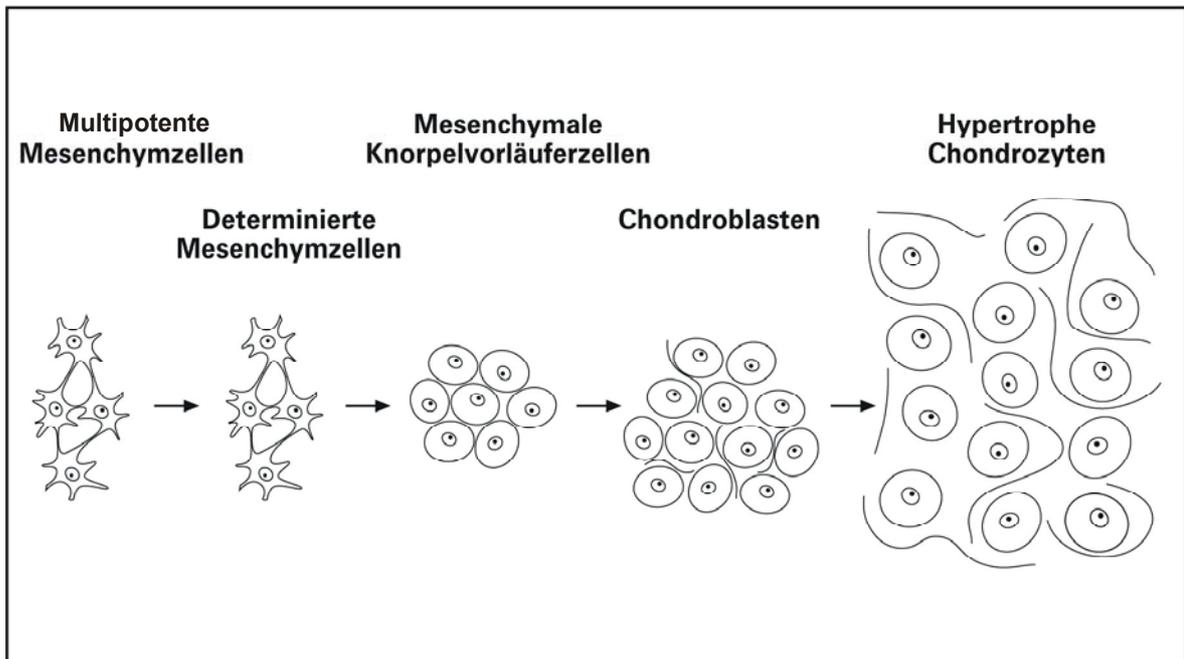


Abbildung 1: Schematische Darstellung der chondrogenen Zelldifferenzierung *in vivo*. Multipotente mesenchymale Zellen durchlaufen einen ersten Differenzierungsschritt in Richtung chondrogen determinierte Mesenchymzellen. Diese Zellen runden sich ab, lagern sich als mesenchymale Knorpelvorläuferzellen aneinander und differenzieren anschließend in Chondroblasten, die Kollagenfibrillen synthetisieren. Das terminale Differenzierungsstadium stellen hypertrophe Chondrozyten dar, die an Größe zugenommen haben und von reichlich extrazellulärer Matrix umgeben sind.

Das Differenzierungsverhalten von Zellen ist abhängig von ihrer Umgebung. So beeinflussen sowohl Zell-Zell- als auch Zell-Matrix-Interaktionen das Schicksal einer Zelle (Hynes und Lander, 1992; Adams und Watt, 1993; Fässler et al., 1996; Sastry und Horwitz, 1996). Dementsprechend werden beteiligte Membranrezeptoren wie z.B. die Integrine und ihre Untereinheiten während der Zelldifferenzierung differentiell exprimiert. Beispielsweise wird während der frühen chondrogenen Differenzierungsphase das α_1 -Integrin herunter- und das α_3 -Integrin heraufreguliert (Shakibaei et al., 1995). Auch die Adhäsionsmoleküle N-Cadherin und N-CAM werden in mesenchymalen Knorpelvorläuferkondensationen exprimiert, während sie in reifen Knorpelstrukturen nur noch im Perichondrium gefunden werden (Widelitz et al., 1993; Oberlender und Tuan, 1994a;

Oberlender und Tuan, 1994b). Knorpelvorläuferkondensationen zeichnen sich ferner durch die Fähigkeit aus, das Lektin 'Peanut'-Agglutinin (PNA) zu binden. Diese Fähigkeit geht den reifenden Knorpelzellen schließlich verloren (Aulthouse und Solursh, 1987; Gotz et al., 1991; Hall und Miyake, 1992).

Die extrazelluläre Matrix spielt eine entscheidene Rolle sowohl bei der Zelladhäsion als auch bei der Signaltransduktion, die über entsprechende Zellmatrixrezeptoren vermittelt werden. Eine große Gruppe extrazellulärer Matrixproteine sind die Kollagene, deren unterschiedliche Typen ein charakteristisches Expressionsmuster während der Chondrogenese aufweisen. Zunächst produzieren mesenchymale Zellen eine Kollagen I-haltige Matrix, die mit voranscheidender Differenzierung in Knorpelvorläuferkondensationen von einer Kollagen II-, IX- und XI-haltigen Matrix ersetzt wird (Kosher et al., 1986; Swiderski und Solursh, 1992; DeLise et al., 2000). Kollagen II stellt die Hauptkomponente der chondrogenen Matrix dar. Das Kollagen II-Gen wird während der Knorpelzelldifferenzierung in zwei verschiedenen mRNA-'Splice'-Varianten exprimiert. Kollagen *Iia* wird als juvenile Variante in mesenchymalen Knorpelvorläuferzellen, Kollagen *Iib* als adulte Form hingegen in reiferen Chondroblasten exprimiert, wobei bei dieser Variante das Exon 2 in der mRNA fehlt (Ryan und Sandell, 1990; Sandell et al., 1991). Schließlich stellen hypertrophe Chondrozyten die Synthese von Kollagen II, IX und XI ein und produzieren stattdessen Kollagen X (DeLise et al., 2000). Neben Kollagenen sind Chondroitinsulfat-haltige Proteoglykane für die druckelastische Eigenschaft des Knorpels von entscheidender Bedeutung, weil sie Wasser zu binden vermögen. Aggrecan ist ein wesentlicher Vertreter dieser Gruppe und wird von heranreifenden Chondroblasten exprimiert (Muir, 1995). Weitere von diesen Zellen sezernierte Matrixkomponenten sind 'Cartilage oligomeric matrix protein' (COMP), 'Cartilage matrix protein' (CMP) und das 'Link-Protein' (Stirpe und Goetinck, 1989; Hedbom et al., 1992; Muratoglu et al., 1995; Recklies et al., 1998).

Alle Anteile des Knorpelskeletts im sich entwickelnden Embryo müssen räumlich und zeitlich koordiniert angelegt werden. Bei diesem als Musterbildung bezeichneten Prozeß spielen Induktionsprozesse aus der Umgebung eine entscheidende Rolle, die eine Aktivierung von Homeobox-Genen zur Folge haben (Krumlauf, 1993; Krumlauf, 1994; Morgan und Tabin, 1994). Beispielsweise kontrolliert der Wachstumsfaktor FGF-8 aus der Gruppe der 'Fibroblast Growth Factors' die proximodistale Achsenausrichtung der Gliedmaßen. FGF-8 wird dabei von ektodermalen Zellen der 'Apical Ectodermal Ridge' (AER) gebildet (Linda et al., 1999). Weitere Regulatoren der Chondrogenese in

Gliedmaßen stellen die Signalmoleküle WNT-7a und Sonic Hedgehog (Shh) dar, die auf die Achsenbildung in ventrodorsaler bzw. anteroposteriorer Richtung einwirken (Linda et al., 1999; Enomoto-Iwamoto et al., 2000). Die Bildung des Axialskeletts aus den sklerotomalen Anteilen der Somiten steht unter dem Einfluß von Chorda und Neuralrohr (Brand-Saberi et al., 1993; Fan und Tessier-Lavigne, 1994). Eine entscheidene Rolle bei diesen Induktionsvorgängen wird Wachstumsfaktoren aus der Gruppe der 'Transforming Growth Factors' (TGF) zugesprochen, zu denen beispielsweise TGF- β_1 , TGF- β_3 und 'Bone Morphogenetic Protein'-2 (BMP-2) gehören (Kulyk et al., 1989; Leonard et al., 1991; Wozney, 1992; Roark und Greer, 1994; Ganan et al., 1996).

Durch induzierende oder inhibierende Faktoren wird letztlich die Expression von Transkriptionsfaktoren in der Zelle reguliert. Während der Chondrogenese wird z.B. im Sklerotom das 'Paired Box'-Gen Pax-1 in hohem Maße exprimiert (Deutsch et al., 1988; Wallin et al., 1994). Ähnlich verhält sich auch die Expression des 'basic Helix Loop Helix' (bHLH) Transkriptionsfaktors Scleraxis, der in allen Knorpelvorläuferkondensationen von Rumpf und Gliedmaßen stark exprimiert wird (Cserjesi et al., 1995). Eine weitere Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die entwicklungsbiologische Prozesse regulieren, sind SOX- (Sry-related High Mobility Group Box) Transkriptionsfaktoren (Wegner, 1999). Aus dieser Gruppe werden Sox5 und Sox6 während der Kondensation mesenchymaler Knorpelvorläuferzellen und in reifen Chondrozyten exprimiert (Lefebvre et al., 1998). Von zentraler Bedeutung für die Entwicklung von Knorpelgewebe ist schließlich die entwicklungsspezifische Expression des Transkriptionsfaktors Sox9, denn eine Mutation im Sox9-Gen hat einen erheblichen Einfluß auf die Knorpelzellendifferenzierung (Bi et al., 1999; de Crombrughe et al., 2000; Bi et al., 2001; Kist et al., 2002).

1.2 Zur Bedeutung des Transkriptionsfaktors Sox9

Bereits vor etwa 20 Jahren wurde erstmals eine Fehlbildung des Skelettsystems bei Neugeborenen beschrieben, die fortan als Kampomelie-Syndrom bzw. kurz Kampomelie bezeichnet wurde (Houston et al., 1983; Foster et al., 1994; Wagner et al., 1994). Als Ursache dieser Erkrankung wurde ein Defekt in dem Gen gefunden, das für den Transkriptionsfaktor Sox9 kodiert (Kwok et al., 1995). Dabei wiesen fast alle Skelettelemente, die im Rahmen der enchondralen Ossifikation aus Knorpelvorstufen entstehen, erhebliche Deformationen auf (Abb.2). Ein Hauptmerkmal der Kampomelie sind daher verkürzte und gebogene Röhrenknochen von Unter- und Oberschenkel (griechisch: *καμπύλος* = *gebogen*; *μέλος* = *Gliedmaße*).

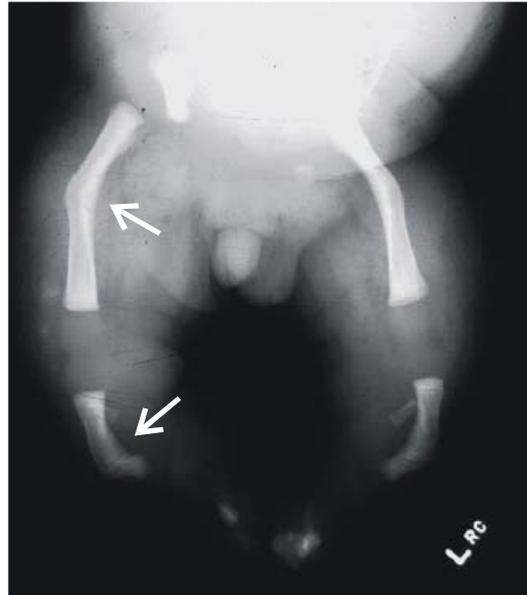


Abbildung 2: Röntgenbild eines Neugeborenen mit Kampomelie
Typisches Merkmal sind die gebogenen und verkürzten langen Röhrenknochen
(Pfeile). Quelle: www.medgen.genetics.utah.edu/photographs/diseases/high/1.jpg

Weitere Charakteristika sind neben einem resultierenden Zwergwuchs kurze Phalangen von Händen und Füßen, hypoplastische zervikale und thorakale Wirbel, ein Glockenthorax mit einem fehlenden Rippenpaar, hypoplastische Scapulae und eine Deformierung des Beckengürtels. Auch im Gesichtsbereich treten Fehlbildungen in Form von Mikrognathie, Gaumenspalten, kleinem Chondrokranium und im Vergleich hierzu überproportional großem Neurokranium auf (Houston et al., 1983; Mansour et al., 1995). Weiterhin sind auch permanente Knorpelstrukturen von Nase, Larynx, Trachea und Bronchien fehlangelegt, so daß viele der Neugeborenen mit Kampomelie schon kurz nach der Geburt am akuten respiratorischem Versagen versterben. Schließlich werden bei den Neugeborenen unterschiedliche Fehlentwicklungen von Herz, Niere, zentralem Nervensystem und Gonaden gefunden, wobei letztere sich bei 3/4 aller genetisch männlichen Patienten im Sinne einer weiblichen Geschlechtsdifferenzierung manifestieren (Mansour et al., 1995). Die Kampomelie tritt mit einer Häufigkeit von 0,5 bis 20 pro 100.000 Neugeborenen auf und kann einem autosomal-dominanten Erbgang folgen bzw. durch *de novo*-Mutationen im Sox9-Gen verursacht sein (Kwok et al., 1995; Mansour et al., 1995; Wright et al., 1995).

Sox9 gehört zur Familie der SOX-Transkriptionsfaktoren, die eine als HMG- (High Mobility Group) Box bezeichnete DNA-bindende Domäne besitzen. Diese Domäne besteht

aus 79 Aminosäuren und weist eine hohe Homologie zur HMG-Box des vom Y-Chromosom kodierten Transkriptionsfaktors SRY auf, woraus sich die Namensgebung ergab (Wegner, 1999; Bowles et al., 2000).

Sox9 wird während der Embryogenese in allen Strukturen exprimiert, die am Aufbau des Skeletts beteiligt sind. So findet man Sox9-Transkripte in den Sklerotomen der Somiten, im lateralen Plattenmesoderm, im Kopfmesenchym und in auswandernden Neuralleistenzellen (Wright et al., 1995; Ng et al., 1997; Zhao et al., 1997). Dabei wird Sox9 vor allem in mesenchymalen Knorpelvorläuferzellen während der Kondensationsphase stark exprimiert. Während der weiteren Reifung der Chondroprogenitorzellen in Chondroblasten bleibt die hohe Sox9-Expression bestehen, ebenso in proliferierenden Chondrozyten der Wachstumsfugen und in Chondrozyten permanenter Knorpelstrukturen. Sox9 wird sowohl in Knorpelanlagen von Femur, Tibia, Rippen, Wirbelkörpern, Scapula und pelvinen Knochen als auch in Nasen-, Kehlkopf- und Bronchialknorpel exprimiert. In hypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfugen wird die Sox9-Expression schließlich eingestellt (Wright et al., 1995; Ng et al., 1997; Zhao et al., 1997).

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, daß Sox9 eine Reihe von knorpelassoziierten Zielgenen aktiviert. Während der Embryogenese wird Sox9 in mesenchymalen Knorpelvorläuferkondensationen und reifen Knorpel-elementen mit Kollagen II, dem Hauptprotein chondrogener Matrix, koexprimiert (Ng et al., 1997; Zhao et al., 1997). Sox9 bindet an ein 'Enhancer'-Element im Intron 1 des Kollagen II-Gens, welches mehrere Bindungsstellen für die HMG-Domäne von Sox9 enthält (Zhou et al., 1995; Lefebvre et al., 1996; Lefebvre et al., 1997; Zhou et al., 1998). Kollagen II-Reportergenkonstrukte, die ausschließlich diese Sox9-Bindungsstellen des Kollagen II-Gens enthalten, wurden nach transienter Transfektion spezifisch in Chondrozyten und Chondrosarkomazellen exprimiert (Mukhopadhyay et al., 1995; Lefebvre et al., 1996; Lefebvre et al., 1997). Die direkte Korrelation von Sox9 und Kollagen II-Expression konnte ebenso *in vivo* in transgenen Mäusen dargestellt werden (Zhou et al., 1995; Lefebvre et al., 1996; Bell et al., 1997).

Sox9 reguliert *in vitro* bzw. *in vivo* über Aktivierung von Promotorelementen die Expression weiterer Knorpelmatrixbestandteile wie Aggrecan (Sekiya et al., 2000) und Kollagen XI (Bridgewater et al., 1998; Liu et al., 2000). Auch die Expression der knorpelassoziierten Gene 'Cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein' (CD-RAD) und Noggin unterliegen der direkten Regulation von Sox9 (Xie et al., 1999; Zehentner et al., 2002).

Der Vollständigkeit halber sollte erwähnt werden, daß Patienten mit Kampomelie auch Fehlbildungen aufweisen, die nicht das Skelettsystem betreffen. Dementsprechend wird

Sox9 auch in nicht-skelettalen Elementen während der Embryogenese exprimiert. Transkripte finden sich in Zellen des zentralen Nervensystems, in Herz, Niere, Pankreas und schließlich in Zellen der Genitalleisten, aus denen sich später die Gonaden entwickeln werden (Wright et al., 1995; Ng et al., 1997; Zhao et al., 1997; Rahkonen et al., 2003). In Hinblick auf die Regulation von Genen, die bei der Geschlechtsdifferenzierung eine Rolle spielen, wurde ein Zusammenhang von Sox9 und dem Anti-Müller-Hormon gefunden, die gemeinsam in den Sertoli-Zellen der Testes exprimiert werden. So wird das Anti-Müller-Hormon unter anderem von einem Proteinkomplex reguliert, der aus Sox9 und dem Steroid-Faktor-1 (SF-1) besteht (De Santa et al., 1998).

1.3 Analyse der Funktion von Sox9 *in vivo* – 'Knockout'-Strategien

Ein direkter methodischer Ansatz zur Aufklärung der Funktion von Genen ist die Untersuchung des veränderten Phänotyps infolge einer Genmutation. Liegen wie bei der Kampomelie Fehlbildungen bei Neugeborenen vor, so kann ein ursächlicher Gendefekt durch genetische Analysen aufgedeckt und somit auf die Funktion dieses Gens rückgeschlossen werden (klassische Genetik). Der Ansatz der reversen Genetik bietet die Möglichkeit der Untersuchung von phänotypischen Auswirkungen einer gezielten Mutation eines Gens im Tiermodell. Die Methode, Mäuse mit Genverlustmutationen zu generieren, ist bereits seit vielen Jahren etabliert (Thomas und Capecchi, 1987). Zur Generierung dieser sogenannten 'Knockout'-Mäuse werden embryonale Stammzellen verwendet. Embryonale Stammzellen entstammen der inneren Zellmasse von Blastozysten (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981), können aber auch aus 8-Zell-Stadien (Wobus et al., 1991) oder Morulae (Eistetter, 1989) gewonnen werden. Embryonale Stammzellen sind pluripotente Zellen, d.h., daß sie in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren können. Zur Herstellung eines Knockouts werden embryonale Stammzellen aus der inneren Zellmasse isoliert, *in vitro* genetisch verändert (für Review siehe Fässler et al., 1995) und anschließend in Blastozysten injiziert, die wiederum in den Uterus scheinchwangerer Mäuse transferiert werden. Da die genetisch veränderten embryonalen Stammzellen pluripotent sind, nehmen sie an der Bildung aller somatischen Gewebe und der Keimzellen teil (Bradley et al., 1984). Es entstehen zunächst Mosaiktiere, sogenannte Chimäre. Paart man Wildtypmäuse mit chimären Tieren, in denen die Mutation in die Keimbahn gelangt ist, erhält man heterozygote Knockout-Mäuse, die untereinander gepaart schließlich homozygote Knockout-Nachkommen hervorbringen können.

Das Standardprinzip zur Herstellung von genetisch veränderten embryonalen Stammzellen besteht darin, über einen Vektor ein defektes Gen in die Zelle einzubringen, welches dann durch homologe Rekombination gegen das endogene Allel ausgetauscht wird (Thomas und Capecchi, 1987). Die verwendeten, sogenannten 'Targeting'-Vektoren enthalten ein Fragment genomischer Ziel-DNA, in deren Protein-kodierenden Bereich eine Selektionskassette eingefügt ist, so daß es zu einem Funktionsverlust kommt. Mittels der Selektionskassette - in der Regel handelt es sich um ein Antibiotikaresistenzgen - können durch Kultivierung auf Selektionsmedien embryonale Stammzellklone isoliert werden, die das funktionsunfähige Genfragment in das Genom integriert haben.

Mit Hilfe der Knockout-Strategie wurde auch die Funktion des Transkriptionsfaktors Sox9 untersucht. Sox9^{+/-}-Knockout-Mäuse wiesen einen Phänotyp auf, der dem der Kampomelie bei Neugeborenen sehr ähnelt (Bi et al., 2001; Kist et al., 2002). So zeichneten sich Sox9^{+/-}-Knockout-Mäuse neben verkürzten und gebogenen langen Röhrenknochen durch hypoplastische Knorpel- und Skelettelemente aus und starben schon kurz nach ihrer Geburt. Ferner zeigten die sklerotomalen Knorpelvorläuferzellen in Sox9^{+/-}-Knockout-Mäusen morphologische Veränderungen im Vergleich zu entsprechenden Zellen in Wildtypmäusen. Schließlich erschien in Sox9^{+/-}-Knockout-Mäusen die Zone der hypertrophen Chondrozyten in den Wachstumsfugen verbreitert. Diese Ergebnisse gaben Hinweise darauf, daß Sox9 sowohl während der Ausbildung mesenchymaler Kondensationen als auch während der Differenzierung reifer Knorpelzellen in hypertrophe Chondrozyten eine wichtige Rolle spielt.

Es ist bisher noch nicht gelungen, homozygote Sox9-Knockout-Mäuse herzustellen. Der Grund hierfür ist, daß Sox9^{+/-}-Knockout-Mäuse das paarungsfähige Alter nicht erreichten und somit keine Nachkommen zeugten. Zudem besteht ein allgemein bekanntes Problem bei der Generierung homozygoter Knockout-Mäuse darin, daß viele homozygote Knockout-Mäuse schon früh während ihrer embryonalen Entwicklung sterben. So wiesen beispielsweise homozygote Fibronectin- oder DNA-Methyltransferase-Knockout-Mäuse einen letalen Phänotyp auf (Li et al., 1992; George et al., 1993), und homozygote Scleraxis-Knockout-Mäuse starben im Stadium der Gastrulation, weil die Bildung des Mesoderms in diesen Embryonen nicht stattfand (Brown et al., 1999).

Das Differenzierungsverhalten von homozygot Sox9-defizienten Zellen wurde in Maus-Chimären, die aus Wildtyp- und Sox9^{+/-}-Zellen bestanden, analysiert. Die Sox9^{+/-}-Zellen nahmen weder am Aufbau von mesenchymalen Knorpelvorläuferkondensationen noch am

Aufbau von reifen Knorpelstrukturen teil. Weiterhin exprimierten die Sox9^{-/-}-Zellen weder Kollagen II noch Kollagen IX oder Aggrecan (Bi et al., 1999).

Eine weitere Möglichkeit, das Differenzierungsverhalten gendefizienter Zellen *in vivo* zu untersuchen, besteht darin, Keimzelltumore, sogenannte Teratome, zu induzieren. Werden embryonale Stammzellen an extrauterine Orte verpflanzt, so können sie dort Teratome ausbilden, in denen Gewebe aller drei Keimblätter vorliegen. Teratome aus Sox9^{+/-}-Zellen enthielten normal entwickeltes Knorpelgewebe mit reifen Chondrozyten, die Kollagen II, Kollagen IX und Aggrecan exprimierten (Bi et al., 1999). Im Gegensatz dazu wurde in Sox9^{-/-}-Teratomen kein Knorpelgewebe und auch keine Kollagen II-, Kollagen IX- oder Aggrecan-Expression gefunden.

Eine Methode, die die Untersuchung eines embryonal letalen Genverlustes ermöglicht, ist die Generierung von konditionellen Knockout-Mäusen mit einem Genfunktionsverlust in spezifischen Organen oder Zelltypen mit Hilfe der 'Cre/loxP'-Knockoutstrategie (Kilby et al., 1993). Dazu werden sogenannte 'loxP sites' in die DNA des zu verändernden Gens eingefügt. Diese 'loxP sites' werden von dem Enzym Cre-Rekombinase erkannt, das die DNA-Sequenz zwischen zwei 'loxP sites' und eine der beiden 'loxP sites' entfernt. Wird die Expression der Cre-Rekombinase unter die Kontrolle des Promotors eines gewebsspezifischen Gens gebracht, so kann mittels 'loxP sites' ein genetisch verändertes Gen gewebsspezifisch ausgeschaltet werden (Orban et al., 1992; Gu et al., 1994).

Bei konditionellen Sox9^{-/-}-Knockout-Mäusen, in denen die Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines Promotors stand, der kurz vor Ausbildung mesenchymaler Knorpelvorläuferkondensationen aktiviert wird, entwickelten sich weder mesenchymale Knorpelvorläuferkondensationen noch Knorpel- oder Knochenelemente (Akiyama et al., 2002). Konditionelle Sox9^{-/-}-Knockout-Mäuse, in denen die Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines Promotors stand, der erst nach der Phase mesenchymaler Knorpelvorläuferkondensationen aktiviert wird, zeigten eine schwere Chondrodysplasie, wobei alle Skelettelemente, die durch enchondrale Ossifikation entstehen, hypoplastisch waren (Akiyama et al., 2002).

Beurteilt man das Differenzierungsverhalten von Sox9^{-/-}-Zellen in Chimären, Teratomen und konditionellen Knockout-Mäusen, so kann allerdings ein gewisser, modulierender Einfluß von Wildtypzellen auf das Differenzierungsverhalten von Sox9-defizienten Zellen nicht ausgeschlossen werden. Eine Alternative, die Folgen eines Gendefekts auf die embryonale Entwicklung in einer Wildtypzell-freien Umgebung zu bestimmen, bietet daher die *in vitro*-Differenzierung gendefizienter embryonaler Stammzellen.

1.4 Ein alternativer Weg – Die *in vitro*-Differenzierung embryonaler Stammzellen

Embryonale Stammzellen lassen sich unter optimalen Kultivierungsbedingungen nahezu unbegrenzt vermehren und besitzen die Fähigkeit, auch *in vitro* in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Werden ES-Zellen als Zellaggregate, als sogenannte „Embryoid Bodies“ (EBs), in Kultur gehalten, so differenzieren sie spontan in hämatopoetische (Schmitt et al., 1991), kardiogene (Wobus et al., 1991; Maltsev et al., 1993; Maltsev et al., 1994), myogene (Rohwedel et al., 1994), epitheliale (Bagutti et al., 1996), adipogene (Dani et al., 1997), neurogene (Fraichard et al., 1995; Strübing et al., 1995), chondrogene (Kramer et al., 2000) und osteogene (Hegert et al., 2002) Zelltypen. Dabei konnte gezeigt werden, daß differenzierende ES-Zellen entwicklungspezifisch regulierte Gene, Proteine, Rezeptoren und Ionenkanäle in Abhängigkeit von ihrem Differenzierungszustand exprimieren (Rohwedel et al., 1994; Wobus et al., 1997; Rohwedel et al., 1998b). Die Expressionsmuster weisen dabei große Ähnlichkeiten zu den Expressionsprofilen auf, die während der Embryogenese gefunden werden (Rohwedel et al., 1994; Rohwedel et al., 1998a; Guan et al., 1999). Demnach spiegelt die *in vitro*-Differenzierung embryonaler Stammzellen Zelldifferenzierungsvorgänge *in vivo* recht genau wider. In Hinblick auf die chondrogene und osteogene Differenzierung wurden bisher verschiedene Stadien, von der Knorpelvorläuferzelle bis hin zur terminal differenzierten Knorpel- und Knochenzelle, beschrieben (Kramer et al., 2000; Hegert et al., 2002).

Das *in vitro*-System eignet sich auch dazu, Induktionsprozesse zu untersuchen, die während der Embryonalentwicklung eine Rolle spielen. Beispielsweise induzierten Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie *in vivo* sowohl die Bildung mesodermalen Gewebes als auch die Differenzierung mesodermaler Zellen in Skelettmuskel, Knorpel- und Knochenzellen (Gurdon et al., 1989; New et al., 1991). *In vitro* induzierte die Zugabe von TGF- β_1 zum Kultivierungsmedium die Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen in Chondrozyten (Johnstone et al., 1998) und führte über Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden zu einer vermehrten Expression von knorpelassoziierten Genen (Tuli et al., 2003). Weiterhin ließen sich aus dem Knochenmark isolierte mesenchymale Stammzellen durch Inkubation in TGF- β_3 -haltigem Differenzierungsmedium verstärkt in Knorpelzellen differenzieren (Barry et al., 2001). Schließlich induzierten sowohl BMP-2 als auch BMP-4 die Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen in Chondrozyten, die sich in Form von Kollagen II- und Alcianblau-positiven Knorpelzellnodules *in vitro* darstellen lassen (Kramer et al., 2000).

Es ist möglich, mit embryonalen Knockout-Stammzellen Differenzierungsvorgänge *in vitro* zu untersuchen, die sich aufgrund eines frühen letalen Phänotyps *in vivo* wie bei β_1 -Integrin^{-/-}, GATA-4^{-/-} oder Scleraxis^{-/-}-Knockout-Mäusen einer Beurteilung entziehen (Soudais et al., 1995; Fässler et al., 1996; Brown et al., 1999). So führte *in vitro* der Verlust des Zelladhäsionsmoleküls β_1 -Integrin zu einer verzögerten mesodermalen Differenzierung in Muskel- und Herzmuskelzellen, während die neuroektodermale Zelldifferenzierung beschleunigt ablief (Fässler et al., 1996; Rohwedel et al., 1998a). GATA-4^{-/-}-ES-Zellen zeigten eine gestörte Differenzierung in das viszerale Endoderm, wohingegen sich mesodermale und ektodermale Strukturen ungestört entwickelten (Soudais et al., 1995), und Scleraxis^{-/-}-ES-Zellen differenzierten nur *in vitro*, nicht aber *in vivo* in mesodermale Zellen (Brown et al., 1999).

2 Zielsetzung

Während die Morphologie der Knorpelzelldifferenzierung gut untersucht ist, gibt es nur sehr wenig Informationen über die molekulare Regulation der chondrogenen Zelldifferenzierung. Transkriptionsfaktoren, die die Expression knorpelassoziierter Gene kontrollieren, spielen in diesem Zusammenhang eine zentrale Rolle. Deshalb sollten in dieser Arbeit die Rolle und Funktion des Transkriptionsfaktors Sox9 während der Knorpelzelldifferenzierung näher charakterisiert werden.

Es ist bisher noch nicht gelungen, die Folgen eines Sox9-Verlustes auf die Knorpelzelldifferenzierung in einer Wildtypzell-freien Umgebung zu untersuchen. Da sich das *in vitro*-System zur Differenzierung embryonaler Stammzellen via „Embryoid Bodies“ (EBs) dazu eignet, die Entwicklung pluripotenter embryonaler Stammzellen in reife und hypertrophe Chondrozyten zu beschreiben (Kramer et al., 2000; Hegert et al., 2002), wurden in dieser Arbeit Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-ES-Zellen *in vitro* differenziert. Dabei war es das Ziel, die chondrogene Differenzierungskapazität von Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-ES-Zellen zu analysieren. Hierzu war es zunächst notwendig, die bislang noch nicht näher charakterisierten frühen chondrogenen Differenzierungsstadien genauer zu untersuchen und zu prüfen, ob es zur Bildung von mesenchymalen Kondensationen kommt. Außerdem sollte beurteilt werden, wie Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie wie TGF- β ₁, TGF- β ₃ und BMP-2 die chondrogene Differenzierung Sox9-defizienter ES-Zellen beeinflussen.

Zell- und molekularbiologische Arbeitsmethoden wurden angewandt, um das Differenzierungsverhalten von Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-ES-Zellen zu beschreiben. Die ES-Zellen wurden als Zellaggregate (EBs) differenziert. Mittels RT-PCR wurde die Genexpression von knorpelassozierten Markern bestimmt, und mit Hilfe von histochemischen und immunhistochemischen Färbungen sowie *in situ*-Hybridisierungen wurden knorpelassozierte Proteine und Gentranskripte in differenzierenden EBs lokalisiert. Um die Expression von Kollagen II auf Proteinebene zu bestimmen, wurde schließlich auch die Methode des Western-Blots verwendet.

3 Material und Methoden

3.1 Kultivierung und Differenzierung von ES-Zellen

3.1.1 Material, Medien und Lösungen

3.1.1.1. Material

- Gewebekulturschalen mit 6 cm und 10 cm Durchmesser (Nunc, Wiesbaden)
- bakteriologische Petrischalen (Greiner, Frickenhausen)
- 24-'well'-Platten (Nunc)
- 96-'well'-Platte (Nunc)
- Objektträger mit zwei Kammern ('chamber slides', Nunc)
- 15 und 50 ml Zentrifugenröhrchen (Nunc)
- Einfrierröhrchen (Nunc)
- 5 ml Einmalpipetten (Eppendorf, Köln)
- 2, 5, 10 und 20 ml Glaspipetten (Eppendorf)
- Pasteurpipetten (Roth, Karlsruhe)
- Sterilfilter (Sartorius, Göttingen), 10ml-Einwegspritze (Braun, Melsungen)
- 10, 20 und 100 µl Pipettierhilfe (Eppendorf) und sterile Pipettenspitzen mit Filtereinsatz (Fisher Scientific, Schwerte)
- Erlenmeyerkolben, Pinzette, Schere und Sieb mit Porengröße 0,5 mm²
- THOMA-Zählkammer

3.1.1.2 Medien und Lösungen

3.1.1.2.1 PBS ('phosphate buffered saline')

Folgende Salze wurden in deionisiertem Wasser gelöst.

171 mM	NaCl	(Merck, Darmstadt)
10,1 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	(Fluka, Dreisenhofen)
3,3 mM	KCl	(Merck)
1,8 mM	KH ₂ PO ₄	(Merck)

Die Lösung wurde anschließend autoklaviert.

3.1.1.2.2 Trypsin / EDTA- Lösung

Trypsin (2,5%; Biochrom, Berlin) und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; 1%; Biochrom) wurden in PBS zu folgender Endkonzentration verdünnt:

0,05% Trypsin

0,02% EDTA

3.1.1.2.3 Gelatine-Lösung

1g Gelatine (Fluka, Neu-Ulm) wurde in 100 ml PBS gelöst. Die Lösung wurde autoklaviert und anschließend mit PBS verdünnt, so daß eine 0,1% Lösung zum Beschichten der Kulturschalen entstand.

3.1.1.2.4 Nährmedien und Additive

Zu dem Grundmedium DMEM (Dulbeccos Modified Eagles`-Medium mit 4500 mg/l D-Glucose; Invitrogen, Karlsruhe) wurde fetales Kälberserum (FKS; Sigma Taufkirchen) gegeben (Konzentrationen siehe unten), das zuvor bei 54°C für 30 Minuten inaktiviert worden war. Um möglichst gute Differenzierungsbedingungen zu bieten, wurden speziell für ES-Zellen getestete Chargen von FKS benutzt.

In allen Nährmedien waren folgende Additive enthalten:

Nicht-essentielle Aminosäuren (1 ml/100 ml Medium) (Invitrogen)

L-Glutamin (1 ml/100 ml Medium) (Invitrogen)

Penicillin / Streptomycin (1 ml/100 ml Medium) (Invitrogen)

β-Mercaptoethanol (β-ME) (1 ml Stammlösung /100 ml Medium)

Die sterilfiltrierte Stammlösung bestand aus 7 µl

50 µM β-ME (Serva, Heidelberg) in 10 ml PBS

Folgende Nährmedien wurden gebraucht:

Kultivierungsmedium

Embryonale Fibroblasten wurden mit einem Medium, bestehend aus DMEM, Additiven und 15% FKS, kultiviert.

Mitomycin-C-Medium

In 10 ml PBS wurden 2 mg Mitomycin C (MMC, Serva) gelöst. Anschließend wurde die Lösung sterilfiltriert. 300 µl dieser Lösung wurden in 6 ml Kultivierungsmedium verdünnt.

LIF-Medium

Zur Kultivierung von ES-Zellen wurde dem Kultivierungsmedium LIF ('leukemia inhibitory factor'; TEBU, Frankfurt) hinzugefügt (Endkonzentration 5 ng/ml), da LIF die Differenzierung embryonaler Stammzellen inhibiert.

Differenzierungsmedium

Zur Differenzierung von ES-Zellen wurde DMEM mit Additiven und 20% FKS verwendet.

Einfriermedium

LIF-Medium mit 8% Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma) wurde sterilfiltriert und anschließend zum Einfrieren der Zellen verwendet.

3.1.2 Allgemeine Techniken der Zellkultivierung.

Embryonale Fibroblasten und ES-Zellen wurden bei 37°C in einem Inkubator (Zapf Nuair, Fernwald) kultiviert, der mit 5% CO₂ begast wurde. Für die Zellkultur wurden autoklavierte oder sterilisierte Materialien und Lösungen gebraucht, und es wurde unter einer Klasse II-Werkbank (Zapf Nuair) gearbeitet.

3.1.2.1. Beschichten der Gewebekulturmateriale mit Gelatine

Um eine bessere Adhäsion der Zellen an die Oberfläche der Kulturschalen (Plastik), 24-'well'-Platten (Plastik) und 'chamber slides' (Glas) zu erreichen, wurden diese mit 0,1% Gelatine beschichtet und für mindestens 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Vor dem Plattieren der Zellen wurde die Gelatine abgesaugt und das jeweilige Medium auf die Gewebekulturschalen, 24-'well'-Platten bzw. 'chamber slides' gegeben.

3.1.2.2 Ablösen der Zellen zum Passagieren oder Einfrieren

Nach Absaugen des Mediums wurden die Gewebekulturschalen mit PBS gespült und anschließend 3 ml Trypsin / EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben. Nach sofortigem Absaugen wurde die Trypsin / EDTA-Lösung ein zweites Mal auf die Zellen pipettiert und

das Ablösen der Zellen unter dem Mikroskop (Leitz) kontrolliert. Die abgelösten Zellen wurden mit 2 ml Kultivierungsmedium von den Schalen gespült, in 10 ml Kultivierungsmedium aufgenommen und anschließend für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt worden war, wurde das Pellet entweder in Einfriermedium zum Einfrieren der Zellen oder in Kultivierungsmedium zur Weiterkultivierung der Zellen aufgenommen und resuspendiert. Für die Weiterkultivierung wurden die Zellen auf Gelatine-beschichtete Gewebekulturschalen verteilt.

3.1.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden, wie unter 3.1.2.2 beschrieben, von den Gewebekulturschalen abgelöst, in 1,8 ml Einfriermedium aufgenommen und in Einfrierröhrchen überführt. Im Styroporkarton verpackt, wurden die Zellen innerhalb von 24 Stunden auf -80°C heruntergekühlt und anschließend zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff gegeben.

3.1.2.4 Auftauen der Zellen

Im Stickstoff (-196°C) gelagerte embryonale Fibroblasten und ES-Zellen wurden im Wasserbad (37°C) aufgetaut, resuspendiert und in 10 ml Kultivierungsmedium aufgenommen. Nachdem die Zellen für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert worden waren, wurden die embryonalen Fibroblasten in 2 ml Kultivierungsmedium resuspendiert und auf eine 10 cm Gewebekulturschale gegeben, die zuvor mit 8 ml Kultivierungsmedium beschickt worden war.

ES-Zellen wurden in 2 ml LIF-Medium resuspendiert und in eine mit inaktivierten Fibroblasten (siehe Abschnitt 3.1.3.2) beschichtete 6 cm Kulturschale überführt, die 4 ml LIF-Medium enthielt.

3.1.2.5 Ermittlung der Zellzahl

Pelletierte Zellen wurden in 1 ml Medium resuspendiert und einige Mikroliter der Zellsuspension mit einer Pasteurpipette unter das Deckglas einer THOMA-Zählkammer gegeben. Nach Auszählen der Zellen unter dem Mikroskop wurde die Zellzahl mit folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellen}_{\text{gezählt}}/64 \times 10^6 = \text{Zellzahl pro ml Medium}$$

3.1.3 Präparation, Kultivierung und Mitomycin C-Behandlung embryonaler Fibroblasten

3.1.3.1 Präparation und Kultivierung embryonaler Fibroblasten

Zur Gewinnung embryonaler Fibroblasten wurden Embryonen aus dem Uterus einer trächtigen Maus 14-16 Tage p.c. unter sterilen Bedingungen präpariert und in eine Petrischale mit PBS überführt. Die Plazenta und die Eihüllen, sowie Kopf und Leber wurden entfernt, anschließend wurden die Embryonen in 0,1% Trypsin gegeben, mit einem sterilen Skalpell zerkleinert und bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren für 25-45 Minuten in 0,1% Trypsin dissoziiert. Um verbliebene Gewebestücke zu entfernen, wurde die Suspension auf ein Sieb gegeben und das Filtrat in 10 ml Kultivierungsmedium aufgenommen. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 1000 rpm wurden die pelletierten Zellen in 3 ml Medium resuspendiert und auf Gelatine-beschichtete 10 cm Gewebekulturschalen mit 10 ml Kultivierungsmedium gegeben. Die embryonalen Fibroblasten wurden für 1-2 Tage kultiviert, passagiert und nach weiteren 1-2 Tagen entweder, wie unter 3.1.2.3 beschrieben, eingefroren oder für die Kultivierung der ES-Zellen mit Mitomycin C-Medium inkubiert.

3.1.3.2 Mitomycin C-Behandlung embryonaler Fibroblasten

Mitomycin C (MMC) ist ein Zytostatikum, das die Zellteilung embryonaler Fibroblasten inhibiert. Die inaktivierten Fibroblasten ('Feeder'-Zellen) besitzen jedoch weiterhin die Fähigkeit, Faktoren wie LIF zu sezernieren, die die Differenzierung von ES-Zellen unterdrücken.

Nachdem das Kultivierungsmedium von der 10 cm Gewebekulturschale, auf der die embryonalen Fibroblasten konfluent gewachsen waren, abgesaugt worden war, wurden die Zellen in 6 ml Mitomycin C-Medium für 2 ½ Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Mitomycin C-Medium abpipettiert und die Gewebekulturschale dreimal mit PBS gespült. Dann wurden die Zellen abgelöst, zentrifugiert und in 1,5 ml Kultivierungsmedium resuspendiert. Die inaktivierten Fibroblasten wurden auf drei Gelatine-beschichtete 6 cm Kulturschalen mit 5 ml Kultivierungsmedium verteilt und bildeten nach Adhäsion einen dichten 'Monolayer'. Nach ca. zwei Stunden konnten die ES-Zellen zur Kultivierung auf die inaktivierten Fibroblasten gegeben werden.

3.1.4 Kultivierung embryonaler Stammzellen

Um den Einfluß des Transkriptionsfaktors Sox9 auf die Knorpelzellendifferenzierung beurteilen zu können, wurde das Sox9-Gen in ES-Zellen der Linie E14.1 (Kuhn et al., 1991) mittels 'Genetargeting' inaktiviert. Die entstandenen ES-Zell-Klone wurden freundlicherweise von Dr. R. Kist und PD Dr. Gerd Scherer (Institut für Humangenetik und Anthropologie der Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt. Folgende ES-Zell-Klone wurden verwendet:

- 1.) E14.1 - Klon D4D6 heterozygot defizient für Sox9 (Sox9^{+/-})
- 2.) E14.1 - Klon D4D12 homozygot defizient für Sox9 (Sox9^{-/-})

Die Differenzierungsleistung dieser Klone wurde mit der verwendeten Wildtyp-ES-Zell-Linie E14.1 verglichen.

Um embryonale Stammzellen im undifferenzierten, pluripotenten Stadium kultivieren zu können, wurden die ES-Zellen auf MMC-inaktivierten Fibroblasten in LIF-Medium kultiviert. Zunächst wurde das Kultivierungsmedium von einer 6 cm Kulturschalen mit MMC-inaktivierten Fibroblasten abgesaugt und durch 4 ml LIF-Medium ersetzt. Die ES-Zellen wurden aufgetaut, auf die Fibroblasten gegeben und bildeten nach ein bis zwei Tagen runde Kolonien (Abb.3). Um die Differenzierung der ES-Zellen während der Kultivierung zu vermeiden, mußte darauf geachtet werden, daß die Kolonien eine bestimmte Dichte und Größe nicht überschritten. Daher wurden die ES-Zellen alle 24 bis 72 Stunden passagiert.

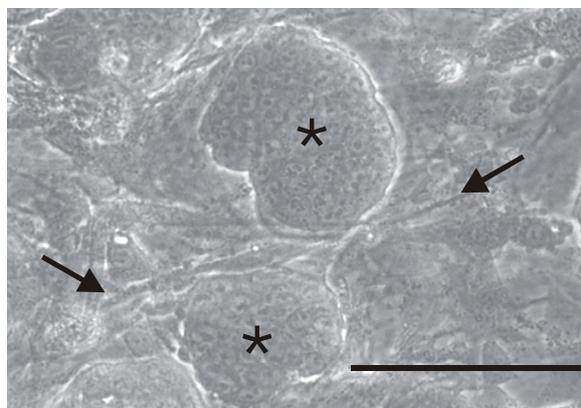


Abbildung 3: ES-Zellen, kultiviert auf embryonalen Fibroblasten (Pfeile), bleiben im undifferenzierten Zustand. Dargestellt sind ES-Zellen der Linie E14.1-Klon D4D6, die Kolonien (*) bilden. Balken = 100 µm

3.1.5 Differenzierung embryonaler Stammzellen

Zur *in vitro*-Differenzierung embryonaler Stammzellen wurden die ES-Zellen als Zellaggregate, sogenannte „Embryoid Bodies“ (EBs) kultiviert.

Der Differenzierungsbeginn umfaßte die Kultivierung der ES-Zellen in „hängenden Tropfen“ für zwei Tage (0d-2d; Abb.4). Anschließend wurden die EBs für drei Tage in Suspension gehalten (2d–5d), so daß sie an Größe zunahmen. Schließlich wurden die EBs auf Gewebekulturschalen, 24-'well'-Platten und 'chamber slides' plattiert, auf denen sie bis zu 33 Tage kultiviert wurden (5d–5+33d).

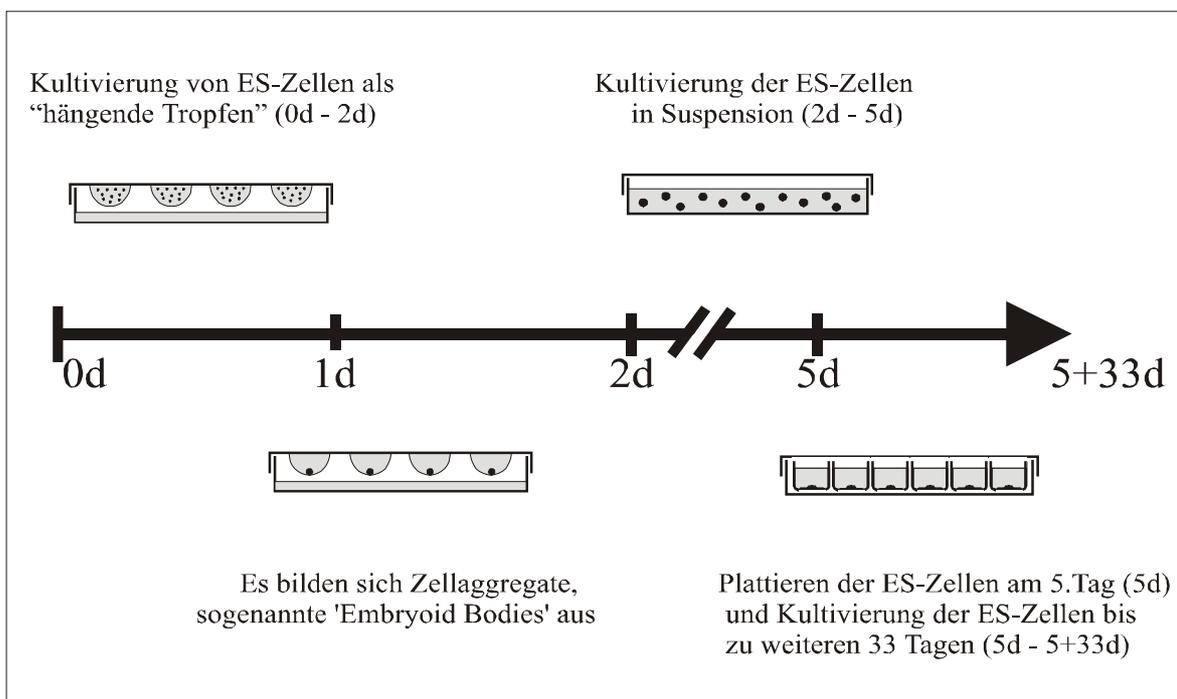


Abbildung 4: Schematische Darstellung der ES-Zell-Differenzierung als 'Embryoid Bodies'

Zur Herstellung von Zellaggregaten wurden ES-Zellen 2 Tage als „hängende Tropfen“ kultiviert (0d-2d) und für weitere 3 Tage in Suspension gehalten (2d-5d), so daß sie eine zur Plattierung geeignete Größe besaßen. Danach wurden sie auf Gewebekulturschalen bis zu 33 Tage differenziert (5d-5+33d).

3.1.5.1 Kultivierung der ES-Zellen als „hängende Tropfen“ (0d-2d)

Die Anzahl der ES-Zellen pro EB war zum einen für das Differenzierungsvermögen der Zellen und zum anderen für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von entscheidender Bedeutung. Zusammen mit den inaktivierten embryonalen Fibroblasten wurden die ES-Zellen von den Gewebekulturschalen abgelöst, zentrifugiert und in 1 ml Differenzierungsmedium aufgenommen. Die Anzahl der ES-Zellen wurde, wie unter 3.1.2.5 beschrieben, ermittelt, wobei die ES-Zellen mikroskopisch von den Fibroblasten

anhand ihrer Größe unterschieden werden konnten. Die ES-Zellen wurden anschließend mit Differenzierungsmedium verdünnt, so daß die Zellen in einer Konzentration von 4×10^4 ES-Zellen/ml Differenzierungsmedium vorlagen. Mit einer sterilen Pipette wurden 20 µl der Zellsuspension (entsprechen 800 Zellen) entnommen und auf die Innenseite eines Deckels von bakteriologischen Petrischalen pipettiert. Ca. 50 Tropfen wurden auf je einen Deckel gegeben, der anschließend auf eine mit PBS gefüllte Petrischale gesetzt wurde. Die Kultivierung der ES-Zellen als „hängende Tropfen“ erfolgte für zwei Tage bei 37°C.

3.1.5.2 Kultivierung der EBs in Suspension (2d-5d)

Die EBs wurden von den Deckeln mit 2 ml Differenzierungsmedium heruntergepült und in bakteriologische Petrischalen mit 8 ml Differenzierungsmedium gegeben, die zuvor nicht mit Gelatine beschichtet worden waren, um ein Anheften der EBs zu vermeiden. Ca. 100 EBs lagen pro Petrischale vor und wurden für drei Tage bei 37°C in Suspension kultiviert.

3.1.5.3 Plattieren und weitere Kultivierung der EBs (5d-5+33d)

Zunächst wurden in den 6 cm Gewebekulturschalen 5 ml Differenzierungsmedium vorgelegt, während in die Vertiefungen der 24-'well'-Platte je 1,5 ml und in die beiden Kammern der 'chamber slides' je 2 ml Differenzierungsmedium pipettiert wurden. Anschließend wurden mit einer sterilen 100 µl Pipette jeweils 10 EBs in die 6 cm Kulturschalen, je 1 EB in die Vertiefungen der 24-'well'-Platte und jeweils 5 EBs in jede Kammer der 'chamber slides' gegeben und bis zu 33 Tage bei 37°C kultiviert (5d-5+33d). In diesem Zeitraum wurde das Medium regelmäßig gewechselt. Zu bestimmten Zeitpunkten der ES-Zell-Differenzierung wurden Proben für RT-PCR (6 cm Kulturschalen, siehe 3.2), histochemische Färbungen (6 cm Kulturschalen und 24-'well'-Platten, siehe 3.4), immunhistochemische Färbungen ('chamber slides', siehe 3.5), *in situ*-Hybridisierungen ('chamber slides', siehe 3.6) sowie für Proteinbestimmungen (6 cm Kulturschale, siehe 3.8) entnommen. Mikroskopisch konnten sich spontan kontrahierende Bereiche als Ausdruck kardiogener Differenzierung beobachtet und ausgezählt werden (24-'well'-Platten).

3.1.6 ES-Zell-Klonierung

Die Klonierung von embryonalen Stammzellen umfaßte das Ausplattieren von undifferenzierten ES-Zellen, die Isolierung von einzelnen ES-Zell-Kolonien, die jeweils aus einer embryonalen Stammzelle hervorgegangen waren, und die Analyse der

Genexpression mittels RT-PCR (siehe 3.2), anhand derer eine Auswahl eines geeigneten ES-Zell-Klons für die Durchführung von weiteren Differenzierungsversuchen getroffen werden konnte.

Durchführung

Embryonale Stammzellen wurden aufgetaut und auf vier 10 cm Gewebekulturschalen plattiert, in denen 10 ml LIF-Medium vorgelegt worden waren. Die ES-Zellen wurden 6 Tage in LIF-Medium kultiviert und bildeten Kolonien. Zur Isolierung der Klone wurde das LIF-Medium von den 10 cm Gewebekulturschalen abgesaugt, und die Schalen wurden zweimal mit PBS gespült und anschließend mit 10 ml PBS überschichtet. Danach wurden unter mikroskopischer Kontrolle ES-Zell-Kolonien mittels einer 100 µl Pipette in jeweils 50 µl Trypsin / EDTA-Lösung überführt, die in einer 96-'well'-Platte vorgelegt worden waren. Die Zellen wurden vereinzelt und jeweils zur Hälfte auf eine 24-'well'-Platte mit 'Feeder'-Zellen (Masterplatte) und auf eine 24-'well'-Platte ohne 'Feeder'-Zellen (Duplikatplatte) gegeben. Nach einer Woche wurden die Zellen der Masterplatte eingefroren und die Zellen der Duplikatplatte zur RNA-Isolierung verwendet.

3.1.7 Stimulierung der EBs mit Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie

Um die Wirkung der Wachstumsfaktoren BMP-2, TGF- β_1 und TGF- β_3 auf Sox9-defiziente ES-Zellen zu beurteilen, wurden Sox9^{-/-}-EBs während der Kultivierung in Suspension (2d-5d) mit BMP-2, TGF- β_1 oder TGF- β_3 in einer Konzentration von 10 ng/ml Differenzierungsmedium stimuliert.

BMP-2 wurde als rekombinantes, humanes Protein von der Firma „Genetics Institute“ (Cambridge, USA) zur Verfügung gestellt, während TGF- β_1 und TGF- β_3 kommerziell erhältlich waren (Perro Tech, Rocky Hill, USA).

3.2 Reverse Transkription (RT) und Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Expression entwicklungsabhängig regulierter Gene während der *in vitro*-Differenzierung von embryonalen Stammzellen wurde mit Hilfe der RT-PCR nachgewiesen. Zunächst mußte die RNA aus den Zellen extrahiert und aufgereinigt werden, bevor sie in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden konnte (Reverse Transkription). Fragmente der cDNA wurden anschließend mit Sequenz-spezifischen Primerpaaren mittels PCR amplifiziert (Mullis et al., 1986; Thiele, 1991) und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Eine semiquantitative Bestimmung der

differenziellen Genexpression wurde nach densitometrischer Auswertung von Ethidiumbromid-markierten DNA-Banden durchgeführt.

3.2.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus kultivierten EBs wurde das „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) in Kombination mit dem „RNase-free DNase Set“ (Qiagen) verwendet. Zunächst wurden die Zellen unter reduzierenden Bedingungen lysiert, so daß die RNA anschließend über eine Ionenaustauschersäule aufgereinigt werden konnte.

3.2.1.1 Geräte, Materialien und Lösungen

Mikro-Zentrifuge (Eppendorf)

PBS

RNase-freies Wasser (Acros Organics, Schwerte)

100 % Ethanol (Merck)

70 % Ethanol

„RNase-free DNase Set“ (Qiagen): RDD-Puffer

DNase-Stammlösung (Lyophilisat gelöst in 550 µl
RNase-freiem Wasser)

DNase-Lösung zur Inkubation: 10 µl DNase-
Stammlösung in 70 µl RDD-Puffer

„RNeasy Mini Kit“ (Qiagen): RLT-Lysepuffer (Guanidinthiocyanat-haltig)

RW1-Waschpuffer

RPE-Waschpuffer

RNase-freies Wasser

1,5 ml und 2 ml Sammelgefäße

Ionenaustauschersäulen

1 % β-Mercaptoethanol (Serva) in RLT-Lysispuffer

3.2.1.2 Durchführung

Die kultivierten EBs wurden mit PBS gespült und mit 500 µl RLT-Lysispuffer, der 1 % β-ME enthielt, lysiert. Anschließend wurde das Lysat unter Verwendung steriler, RNase-freier Pipettenspitzen in ein Eppendorfgefäß gegeben und entweder bei –80°C eingefroren oder zur RNA-Isolierung sofort weiterverarbeitet. Dafür wurden 500 µl 70 % Ethanol zu dem Lysat pipettiert, und das erhaltene Gemisch wurde auf eine Ionenaustauschersäule

gegeben. Nach Zentrifugation für 15 sec bei 10000 rpm wurde das Filtrat verworfen. Danach wurden 350 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Anschließend folgte bei Raumtemperatur eine Inkubation der Säule mit 80 µl DNase-Lösung für 20 Minuten, um die genomische DNA zu verdauen. Nach Zufügen von 350 µl RW1-Puffer wurde bei 10000 rpm für 15 sec zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Danach wurde die Säule zweimal mit 500 µl RPE-Puffer durch Zentrifugation gewaschen. Schließlich wurde die RNA mit 50 µl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation für eine Minute bei 10000 rpm eluiert und ihre Konzentration durch Messung der Absorption bei 260 nm photometrisch ermittelt (Photometer, Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech).

3.2.2 Reverse Transkription (RT)

'Messenger'-RNA (mRNA) wurde mittels reverser Transkription in komplementäre DNA umgeschrieben. Hierfür wurden spezielle Primer verwendet, die an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden (Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer). Unter Verwendung einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase und Nukleotiden (dNTPs) wurde die cDNA als Hybridmolekül aus einem RNA- und einem DNA-Strang synthetisiert.

3.2.2.1 Geräte, Lösungen, Puffer, Nukleotide und Enzyme

'Thermocycler' (MWG, Biotech, Ebersberg)
RNase-freies Wasser (Acros Organics)
Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer (Invitrogen)
5 x „First Strand“-Puffer (Invitrogen)
0,1 M Dithiothreitol (DTT) (Invitrogen)
10 mM dNTPs (Desoxynucleosidtriphosphate: dCTP, dTTP, dATP, dGTP; Roth)
SuperskriptTMII - Reverse Transkriptase (Invitrogen)

3.2.2.2 Durchführung

500 ng RNA wurden mit 1 µl Oligo(dT)-Primer versetzt. Anschließend wurde RNase-freies Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 12 µl hinzupipettiert. Dieser Ansatz wurde für 10 Minuten bei 70°C inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt. Danach wurden dem Ansatz 4 µl „First Strand“-Puffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTPs hinzugegeben, und die Lösung wurde auf 42°C erhitzt. Nach zwei Minuten wurde die SuperskriptTMII-Polymerase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, hinzupipettiert und der Ansatz für 50 Minuten bei 42°C inkubiert. Schließlich wurde durch Erhitzen des Probenansatzes auf

95°C für 5 Minuten das Enzym inaktiviert und die Reaktion somit gestoppt. Die entstandene cDNA wurde entweder zur PCR verwendet (siehe Abschnitt 3.2.3) oder bei -20°C eingefroren.

3.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Das Prinzip der PCR beruht darauf, daß durch eine wiederkehrende Abfolge von DNA-Denaturierung, Anlagerung von Sequenz-spezifischen Primern an die DNA ('Annealing') und Strangsynthese durch eine hitzestabilen DNA-Polymerase (Elongation) eine exponentielle Vervielfältigung eines durch die Sequenz-spezifischen Primer eingegrenzten Genfragments stattfinden kann. Da die Sequenzen der Gene, deren Expression untersucht werden sollte, bekannt waren, konnten mit Hilfe der Software „PC/GENE“ (IntelliGenetics) geeignete Primer erstellt werden. Die Primer wurden von der Firma Eurogentech (Seraing, Belgien) synthetisiert.

3.2.3.1 Ansätze und Enzyme

Die PCR-Reaktionen wurden im PCR-'Thermocycler' „PTC-200“ (Biozym, Oldendorf) durchgeführt. Es wurden Polymerasen von 2 verschiedenen Firmen entsprechend den Herstellerangaben wie folgt verwendet:

1.	RNase-freies Wasser (Acros Organics)	33 µl
	Thermopol-Puffer (Invitrogen)	5 µl
	4 mM dNTPs (Roth)	5 µl
	10 µM Antisense-Primer (Eurogentech, Belgien)	2,5 µl
	10 µM Sense-Primer (Eurogentech)	2,5 µl
	Vent-DNA-Polymerase (Invitrogen)	1 µl
2.	RNase-freies Wasser (Acros Organics)	33 µl
	PCR-Puffer (Roche)	5 µl
	4 mM dNTPs (Roth)	5 µl
	10 µM Antisense-Primer (Eurogentech)	2,5 µl
	10 µM Sense-Primer (Eurogentech)	2,5 µl
	Taq-DNA-Polymerase (Roche)	1 µl

Alle Ansätze wurden auf Eis pipettiert.

3.2.3.2 Durchführung

Zunächst wurde 1 µl cDNA in ein Eppendorfgefäß gegeben und der Ansatz, wie zuvor beschrieben, vervollständigt. Die Reaktionsgemische wurden in den PCR-Cycler überführt, und folgende PCR-Zyklen wurden nach einer zweiminütigen Erhitzung der Proben auf 95°C durchlaufen: Denaturierung der Proben bei 95°C für 40 Sekunden – Anlagerung ('Annealing') der Primer für 40 Sekunden ('Annealingtemperatur' siehe Tabelle 1) – Elongation bei 72°C für 50 Sekunden. Dieser Zyklus wurde je nach Verwendung der Primer 32-45 mal wiederholt (Tabelle 1). Schließlich wurden die Reaktionsgemische für 8 min auf 72°C erhitzt und danach entweder bei -20°C eingefroren oder für die Durchführung der Agarosegelelektrophorese (siehe 3.2.4) weiterverarbeitet.

Tabelle 1: Nachweis der Genexpression mittels RT-PCR: Es ist angegeben, welche Primer zur Amplifikation entsprechender Gene verwendet wurden. Jeweils dargestellt sind die Länge des amplifizierten Genfragments, die 'Annealing'-Temperatur, die Zyklenanzahl sowie entsprechende Literaturnachweise.

Gen	Primer in 5'-3'-Orientierung	Länge des amplifizierten Fragmentes (bp)	'Annealing'-Temperatur (°C)	Zyklusanzahl	Literaturnachweis
Sox9	TGG GTG GCA AGT ATT GGT CAA ACT CA TGA AGA AGG AGA GCG AGG AAG ATA A	Wildtyp: 722 Rekombinant: 469	57	45	(Lefebvre et al., 1998)
Scleraxis	CGG TCT TTG CTC AAC TTT CTC TGG T AAC AGG GTG AAC ACG GCC TTC	322	63	36	(Cserjesi et al., 1995)
Kollagen II	AGG GGT ACC AGG TTC TCC ATC CTG CTC ATC GCC GCG GTC CTA	Juvenil (IIa): 432 Adult (IIb): 225	60	38	(Metsäranta et al., 1991)
Aggrecan	GCC ACC CTG GAG GTC ATA GTG A ATT TCT CTG GGG ATG TCG CAT AA	361	60	38	(Walcz et al., 1994)
Kollagen X	ATG CCT TGT TCT CCT CTT ACT GGA CTT TCT GCT GCT AAT GTT CTT GAC C	164	61	38	(Elima et al., 1993)
β-Tubulin	GGA ACA TAG CCG TAA ACT GC TCA CTG TGC CTG AAC TTA CC	317	60	32	(Wang et al., 1986)

3.2.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient dazu, Nukleinsäuren ihrem Molekulargewicht entsprechend im elektrischen Feld aufzutrennen. Zur Darstellung der aufgetrennten Fragmente wurde dem Gel Ethidiumbromid hinzugefügt, das sich in doppelsträngige DNA einlagert und unter Anregung mit UV-Licht sichtbar wird.

3.2.4.1 Geräte, Chemikalien und Puffer

Gelkammern und Kämme (Biorad, München)

Spannungsgeber „Power Pac 300“ (Biorad)

Mikrowelle (Toshiba)

TBE-Puffer: 50 mM Tris (Boehringer Mannheim)

50 mM Borsäure (Merck)

20 mM EDTA (pH 8; Merck)

Agarose „Ultra Pure“ (Invitrogen)

Ethidiumbromid (1 %; Serva)

1 kb-DNA-Leiter (Invitrogen): Der Längenstandard wurde im Verhältnis 1:10 mit RNase- und DNase-freiem Wasser (Acros Organics) verdünnt.

Ladepuffer „Blue Juice“ („BJ“): 0,1 M LiCl (Merck), 20–50 mM EDTA (Merck),

15% Ficoll (Merck), 0,01 % Bromphenolblau (Merck)

3.2.4.2 Durchführung

Für die Auftrennung der Proben wurde ein 2 %iges Gel hergestellt. Dazu wurden 2 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer suspendiert. Anschließend wurde die Suspension zum Kochen gebracht. Es wurden 3 µl Ethidiumbromid (1%) hinzugegeben und das Gel zum Aushärten in eine Gelkammer gegossen, in die zuvor ein Kamm für die Aussparung von Probenaschen gesetzt worden war. Nach ca. 30 min wurde das Gel mit TBE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. Jeweils 10 µl amplifizierte DNA bzw. 7,5 µl 1 kb-DNA-Leiter wurden mit 2,5 µl „BJ“-Ladepuffer versehen und in die Geltaschen pipettiert. Anschließend wurden die Proben für mindestens 30 min bei 80 V aufgetrennt.

3.2.5 Densitometrische Auswertung

Das Agarosegel wurde auf einem UV-Transilluminator („Bioblock“; Scientific, Aachen) mit einer Videokamera (Olympus, Hamburg) fotografiert. Die Banden der aufgetrennten DNA-Fragmente konnten unter Zuhilfenahme der „Gel-Pro Analyzer“-Software (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA) ausgemessen und ihre Intensität densitometrisch bestimmt werden. Die erhaltenen Werte für die entwicklungsabhängig exprimierten Gene wurden mit den densitometrisch ermittelten Werten für das Haushaltsgen β -Tubulin ins Verhältnis gesetzt. Der höchste ermittelte Wert wurde gleich 100 % gesetzt, und die übrigen Werte wurden auf diesen bezogen.

3.3 Klonierung von RT-PCR-Produkten

Um die Nukleotidsequenz amplifizierter cDNA-Fragmente zu bestimmen, wurden die RT-PCR-Produkte zunächst aufgereinigt und in einem Plasmid-Vektor kloniert. Die klonierte Plasmid-DNA wurde aufgereinigt und durch einen Verdau mit einem Restriktionsenzym und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung charakterisiert. Durch DNA-Sequenzierung wurde schließlich die cDNA-Nukleotidsequenz bestimmt.

3.3.1 Aufreinigung der RT-PCR-Produkte

3.3.1.1 Material und Lösungen

100 % Ethanol

100 % Isopropanol

„QIAquick Gel Extaction Kit" (Qiagen): QIAquick-Säulen

QG-Puffer

PE-Puffer

EB-Puffer

3.3.1.2 Durchführung

RT-PCR-Produkte wurden auf einem 2%-igem Agarosegel aufgetrennt und mit einem Skalpel unter UV-Licht herausgeschnitten. Anschließend wurde mit Hilfe des „QIAquick Gel Extaction Kits" (Qiagen) die DNA aus dem Gel isoliert. Zur Aufreinigung wurde QG-Puffer zu dem herausgeschnittenen Gelstückchen gegeben und für 10 Minuten bei 50°C inkubiert, so daß sich das Gel auflösen konnte. Nach Zugabe von Isopropanol wurde die Lösung auf eine QIAquick-Säule pipettiert, für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Der PE-Waschpuffer wurde auf die Säule gegeben, und es wurde zweimal für eine Minute zentrifugiert. Schließlich wurde die cDNA mit 50 µl EB-Puffer durch Zentrifugation für eine Minute bei 13000 rpm eluiert und ihre Konzentration photometrisch bestimmt.

3.3.2 Klonierung der RT-PCR-Produkte in einem Plasmid-Vektor

Die Klonierung wurde unter Zuhilfenahme des „Zero Blunt™ PCR Cloning Kits" der Firma Invitrogen durchgeführt. Die zu sequenzierenden RT-PCR-Produkte waren mit der Vent-DNA-Polymerase amplifiziert worden. Da diese eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität besitzt, wiesen die Fragmentenden keinen Basenüberhang auf ('blunt end'). Daher wurde zur Durchführung der Ligation ein linearisierter 'blunt end'-Klonierungsvektor verwendet

(Abb.5). Die hitzevermittelte Transformation wurde mit den E.coli-Bakterien 'One Shot Top 10 Cells' der Firma Invitrogen durchgeführt.

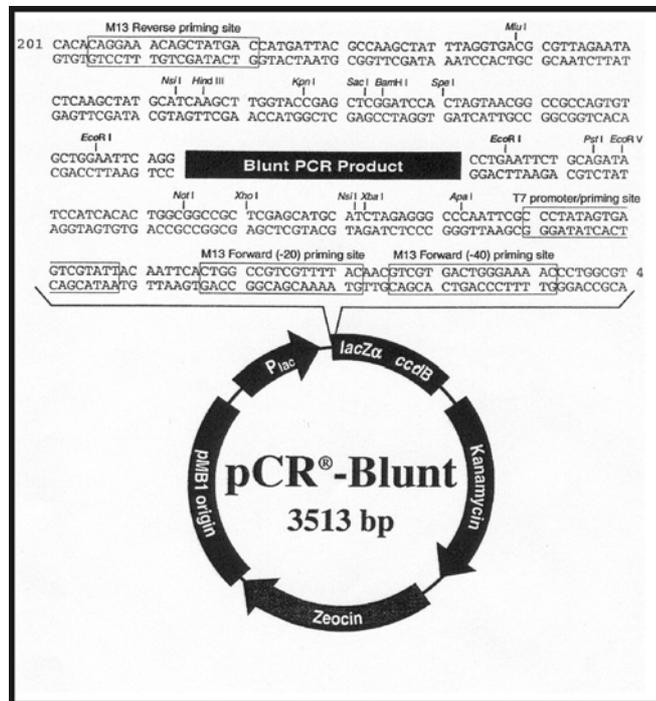


Abbildung 5: Für die Sequenzierung verwendeter Klonierungsvektor RT-PCR-Produkte wurden in dem linearisierten 'blunt pCR®-Cloning Vector' kloniert, der Enden ohne Basenüberhang aufwies und ein Kanamycin-Resistenzgen enthielt.

3.3.2.1 Vektor, Lösungen, Enzyme, Geräte, Material und Medien

RNase- und DNase-freies Wasser (Acros Organics)

„Zero Blunt™ PCR Cloning Kit“: linearisierter 'blunt pCR®-Cloning Vector'

10 x Ligationspuffer

T4-DNA-Ligase

Inkubationsschüttler (New Brunswick Scientific, New Jersey, USA)

bakteriologische Petrischalen (Sarstedt, Nümbrecht)

15 ml-Röhrchen (Nunc), Öse

0,5 M β -Mercaptoethanol (Serva)

SOC-Medium (Invitrogen)

LB-Medium („Luria Bertani“) mit Kanamycin:

In 200 ml destilliertem Wasser wurden folgende Substanzen gelöst :

2 g Trypton (Difco; Heidelberg)

1 g Hefeextrakt (Difco)

2 g NaCl (Merck)

Nach Einstellen des pH auf 7,5 mit NaOH, Autoklavieren und Abkühlen der Lösung auf 60°C wurden 100 µl Kanamycin (100 mg/ml; Boehringer Mannheim) hinzugegeben. Zur Herstellung von Agar-Platten wurden dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 15 g/l Bacto™ Agar (Difco) hinzugesetzt.

3.3.2.2 Durchführung der Ligation

5 µl der aufgereinigten cDNA, 1 µl des Klonierungsvektors, 1 µl Ligationspuffer, 1 µl T4-DNA-Ligase und 2 µl Wasser wurden vermischt. Der Ansatz wurde anschließend für eine Stunde bei 16°C inkubiert und auf Eis aufbewahrt.

3.3.2.3 Durchführung der Transformation und Selektion von E.coli-Bakterien

Die Bakterien wurden aufgetaut und mit 2 µl β-Mercaptoethanol und 2 µl des Ligationsansatzes (siehe Abschnitt 3.3.2.2) versehen. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien zur Transformation für 45 sec auf 42°C erhitzt und im Anschluß für zwei Minuten auf Eis gegeben. Danach wurden 250 µl SOC-Medium, das auf 37°C vorgewärmt war, zu den Bakterien pipettiert und die Suspension anschließend für eine Stunde bei 37°C und 225 rpm im Inkubationsschüttler inkubiert.

Zur Selektion der transformierten Bakterien wurden bakteriologische Petrischalen mit 10 ml heißem, Kanamycin-haltigem LB-Medium versetzt. Nach Erstarren des Mediums wurden 150 µl der Bakteriensuspension auf eine Petrischale gegeben und mit einer sterilen Öse ausgestrichen. Anschließend wurden die Petrischale samt Deckel umgedreht und ÜN bei 37°C gelagert. Am nächsten Tag wurden erfolgreich transformierte Bakterienklone mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen und in jeweils ein 15 ml-Röhrchen gegeben, in dem sich 3 ml LB-Medium befand. Die Bakteriensuspensionen wurden schließlich bei 37°C ÜN unter Schütteln inkubiert.

3.3.3 Isolation und Restriktionsverdau der Plasmid-DNAs

In E.coli klonierte Plasmid-DNAs wurden unter Zuhilfenahme des „Plasmid Miniprep Kit I“ der Firma Peqlab Biotechnologies isoliert.

3.3.3.1 Material, Lösungen, Puffer und Enzyme

RNase- und DNase-freies Wasser (Acros Organics)

„Plasmid Miniprep Kit I“ (Peqlab Biotechnologies, Erlangen):

HiBind®-Miniprep-Säule

Lösungen I, II und III

HB-Puffer

DNA-Waschpuffer mit 100 % Ethanol

TE-Puffer

Restriktionsenzym Eco RI (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

10x Eco RI - Puffer (MBI Fermentas)

„BJ“-Puffer (siehe 3.2.4.1)

3.3.3.2 Durchführung

Von den Bakterienkulturen wurden jeweils 1,5 ml entnommen und bei 13000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 250 µl Lösung I und 250 µl Lösung II aufgenommen, um die transformierten Bakterien zu lysieren und bakterielle RNA zu verdauen. Durch Zugabe von 350 µl Lösung III wurde das Lysat neutralisiert und im Anschluß für 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Plasmid-DNA-enhaltende Überstand wurde danach auf eine HiBind®-Miniprep-Säule gegeben und für eine Minute zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 500 µl HB-Puffer beladen und nach erneuter Zentrifugation mit 750 µl DNA-Waschpuffer versehen. Durch zweimaliges Zentrifugieren der Säule für jeweils eine Minute bei 13000 rpm wurde die DNA getrocknet. Im Anschluß wurde die DNA mit 50 µl TE-Puffer durch erneute Zentrifugation eluiert.

Die isolierte Plasmid-DNA wurde restringiert, indem zu 1 µl Plasmid-DNA 0,5 µl des Restriktionsenzym Eco RI, 2 µl 10x Eco RI-Puffer und 16,5 µl Wasser gegeben wurden. Anschließend wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37°C inkubiert und die Reaktion mit 5 µl „BJ“-Puffer gestoppt. Schließlich wurden 10 µl entnommen und gelelektrophoretisch aufgetrennt, um die zuvor klonierte cDNA nachzuweisen.

3.3.4 DNA-Sequenzierung

Die klonierten RT-PCR-Produkte wurden zur Bestimmung der Nukleotidsequenz an einen kommerziell angebotenen Sequenzierservice (Firma MWG-Biotech) versandt.

3.4 Histochemischer Nachweis von knorpelspezifischen

Proteoglykanen

Mit dem Farbstoff Alcianblau 8GX können knorpelassoziierte Proteoglykane in fixierten Geweben nachgewiesen werden (Romeis, 1989).

3.4.1 Lösungen und Puffer

PBS

3,7 % Formaldehydlösung (Merck)

Alcianblaulösung: Folgende Substanzen wurden in 500 ml 3 % Essigsäure (Fluka) gelöst:

NaCl	(Merck)	4,5 g
MgCl ₂	(Merck)	6,4 g
Alcianblau 8GX	(Sigma)	0,25 g

Im Anschluß wurde die Lösung mit 32 % HCl auf pH 1,5 eingestellt.

3.4.2. Durchführung

Das Differenzierungsmedium wurde von den 6 cm Gewebekulturschalen abgenommen. Danach wurden die EBs einmal mit PBS gewaschen und mit der Formaldehydlösung für 30 Minuten überschichtet, um die Zellen für die Färbung zu fixieren. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Alcianblaulösung auf die EBs gegeben, und es erfolgte eine Färbung der Zellen bei Raumtemperatur ÜN. Anschließend wurden die EBs dreimal mit PBS gewaschen und schließlich lichtmikroskopisch beurteilt.

3.5 Nachweis der Protein-Verteilung in EBs mittels indirekter

Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz bietet die Möglichkeit, gewebespezifische Proteine in Zellen und Geweben darzustellen. Ein primärer Antikörper erkennt dabei eine bestimmte Region (Epitop) eines Antigens und wird von einem sekundären Antikörper gebunden, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Durch Anregung des fluoreszierenden Farbstoffes mit Licht bestimmter Wellenlänge kann somit das Protein durch Emission von Licht einer anderen, charakteristischen Wellenlänge indirekt dargestellt werden.

3.5.1 Lösungen und Puffer

PBS

Methanol-Aceton-Lösung: Zu 7 ml Methanol (Merck) wurden 3 ml Aceton (Merck) gegeben

10 % Ziegen Serum (Dianova, Hamburg) in PBS

Vectashield-Einbettungsmedium (Vector, Burlingame, USA)

3.5.2 Durchführung

Von den 'chamber slides' mit 10 differenzierten EBs wurde das Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, bevor die Methanol-Aceton-Lösung zum Fixieren der Zellen auf die Objektträger für 5 min gegeben wurde. Danach wurden die 'chamber slides' dreimal mit PBS gewaschen, in eine feuchte Kammer überführt und mit Ziegen Serum zum Blockieren freier, unspezifischer Bindungsstellen für 30 Minuten überschichtet. Nach Absaugen des Serums wurden dann 200 µl des primären Antikörpers (Tabelle 2) auf die EBs gegeben, und es folgte eine Inkubation bei 37°C für eine Stunde. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden 200 µl des sekundären Antikörpers (Tabelle 3) für eine ebenfalls einstündige Inkubation bei 37°C auf die Zellen gegeben. Schließlich wurden die Objektträger erneut dreimal mit PBS gespült und mit Vectashield-Einbettungsmedium überschichtet. Die Protein-Verteilung in den differenzierten EBs wurde anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop („Axioplan 2“; Zeiss, Jena) beurteilt.

Tabelle 2: Für die Immunfluoreszenz verwendete primäre Antikörper. Angegeben sind die untersuchten Antigene, die Namen der Antikörper, ihre Verdünnung und die Firmen, von denen die Antikörper bezogen wurden.

Antigen	Name	Verdünnung	Firma
Kollagen II	II II 6B3	1:20	Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa, USA)
Neurofilament 160 kDa	Anti-Neurofilament 160 kDa Klon NN18	1:20	Sigma

Tabelle 3: Für die Immunfluoreszenz verwendete Sekundärantikörper. Aufgelistet sind die Bezeichnung der Sekundärantikörper, die Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen die Antikörper markiert waren, die Verdünnung der Antikörper sowie die Firma, bei der sie kommerziell erhältlich waren.

	Markierung	Verdünnung	Firma
Ziege-anti-Maus-IgG	DTAF (Dichlorotriazinylaminofluorescein)	1:200	Dianova (Hamburg)
Ziege-anti-Maus-IgG	Cy3 (Indocabocyanin)	1:200	Dianova (Hamburg)

3.6 Darstellung der Verteilung von knorpelspezifischen Gentranskripten und Proteinen in EBs mittels *in situ*-Hybridisierung in Kombination mit indirekter Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung ist es möglich, Gentranskripte in Zellen mit einer spezifischen RNA-Sonde nachzuweisen. Die RNA-Sonde hat eine zu der mRNA komplementäre Nukleotidsequenz und wird daher auch als 'Antisense'-mRNA-Sonde bezeichnet. Als negative Kontrolle wird eine RNA mit der Nukleotidsequenz der mRNA verwendet, die auch als 'Sense'-Sonde bezeichnet wird. Nach Hybridisierung der mRNA mit der 'Antisense'-mRNA-Sonde wird die mRNA mit einem gegen die Sonde gerichteten Antikörper *in situ* indirekt nachgewiesen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, die *in situ*-Hybridisierung mit einer indirekten Immunfluoreszenz zu kombinieren, so daß die Lokalisation einer mRNA und eines Proteins gleichzeitig dargestellt werden kann.

3.6.1 Herstellung einer RNA-Sonde mittels *in vitro*-Transkription

Das Ausgangsmaterial für die Synthese einer RNA-Sonde umfaßte ein geschnittenes Plasmid, in das eine cDNA kloniert worden war. Zusätzlich enthielt das Plasmid Promotoren für DNA-abhängige RNA-Polymerasen. Für die Durchführung der Versuche wurden Plasmide mit integrierter Scleraxis-, Aggrecan- oder Kollagen X-cDNA verwendet, die mir freundlicherweise von Dr. Claudia Hegert und Caroline Oppelt (Institut für Medizinische Molekularbiologie, Lübeck) zur Verfügung gestellt wurden. Zusätzlich wurden Plasmide mit integrierter Sox5- oder Sox6-cDNA verwendet, die von Dr. Veronique Lefebvre (Lerner Research Institute, Cleveland, USA) hergestellt worden waren und mir freundlicherweise zur Durchführung der Experimente überlassen wurden. Durch *in vitro*-Transkription wurde eine 'Antisense'-mRNA-Sonde von der klonierten

cDNA hergestellt. 'Sense'-mRNA, die als Negativkontrolle diente, wurde vom komplementären cDNA-Strang durch Verwendung einer zweiten RNA-Polymerase synthetisiert. Die RNA-Sonden wurden unter Verwendung des "DIG-RNA-Labeling-Kit" (Boehringer Mannheim) mit Digoxigenin-11-dUTP markiert.

3.6.1.1 Lösungen, Puffer und Enzyme

RNase- und DNase-freies Wasser (Acros Organics)

'DIG-RNA-Labeling-Mix' (Boehringer Mannheim)

10 x Transkriptionspuffer (Boehringer Mannheim)

200 mM EDTA (siehe 3.6.2.1)

3.6.1.2 Durchführung

1 µg Plasmid-DNA, 2 µl 'DIG-RNA-Labeling-Mix', 2 µl 10 x Transkriptionspuffer und 2 µl RNA-Polymerase wurden vermischt. Anschließend wurde das Gemisch mit RNase- und DNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Danach wurde der Ansatz für zwei Stunden bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 2 µl 200 mM EDTA gestoppt. Schließlich wurde die RNA-Konzentration durch Messung der Absorption bei 260 nm photometrisch ermittelt (Photometer, Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech).

3.6.2 *In situ*-Hybridisierung

Die *in situ*-Hybridisierung wurde nach einem Protokoll von Yamada et al. (1994) in abgewandelter Form durchgeführt. Die EBs wurden fixiert, die Nukleinsäuren denaturiert und die Zellen mit einer DNA-haltigen Prähybridisierungslösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach Hybridisierung von Gentranskripten mit einer RNA-Sonde wurde das Präparat zur Durchführung einer indirekten Immunfärbung mit einem primären Antikörper inkubiert (Tabelle 5). Die RNA-Sonde und der primäre Antikörper wurden schließlich mit spezifischen fluoreszierenden Antikörpern dargestellt (Tabelle 5 und 6).

Tabelle 5: Die bei der Kombination von *in situ*-Hybridisierung und Immunfluoreszenz verwendeten primären Antikörper. Aufgelistet sind die untersuchten Antigene, die Bezeichnung der Antikörper, ihre Verdünnung und die Firmen, von denen die Antikörper bezogen wurden.

Antigen	Name	Verdünnung	Firma
Kollagen II	II II 6B3	1:20	Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa, USA)
N-Cadherin	GC 4	1:40	Sigma
N-CAM	AG 1	1:20	Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa, USA)
Digoxigenin	Anti-Digoxigenin-Fluorescein	1:100	Boehringer Mannheim

Tabelle 6: Bei der Kombination von *in situ*-Hybridisierung und Immunfluoreszenz verwendeter Sekundärantikörper. Neben der Bezeichnung des Antikörpers sind seine Markierung, die Verdünnung sowie die Firma angegeben, bei der er kommerziell erworben wurde.

	Markierung	Verdünnung	Firma
Ziege-anti-Maus-IgG	Cy 3 (Indocarbocyanin)	1:800	Dianova

3.6.2.1 Chemikalien und Lösungen

Fixierungslösung

In 200 ml PBS wurden 8 g Paraformaldehyd (Fluka) und 8 g D(+)-Sucrose (Fluka) gegeben und unter einem Abzug für eine Stunde auf 60°C erhitzt, so daß sich das Paraformaldehyd vollständig lösen konnte. Anschließend wurde die Lösung auf 4°C heruntergekühlt, aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

20x SSC-Stammlösung

175,3 g NaCl (Merck) und 88,2 g *tri*-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck) wurden in 800 ml destilliertem Wasser gelöst. Mit 10 N NaOH wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt und destilliertes Wasser bis zu einem Endvolumen von einem Liter hinzugegeben. Die Lösung wurde schließlich aliquotiert und autoklaviert.

Durch Verdünnen der 20x SSC-Stammlösung mit destilliertem Wasser wurden sowohl eine 2x SSC- als auch eine 0,2x SSC- und eine 0,1x SSC-Lösung hergestellt.

50x Denhardt's Reagenz

In 500 ml destilliertem Wasser wurden 5 g Ficoll (Fluka), 5g Polyvinylpyrrolidon (Fluka) und 5 g Rinderserumalbumin (Sigma) gelöst. Die Lösung wurde anschließend filtriert und nach Aliquotieren bei -20°C eingefroren.

200 mM EDTA

Es wurden 7,44 g EDTA (Merck) in 100 ml destilliertes Wasser gegeben und der pH mit 10 M NaOH auf 8,0 eingestellt.

Prähybridisierungslösung

Für jeden Objekträger wurde 1 ml Prähybridisierungslösung mit folgender Zusammensetzung verwendet.

250 μl	20x SSC
100 μl	50x Denhardt's Reagenz
500 μl	100 % Formamid (Merck)
25 μl	Hefe-tRNA (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma)
15,5 μl	Herings-Sperma-DNA (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Invitrogen)
20 μl	200 mM EDTA
89,5 μl	RNase- und DNase-freies Wasser (Acros Organics)

Hybridisierungslösung

Die Hybridisierungslösung enthielt neben folgenden Substanzen 1 μg - 'Antisense'-mRNA-Sonde bzw. für die Negativkontrolle 1 μg 'Sense'-mRNA.

250 μl	20x SSC
100 μl	50 x Denhardt's Reagenz
500 μl	100 % Formamid (Merck)
25 μl	Hefe-tRNA (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma)
20 μl	200 mM EDTA
105 μl	RNase- und DNase-freies Wasser (Acros Organics) mit 1 μg RNA-Sonde; Zugabe der Sonde kurz vor Gebrauch (siehe 3.6.2.2)

3.6.2.2 Durchführung

Die 'chamber slides' mit differenzierten EBs wurden in eine feuchte Kammer gegeben und nach Absaugen des Mediums mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die EBs bei

Raumtemperatur mit 1,5 ml Fixierungslösung für 20 min inkubiert, zweimal für 5 min mit PBS gewaschen und danach mit 1,5 ml 2x SSC überschichtet. Die Präparate wurden daraufhin in einem Inkubationsofen (MWG-Biotech) für 15 min auf 70°C erhitzt, um Proteine und Nukleinsäuren zu denaturieren. Dann wurden die EBs bei Raumtemperatur mit PBS und danach mit 2x SSC gewaschen, bevor sie für jeweils 2 min mit 50 %, 70 % und 95 % Ethanol und für zweimal 2 min mit 100 % Ethanol dehydriert wurden. Nach Absaugen des Ethanols wurden die Präparate an der Luft getrocknet. Anschließend wurden 500 µl Prähybridisierungslösung in jede Kammer gegeben und es folgte eine Inkubation für mindestens eine Stunde bei 45°C. Kurz vor dem Inkubationsende wurde die RNA-Sonde für 2 min auf 80°C erhitzt. Nach Zugabe der denaturierten RNA-Sonde zu der Hybridisierungslösung wurde die Prähybridisierungslösung von den EBs abgenommen und 500 µl Hybridisierungslösung in jede Kammer der 'chamber slides' pipettiert. Die Hybridisierung fand bei 45°C ÜN statt. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung von den Zellen abgesaugt, und es folgten für jeweils 15 min bei 45°C zwei Waschvorgänge mit 1,5 ml 2x SSC, ein Waschschrift mit 1,5 ml 0,2x SSC und schließlich zwei Waschvorgänge mit 1,5 ml 0,1x SSC. Zur Durchführung der indirekten Immunfluoreszenz wurden die EBs anschließend mit PBS gewaschen und mit 200 µl des primären Antikörpers (Tabelle 5) versehen. Nach einer Inkubation für eine Stunde bei 37°C wurden die EBs dreimal mit PBS gewaschen und mit 200 µl eines Gemisches, bestehend aus sekundärem Antikörper und dem gegen das Digoxigenin der RNA-Sonde gerichteten Antikörper, überschichtet (Tabelle 5 und 6). Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C für eine Stunde. Schließlich wurden die Präparate dreimal mit PBS gewaschen, in Vectashield-Medium (Vector) eingebettet und unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

3.7 Nachweis des Bindungsvermögens von PNA in differenzierenden EBs

PNA gehört zu der Gruppe der Lektine und lagert sich an Glykostrukturen von Zellmembranen an (Milaire, 1991).

3.7.1 Lösungen und Medien

PBS

Formaldehydlösung (3,7%)

Vectashield-Einbettungsmedium (Vector)

3.7.2 Durchführung

'Chamber slides' mit differenzierten EBs wurden dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die EBs für 30 Minuten mit der Formaldehydlösung fixiert und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurden in jede Kammer der 'chamber slides' 100µl FITC-markiertes PNA (Biomedica, Foster City, USA) in einer Konzentration von 0,1 mg/ml gegeben, und es erfolgte eine 45 minütige Inkubation im Dunkeln. Schließlich wurden die 'chamber slides' dreimal mit PBS gewaschen und in Vectashield eingebettet.

3.8 Nachweis von Kollagen II-Protein mittels Westernblot

Während der Differenzierung embryonaler Stammzellen in Chondrozyten werden gewebespezifische Proteine wie beispielsweise Kollagen II synthetisiert. Diese können isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Westernblot nachgewiesen werden. Dazu werden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert ('geblotet') und mit einem spezifischen primären sowie einem Enzym-gekoppelten sekundären Antikörper dargestellt. Durch Zugabe eines Substrates wird schließlich über eine Farbreaktion auf der Membran das Protein nachgewiesen.

3.8.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zunächst mußte die Konzentration des Proteins, das nachgewiesen werden sollte, bestimmt werden. Dazu wurde die Methode nach Bradford angewandt. Diese Form der Proteinbestimmung beruht darauf, daß der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue-G250 Bindungen mit Proteinen eingeht, deren Molekulargewicht mehr als 3 kDa umfaßt. Aufgrund einer daraus resultierenden Verschiebung der Lichtabsorption ist es möglich, die Proteinkonzentration bei 595 nm photometrisch zu bestimmen.

3.8.1.1 Lösungen und Puffer

Lysispuffer:	137 mM NaCl	(Merck)
	8,5 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	(Fluka)
	3 mM KCl	(Merck)
	1,5 mM KH ₂ PO ₄	(Merck)

2 % Nonylphenylpolyethylenglycol (NP 40; Fluka)

Bradford-Reagenz: Folgende Substanzen wurden in 500 ml destilliertem Wasser aufgenommen und anschließend filtriert:

- 50 mg Coomassie Brilliant Blue-G250 (Merck)
- 25 ml Methanol (Merck)
- 50 ml ortho-Phosphorsäure (85%) (Merck)

3.8.1.2 Durchführung

EBs, kultiviert auf 6 cm-Gewebekulturschalen, wurden mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die EBs in 200 µl Lysispuffer aufgenommen und mit Hilfe eines Mörsers zerkleinert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, 1 µl davon in 99 µl destilliertem Wasser verdünnt und 1 ml Bradford-Reagenz hinzugefügt. Nach Erstellen einer Eichkurve mit Hilfe einer Verdünnungsreihe von BSA (Sigma) wurde die Proteinkonzentration photometrisch ermittelt.

3.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ermöglicht es, Proteine unabhängig von ihrer Eigenladung ihrem Molekulargewicht entsprechend aufzutrennen. Dieser Effekt wird durch das in Gel und Puffer enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) vermittelt, das Proteine denaturieren und sich mit seiner negativen Ladung an diese Proteine anlagern kann, so daß deren Eigenladung überlagert wird.

3.8.2.1 Geräte, Material, Lösungen und Puffer

Spannungsgeber „Power Pac 1000“ (Biorad)

Glasplatten, 'Spacer', Kamm

Elektrophoresekammer (Biorad)

10 % Agarose-Lösung: 10 mg Agarose (Roth) in 100 ml TBE-Puffer (siehe 3.2.4.1)

Butanol (Merck)

Laufpuffer: In 1000 ml wurden aufgenommen:

- 14,1 g Glycin (Biomol)
- 3 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris; Biomol, Hamburg)
- 10 ml 10 % Natriumdodecylsulfat (SDS; Serva); 10 mg gelöst in 100 ml Aqua dest.

Auftragspuffer:	2,5 ml	0,5 M Tris (pH 6,8)	(Biomol)
	4,9 ml	10 % SDS	(Serva)
	2 ml	Glycerin	(Merck)
	0,1 ml	β -Mercaptoethanol	(Serva)
	0,05 %	Bromphenolblau (w/v)	(Merck)

Proteinmarker: „Prestained SDS-Molecular-Weight-Marker“ (Sigma)

Positivkontrolle: Kollagen II aus Knorpelgewebe

(freundlicherweise überlassen von Prof. Dr. H. Notbohm, Institut für
Medizinische Molekularbiologie, Universität Lübeck)

3.8.2.2 Durchführung

Zunächst wurde ein Trenngel hergestellt, dessen Zusammensetzung aus Tabelle 7 zu ersehen ist. Das flüssige Gel wurde in eine Vorrichtung gegeben, die aus zwei Glasplatten bestand, zwischen die randständig Plastikstreifen, sogenannte 'Spacer', gelegt und deren Ränder mit der 10%igen Agarose-Lösung abgedichtet worden waren. Das Gel wurde danach mit Butanol überschichtet, um ein Auspolymerisieren des Gels unter Sauerstoffabschluß für ca. 1 Stunde zu gewährleisten. Nachdem das Butanol abgegossen und zweimal mit destilliertem Wasser nachgespült worden war, wurde das Sammelgel zwischen die Glasplatten auf das Trenngel gegeben und ein Kamm zur Aussparung der Probenaschen hineingesetzt. Nach einer weiteren Stunde wurden die Glasplatten senkrecht in eine Apparatur zur Durchführung der Elektrophorese gesetzt und die Kammern mit Laufpuffer aufgefüllt. Der Kamm wurde entfernt, so daß die Proben aufgetragen werden konnten. Hierzu wurden 30 μ g Gesamtprotein bzw. 5 μ l Proteinmarker mit gleichem Volumen Auftragspuffer versehen, für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend mit einer 100 μ l Pipette in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Als Positivkontrolle wurde Kollagen II verwendet. Nach Durchlaufen des Sammelgels bei 15 mA wurden die Proben bei 25 mA für ca. zwei Stunden im Trenngel ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt.

Tabelle 7: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel. Angegeben sind Volumina von Substanzen, die zur Herstellung eines 10 %igen Trenngels bzw. eines 4 %igen Sammelgels benötigt wurden.

	10 % Trenngel	4 % Sammelgel
30 % Acrylamid / 0,8 % N'N'-Methylen-bisacrylamid (Roth)	3,3 ml	332 µl
Destilliertes Wasser	4 ml	2,104 ml
1,5 M Tris (pH 8,8; Biomol)	2,5 ml	-
0,5 M Tris (pH 6,8; Biomol)	-	831 µl
10 % SDS-Lösung (Serva)	100 µl	33,22 µl
Tetramethylethyldiamin (TEMED; Biorad)	8 µl	4,0 µl
Ammoniumpersulfat (APS; Biorad)	56 µl	20 µl

3.8.3 Western-Blot im Semi-Dry-Verfahren

Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde in Anlehnung an die Methode von Khyse-Andersen (1984) durchgeführt.

3.8.3.1 Geräte, Lösungen und Puffer

Blotapparatur (Biorad)

Die Puffer wurden in folgender Zusammensetzung mit destilliertem Wasser angesetzt:

Anodenpuffer I	30 mM	Tris	(Biomol)
	20 %	Methanol	(Merck)
Anodenpuffer II	300 mM	Tris	(Biomol)
	20 %	Methanol	(Merck)
Kathodenpuffer	25 mM	Tris	(Biomol)
	20 %	Methanol	(Merck)
	40 mM	6-Aminohexansäure	(Roth)
	0,01 %	SDS	(Serva)
TBST	150 mM	NaCl	(Merck)
	10 mM	Tris (pH 8,8)	(Biomol)
	0,05 %	Triton X-100	(Fluka)

TBST mit 0,1 % BSA (PAA; Linz, Österreich)

Ponceau S (Serva)

15 % Magermilchlösung (Töpfer)

AP-Puffer	100 mM Tris	(pH 9,5; Biomol)
	100 mM NaCl	(Merck)
	1 mM MgCl ₂	(Merck)

Substratlösung 15 mg 4-Nitrotetrazoliumblausäurechlorid (NBT; Sigma) wurden in 400 µl Dimethylformamid (DMF, Fluka) und 100 µl AP-Puffer gelöst. Zusätzlich wurden 7,5 mg 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoylephosphat (BCIP; Sigma) in 500 µl DMF aufgenommen. Anschließend wurden die NBT- und die BCIP-Lösung vermischt mit 50 ml AP-Puffer verdünnt.

3.8.3.2 Durchführung

Mit Hilfe eines Spatels wurde das Sammelgel entfernt. Danach wurde eine in Anodenpuffer I getränkte Nitrozellulosemembran auf das Trenngel gelegt. Anschließend wurden auf die Blotmembran drei mit Anodenpuffer I und darüber drei mit Anodenpuffer II getränkte Filterpapiere gegeben. Nach Wenden des Stapels wurden drei mit Kathodenpuffer durchtränkte Filterpapierstückchen auf die freie Gelseite gelegt. Um Luftblasen zu entfernen, wurde der Stapel jeweils nach dem Aufbringen von drei Filterpapierlagen mit Hilfe einer Rolle ausgewalzt. Der gesamte Stapel wurde nun in eine Blotapparatur gesetzt, und es erfolgte der Proteintransfer von dem Gel auf die Membran bei 50 mA für eine Stunde. Nach Beendigung des Blotvorgangs wurde die Nitrozellulosemembran zur Kontrolle des Proteintransfers mit Ponceau S für 5 Minuten gefärbt und anschließend mit Anodenpuffer II wieder entfärbt. Im Anschluß daran wurde die Membran zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit der Magermilchlösung für zwei Stunden inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen der Blotmembran in TBST für jeweils 5 Minuten wurde der primäre, gegen Kollagen II gerichtete Antikörper auf die Membran gegeben (siehe Tabelle 2, Seite 32). Dieser lag in einer 1:20-Verdünnung in TBST mit 0,1 % BSA vor. Die Inkubation mit diesem Antikörper fand bei Raumtemperatur ÜN statt. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für jeweils 10 Minuten in TBST gewaschen und anschließend mit einem sekundären Antikörper für 1½ Stunden inkubiert. Dieser war mit dem Enzym Alkalische Phosphatase konjugiert und lag in einer 1:1000-Verdünnung in TBST mit 0,1 % BSA vor. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Membran erneut dreimal für jeweils 10 Minuten in TBST gewaschen und anschließend für 10 Minuten mit dem AP-Puffer

gespült. Zur Darstellung des Kollagen II wurde die Substratlösung auf die Membran gegeben, und es erfolgte unter Schütteln eine Inkubation im Dunkeln für wenige Minuten. Schließlich wurde die Farbreaktion mit destilliertem Wasser gestoppt und die Membran getrocknet.

3.9 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden freundlicherweise von PD Dr. M. Klinger (Institut für Anatomie, Universität Lübeck) angefertigt. Die zu untersuchenden Zellverbände wurden mit einem Mikromanipulator der Firma Eppendorf (mit Fluoreszenzeinrichtung) aus differenzierten EBs herausgeschnitten und anschließend zur Fixierung in folgende Lösung gegeben.

Fixierungslösung: 2% Glutaraldehydlösung (Merck)
 2% Paraformaldehydlösung (Fluka)
 0,05% CaCl₂-Lösung (Merck)

3.10 Statistische Auswertung

Die Daten für die statistische Auswertung wurden aus mindestens drei voneinander unabhängigen Differenzierungsversuchen (n=3-6) gewonnen und mit dem Statistikprogramm „Sigma Plot 5.0“ der Firma Jandel ausgewertet (Student's t-Test). Stimulationsversuche mit Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie wurden jeweils einmalig durchgeführt (n=1).

-

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von Sox9-defizienten ES-Zellen

Um den Einfluß des Transkriptionsfaktors Sox9 auf die Knorpelzelldifferenzierung beurteilen zu können, wurden heterozygot und homozygot Sox9-defiziente embryonale Stammzellen *in vitro* differenziert. Die Zellen wurden mir freundlicherweise von Dr. R. Kist und PD Dr. G. Scherer (Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt. Die analysierten Zellen tragen einen Defekt im Sox9-Gen, der mittels des 'Cre-lox-P'-Systems etabliert worden war. ES-Zellen der Linie E14.1 waren mit einem Sox9-'Targeting'-Vektor transfiziert worden, bei dem das Exon 2 von 'lox P sites' flankiert war (Abb.6A). Nach Selektion und Charakterisierung des erfolgreichen 'Genetargetings' wurde das Exon 2 durch Expression von Cre-Rekombinase entfernt, so daß das veränderte Allel nur Exon 1 und Exon 3 enthielt (Abb.6A). Dies konnte mittels RT-PCR nachgewiesen werden (Abb.6B). Dazu wurden Primer gewählt, die sequenzspezifisch in Exon 1 und Exon 3 binden. Während beim Wildtyp ein amplifiziertes Fragment mit einer Länge von 723 bp zu detektieren war, ergab die Analyse des heterozygoten Sox9-Knockout-Klons D4D6 (Sox9^{+/-}) sowohl ein Fragment von 723 bp als auch ein um die Länge des Exon 2 verkürztes Fragment von 469 bp. Überraschenderweise wurde beim homozygoten Sox9-Knockout-Klon D4D12 ("Sox9^{-/-}") neben dem 469 bp-Fragment auch das Wildtyp-spezifische Fragment von 723 bp nachgewiesen. Da die entsprechende PCR-Bande nach gelelektrophoretischer Auftrennung eine geringe Intensität zeigte, lag der Schluß nahe, daß es bei der Isolierung des ES-Zell-Klons zu einer Kontamination mit Wildtyp- oder Sox9^{+/-}-ES-Zellen gekommen war. Diese Möglichkeit mußte insbesondere deshalb in Betracht gezogen werden, da nach der Cre-Rekombinase-Behandlung keine Antibiotika-Selektion mehr möglich war, da auch die Antibiotika-Selektionskassette durch Cre-Rekombinase-Verdau aus dem Vektorkonstrukt herausgeschnitten worden war. Deshalb wurden die D4D12-ES-Zellen erneut in sehr geringer Dichte kultiviert und 9 Subklone isoliert, die bei der Analyse der Sox9-Expression ein einziges amplifiziertes Fragment von 469 bp-Länge, spezifisch für das mutierte Allel, aufwiesen (Abb.6C). Alle folgenden Versuche wurden mit dem Subklon D4D12-C4 durchgeführt und mit einem weiteren Subklon (D4D12-D6) verifiziert.

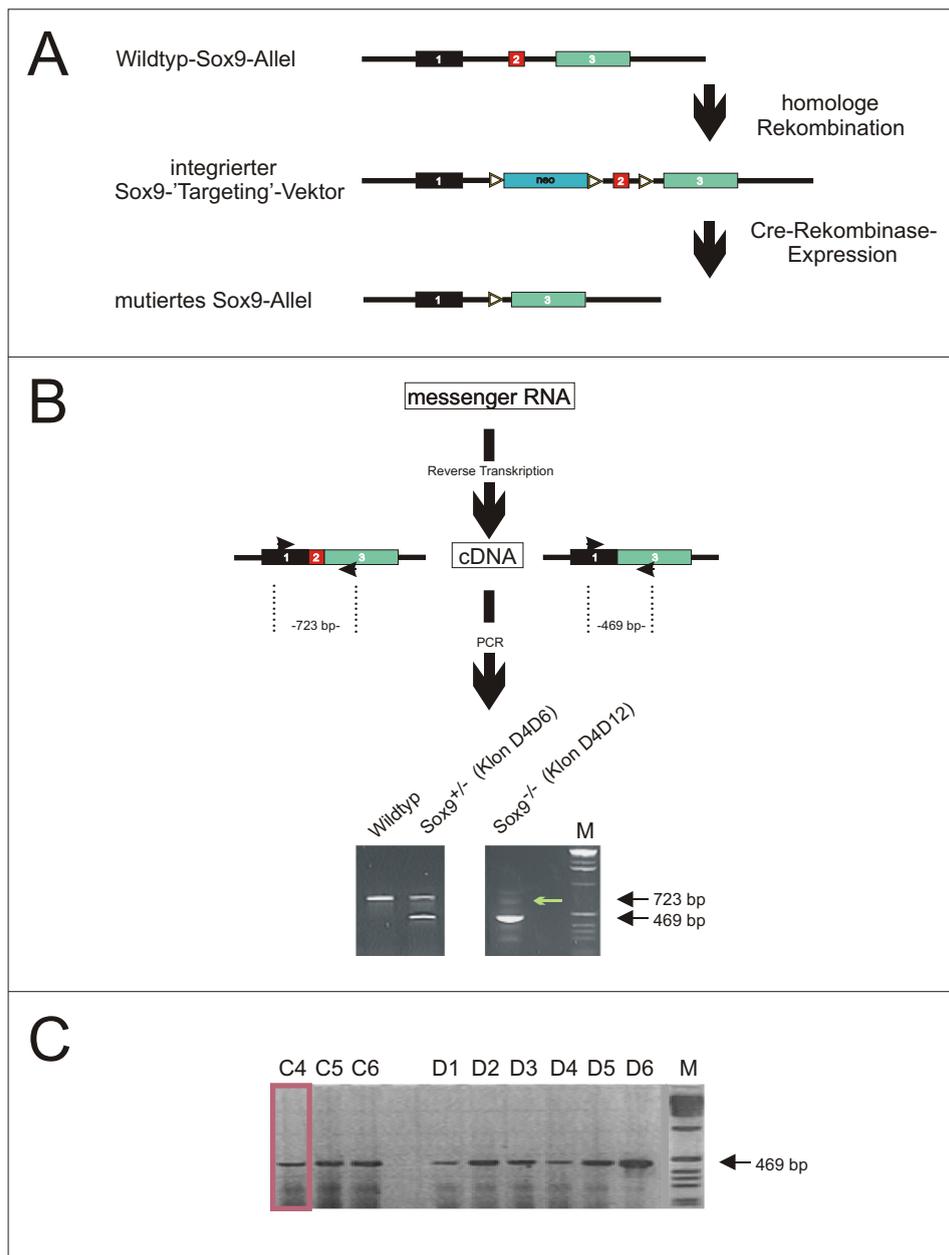


Abbildung 6: Das Exon 2 des Sox9-Gens fehlt in Sox9-defizienten ES-Zellen.

(A) Sox9 wird von 3 Exons kodiert. Ein Sox9-'Targeting'-Vektor mit 'lox P-sites' (Dreiecke), die das Exon 2 und eine Selektionskassette flankierten, wurde durch homologe Rekombination in das Genom von ES-Zellen der Linie E14.1 integriert. Nach Selektion Vektor-positiver Klone wurden durch enzymatischen Verdau mit Cre-Rekombinase das Exon 2 und die Selektionskassette entfernt, wobei eine 'lox P site' im Genom verblieb. neo = Neomycin-Selektionskassette

(B) Nach RNA-Isolation aus Wildtyp-, Sox9^{+/-} (Klon D4D6)- und Sox9^{-/-} (Klon D4D12)-EBs und deren Umschreibung in cDNA mittels Reverser Transkriptase wurde eine PCR-Analyse mit sequenzspezifischen Primern (kurze Pfeile) durchgeführt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der amplifizierten Fragmente und deren Darstellung mit Ethidiumbromid wurde beim Wildtyp ein Fragment von 723 bp und beim heterozygoten Knockout-Klon D4D6 jeweils ein Fragment von 723 bp und 469 bp Länge gefunden. Auch der Knockout-Klon D4D12 wies neben dem Fragment von 469 bp des mutierten Allels ein sehr schwach amplifiziertes Fragment von 723bp des Wildtyp-Allels auf (grüner Pfeil).

(C) Durch Reklonierung des Knockout-Klons D4D12 konnten 9 Subklone isoliert werden (C4-C6 und D1-D6). Eine PCR-Analyse ergab, daß alle Subklone nur das 469 bp Fragment des mutierten Allels aufwiesen. Für die weiteren Versuche wurde Subklon D4D12-C4 verwendet. M=Marker

Der Transkriptionsfaktor Sox9 bindet mit einer 'High Mobility Group' (HMG)-Domäne an DNA und besitzt eine Transaktivierungsdomäne, die vom Exon 3 kodiert wird (Südbeck et al., 1996). Da die HMG-Domäne von Teilen des Exon 1 und des Exon 2 kodiert wird (HMG-Box), wurde durch das Entfernen des Exon 2 die DNA-Bindung eliminiert (Abb.7). Sequenzanalysen der amplifizierten Sox9 Genfragmente von 723 bp bzw. 469 bp zeigten, daß das Exon 2 mit einer Länge von 254 bp im Sox9-Knockout komplett fehlte, so daß in einem hypothetischen Protein die HMG-Box um circa die Hälfte deletiert wäre. Die Fusion der verbliebenen Exons 1 und 3 würde außerdem zu einem Rasterschub führen, der im Falle einer Translation der mRNA eine Änderung der carboxyterminalen Aminosäuresequenz des Sox9-Proteins mit einem vorgezogenen Stopcodon im Exon 3 zur Folge hätte. Ein hypothetisches Protein wäre dadurch von ursprünglich 507 auf 165 Aminosäuren verkürzt.

Die isolierten ES-Zell-Klone und die Wildtyp-ES-Zellen der Linie E14.1 wurden als EBs *in vitro* differenziert. Zur Differenzierung wurden die EBs für 2 Tage in "hängenden Tropfen" generiert (0d-2d), dann 3 Tage in Suspension gehalten (2d-5d), anschließend auf Gewebekulturschalen plattiert (5d) und schließlich bis zu 33Tage (5d-5+33d) kultiviert (siehe Abb.4). Zu verschiedenen Zeitpunkten während der Differenzierung wurde RNA isoliert und mittels RT-PCR analysiert. Die Analyse der Expression des Sox9-Gens während des Differenzierungszeitraumes von 5+3d bis 5+31d ergab, daß das intakte Sox9-Allel bzw. das mutierte Allel in Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Sox9-Knockout-EBs während des gesamten Differenzierungszeitraumes exprimiert wurde (Abb.8). Dies zeigt, daß Sox9 auch nach dem 'Genetargeting' während der ES-Zell-Differenzierung kontinuierlich exprimiert wurde.

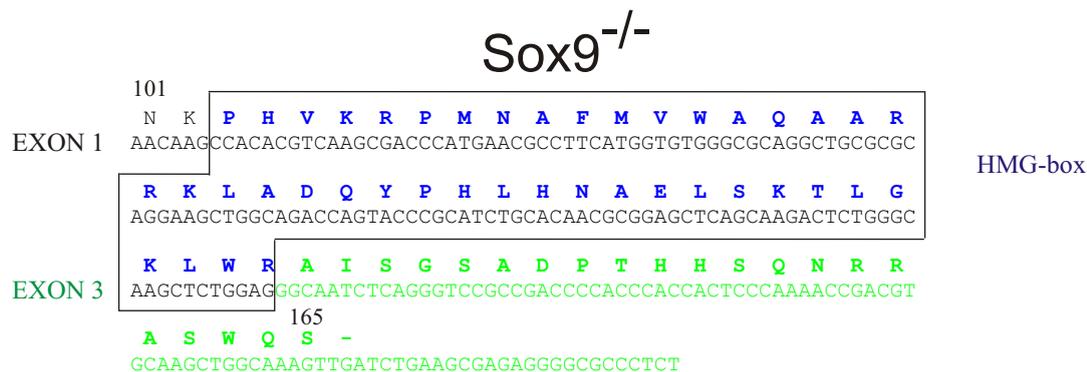
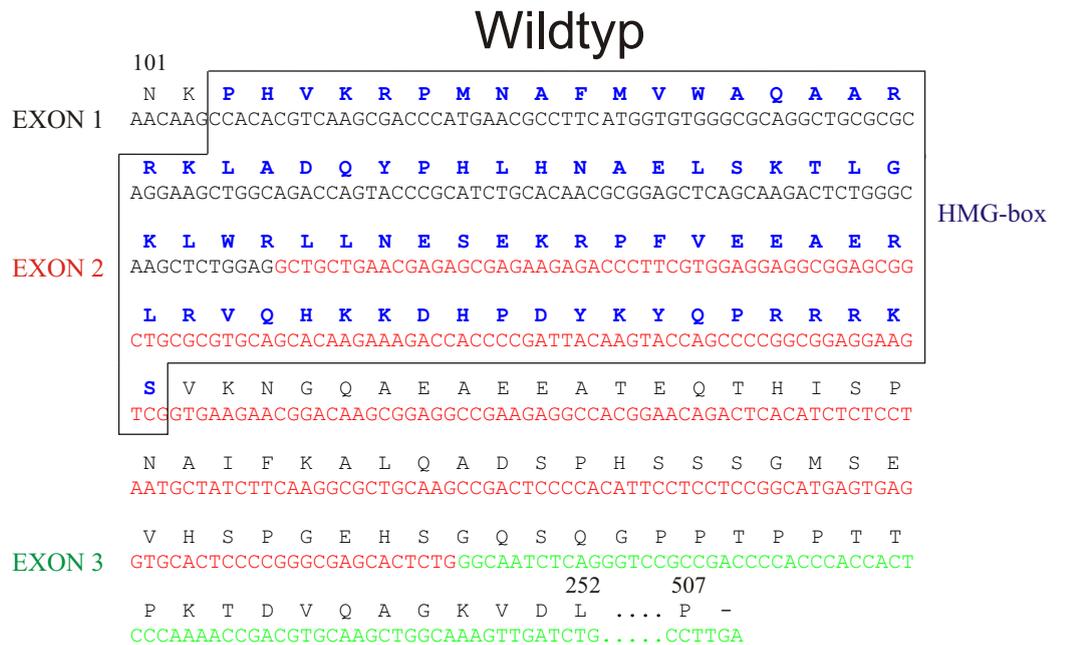


Abbildung 7: Die Deletion des Exon 2 im Sox9-Gen führte zu einer Verkürzung der HMG-Box und zu einer Rasterschubmutation.

Dargestellt ist die durch Sequenzierung ermittelte Nukleotidsequenz des Sox9-Wildtyp- und die des Sox9-Knockout-Allels sowie die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz. Sequenzanalysen der amplifizierten Sox9-cDNA-Fragmente von 723 bp (Wildtyp) und 469 bp (Sox9^{-/-}) Länge zeigten, daß das Exon 2 mit einer Länge von 254 bp im Knockoutfragment komplett fehlte. Dadurch wurde die HMG-Box von 79 auf 44 Aminosäuren verkürzt (Δ HMG-Box). Zusätzlich führte der Verlust des Exon 2 zu einer Rasterschubmutation, die im Falle einer Translation eine veränderte Aminosäuresequenz im C-terminalen Bereich des Sox9-Proteins zur Folge hätte. Außerdem wäre dieses von 507 auf 165 Aminosäuren verkürzt. Die Nukleotidsequenz des 3'-Bereichs des Exon 1 ist schwarz, die des Exon 2 rot und die des 5'-Bereichs des Exon 3 grün dargestellt. Die entsprechenden Aminosäuresequenzen befinden sich über den Nukleotiden, wobei HMG- und Δ HMG-Box violett und die veränderte C-terminale Aminosäuresequenz grün dargestellt sind.

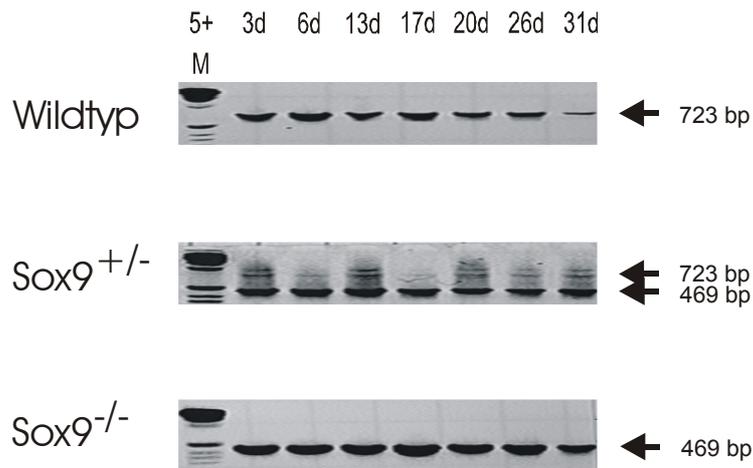


Abbildung 8: Sox9-Expression in differenzierenden Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs

Die RT-PCR-Analyse zeigte, daß Sox9-Gentranskripte mit einer Länge von 723bp bzw. 469bp in Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs während des gesamten Differenzierungszeitraumes von 3 (5+3d) bis 31 (5+31d) Tage nach dem Plattieren der EBs exprimiert wurden. M = Marker

4.2 Auswirkungen des Verlustes von Sox9 auf die ES-Zell-Differenzierung in Knorpelzellen

4.2.1 Expression knorpelspezifischer Marker in Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs während der ES-Zell-Differenzierung

Mit Hilfe der RT-PCR wurde die Expression der chondrogenen Markergene *Scleraxis*, *Kollagen IIa*, *Kollagen IIb*, *Aggrecan* und *Kollagen X* in differenzierenden Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs semiquantitativ bestimmt (Abb.9). Dabei wurde deutlich, daß Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs während des gesamten Differenzierungszeitraumes von 3d bis 5+31d ein nur leicht unterschiedliches Expressionsmuster aufwiesen. Die Unterschiede waren in der Regel statistisch nicht signifikant. Allerdings zeigten die Sox9^{-/-}-EBs bei den Genen, die für Matrixproteine kodieren, einen geringeren Expressionslevel.

Der Transkriptionsfaktor *Scleraxis* ist ein Marker für mesenchymale Knorpelvorläuferzellen (Cserjesi et al., 1995). In Wildtyp-EBs wurde *Scleraxis* während des gesamten Differenzierungszeitraumes exprimiert. Nach einer relativ hohen Expression am

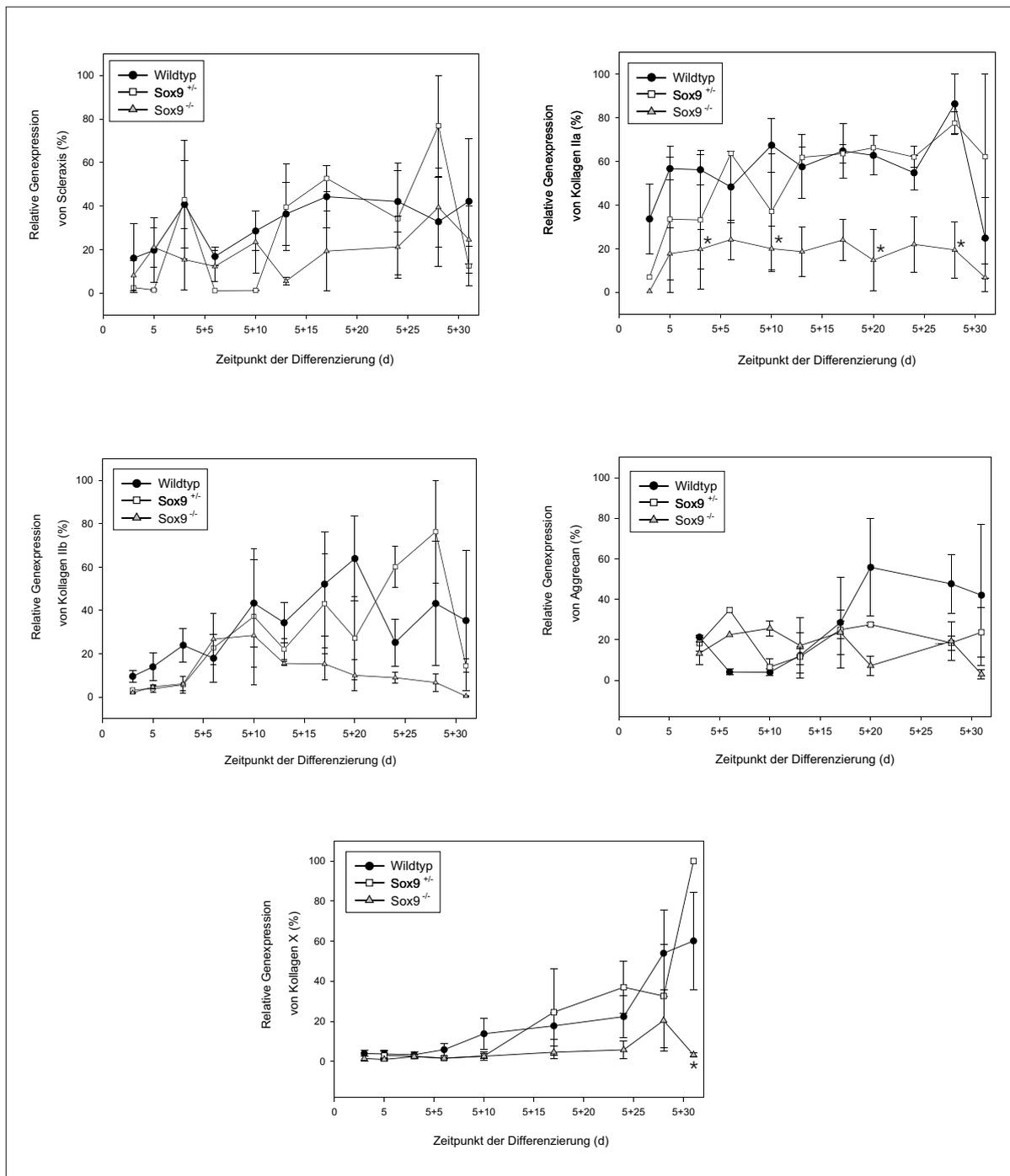


Abbildung 9: Expressionsanalyse knorpelassoziierter Gene in Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs während des Differenzierungszeitraumes von 3d bis 5+31d.

Mittels RT-PCR wurde die Expression der Knorpelmarker Scleraxis, Kollagen IIa, Kollagen IIb, Aggrecan und Kollagen X in differenzierenden EBs semiquantitativ bestimmt. Dabei zeigte sich, daß bezüglich der Expression dieser Marker kaum signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs bestanden. Lediglich die Expression von Kollagen IIa war zu den Zeitpunkten 5+3d, 5+10d, 5+20d und 5+28d in Sox9^{-/-}-EBs statistisch signifikant vermindert. Am Tag 5+31d bestand ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs bezüglich ihrer Kollagen X-Expression. Generell war der Expressionslevel der Kollagen-Gene in Sox9^{-/-}-EBs geringer.

Dargestellt sind relative Genexpressionen, die durch Abgleich gegen die Expression des Haushaltsgens β -Tubulin ermittelt werden konnten. Mittelwerte \pm Standardabweichung wurden aus Daten von mindestens 3 voneinander unabhängigen Versuchen errechnet. *: $p \leq 0.05$

Tag 5+3d fiel sie bis zum Tag 5+6d leicht ab, stieg anschließend bis zum Tag 5+17d wieder an und blieb bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes weitestgehend konstant. Sox9^{+/-}-EBs exprimierten *Scleraxis* in ähnlicher Weise, jedoch war die Expression in dem Zeitraum von 5+6d bis 5+10d geringer. Außerdem wurde eine vergleichsweise hohe Expression am Tag 5+28d gefunden. Differenzierende Sox9^{-/-}-ES-Zellen zeigten ebenfalls ein ähnliches Expressionsmuster wie der Wildtyp. Allerdings war in dem Zeitraum von 5+13d bis 5+24d die *Scleraxis*-Expression leicht erniedrigt.

Kollagen II ist ein Hauptbestandteil der Knorpelmatrix und wird während der Embryogenese differentiell als juvenile Variante *Iia* und als adulte 'Splice'-Form *Iib* exprimiert (Ryan und Sandell, 1990; Sandell et al., 1991).

Kollagen Iia wurde während des gesamten Beobachtungszeitraumes in differenzierenden Wildtyp-ES-Zellen auf einem relativ konstanten Level transkribiert. Ein sehr ähnliches Expressionsmuster wurde auch in Sox9^{+/-}-EBs gefunden, wobei die *Kollagen Iia*-Expression von 3d bis 5+3d etwas schwächer war. Sox9^{-/-}-EBs exprimierten *Kollagen Iia* von 3d bis 5+31d auf einem geringeren Level als Wildtyp-EBs. Die Unterschiede waren jedoch nur zu den Zeitpunkten 5+3d, 5+10d, 5+20d und 5+28d statistisch signifikant.

Die Expression von *Kollagen Iib* stieg in Wildtyp-EBs von 3d bis 5+20d an, fiel bis zum Tag 5+24d wieder ab und blieb bis zum Tag 5+31d annähernd konstant. Ähnlich verhielt sich auch die *Kollagen Iib*-Expression in differenzierenden Sox9^{+/-}-ES-Zellen, mit dem Unterschied, daß das Expressionsmaximum erst am Tag 5+28d erreicht wurde. Sox9^{-/-}-EBs exprimierten *Kollagen Iib* von 3d bis 5+13d in ähnlicher Weise wie Wildtyp- und Sox9^{+/-}-EBs. Im Gegensatz zu diesen wurde *Kollagen Iib* aber ab 5+13d bis zum Ende des Differenzierungszeitraumes deutlich herunterreguliert.

Aggrecan als Chondroitinsulfat-haltiges Proteoglycan ist ein weiterer Bestandteil chondrogener Matrix. Die Expressionsanalyse ergab, daß *Aggrecan* in Wildtyp-EBs schon am Tag 5+3d exprimiert wurde, anschließend stark herunterreguliert wurde (5+6d bis 5+10d) und daß danach die *Aggrecan*-Expression bis 5+20d anstieg. Differenzierende Sox9^{+/-}-ES-Zellen zeigten ein ähnliches Expressionsmuster. Allerdings wurde eine stärkere *Aggrecan*-Expression am Tag 5+6d gefunden und das Expressionsniveau war in dem Zeitraum von 5+17d bis 5+31d etwas erniedrigt. Sox9^{-/-}-EBs exprimierten *Aggrecan* zunächst stärker als im Wildtyp. Ab 5+20d fiel die Expression dann aber deutlich gegenüber dem Wildtyp ab.

Die *Kollagen X*-Expression stieg in differenzierenden Wildtyp-ES-Zellen von 3d bis 5+31d an, mit einem Expressionsmaximum am Tag 5+31d. Ein sehr ähnliches

Expressionsprofil zeigten auch Sox9^{+/-}-EBs, wobei die Expression von *Kollagen X* am Tag 5+31d noch höher lag als in Wildtyp-EBs. Im Gegensatz dazu exprimierten differenzierende Sox9^{-/-}-ES-Zellen *Kollagen X* mit Ausnahme eines kleinen Anstiegs am Tag 5+28d während des gesamten Differenzierungszeitraumes auf einem sehr niedrigen Level. Eine statistische Analyse ergab, daß ein signifikanter Unterschied zwischen Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs in Bezug auf ihre Kollagen X-Expression am Tag 5+31d bestand.

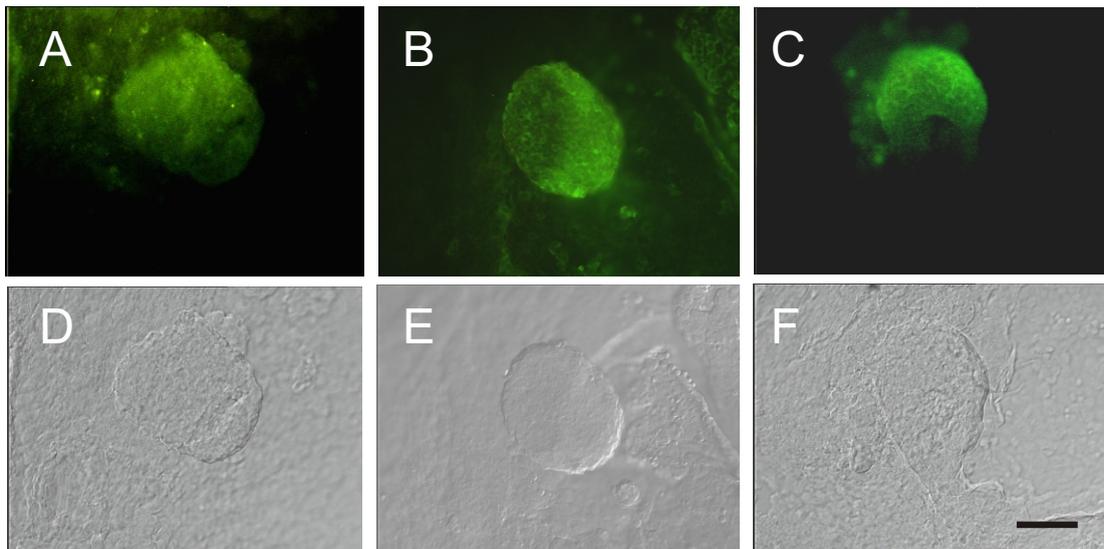
Zusammenfassend zeigte sich, daß insbesondere die Marker für reife und hypertrophe Chondrozyten wie Kollagen *Iib*, Aggrecan und vor allem Kollagen X während der Differenzierung der Sox9^{-/-}-ES-Zellen im Vergleich zu Wildtyp- und Sox9^{+/-}-ES-Zellen herunterreguliert wurden. Dies ist ein erster Hinweis darauf, daß die Differenzierung von Sox9^{-/-}-ES-Zellen in ausgereifte hypertrophe Chondrozyten gestört ist.

4.2.2 Differenzierende Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-ES-Zellen bilden mesenchymale Knorpelvorläuferkondensationen

Im Laufe der frühen Knorpelzellendifferenzierung lagern sich mesenchymale Zellen aneinander und bilden Knorpelvorläuferkondensationen. Diese Zellen exprimieren charakteristische Marker wie die Transkriptionsfaktoren *Scleraxis*, Sox5 und Sox6, die Zelladhäsionsmoleküle N-Cadherin und N-CAM und später die Matrixproteine Aggrecan und Kollagen II (Sandell et al., 1991; Widelitz et al., 1993; Oberlender und Tuan, 1994a; Oberlender und Tuan, 1994b; Cserjesi et al., 1995; Lefebvre et al., 1998). Mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung und Immunfluoreszenz wurde *Scleraxis*-, Sox5-, Sox6- und Aggrecan-mRNA bzw. N-Cadherin-, N-CAM- und Kollagen II-Protein in Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs während des Beobachtungszeitraumes von 5+5d bis 5+31d lokalisiert. Weiterhin wurde das Bindungsvermögen für das Lektin 'Peanut'-Agglutinin (PNA) in differenzierenden EBs getestet, da mesenchymale Knorpelvorläuferkondensationen über entsprechende Membranrezeptoren PNA zu binden vermögen (Milaire, 1991).

Es zeigte sich, daß sowohl Wildtyp- als auch Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs Kondensationen von Zellen enthielten, die *Scleraxis* exprimierten (Abb.10.I). Diese Zellen lagerten sich dicht aneinander und waren von nur wenig extrazellulärer Matrix umgeben. Um festzustellen, ob ein Unterschied in der Anzahl dieser Kondensationen zwischen den drei ES-Zell-Klonen bestand, wurden die Kondensationen pro EB ausgezählt (Abb.10.II). Schon am Tag 5+5d wurden die ersten mesenchymalen Kondensationen gebildet und waren während des gesamten Beobachtungszeitraumes vorhanden. Es ergab sich, daß von 5+5d bis 5+31d kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl mesenchymaler Kondensationen

I



II

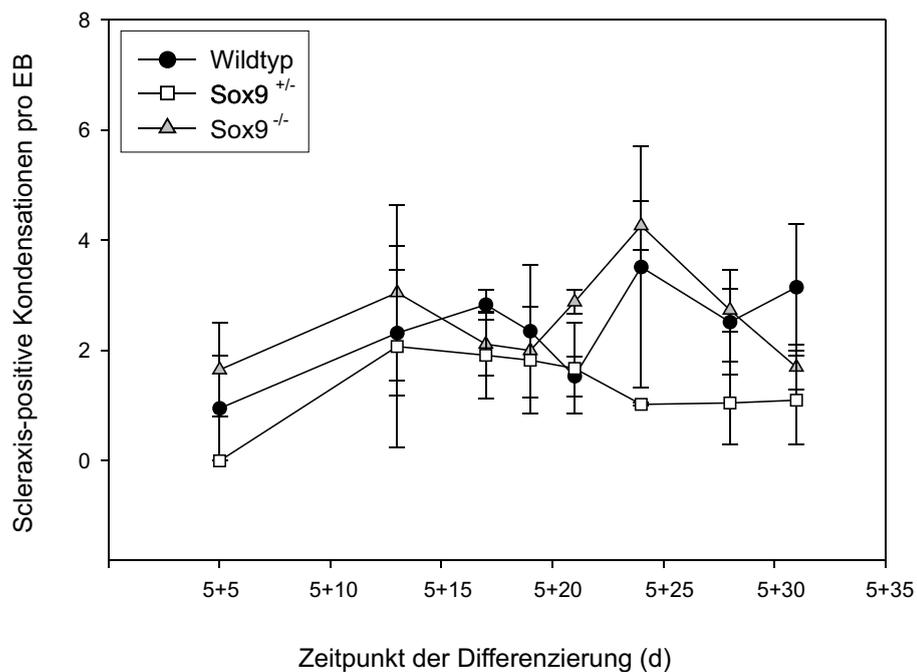


Abbildung 10: Differenzierende Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-ES-Zellen bilden *Scleraxis*-exprimierende Knorpelvorläuferkondensationen.

(I) *In situ*-Hybridisierungen von Wildtyp- (A, D), Sox9^{+/-}- (B, E) und Sox9^{-/-}-EBs (C, F) mit einer 'Antisense'-Sonde gegen *Scleraxis*-mRNA (A-C) zeigten, daß *Scleraxis* in mesenchymalen Kondensationen (D-F) aller 3 Zell-Linien exprimiert wurde. Die mesenchymalen Knorpelvorläuferkondensationen bestanden aus dicht aneinandernliegenden Zellen (D-F). Balken = 100µm

(II) Eine quantitative Auswertung ergab, daß sich während des Differenzierungszeitraumes die Anzahl der Kondensationen in Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs kaum unterschied. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

zwischen Wildtyp, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-Knockout vorlag. In Wildtyp-EBs stieg die Anzahl mesenchymaler Kondensationen von 5+5d bis 5+17d an, fiel bis zum Tag 5+21d ab, stieg anschließend bis 5+24d erneut an und blieb schließlich bis 5+31d konstant. Ein ähnliches Bild zeigten auch Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs, wobei in Sox9^{+/-}-EBs in dem Zeitraum von 5+24d bis 5+31d weniger Kondensationen gefunden wurden. Morphologisch unterschieden sich die mesenchymalen Knorpelvorläuferkondensationen der Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs nicht von den Wildtyp-Kondensationen.

Die Kombination der *in situ*-Hybridisierung mit Immunfärbungen zeigte, daß die *Scleraxis*-exprimierenden Knorpelvorläuferkondensationen in Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs sowohl N-Cadherin als auch N-CAM exprimierten (Abb.11 und 12). Die Expression dieser Zelloberflächenmoleküle war abhängig vom Zeitpunkt der Differenzierung. Die ersten mesenchymalen Kondensationen, die positiv für N-Cadherin und N-CAM waren, wurden in differenzierenden EBs aller drei ES-Zell-Klone erst am Tag 5+13d gefunden und waren während des gesamten folgenden Beobachtungszeitraumes vorhanden.

Auch Kollagen II wurde in *Scleraxis*-positiven Knorpelvorläuferkondensationen zeitabhängig exprimiert. Während in den mesenchymalen Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-Kondensationen von 5+5d bis 5+13d kaum Kollagen II detektiert wurde, enthielten in dem Differenzierungszeitraum von 5+15d bis 5+31d nahezu alle dieser Kondensationen Kollagen II-Fibrillen, die im Zentrum der Kondensationen lagen (Abb.13). Dabei konnten keine auffälligen Unterschiede bezüglich der Kollagen II-Expression zwischen Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-Kondensationen nachgewiesen werden.

Zusätzlich zu den Kollagen II-Fibrillen in den Knorpelvorläuferkondensationen wurden sowohl in den Wildtyp- als auch in Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs Kollagen II-Fasern detektiert, die keinen sichtbaren Bezug zu den Kondensationen aufwiesen (Abb.14). Eine Quantifizierung der Kollagen II-Menge in Wildtyp- und Sox9^{-/-}-EBs mit Hilfe eines Westernblots war nicht möglich (Abb.15). Eine Ursache hierfür könnte die insgesamt relativ geringe Kollagen II-Menge in differenzierenden EBs sein.

Sox5 und Sox6 sind Transkriptionsfaktoren, die spezifisch in mesenchymalen Knorpelvorläuferkondensationen exprimiert werden (Lefebvre et al., 1998). Um die Expression dieser Marker in den Kollagen II-positiven Knorpelvorläuferkondensationen zu prüfen, wurden *in situ*-Hybridisierungen mit Sonden für Sox5 und Sox6 durchgeführt. Dabei wurde deutlich, daß in Kondensationen von Wildtyp- und Sox9^{-/-}-EBs Sox5 und Kollagen II (Abb.16) bzw. Sox6 und Kollagen II (Abb.17) koexprimiert wurden.

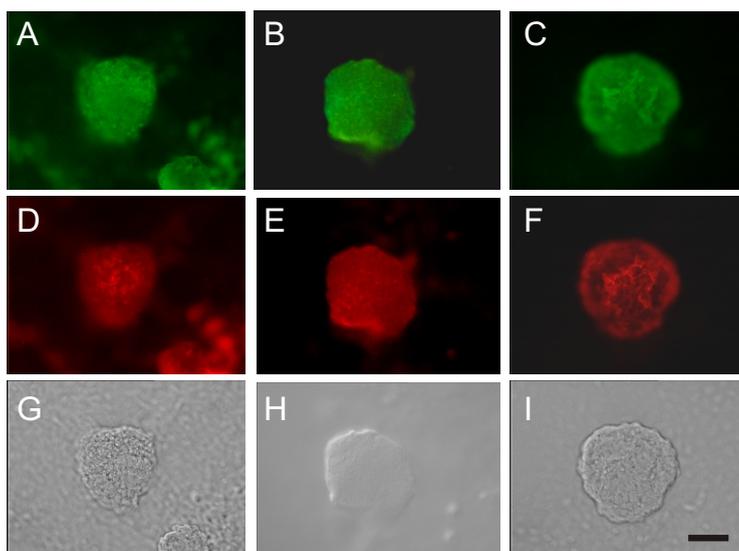


Abbildung 11: Knorpelvorläuferkondensationen in Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs enthalten N-Cadherin-exprimierende Zellen.

Scleraxis-*in situ*-Hybridisierungen (A-C) wurden mit Immunfärbungen gegen N-Cadherin (D-F) kombiniert. Es zeigte sich, daß sowohl Wildtyp- (A, D, G) als auch Sox9^{+/-}- (B, E, H) und Sox9^{-/-}- (C, F, I) Knorpelvorläuferkondensationen *Scleraxis* und N-Cadherin koexprimierten.

Balken = 100µm

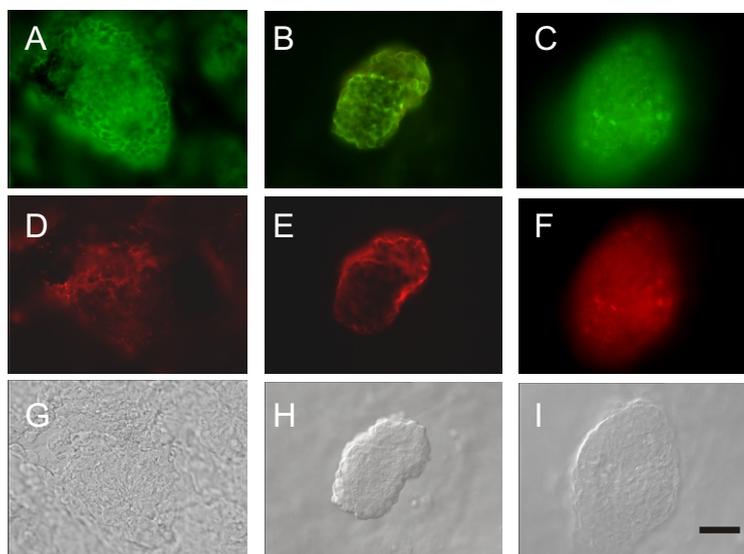


Abbildung 12: Mesenchymale Knorpelvorläuferkondensationen in Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs enthalten Zellen, die das Adhäsionsmolekül N-CAM exprimieren.

In situ-Hybridisierungen gegen *Scleraxis*-mRNA (A-C) in Kombination mit immunhistochemischen Färbungen gegen N-CAM (D-F) machten deutlich, daß Wildtyp- (A, D, G), Sox9^{+/-}- (B, E, H) und Sox9^{-/-}-EBs (C, F, I) Knorpelvorläuferkondensationen enthielten, deren Zellen *Scleraxis* und N-CAM koexprimierten. Balken = 100µm

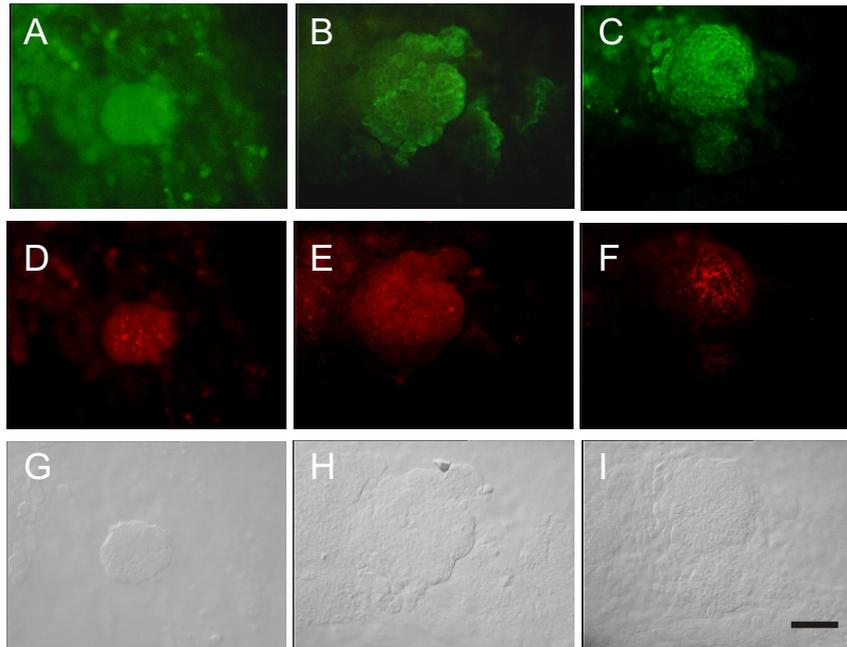


Abbildung 13: Mesenchymale Knorpelvorläuferkondensationen in Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs lagern im Verlauf der Differenzierung Kollagen II-Fibrillen ein. Scleraxis-*in situ*-Hybridisierungen (A-C) wurden zusammen mit Kollagen II-Immurfärbungen (D-F) durchgeführt. Ab circa 2 Wochen nach dem Plattieren der „Embryoid Bodies“ (5+15d – 5+31d) wurden in Wildtyp- (A, D, G), Sox9^{+/-}- (B, E, H) und Sox9^{-/-}- (C, F, I) EBs Scleraxis-exprimierende Knorpelvorläuferkondensationen gefunden, die vor allem im Zentrum Kollagen II-Fibrillen enthielten. Balken = 100µm

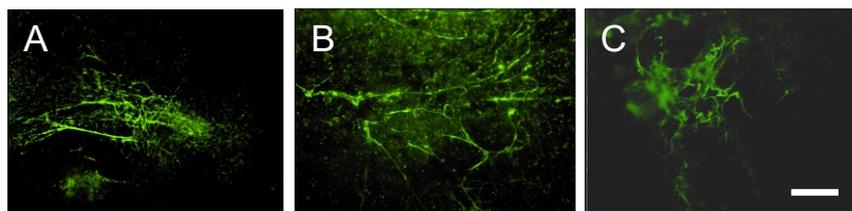


Abbildung 14: Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs enthalten Kollagen II-Fasern, die ohne sichtbaren Bezug zu mesenchymalen Kondensationen in den EBs detektiert wurden. Immurfärbungen gegen Kollagen II-Protein zeigten, daß differenzierende Wildtyp- (A), Sox9^{+/-}- (B) und Sox9^{-/-}-EBs (C) eine annähernd gleiche Menge von in den EBs verteilten Kollagen II-Fasern aufwiesen. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte aus 5+28d alten EBs. Balken = 100µm

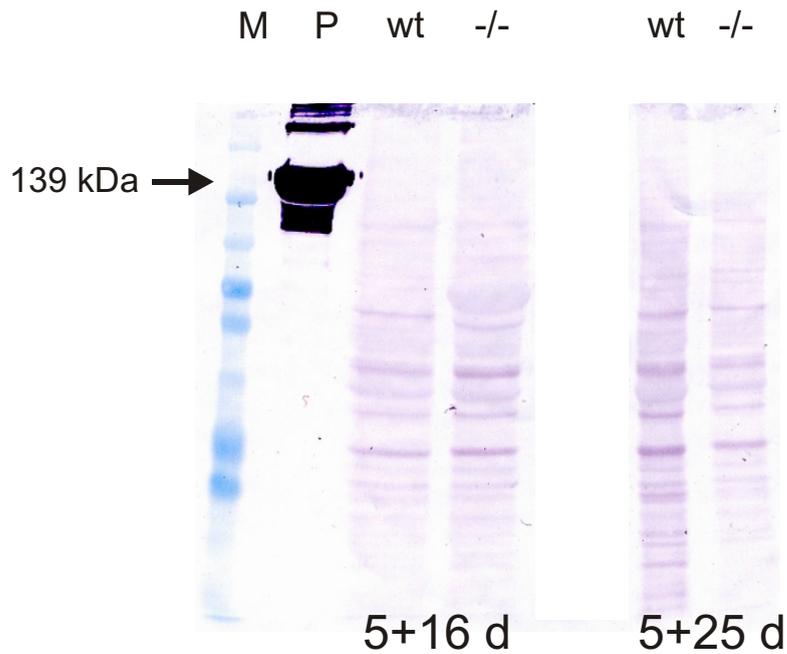


Abbildung 15: Westernblot-Analyse zur semiquantitativen Bestimmung des Kollagen II-Gehalts in differenzierenden Wildtyp- und Sox9^{-/-}-EBs.

Vermutlich aufgrund des sehr geringen Kollagen II-Proteingehalts in Wildtyp- (wt) und Sox9^{-/-} (-/-) EBs konnte weder am Tag 5+16d noch am Tag 5+25d das 139 kDa schwere Kollagen II nachgewiesen werden. M = Marker; P = Positivkontrolle

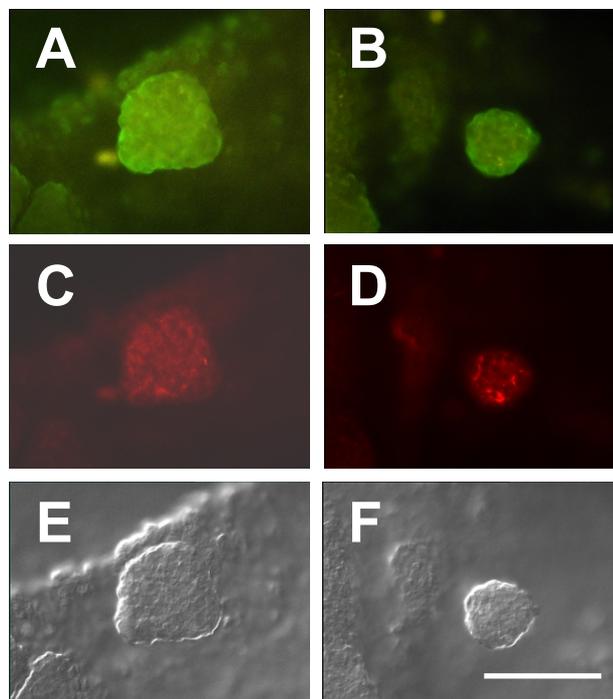


Abbildung 16: Mesenchymale Knorpelvorläuferkondensationen in Wildtyp- und Sox9^{-/-}-EBs exprimieren Sox5.

Sox5-*in situ*-Hybridisierungen (A, B) wurden mit Immunfärbungen gegen Kollagen II (C, D) kombiniert. Es zeigte sich, daß sowohl Wildtyp- (A, C, E) als auch Sox9^{-/-} (B, D, F) Knorpelvorläuferkondensationen Sox5 und Kollagen II koexprimierten. Balken = 100µm

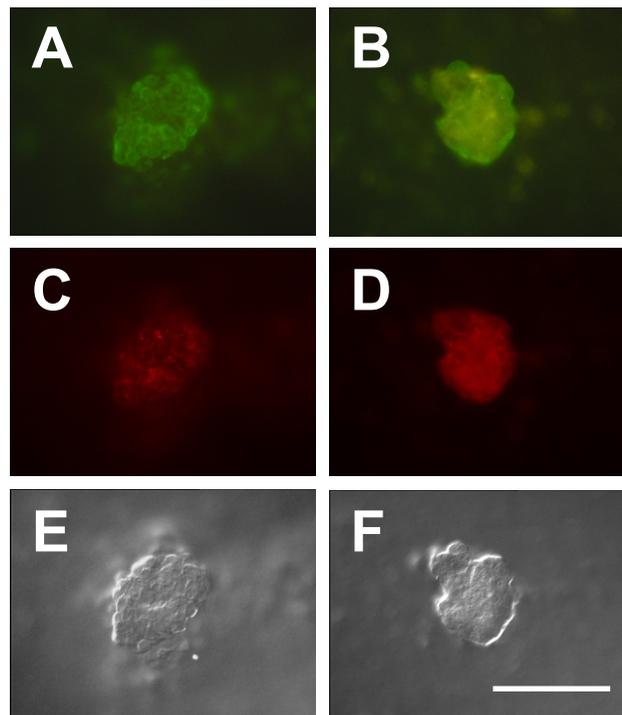


Abbildung 17: Knorpelvorläuferkondensationen von Wildtyp- und Sox9^{-/-}-EBs enthalten Sox6-exprimierende Zellen.

In situ-Hybridisierungen gegen Sox6-mRNA (A, B) in Kombination mit immunhistochemischen Färbungen gegen Kollagen II (C, D) machten deutlich, daß Wildtyp- (A, C, E) und Sox9^{-/-}- (B, D, F) EBs Knorpelvorläuferkondensationen enthielten, deren Zellen Sox6 und Kollagen II koexprimierten. Balken = 100µm

Ein weiteres wichtiges Molekül der Knorpelmatrix ist das Proteoglykan Aggrecan (Muir, 1995). Mittels *in situ*-Hybridisierung zur Darstellung von Aggrecan-mRNA kombiniert mit einer Immunfärbung gegen Kollagen II-Protein wurde geprüft, ob die mesenchymalen Knorpelvorläuferkondensationen in Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs *Aggrecan* exprimierten (Abb.18). Es zeigte sich, daß sowohl Wildtyp- als auch Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs Kondensationen enthielten, die *Aggrecan* und Kollagen II koexprimierten.

Charakteristisch für mesenchymale Kondensationen ist ferner die Bindung von PNA. PNA lagert sich an Glykostrukturen von Zellmembranen an und wird *in vivo* von kondensierten Chondroprogenitorzellen der Sklerotome und der Extremitätenknospen gebunden (Bagnall und Sanders, 1989; Gotz et al., 1991; Milaire, 1991; Hall und Miyake, 1992). Sowohl Wildtyp- als auch Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs enthielten mesenchymale Knorpelvorläuferkondensationen, die PNA binden konnten (Abb.19).

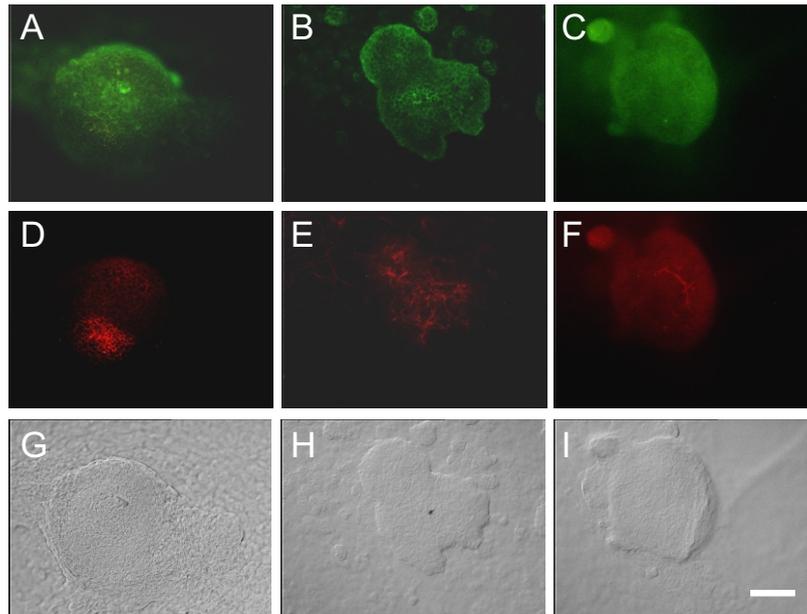


Abbildung 18: Die Kollagen II-positiven Kondensationen von Wildtyp-, Sox9^{+/+}- und Sox9^{-/-}-EBs exprimieren *Aggrecan*.

In situ-Hybridisierungen mit einer 'Antisense'-Sonde gegen *Aggrecan*-mRNA (A-C) wurden zusammen mit Kollagen II-Immundefärbungen (D-F) durchgeführt. Sowohl Wildtyp- (A, D, G) als auch Sox9^{+/+}- (B, E, H) und Sox9^{-/-}-EBs (C, F, I) enthielten Kondensationen, die neben Kollagen II *Aggrecan* exprimierten. Balken = 100µm

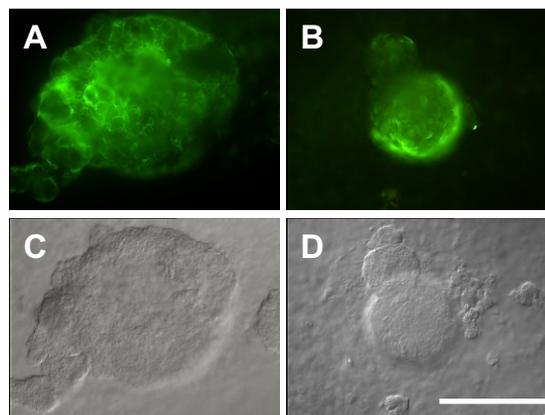


Abbildung 19: Knorpelvorläuferzellen in Wildtyp- und Sox9^{-/-}-EBs binden PNA.

Wildtyp- (A, C) und Sox9^{-/-}- (B, D) EBs wurden mit fluoreszierendem PNA inkubiert. Beide ES-Zell-Linien enthielten mesenchymale Zellkondensationen (C, D), die das Lektin PNA banden (A, B). Balken = 100µm

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von frühen mesenchymalen Knorpelvorläuferkondensationen zeigten schließlich, daß sich die Zellen dicht aneinanderlagerten und verhältnismäßig wenig Zytoplasma enthielten (Abb.20). Auch das rauhe endoplasmatische Retikulum, das einen Hinweis auf die Sekretionsleistung von Zellen gibt, war in diesen mesenchymalen Zellen nur spärlich vorhanden.

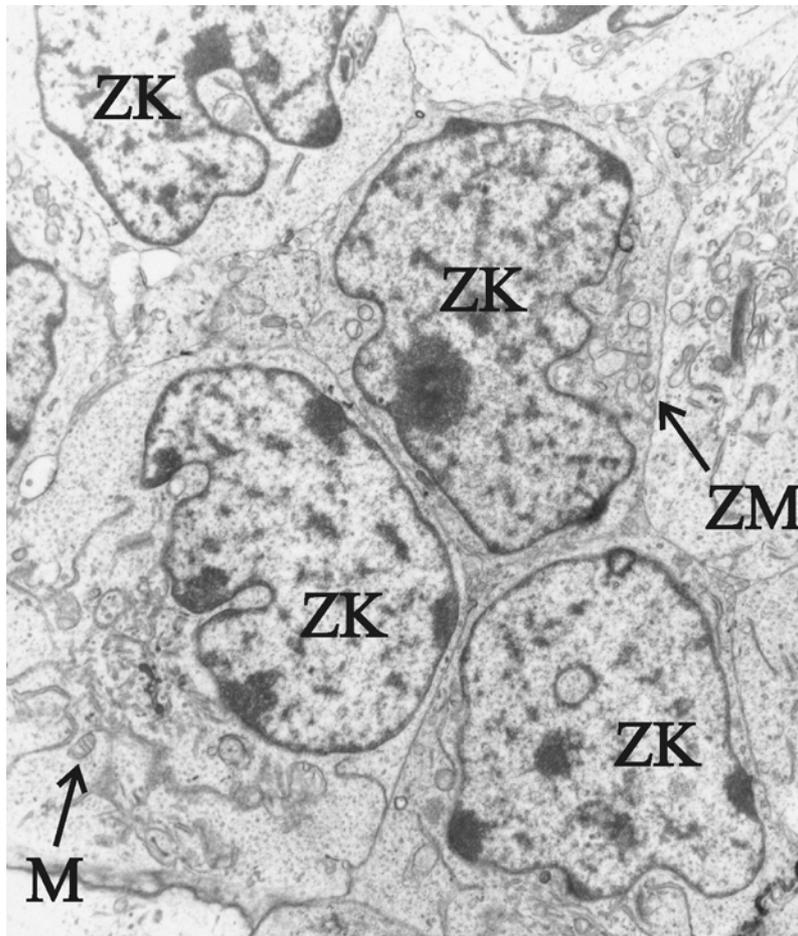


Abbildung 20: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Zellen einer frühen mesenchymalen Knorpelvorläuferkondensation aus Sox9^{-/-}-EBs. Die Zellen bildeten enge Zellkontakte aus und erhielten nur wenig Zytoplasma und rauhes endoplasmatisches Retikulum. ZK = Zellkern; ZM = Zellmembran; M = Mitochondrium; Vergrößerung = 6000fach

4.2.3 Sox9^{-/-}-ES-Zellen durchlaufen im Gegensatz zu Wildtyp- und Sox9^{+/-}-ES-Zellen nicht das Stadium der späten Knorpelzeldifferenzierung

In den Wachstumsfugen langer Röhrenknochen findet man eine charakteristische Anordnung von Knorpelzellen, die zunächst proliferieren und sich später in blasige, hypertrophe Chondrozyten umwandeln. Dieser Prozeß umfaßt den Vorgang der späten Knorpelzeldifferenzierung. Untersuchungen zeigten, daß dieser Prozeß *in vitro* rekapituliert wird (Kramer et al., 2000). Die *in vitro*-Differenzierung von Wildtyp-ES-Zellen beginnt mit Knorpelvorläuferzellen, die *Scleraxis* exprimieren, und endet mit terminal differenzierten Knorpelzellen, die in Nodules organisiert sind und sich mit Alcianblau anfärben lassen.

Um den Einfluß des Sox9-Verlustes auf diesen Prozeß zu prüfen, wurden Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs mittels Alcianblau-Färbung untersucht. Dabei zeigte sich, daß sowohl in Wildtyp- als auch in Sox9^{+/-}-EBs stark angefärbte und hochorganisierte Nodules gefunden wurden (Abb.21). Diese Nodules bestanden aus blasigen Knorpelzellen, die von einer Alcianblau-gefärbten Matrix umgeben waren (Abb.21.I). Zu späteren Zeitpunkten der Differenzierung waren diese Knorpelzellnodules außerdem von einem prominenten Randwall umgeben, der aus dichter extrazellulärer Matrix bestand, während im Zentrum der Nodules die Anfärbbarkeit mit Alcianblau nachließ (Abb.21.II). In Wildtyp-EBs erschienen die ersten Alcianblau-gefärbten Knorpelzellnodules am Tag 5+13d. Deren Anzahl stieg anschließend bis 5+28d an und nahm schließlich bis 5+33d wieder etwas ab. Ein ähnlicher Verlauf der Nodulebildung wurde auch in differenzierenden Sox9^{+/-}-EBs gefunden, wobei die ersten Nodules etwas später, am Tag 5+17d, zu sehen waren. In Sox9^{+/-}-EBs war außerdem die Anzahl der Alcianblau-gefärbten Nodules im Vergleich zu Wildtyp-EBs in etwa halbiert. In Sox9^{-/-}-EBs wurden schließlich im Gegensatz zu Wildtyp- und Sox9^{+/-}-EBs keine mit Alcianblau anfärbbaren Nodules während des gesamten Beobachtungszeitraumes von 5+3d bis 5+33d gefunden (Abb.21.III). Offenbar findet in Abwesenheit von Sox9 keine späte Knorpelzeldifferenzierung statt, und die Gendosis beeinflußt das Ausmaß der Nodulebildung.

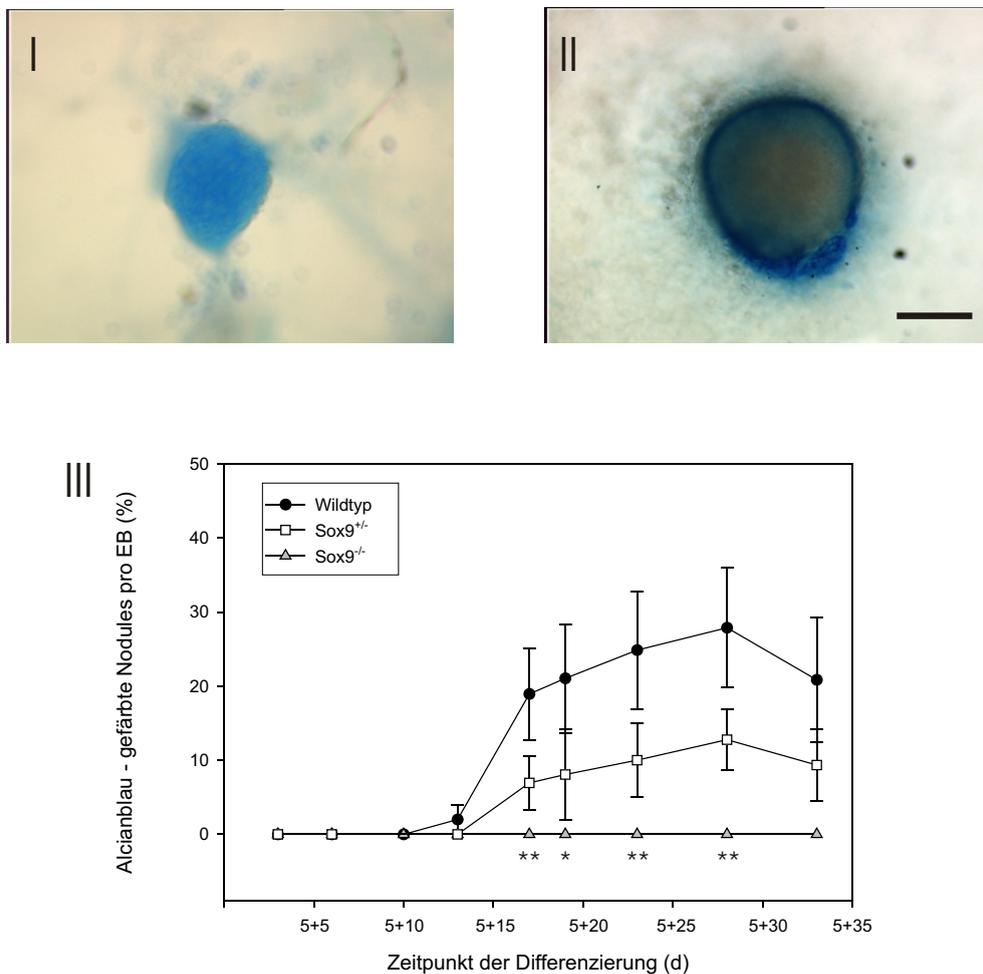


Abbildung 21: In Sox9^{−/−}-EBs wurden keine Alcianblau-gefärbten Knorpelzellnodules gefunden. Nodules in Wildtyp- und Sox9^{+/−}-EBs bestanden aus blasigen Zellen, zwischen denen sich eine blau angefärbte Matrix befand (I). Zu späteren Zeitpunkten der Differenzierung nahm die Anfärbbarkeit im Zentrum des Nodules ab, während sich um das Nodule herum ein tiefblau angefärbter Randsaum ausbildete (II). Die ersten Nodules traten in Wildtyp-EBs am Tag 5+13d, in Sox9^{+/−}-EBs am Tag 5+17d auf, und ihre Anzahl war in den heterozygot-Sox9-defizienten EBs halbiert (III). Sox9^{−/−}-EBs enthielten zu keinem Zeitpunkt der Differenzierung Alcianblau-gefärbte Nodules. Balken = 100µm; *:p ≤ 0.05; **:p ≤ 0.01

Anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Knorpelzellnodule wurde deutlich, daß die blasig-hypertrophen Knorpelzellen viel Zytoplasma enthielten und von reichlich extrazellulärer Matrix mit Kollagenfasern umgeben waren (Abb.22). Aufnahmen aus einem Randgebiet eines Knorpelzellnodule zeigten Kollagenfasern, die ein ähnliches Verteilungsmuster wie Kollagen II-Fasern in vitalem Knorpelgewebe aufwiesen (Abb.23).

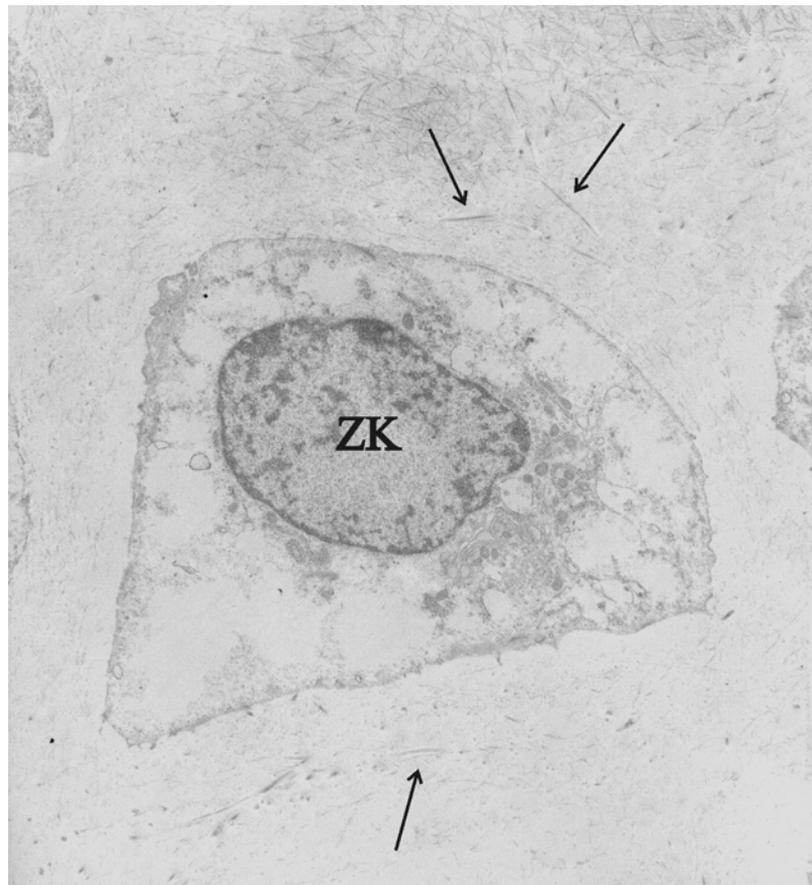


Abbildung 22: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer hypertrophen Knorpelzelle aus einem Knorpelzellnodule

Die blasig-hypertrophe Knorpelzelle enthält reichlich Zytoplasma und wird von einer kollagenfaserigen extrazellulären Matrix umgeben. Eine Querstreifung der Kollagenfibrillen (Pfeile) ist andeutungsweise erkennbar. ZK = Zellkern; Vergrößerung: 4600fach

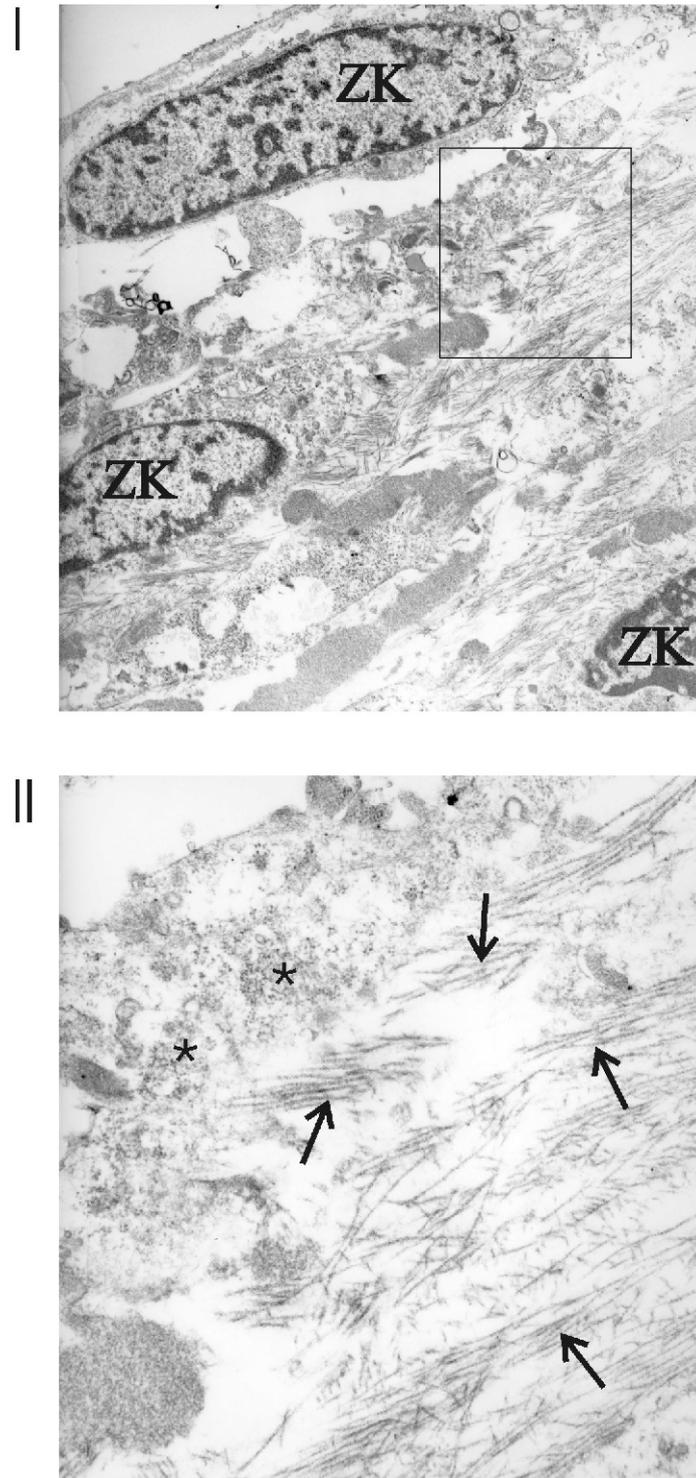


Abbildung 23: Elektronenmikroskopische Aufnahme von einem Randgebiet eines Knorpelzellnodules

(I) Chondrogene Zellen, zwischen denen sich ein kollagenfaseriges Flechtwerk ausgebildet hat. ZK = Zellkern; Vergrößerung: 6000fach

(II) Ausschnitt aus (I); Die Kollagenfibrillen sind teilweise längs (Pfeile) und teilweise quer (*) angeschnitten. Vergrößerung: 22000fach

Um die Expression von knorpelassoziierten Markern in den Knorpelzellnodules bzw. den mesenchymalen Kondensationen zu prüfen, wurden *in situ*-Hybridisierungen mit 'Antisense'-Sonden gegen *Scleraxis*-, *Aggrecan*- und *KollagenX*- mRNA kombiniert mit Immunfärbungen gegen Kollagen II-Protein durchgeführt.

Zellen in Nodules von Wildtyp- und Sox9^{+/-}-EBs waren in einer Kollagen II-positiven extrazellulären Matrix eingebettet und exprimierten schwach *Scleraxis* (Abb.24). Charakteristisch für die Nodules war außerdem der Randwall, der die Nodules umgab und in dem auch immunhistochemisch Kollagen II-Fasern identifiziert werden konnten. In Sox9^{-/-}-EBs wurden auch bei dieser Analyse keine Nodules, sondern ausschließlich Kollagen II-positiv Knorpelvorläuferkondensationen mit *Scleraxis*-exprimierenden Zellen detektiert.

Aggrecan-mRNA-*in situ*-Hybridisierungen ergaben, daß zusätzlich zu den Zellen mesenchymaler Kondensationen (siehe Abschnitt 4.2.2) die Zellen in den Wildtyp- und Sox9^{+/-}-Nodules *Aggrecan* exprimierten (Abb.25). Demgegenüber enthielten Sox9^{-/-}-EBs nur mesenchymale Kondensationen von *Aggrecan*-exprimierenden Zellen.

Die *in situ*-Hybridisierung für *Kollagen X* zeigte, daß viele Zellen sowohl in Wildtyp- als auch in Sox9^{+/-}-Nodules *Kollagen X* exprimierten (Abb.26). Allerdings wurden in Sox9^{+/-}-Nodules mehr *Kollagen X*-exprimierende Zellen gefunden als in Wildtyp-Nodules. Auch exprimierten die Zellen in den Sox9^{+/-}-Nodules *KollagenX*-mRNA stärker als Zellen in Wildtyp-Nodules. Es gab dabei keinen wesentlichen Unterschied zwischen Wildtyp- und Sox9^{+/-}-Nodules bezüglich der Gesamtzahl ihrer Zellen und der Größe der Nodules (Abb.27). In einigen mesenchymalen Kondensationen der Sox9^{-/-}-EBs wurden sehr wenige Zellen detektiert, die ebenfalls *Kollagen X* exprimierten (Abb.26). Diese Zellen erschienen jedoch nicht blasig-hypertroph und waren nicht in der extrazellulären Matrix eingebettet.

Eine Analyse der Anzahl Kollagen II-positiver Nodules in Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs während des Beobachtungszeitraumes von 5+5d bis 5+31d ergab, daß die ersten Kollagen II-positiven Nodules am Tag 5+13d in Wildtyp-EBs bzw. am Tag 5+15d in Sox9^{+/-}-EBs auftraten (Abb.28). In Wildtyp-EBs stieg zunächst die Zahl der Nodules bis 5+17d an und fiel anschließend bis 5+31d wieder ab. Die Zahl der Kollagen II-positiven Nodules in Sox9^{+/-}-EBs blieb von 5+15d bis 5+31d relativ konstant und war wie bei der Auswertung der Alcianblau-Färbungen im Vergleich zum Wildtyp um etwa die Hälfte reduziert. In Sox9^{-/-}-EBs fanden sich, wie bereits erwähnt, während des gesamten Differenzierungszeitraumes keine Kollagen II-positiven Nodules.

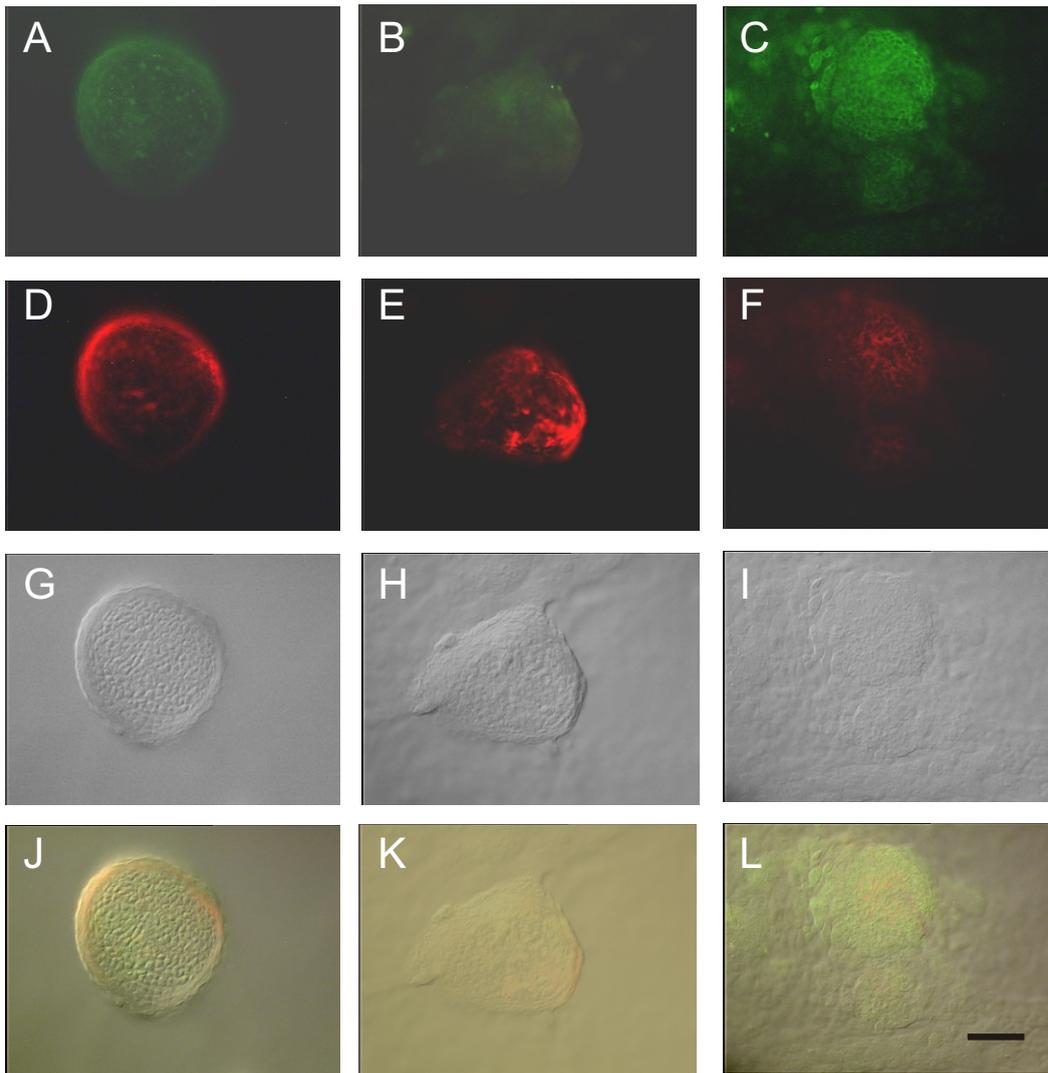


Abbildung 24: Sox9^{-/-}-EBs enthalten keine *Scleraxis*- und Kollagen II-exprimierenden Knorpelzellnodules.

In situ-Hybridisierungen mit einer *Scleraxis*-mRNA-'Antisense'-Sonde (A-C) in Kombination mit immunhistochemischen Kollagen II-Färbungen (D-F) machten deutlich, daß die blasigen Zellen in Wildtyp- (A, D, G, J) und Sox9^{+/+}- Nodules (B, E, H, K) *Scleraxis* schwach exprimierten und Kollagen II-Fasern bildeten, die sich zirkulär um die Nodules formierten. Sox9^{-/-}-EBs (C, F, I, L) hingegen enthielten nur die zuvor beschriebenen Knorpelvorläuferkondensationen. J-L zeigt die Kolokalisation. Balken = 100µm

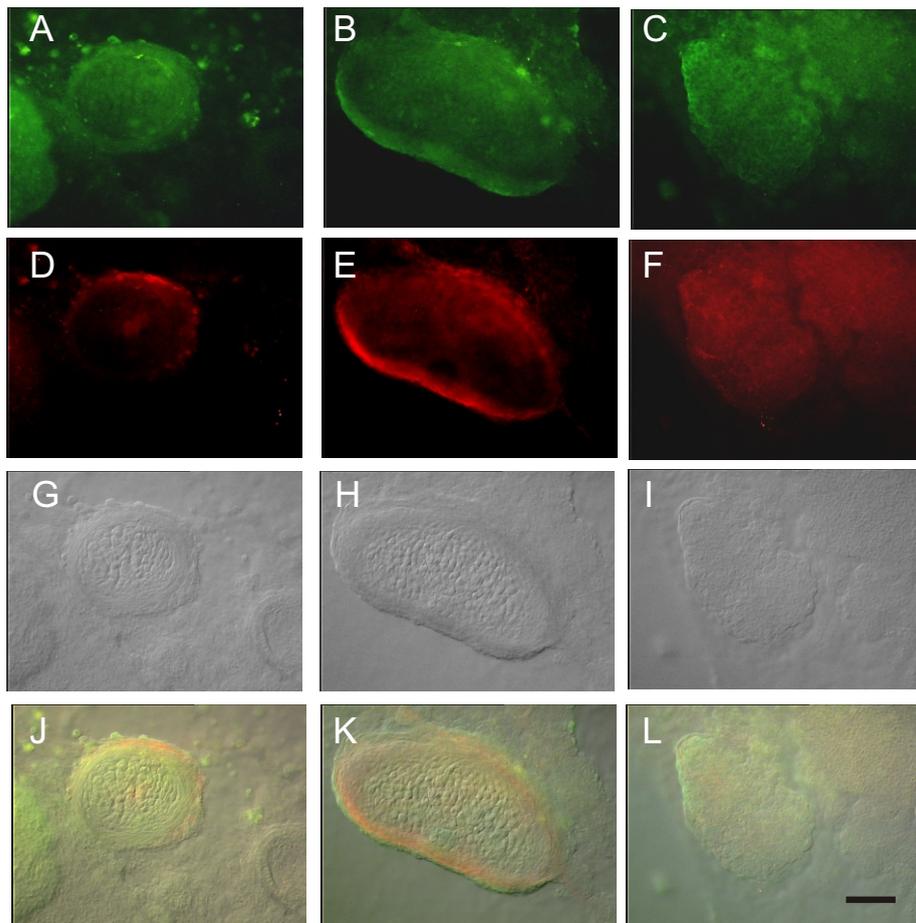


Abbildung 25: Sox9^{-/-}-EBs bilden keine *Aggrecan*-positiven Nodules. *Aggrecan*-mRNA-*in situ*-Hybridisierungen (A-C) wurden zusammen mit Immunfärbungen gegen Kollagen II (D-F) durchgeführt. Während Wildtyp- (A, D, G, J) und Sox9^{+/+}-EBs (B, E, H, K) *Aggrecan*- und Kollagen II-exprimierende Knorpelzellnodules aufwiesen, konnten in Sox9^{-/-}-EBs (C, F, I, L) nur mesenchymale Zellkondensationen mit zentral lokalisiertem Kollagen II detektiert werden. J-L zeigt die Kolokalisation. Balken = 100µm

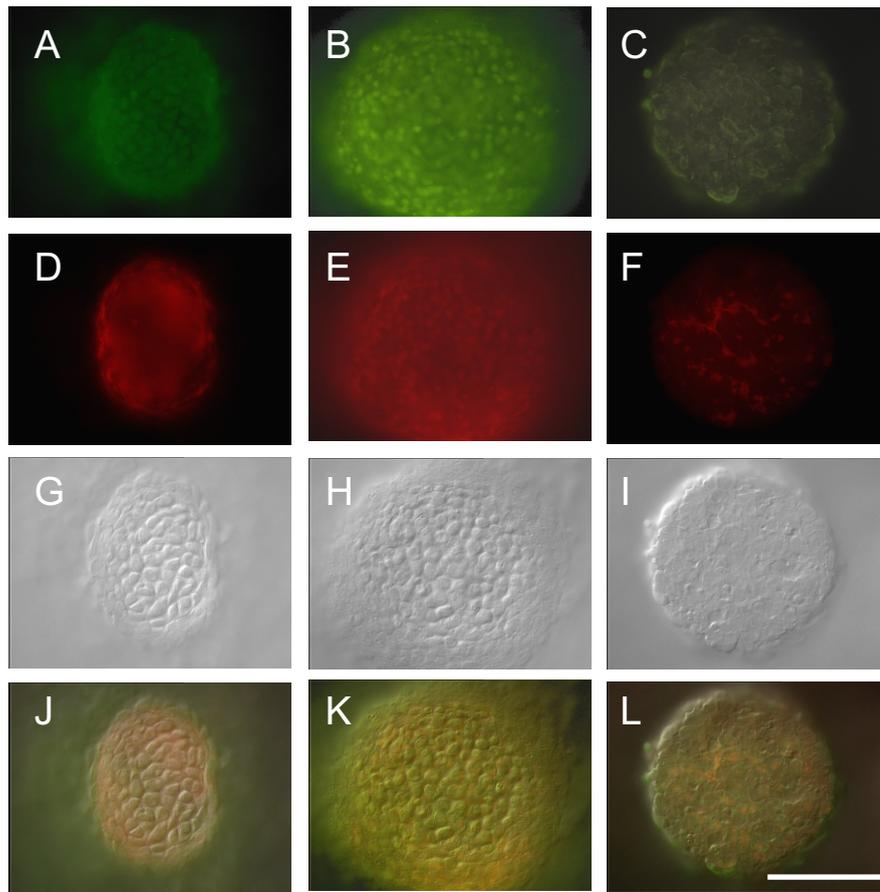


Abbildung 26: Sox9^{-/-}-ES-Zellen differenzieren nicht in hypertrophe, *Kollagen X*-exprimierende Knorpelzellen.

In situ-Hybridisierungen mit einer 'Antisense'-Sonde gegen Kollagen X-mRNA (A-C) in Kombination mit immunhistochemischen Kollagen II-Färbungen (D-F) machten deutlich, daß die blasig-hypertrophen Zellen in Wildtyp- (A, D, G, J) und Sox9^{+/+}-Nodules (B, E, H, K) *Kollagen X* exprimierten. In Sox9^{-/-}-EBs (C, F, I, L) fanden sich Kondensationen von Zellen, die ebenfalls *Kollagen X* exprimierten, jedoch nicht blasig-hypertroph erschienen und sich nicht in ihrer extrazellulären Matrix einbetteten. Die Sox9^{-/-}-Kondensationen waren im Gegensatz zu den Nodules der Wildtyp- und Sox9^{+/+}-EBs (D, E) nicht von einem zirkulären Kollagen II-Faserwall umgeben. Balken = 100µm

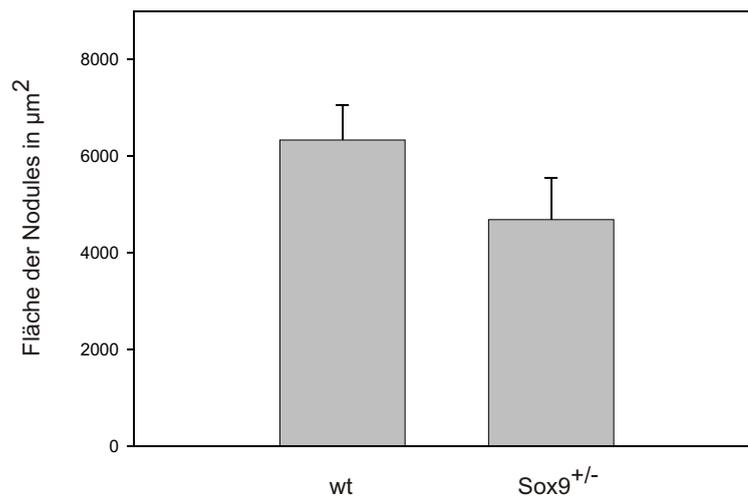


Abbildung 27: Die Größe der Nodules von Wildtyp- und Sox9^{+/-}-EBs unterscheidet sich statistisch nicht signifikant.

Die Fläche von je 20 Nodules aus Wildtyp- und Sox9^{+/-}-EBs wurde mit dem Programm „Scion Image“ (Scion Corporation, Frederick, Maryland) ausgemessen. Die Daten wurden mit dem Statistik-Programm „Sigma Plot“ ausgewertet. Es ergab sich kein statistisch signifikanter Größenunterschied zwischen Wildtyp- und Sox9^{+/-}-Nodules. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen. wt = Wildtyp

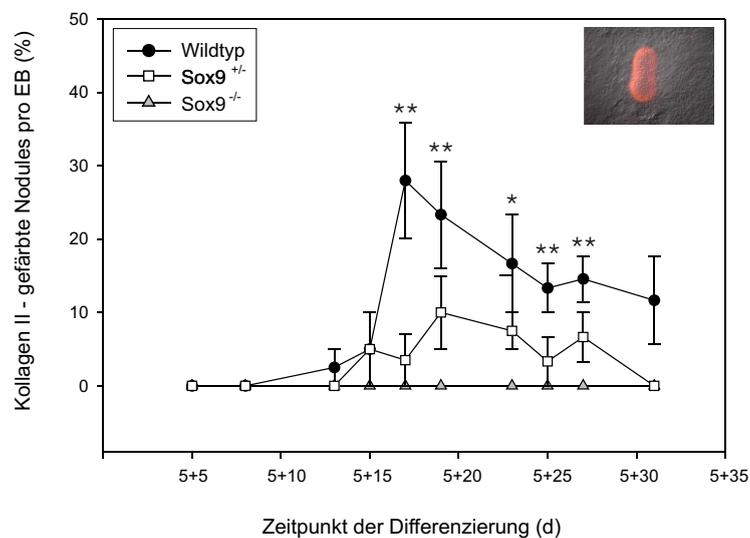


Abbildung 28: Quantitative Auswertung der Differenzierung Kollagen II-positiver Nodules in Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs.

Immunhistochemisch dargestellte Kollagen II-exprimierende Nodules ('Inset') traten in Wildtyp-EBs schon 13 Tage nach dem Plattieren auf (5+13d), Sox9^{+/-}-Nodules hingegen erst 2 Tage später. Während die Anzahl an Wildtyp-Nodules zunächst bis zum Tag 5+17d deutlich anstieg und anschließend wieder abnahm, blieb die Menge an Sox9^{+/-}-Nodules während der gesamten Differenzierungszeitraum von 5+5d bis 5+31d keine Kollagen II-positiven Nodules. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen. *:p ≤ 0.05; **:p ≤ 0.01

4.3 Einfluß von Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie auf die Knorpelzeldifferenzierung Sox9-defizienter ES-Zellen

BMP-2, TGF- β_1 und TGF- β_3 sind Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Bildung chondrogenen Gewebes induzieren können (Joyce et al., 1990; Luyten et al., 1994; Qi und Scully, 1998; Kramer et al., 2000; Barry et al., 2001). Es stellt sich die Frage, ob BMP-2, TGF- β_1 oder TGF- β_3 die defekte Knorpelzeldifferenzierung in Abwesenheit von Sox9 kompensieren können. Um dies zu prüfen, wurden Sox9^{-/-}-EBs in dem Zeitraum von 2d bis 5d, in dem die mesodermale Differenzierung durch Wachstumsfaktoren beeinflussbar ist (Rohwedel et al., 1999; Kramer et al., 2000), mit BMP-2, TGF- β_1 oder TGF- β_3 in einer Konzentration von 10 ng/ml Differenzierungsmedium inkubiert. Eine Analyse mittels Alcianblau-Färbung ergab, daß während des gesamten Beobachtungszeitraumes von 5+3d bis 5+31d keine Nodules in Sox9^{-/-}-EBs nach Stimulation mit den genannten Wachstumsfaktoren zu finden waren (Abb.29). In differenzierten Kontroll-EBs aus Wildtyp-Zellen stimulierte BMP-2, wie zu erwarten, die Nodulebildung gegen Ende des Differenzierungszeitraumes.

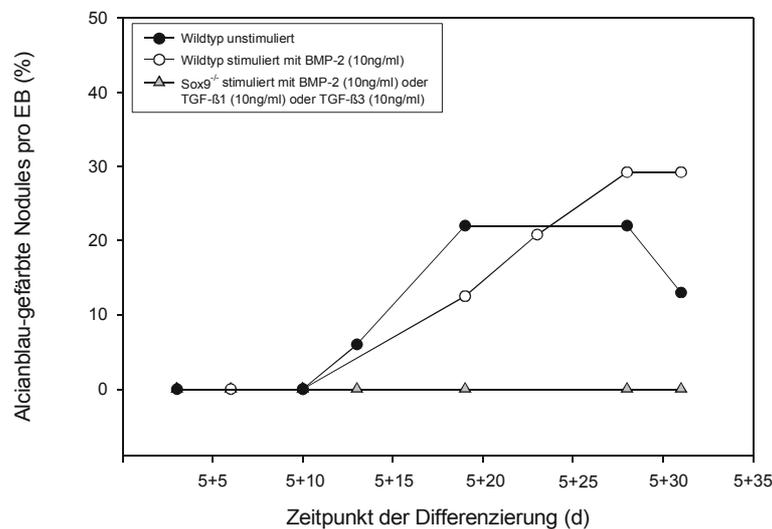


Abbildung 29: Quantitative Auswertung von Alcianblau-gefärbten Nodules von Wildtyp- und Sox9^{-/-}-EBs nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie. Sox9^{-/-}-EBs wurden mit BMP-2, TGF- β_1 oder TGF- β_3 in einer Konzentration von 10 ng/ml Differenzierungsmedium in dem Zeitraum von 2d-5d inkubiert. Während des gesamten Differenzierungszeitraumes von 5+3d bis 5+31d waren keine Nodules in Sox9^{-/-}-EBs nach Stimulation mit BMP-2, TGF- β_1 oder TGF- β_3 zu finden. In differenzierenden Wildtyp-EBs hingegen stimulierte BMP-2 die Nodulebildung gegen Ende des Differenzierungszeitraumes.

4.4 Auswirkung des Sox9-Funktionsverlustes auf die kardiale und neuronale Differenzierung in vitro

Sox9 wird während der Embryogenese nicht nur im Knorpelgewebe, sondern auch in anderen Zellen mesodermalen Ursprungs wie beispielsweise im kardialen Gewebe exprimiert und spielt auch eine Rolle bei der neuroektodermalen Differenzierung (Stolt et al., 2003; Rahkonen et al., 2003). Bei dieser Arbeit stand die Beurteilung der Auswirkung des Sox9-Gendefekts auf die Differenzierung von Knorpelzellen im Mittelpunkt. Um darüberhinaus einen ersten Eindruck von den Folgen des Sox9-Funktionsverlustes auf andere Differenzierungsprozesse zu erhalten, wurden die Zellen im Verlauf der Differenzierungsversuche mittels einfach durchzuführender Tests auf die Differenzierungseffizienz von Herzmuskelzellen und Nervenzellen als Vertreter der mesodermalen bzw. der neuroektodermalen Richtung untersucht.

Während der Differenzierung embryonaler Stammzellen können in den EBs rhythmisch schlagende Bereiche beobachtet werden, die aus kontraktile Zellen bestehen (Wobus et al., 1991). Diese Bereiche bestehen aus spezialisierten Herzzelltypen (Maltsev et al., 1993) und wurden in Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs während des Beobachtungszeitraumes von 5+3d bis 5+31d ausgezählt (Abb.30). Es zeigte sich, daß in Wildtyp-EBs die Anzahl schlagender Bereiche von 5+3d bis 5+19d zunächst anstieg und anschließend bis 5+31d wieder abnahm. Ähnliches zeigten auch Sox9^{+/-}-EBs, die im Vergleich zum Wildtyp allerdings eine verstärkte kardiale Differenzierung während des gesamten Beobachtungszeitraumes aufwiesen. Diese Unterschiede waren an den Tagen 5+6d, 5+12d, 5+17d, 5+24d und 5+26d statistisch signifikant. In Sox9^{-/-}-EBs wurde eine deutlich verfrühte kardiale Differenzierung gefunden, die schon am Tag 5+10d ihr Maximum erreichte. Anschließend fiel die Zahl der schlagenden Bereiche ab, um nocheinmal am Tag 5+19d kurzzeitig anzusteigen. Die Unterschiede waren in der frühen Phase von 5+6d bis 5+12d im Vergleich zum Wildtyp statistisch signifikant, während zu späteren Zeitpunkten kaum ein Unterschied zwischen Wildtyp- und Sox9^{-/-}-EBs hinsichtlich ihrer kardialen Differenzierungsfähigkeit zu beobachten war.

Um einen ersten Eindruck von der Auswirkung des Sox9-Verlustes auf die neuronale Differenzierungsfähigkeit zu gewinnen, wurden Immunfärbungen von Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs für das Neurofilament 160kDa durchgeführt (Abb.31). Dabei wurde deutlich, daß sowohl Wildtyp- als auch Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-ES-Zellen in neuronale Zellen

differenzierten, die sich bevorzugt im Zentrum der EBs befanden und die mit ihren axonalen Fortsätzen bis in die Peripherie der EBs projizierten.

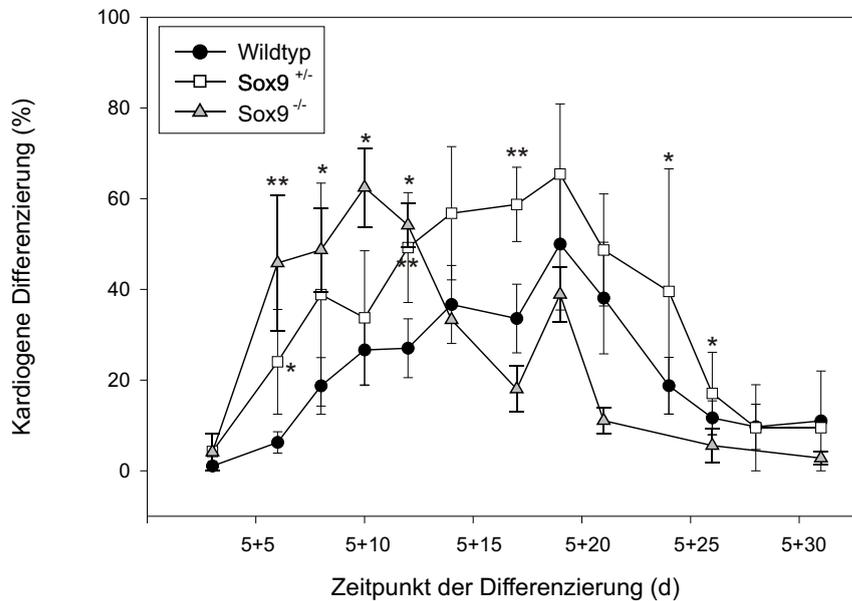


Abbildung 30: Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-ES-Zellen differenzieren in Herzmuskelzellen. Während Wildtyp- und Sox9^{+/-}-ES-Zellen eine maximale kardiale Differenzierung am Tag 5+19d aufwiesen, differenzierten Sox9^{-/-}-ES-Zellen deutlich früher mit einem Maximum am Tag 5+10d in Herzmuskelzellen. Es wurden EBs mit rhythmisch schlagenden Bereichen in Relation zur Gesamtzahl der EBs ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen. *:p \leq 0.05; **:p \leq 0.01

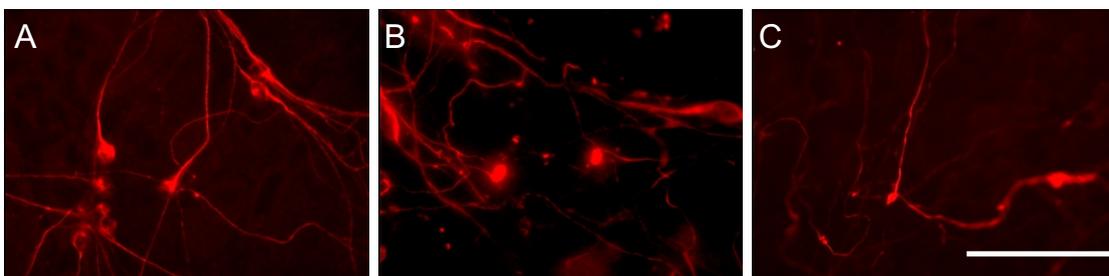


Abbildung 31: Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-ES-Zellen differenzieren in neuronale Zellen. Durch immunohistochemische Färbungen gegen das Neurofilament 160 kDa wurden sowohl in Wildtyp- (A) als auch in Sox9^{+/-}- (B) und Sox9^{-/-}- (C) EBs neuronale Zellen gefunden, deren Zellkörper sich bevorzugt im Zentrum der EBs befanden, während ihre Fortsätze bis in die Peripherie ragten. Balken = 100 μ m

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Folgen der Inaktivierung des Transkriptionsfaktors Sox9 auf die Knorpelzellendifferenzierung *in vitro* untersucht. Heterozygot- und homozygot Sox9-defiziente ES-Zellen sind in der Lage, in einer Wildtypzell-freien Umgebung mesenchymale Knorpelvorläuferkondensationen als Ausdruck einer frühen Knorpelzellendifferenzierung auszubilden. Bei völligem Sox9-Genfunktionsverlust in Sox9^{-/-}-ES-Zellen wird allerdings das Stadium der späten Knorpelzellendifferenzierung nicht mehr erreicht und die Bildung von Knorpelzellnodules bleibt aus, wie mittels histochemischer und immunhistochemischer Analyse gezeigt werden konnte. Auch die Analyse der Expression entwicklungspezifisch regulierter, knorpelassoziierter Gene in differenzierenden Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs mittels RT-PCR gab Hinweise darauf, daß Sox9 ein Regulator der späten Knorpelzellendifferenzierung ist. Eine wichtige Voraussetzung, das Differenzierungsverhalten einer genetisch veränderten ES-Zell-Linie zu interpretieren, ist der Vergleich mit dem Differenzierungsverhalten von Wildtyp-ES-Zellen. Es war daher notwendig, zunächst die chondrogene Differenzierung von ES-Zellen der Wildtypzell-Linie E14.1, die zur Generierung der Sox9-defizienten ES-Zell-Klone verwendet worden war, zu analysieren. Tatsächlich zeigen verschiedene ES-Zell-Linien ein unterschiedliches chondrogenes Differenzierungspotential (Kramer et al., eingereicht). Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche ergaben, daß E14.1-ES-Zellen die Fähigkeit besitzen, über Knorpelvorläuferzellen in terminal differenzierte hypertrophe Chondrozyten zu differenzieren, begleitet von einer differentiellen Expression knorpelassoziierter Gene. Somit war ein geeignetes *in vitro*-System etabliert, mit dem die Sox9-Genfunktion während der Knorpelzellendifferenzierung bestimmt werden konnte.

5.1 Die verwendeten Sox9-defizienten ES-Zellen besitzen ein funktionsloses

Sox9-Gen

Zwischen den Sox9-Proteinen von Mensch und Maus, die aus 509 bzw. 507 Aminosäuren aufgebaut sind, besteht eine hohe Homologie von 96% (Foster et al., 1994; Wagner et al., 1994; Wright et al., 1995). Dabei besitzen sowohl die HMG-Box als auch die C-terminal lokalisierte Domäne für die Transkriptionsaktivierung (Transaktivierungsdomäne) eine stark konservierte Aminosäuresequenz. Ein heterozygoter Sox9-Genverlust verursacht beim Menschen das Krankheitsbild der Kampomelie (Foster et al., 1994; Wagner et al.,

1994). Genanalysen von Patienten mit dieser Chondrodysplasie zeigten unterschiedliche Mutationen im Sox9-Gen, die zum Austausch von Aminosäuren oder zu einem Rasterschub mit konsekutiver Veränderung oder Verkürzung der primären Aminosäuresequenz führten (Kwok et al., 1995; Meyer et al., 1997; McDowall et al., 1999). Dabei fanden sich Mutationen sowohl in der HMG-Box, die von Exon 1 und 2 kodiert wird, als auch in der C-terminal lokalisierten Transaktivierungsdomäne, die aus zwei wichtigen Untereinheiten besteht (AS 339-379 und AS 402-509).

In dieser Arbeit wurden Sox9-defiziente ES-Zellen der Maus untersucht, bei denen das Exon 2 deletiert war. Dadurch käme es in einem hypothetisch gebildeten Protein zur Deletion der HMG-Box um ca. 50% und aufgrund eines Rasterschubs zum Verlust der C-terminalen Transaktivierungsdomäne.

Für die Funktion eines Transkriptionsfaktors ist eine DNA-bindende und eine transaktivierende Domäne von entscheidender Bedeutung (Ptashne, 1988; Mitchell und Tjian, 1989). Die HMG-Domäne von Sox-Proteinen bindet sequenzspezifisch an DNA von Zielgenen. (Connor et al., 1994; Lefebvre et al., 1997). Weiterhin wird der HMG-Domäne eine wichtige Rolle bei der Einschleusung des Sox-Proteins in den Zellkern zugesprochen (Südbeck und Scherer, 1997; Harley et al., 2003). Aufgrund der Deletion in der HMG-Box-kodierenden Region in Sox9-defizienten ES-Zellen kann ein hypothetisch gebildetes, verändertes Sox9-Protein diese Funktionen nicht mehr wahrnehmen. Transfektionsversuche haben gezeigt, daß mit zunehmender Verkürzung des Sox9-Proteins im C-terminalen Bereich eine Abnahme der Transaktivierungsaktivität verbunden war (Südbeck et al., 1996; Ng et al., 1997; McDowall et al., 1999). Beispielsweise besaß ein verkürztes Sox9-Protein mit einer Länge von 248 Aminosäuren eine kaum noch nachweisbare Transaktivierungsfähigkeit. Die in dieser Arbeit untersuchten Sox9-Knockout-Stammzellen würden ein hypothetisches Sox9-Protein von nur 165 Aminosäuren Länge exprimieren. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß ein solches hypothetisches Protein die Transkription von Sox9-Zielgenen nicht mehr aktivieren kann. Darüberhinaus ist ein solches Protein aufgrund seiner Länge und seiner veränderten sterischen Konformation instabiler und somit anfälliger für den intrazellulären Proteaseverdau.

Schließlich würden auch Phosphorylierungsstellen in einem hypothetisch exprimierten Sox9-Protein in den untersuchten Sox9-defizienten Zellen fehlen. Transkriptionsfaktoren üben viele ihrer Funktionen in einem phosphorylierten Zustand aus (für Review siehe Boulikas, 1995). Beispielsweise wurde für das humane SRY-Protein gezeigt, daß dieses im phosphorylierten Zustand eine verstärkte DNA-Bindungsaktivität besitzt (Desclozeaux et

al., 1998). Es wurden drei Phosphorylierungsstellen im Sox9-Protein beschrieben (Huang et al., 2000; Huang et al., 2001). Zwei von diesen wären in dem Sox9-Knockout deletiert.

5.2 Der Verlust von Sox9 hat keine Auswirkungen auf die Bildung

mesenchymaler Knorpelvorläuferkondensationen in vitro

Zur Beschreibung der Knorpelzelldifferenzierung wurden Versuche mit etablierten Zell-Linien aus mesenchymalen Zellen, primären Chondrozyten und Chondrosarkomazellen durchgeführt (Ahrens et al., 1993; Erlebacher et al., 1995; Mukhopadhyay et al., 1995). Da diese Zellen jedoch ein frühes Differenzierungsprogramm bereits durchlaufen haben, beschränkten sich Aussagen zur Chondrogenese auf fortgeschrittene, späte Differenzierungsstadien. Demgegenüber eignet sich die *in vitro*-Differenzierung pluripotenter embryonaler Stammzellen dazu, sowohl sehr frühe als auch späte chondrogene Entwicklungsschritte zu beschreiben (Kramer et al., 2000; Hegert et al., 2002; Hargus et al., eingereicht). In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-ES-Zellen in mesenchymale Knorpelvorläuferzellen differenzierten, die sich zu Kondensationen formierten. Dabei wurden in diesem Stadium Marker mesenchymaler Kondensationen wie Scleraxis, N-Cadherin, N-CAM, Sox5 und Sox 6 exprimiert.

Scleraxis ist ein Transkriptionsfaktor der 'basic Helix-Loop-Helix'-Familie, der während der Maus-Embryogenese mit Einsetzen der chondrogenen Zelldifferenzierung 9,5 Tage p.c. in mesenchymalen Knorpelvorläuferzellen exprimiert wird (Cserjesi et al., 1995). Scleraxistranskripte lassen sich zunächst im ventrolateralen Anteil der Sklerotome und in mesenchymalen Zellen der Extremitätenknospen nachweisen und werden mit voranschreitender embryonaler Entwicklung in kondensierten Chondroprogenitorzellen des gesamten Knorpelskeletts exprimiert. In Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs nahmen Anzahl und Größe von *Scleraxis*-exprimierenden Knorpelvorläuferkondensationen während des gesamten Differenzierungszeitraumes zu. Dies weist darauf hin, daß sich die Scleraxis-Expression nicht unter der Kontrolle von Sox9 befindet.

In vivo wird *Scleraxis* in späteren Embryonalstadien (14,5 Tage p.c.) zusätzlich auch im straffen Bindegewebe wie Bändern und Sehnen gefunden (Cserjesi et al., 1995; Schweitzer et al., 2001; Brent et al., 2003). Ferner wurden *Scleraxis*-exprimierende Sehnenvorläufer beschrieben, die sich von einem erst kürzlich identifizierten Subkompartiment der Somiten, dem sogenannten Syndetom, herleiten (Brent et al., 2003). Demnach könnte die Scleraxis-Expression in Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs sowohl von Knorpel- als auch von Sehnenvorläufern verursacht sein. Allerdings sind in embryonalen Sehnen und deren

Vorläufern mesenchymale Zellen enthalten, die die Fähigkeit besitzen, in Chondrozyten zu differenzieren (Ralphs et al., 1991; Koob et al., 1992). Die Scleraxis-Expression in diesen Sehnen ist möglicherweise auf die Anwesenheit dieser Knorpelvorläuferzellen zurückzuführen. Weitere Hinweise dafür, daß Scleraxis in erster Linie als chondrogener Transkriptionsfaktor angesehen werden muß, gaben histologische Untersuchungen von Maus-Chimären aus Wildtyp- und Scleraxis^{-/-}-Zellen. In diesen Mäusen waren Scleraxis^{-/-}-Zellen sowohl vom Sklerotom als auch von späteren Chondroprogenitorzellen beispielsweise der Rippen ausgeschlossen, während Scleraxis^{-/-}-Zellen an der Bildung von Sehnen teilnahmen (Brown et al., 1999).

N-Cadherin und N-CAM sind Adhäsionsmoleküle, die während der Entwicklung von neuronalem Embryonalgewebe exprimiert werden (Rutishauser, 1984; Inuzuka et al., 1991). Zusätzlich wurde aber auch eine starke Expression dieser Marker im mesodermalen Gewebe wie beispielsweise in mesenchymalen Knorpelvorläufern der Extremitätenknospen gefunden (Tavella et al., 1994; Oberlender und Tuan, 1994a; Oberlender und Tuan, 1994b). Daß N-Cadherin und N-CAM auch eine entscheidende Rolle während der frühen Phase der Knorpelzellendifferenzierung spielen, zeigten Versuche, bei denen N-Cadherin bzw. N-CAM mittels monoklonaler Antikörper blockiert wurden. Dies hatte zur Folge, daß die Kondensation mesenchymaler Zellen und somit die weitere chondrogene Zelldifferenzierung stark eingeschränkt war (Widelitz et al., 1993; Oberlender und Tuan, 1994b). Mit voranschreitender Knorpelzellendifferenzierung wird die Expression von N-Cadherin und N-CAM eingestellt und schließlich nur noch im Perichondrium nachgewiesen (Chuong et al., 1993; Tavella et al., 1994; Oberlender und Tuan, 1994b). In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß N-Cadherin und N-CAM sowohl in Wildtyp- als auch in Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-Knorpelvorläuferkondensationen exprimiert wird. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen einer Studie, die gezeigt hat, daß Sox9 die Expression von N-Cadherin direkt kontrolliert (Panda et al., 2001). Andererseits wurden N-Cadherin und N-CAM auch von Sox9^{-/-}-Zellen in konditionellen Knockout-Mäusen exprimiert (Akiyama et al., 2002). Es kann daher angenommen werden, daß neben Sox9 andere Transkriptionsfaktoren die Genaktivität dieser Adhäsionsmoleküle regulieren.

In differenzierenden Wildtyp- und Sox9-defizienten EBs waren mesenchymale Knorpelvorläuferkondensationen enthalten, die Sox5 und Sox6 gemeinsam mit Kollagen II exprimierten. Sox5 und Sox6 sind zwei weitere Transkriptionsfaktoren der SOX-Familie, die während der Embryogenese 10,5 Tage p.c. im Sklerotom, lateralen Plattenmesoderm und im Kopfmesenchym von kondensierten Chondroprogenitorzellen exprimiert werden

(Lefebvre et al., 1998). Später werden diese Marker auch in reifen Chondrozyten des Knorpelskeletts gefunden. Dabei werden *Sox5* und *Sox6* gemeinsam mit Kollagen II und *Sox9* in diesen Strukturen koexprimiert. Studien mit *Sox5*^{-/-}- und mit *Sox6*^{-/-}- Knockout-Mäusen machten deutlich, daß der Verlust von *Sox5* bzw. *Sox6* nur geringe skelettale Fehlbildungen in diesen Mäusen zur Folge hatte (Smits et al., 2001). Demgegenüber zeigten Nachkommen von Kreuzungen von *Sox5*^{-/-}- und *Sox6*^{-/-}-Knockout-Mäusen, die Defekte in beiden Genen hatten (*Sox5*^{-/-}/*Sox6*^{-/-}-Doppelknockout-Mäuse), eine schwere generalisierte Chondrodysplasie (Smits et al., 2001). Dies deutet darauf hin, daß möglicherweise der Verlust von *Sox5* durch *Sox6* bzw. der Verlust von *Sox6* durch *Sox5* kompensiert wird. Tatsächlich wurden für SOX-Transkriptionsfaktoren überlappende Funktionen während embryonaler Differenzierungsvorgänge beschrieben (für Review siehe Wegner, 1999). Demnach wäre es denkbar, daß während der frühen Knorpelzeldifferenzierung der Verlust von *Sox9* durch *Sox5* und *Sox6* kompensiert wird, so daß mesenchymale Zellkondensationen in *Sox9*-defizienten EBs gebildet werden.

Es wurden weitere Transkriptionsfaktoren wie *Cart-1*, *ck-erg* und *ets-2* beschrieben, die *in vivo* in mesenchymalen Knorpelvorläuferkondensationen exprimiert werden (Zhao et al., 1994; Maroulakou et al., 1994; Dhordain et al., 1995). Auch diese Transkriptionsfaktoren könnten möglicherweise den Verlust von *Sox9* in differenzierenden EBs kompensieren.

Es wurde bisher angenommen, daß differenzierende *Sox9*^{-/-}-Zellen nicht in der Lage seien, mesenchymale Knorpelvorläuferkondensationen auszubilden. So entwickelten sich in konditionellen *Sox9*-Knockout-Mäusen, in denen beide *Sox9*-Allele kurz vor Ausbildung mesenchymaler Knorpelvorläuferkondensationen inaktiviert worden waren, keine Knorpelvorläuferkondensationen (Akiyama et al., 2002). Auch die Bindung von PNA, welches charakteristischerweise von mesenchymalen Kondensationen gebunden wird, war in diesen Mäusen geringer. Außerdem nahmen *Sox9*^{-/-}-Zellen in Maus-Chimären nicht an der Bildung von Knorpelvorläuferkondensationen teil, sondern wurden in 11,5 und 12,5 Tage alten Embryonen nur außerhalb der Knorpelanlagen nachgewiesen (Bi et al., 1999).

Bei der Analyse von Maus-Chimären kann aber ein modulierender Einfluß von Wildtypzellen auf benachbarte Knockout-Zellen nicht ausgeschlossen werden. Beispielsweise differenzierten in β_1 -Integrin^{-/-}-Maus-Chimären β_1 -defiziente Zellen in morphologisch unauffällige Neuronen, während die Neurone in β_1 -Integrin^{-/-}-EBs verkürzt waren (Fässler und Meyer, 1995; Rohwedel et al., 1998a). Dieser Unterschied könnte durch einen kompensierenden Effekt durch Wildtypzellen *in vivo* erklärt werden. Es wurde auch beschrieben, daß Wildtypzellen in Maus-Chimären einen Wachstumsvorteil

gegenüber Knockout-Zellen haben. Beispielsweise nahm die Anzahl von DNA-Polymerase $\beta^{-/-}$ -Zellen in entsprechenden Chimären mit voranschreitender Embryonalentwicklung ständig ab (Betz et al., 1996). Es ist deshalb denkbar, daß die Wildtypzellen in Sox9 $^{-/-}$ -Chimären einen inhibierenden Einfluß auf Sox9-defiziente Zellen bei der Ausbildung mesenchymaler Kondensationen ausüben.

Die Abwesenheit von mesenchymalen Knorpelvorläuferkondensationen in konditionellen Sox9 $^{-/-}$ -Knockout-Mäusen könnte dadurch erklärt werden, daß durch den Verlust von Sox9 das Gleichgewicht zwischen induzierenden und inhibierenden chondrogenen Faktoren zugunsten der Inhibition gestört wird, so daß die Bildung mesenchymaler Zellkondensationen unterbleibt. Das Ektoderm bildet z.B. Faktoren wie FGF-2 und FGF-8, die das Wachstum von Knorpelvorläuferkondensationen in den Extremitätenknospen von Mäuseembryonen inhibieren und somit deren Form und Größe regulieren (Zanetti und Solursh, 1986; Mofteh et al., 2002). Es wurde gezeigt, daß das ektodermale Gewebe von konditionellen Sox9 $^{-/-}$ -Knockout-Mäusen ebenfalls FGF-8 bildete, welches auf Sox9 $^{-/-}$ -Zellen einwirkte (Akiyama et al., 2002). Es ist denkbar, daß Sox9 ein Antagonist von inhibierenden ektodermalen Faktoren wie FGF-8 darstellt. In dieser Arbeit wurden Sox9 $^{-/-}$ -ES-Zellen in einer Wildtypzell-freien Umgebung differenziert. Außerdem befanden sich differenzierende Sox9 $^{-/-}$ -ES-Zellen nicht unter dem direkten Einfluß von inhibierenden ektodermalen Faktoren wie FGF-8, weil in differenzierenden EBs keine Morphogenese stattfindet. Dies könnte die Ursache dafür sein, daß *in vitro* die Bildung mesenchymaler Knorpelvorläuferkondensationen nicht unterbunden wurde. Die Funktion von Sox9 bei der Bildung mesenchymaler Knorpelvorläuferkondensationen wäre dann von der zellulären Umgebung abhängig und somit keine zellautonome Funktion.

Publizierte Beispiele zeigen, daß das Modellsystem der *in vitro*-Differenzierung embryonaler Stammzellen als EBs prinzipiell geeignet ist, um nicht-zellautonome Vorgänge zu untersuchen. Während beispielsweise Scleraxis $^{-/-}$ -Knockout-Mäuse kein Mesoderm bilden konnten, exprimierten Scleraxis $^{-/-}$ -EBs mesodermale Marker auf einem Niveau, das dem von Wildtyp-EBs glich (Brown et al., 1999). Dies deutete darauf hin, daß die Fähigkeit zur Mesodermbildung von Scleraxis $^{-/-}$ -Zellen nicht zellautonom, sondern vielmehr abhängig von äußeren Faktoren war. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für Srf $^{-/-}$ -Zellen gefunden. SRF ('Serum Response Factor') ist ein Transkriptionsfaktor, der ebenfalls eine entscheidende Rolle während der Mesoderminduktion spielt. Srf $^{-/-}$ -Knockout-Mäuse starben im Stadium der Gastrulation, weil die Bildung des Mesoderms nicht stattfand (Arsenian et al., 1998). Demgegenüber waren Srf $^{-/-}$ -ES-Zellen in der Lage, *in vitro* in

mesodermale Zellen zu differenzieren (Weinhold et al., 2000), was auf eine nicht-zellautonome Funktion von Srf bei der Bildung mesodermaler Strukturen hinwies.

5.3 Die Knorpelmarker Kollagen II und Aggrecan werden in

Sox9-defizienten EBs exprimiert

Kollagen II und Aggrecan stellen zwei Hauptkomponenten der chondrogenen Matrix dar, die *in vivo* in vielen Skelettelementen koexprimiert werden (Glumoff et al., 1994). Während der Embryonalentwicklung werden Transkripte für Kollagen II und Aggrecan gemeinsam mit Sox9-Gentranskripten in mesenchymalen Knorpelvorläuferkondensationen und reiferen Knorpel-elementen gefunden (Ng et al., 1997; Zhao et al., 1997; Bi et al., 1999), so daß angenommen wurde, daß Sox9 an der Regulation dieser Knorpelmarker beteiligt ist.

Mehrere Studien haben gezeigt, daß Sox9 an ein 'Enhancer'-Element im Intron 1 des Kollagen II-Gens binden kann, welches mehrere Bindungsstellen für die HMG-Box von Sox9 enthält (Zhou et al., 1995; Lefebvre et al., 1996; Lefebvre et al., 1997; Zhou et al., 1998). Wurden Chondrozyten und Chondrosarkomazellen mit Kollagen II-Reporter-genkonstrukten transfiziert, die ausschließlich diese Sox9-Bindungsstellen des Kollagen II-Gens enthielten, so wurden diese Konstrukte spezifisch in diesen Zellen exprimiert (Mukhopadhyay et al., 1995; Lefebvre et al., 1996; Lefebvre et al., 1997). Auch *in vivo* in transgenen Mäusen konnte die direkte Korrelation zwischen der Expression von Sox9 und Kollagen II dargestellt werden (Zhou et al., 1995; Lefebvre et al., 1996; Bell et al., 1997). Ferner wurde auch in nichtchondrogenen Zellen bei Sox9-Überexpression ein Kollagen II-Reporter-genkonstrukt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aktiviert (Bell et al., 1997; Lefebvre et al., 1997).

Auch die Expression von Aggrecan wird durch Sox9 reguliert. *In vitro* wurde gezeigt, daß Sox9 an ein 'Enhancer'-Element im Intron 1 des Aggrecan-Gens bindet und die Expression eines Aggrecan-Reporter-genkonstrukts in transfizierten TC6-Zellen aktiviert (Sekiya et al., 2000).

Schließlich exprimierten Sox9^{-/-}-Zellen in Maus-Chimären weder *Kollagen II* noch *Aggrecan* (Bi et al., 1999). Auch waren Sox9^{-/-}-Zellen in Teratomen aus Sox9^{-/-}-ES-Zellen nicht in der Lage, Kollagen II- oder Aggrecan-Protein zu bilden (Bi et al., 1999).

Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß differenzierende Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs die 'Splice'-Varianten *a* und *b* von Kollagen II sowie *Aggrecan* differentiell exprimierten. Kollagen IIa wird von mesenchymalen Chondroprogenitorzellen

und Kollagen IIb von reiferen Chondroblasten gebildet (Ryan und Sandell, 1990; Sandell et al., 1991). Während sich differenzierende Wildtyp- und Sox9^{+/-}-EBs bezüglich der Kollagen IIa und IIb-Expression kaum unterschieden, war die Expression in Sox9^{-/-}-EBs deutlich niedriger. Allerdings wurden auch in differenzierenden Sox9^{-/-}-EBs Kollagen II-Fibrillen detektiert. Weiterhin unterschieden sich differenzierende Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs bezüglich der Aggrecan-Expression zu frühen Zeitpunkten der Differenzierung nur wenig, so daß angenommen werden kann, daß der Verlust von Sox9 *in vitro* durch andere Faktoren kompensiert wird.

Die unterschiedlichen Ergebnisse zur Expression von Kollagen II und Aggrecan in den Sox9^{-/-}-Maus-Chimären und Sox9^{-/-}-EBs lassen sich möglicherweise durch die zuvor diskutierte Fähigkeit von Sox9^{-/-}-Zellen zur Bildung mesenchymaler Knorpelvorläuferkondensationen *in vitro* in EBs erklären. Kollagen II und *Aggrecan* wurden nach Ausbildung der Knorpelvorläuferkondensationen von Wildtyp- und Sox9-defizienten EBs exprimiert. Auch *in vivo* geht der Prozeß der Zellkondensation der Expression knorpelassoziierter Gene voraus (Zhao et al., 1997; DeLise et al., 2000). Möglicherweise ist die Ausbildung mesenchymaler Zellkondensationen eine Voraussetzung für die Expression knorpelassoziierter Gene wie Kollagen II und Aggrecan. Für diese Annahme spricht auch, daß in konditionellen Sox9-Knockout-Mäusen *Kollagen II* nur dann in mesenchymalen Zellkondensationen exprimiert wurde, wenn Sox9 nach deren Ausbildung inaktiviert wurde (Akiyama et al., 2002). In Mäusen hingegen, in denen das Sox9-Gen kurz vor Ausbildung mesenchymaler Zellkondensationen inaktiviert worden war, wurden keine Knorpelvorläuferkondensationen mehr gebildet, und folglich wurde auch kein *Kollagen II* exprimiert (Akiyama et al., 2002).

Es ist nicht bekannt, ob Sox9^{-/-}-Teratome, in denen ebenfalls kein Kollagen II und Aggrecan nachgewiesen werden konnte, mesenchymale Zellkondensationen bilden (Bi et al., 1999). Es ist aber denkbar, daß in diesen Teratomen die Wildtypzellen der Wirte einen inhibierenden Einfluß auf die Knorpelzelldifferenzierung Sox9-defizienter Zellen haben.

Es gibt viele Hinweise dafür, daß neben Sox9 weitere Faktoren bei der Regulation des Kollagen II-Gens beteiligt sind. *In vivo* konnte gezeigt werden, daß *Kollagen II* unabhängig von Sox9 exprimiert wurde (Ng et al., 1997). Ferner wurden in Mausembryonen Sox9-exprimierende Zellen gefunden, die kein Kollagen II bildeten (Ng et al., 1997). Außerdem wurde vor Kurzem beschrieben, daß die Expressionsänderung des Kollagen II-Gens in humanen Chondrozyten nicht direkt mit der Expression von Sox9 korrelierte (Aigner et al., 2003).

Transkriptionsfaktoren, die neben Sox9 an der Regulation des Kollagen II-Gens beteiligt sein könnten, sind die sogenannten 'Chondrocyte-Specific Enhancer-Binding Proteins' (CSEPs), zu denen Sox5 und Sox6 gehören (Zhou et al., 1998; Lefebvre et al., 1998). *In vitro*-Studien machten deutlich, daß Sox5 und Sox6 die endogene Aggrecan-Expression und Kollagen II-Reportergenkonstrukte in transfizierten Fibroblasten aktivieren konnten (Lefebvre et al., 1998). Ferner wurde in Sox5^{-/-}/Sox6^{-/-}-Doppelknockout-Mäusen die Expression knorpelassoziierter Gene stark herunterreguliert, obwohl Sox9 auf normalem Niveau exprimiert wurde (Akiyama et al., 2002). Weitere Transkriptionsfaktoren, die Regulatoren des Kollagen II-Gens sein könnten, sind Sp-1 und C-Krox, die während der Embryonalentwicklung der Maus ein ähnliches Expressionsmuster wie Sox9 und *Kollagen II* zeigen (Galera et al., 1996; Marin et al., 1997). Auch POU-Transkriptionsfaktoren wie z.B. Brain-1 sind möglicherweise an der Steuerung des Kollagen II-Gens beteiligt, denn der Kollagen II-'Enhancer' besitzt Bindungsstellen für diesen Transkriptionsfaktor (Lefebvre et al., 1996). Schließlich könnte auch Scleraxis bei der Regulation des Kollagen II-Gens eine Rolle spielen, denn es wurde gezeigt, daß die Überexpression von Scleraxis die Expression von endogenem *Kollagen II* in Osteosarkomazellen verstärkt (Liu et al., 1997). In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß in Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs Sox5, Sox6 und *Scleraxis* in mesenchymalen Kondensationen exprimiert wurden. Die Aktivierung der Kollagen II- und Aggrecan-Expression könnte in Abwesenheit von Sox9 durch die genannten Transkriptionsfaktoren kompensiert worden sein.

Kürzlich wurde für Sox9 sogar ein inhibierender Effekt auf die Expression des Kollagen II-Gens beschrieben. In primären Chondrozyten wurde die Kollagen II-Expression nach Transfektion mit einem Sox9-Expressionsvektor in hoher Konzentration herunterreguliert (Kyriotou et al., 2003). Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß im Kollagen II-Promotor auch spezifische Sequenzen gefunden wurden, über die Sox9 eine Transkriptionshemmung vermittelt (Kyriotou et al., 2003).

5.4 Der Verlust von Sox9 bewirkt eine gestörte späte

Knorpelzellendifferenzierung in vitro und in vivo

Die Knorpelzellendifferenzierung von Sox9^{-/-}-ES-Zellen war in einem späten Stadium blockiert, das durch die Ausbildung Alcianblau- und Kollagen II-positiver Knorpelzellnodules charakterisiert war. In Übereinstimmung damit waren Sox9-defiziente Zellen in Sox9^{-/-}-Maus-Chimären und Sox9^{-/-}-Teratomen ebenfalls nicht in der Lage, in reife Chondrozyten zu differenzieren (Bi et al., 1999). Außerdem waren auch Sox9^{-/-}-Zellen in

konditionellen Knockout-Mäusen, in denen das Sox9-Gen vor Ausbildung mesenchymaler Kondensationen inaktiviert worden war, nicht in der Lage, Knorpel- und Knochengewebe zu bilden (Akiyama et al., 2002).

In Sox9^{+/-}-EBs war die Anzahl der Knorpelzellnodules im Vergleich zum Wildtyp um ca. die Hälfte reduziert. Dies bestätigt die Annahme, daß die Gendosis von Sox9 für die späte Knorpelzelldifferenzierung von entscheidender Bedeutung ist (Bi et al., 2001). Übereinstimmend damit wiesen auch Kampomelie-Patienten und Sox9^{+/-}-Knockout-Mäuse hypoplastische Knorpel-elemente auf (Houston et al., 1983; Bi et al., 2001; Kist et al., 2002).

In den Wachstumsfugen langer Röhrenknochen wird Sox9 in proliferierenden, prähypertrophen, jedoch nicht in hypertrophen Chondrozyten exprimiert (Zhao et al., 1997; Bi et al., 2001). Deshalb wurde angenommen, daß Sox9 die Differenzierung von prähypertrophen in hypertrophe Chondrozyten inhibiert. Tatsächlich fand in den Wachstumsfugen transgener Mäuse, in denen Sox9 überexprimiert wurde, eine verzögerte Differenzierung in hypertrophe Knorpelzellen statt (Akiyama et al., 2002). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß die Halbierung der Sox9-Gendosis die Bildung hypertropher Zellen *in vitro* fördert. So exprimierten differenzierende Sox9^{+/-}-EBs *Kollagen X* als Marker hypertropher Chondrozyten etwa gleich stark wie entsprechende Wildtyp-EBs, obwohl die Anzahl an Knorpelzellnodules in Sox9^{+/-}-EBs um ca. die Hälfte reduziert war, wobei Sox9^{+/-}-Nodules eine ähnliche Größe wie Wildtypnodules aufwiesen. Allerdings enthielten Sox9^{+/-}-Nodules mehr *Kollagen X*-exprimierende Zellen, und diese Zellen exprimierten *Kollagen X* stärker als entsprechende hypertrophe Chondrozyten in Wildtypnodules. Auch *in vivo* wurde dieser Gendosis-Effekt von Sox9 beschrieben. In heterozygoten Sox9-Knockout-Mäusen differenzierten Sox9^{+/-}-Zellen vermehrt und beschleunigt in hypertrophe Knorpelzellen, so daß die Zone der hypertrophen Chondrozyten in den langen Röhrenknochen dieser Mäuse verbreitert war (Bi et al., 2001).

In Sox9^{-/-}-EBs wurde *Kollagen X* dagegen kaum noch exprimiert. Außerdem zeigten die *Kollagen X*-exprimierenden Zellen nicht die Morphologie typischer hypertropher Chondrozyten. Da in Sox9^{-/-}-EBs bereits die Differenzierung in prähypertrophe Chondrozyten blockiert war, konnte es nicht zur Bildung hypertropher Knorpelzellen kommen. In konditionellen Sox9-Knockout-Mäusen dagegen, in denen das Sox9-Gen nach Ausbildung mesenchymaler Knorpelvorläuferkondensationen inaktiviert worden war, konnten *Kollagen X*-exprimierende, hypertrophe Knorpelzellen in hoher Anzahl in

skelettalen Elementen nachgewiesen werden (Akiyama et al., 2002). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Inaktivierung des Sox9-Gens in einigen Fällen erst in prähypertrophen Chondrozyten erfolgte und dann zu einer beschleunigten Differenzierung in hypertrophe Knorpelzellen führte (Akiyama et al., 2002).

5.5 Die Blockade der Knorpelzellendifferenzierung in Sox9-defizienten EBs kann durch Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie nicht aufgehoben werden

Ein Ziel dieser Arbeit war, zu prüfen, ob der Block der Knorpelzellendifferenzierung in Sox9^{-/-}-EBs durch Zugabe von Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie kompensiert werden kann. Deshalb wurden Sox9^{-/-}-EBs mit BMP-2, TGF- β_1 und TGF- β_3 stimuliert, wobei die Stimulation in einem Kultivierungszeitraum stattfand (2d-5d), in dem die mesodermale, insbesondere die chondrogene Differenzierung embryonaler Stammzellen beeinflußt werden kann (Rohwedel et al., 1994; Rohwedel et al., 1999; Kramer et al., 2000).

Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie können sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Knorpelzellendifferenzierung induzieren. Beispielsweise stimulierte BMP-2 die Differenzierung embryonaler Stammzellen in Knorpelzellnodules (Kramer et al., 2000) und induzierte *in vivo* ektopisch die Bildung von Knorpelgewebe (Kubler et al., 1998). Auch die Kollagen II-Expression konnte sowohl *in vitro* in differenzierenden mesenchymalen Zellen der Linie C3H10T1/2 als auch *in vivo* in Extremitäten der Maus durch BMP-2 stimuliert werden (Zehentner et al., 2002). In Stimulationsversuchen mit Ratten zeigte sich, daß nach Unterspritzung von TGF- β -Faktoren unter das Periost die Bildung von Knorpel- und Knochengewebe induziert werden konnte (Joyce et al., 1990). Weiterhin stimulierte TGF- β_1 die Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen in Chondrozyten und führte zu einer vermehrten Expression knorpelassoziierter Gene in chondrogenen Zellen (Luyten et al., 1994; Qi und Scully, 1998; Tuli et al., 2003). Schließlich wurde gezeigt, daß mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark nach Inkubation mit TGF- β_3 verstärkt in Knorpelzellen differenzierten (Barry et al., 2001).

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, konnte weder BMP-2 noch TGF- β_1 oder TGF- β_3 die Bildung von Knorpelzellnodules in Sox9^{-/-}-EBs induzieren, während in Kontrollversuchen mit Wildtyp-EBs zu späteren Zeitpunkten der Differenzierung eine erhöhte Anzahl an Nodules nach BMP-2-Stimulation gefunden wurde. Dies deutet darauf hin, daß BMP-2, TGF- β_1 und TGF- β_3 nicht der Regulation von Sox9 unterliegen. Es ist im Gegenteil

denkbar, daß BMP-2, TGF- β_1 und TGF- β_3 an der Regulation von Sox9 beteiligt sind. Tatsächlich wurde *in vivo* und *in vitro* beschrieben, daß die Applikation von BMP-2 eine erhöhte Expression von Sox9 zur Folge hatte (Healy et al., 1999; Zehentner et al., 1999; Zehentner et al., 2002). Weiterhin reguliert Sox9 in direkter Abhängigkeit von BMP-Signalen die Expression des Transkriptionsfaktors Nkx3.2, der an der Steuerung der Knorpelzeldifferenzierung in den Somiten beteiligt ist (Murtaugh et al., 2001; Zeng et al., 2002).

5.6 Erste Hinweise auf eine Rolle von Sox9 während der kardiogenen und neuronalen Differenzierung

Das Krankheitsbild der Kampomelie umfasst nicht nur Fehlbildungen, die das Skelettsystem betreffen, sondern auch solche, die sich in anderen Organsystemen manifestieren (Houston et al., 1983; Wagner et al., 1994; Mansour et al., 1995). Beispielsweise weisen ca. 1/3 aller Neugeborenen mit Kampomelie Herzfehlbildungen wie Ventrikelseptumdefekt, Vorhofseptumdefekt oder eine Fallot'sche Tetralogie auf. Um erste Hinweise zu erhalten, ob der Sox9-Gendefekt einen Einfluß auf die kardiogene Differenzierung zeigt, wurde in Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs die Anzahl kontrahierender Bereiche von Herzmuskelzellen bestimmt. Es ergaben sich Hinweise, daß Sox9^{-/-}-ES-Zellen im Vergleich zum Wildtyp früher in Kardiomyozyten differenzierten und daß sowohl in Sox9^{+/-}- als auch in Sox9^{-/-}-EBs mehr Herzmuskelzellen differenzierten. Demnach könnte Sox9 einen inhibierenden Effekt auf die Herzmuskelzeldifferenzierung haben.

Neben Herzfehlbildungen wurden bei vielen Kampomelie-Patienten auch Fehlentwicklungen des zentralen Nervensystems gefunden, die mit mentaler Retardierung einhergehen (Houston et al., 1983; Wagner et al., 1994; Mansour et al., 1995). Da Sox9 in Mausembryonen in neuronalen Stammzellen von Gehirn und Rückenmark exprimiert wird (Wright et al., 1995; Stolt et al., 2003), wurde in dieser Arbeit ein erster Test für den Einfluß des Sox9-Defektes auf die neuronale Differenzierung durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß sowohl in Wildtyp- als auch in Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs Zellen mit typischer neuronaler Morphologie vorhanden waren, die zuvor auch in differenzierten EBs der ES-Zell-Linie D3 beschrieben wurden (Rohwedel et al., 1998a). Auch in Studien mit konditionellen Sox9-Knockout-Mäusen, in denen beide Sox9-Allele in frühen neuroepithelialen Zellen ausgeschaltet worden waren, wurde beschrieben, daß die Differenzierung von Sox9-defizienten Zellen in Inter- und Motoneurone nicht gestört war

(Stolt et al., 2003). Diese Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, daß auch hierbei der Verlust von Sox9 durch andere SOX-Proteine wie Sox1-4, Sox11 und Sox22 kompensiert werden kann, da für diese Faktoren eine überlappende Funktion im Rahmen der Nervenzelldifferenzierung beschrieben wurde (für Review siehe Wegner, 1999).

5.7 Stammzellen in der Medizin – ein Ausblick

Ein großes Problem für die Transplantationsmedizin stellt der permanente Mangel an transplantierbaren Geweben und Organen dar, so daß seit längerem nach Alternativen für den Gewebeersatz gesucht wird. Möglicherweise bieten embryonale Stammzellen in diesem Zusammenhang eine geeignete Quelle. Denn ES-Zellen zeichnen sich durch die Möglichkeit zur Selbsterneuerung aus und besitzen die Fähigkeit, in verschiedene Zelltypen zu differenzieren. So wurde beispielsweise für murine und humane ES-Zellen beschrieben, daß sie in Kardiomyozyten, Endothelzellen und Nervenzellen differenzieren können (Itskovitz-Eldor et al., 2000; Reubinoff et al., 2000; Carpenter et al., 2003). Allerdings liegen bei der *in vitro*-Differenzierung von embryonalen Stammzellen verschiedene Zelltypen nebeneinander vor, so daß keineswegs eine reine Population eines Zelltyps zur Transplantation zur Verfügung steht. Weiterhin befinden sich in EBs auch noch undifferenzierte Stammzellen, die nach Transfer in Empfängerorganismen Teratome ausbilden können. Dies zeigt deutlich, daß die Verwendung von embryonalen Stammzellen zu Transplantationszwecken mit Problemen behaftet ist.

Verschiedene Techniken wurden angewandt, um reine Populationen von Zelltypen herzustellen, die aus ES-Zellen differenziert worden sind. So differenzierten beispielsweise murine ES-Zellen durch *in vitro*-Stimulierung mit Retinsäure und Sonic Hedgehog bevorzugt in Motoneurone, die nach Transplantation im adulten Rückenmark integrierten und dort funktionelle Aufgaben übernahmen (Wichterle et al., 2002). Auch durch die genetische Manipulation von ES-Zellen kann erreicht werden, daß diese Zellen bevorzugt in einen bestimmten Zelltyp differenzieren. So wurden beispielsweise Kardiomyozyten mit Hilfe dieses Ansatzes aus differenzierenden EBs isoliert (Klug et al., 1996).

Eine weitere Alternative zur Herstellung eines Gewebeersatzes könnte die Verwendung adulter Stammzellen bieten. Adulte Stammzellen finden sich in differenzierten Geweben und Organen wie Gehirn, Leber, Haut oder Knochenmark und sorgen für die Bereitstellung von gewebs- bzw. organspezifischen Zellen. Ein großer Vorteil bei der Verwendung dieser Zellen zu Transplantationszwecken besteht darin, daß diese Zellen nach Isolation aus einem Organismus ebenfalls in verschiedene Zelltypen wie beispielsweise in Knorpel- und

Fettzellen (Pittenger et al., 1999), Nervenzellen (Woodbury et al., 2000) und Herzzellen (Orlic et al., 2001) differenzieren können und nach Rückführung in denselben Organismus keine Immunreaktionen hervorrufen.

Eine Möglichkeit, auch mit embryonalen Stammzellen autolog zu arbeiten, stellt das sogenannte therapeutische Klonieren dar (Colman und Kind, 2000). Dabei werden Zellen aus einem Organismus isoliert und deren Zellkerne in entkernte Eizellen injiziert. Diese Eizellen entwickeln sich in Blastozysten, aus denen ES-Zellen mit pluripotenter Differenzierungsfähigkeit gewonnen werden können (Wakayama et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, daß im Mausmodell durch die Kombination von therapeutischem Klonieren, Gen- und Zelltherapie eine genetische Erkrankung mit embryonalen Stammzellen behandelt werden konnte (Rideout, et al., 2002). Dazu wurden $Rag2^{-/-}$ -Knockout-Mäusen, die an einer schweren kombinierten Immundefizienz litten, $Rag2^{-/-}$ -Fibroblasten entnommen. Deren Zellkerne wurden anschließend in enukleierte Eizellen injiziert. Aus den sich entwickelnden $Rag2^{-/-}$ -Blastozysten wurden anschließend autologe ES-Zellen isoliert, in die dann über homologe Rekombination ein Wildtyp- $Rag2$ -Gen eingeschleust wurde. Nach Kultivierung via EBs wurden diese Zellen mit einem Retrovirus transfiziert, über das ein $HoxB4$ -Gen eingeschleust wurde, um die Stammzellen bevorzugt in hämatopoetische Zellen zu differenzieren. Die hämatopoetischen Zellen nahmen nach Transplantation in bestrahlte $Rag2^{-/-}$ -Knockout-Mäuse schließlich an der Bildung von B- und T-Lymphozyten teil, so daß diese Tiere überlebten.

Möglicherweise lassen sich auch in Zukunft genetische Erkrankungen mit Hilfe von adulten Stammzellen behandeln. Erste Hinweise darauf gaben Versuche mit alpha-Sarcoglycan (α -SG) $^{-/-}$ -Knockout-Mäusen, die an einer Form der Muskeldystrophie leiden (Sampaolesi et al., 2003). Dazu wurden Mesangioblasten, also adulte hämatopoetische Stammzellen, aus α -SG $^{-/-}$ -Knockout-Mäusen isoliert und *in vitro* mit lentiviralen Vektoren transfiziert, die das Wildtyp- α -SG-Gen enthielten. Nach Rücktransfer in die α -SG $^{-/-}$ -Knockout-Mäuse integrierten diese genetisch veränderten Mesangioblasten im Muskelgewebe und führten in diesen Mäusen zum Aufbau von gesundem Muskelgewebe. Es bleibt offen, ob in Zukunft möglicherweise auch chondrodysplastische Erkrankungen unter Verwendung genetisch veränderter adulter oder embryonaler Stammzellen behandelt werden können. Zumindest läßt aber das Potential dieser Zellen auf einen zukünftigen Platz in der Medizin hoffen.

6. Zusammenfassung

Während die Morphologie der Entwicklung von Knorpelgewebe recht gut untersucht ist, gibt es bisher nur wenig Informationen zur molekularen Regulation der Knorpelzellendifferenzierung durch entsprechende Transkriptionsfaktoren. Deshalb sollte in dieser Arbeit die Rolle des Transkriptionsfaktors Sox9 während der chondrogenen Zelldifferenzierung näher charakterisiert werden. Dazu wurden sowohl embryonale Wildtypstammzellen als auch heterozygot bzw. homozygot Sox9-defiziente embryonale Stammzellen via "Embryoid Bodies" differenziert.

Es wurde gezeigt, daß sowohl Wildtyp- als auch Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-ES-Zellen in mesenchymale Chondroprogenitorzellen differenzierten, die Kondensationen bildeten und für dieses Stadium charakteristische Marker wie *Scleraxis*, *Sox5*, *Sox6*, N-Cadherin, N-CAM, Rezeptoren für PNA und später auch Kollagen II und *Aggrecan* exprimierten. Der Vergleich mit Sox9-Knockout-Studien *in vivo* zeigt, daß die Fähigkeit von Sox9^{+/-}-Zellen zur Bildung mesenchymaler Knorpelvorläuferkondensationen nicht zelleigen bzw. nicht zellautonom, sondern vielmehr abhängig von ihrer zellulären Umgebung ist. Ferner konnte mittels RT-PCR dargestellt werden, daß sich größtenteils die Expression der Knorpelgene *Scleraxis*, Kollagen IIa, Kollagen IIb und *Aggrecan* in Wildtyp und Sox9-defizienten EBs nicht signifikant unterschied, obwohl die Kollagen IIa-Expression in Sox9^{-/-}-EBs zu einigen Zeitpunkten vermindert war. Diese Ergebnisse zeigten, daß Sox9 im Gegensatz zu bisherigen Annahmen nicht als alleiniger Hauptregulator des Kollagen II- und *Aggrecan*-Gens angesehen werden kann, sondern daß andere Transkriptionsfaktoren neben Sox9 an der Regulation dieser Gene beteiligt sein müssen.

Während die frühe Knorpelzellendifferenzierung in Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-EBs nicht gestört war, hatte der Sox9-Verlust einen Block der späten Knorpelzellendifferenzierung zur Folge. Wie in dieser Arbeit dargestellt wurde, differenzierten sowohl Wildtyp- als auch Sox9^{+/-}-ES-Zellen in prähypertrophe und hypertrophe, *KollagenX*-exprimierende Chondrozyten, die sich zu Alcianblau- und Kollagen II-positiven Knorpelzellnodules formierten. Demgegenüber wurden in Sox9^{-/-}-EBs keine derartigen Knorpelzellnodules nachgewiesen, so daß in diesen EBs auf einen Differenzierungsblock noch vor Ausbildung prähypertropher und hypertropher Chondrozyten geschlossen werden konnte. Auch nach Applikation von Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie wie BMP-2, TGF- β_1 und TGF- β_3 konnte die Nodulebildung in Sox9^{-/-}-EBs nicht induziert werden. Da in Sox9^{+/-}-EBs die Anzahl an Knorpelzellnodules auf ca. die Hälfte reduziert war, obwohl die *Kollagen X*-

Expression dem Wildtyplevel entsprach, wurde einerseits deutlich, daß die Ausbildung reifer Knorpelstrukturen von der Gendosis von Sox9 abhängig ist. Andererseits bestätigten diese Ergebnisse, daß Sox9 die Differenzierung prähypertropher in hypertrophe Chondrozyten inhibiert.

Schließlich gab es erste Hinweise darauf, daß die neuronale Differenzierung durch Funktionsverlust von Sox9 nicht beeinträchtigt war. Demgegenüber setzte die kardiogene Zelldifferenzierung nach Sox9-Funktionsverlust verfrüht ein, weshalb auf einen inhibierenden Effekt von Sox9 auf die Herzmuskelzelldifferenzierung geschlossen werden konnte.

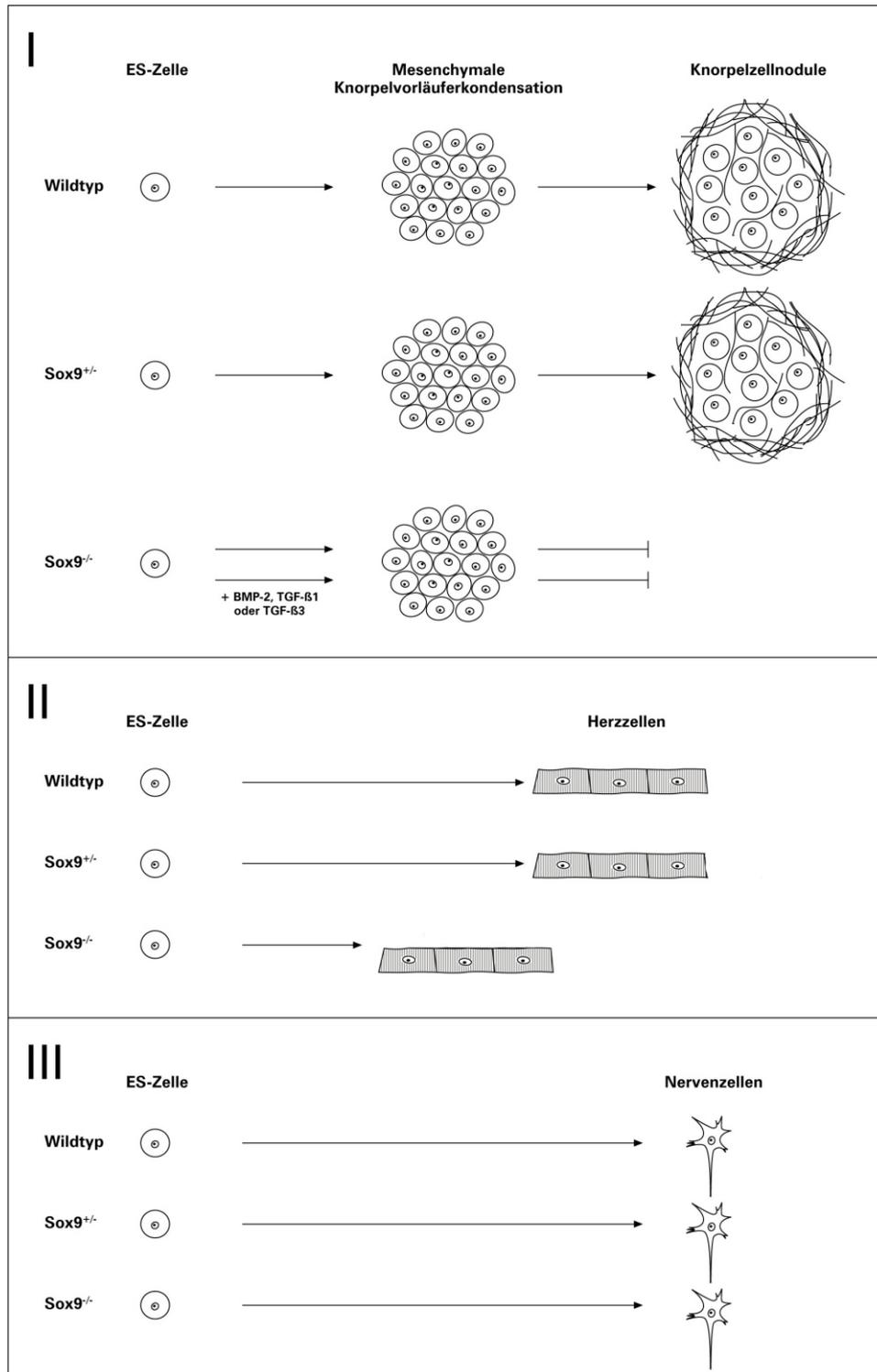


Abbildung 32: Zusammenfassende, schematische Darstellung der Differenzierungsfähigkeit von Wildtyp-, Sox9^{+/-}- und Sox9^{-/-}-ES-Zellen in chondrogene (I), kardiogene (II) und neuronale (III) Zellen

Literaturverzeichnis

1. Adams J.C.Watt F.M. 1993. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 117:1183-1198.
2. Ahrens M., Ankenbauer T., Schroder D., Hollnagel A., Mayer H., Gross G. 1993. Expression of human bone morphogenetic proteins-2 or -4 in murine mesenchymal progenitor C3H10T1/2 cells induces differentiation into distinct mesenchymal cell lineages. *DNA Cell Biol.* 12:871-880.
3. Aigner T., Gebhard P.M., Schmid E., Bau B., Harley V., Poschl E. 2003. SOX9 expression does not correlate with type II collagen expression in adult articular chondrocytes. *Matrix Biol.* 22:363-372.
4. Akiyama H., Chaboissier M.C., Martin J.F., Schedl A., de Crombrughe B. 2002. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* 16:2813-2828.
5. Arsenian S., Weinhold B., Oelgeschlager M., Ruther U., Nordheim A. 1998. Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *EMBO J.* 17:6289-6299.
6. Aulthouse A.L.Solursh M. 1987. The detection of a precartilag, blastema-specific marker. *Dev. Biol.* 120:377-384.
7. Bagnall K.M.Sanders E.J. 1989. The binding pattern of peanut lectin associated with sclerotome migration and the formation of the vertebral axis in the chick embryo. *Anat. Embryol. (Berl)* 180:505-513.
8. Bagutti C., Wobus A.M., Fässler R., Watt F.M. 1996. Differentiation of embryonal stem cells into keratinocytes: comparison of wild-type and beta 1 integrin-deficient cells. *Dev. Biol.* 179:184-196.
9. Bain G., Kitchens D., Yao M., Hüttner J.E., Gottlieb D.I. 1995. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro *Dev. Biol.* 168:342-357
10. Barry F., Boynton R.E., Liu B., Murphy J.M. 2001. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp. Cell Res.* 268:189-200.
11. Bell D.M., Leung K.K., Wheatley S.C., Ng L.J., Zhou S., Ling K.W., Sham M.H., Koopman P., Tam P.P., Cheah K.S. 1997. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat. Genet.* 16:174-178.

12. Betz U.A., Vosshenrich C.A., Rajewsky K., Muller W. 1996. Bypass of lethality with mosaic mice generated by Cre-loxP-mediated recombination. *Curr. Biol.* 6:1307-1316.
13. Bi W., Deng J.M., Zhang Z., Behringer R.R., de Crombrughe B. 1999. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat. Genet.* 22:85-89.
14. Bi W., Huang W., Whitworth D.J., Deng J.M., Zhang Z., Behringer R.R., de Crombrughe B. 2001. Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:6698-6703.
15. Boulikas T. 1995. Phosphorylation of transcription factors and control of the cell cycle. *Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 5:1-77.
16. Bowles J., Schepers G., Koopman P. 2000. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev. Biol.* 227:239-255.
17. Bradley A., Evans M., Kaufman M.H., Robertson E. 1984. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309:255-256.
18. Brand-Saberi B., Ebensperger C., Wilting J., Balling R., Christ B. 1993. The ventralizing effect of the notochord on somite differentiation in chick embryos. *Anat. Embryol. (Berl)* 188:239-245.
19. Brent A.E., Schweitzer R., Tabin C.J. 2003. A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell* 113:235-248.
20. Bridgewater L.C., Lefebvre V., de Crombrughe B. 1998. Chondrocyte-specific enhancer elements in the Col11a2 gene resemble the Col2a1 tissue-specific enhancer. *J. Biol. Chem.* 273:14998-15006.
21. Brown D., Wagner D., Li X., Richardson J.A., Olson E.N. 1999. Dual role of the basic helix-loop-helix transcription factor scleraxis in mesoderm formation and chondrogenesis during mouse embryogenesis. *Development* 126:4317-4329.
22. Brüstle O., Jones K.N., Learish R.D., Karam K., Choudhary K., Wiestler O.D., Duncan I.D., McKay R.D. 1999. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 285(5428):754-6
23. Cancedda D.F., Gentili C., Manduca P., Cancedda R. 1992. Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation in culture. *J. Cell Biol.* 117:427-435
24. Carpenter M.K., Rosler E., Rao M.S. 2003. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 5:79-88.

25. Chuong C.M., Widelitz R.B., Jiang T.X., Abbott U.K., Lee Y.S., Chen H.M. 1993. Roles of adhesion molecules NCAM and tenascin in limb skeletogenesis: analysis with antibody perturbation, exogenous gene expression, talpid mutants and activin stimulation. *Prog. Clin. Biol. Res.* 383B:465-474.
26. Coelho C.N., Kosher R.A. 1991. Gap junctional communication during limb cartilage differentiation. *Dev. Biol.* 144:47-53.
27. Colman A., Kind A. 2000. Therapeutic cloning: concepts and practicalities. *Trends Biotechnol.* 18:192-196.
28. Connor F., Cary P.D., Read C.M., Preston N.S., Driscoll P.C., Denny P., Crane-Robinson C., Ashworth A. 1994. DNA binding and bending properties of the post-meiotically expressed Sry-related protein Sox-5. *Nucleic Acids Res.* 22:3339-3346.
29. Cserjesi P., Brown D., Ligon K.L., Lyons G.E., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Olson E.N. 1995. Scleraxis: a basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. *Development* 121:1099-1110.
30. Dani C., Smith A.G., Dessolin S., Leroy P., Staccini L., Villageois P., Darimont C., Ailhaud G. 1997. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 11):1279-1285.
31. de Crombrughe B., Lefebvre V., Behringer R.R., Bi W., Murakami S., Huang W. 2000. Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biol.* 19:389-394.
32. De Santa B.P., Bonneaud N., Boizet B., Desclozeaux M., Moniot B., Südbek P., Scherer G., Poulat F., Berta P. 1998. Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol. Cell Biol.* 18:6653-6665.
33. DeLise A.M., Fischer L., Tuan R.S. 2000. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis. Cartilage.* 8:309-334.
34. Desclozeaux M., Poulat F., De Santa B.P., Capony J.P., Turowski P., Jay P., Mejean C., Moniot B., Boizet B., Berta P. 1998. Phosphorylation of an N-terminal motif enhances DNA-binding activity of the human SRY protein. *J. Biol. Chem.* 273:7988-7995.
35. Deutsch U., Dressler G.R., Gruss P. 1988. Pax 1, a member of a paired box homologous murine gene family, is expressed in segmented structures during development. *Cell* 53:617-625.

36. Dhordain P., Dewitte F., Desbiens X., Stehelin D., Duterque-Coquillaud M. 1995. Mesodermal expression of the chicken *erg* gene associated with precartilaginous condensation and cartilage differentiation. *Mech. Dev.* 50:17-28.
37. Eistetter H.R. 1989. Pluripotent embryonal stem cell lines can be established from disaggregated mouse morulae. *Dev. Growth Diff.* 31:275-282
38. Elima K., Eerola I., Rosati R., Metsäranta M., Garofalo S., Perala M., de Crombrugge B., Vuorio E. 1993. The mouse collagen X gene: complete nucleotide sequence, exon structure and expression pattern. *Biochem. J.* 289 (Pt 1):247-253.
39. Enomoto-Iwamoto M., Nakamura T., Aikawa T., Higuchi Y., Yuasa T., Yamaguchi A., Nohno T., Noji S., Matsuya T., Kurisu K., Koyama E., Pacifici M., Iwamoto M. 2000. Hedgehog proteins stimulate chondrogenic cell differentiation and cartilage formation. *J. Bone Miner. Res.* 15:1659-1668.
40. Erlebacher A., Filvaroff E.H., Gitelman S.E., Derynck R. 1995. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* 80:371-378.
41. Evans M.J.Kaufman M.H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.
42. Fan C.M.Tessier-Lavigne M. 1994. Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. *Cell* 79:1175-1186.
43. Fässler R., Martin K., Forsberg E., Litzemberger T., Iglesias A. 1995. Knockout mice: how to make them and why. The immunological approach. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 106:323-334.
44. Fässler R.Meyer M. 1995. Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev.* 9:1896-1908.
45. Fässler R., Rohwedel J., Maltsev V., Bloch W., Lentini S., Guan K., Gullberg D., Hescheler J., Addicks K., Wobus A.M. 1996. Differentiation and integrity of cardiac muscle cells are impaired in the absence of beta 1 integrin. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 13):2989-2999.
46. Foster J.W., Dominguez-Steglich M.A., Guioli S., Kowk G., Weller P.A., Stevanovic M., Weissenbach J., Mansour S., Young I.D., Goodfellow P.N., . 1994. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372:525-530.

47. Fraichard A., Chassande O., Bilbaut G., Dehay C., Savatier P., Samarut J. 1995. In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 10):3181-3188.

48. Galera P., Park R.W., Ducey P., Mattei M.G., Karsenty G. 1996. c-Krox binds to several sites in the promoter of both mouse type I collagen genes. Structure/function study and developmental expression analysis. *J. Biol. Chem.* 271:21331-21339.

49. Ganan Y., Macias D., Duterque-Coquillaud M., Ros M.A., Hurle J.M. 1996. Role of TGF beta s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development* 122:2349-2357.

50. George E.L., Georges-Labouesse E.N., Patel-King R.S., Rayburn H., Hynes R.O. 1993. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 119:1079-1091.

51. Glumoff V., Savontaus M., Vehanen J., Vuorio E. 1994. Analysis of aggrecan and tenascin gene expression in mouse skeletal tissues by northern and in situ hybridization using species specific cDNA probes. *Biochim. Biophys. Acta* 1219:613-622.

52. Gotz W., Fischer G., Herken R. 1991. Lectin binding pattern in the embryonal and early fetal human vertebral column. *Anat. Embryol. (Berl)* 184:345-353.

53. Gu H., Marth J.D., Orban P.C., Mossmann H., Rajewsky K. 1994. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265:103-106.

54. Guan K., Rohwedel J., Wobus A.M. 1999. Embryonic differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation *in vitro Cytotechnology* 30:211-226

55. Gurdon J.B., Mohun T.J., Sharpe C.R., Taylor M.V. 1989. Embryonic induction and muscle gene activation. *Trends Genet.* 5:51-56.

56. Hall B.K., Miyake T. 1992. The membranous skeleton: the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis. *Anat. Embryol. (Berl)* 186:107-124.

57. Harley V.R., Clarkson M.J., Argentaro A. 2003. The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9]. *Endocr. Rev.* 24:466-487.

58. Healy C., Uwanogho D., Sharpe P.T. 1999. Regulation and role of Sox9 in cartilage formation. *Dev. Dyn.* 215:69-78.
59. Hedbom E., Antonsson P., Hjerpe A., Aeschlimann D., Paulsson M., Rosa-Pimentel E., Sommarin Y., Wendel M., Oldberg A., Heinegard D. 1992. Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *J. Biol. Chem.* 267:6132-6136.
60. Hegert C., Kramer J., Hargus G., Müller J., Guan K., Wobus A.M., Müller P.K., Rohwedel J. 2002. Differentiation plasticity of chondrocytes derived from mouse embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* 115:4617-4628.
61. Houston C.S., Opitz J.M., Spranger J.W., Macpherson R.I., Reed M.H., Gilbert E.F., Herrmann J., Schinzel A. 1983. The campomelic syndrome: review, report of 17 cases, and follow-up on the currently 17-year-old boy first reported by Maroteaux et al in 1971. *Am. J. Med. Genet.* 15:3-28.
62. Huang W., Chung U.I., Kronenberg H.M., de Crombrughe B. 2001. The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signaling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:160-165.
63. Huang W., Zhou X., Lefebvre V., de Crombrughe B. 2000. Phosphorylation of SOX9 by cyclic AMP-dependent protein kinase A enhances SOX9's ability to transactivate a Col2a1 chondrocyte-specific enhancer. *Mol. Cell Biol.* 20:4149-4158.
64. Hynes R.O., Lander A.D. 1992. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell* 68:303-322.
65. Inuzuka H., Redies C., Takeichi M. 1991. Differential expression of R- and N-cadherin in neural and mesodermal tissues during early chicken development. *Development* 113:959-967.
66. Itskovitz-Eldor J., Schuldiner M., Karsenti D., Eden A., Yanuka O., Amit M., Soreq H., Benvenisty N. 2000. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.* 6:88-95.
67. Johnstone B., Hering T.M., Caplan A.I., Goldberg V.M., Yoo J.U. 1998. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp. Cell Res.* 238:265-272.
68. Joyce M.E., Roberts A.B., Sporn M.B., Bolander M.E. 1990. Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J. Cell Biol.* 110:2195-2207.

69. Kelley R.O., Fallon J.F. 1978. Identification and distribution of gap junctions in the mesoderm of the developing chick limb bud. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 46:99-110.
70. Khyse-Anderson J. 1984. *Biophys. Biochem. Methods* 10:203-209
71. Kilby N.J., Snaith M.R., Murray J.A. 1993. Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet.* 9:413-421.
72. Kist R., Schrewe H., Balling R., Scherer G. 2002. Conditional inactivation of Sox9: a mouse model for campomelic dysplasia. *Genesis.* 32:121-123.
73. Klug M.G., Soonpaa M.H., Koh G.Y., Field L.J. 1996. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J. Clin. Invest* 98:216-224.
74. Koob T.J., Clark P.E., Hernandez D.J., Thurmond F.A., Vogel K.G. 1992. Compression loading in vitro regulates proteoglycan synthesis by tendon fibrocartilage. *Arch. Biochem. Biophys.* 298:303-312.
75. Kosher R.A., Kulyk W.M., Gay S.W. 1986. Collagen gene expression during limb cartilage differentiation. *J. Cell Biol.* 102:1151-1156.
76. Kramer J., Hegert C., Guan K., Wobus A.M., Muller P.K., Rohwedel J. 2000. Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mech. Dev.* 92:193-205.
77. Krumlauf R. 1993. Mouse Hox genetic functions. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:621-625.
78. Krumlauf R. 1994. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78:191-201.
79. Kubler N.R., Reuther J.F., Faller G., Kirchner T., Ruppert R., Sebald W. 1998. Inductive properties of recombinant human BMP-2 produced in a bacterial expression system. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 27:305-309.
80. Kuhn R., Rajewsky K., Muller W. 1991. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* 254:707-710.
81. Kulyk W.M., Rodgers B.J., Greer K., Kosher R.A. 1989. Promotion of embryonic chick limb cartilage differentiation by transforming growth factor-beta. *Dev. Biol.* 135:424-430.
82. Kwok C., Weller P.A., Guioli S., Foster J.W., Mansour S., Zuffardi O., Punnett H.H., Dominguez-Steglich M.A., Brook J.D., Young I.D., . 1995. Mutations in

- SOX9, the gene responsible for Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal. *Am. J. Hum. Genet.* 57:1028-1036.
83. Kypriotou M., Fossard-Demoor M., Chadjichristos C., Ghayor C., de Crombrugge B., Pujol J.P., Galera P. 2003. SOX9 exerts a bifunctional effect on type II collagen gene (COL2A1) expression in chondrocytes depending on the differentiation state. *DNA Cell Biol.* 22:119-129.
 84. Lefebvre V., Huang W., Harley V.R., Goodfellow P.N., de Crombrugge B. 1997. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol. Cell Biol.* 17:2336-2346.
 85. Lefebvre V., Li P., de Crombrugge B. 1998. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J.* 17:5718-5733.
 86. Lefebvre V., Zhou G., Mukhopadhyay K., Smith C.N., Zhang Z., Eberspaecher H., Zhou X., Sinha S., Maity S.N., de Crombrugge B. 1996. An 18-base-pair sequence in the mouse proalpha1(II) collagen gene is sufficient for expression in cartilage and binds nuclear proteins that are selectively expressed in chondrocytes. *Mol. Cell Biol.* 16:4512-4523.
 87. Leonard C.M., Fuld H.M., Frenz D.A., Downie S.A., Massague J., Newman S.A. 1991. Role of transforming growth factor-beta in chondrogenic pattern formation in the embryonic limb: stimulation of mesenchymal condensation and fibronectin gene expression by exogenous TGF-beta and evidence for endogenous TGF-beta-like activity. *Dev. Biol.* 145:99-109.
 88. Li E., Bestor T.H., Jaenisch R. 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69:915-926.
 89. Linda J., Sandell und Pablo Adler 1999. Developmental Patterns of Cartilage. *Frontiers in Bioscience* 4:731-742
 90. Liu Y., Li H., Tanaka K., Tsumaki N., Yamada Y. 2000. Identification of an enhancer sequence within the first intron required for cartilage-specific transcription of the alpha2(XI) collagen gene. *J. Biol. Chem.* 275:12712-12718.
 91. Liu Y., Watanabe H., Nifuji A., Yamada Y., Olson E.N., Noda M. 1997. Overexpression of a single helix-loop-helix-type transcription factor, scleraxis, enhances aggrecan gene expression in osteoblastic osteosarcoma ROS17/2.8 cells. *J. Biol. Chem.* 272:29880-29885.
 92. Luyten F.P., Chen P., Paralkar V., Reddi A.H. 1994. Recombinant bone morphogenetic protein-4, transforming growth factor-beta 1, and activin A

- enhance the cartilage phenotype of articular chondrocytes in vitro. *Exp. Cell Res.* 210:224-229.
93. Maltsev V.A., Rohwedel J., Hescheler J., Wobus A.M. 1993. Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech. Dev.* 44:41-50.
94. Maltsev V.A., Wobus A.M., Rohwedel J., Bader M., Hescheler J. 1994. Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ. Res.* 75:233-244.
95. Mansour S., Hall C.M., Pembrey M.E., Young I.D. 1995. A clinical and genetic study of campomelic dysplasia. *J. Med. Genet.* 32:415-420.
96. Marin M., Karis A., Visser P., Grosveld F., Philipsen S. 1997. Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell* 89:619-628.
97. Maroulakou I.G., Papas T.S., Green J.E. 1994. Differential expression of ets-1 and ets-2 proto-oncogenes during murine embryogenesis. *Oncogene* 9:1551-1565.
98. Martin G.R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 78:7634-7638.
99. McDowall S., Argentaro A., Ranganathan S., Weller P., Mertin S., Mansour S., Tolmie J., Harley V. 1999. Functional and structural studies of wild type SOX9 and mutations causing campomelic dysplasia. *J. Biol. Chem.* 274:24023-24030.
100. Metsäranta M., Toman D., de Crombrughe B., Vuorio E. 1991. Mouse type II collagen gene. Complete nucleotide sequence, exon structure, and alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 266:16862-16869.
101. Meyer J., Südbeck P., Held M., Wagner T., Schmitz M.L., Bricarelli F.D., Eggermont E., Friedrich U., Haas O.A., Kobelt A., Leroy J.G., Van Maldergem L., Michel E., Mitulla B., Pfeiffer R.A., Schinzel A., Schmidt H., Scherer G. 1997. Mutational analysis of the SOX9 gene in campomelic dysplasia and autosomal sex reversal: lack of genotype/phenotype correlations. *Hum. Mol. Genet.* 6:91-98.
102. Milaire J. 1991. Lectin binding sites in developing mouse limb buds. *Anat. Embryol. (Berl)* 184:479-488.

103. Mitchell P.J., Tjian R. 1989. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245:371-378.
104. Moftah M.Z., Downie S.A., Bronstein N.B., Mezentseva N., Pu J., Maher P.A., Newman S.A. 2002. Ectodermal FGFs induce perinodular inhibition of limb chondrogenesis in vitro and in vivo via FGF receptor 2. *Dev. Biol.* 249:270-282.
105. Morgan B.A., Tabin C. 1994. Hox genes and growth: early and late roles in limb bud morphogenesis. *Dev. Suppl* 181-186.
106. Muir H. 1995. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *Bioessays* 17:1039-1048.
107. Mukhopadhyay K., Lefebvre V., Zhou G., Garofalo S., Kimura J.H., de Crombrughe B. 1995. Use of a new rat chondrosarcoma cell line to delineate a 119-base pair chondrocyte-specific enhancer element and to define active promoter segments in the mouse pro-alpha 1(II) collagen gene. *J. Biol. Chem.* 270:27711-27719.
108. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1:263-273.
109. Muratoglu S., Bachrati C., Malpeli M., Szabo P., Neri M., Dozin B., Deak F., Cancedda R., Kiss I. 1995. Expression of the cartilage matrix protein gene at different chondrocyte developmental stages. *Eur. J. Cell Biol.* 68:411-418.
110. Murtaugh L.C., Zeng L., Chyung J.H., Lassar A.B. 2001. The chick transcriptional repressor Nkx3.2 acts downstream of Shh to promote BMP-dependent axial chondrogenesis. *Dev. Cell* 1:411-422.
111. New H.V., Howes G., Smith J.C. 1991. Inductive interactions in early embryonic development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1:196-203.
112. Ng L.J., Wheatley S., Muscat G.E., Conway-Campbell J., Bowles J., Wright E., Bell D.M., Tam P.P., Cheah K.S., Koopman P. 1997. SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev. Biol.* 183:108-121.
113. Oberlender S.A., Tuan R.S. 1994a. Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. *Development* 120:177-187.
114. Oberlender S.A., Tuan R.S. 1994b. Spatiotemporal profile of N-cadherin expression in the developing limb mesenchyme. *Cell Adhes. Commun.* 2:521-537.

115. Orban P.C., Chui D., Marth J.D. 1992. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:6861-6865.
116. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S.M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D.M., Leri A., Anversa P. 2001. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410:701-705.
117. Panda D.K., Miao D., Lefebvre V., Hendy G.N., Goltzman D. 2001. The transcription factor SOX9 regulates cell cycle and differentiation genes in chondrocytic CFK2 cells. *J. Biol. Chem.* 276:41229-41236.
118. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
119. Poole A.R. 1991. In Cartilage: molecular aspects (Eds.: B.K.Hall, S.A. Newmann), *CRC Press*, Boca Raton, S. 179-211
120. Ptashne M. 1988. How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* 335:683-689.
121. Qi W.N., Scully S.P. 1998. Effect of type II collagen in chondrocyte response to TGF-beta 1 regulation. *Exp. Cell Res.* 241:142-150.
122. Rahkonen O., Savontaus M., Abdelwahid E., Vuorio E., Jokinen E. 2003. Expression patterns of cartilage collagens and Sox9 during mouse heart development. *Histochem. Cell Biol.* 120:103-110.
123. Ralphs J.R., Benjamin M., Thornett A. 1991. Cell and matrix biology of the suprapatella in the rat: a structural and immunocytochemical study of fibrocartilage in a tendon subject to compression. *Anat. Rec.* 231:167-177.
124. Recklies A.D., Baillargeon L., White C. 1998. Regulation of cartilage oligomeric matrix protein synthesis in human synovial cells and articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 41:997-1006.
125. Reubinoff B.E., Pera M.F., Fong C.Y., Trounson A., Bongso A. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* 18:399-404.
126. Rideout W.M., III, Hochedlinger K., Kyba M., Daley G.Q., Jaenisch R. 2002. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell* 109:17-27.

127. Roark E.F., Greer K. 1994. Transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein-2 act by distinct mechanisms to promote chick limb cartilage differentiation in vitro. *Dev. Dyn.* 200:103-116.
128. Rohwedel J., Guan K., Wobus A.M. 1999. Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro. *Cells Tissues. Organs* 165:190-202.
129. Rohwedel J., Guan K., Zuschratter W., Jin S., Ahnert-Hilger G., Furst D., Fässler R., Wobus A.M. 1998a. Loss of beta1 integrin function results in a retardation of myogenic, but an acceleration of neuronal, differentiation of embryonic stem cells in vitro. *Dev. Biol.* 201:167-184.
130. Rohwedel J., Kleppisch T., Pich U., Guan K., Jin S., Zuschratter W., Hopf C., Hoch W., Hescheler J., Witzemann V., Wobus A.M. 1998b. Formation of postsynaptic-like membranes during differentiation of embryonic stem cells in vitro. *Exp. Cell Res.* 239:214-225.
131. Rohwedel J., Maltsev V., Bober E., Arnold H.H., Hescheler J., Wobus A.M. 1994. Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Dev. Biol.* 164:87-101.
132. Romeis B. 1989. In: *Mikroskopische Technik* (Ed.: P. Böck), S. 425-426 und S. 443-444, Urban und Schwarzenberg, München, 17. Auflage
133. Rutishauser U. 1984. Developmental biology of a neural cell adhesion molecule. *Nature* 310:549-554.
134. Ryan M.C., Sandell L.J. 1990. Differential expression of a cysteine-rich domain in the amino-terminal propeptide of type II (cartilage) procollagen by alternative splicing of mRNA. *J. Biol. Chem.* 265:10334-10339.
135. Sampaolesi M., Torrente Y., Innocenzi A., Tonlorenzi R., D'Antona G., Pellegrino M.A., Barresi R., Bresolin N., De Angelis M.G., Campbell K.P., Bottinelli R., Cossu G. 2003. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science* 301:487-492.
136. Sandell L.J., Morris N., Robbins J.R., Goldring M.B. 1991. Alternatively spliced type II procollagen mRNAs define distinct populations of cells during vertebral development: differential expression of the amino-propeptide. *J. Cell Biol.* 114:1307-1319.
137. Sastry S.K., Horwitz A.F. 1996. Adhesion-growth factor interactions during differentiation: an integrated biological response. *Dev. Biol.* 180:455-467.

138. Schmitt R.M., Bruyns E., Snodgrass H.R. 1991. Hematopoietic development of embryonic stem cells in vitro: cytokine and receptor gene expression. *Genes Dev.* 5:728-740.
139. Schweitzer R., Chyung J.H., Murtaugh L.C., Brent A.E., Rosen V., Olson E.N., Lassar A., Tabin C.J. 2001. Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. *Development* 128:3855-3866.
140. Sekiya I., Tsuji K., Koopman P., Watanabe H., Yamada Y., Shinomiya K., Nifuji A., Noda M. 2000. SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J. Biol. Chem.* 275:10738-10744.
141. Shakibaei M., Zimmermann B., Merker H.J. 1995. Changes in integrin expression during chondrogenesis in vitro: an immunomorphological study. *J. Histochem. Cytochem.* 43:1061-1069.
142. Smits P., Li P., Mandel J., Zhang Z., Deng J.M., Behringer R.R., de Crombrughe B., Lefebvre V. 2001. The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev. Cell* 1:277-290.
143. Soudais C., Bielinska M., Heikinheimo M., MacArthur C.A., Narita N., Saffitz J.E., Simon M.C., Leiden J.M., Wilson D.B. 1995. Targeted mutagenesis of the transcription factor GATA-4 gene in mouse embryonic stem cells disrupts visceral endoderm differentiation in vitro. *Development* 121:3877-3888.
144. Stirpe N.S., Goetinck P.F. 1989. Gene regulation during cartilage differentiation: temporal and spatial expression of link protein and cartilage matrix protein in the developing limb. *Development* 107:23-33.
145. Stolt C.C., Lommes P., Sock E., Chaboissier M.C., Schedl A., Wegner M. 2003. The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes Dev.* 17:1677-1689.
146. Strübing C., Ahnert-Hilger G., Shan J., Wiedenmann B., Hescheler J., Wobus A.M. 1995. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mech. Dev.* 53:275-287.
147. Südbek P., Scherer G. 1997. Two independent nuclear localization signals are present in the DNA-binding high-mobility group domains of SRY and SOX9. *J. Biol. Chem.* 272:27848-27852.
148. Südbek P., Schmitz M.L., Baeuerle P.A., Scherer G. 1996. Sex reversal by loss of the C-terminal transactivation domain of human SOX9. *Nat. Genet.* 13:230-232.

149. Swiderski R.E., Solursh M. 1992. Localization of type II collagen, long form alpha 1(IX) collagen, and short form alpha 1(IX) collagen transcripts in the developing chick notochord and axial skeleton. *Dev. Dyn.* 194:118-127.
150. Tavella S., Raffo P., Tacchetti C., Cancedda R., Castagnola P. 1994. N-CAM and N-cadherin expression during in vitro chondrogenesis. *Exp. Cell Res.* 215:354-362.
151. Thiele D. 1991. [The "polymerase chain reaction" (PCR) and its possible applications]. *Immun. Infekt.* 19:138-142.
152. Thomas K.R., Capecchi M.R. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51:503-512.
153. Thorogood P.V., Hinchliffe J.R. 1975. An analysis of the condensation process during chondrogenesis in the embryonic chick hind limb. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 33:581-606.
154. Tuli R., Tuli S., Nandi S., Huang X., Manner P.A., Hozack W.J., Danielson K.G., Hall D.J., Tuan R.S. 2003. Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J. Biol. Chem.* 278:41227-41236.
155. Wagner T., Wirth J., Meyer J., Zabel B., Held M., Zimmer J., Pasantes J., Bricarelli F.D., Keutel J., Hustert E., . 1994. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79:1111-1120.
156. Wakayama T., Tabar V., Rodriguez I., Perry A.C., Studer L., Mombaerts P. 2001. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 292:740-743.
157. Walcz E., Deak F., Erhardt P., Coulter S.N., Fulop C., Horvath P., Doege K.J., Glant T.T. 1994. Complete coding sequence, deduced primary structure, chromosomal localization, and structural analysis of murine aggrecan. *Genomics* 22:364-371.
158. Wallin J., Wilting J., Koseki H., Fritsch R., Christ B., Balling R. 1994. The role of Pax-1 in axial skeleton development. *Development* 120:1109-1121.
159. Wang D., Villasante A., Lewis S.A., Cowan N.J. 1986. The mammalian beta-tubulin repertoire: hematopoietic expression of a novel, heterologous beta-tubulin isotype. *J. Cell Biol.* 103:1903-1910.
160. Wegner M. 1999. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res.* 27:1409-1420.

161. Weinhold B., Schratt G., Arsenian S., Berger J., Kamino K., Schwarz H., Ruther U., Nordheim A. 2000. Srf(-/-) ES cells display non-cell-autonomous impairment in mesodermal differentiation. *EMBO J.* 19:5835-5844.
162. Wichterle H., Lieberam I., Porter J.A., Jessell T.M. 2002. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 110:385-397.
163. Widelitz R.B., Jiang T.X., Murray B.A., Chuong C.M. 1993. Adhesion molecules in skeletogenesis: II. Neural cell adhesion molecules mediate precartilaginous mesenchymal condensations and enhance chondrogenesis. *J. Cell Physiol* 156:399-411.
164. Wiles M.V. und Keller G. 1991. Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development* 111:259-267
165. Wobus, A.M., J.Rohwedel, C.Strübing, J.Shan, K.Adler, V.Maltsev, and J.Hescheler. 1997. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *In Methods in developmental toxicology and biology.* S.Klug and R.Thiel, editors. Blackwell Science, Berlin, Wien. 1-17.
166. Wobus A.M., Wallukat G., Hescheler J. 1991. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation* 48:173-182.
167. Woodbury D., Schwarz E.J., Prockop D.J., Black I.B. 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 61:364-370.
168. Wozney J.M. 1992. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* 32:160-167.
169. Wright E., Hargrave M.R., Christiansen J., Cooper L., Kun J., Evans T., Gangadharan U., Greenfield A., Koopman P. 1995. The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat. Genet.* 9:15-20.
170. Xie W.F., Zhang X., Sakano S., Lefebvre V., Sandell L.J. 1999. Trans-activation of the mouse cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein gene by Sox9. *J. Bone Miner. Res.* 14:757-763.
171. Yamada G., Kioussi C., Schubert F.R., Eto Y., Chowdhury K., Pituello F., Gruss P. 1994. Regulated expression of Brachyury(T), Nkx1.1 and Pax genes in embryoid bodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199:552-563.
172. Zanetti N.C.Solursh M. 1986. Epithelial effects on limb chondrogenesis involve extracellular matrix and cell shape. *Dev. Biol.* 113:110-118.

173. Zehentner B.K., Dony C., Burtscher H. 1999. The transcription factor Sox9 is involved in BMP-2 signaling. *J. Bone Miner. Res.* 14:1734-1741.
174. Zehentner B.K., Haussmann A., Burtscher H. 2002. The bone morphogenetic protein antagonist Noggin is regulated by Sox9 during endochondral differentiation. *Dev. Growth Differ.* 44:1-9.
175. Zeng L., Kempf H., Murtaugh L.C., Sato M.E., Lassar A.B. 2002. Shh establishes an Nkx3.2/Sox9 autoregulatory loop that is maintained by BMP signals to induce somitic chondrogenesis. *Genes Dev.* 16:1990-2005.
176. Zhao G.Q., Eberspaecher H., Seldin M.F., de Crombrughe B. 1994. The gene for the homeodomain-containing protein Cart-1 is expressed in cells that have a chondrogenic potential during embryonic development. *Mech. Dev.* 48:245-254.
177. Zhao Q., Eberspaecher H., Lefebvre V., de Crombrughe B. 1997. Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev. Dyn.* 209:377-386.
178. Zhou G., Garofalo S., Mukhopadhyay K., Lefebvre V., Smith C.N., Eberspaecher H., de Crombrughe B. 1995. A 182 bp fragment of the mouse pro alpha 1(II) collagen gene is sufficient to direct chondrocyte expression in transgenic mice. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 12):3677-3684.
179. Zhou G., Lefebvre V., Zhang Z., Eberspaecher H., de Crombrughe B. 1998. Three high mobility group-like sequences within a 48-base pair enhancer of the Col2a1 gene are required for cartilage-specific expression in vivo. *J. Biol. Chem.* 273:14989-14997.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. P. K. Müller für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der finanziellen Mittel für die Durchführung dieser Dissertation recht herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Jürgen Rohwedel, der das Thema gestellt hat und von dem ich in den letzten Jahren sehr viel gelernt habe. So habe ich nicht nur von seinem Wissen in fachbezogenen Diskussionen profitiert, sondern bekam auch immer wieder hilfreiche Ratschläge, wenn Probleme bei der Durchführung von Experimenten auftraten. Besonders hervorheben möchte ich dabei seine ständige Gesprächsbereitschaft und das entspannte Arbeitsklima in unserer Arbeitsgruppe "Zelluläre Differenzierung".

In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch sehr herzlich bei Jan Kramer, Claudia Hegert, Beate Lembrich, Tanja Engebrecht, Alexandra Eirich und Marius Dohse aus unserer Arbeitsgruppe bedanken, die mir immer hilfreich zur Seite standen und nicht nur werktags für eine gute Stimmung im Labor sorgten.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Instituts für Medizinische Molekularbiologie, besonders aber bei Katja Thiele, für das freundliche Arbeitsklima bedanken.

Schließlich gilt mein Dank auch PD Dr. Charli Kruse für das Isolieren von Zellaggregaten aus EBs und PD Dr. M. Klinger, der die elektronenmikroskopischen Aufnahmen angefertigt hat.

Lebenslauf**Persönliche Daten**

Nachname: Hargus
 Vorname: Gunnar
 Geburt: 27.09.1976 in Eutin
 Familienstand: ledig

Schulbildung

1983-1987 Grundschule in Eutin
 1987-1996 Gymnasium in Eutin
 1996 Abitur, Note: 1,8

Zivildienst

1996-1997 Pflege im St.Elisabeth-Krankenhaus Eutin

Hochschulausbildung

Oktober 1997- Juni 2004 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck

Prüfungen: 1999 Physikum, Note: "gut"
 2000 1.Staatsexamen, Note: "gut"
 2003 2.Staatsexamen, Note: "gut"
 2004 3.Staatsexamen, Note: "befriedigend"
 Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung: "gut"

Famulaturen: September 2000 Chirurgie, Nordstadt-Krankenhaus,
 Hannover
 Februar 2002 Neurochirurgie, Universität Lübeck
 März 2002 Anästhesie, Bedford General Hospital,
 Bedford (England)
 August 2002 HNO-Heilkunde, Universität Lübeck
 September 2002 Innere Medizin, Krankenhaus-Süd, Lübeck

Praktisches Jahr:
 (2003-2004) Innere Medizin: Krankenhaus-Süd, Lübeck; Prof. Hütteroth
 Chirurgie: Sligo General Hospital, Sligo (Irland);
 Mr. Martin Caldwell (Consultant Surgeon)
 Neurologie: Universität Lübeck; Prof. Kömpf

Forschungspraktika und -seminare:	September/Oktober 1998	Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Universität Lübeck, Prof. Kirchner
	WS 1998/1999 Februar/März 1999	Immunchemisches Seminar und Immunchemischer Kurs, Abteilung für Immunchemie und Biochemische Mikrobiologie des Forschungszentrums Borstel, Prof. Rietschel
	Oktober 2002	Institut für Biochemie, Universität Verona (Italien), Prof. Libonati

Wissenschaftliche Tätigkeit

Winter 2000/2001 bis Sommer 2002	Durchführung des experimentellen Teils der Promotionsarbeit "Die Funktion des Transkriptionsfaktors Sox9 während der Knorpelzellendifferenzierung – Analyse Sox9-defizienter embryonaler Stammzellen der Maus <i>in vitro</i> " im Institut für Medizinische Molekularbiologie der Universität zu Lübeck (Prof.Müller); Arbeitsgruppe "Zelluläre Differenzierung" (PD Dr. J. Rohwedel)
Seit Sommer 2003	Mitarbeit an dem Projekt „Renale Differenzierungsfähigkeit muriner embryonaler Stammzellen <i>in vitro</i> “ am Institut für Medizinische Molekularbiologie der Universität zu Lübeck (Prof.Müller); Arbeitsgruppe "Zelluläre Differenzierung" (PD Dr. J. Rohwedel)

Veröffentlichungen

Originalarbeiten:

1. Hegert, C., Kramer, J., Hargus, G., Müller, J., Guan, K., Wobus, A., Müller, P.K., Rohwedel, J. (2002). Differentiation plasticity of chondrocytes derived from mouse embryonic stem cells. *Journal of Cell Science* 115, 4617-4628
2. Hargus, G., Kist, R., Kramer, J., Scherer, G., Rohwedel, J.: Loss of Sox9 function results in defective chondrocyte differentiation of mouse embryonic stem cells *in vitro*. (eingereicht bei *Journal of Cell Science*, 2004)
3. Kramer, J., Hegert, C., Hargus, G., Rohwedel, J.: Mouse ES cell lines show a variable degree of chondrogenic differentiation *in vitro*. (eingereicht bei *Cell Biology International*, 2004)
4. Kramer, J., Hargus, G., Steinhoff J., Rohwedel, J. (in Bearbeitung). Nephrogenic differentiation of mouse embryonic stem cells *in vitro*.
5. Kramer, J., Hargus, G., Steinhoff J., Rohwedel, J. (in Bearbeitung). Loss of Sox9 function results in altered nephrogenic differentiation of mouse embryonic stem cells *in vitro*.

Übersichtsartikel:

1. Kramer, J., Hegert, C., Hargus, G., Rohwedel, J. (2003). Chondrocytes derived from mouse embryonic stem cells. *Cytotechnology* 41, 177-187
2. Kramer, J., Hargus, G., Rohwedel, J. (2004). Derivation of chondrocytes from ES cells *in vitro*, in: "Embryonic Stem Cells II: Methods and Protocols", Turksen, K. (ed.), im Druck.

Poster

1. G.Hargus, J.Kramer, C.Hegert, R.Kist, G.Scherer, P.K.Müller, J.Rohwedel:
"Loss of Sox9 function results in defective chondrocyte differentiation *in vitro*."
(Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Bindegewebforschung,
Lübeck, 07.-09.März 2002)
2. J.Rohwedel, J.Kramer, C.Hegert, G.Hargus, P.K.Müller: "Embryonic stem cells –
a useful source to generate chondrogenic cells for therapeutical applications?"
(Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Bindegewebforschung,
Ulm, 27.-29. März 2003)
3. G.Hargus, J.Kramer, C.Hegert, R.Kist, G.Scherer, P.K.Müller, J.Rohwedel:
"Sox9-deficient mouse embryonic stem cells are unable to differentiate into mature and
hypertrophic chondrocytes *in vitro*."
(Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Bindegewebforschung,
Ulm, 27.-29. März 2003)
4. J.Kramer, J.Steinhoff, G.Hargus, J.Rohwedel:
"*In vitro*-Differentiation of embryonic stem cells as a model to study renal development"
(2.Internationales Treffen des „Stammzell-Netzwerkes Nordrhein-Westfalen“,
Bonn, 01.-02. April 2004)

Vorträge

- Hargus, G.: "Der Verlust des Transkriptionsfaktors Sox9 verursacht eine gestörte Knorpel-
zellendifferenzierung *in vitro*."
(Seminar des Instituts für Medizinische Molekularbiologie der Universität zu
Lübeck, November 2001)