
4 Ergebnisse

4.1 Inhibition und Stimulation des Ihh-Signalweges

Zur gezielten Identifikation von Zielgenen des Ihh-Signalweges sollten experimentelle Ansätze gefunden werden, bei denen dieser Signalweg möglichst vollständig inhibiert oder stimuliert wird. Dafür wurden verschiedene Versuchsansätze zur Modulation des Ihh-Signalweges in der Gliedmaßenkultur in Betracht gezogen und experimentell auf ihre Effektivität hin untersucht.

4.1.1 Inhibition des Ihh-Signalweges mit Antikörpern und Antikörperfragmenten

Eine Möglichkeit, einen durch einen Wachstumsfaktor stimulierten Signalweg zu inhibieren, stellt die Applikation von Antikörpern gegen den Wachstumsfaktor dar (Egle et al. 1996; Chegini 1997). Da gegen Ihh keine spezifischen Antikörper erhältlich waren und die N-terminalen Signalpeptide IhhN und ShhN über 96% Identität der Aminosäuresequenz aufweisen, sollte getestet werden, ob der Ihh-Signalweg während der Chondrozytendifferenzierung mit einem Shh-spezifischen Antikörper inhibiert werden kann.

Der verwendete Antikörper ist ein monoklonales Maus IgG (mAb 5E1), welches im Labor von T. Jessel erstellt wurde. Dieser Antikörper bindet spezifisch an ein hochkonserviertes Peptid von Shh (Ericson et al. 1996). Es konnte gezeigt werden, daß der Antikörper in der Lage ist, von Shh ausgelöste Signalprozesse quantitativ zu inhibieren (Ericson et al. 1996; Outram et al. 2000; Zhang und Yang 2001).

Um eine Kreuzreaktion vom mAb 5E1 mit Ihh zu bestätigen, wurde der Antikörper im Western-Blot getestet. Bei diesem Versuch wurden Proteinpräparationen aus Gliedmaßenanlagen von E 16,5 dpc Mausembryonen verwendet, mittels PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Als Kontrollen dienten eine Proteinpräparation aus embryonalem Muskelgewebe und rekombinantes ShhN-

Protein (Ontogeny, Boston, USA). Die Proteindetektion erfolgte mit dem 5E1-Antikörper. Der Nachweis wurde mit einem Ziege anti-Maus Antikörper (Fab-spezifisch), gekoppelt mit alkalischer Phosphatase geführt. In diesem Experiment konnte eine Bande von 20 kDa für das rekombinante Shh-Protein und eine Bande gleicher Größe in der Proteinpräparation detektiert werden (Abb. 9). Da in Gliedmaßenanlagen dieses Entwicklungsstadiums keine Shh- oder Dhh-Expression nachgewiesen worden ist, handelt es sich bei dem von diesem Antikörper detektierten Protein mit der Molekularmasse von 20 kDa um Ihh. Der mAb 5E1 reagiert also spezifisch mit IhhN. Daher sollte im Folgenden getestet werden, ob mAb 5E1 den Ihh-Signalweg in der Gliedmaßenkultur inaktiviert.



Abb. 9: Der mAb 5E1 erkennt Ihh und Shh

Proteinpräparationen aus E 16,5 Gliedmaßenanlagen (1), Muskelgewebe (2) sowie rekombinantes Shh (3) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Der mAb 5E1 detektiert das endogene, in der Gliedmaßenanlage vorhandene Ihh (1) und rekombinantes Shh (3). Eine Proteinpräparation Muskelgewebe diente als Negativkontrolle (2).

Der mAb 5E1 lag in Form von Ascites-Punktat vor. Hierbei handelt es sich um eine konzentrierte Antikörperlösung, die von Mäusen im Peritoneum gebildet wird (Ausubel et al. 1987-1999; Sambrook et al. 1989). In der Ascitesflüssigkeit sind neben dem Antikörper verschiedene inflammatorische Faktoren und weitere Serumproteine vorhanden, die in Zellkulturassays unerwünschte Nebenwirkungen haben. In Gliedmaßenkulturen kann daher durch Ascites ein unspezifischer Effekt auf die Chondrozytendifferenzierung nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund ist es notwendig, den monoklonalen Antikörper aufzureinigen. Ebenso wurde ein Kontroll-Ascites aufgereinigt.

Die Aufreinigung fand affinitätschromatographisch an Protein G-Sepharose statt (Akerstrom et al. 1985). Die Reinheit des Maus IgG wurde anschließend mittels SDS-PAGE und Proteinfärbung kontrolliert (nicht gezeigt). Die vor der Reinigung im Ascites vorhandenen Serumproteine waren nicht mehr erkennbar, die Antikörper IgGs lagen nach Proteinfärbung als Banden bei 150 kDa vor, was dem Molekulargewicht eines Maus IgG entspricht. Es konnten somit keine Fremd-Proteine neben dem Maus-IgG nachgewiesen werden.

Die aufgereinigten Antikörper (mAb 5E1 und Kontroll-IgG) wurden nun in der *in-vitro*-Organkultur für vier Tage auf Gliedmaßenexplantate von E 14,5 und E 16,5 Embryonen appliziert. Hierbei wurden Konzentrationen im Zellkulturmedium von 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml mAb getestet. Die so behandelten Gliedmaßen wurden daraufhin fixiert, in Paraffin eingebettet und geschnitten. Die Analyse der Schnitte dieser Gliedmaßen mittels *in-situ*-Hybridisierung wurde mit den Proben *Ptc*, als Marker für die Aktivität des Ihh-Signalweges und *Ihh*, als Marker für den Beginn der Chondrozytendifferenzierung durchgeführt (Abb. 10).

Die Hybridisierung mit *Ptc* ergab ein vergleichsweise schwaches Signal, was auf eine Herabregulation der *Ptc*-Transkription hinweist (Abb. 10B). Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf eine Interaktion von Ihh mit mAb 5E1 zurückzuführen, womit eine Bindung an *Ptc* verhindert und die Ihh-Signalweiterleitung unterbrochen wird. Dadurch wird die Expression des Zielgenes *Ptc* herabreguliert. Zweitens konnte eine vergrößerte *Ihh*-Expressionsdomäne im Vergleich zu den mit dem Kontroll IgG

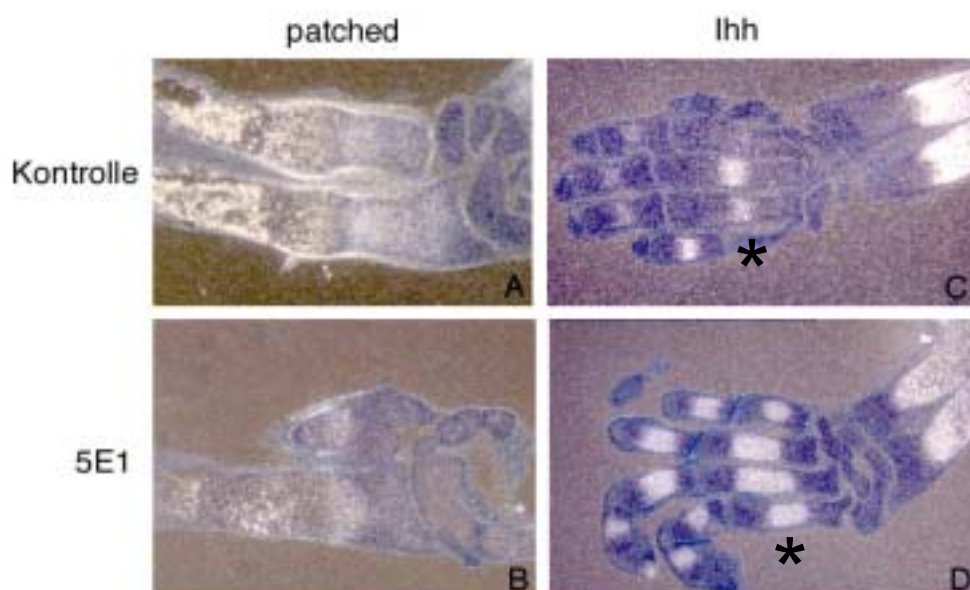


Abb. 10: 5E1-Behandlung reprimiert die *ptc*-Expression und beschleunigt die Differenzierung

E 16,5 Gliedmaßen wurden für 4 d in Kultur genommen und mit Kontroll IgG (A, C) bzw. 5E1 IgG (B, D) behandelt. Nach der Kultur wurde mit *in-situ*-Hybridisierung die Expression der Gene *Ihh* und *Ptc* untersucht. Es konnte ein abgesenktes Expressionsniveau von *Ptc* bei 5E1-Behandlung (A) im Vergleich zur Kontrollantikörperbehandlung (B) festgestellt werden. Bei 5E1-behandelten Gliedmaßen ist die *Ihh*-Expressionsdomäne (D*) größer als bei Kontrollantikörper-behandelten Gliedmaßen (C *). Der gleiche Effekt konnte auch bei Behandlung mit Antikörperfragmenten festgestellt werden (nicht gezeigt).

behandelten Gliedmaßen gefunden werden (Abb. 10D). Dieses Ergebnis deutet ebenso auf eine Interaktion von 5E1 mit Ihh hin. Durch eine Reduktion von freiem Ihh findet eine schwächere Induktion des Ihh/PTHrP-Rückkopplungskreises statt. Da PTHrP die Differenzierung inhibiert, beginnen dementsprechend mehr Chondrozyten mit der Differenzierung. Dies führt zu einer Vergrößerung der *Ihh*-Expressionsdomäne und der Expansion dieser zur Gelenksregion hin. Die *Ptc*-Expression ist jedoch nicht vollständig reprimiert (Abb. 10B). Dies läßt auf eine partielle Inhibition des Ihh-Signalweges schließen.

Um den Effekt des mAb 5E1 auf den Ihh/PTHrP-Rückkopplungskreis zu verstärken, wurde das IgG in seine Epitop-bindenden Untereinheiten, die Fab₂- und Fab-Fragmente gespalten (Abb. 11). Aufgrund der geringeren Molekülgröße dieser Fragmente sollten die erzeugten Fragmente über eine höhere Mobilität im Knorpelgewebe verfügen und daher eine effektivere Signalinhibition bewirken (Wilson et al. 1991). Die Spaltung der IgGs in die Fab₂ und Fab-Fragmente erfolgte proteolytisch durch die Protease Ficin. Die Fragmente wurden im Anschluß aufgereinigt. Der Nachweis der Fab₂- und Fab-Fragmentpräparation im Western-

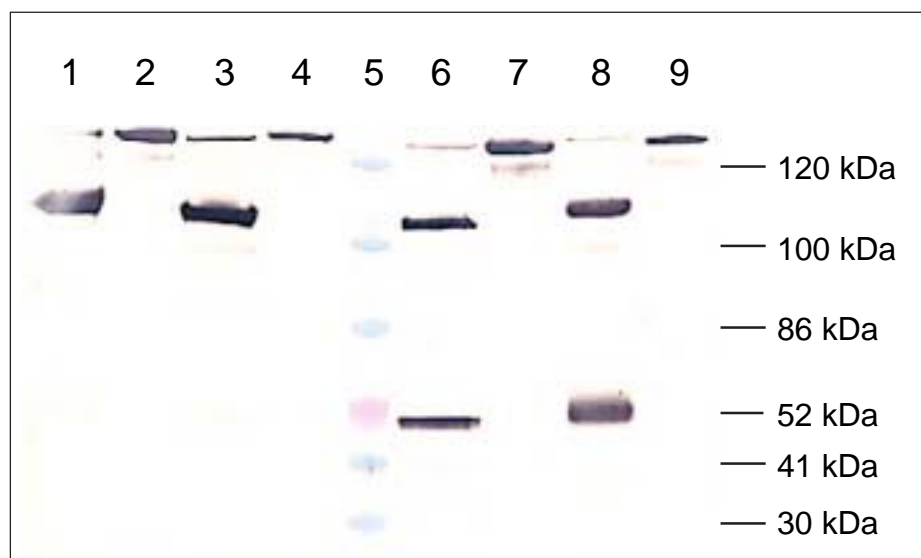


Abb. 11: Fragmentierung des Antikörpers 5E1 und des Kontroll-IgG in Fab₂ und Fab-Fragmente

Zwei Maus IgG-Präparationen wurden fragmentiert und im Western-Blot analysiert. Hybridisiert wurde dieser Western Blot mit einem Fab-spezifischen Ziege anti-Maus Antikörper. In den Spuren 1, 2 und 6, 7 ist 5E1 IgG aufgetragen und in den Spuren 3, 4 und 8, 9 ist das Kontroll IgG aufgetragen. In den Spuren 1 und 3 wurde die Fab₂-Präparation, in Spur 6 und 8 die Fab-Präparation aufgetragen. In den Spuren 2, 4, 7 und 9 wurde jeweils gesamt-IgG aufgetragen. Die Spur 5 zeigt den Größenstandard, die korrespondierenden Molekulargewichte sind rechts angegeben.

Blot ergab Banden mit Molekülmassen von 110 kDa bei Fab₂ und von 50 kDa bei Fab (Abb 11). Die Fab₂- und Fab-Fragmente wurden anschließend für vier Tage in einer Konzentration von 100 µg/ml auf Gliedmaßenkulturen appliziert. Die Gliedmaßen wurden fixiert, in Paraffin eingebettet und geschnitten. Die Analyse der Schnitte wurde mittels *in-situ*-Hybridisierung von *Ptc* durchgeführt. Sollte in diesem Ansatz durch die Antikörperfragmente mehr Ihh immobilisiert und somit der Ihh-Signalkaskade entzogen werden, sollte das zu einer schwächeren *Ptc*-Expression führen, da die *Ptc*-Expression von Ihh induziert wird. Ähnlich dem Kulturansatz mit gesamt IgG-mAb 5E1 ist *Ptc* bei der Kultur mit 5E1-Fab- bzw. 5E1-Fab₂-Fragmenten herabreguliert (nicht gezeigt). Darüberhinaus wurde Ihh als Marker für die prähypertrophe Differenzierung getestet. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Wirkung des 5E1-gesamt IgG und der 5E1-Fragmente auf die *Ptc*- bzw. *Ihh*-Expression festgestellt werden (nicht gezeigt). Sowohl der gesamte Antikörper als auch die Antikörperfragmente zeigten eine quantitativ vergleichbare Wirkung auf die Genexpression von *Ptc* und *Ihh*. Da weiterhin ein typisches *Ptc*-Expressionsmuster erkennbar war, konnte eine vollständige Inhibition des Ihh-Signalweges durch Verwendung von Antikörpern bzw. Antikörperfragmenten nicht erreicht werden.

4.1.2 Inhibition des Ihh-Signalweges mit Cyclopamin

Das Hauptalkaloid von *Veratrum californicum*, Cyclopamin, inhibiert effektiv den Shh-Signalweg bei der dorsoventralen Musterbildung des Neuralrohres und der Somiten (Cooper et al. 1998; Incardona et al. 1998). Da Ihh und Shh über den gleichen Signalweg wirken, besteht die Möglichkeit, daß auch der Ihh-Signalweg durch Cyclopamin inhibiert werden kann. Um diese Hypothese experimentell zu verifizieren, wurden Gliedmaßenexplantate der Stadien E 14,5 und E 16,5 mit verschiedenen Cyclopamin-Konzentrationen behandelt. So sollte zunächst eine optimale Konzentration von Cyclopamin ermittelt werden, die den Ihh-Signalweg effektiv inhibiert, jedoch nicht toxisch auf das Gewebe wirkt. Die gewählten Endkonzentrationen lagen bei 100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM und 1 mM. Als Kontrolle diente in diesem Ansatz das Lösungsmittel für Cyclopamin, 95% Ethanol. Die Behandlung der Gliedmaßenexplantate erfolgte über vier Tage bei täglichem

Mediumwechsel. Die Auswirkung der Cyclopaminbehandlung auf die Genexpression wurde mittels *in-situ*-Hybridisierung analysiert. Hierbei wurde die Expression von *Ptc*, *Ihh*, *Col-II* und *Col-X* in behandelten und unbehandelten Gliedmaßen untersucht. Eine Konzentration von 100 nM oder 1 µM Cyclopamin resultierte in einer leicht verminderten *Ptc*-Expression. Bei 10 µM Cyclopamin konnte die *Ptc*-Expression vollständig inhibiert werden (nicht gezeigt). Dieser Effekt war gekoppelt mit einer verstärkten Differenzierung, denn die Expressionszentren der Differenzierungsmarker für prähypertrophe Chondrozyten (*Ihh*) und für hypertrophe Chondrozyten (*Col-X*) waren im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in Richtung der Gelenksregion verschoben (Abb. 12). Der gleiche Effekt war bei der Konzentration von 100 µM Cyclopamin festzustellen, wobei hier die Expression aller untersuchten Gene, inklusive des Markers für nicht-hypertroph differenzierte Chondrozyten, *Col-II*, zusätzlich herabgesetzt war (nicht gezeigt). Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die früher beschriebenen toxischen Effekte von Cyclopamin in hoher Konzentration zurückzuführen (Keeler 1970, 1973). Bei der höchsten Konzentration von 1 mM Cyclopamin war nur noch eine sehr schwache Genexpression sämtlicher getesteter Gene festzustellen, was auf einen verstärkten toxischen Effekt zurückzuführen ist (nicht gezeigt). Als optimale Cyclopamin-Konzentration in der Gliedmaßenkultur wurde 10 µM ermittelt.

4.1.3 Cyclopamin ist ein effektiver Inhibitor des *Ihh*-Signalweges

Im Folgenden wurde getestet, ob die Inhibition der *Ptc*-Expression auf einer Unterbrechung des *Ihh*-Signalweges beruht. Eine Unterbrechung des *Ihh*-Signalweges sollte die Blockade des *Ihh*/PTHrP-Rückkopplungskreises einschließen. Trifft dies zu, bewirkt eine Blockade des *Ihh*-Signalweges eine Reduktion der *PTHrP*-Expression, was zu einer verstärkten Differenzierung führt. Diese fehlende *PTHrP*-Expression könnte durch die externe Gabe von PTHrP substituiert werden und dadurch das physiologische Niveau der Chondrozytendifferenzierung wieder hergestellt werden. Daher wurde in der Gliedmaßenkultur der Versuch unternommen, den Cyclopamineffekt durch Gabe von PTHrP zu kompensieren. Hierfür wurden die Gliedmaßen für vier Tage in Kultur genommen und neben unkonditioniertem Kontroll-

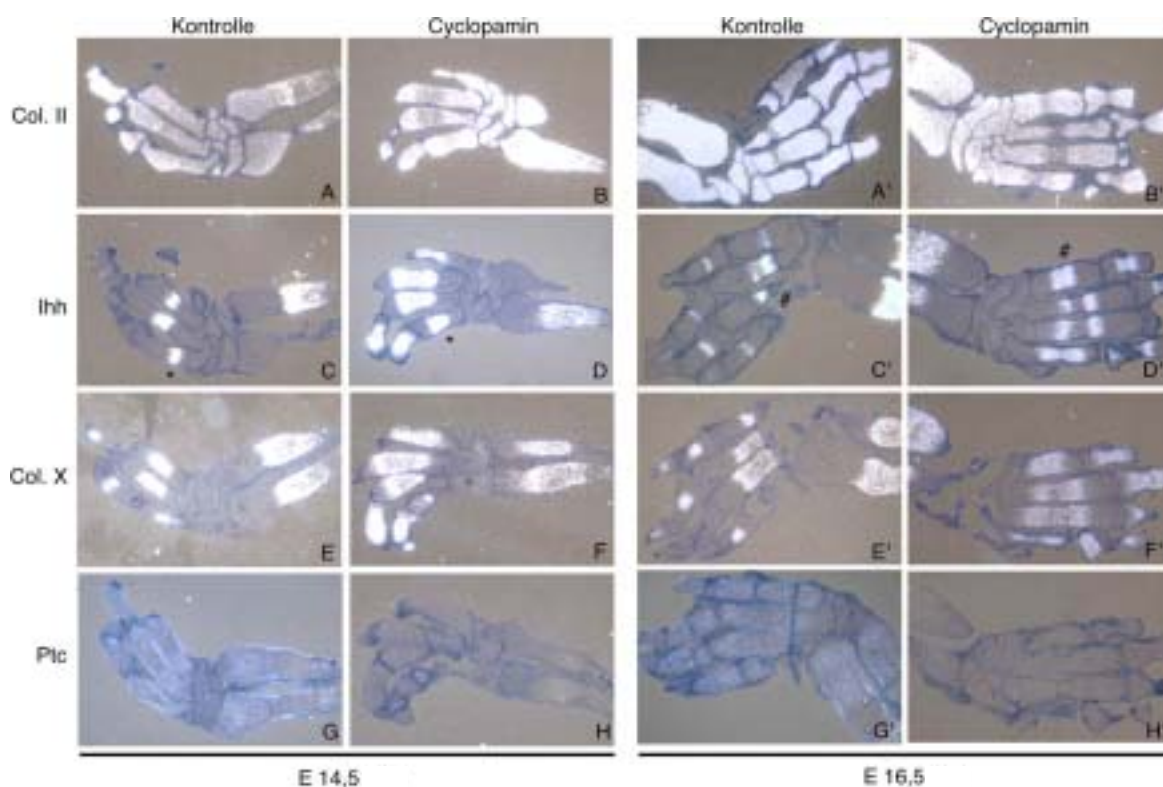


Abb. 12: Cyclopaminbehandlung inhibiert den *Ihh*-Signalweg und beschleunigt die Chondrozytendifferenzierung

E 14,5 (Bilder A bis H) und E 16,5 (Bilder A' bis H') Gliedmaßen wurden für 4 d in Kultur genommen. Verglichen wurde die Expression von Kollagen-II (A, B, A', B'), *Ihh* (C, D, C', D'), Kollagen-X (E, F, E', F') und *Ptc* (G, H, G', H'). Nach Cyclopaminbehandlung ist die Differenzierung der Chondrozyten weiter fortgeschritten und die *Ihh*-Expressionsdomäne ist im Vergleich zu Kontrollkulturen größer und weiter zur Gelenksregion hin verschoben (* in D und # in D'). Einen ähnlichen Effekt zeigt der Marker der hypertrophen Differenzierung, Col-X. Nach Cyclopaminbehandlung (F bzw. F') ist die Differenzierung weiter fortgeschritten als in der Kontrolle (E und E'). Die *Ptc*-Expression ist nach Cyclopaminbehandlung vollständig reprimiert (H und H') im Vergleich zur Kontrolle (G und G').

Medium mit konditioniertem Medium behandelt. Das konditionierte Medium enthielt entweder Cyclopamin oder PTHrP oder beide Substanzen, PTHrP und Cyclopamin. PTHrP (Aminosäuren 1-34) wurde in einer Konzentration von 3×10^{-7} M verwendet (Vortkamp et al. 1996).

Anschließend wurde die Analyse des Differenzierungsstandes der Chondrozyten in der *in-situ*-Hybridisierung durchgeführt (Abb. 13). Bei 10 μ M Cyclopamin ist im Vergleich zur Kontrolle eine Verschiebung der *Ihh*-Expressionsdomäne in Richtung zur Gelenksregion sichtbar, was auf eine verstärkte Differenzierung der Chondrozyten schließen lässt. Bei der Applikation von 300 nM PTHrP war im Vergleich zur Kontrolle ein größerer Abstand der *Ihh*-Expressionsdomäne zur Gelenksregion festzustellen.

Die Gabe von PTHrP bewirkt somit eine verzögerte Differenzierung. Die Doppelbehandlung mit 10 μ M Cyclopamin und 300 nM PTHrP konnte den durch Cyclopamin hervorgerufenen Effekt aufheben. Der Differenzierungsstatus der Zellen, sichtbar gemacht durch die *Ihh*-Expressionsdomäne, war bei diesen Bedingungen auf einem mit der Kontrolle vergleichbarem Niveau. Der Cyclopamineffekt kann folglich durch Applikation von PTHrP kompensiert werden. Diese Experimente zeigen, daß Cyclopamin spezifisch den *Ihh*/PTHrP-Rückkopplungskreis unterbricht. Da der *Ihh*/PTHrP-Rückkopplungskreis von einem funktionalen *Ihh*-Signalweg abhängt, kann bei Cyclopaminbehandlung von einer Unterbrechung dieses Signalweges ausgegangen werden.

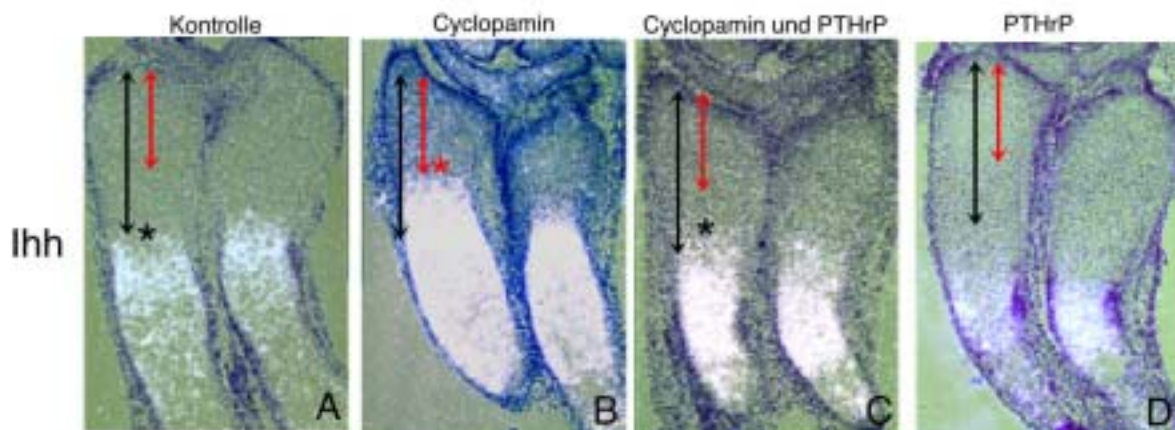


Abb. 13: Kombinationsbehandlung mit Cyclopamin und PTHrP stellt das physiologische Differenzierungsniveau wieder her

Gliedmaßenkulturen wurden mit Kontrollmedium (A), Cyclopamin-supplementiertem Medium (B), Cyclopamin- und PTHrP-supplementiertem Medium (C) und PTHrP-supplementiertem Medium (D) für 4 d inkubiert. Es wurde die *Ihh*-Expression nachgewiesen. In Bild A ist das Differenzierungsniveau bei unbehandelten Gliedmaßenkulturen gezeigt, der Beginn der *Ihh*-Expressionsdomäne ist durch einen * gekennzeichnet. Durch Gabe von Cyclopamin wird der Differenzierungsblock aufgehoben und es ist ein wesentlich früherer Beginn der *Ihh*-Expression zu erkennen (roter *). Dieser Effekt kann fast vollständig durch Gabe von PTHrP kompensiert werden, die Differenzierung erscheint auf Bild C (*) trotz Cyclopaminapplikation wieder vergleichbar mit der von Bild A. Die Gabe von PTHrP allein (Bild D) führte zu einer stärkeren Differenzierungsinhibition als in den unbehandelten Kulturen (Bild A). Die schwarzen Pfeile markieren die Größe des Abstandes von der periartikulären Region zum Beginn der Differenzierung im Kontrollansatz, die roten Pfeile verdeutlichen den Abstand von der periartikulären Region zum Beginn der Differenzierung bei Cyclopamin-Behandlung.

4.1.4 Zeitlicher Verlauf der *Ihh*-Zielgenrepression

Ziel dieser Arbeit war es, direkte Zielgene von *Ihh* zu ermitteln. Es sollte daher in den folgenden Experimenten der Zeitraum zur Blockade des *Ihh*-Signalweges bestimmt werden, bei dem erste sichtbare Veränderungen der *Ihh*-abhängigen Genexpression festzustellen sind. Als Indikator der Blockade des *Ihh*-Signalweges wurde das direkt durch *Ihh* aktivierte Zielgen *Ptc* gewählt (Marigo und Tabin 1996; Vortkamp et al. 1996). Zur Untersuchung der Kinetik der Inhibition des *Ihh*-Signalweges wurde 10 μM Cyclopamin über verschiedene Zeiträume appliziert (Abb. 14). Hierfür wurden E 14,5 und E 16,5 Gliedmaßen über einen Zeitraum von 0 h, 6 h, 12 h, 24 h oder 48 h mit Cyclopamin behandelt. Die anschließende Analyse der *Ptc*-Expression in der *in-situ*-Hybridisierung zeigte eine schwache Herabregulation des *Ptc*-Expressionsniveaus bereits nach 6 h Kultur. Nach 12 h war eine sehr schwache, über das gesamte Gewebe gleichmäßig erscheinende *Ptc*-Expression zu erkennen, ebenso zu allen späteren Zeitpunkten. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um eine basale *Ptc*-Expression. Diese Experimente zeigen, daß nach einer Behandlungsdauer von 12 h die Expression des Zielgenes *Ptc* bereits maximal herabreguliert ist.

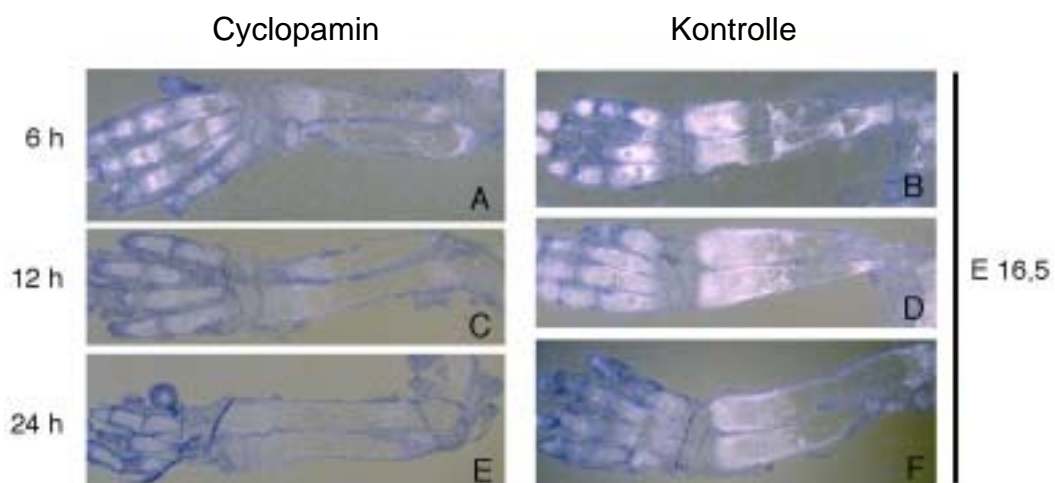


Abb. 14: Zeitlicher Verlauf der *Ptc*-Repression nach Cyclopaminbehandlung

E 16,5 Gliedmaßen wurden für 6 h (A und B), 12 h (C und D) und 24 h (E und F) mit Cyclopamin (A, C, E) oder Kontrollmedium (B, D, F) behandelt. Nach 6 h ist eine leicht verringerte *Ptc*-Expression bei Cyclopaminbehandlung (A) im Vergleich zur Kontrollkultur (B) sichtbar. Eine vollständige Repression der *Ptc*-Expression ist nach 12 h Inkubationszeit mit Cyclopamin-konditioniertem Medium vorhanden (C).

Es ist davon auszugehen, daß weitere direkte Zielgene im gleichen Zeitintervall reguliert werden. Für die weiteren Experimente zur Inhibition des *Ihh*-Signalweges wurde daher eine Cyclopamin-Konzentration von 10 µM über einen Zeitraum von 12 h in der Gliedmaßenkultur verwendet (Abb. 15).

4.1.3 Stimulation des *Ihh*-Signalweges mit rekombinantem *Shh*-Protein

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß es möglich ist, den *Ihh*-Signalweg durch Applikation von rekombinantem *Shh*-Protein zu stimulieren (Lanske et al. 1996; Vortkamp et al. 1996). Hierbei ist nach zwei bis vier Tagen Inkubation mit 5 µg *Shh*/ml Medium in der Gliedmaßenkultur eine starke Blockade der Chondrozytendifferenzierung zu erkennen. Dies wird sichtbar durch eine Vergrößerung des Abstandes der *Ihh*- bzw. *Col-X* Expressionsdomäne zur Gelenksregion im Vergleich zur Kontrolle. Dies läßt auf eine Blockade der Chondrozytendifferenzierung schließen. Ebenso wird auch das *Ihh*-Zielgen *Ptc* in diesem Kulturansatz transkriptionell heraufreguliert. Bei einer Inkubationsdauer von 12 h mit 5 µg *Shh*/ml war im Vergleich zu unbehandelten Gliedmaßen eine Hochregulation der *Ptc*-Expression zu erkennen (Abb. 15). Vergleichbar mit der Cyclopaminbehandlung war in diesem Zeitraum keine Änderung des Differenzierungszustandes der Zellen erkennbar. Es wurden daher alle weiteren Behandlungen mit rekombinantem *Shh*-Protein bei einer Konzentration von 5 µg/ml Medium über einen Zeitraum von 12 h durchgeführt.

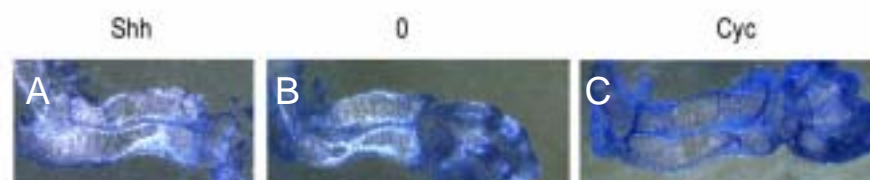


Abb. 15: Die *Ptc*-Transkription wird nach Cyclopaminbehandlung inhibiert und nach *Shh*-behandlung induziert

Gezeigt ist das Expressionsniveau von *Ptc* in E 14,5 Gliedmaßen nach 12 h in der Kultur. Nach Gabe von *Shh* wird ein leicht erhöhtes *Ptc*-Expressionsniveau sichtbar (A). Nach Gabe von Cyclopamin ist keine *Ptc*-Expression nachweisbar (C). Die unbehandelte Gliedmaßenkultur zeigt das *Ptc*-Expressionsniveau nach 12 h in Kultur (B).

4.2 PCR-basierte Subtraktion von cDNA

Als Ausgangsmaterial für die Subtraktion wurden ausschließlich Vordergliedmaßen von E 14,5 Embryonen verwendet. Es wurde cDNA aus Gliedmaßen hergestellt, die entweder 12 h mit 10 μ M Cyclopamin zur vollständigen Inhibition des Ihh-Signalweges oder mit 5 μ g/ml Shh zur Stimulation des Ihh-Signalweges behandelt wurden. Dafür wurden aus jeweils 120 mit Cyclopamin bzw. Shh behandelten Vordergliedmaßenkulturen polyA-RNA isoliert. Von den beiden polyA-RNA-Pools wurden jeweils 2,5 μ g für die cDNA-Synthese eingesetzt. Die so erzeugten cDNA-Präparationen wurden für die cDNA-Subtraktion eingesetzt.

Im Folgenden wird als *Tester* die zu untersuchende cDNA bezeichnet, als *Driver* wird hingegen die vom *Tester* subtrahierte cDNA definiert. Es wurden insgesamt zwei Subtraktionen und eine Kontrollsubtraktion durchgeführt:

1. cDNA aus der Shh-Behandlung als *Tester* (st) gegen cDNA aus Cyclopamin-Behandlung als *Driver* (cd) sowie
2. cDNA aus Cyclopamin-Behandlung als *Tester* (ct) gegen cDNA aus Shh-Behandlung als *Driver* (sd).
3. Die Kontrollsubtraktion beruht im Wesentlichen auf der Subtraktion von zwei nahezu identischen humanen Leber cDNA-Pools, wobei der *Driver* unbehandelt ist. Der *Tester*-cDNA ist ein HindIII-Verdau des λ -Bakteriophagengenoms zugesetzt. Erfolgt bei der Kontrollsubtraktion eine Reamplifikation dieser Fragmentkollektion, deutet dies auf eine erfolgreich verlaufene Subtraktion hin.

Die in die cDNA-Subtraktion eingesetzten cDNA-Pools sind im Folgenden klein geschrieben (ct, st), die cDNA-Pools nach Abschluß der Subtraktion sind groß geschrieben (ST, für Shh-*Tester* oder CT, für Cyclopamin-*Tester*). Um den Verlauf der Subtraktion zu verfolgen, sollte die Anreicherung oder Reduktion der *Ptc*-cDNA nach Shh- oder Cyclopaminbehandlung untersucht werden. Die in das Subtraktionsexperiment eingesetzten, unsubtrahierten cDNA-Pools sowie die erzeugten, subtrahierten cDNA-Pools wurden daher mittels Agarosegelelektrophorese

aufgetrennt und durch Southern Blot auf eine Nylonmembran übertragen. Die Analyse der geblotteten cDNAs erfolgte durch Hybridisierung mit *Ptc* (Abb. 16). In der unsubtrahierten cDNA aus Cyclopamin-behandelten Gliedmaßenkulturen (ct) konnte die *Ptc*-cDNA nur schwach detektiert werden (basale Expression) während im Shh-behandelten cDNA Pool (st) wie erwartet ein stärkeres *Ptc*-Signal nachzuweisen war (Abb. 16, 3/4). Durch die Subtraktion wurde dieser Mengenunterschied der *Ptc*-cDNA noch weiter verstärkt: Das *Ptc*-Signal der subtrahierten Shh-cDNA (ST) erscheint intensiver als die st-cDNA und die CT-cDNA erscheint schwächer als die ct-cDNA (Abb. 16, 1/2). Weiterhin kann man eine Größenverschiebung des hybridisierten Fragmentes der ST- und CT-Signale im Vergleich zu den st- und ct-Signalen beobachten. Der Grund für die Verschiebung der Fragmentgröße in der subtrahierten cDNA ist die interne (nested) PCR während der Subtraktion. Da sowohl eine Anreicherung des Zielgenes *Ptc* in der ST-cDNA sowie eine Reduktion von *Ptc* in der CT-cDNA als auch die Fragmentgrößenverschiebung der angereicherten Fragmente stattfanden, war die PCR-basierte Subtraktion erfolgreich verlaufen.

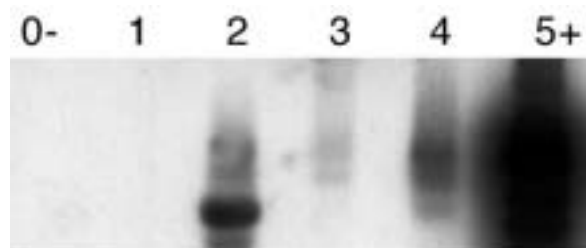


Abb. 16: Nachweis von *Ptc* in unsubtrahierten und subtrahierten cDNAs

Bei gleicher aufgetragener DNA-Menge kann in der subtrahierten ST-cDNA (2) eine Amplifikation des *Ptc*-Signales im Vergleich zu st-cDNA (4) beobachtet werden. Dies ist auf den Anreicherungseffekt bei der PCR-basierten Subtraktion zurückzuführen. Ebenso war die schwach detektierbare *Ptc*-cDNA in ct (3) nach der Subtraktion in CT (1) nicht mehr nachweisbar. Die Subtraktion der cDNA kann daher als erfolgreich angesehen werden. Spur 0-: Negativkontrolle, Spur 1: CT-cDNA, Spur 2: ST-cDNA, Spur 3: ct-cDNA, Spur 4: st-cDNA, Spur 5+: Positivkontrolle. Hybridisiert wurde mit *Ptc*-cDNA.

4.3 Analyse von klonierten Fragmenten

Die subtrahierten cDNA-Pools ST und CT wurden im Anschluß in den pGEM-T easy T/A-Ligationsvektor kloniert und in TOP10 *E. coli* transformiert. Jede Bibliothek (ST und CT) wurden auf selektivem LB-Agar ausplattiert. Es wurden für jede Bibliothek 288 Klone in drei 96-*well* Platten angeimpft und mehrfach repliziert. Die so produzierten Platten tragen die Bezeichnung ST1, ST2 und ST3 sowie analog dazu CT1, CT2 und CT3.

4.2.1 Analyse der Klonbibliotheken

Zur qualitativen Abschätzung der Redundanz der Klone sowie der Qualität der Ligation der Bibliothek wurden die in den pGEM-T easy Vektor ligierten cDNA-Fragmente mit M13fw- und M13rev-Primern mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend in der Gelelektrophorese analysiert (Abb. 17). Die Insertgrößen bei allen sechs Klonplatten zeigte eine breite Streuung in den Fragmentgrößen von 500 bp bis etwa 1500 bp. Dies deutet darauf hin, daß die Klonbibliotheken nur eine geringe Redundanz aufweisen. Weiterhin konnten durchschnittlich zwei doppelte Integrationen pro analysierter Platte (96 Klone) festgestellt werden. Da eine Doppelinsertationen die weiteren Analysen stört, wurden diese Klone sowie Klone ohne Insert ausgeschlossen.

Die weitere Analyse der klonierten Bibliotheken diente dem Auffinden falsch positiver Klone. Dabei handelt es sich um Klone, die trotz der Subtraktion in beiden cDNA-Pools vorkommen. Dies sind wahrscheinlich keine *Ihh*-Zielgene. Die Unterscheidung von differenziell exprimierten Fragmenten von gemeinsam exprimierten Fragmenten erfolgte mittels komplexer Hybridisierung. Hierzu wurden PCR-Produkte der einzelnen Bibliotheken auf jeweils zwei Nylonmembranen direkt aufgebracht (Dot-Blots). Jeweils eine Membran wurde darauf mit der ST- oder CT-cDNA hybridisiert (Abb. 18). Klone, die bei Hybridisierung mit der Bibliothek aus der sie kloniert wurden, ein Signal zeigten und in der invers subtrahierten jedoch nicht, sind differentiell exprimiert.

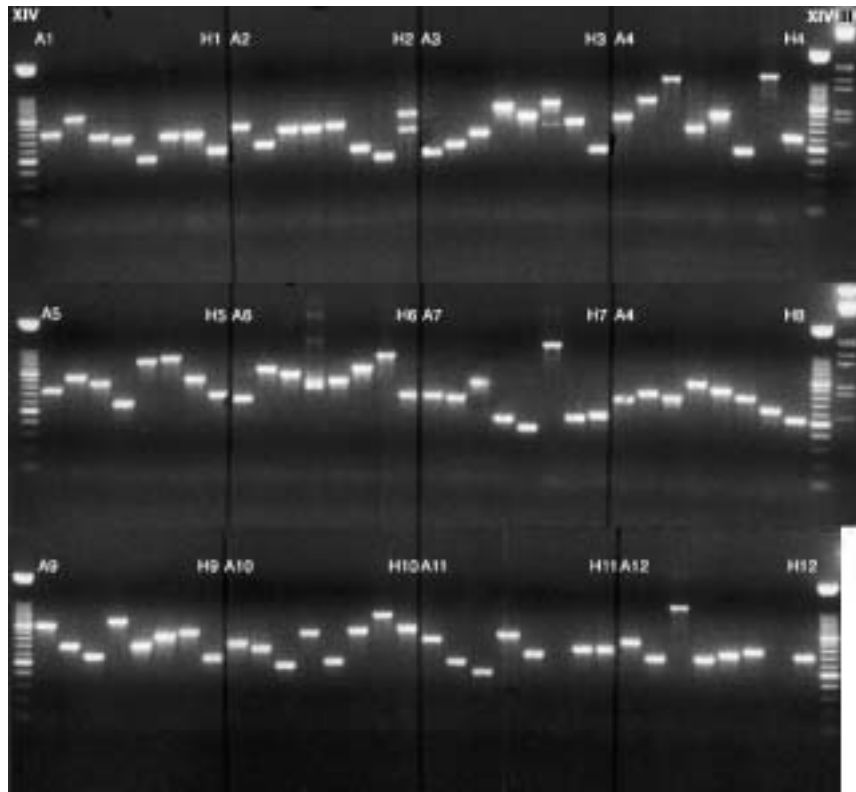


Abb. 17: Analyse der Redundanz der Klonbibliotheken

Gezeigt sind PCR-Produkte der Klone aus Platte ST2, die aus der ST-cDNA stammen. Dieser Versuch diente der Rückbestätigung der Heterogenität und geringen Redundanz der Klone. Klone mit zwei oder mehr Banden lassen auf Mehrfachligationen bzw. -transformationen schließen (H2 und D6) und wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen, ebenso wurden Klone ohne Insert (F11 und G12) nicht weiter untersucht. Markerspuren sind links (XIV) und rechts (XIV und III) gezeigt.

Das Ergebnis läßt sich folgendermaßen zusammenfassen: Bei der durchgeführten Selbsthybridisierung zeigten 97 % der aufgetragenen Klone ein Hybridisierungssignal. Lediglich bei 17 Klonen ist kein Signal zu beobachten, dabei handelt es sich um Klone ohne Insert (Abb. 18, Klone ST2F11 und ST2G12). Dies wurde schon in der Redundanzanalyse der Kloninserts sichtbar (Abb. 17, Klone ST2F11 und ST2G12). In der Hybridisierung mit dem jeweiligen Driver cDNA-Pool zeigten ca. 77 % der Klone ein Hybridisierungssignal und wurden aufgrund ihres doppelten Vorkommens von weiteren Analysen ausgeschlossen. Es wurden für weitere Analysen die Klone ausgewählt, die in der eigenen subtrahierten Bibliothek (z.B. ST) und nicht in der invers-subtrahierten Bibliothek (z.B. CT) vorkommen. Dies trifft auf 134 (23%) der 576 (6*96) Klone zu. Es handelt sich um 60 ST-Klone und 74 CT-Klone. Diese PCR-Produkte wurden weiterhin analysiert, da nur hier eine Regulation der korrespondierenden cDNAs in Antwort auf die Behandlung mit Shh-Protein oder Cyclopamin zu erwarten ist.

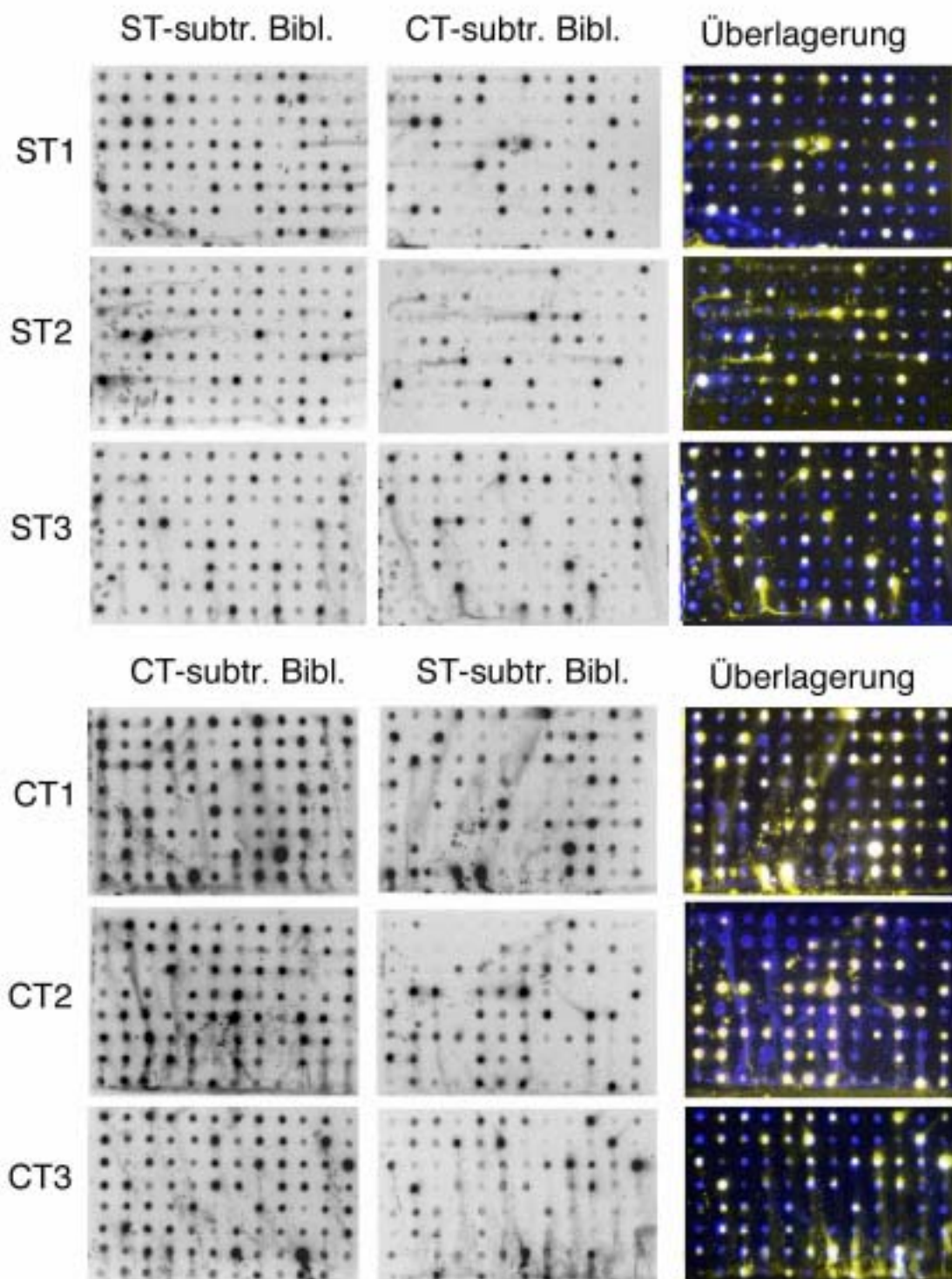


Abb. 18: Differenziell vorhandene Klone in den subtrahierten cDNA-Pools

Komplexe Hybridisierung der Platten ST1-3 und CT1-3 jeweils mit dem eigenen subtrahierten cDNA-Pool (linke Spalte) und dem revers subtrahierten cDNA-Pool (mittlere Spalte). In der rechten Spalte ist die Überlagerung beider Hybridisierungen dargestellt. Differenziell exprimierte Klone sind in der Überlagerung intensiv blau gefärbt. Diese Klone wurden weiter analysiert.

Von diesen 134 differentiellen Klonen wurden zunächst Plasmid-Präparationen hergestellt, die anschließend sequenziert wurden. 125 Klone ergaben eine lesbare Sequenz, wobei sechs Klone doppelt oder mehrfach gepickt und sequenziert worden sind. Die Sequenzen wurden im Internet mit den gängigen Sequenzdatenbanken verglichen (Altschul et al. 1990; Madden et al. 1996). Verwendet wurden hierfür die Internet-basierten Portale von NCBI (www.ncbi.nih.nlm.gov) und Celera (www.celera.com). Für den Vergleich der Sequenzen wurde der Standard-BLAST Algorithmus auf der jeweiligen Website verwendet. Es wurde in *Expressed-Sequence Tag* (EST)- und *Non-redundant* (nr)-Datenbanken verschiedener Spezies gesucht. Eine Auflistung der 119 Sequenzen differentieller Klone ist im Anhang aufgeführt.

4.2.2 In-situ-Hybridisierung differentiell exprimierter Kandidaten

Im folgenden Schritt wurde die Expression der 119 differentiell exprimierten cDNAs in Mausgliedmaßenanlagen der Stadien E 14,5 und E 16,5 mittels *in-situ*-Hybridisierung untersucht. In diesem Ansatz zeigten 32 Klone ein chondrozyten-spezifisches Signal. Bei 87 Klonen war kein Signal in der spezifischen Region der Skelettanlage der Gliedmaßen vorhanden. Diese 87 Klone gliedern sich folgendermaßen auf: Acht Klone zeigten ein starkes ubiquitäres Signal, zehn Klone zeigten ein schwaches ubiquitäres Signal, 66 Klone zeigten kein detektierbares Signal, zwei Klone waren exklusiv in Haut und ein Klon in Muskelgewebe exprimiert. Diese 87 Klone wurden nicht näher untersucht.

Das Expressionsmuster der 32 chondrozytenspezifischen Klone zeigte eine große Varianz sowohl in der Intensität als auch in der lokalen Verteilung der Genexpression (Abb. 19). Zu finden waren Klone, die im schmalen Bereich der periartikulären Chondrozyten exprimiert sind, der sich auch durch die Expression von PTHrP auszeichnet (Abb. 19A, ST1C8: twisted gastrulation protein und Abb. 19B, CT2B4: unbekanntes Genprodukt). Weiterhin wurde in verschiedenen Subpopulationen der Chondrozyten eine hochspezifische Expression nachgewiesen. So ist der Klon ST1H3 (CD24a) spezifisch in proliferierenden Chondrozyten exprimiert (Abb. 19C).

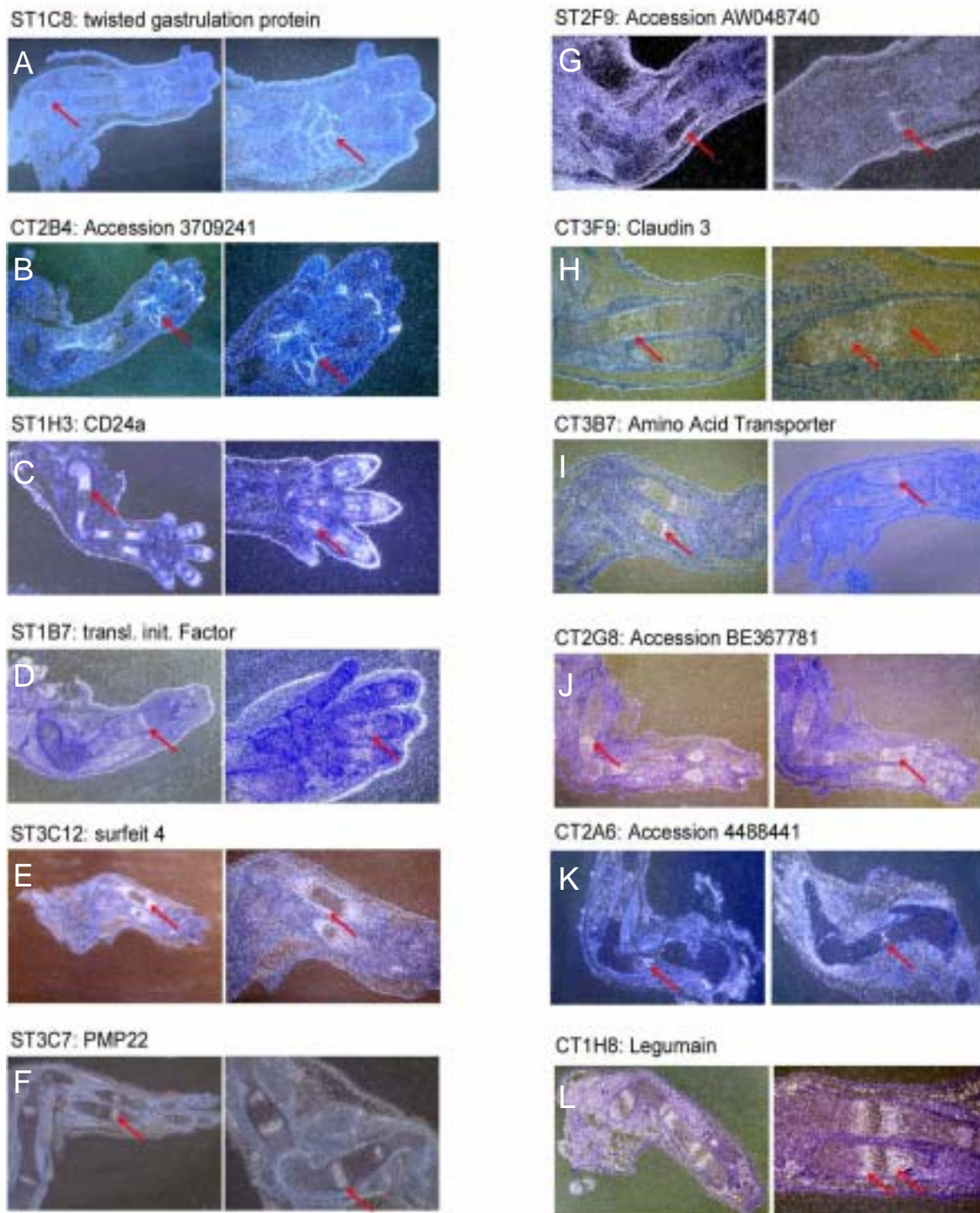


Abb. 19: Expressionsmuster von 12 ausgewählten Klonen in Gliedmaßen

Von den 32 Klonen mit chondrozytenspezifischen Expressionsdomänen in Vordergliedmaßen von E 14,5 (A bis I, K) oder E 16,5 (L, J) Embryonen sind hier beispielhaft 12 gezeigt. Die roten Pfeile zeigen die im Text beschriebenen Signale. Neben den Klonbezeichnungen ist bei bekannten Genprodukten der Name und bei unbekanntem Genprodukten die GenBank Accession-Nummer angegeben.

Die prähypertrophen Chondrozyten exprimieren das Genprodukt CT3B7 (Aminosäure-Transporter-Protein, Abb. 19I). Der Klon CT2G8 (unbekanntes Genprodukt) zeigt in undifferenzierten und prähypertrophen Chondrozyten Expressionsdomänen (Abb. 19J). Die Klone ST1B7 (Translations-Initiierungs-Faktor) und ST3C12 (Surfeit 4) sind in prähypertrophen Chondrozyten exprimiert (Abb. 19D und 19E), wobei der Klon ST3C12 zusätzlich in dem die hypertrophen Chondrozyten flankierenden Perichondrium exprimiert ist (Abb. 19E). ST1C8 wird in der Gelenksregion und schwach in den hypertrophen Chondrozyten exprimiert (Abb. 19A). Eine starke Expressionsdomäne, die sich fast vollständig mit der von *Ihh* deckt und die prähypertrophen Chondrozyten charakterisiert zeigt der Klon ST3C7 (PMP22, Abb. 19F). Eine rein perichondrale Expressionsdomäne, ebenfalls die hypertrophen Chondrozyten flankierend, zeigt der Klon ST2F9 (unbekanntes Genprodukt, Abb. 19G). Eine schwächere Expression im Periosteum und im Knochen zeigt der Klon CT3F9 (Claudin 3, Abb. 19H). Ein rein knochenspezifisches Expressionsverhalten zeigt der Klon CT2A6 (unbekanntes Genprodukt, Abb. 19K). Der Klon CT1H8 (Legumain) ist bei E 16,5 Embryonen in zwei Domänen exprimiert, die beide die hypertrophe Zone differenzierter Chondrozyten flankieren (Abb. 19L).

4.3.1 Funktionale Analyse bekannter gefundener Klone

Um die Funktionen von einigen im Screen identifizierten Genen zu untersuchen, wurden zwei Kandidaten, Peripheres Myelin Protein 22 kDa (*PMP22*) und Twisted-Gastrulation Protein (*tsg*) in das RCAS P (B)-Retrovirus (RCAS) zur Mißexpression in Hühnergliedmaßen kloniert (Morgan und Fekete 1996; Vortkamp et al. 1996; Bell und Brickell 1997; Logan und Tabin 1998). Das Expressionsmuster für *PMP22* in chondrogenen Anlagen ist bisher nicht beschrieben worden. Die Expressionsdomäne von *PMP22* flankiert und überlappt teilweise die *Ihh*-Expressionsdomäne. Dies legt eine Regulation durch *Ihh* nahe. Für *tsg* ist gezeigt worden, daß dieses Protein antagonistisch mit knochen-morphogenetischen Proteinen (BMPs) interagiert, die mit *Ihh* in Wechselwirkung stehen (Minina et al. 2001; Ross et al. 2001).

Die Klonierung erfolgte bei *tsg* durch PCR-Amplifikation der im Screen isolierten kodierenden Sequenz und bei *PMP22* durch PCR-Amplifikation aus einem die kodierende Sequenz enthaltenden IMAGE Klon (IMAGE 6310322) mit modifizierenden Primern (Abb. 20). Das PCR-Produkt wurde gerichtet in den pSlax-Shuttlevektor kloniert, hierfür wurde die in der PCR eingeführte BbsI-Restriktionsstelle (am 5'-Ende) und die EcoRI-Restriktionsstelle (3'-Ende) genutzt. Die gesamte Expressionskassette des so modifizierten pSlax-Vektors wurde im Anschluß in ein das gesamte RCAS-Genom umfassendes Plasmid integriert. Dieses Konstrukt wurde zur Virusproduktion in immortalisierte Hühnerfibroblasten (DF-1 Zellen) transfiziert. Das in den Zellkultur-Überstand sezernierte Virus wurde mittels Ultrazentrifugation aufkonzentriert. Die so gewonnenen RCAS Viren (RCAS-*PMP22* und RCAS-*tsg*) wurden für die *in-ovo*-Mißexpression genutzt (Morgan und Fekete 1996; Logan und Tabin 1998).

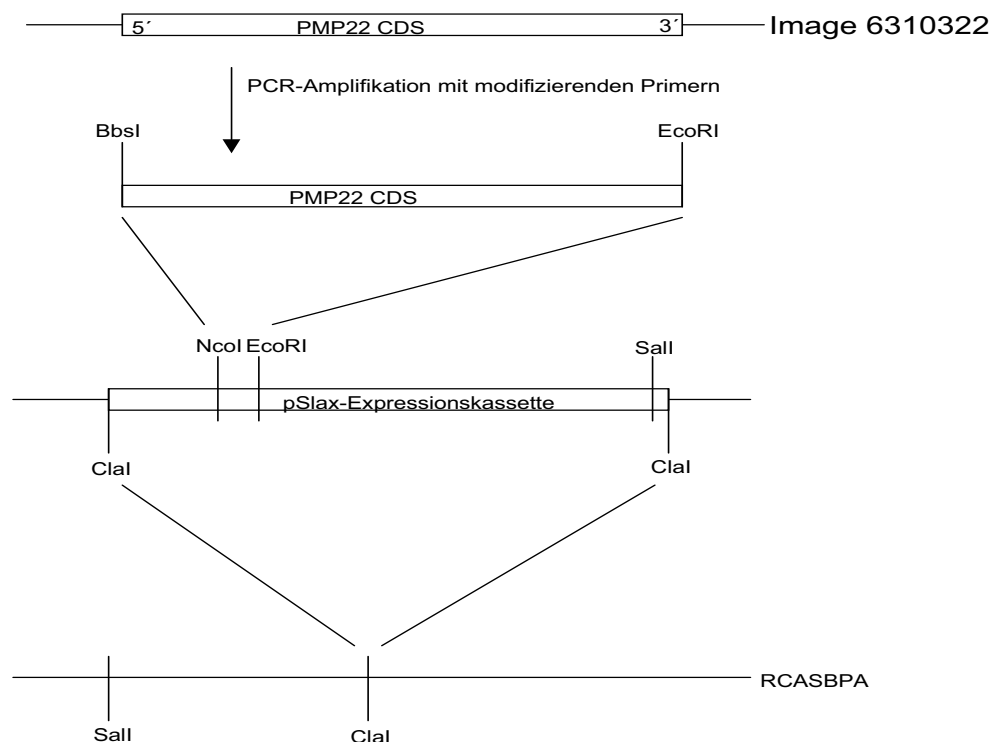


Abb. 20: Schema der Virusklonierung für *PMP22*

Aus dem IMAGE-Klon 6310322 wurde mittels modifizierenden Primern die kodierende Sequenz für *PMP22* herausamplifiziert. Das so gewonnene Fragment wurde mit BbsI und EcoRI geschnitten und dann in den mit NcoI und EcoRI geöffneten pSlax-Vektor ligiert. Anschließend wurde die pSlax-Expressionskassette mit ClaI herausgetrennt dann in den RCASBPA-Vektor ligiert. Die Bestimmung der Orientierung des Inserts erfolgte mit Sall.

4.3.2 Mißexpression von PMP22 und Tsg in Hühnchengliedmaßen

Das RCAS-*PMP22* und RCAS-*tsg* Virus wurde in die rechten Hühnergliedmaßenknospen des Stadiums Hamburger-Hamilton (HH) 20 injiziert (Hamburger und Hamilton 1951). Die so manipulierten Hühnerembryonen wurden bis zum Stadium HH 36 inkubiert und danach analysiert (Abb. 21 und 22). Dafür wurden die mit RCAS-Virus injizierten rechten, sowie zur Kontrolle die uninjizierten linken Gliedmaßen in Paraffin eingebettet, geschnitten und in der *in-situ*-Hybridisierung analysiert. Die *in-situ*-Hybridisierung erfolgte mit der antisense-RNA für *tsg* bzw. *PMP22* und *Ihh*.

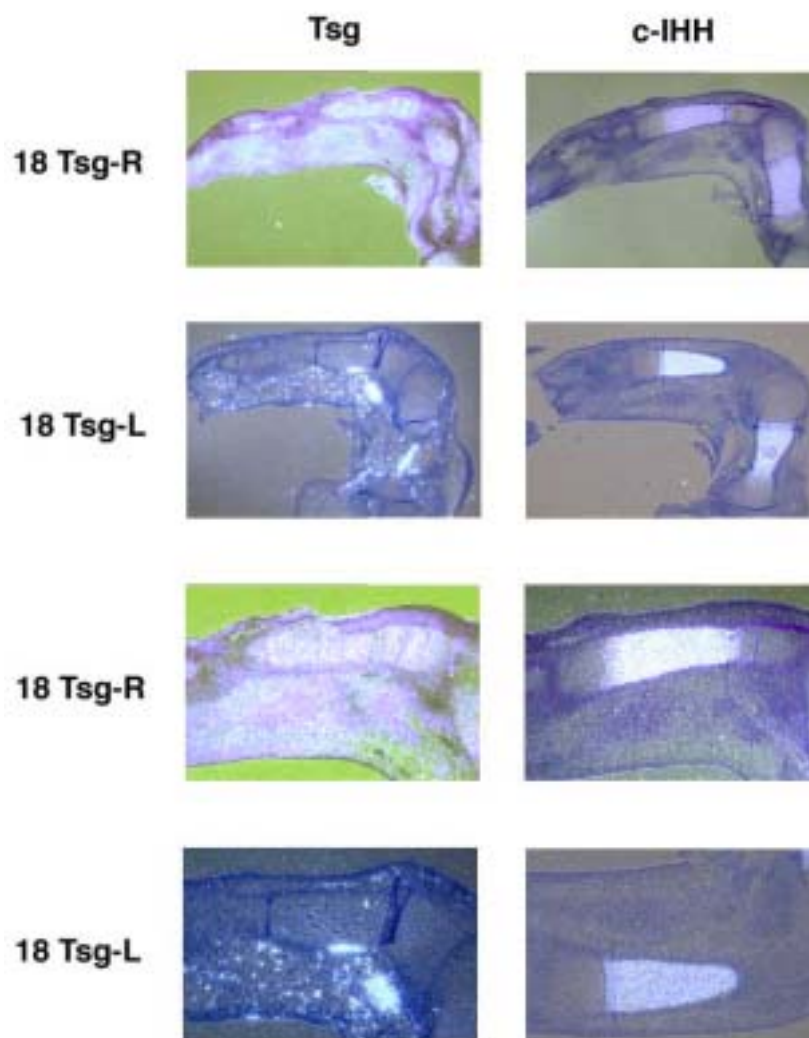


Abb. 21: Überexpression von Tsg in Hühnergliedmaßen

In embryonale Gliedmaßen des Stadiums HH 20 wurde RCAS-*tsg* zur Überexpression von *Tsg* injiziert. Die infizierten rechten (R) und korrespondierenden uninjizierten linken (L) Gliedmaßen wurden im Stadium HH 36 abgetrennt und mittels *in-situ*-Hybridisierung analysiert. An diesen Schnitten wurde *Tsg* zum Nachweis der Überexpression (linke Spalte) und *Ihh* zum Nachweis des Differenzierungsstandes (rechte Spalte) hybridisiert.

Neben einer großflächigen Infektion der Chondrozyten der rechten Vordergliedmaßen im Vergleich zu den unbehandelten linken Gliedmaßen konnte morphologisch kein Unterschied gefunden werden. In der *in-situ*-Hybridisierung mit Huhn-*Ihh* konnte kein Unterschied in dem Differenzierungsstand der Chondrozyten in den Gliedmaßenanlagen festgestellt werden. Da *Tsg* als Antagonist für den BMP-Signalweg charakterisiert wurde, wurde zusätzlich die Expressionsdomäne von Chordin analysiert (Reddi 2001). Chordin wirkt ebenfalls antagonistisch im BMP-Signalweg und kann zusätzlich als Marker für die Gelenksregion der Hühnergliedmaßen herangezogen werden (Balemans und Van Hul 2002; Garcia Abreu et al. 2002). Ebenso wie bei der Expression von *Ihh* wurde bei der *Chordin*-Expression kein Unterschied festgestellt (nicht gezeigt).

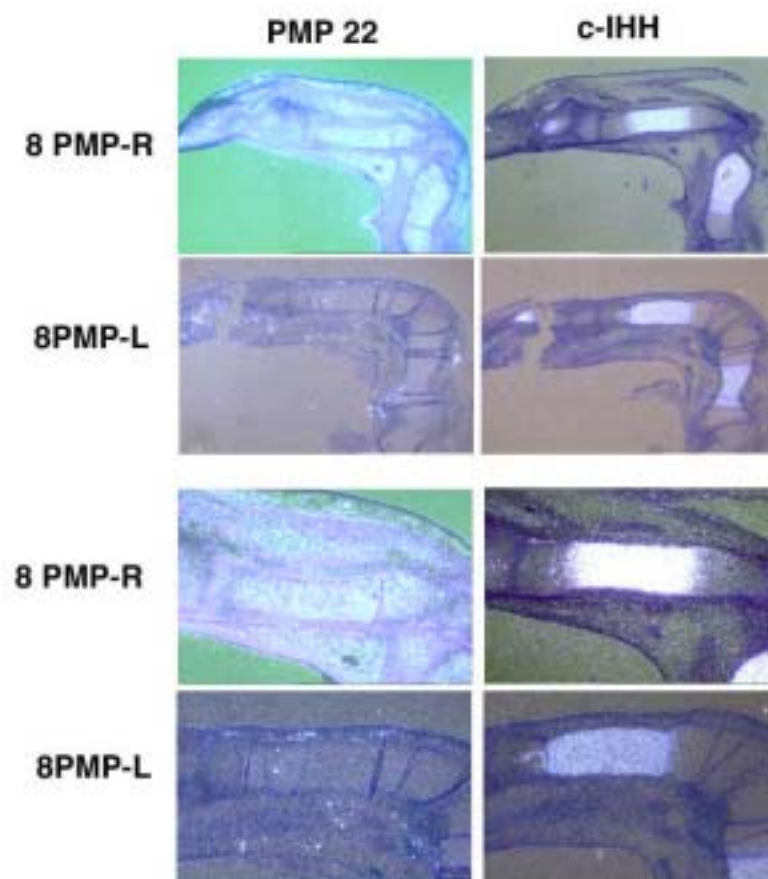


Abb. 22: Überexpression von *PMP22* in Hühnergliedmaßen

In embryonale Gliedmaßen des Stadiums HH 20 wurde RCAS-PMP zur Überexpression von *PMP22* injiziert. Die infizierten rechten (R) und korrespondierenden uninfizierten linken (L) Gliedmaßen wurden im Stadium HH 36 abgetrennt und mittels *in-situ*-Hybridisierung analysiert. An diesen Schnitten wurde *PMP22* zum Nachweis der Überexpression (linke Spalte) und *Ihh* zum Nachweis des Differenzierungsstandes (rechte Spalte) hybridisiert.

4.4 RNase-Protection Assays

Um sicherzustellen, daß die in der *in-situ*-Hybridisierung identifizierten Klone direkt durch Shh-Behandlung reguliert werden, wurde die Transkriptmenge bei Stimulation oder Inhibition des Ihh-Signalweges nachgewiesen. Hierfür wurde die Methode des RNase-Protection Assays (RPA) gewählt, da sie eine genaue quantitative Aussage der untersuchten RNA in einem RNA-Pool ermöglicht. Für dieses Experiment wurde gesamt-RNA aus E 14,5 Vordergliedmaßen gewonnen, die für 12 h mit 10 µM Cyclopamin, 5 µg/ml Shh oder un-supplementiertem Medium behandelt wurden. Die RNA wurde in einem Vorversuch im Northern-Blot auf die Expression von *Ptc* und *Actin* getestet (Abb. 23). Zur Auswertung und Quantifizierung der Signalintensität wurde das Softwarepaket ImageQuant (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England) verwendet. Die auf *Actin* bezogene Signalintensität von *Ptc* für die Behandlung mit Shh-Protein beträgt 119%. Im Falle der Cyclopamin-Behandlung beträgt die Signalintensität von *Ptc* 5 %.

Die gleichen RNA-Präparationen wurden nun im RNase-Protection Assay untersucht. Mit dieser Methode konnten die schon im Northern-Blot erzielten Ergebnisse bestätigt werden (Abb. 24). Bei der Analyse der Signalintensität von *Ptc* war eine intensivere, geschützte Bande (176%) und somit eine Heraufregulation der *Ptc*-Transkription im Shh-RNA Pool zu beobachten. Für die Cyclopamin-RNA konnte eine sehr schwache geschützte Bande (6%) und somit eine starke Herabregulation der *Ptc*-Transkription nachgewiesen werden. Die Unterschiede in den Meßwerten zwischen Northern-Blot und RNase-Protection Assay liegen in der besseren Quantifizierbarkeit von Transkriptmengen bei den RNase-Protection Assays begründet.

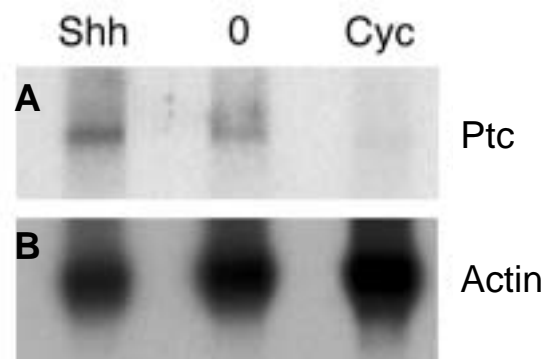


Abb. 23: Die *Ptc*-Transkription wird durch Shh-Protein induziert und durch Cyclopamin inhibiert

Ein Northern Blot von RNA-Präparationen aus Gliedmaßenkulturen wurde mit *Ptc* (oben) und *Actin* (unten) hybridisiert. In RNA aus Shh-behandelter Gliedmaßenkultur (Shh) ist im Vergleich zu der RNA aus Kontrollkultur (0) ein verstärktes *Ptc*-Signal sichtbar. In der Cyclopamin-behandelten RNA (Cyc) ist *Ptc* nahezu nicht mehr nachweisbar.

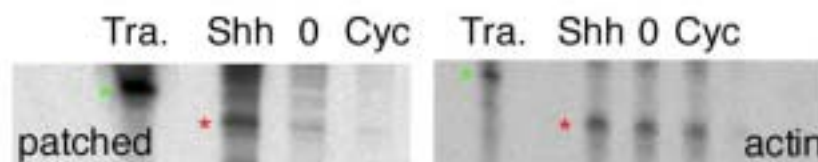


Abb. 24: Nachweis der *Ptc*- und *Actin*-Expression im RNase-Protection Assay

RNA aus Shh-behandelten Gliedmaßenkulturen (Shh, linke Bildhälfte) enthält mehr *Ptc*-Transkript als RNA aus der Kontrollkultur (0, li.). In Cyclopamin-behandelter Gliedmaßenkultur ist *Ptc* schwach nachweisbar (Cyc, li.). Als Kontrolle dient der Nachweis der *Actin*-RNA (rechte Bildhälfte). Hier ist kein Unterschied in den eingesetzten RNA-Präparationen aus Shh-Kultur (Shh), unbehandelter Kultur (0) und Cyclopamin-behandelter Kultur (Cyc) nachweisbar. Tra.: eingesetztes ungeschütztes Fragment (grüner *).

Im Anschluß an die Etablierung des RNase-Protection Assays wurden die 32 identifizierten Klone in diesen RNA-Präparationen untersucht. Bei 30 Klone konnte auch in der doppelten Durchführung des Experimentes keine signifikante Regulation durch Shh oder Cyclopamin nachgewiesen werden. Bei zwei cDNAs konnte im RNase-Protection Assay jedoch eine geringere Signalintensität des geschützten Fragmentes nach Cyclopaminbehandlung festgestellt werden: Dies sind die Klone CT1H8 und ST2C6 (Abb. 25 unten). Zur Bestätigung wurde das Experiment wiederholt (Abb. 26). Anschließend wurden die Signale quantifiziert und der Mittelwert aus den Versuchsansätzen gebildet.

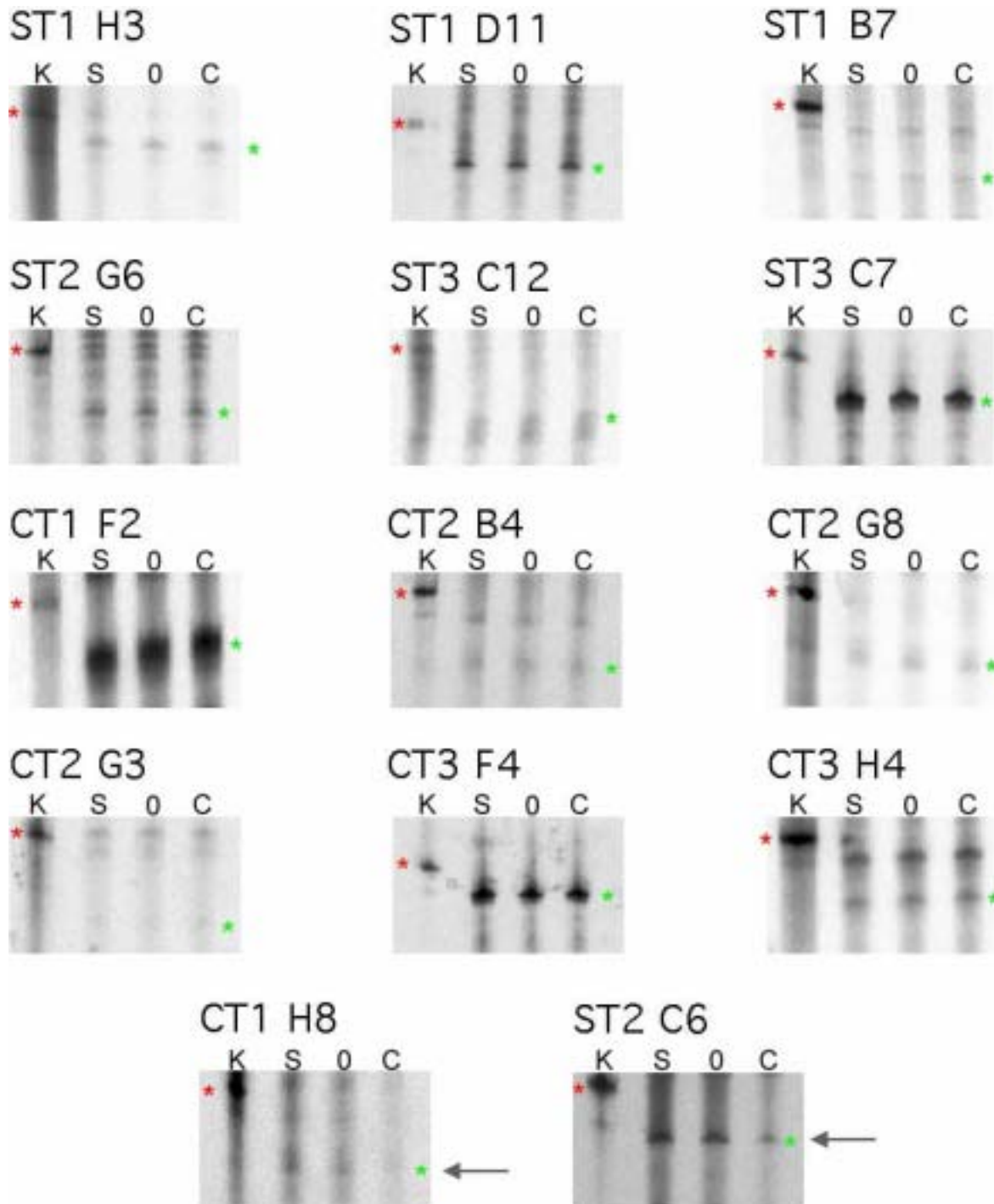


Abb.25: CT1H8-RNA und ST2C6-RNA wird in konditionierter Gliedmaßenkultur reguliert

Die Expression der Transkripte für CT1H8 und ST2C6 wurde nach Shh-Behandlung in der Gliedmaßenkultur (S) im Vergleich zur Kontrolle (0) leicht heraufreguliert. In Folge einer Cyclopamin-Behandlung (C) wurde die Transkriptmenge beider Klone deutlich verringert (Pfeile). Bei den übrigen untersuchten Transkripten konnte keine Regulation nachgewiesen werden. K: eingesetztes, vor RNAse-Verdau ungeschütztes Fragment (roter *); S, 0, C: geschützte Fragmente nach Inkubation mit RNA aus Shh-behandelten Gliedmaßenkulturen, unbehandelten Kulturen oder Cyclopamin-behandelten Kulturen (grüner Stern).

Tab. 1: Quantifizierung des RNase-Protection Assays der Klone CT1H8 und ST2C6 in der Gliedmaßenkultur nach Shh-, Kontroll- oder Cyclopamin-Behandlung

	Shh	0	Cyc
CT1H8	108%	100%	77%
ST2C6	107%	100%	67%

Für den Klon CT1H8 konnte eine um 23 % verminderte Transkriptmenge in der Gliedmaßenkultur nach der Behandlung mit Cyclopamin und eine um 8 % erhöhte Transkriptmenge nach Shh-Behandlung festgestellt werden. Ebenso wie bei dem Klon CT1H8 war bei dem Klon ST2C6 eine Änderung der absoluten Transkriptmenge zu beobachten. Bei Shh-Behandlung fand sich eine Erhöhung der Transkriptmenge um 7 % und bei Cyclopaminbehandlung eine um 33 % geringere Transkriptmenge (Tab. 1).

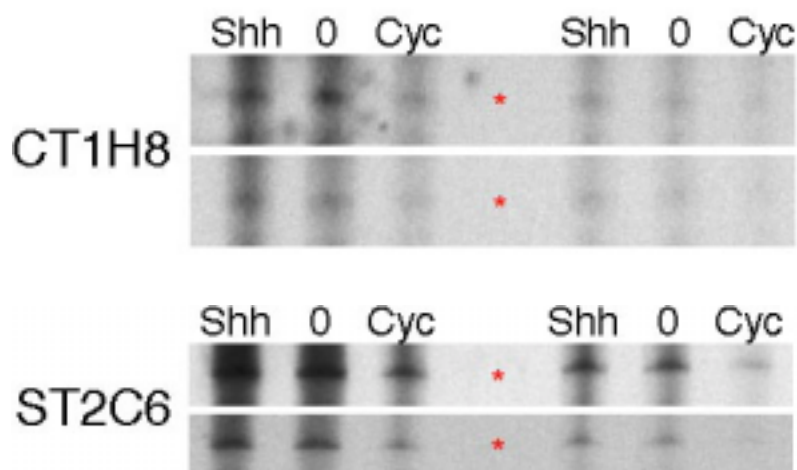


Abb. 26: Wiederholung des RPA für die Klone ST2C6 und CT1H8

Die Klone ST2C6 und CT1H8 wurden in vier unabhängigen RNase-Protection Assays getestet. Es konnte in allen Wiederholungen eine Herabregulation der Transkriptmenge nach Cyclopaminbehandlung festgestellt werden (Cyc). Nach Shh-behandlung ist die Transkriptmenge leicht erhöht (0). Die Quantifizierung der Transkriptmengen ist in Tabelle 1 dargestellt.

4.5 *In-vivo*-Expressionsanalyse der Klone CT1H8 und ST2C6

Um die Regulation von ST2C6 mit der *Ihh*-Expression in einen räumlichen Zusammenhang zu bringen, wurde die Expression von ST2C6 mit der von *Ihh* auf Parallelschnitten verglichen (Abb. 27). *Ihh* wird in prähypertrophen Chondrozyten exprimiert (Vortkamp et al., 1996). Das Signal von ST2C6 grenzt an direkt an die *Ihh*-Expressionsdomäne an: Es konnte eine intensive Expression im die prähypertrophen Chondrozyten flankierenden Perichondrium nachgewiesen werden. Diese perichondriale Expressionsdomäne erstreckt sich weiter gegenüber den hypertrophen Chondrozyten und dem Knochen in der Mitte des Skelettelementes. Weiterhin wird ST2C6 direkt im Knochen exprimiert. Diese direkte Aneinandergrenzung der ST2C6- und *Ihh*-Expressionsdomänen legt die Vermutung nahe, daß ST2C6 durch *Ihh* reguliert werden kann.

Bei dem Klon CT1H8 konnten Expressionsdomänen in der Region der prähypertrophen Chondrozyten und in der zentralen Knochenanlage gefunden werden (Abb. 28). Hypertrophe Chondrozyten, proliferierende Chondrozyten sowie das Perichondrium zeigten keine CT1H8-Expression. Auch hier liegt die Vermutung nahe, daß die Überlappung der CT1H8-Expressionsdomäne in den prähypertrophen Chondrozyten sowie die Expression im Knochen eine positive Regulation dieses Klones durch *Ihh* zur Folge haben kann.

4.6 Rückbestätigung der differentiellen Genexpression

Um eine *Ihh*-abhängige Expression der Klone CT1H8 und ST2C6 im Gewebe nachzuweisen, wurde die Expression dieser Gene in der Organkultur sowie in zwei verschiedenen transgenen Mauslinien untersucht.

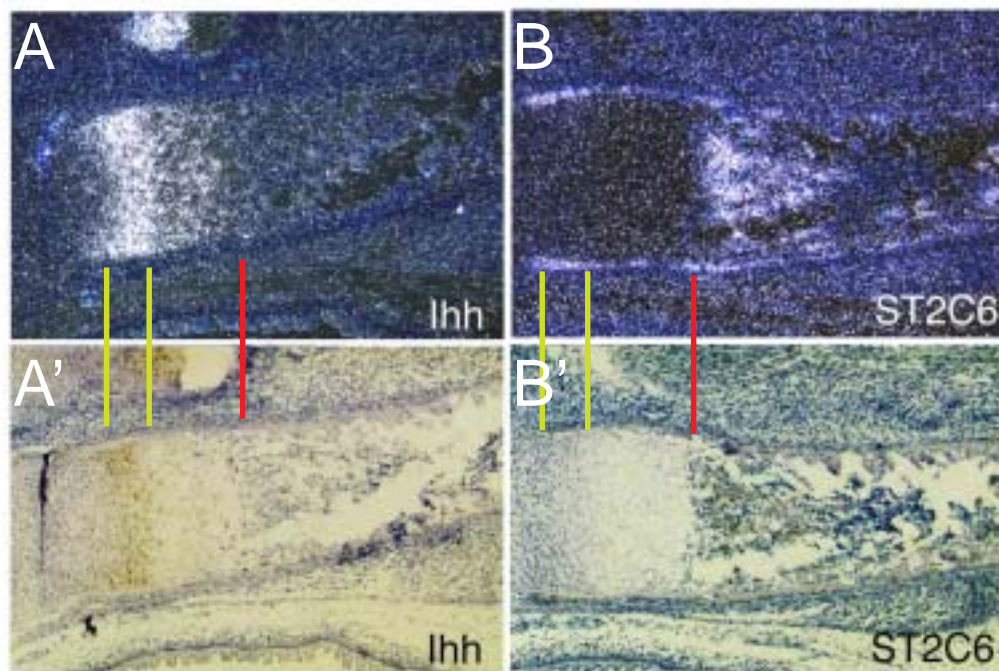


Abb. 27: Vergleich der ST2C6-Expressionsdomäne mit der *Ihh*-Expression

Ihh-Transkripte (A, Dunkelfeld; A' Hellfeld) und ST2C6-Transkripte (B, Dunkelfeld; B' Hellfeld) wurden an E 16,5 Mausgliedmaßen nachgewiesen. ST2C6 wird stark im Periosteum in Nähe zur *Ihh*-Quelle exprimiert. Weiterhin ist es im Periosteum gegenüber den prähypertrophen Chondrozyten und im Knochen exprimiert (B). Der Bereich der prähypertrophen Chondrozyten ist durch zwei grüne Striche gekennzeichnet. Ab dem roten Strich ist calcifizierter Knochen sichtbar.

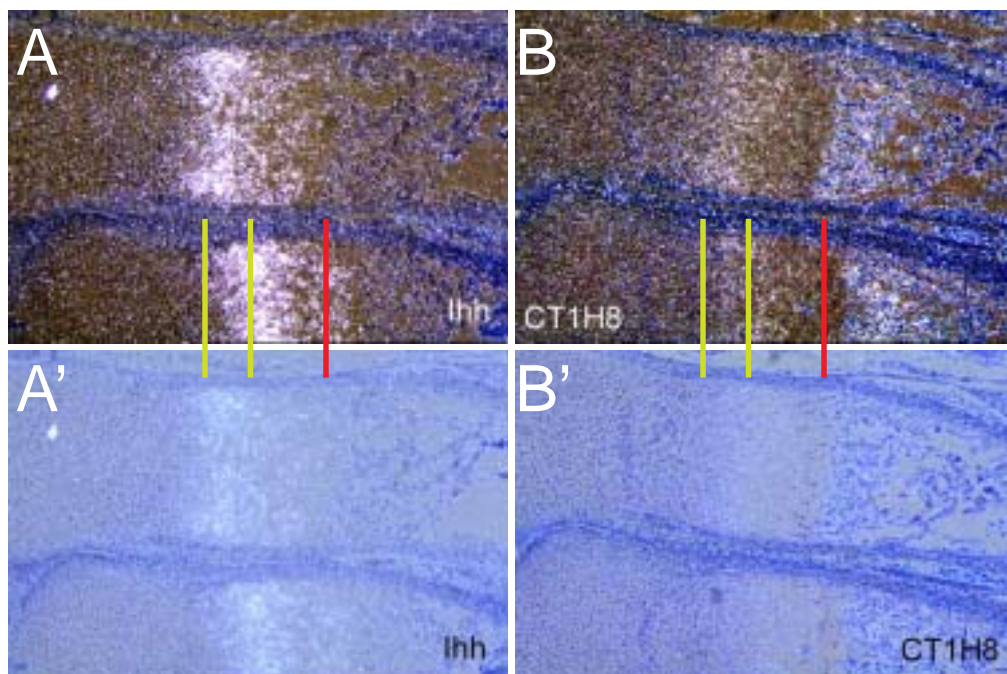


Abb. 28: Vergleich der Expressionsdomänen von CT1H8 mit der *Ihh*-Expression

Ihh-Transkripte (A, Dunkelfeld; A' Hellfeld) und CT1H8-Transkripte (B, Dunkelfeld und B', Hellfeld) wurden an E 16,5 Mausgliedmaßen nachgewiesen. CT1H8 (B) wird überlappend mit *Ihh* (A) exprimiert (grüne Striche). Weiterhin ist eine CT1H8-Expression im Knochen erkennbar (roter Strich).

Hierzu wurden E 16,5 und E 14,5 Vordergliedmaßen für 12 h in supplementiertem Medium (Cyclopamin, Shh-Protein und unconditioniert) in Kultur genommen und anschließend durch *in-situ*-Hybridisierung analysiert. Die Cyclopaminbehandlung bewirkt eine Herabregulation der Genexpression des Klonen CT1H8 (Abb. 29 C und I). Bei Shh-Behandlung war kein Unterschied festzustellen (Abb. 29 A und G). Die Expressionsdomäne des Klonen ST2C6 ist nach 12 h Gliedmaßenkultur kleiner und schwächer als bei frisch präparierten Gliedmaßen. Weder die Gabe von Shh noch die Gabe von Cyclopamin konnte eine Veränderung der ST2C6-Expression bewirken (Abb. 29 D, E, F und J, K, L).

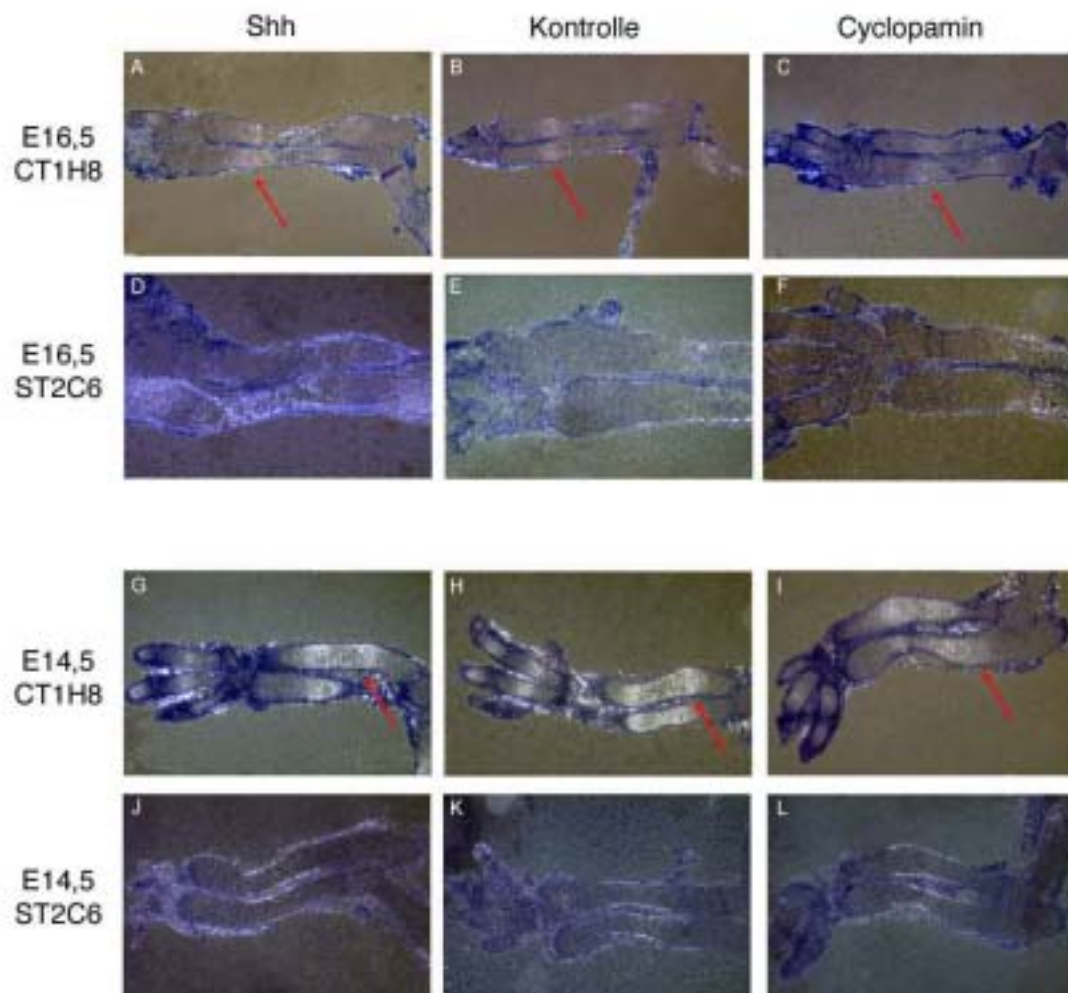


Abb. 29: Der Klon CT1H8 wird in der Organkultur nach Cyclopamingabe herabreguliert

Kulturen von embryonalen Gliedmaßen der Stadien E 14,5 und E 16,5 wurden für 12 h in Organkultur mit Shh-Protein (A, D, G, J), Cyclopamin (C, F, I, L) und unbehandeltem Medium (B, E, H, K) supplementiert. Das Expressionsniveau des Klonen CT1H8 nimmt bei 12 h Behandlung mit Cyclopamin im Vergleich zur Behandlung mit Shh-Protein und Kontrollmedium deutlich ab (rote Pfeile, A, B, C). Für den Klon ST2C6 konnte keine merkliche Veränderung der Expressionsdomäne beobachtet werden (G, H, I).

Im Anschluß wurde die Genexpression von CT1H8 und ST2C6 bei E 16,5 Vordergliedmaßen von Mäusen, in denen *Ihh* deletiert war (*Ihh* ^{-/-}), untersucht (St-Jacques et al., 1999). Es konnte in der *in-situ*-Hybridisierung wie erwartet keine *Ihh*-Expression gefunden werden (Abb. 30 C). Ebenso ist in den Knochenanlagen keine *Ptc*-Expression sichtbar, wogegen die bereits beschriebene *Ptc*-Expressionsdomäne in den Haarfollikeln erhalten bleibt (Bitgood und McMahon 1995, Abb. 30 D, roter Stern). Eine Expression von ST2C6 und CT1H8 ist bei *Ihh*-defizienten Tieren durch *in-situ*-Hybridisierung nicht nachweisbar (Abb. 30 B und C). Die Aktivierung von ST2C6 und CT1H8 ist daher wahrscheinlich von einem funktionalem *Ihh*-Signalweg abhängig.

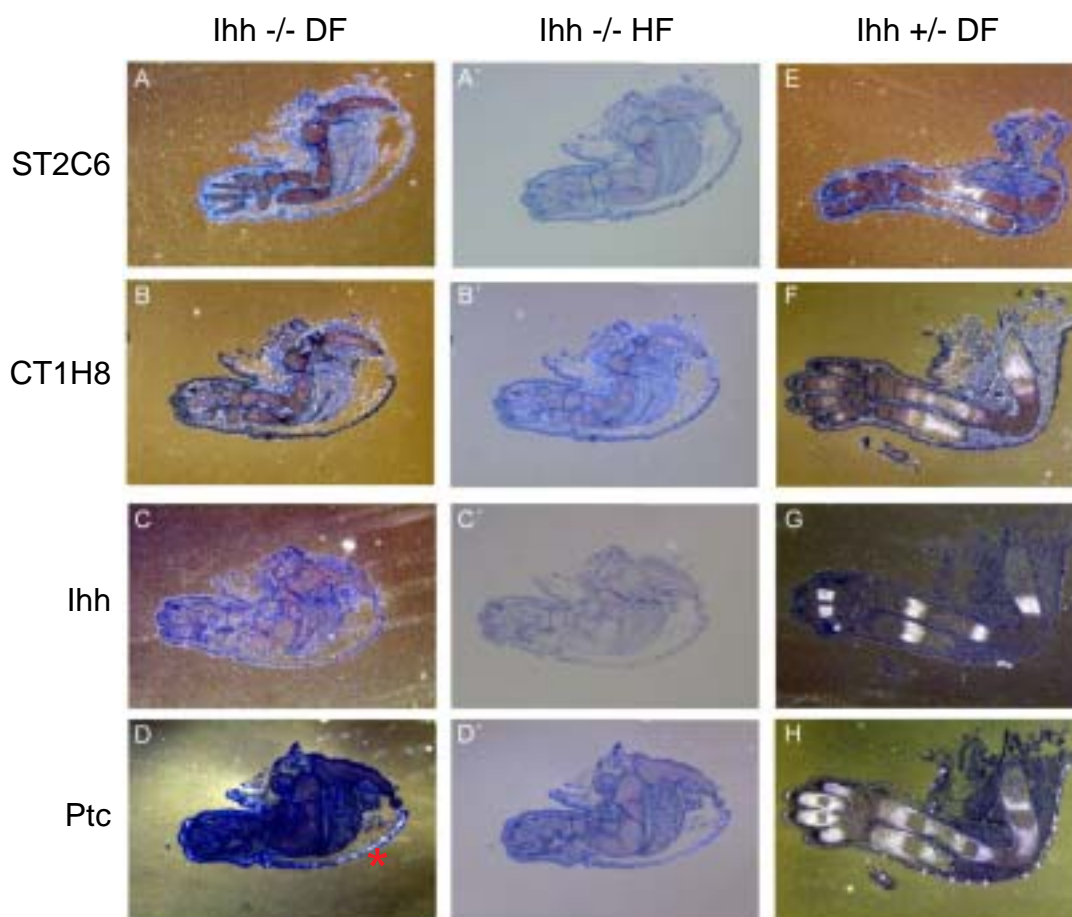


Abb. 30: ST2C6 und CT1H8 liegen downstream von *Ihh*

E 16,5 *ihh* ^{-/-} und *ihh* ^{+/-} Gliedmaßenschnitte wurden mit Proben für *Ptc*, *Ihh*, CT1H8 und ST2C6 hybridisiert. Bei Skelettanlagen von *Ihh*-defizienten Mäusen konnten im Dunkelfeld (*Ihh* ^{-/-} DF) keine Expressionsdomänen für *Ihh* (C), ST2C6 (A) und CT1H8 (B) nachgewiesen werden. Bei diesen Tieren ist eine *Ptc*-Expression in den Skelettanlagen nicht nachweisbar. In den Haarfollikelanlagen ist *Ptc* jedoch weiterhin exprimiert (D; roter *). Zur Kontrolle wurde die Expression von ST2C6 (E), CT1H8 (F), *Ihh* (G) und *Ptc* (H) bei *Ihh* ^{+/-} Vordergliedmaßen nachgewiesen (*Ihh* ^{+/-} DF). Heterozygote Tiere zeigen ebenso wie wt-Tiere keinen Phänotyp (nicht gezeigt).

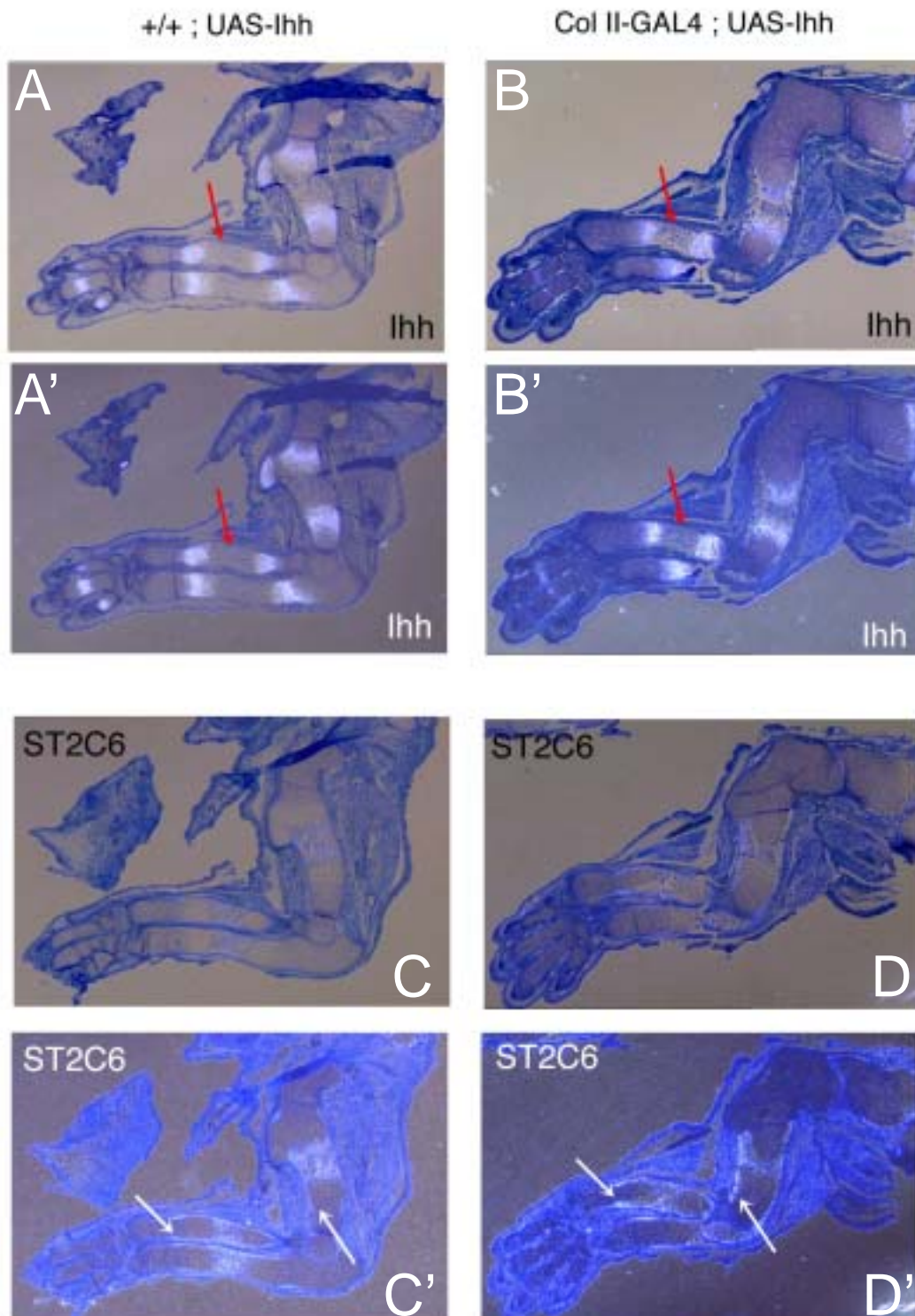


Abb. 31: ST2C6 wird bei *Ihh*-überexprimierenden Mäusen heraufreguliert

An E 16,5 *UAS-Ihh* Vordergliedmaßenanschnitten wurde die Expression von *Ihh* (A, Hellfeld; A', Dunkelfeld) und ST2C6 (C, Hellfeld, C', Dunkelfeld) nachgewiesen. In Schnitten von *Ihh*-überexprimierenden Mäusen (*Col II-GAL4 ; UAS-Ihh*) konnten im Vergleich zur Kontrolle (weiße Pfeile in C') vergrößerte Expressionsdomänen für ST2C6 nachgewiesen werden (weiße Pfeile D'). Durch die Überexpression von *Ihh* weisen die *Col II-GAL4 ; UAS-Ihh*-Mäuse im Vergleich zur Kontrolle (A und A') eine verzögerte Differenzierung mit näher beieinander liegenden *Ihh*-Expressionsdomänen auf (roter Pfeil in B').

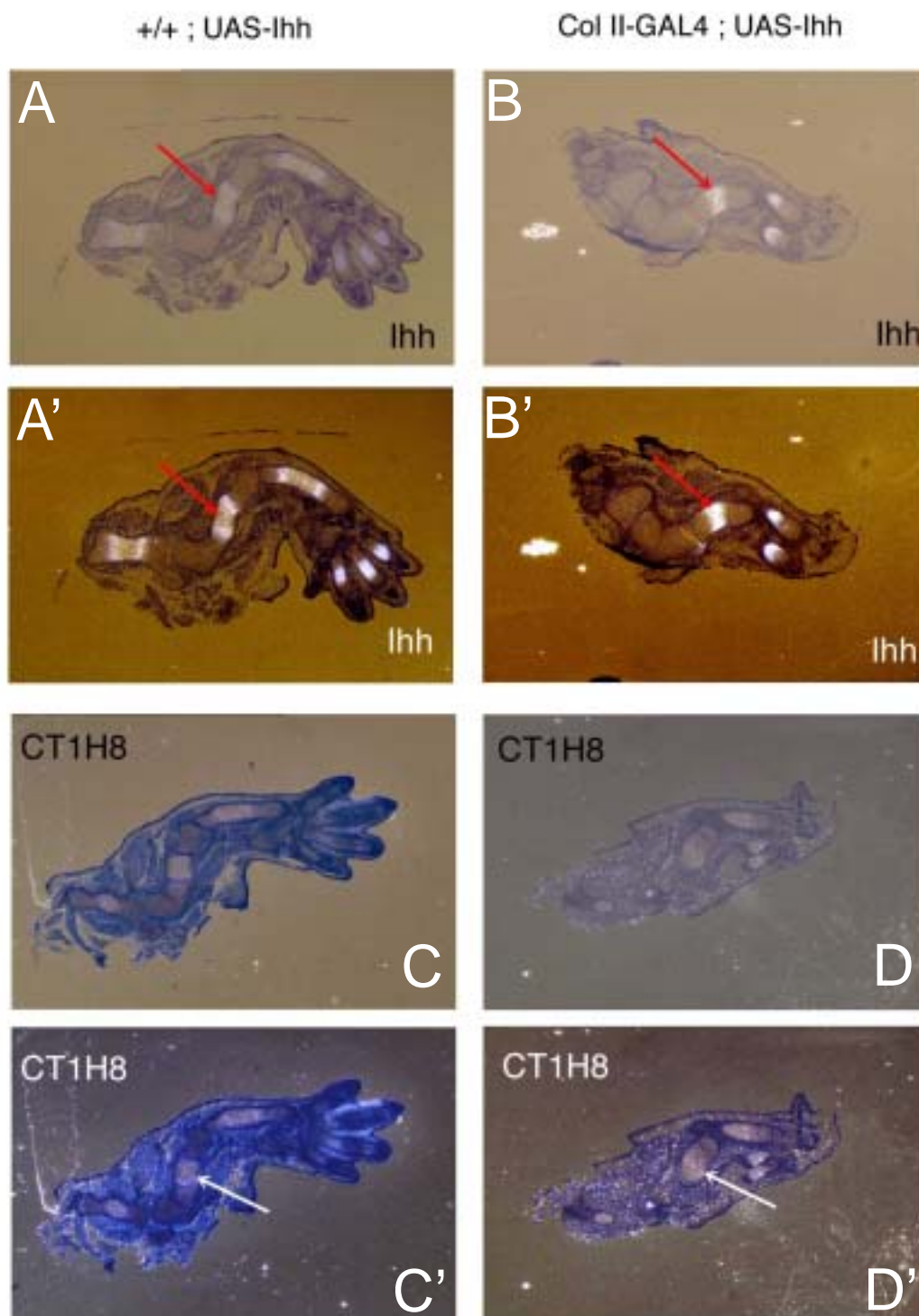


Abb.32: CT1H8 wird bei *Ihh*-überexprimierenden Mäusen heraufreguliert

An E 14,5 *UAS-Ihh* (A, A', C, C') und *Col II-GAL4 ; UAS-Ihh* (B, B', D, D') Vordergliedmaßenschnitten wurden CT1H8 (C, C', D, D') und *Ihh* (A, A', B, B') nachgewiesen. In *Col II-GAL4 ; UAS-Ihh* Tieren konnte im Vergleich zur Kontrolle (weiße Pfeile in C') eine verstärkte Expression von CT1H8 nachgewiesen werden (weißer Pfeil, D'). Durch die Überexpression von *Ihh* weisen die *Col II-GAL4 ; UAS-Ihh*-Mäuse im Vergleich zur Kontrolle (roter Pfeil in A') eine verzögerte Differenzierung mit näher beieinander liegenden *Ihh*-Expressionsdomänen auf (roter Pfeil in B').

Ein letzter Ansatz zur *in-vivo*-Rückbestätigung der *Ihh*-abhängigen Regulation von CT1H8 und ST2C6 war die Expressionsanalyse in *Ihh*-überexprimierenden Mäusen. Um *Ihh* unter der Kontrolle des Kollagen Typ-II-Promotors überzuexprimieren, wurden zwei verschiedene Mauslinien verkreuzt: Eine transgene Mauslinie trägt den Transkriptionsaktivator *GAL4* aus Hefe unter der Kontrolle des Kollagen Typ-II-Promotors (*Col II-GAL4*) und eine weitere Mauslinie die *GAL4*-Zielsequenz *UAS* gefolgt von der cDNA des *Ihh*-Orthologes aus dem Huhn (*UAS-Ihh*) (Rowitch et al. 1999; Long et al. 2001; Minina et al. 2001). Die Kreuzung dieser beiden Mauslinien führt bei 25 % des Nachwuchses zum Vorhandensein beider Konstrukte im Mausgenom. Als Folge kann der unter der Kontrolle des *Col-II*-Promotors exprimierte *GAL4*-Transkriptionsaktivator an die *UAS*-Zielsequenz binden und somit die Expression von *Ihh* initiieren. Die Überexpression von *Ihh* in *Col II-GAL4;UAS-Ihh*-Mäusen führt zu einem Phänotyp mit verzögerter Differenzierung der Chondrozyten (Minina et al. 2001, Abb. 31 A´ und B´ sowie Abb. 32 A´ und B´, rote Pfeile).

Die Analyse der Genexpression von ST2C6 und CT1H8 zeigte bei dieser *Ihh*-überexprimierenden Mauslinie folgendes Ergebnis: Die Expression von ST2C6 wird im Perichondrium gegenüber der Domäne der prähypertrophen Chondrozyten verstärkt (Abb. 31 D´, Pfeil). Ebenso ist die Expression von CT1H8 in *Ihh*-überexprimierenden Mäusen heraufreguliert (Abb. 32 D´).

4.7 Das Transkript von ST2C6

Zur Bestimmung der Transkriptlänge von ST2C6 wurde ein Northern Blot aus RNA von embryonalen Gliedmaßen hergestellt und mit dem im Screen identifizierten cDNA-Fragment hybridisiert. Die Transkriptlänge ist auf etwa 6000 Nukleotiden bestimmt worden (Abb. 33).

Da es sich bei dem Klon ST2C6 um ein bisher unbekanntes Genprodukt handelte, wurden weitere computergestützte Analysen durchgeführt. Um die Sequenz des Transkriptes zu ermitteln, wurde die Maus EST-Datenbank nach Sequenzen durchsucht, die mit ST2C6 überlappen. Durch Aneinanderreihung der EST-Fragmente konnten 144 Maus-ESTs identifiziert werden, die eine Transkriptlänge von 5690 Basen überspannen (EST-Contig). Für dieses Verfahren wurden Celera (Mus Transcript Assembly, Mus Transcript Database) und NCBI-Datenbanken (Mus EST, Mus Unigene) genutzt. Das computergestützt erreichte Ergebnis deckt sich mit der im Northern-Blot determinierten physikalischen Transkriptlänge. Das gefundene DNA-Fragment vom Klon ST2C6 konnte vollständig in diesen EST-Contig integriert werden (Abb. 34). Es konnte ein offener-Leserahmen (ORF) von 2727 Nukleotiden, entsprechend 909 Aminosäuren identifiziert werden. Ein 87 b umfassender Teil der kodierenden Sequenz im 5'-Bereich von ST2C6 ist in einigen EST-Sequenzen zu

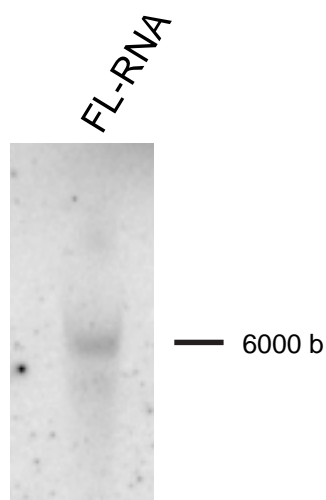


Abb. 33: Das ST2C6-Transkript umfaßt 6000 Basen

Aufgetragen wurde ein RNA-Größenstandard (nicht gezeigt) und RNA aus E 16,5 dpc NMRI-Mausgliedmaßen (FL-RNA). Die Hybridisierung erfolgte mit dem im Screen identifizierten ST2C6-Fragment. Anhand des Größenstandards konnte für ST2C6 eine Transkriptlänge von ca. 6000 Basen festgestellt werden.

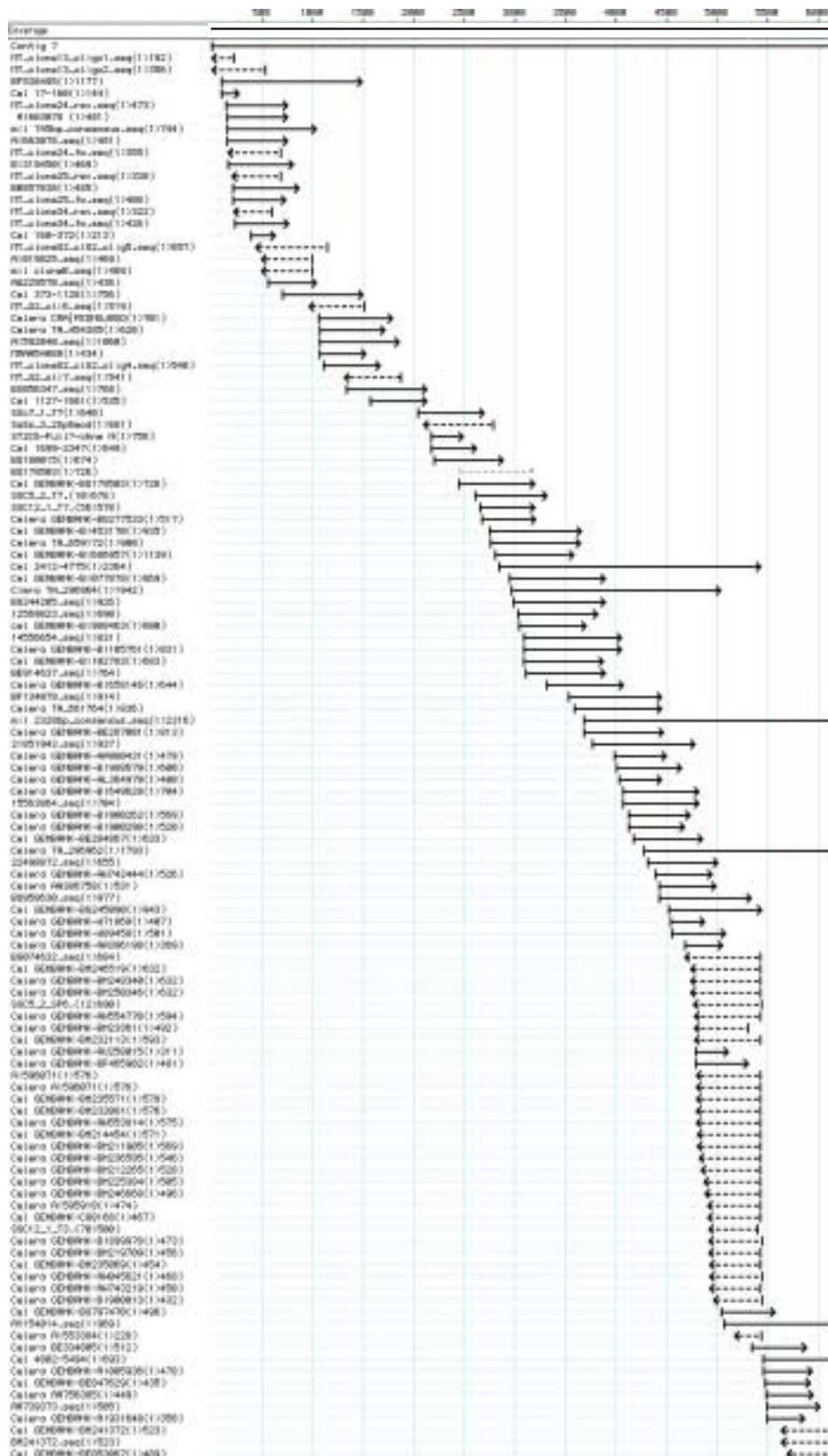


Abb. 34: Kontinuierliche EST-Überlappung für das Gen ST2C6 (EST Contig)
 Ausgehend von der Sequenz des Klonen ST2C6 konnten computergestützt über 150 EST-Sequenzen gefunden werden, die miteinander überlappen. Diese Abbildung zeigt 120 dieser Sequenzen und deren Überlagerung zu einer Consensus-Sequenz.

finden, in anderen jedoch nicht. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um ein alternativ gespleißtes Exon.

Um den genomischen Locus von ST2C6 zu identifizieren, wurde mit dem vorhergesagten Transkript das Maus-Genom durchsucht (www.celera.com). Der genomische Locus für das ST2C6 Gen konnte auf dem Maus Chromosom 15 in der Bande 15E3 lokalisiert werden. Er umfaßt etwa 185 kbp. In diesem Fragment sind 20 Exons mit einem alternativen Exon enthalten (Abb. 35). Das erste Intron umfaßt ca. 85 kbp. Das zweite Exon ist alternativ gespleißt und umfaßt 87 bp. Die ersten 19 der 20 Exons sind meist deutlich kürzer als 250 bp, während das letzte Exon 2981 bp lang ist (s. Abb. 35).

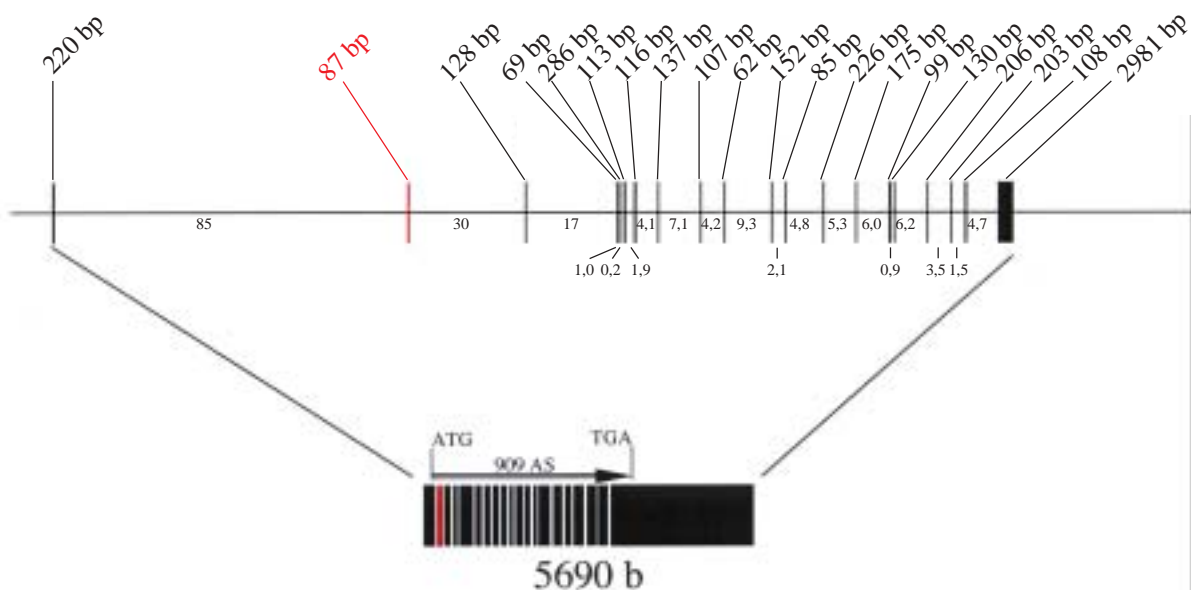


Abb. 35: Genomischer Locus von ST2C6

Das Alignment der Konsensus-Sequenz gegen das Mausgenom zeigt vollständige Übereinstimmung über einen Bereich von 185 kbp. Es konnten 20 Exons sowie ein alternatives Exon vollständig im Mausgenom identifiziert werden. Der hier gezeigte Genlocus befindet sich auf dem Mausechromosom 15E3. In der oberen Zeile ist die Größe der einzelnen Exons angegeben. Das alternative zweite Exon ist rot dargestellt. Die Introngrößen sind in kbp in kleiner Schrift zwischen den Exonsymbolen angegeben.