

---

## 5 Diskussion

### 5.1 Identifikation von Zielgenen im Indian Hedgehog-Signalweg

Bei der Maus wird die Anzahl vorhandener Gene zwischen 30.000 und 70.000 geschätzt (Venter et al. 2001; Wright et al. 2001). Von dieser großen Zahl wird jedoch nur ein geringer Anteil (etwa 15 %) in jeder individuellen Zelle exprimiert. Die zeitliche und räumliche Regulation der Genexpression in einem Organismus bildet die Grundlage für das Leben. Das Genexpressionsmuster jeder Zelle ist abhängig von vielen Einflüssen. Dazu gehören der Entwicklungsstatus, das Alter und die Art des Gewebes. Eine wichtige Fragestellung in der Analyse von Entwicklungsprozessen ist die Identifikation und Charakterisierung der Gene, die in einem bestimmten Gewebe differentiell exprimiert sind.

Die Familie der Hedgehog-Proteine sind wesentliche Signalfaktoren für die Entwicklung lebenswichtiger Organsysteme (Hammerschmidt et al. 1997). Dazu gehören unter anderen der Darm (Sukegawa et al. 2000), verschiedene neuronale Gewebe (Ekker et al. 1995; Marigo und Tabin 1996), die Haut (Chiang et al. 1999) und die Lunge (Mahlpuu et al. 2001). Auch die Knochendifferenzierung wird durch ein Mitglied dieser Genfamilie, *Indian-Hedgehog (Ihh)*, reguliert. Das Genprodukt von *Ihh* kann als Schlüsselfaktor zur Kontrolle der Chondrozytendifferenzierung angesehen werden, da diese über den Ihh/PTHrP-Rückkopplungskreis reguliert wird (Vortkamp et al. 1996). *Ihh*-defiziente Mäuse zeigen keine Chondrozytenproliferation und sind nicht in der Lage, Knochen auf dem Wege der endochondralen Ossifikation zu bilden (St-Jacques et al. 1999). Diese Effekte sind nicht durch den Ihh/PTHrP-Rückkopplungskreis beeinflusst. Es muß davon ausgegangen werden, daß Ihh allein wesentlicher Signalfaktor für diese Prozesse ist (St-Jacques et al. 1999). Ihh ist somit von PTHrP-unabhängig an der Induktion der endochondralen Ossifikation beteiligt.

Das Auffinden von neuen, unmittelbar durch die Ihh-Signaltransduktion aktivierten Zielgenen ermöglicht eine genaue Charakterisierung des Ihh-Signalweges. Die Identifikation und Analyse solcher Zielgene eröffnet die Möglichkeit, Signalkaskaden aufzudecken, die bestimmte Entwicklungsprogramme, wie die Knochenbildung oder

Chondrozytenproliferation, initiieren. Solche Zielgene ermöglichen neue Ansätze in der Therapie von Erkrankungen des Knochenapparates und der Frakturheilung sowie bei Erbkrankheiten und Tumoren, bei denen der Hh-Signalweg beteiligt ist (Fan et al. 1997; Reifenberger et al. 1998; Xie et al. 1998).

## 5.2 Inhibition des Ihh-Signalweges durch Antikörper

Zur Identifikation von Zielgenen des Ihh-Signalweges wurde cDNA aus Gewebe mit aktiviertem oder inaktiviertem Ihh-Signalweg verglichen, um spezifisch regulierte Gene zu finden. Dafür mußte eine Methode etabliert werden, mit der der Ihh-Signalweg effektiv inhibiert werden kann. Zunächst wurde eine Inhibition des Ihh-Signalweges mit Antikörpern in Betracht gezogen und untersucht. Der dafür genutzte monoklonale Antikörper (mAb) 5E1 reagiert auf einen Teil des Shh-Signalpeptids und inhibiert von Shh ausgelöste Signalprozesse (Ericson et al. 1996; Outram et al. 2000; Zhang und Yang 2001). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine Kreuzreaktion des mAb 5E1 mit Ihh nachgewiesen werden. Darauf aufbauend wurde versucht, den Ihh-Signalweg in der Gliedmaßenkultur durch den mAb 5E1 zu inhibieren. Die Behandlung der Gliedmaßen mit dem mAb 5E1 führte bereits nach 24 h Kultur zu einer leichten Repression der Genexpression des bekannten Ihh-Zielgenes *Ptc*. Nach einer Inkubationszeit von vier Tagen war zusätzlich eine leicht verstärkte Differenzierung der Chondrozyten sichtbar. Durch den Antikörper wird Ihh an einer Bindung an Ptc und damit der Induktion der Ihh-Signalkaskade gehindert. Dies führt zu einer abgeschwächten Induktion von PTHrP in der periartikulären Region. Da PTHrP die Differenzierung der Chondrozyten blockiert, hat eine geringere PTHrP-Dosis also eine verstärkte Chondrozytendifferenzierung zur Folge, was auch in diesen Experimenten zu beobachten war. Es konnte somit erstmals eine hochspezifische Inhibition des Ihh-Signalweges durch den mAb 5E1 gezeigt werden.

Bei der Behandlung mit mAb 5E1 war eine vollständige Repression der *Ptc*-Transkription nicht möglich. Da *Ptc* als Indikator für Ihh-Signalaktivität angesehen werden kann, ist davon auszugehen, daß der Ihh-Signalweg durch mAb 5E1 nicht

vollständig inhibiert wurde. Eine vollständige Inhibition der Ihh-Zielgenexpression ist jedoch wichtig für die erfolgreiche Identifikation von neuen Zielgenen. Es muß ein möglichst großer Unterschied zwischen Inhibition und Aktivierung des Ihh-Signalweges erreicht werden, damit die folgende Isolation von Ihh-Zielgenen optimal verläuft. Um die inhibitorische Wirkung des Antikörpers zu erhöhen, wurde dieser in seine Fab- und Fab<sub>2</sub>-Fragmente gespalten. Die Antikörperfragmente weisen eine geringere Molekülgröße als gesamt-IgGs auf. Daher besteht die Möglichkeit, daß der Effekt von 5E1 nach der Spaltung des gesamt-IgGs verstärkt wird. Die proteolytische Spaltung des Antikörpers in seine Untereinheiten und Applikation der Fragmente in die Gliedmaßenkultur sollte eine effektivere Diffusion in das Gewebe mit einer stärkeren Inhibition des Ihh-Signalweges bewirken. Bei Fab- oder Fab<sub>2</sub>-Applikation konnte jedoch keine signifikante Steigerung des Effektes, der durch das gesamt-IgG hervorgerufen wird, erzielt werden. In Gliedmaßenkulturen, die mit Antikörperfragmenten behandelt wurden, war ebenfalls eine schwache Inhibition der *Ptc*-Expression mit einer leicht stärkeren Chondrozytendifferenzierung sichtbar. Da Antikörper und dessen Fragmente Proteine sind, die Ladungen aufweisen, können sie in wässriger Lösung mit anderen Proteinen, wie z.B. der extrazellulären Matrix, in Wechselwirkung treten. Dadurch wird die ungehinderte Diffusion des Antikörpers und der Antikörperfragmente in der Organkultur eingeschränkt. Es gelangt nicht genügend Antikörper in das Gewebe, um Ihh vollständig zu binden. Ein weiterer möglicher Grund für die partielle Inhibition bei der Antikörperbehandlung liegt vermutlich in der großen Masse der Antikörper und der Antikörperfragmente. Das Molekulargewicht eines Maus IgG liegt bei ca. 150 kDa, das eines Fab<sub>2</sub>-Fragmentes bei 110 kDa und das eines Fab-Fragmentes bei 50 kDa (Ausubel et al. 1987-1999; Sambrook et al. 1989). Die Größe dieser Proteine behindert eine Diffusion im Gewebe zusätzlich.

### 5.3 Cyclopamin als Inhibitor des Hedgehog-Signalweges bei Vertebraten

Das Hauptalkaloid des weißen Nieswurz (*Veratrum californicum*), Cyclopamin, wurde als verursachendes Agens für schwere, zyklopenhafte Mißbildungen unter dem Nachwuchs von Schafherden in Nordamerika identifiziert (Keeler 1970, 1973a,

1973b). Von Cyclopamin induzierte Mißbildungen manifestieren sich unter anderem in einer fehlenden Zweiteilung der Hirnsphären (Holoprosencephalie) sowie Defekten in der Organogenese der Gliedmaßen.

Die molekulare Ursache der teratogenen Wirkung von Cyclopamin wurde erst etwa 20 Jahre später, nach Aufklärung des Shh-Signalweges, geklärt. (Incardona et al. 1998, 2000a; Incardona und Roelink 2000). Es konnte festgestellt werden, daß Cyclopamin eine Blockade des Shh-Signalweges durch direkte Interaktion mit Smo bewirkt (Chen et al. 2002a, 2002b; Taipale et al. 2002). Dies findet an den Transmembranbereichen dieses Proteins statt. Diese Interaktion bewirkt wahrscheinlich eine Konformationsänderung und damit eine Inaktivierung des gesamten Proteins (Christopoulos und Kenakin 2002). Als Folge ist eine von Shh abhängige Signalweiterleitung nicht mehr möglich und es treten Mißbildungen während der Embryonalentwicklung auf.

Durch Applikation von Cyclopamin können von Shh beeinflusste Prozesse wie die Entwicklung der Haarfollikel (Chiang et al. 1999), die Musterbildung im Darm (Sukegawa et al. 2000), Teile der Insulinproduktion (Thomas et al. 2000) und viele Entwicklungsprozesse des zentralen Nervensystems (Dahmane et al. 2001; Tekki-Kessaris et al. 2001) *in-vitro* und *in-vivo* inhibiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, daß neben dem Shh-Signalweg auch der Ihh-Signalweg effektiv durch Cyclopamin inhibiert werden kann. Nach Gabe von Cyclopamin in der Gliedmaßenkultur blieb die durch Ihh induzierte *PTHrP*-Expression aus. Als Folge davon differenzierten die Chondrozyten stärker als in unbehandelten Gliedmaßen. Dieser Effekt konnte durch zusätzliche Gabe von PTHrP kompensiert werden. Es kann daher von einer spezifischen Unterbrechung des Ihh-Signalweges ausgegangen werden. Im Gegensatz zur partiellen Inhibition des Ihh-Signalweges durch Antikörper führte Cyclopamin zu einer nahezu vollständigen Repression des Zielgens *Ptc*.

---

Cyclopamin ist ein organisches Molekül mit einem Molekulargewicht von 411 Da und amphipathischem Charakter. Es kann aufgrund seiner geringen Größe frei durch die extrazelluläre Matrix diffundieren und gliedert sich leicht in die Lipidstruktur der Zellmembran ein, wo es eine Interaktion und Inhibition von Smo induziert (Incardona et al. 1998; Chen et al. 2002a). Es eignet sich besser zur Ihh-Zielgenrepression als Antikörper und wurde daher in dieser Arbeit weiter verwendet.

Für die Verwendung von Cyclopamin in der Gliedmaßenkultur war es nötig, eine optimale Konzentration zu finden, bei der eine maximale Blockierung des Ihh-Signalweges erzielt werden kann, ohne daß toxische Effekte auftreten. Die in dieser Arbeit für die Organkultur ermittelte optimale Cyclopamin-Konzentration von 10 µM deckt sich mit bisher veröffentlichten Versuchsbedingungen (Incardona et al. 1998; Kim und Melton 1998; Chiang et al. 1999). Weiterhin war es nötig, die optimale Dauer der Cyclopaminbehandlung zu bestimmen. Innerhalb dieses Behandlungszeitraumes sollte eine Blockade der Expression von Ihh-Zielgenen eintreten, wobei jedoch keine Änderung der Differenzierung erreicht werden soll. So induziert Cyclopamin über einen Zeitraum von vier Tagen die Genexpression von *Col-X* in der Gliedmaßenkultur. Es handelt sich bei *Col-X* um einen Differenzierungsmarker, der den veränderten Differenzierungsstatus widerspiegelt. *Col-X* ist jedoch kein Zielgen von Ihh. Es ist daher wichtig, eine Inhibition bzw. Stimulation des Ihh-Signalweges über einen kurzen Zeitraum durchzuführen. Als Indikator für die Inhibition des Ihh-Signalweges diente das Expressionsniveau von *Ptc* (Lanske et al. 1996; Vortkamp et al. 1996). Der Zeitraum, nachdem die *Ptc*-Expression in der Cyclopamin-behandelten Kultur embryonaler Mausgliedmaßen nahezu vollständig reprimiert wurde, betrug 12 h.

#### **5.4 Aktivierung des Ihh-Signalweges**

Für die Aktivierung des Ihh-Signalweges wurde bereits in verschiedenen Veröffentlichungen rekombinantes Shh-Protein genutzt (Vortkamp et al. 1996; Lanske et al. 1996).

Wie bei der Cyclopamin-Kultur wurde für die Stimulation des Ihh-Signalweges durch Shh-Protein ein Zeitraum von 12 h gewählt; nach dieser Zeit tritt eine Aktivierung von *Ptc* auf. Nach einer so kurzen Inkubationsdauer ist analog zum Cyclopamin davon auszugehen, daß ausschließlich direkte Zielgene des Ihh-Signalweges reguliert werden und nicht spätere Gene, die einen bestimmten Differenzierungszustand charakterisieren.

#### **5.4 Screen nach Zielgenen im Indian Hedgehog-Signalweg**

Aufbauend auf die gezeigte Inhibition des Ihh-Signalweges durch Cyclopamin sowie die Induktion des Ihh-Signalweges mit rekombinantem Shh-Protein sollte eine Methode etabliert werden, die es ermöglicht, neue Zielgene im Ihh-Signalweg zu identifizieren.

Für diese Untersuchung kommen verschiedene Methoden in Frage, von denen im Folgenden drei diskutiert werden. Die Expressionsanalyse kann durch differential display, Microarrays oder subtraktive Hybridisierung erfolgen. Die Wahl für die weitere Analyse fiel auf die Methode der subtraktiven Hybridisierung.

Die Methode des differential display dient der direkten Sichtbarmachung und Beurteilung von veränderter Genexpression (Liang und Pardee 1992; Liang et al. 1993). Durch RT-PCR mit 5'-randomisierten Primern in Kombination mit konstanten 3'-XY-polyA-Primern erhält man einen Pool von PCR-Produkten. Nach Auftrennung der PCR-Produkte durch PAGE ergibt sich für jede Primerkombination ein spezifisches Bandenmuster. Unterschiede im Bandenmuster der zu vergleichenden RNA-Populationen deuten auf eine differentielle Genexpression in den beiden Ausgangsgeweben hin. Diese Methode ermöglicht eine direkte Visualisierung regulierter Transkriptfragmente. Die Anwendung dieser Methode bringt jedoch einige Nachteile mit sich. Zunächst ist es trotz der guten Auflösung durch Sequenzgele schwierig, gezielt das regulierte Fragment aus dem Gel zu isolieren und zu klonieren, da die Banden sehr nahe beieinander liegen. Ein weiterer Nachteil ist, daß das

gesamte Transkriptom miteinander verglichen wird. Ein Ausschluß von konstitutiv exprimierten Genen (housekeeping-Gene), die aufgrund ihres häufigen Vorkommens wahrscheinlich auch präferentiell in der PCR amplifiziert werden, ist nicht möglich. Es ist daher wahrscheinlich, daß differentielle Signale durch Überlagerung von Banden der housekeeping-Gene verloren gehen.

Eine weitere Möglichkeit zur Analyse der Genexpression ist die Hybridisierung von gewebsspezifischen cDNAs auf high-density Filtern oder Microarrays (Pietu et al. 1996). Bei diesem Ansatz ist eine hohe Anzahl von Genprodukten auf einen Nylonfilter oder Glasträger aufgebracht. Diese werden mit markierter cDNA hybridisiert. Unterschiede in der Signalintensität bei verschiedenen Hybridisierungsexperimenten deuten auf eine Regulation des Gens hin. Die Expressionsanalyse von Genen durch Hybridisierung auf high-density Filter kann jedoch stark fehlerbehaftet sein, da die Streuung der Signalintensitäten bei identischen Ausgangsbedingungen relativ hoch ist. Daher ist eine quantitative Aussage zum Genexpressionsniveau nur schwer und erst nach mehrmaliger Wiederholung möglich. Die Verwendung von Microarrays auf Glasträgern erlaubt eine genauere Quantifizierung. Diese Methode war zum Zeitpunkt der Experimente dieser Arbeit jedoch noch nicht etabliert und wurde daher nicht genutzt.

In dieser Arbeit wurde die Methode des PCR-basierten subtraktiven cDNA-Screens gewählt. Auch diese Methode erlaubt es, zwei mRNA-Populationen miteinander zu vergleichen. Sie erlaubt die Anreicherung von Transkripten, die lediglich in einer mRNA-Population enthalten sind (Ausubel et al. 1987-1999). Genprodukte, die in beiden mRNA-Populationen vorhanden sind, werden durch diese Methode weitgehend beseitigt. Hierzu werden zunächst beide mRNA-Populationen in cDNA revers transkribiert. Die zu untersuchende cDNA wird üblicherweise als Tester und die Referenz cDNA als Driver bezeichnet. Es werden zwei verschiedene Tester-cDNAs durch Ligation mit zwei unterschiedlichen Adapter-Oligonukleotiden erzeugt, der Driver bleibt unmodifiziert. Diese Adapter-Oligonukleotide erlauben später eine spezifische Amplifikation mittels PCR. Im Anschluß wird jeweils eine Tester-cDNA mit der Driver-cDNA hybridisiert, wobei der Driver im Überschuß zugesetzt wird. Aufgrund der

Mengenverhältnisse im Hybridisierungsansatz bilden Tester-Einzelstränge mit hoher Wahrscheinlichkeit mit Driver-Einzelsträngen Hybride. Diese Hybride aus Tester und Driver können nicht amplifiziert werden, da die Driver-cDNA keine Adapter besitzt. Dies bedeutet, daß cDNAs, die in beiden cDNA-Populationen vorkommen, nicht amplifizierbar sind. Die anschließende Vereinigung der beiden ersten Hybridisierungsansätze und neuerliche Zugabe von Driver im Überschuß erlaubt nun die Hybridisierung der noch einzelsträngigen spezifischen Tester cDNAs mit zwei unterschiedlichen Adaptern. Diese Hybride entstehen jedoch nur bei cDNAs, die in großem Überschuß im Tester vorkommen, da andere cDNAs mit dem zugegebenen Driver hybridisieren. Nur cDNAs mit zwei unterschiedlichen Adapter-Oligosequenzen sind anschließend durch PCR exponentiell amplifizierbar. Die PCR-Produkte können dann kloniert und weiter analysiert werden. Durch die Zugabe von Driver im Überschuß findet eine Normalisierung der subtrahierten cDNAs statt. Das bedeutet, daß die Repräsentationsbreite verschiedener Transkripte equalisiert wird. Weiterhin werden konstitutiv exprimierte Gene (z. B. housekeeping-Gene) durch die Hybridisierung mit der Driver-cDNA herausgefiltert. Die Nutzung der PCR zur Amplifikation der spezifischen Tester-cDNAs erlaubt darüberhinaus eine Amplifikation von gering-exprimierten Genen, wie z.B. Transkriptionsfaktoren. Findet lediglich eine graduelle Regulation der Genexpression statt, ist dies mit dieser Methode nur schwer detektierbar.

Der entscheidende Grund für die Wahl dieser Methode im Rahmen dieser Arbeit war die Möglichkeit, cDNAs zu amplifizieren, die in geringer Kopienzahl im Tester-Pool vorliegen. Beispiele für die erfolgreiche Anwendung dieser Methode ist die Identifikation von Transkripten in einem Zellkulturassay, die aufgrund der Behandlung mit einer Phorbolmyristat-Verbindung heraufreguliert werden (Gurskaya et al. 1996), die Identifizierung differentieller Gene in Brustkrebszelllinien, die den Östrogen-Rezeptor exprimieren (Kuang et al. 1998), die Identifikation eines neuen Liganden für den Tumor-Nekrose Faktor Rezeptor (Wong et al. 1997) und die Identifikation eines G-Protein Rezeptors für Leukotrien B4 (Yokomizo et al. 1997).



Als Ausgangsmaterial für den differentiellen Screen diente in dieser Arbeit mRNA aus Gliedmaßen, bei denen der *Ihh*-Signalweg für 12 h mit Cyclopamin blockiert oder mit *Shh* stimuliert wurde. Um die Effizienz der cDNA-Subtraktion zu beurteilen, wurden die eingesetzten cDNAs mit den subtrahierten cDNAs verglichen. Diese Untersuchung der cDNAs erfolgte durch Southern-Blot und Hybridisierung mit *Ptc*. Das *Ptc*-Signal war bei der cDNA aus *Shh*-behandelten Kulturen (st) wesentlich stärker als bei Cyclopamin-behandelten Kulturen (ct). Nach Durchführung der Subtraktion wurde dieser Unterschied weiter verstärkt: Die subtrahierte *Shh* cDNA (ST) zeigte ein verstärktes *Ptc*-Signal im Vergleich zu der unsubtrahierten *Shh* cDNA (st). Bei der subtrahierten Cyclopamin cDNA (CT) war das *Ptc*-Transkript nicht mehr detektierbar. Durch die Subtraktion reichert sich also das *Ptc*-Transkript in der ST cDNA an. Es ist möglich, daß sich in der ST cDNA auch weitere Zielgene für *Ihh* anreichern. In der CT cDNA sollten Transkripte angereichert sein, die durch Fehlen des *Ihh*-Signales aktiviert werden.

Die subtrahierten cDNAs wurden anschließend kloniert. Es wurden 288 Klone (drei Platten je 96 Klone) je subtrahierter Bibliothek (ST und CT) isoliert. Nur Klone, die in der eigenen und nicht in der invers-subtrahierten Bibliothek vorkommen, sind differentiell exprimiert und kommen daher für eine weitergehende Untersuchung in Frage. Die Identifikation differentieller Klone erfolgte mittels komplexer Hybridisierung der isolierten DNA-Fragmente mit der ST- und der CT-cDNA. Nur die Klone, die in der Bibliothek aus der sie stammen und nicht in der invers-subtrahierten Bibliothek vorkommen, sind als differentiell exprimiert anzusehen. Auf diese Weise konnten 60 Klone der ST-Bibliothek und 74 Klone der CT-Bibliothek bestätigt werden. Um weitere falsch positive Kandidaten auszuschließen, wurde die Genexpression dieser 134 Klone durch *in-situ*-Hybridisierung an Gliedmaßen von Mausembryonen untersucht, da davon auszugehen ist, daß *Ihh*-Zielgene in den Skelettanlagen exprimiert werden. Diese Analyse zeigte für 32 Klone (19 ST-Klone und 13 CT-Klone) eine Genexpression im Gliedmaßenbereich der Skelettanlage.

## 5.5 Rückbestätigung der isolierten Klone

Um eine tatsächliche von *Ihh*-abhängige Genexpression der bisher eingegrenzten 32 Kandidaten sicherzustellen, wurden diese weitergehend untersucht. Die Strategie für die Rückbestätigung einer *Ihh*-abhängigen Genexpression der gefundenen Kandidaten gliederte sich dabei in drei Stufen. Zunächst sollte eine Regulation der Transkriptmenge der Kandidaten aus *Shh*- und Cyclopamin-behandelten Gliedmaßenkulturen untersucht werden. Dafür wurde aufgrund der genauen Quantifizierbarkeit die Methode des RNase-Protection Assays gewählt (Ausubel et al. 1987-1999). Die zweite Rückbestätigung erfolgte über die Methode der Gliedmaßenorgankultur. Hierbei wurden embryonale Mausgliedmaßen direkt mit *Shh* zur Stimulation des *Ihh*-Signalweges und mit Cyclopamin zur Blockade des *Ihh*-Signalweges behandelt. Die anschließende Analyse der Kandidaten durch *in-situ*-Hybridisierung sollte eine Variation der Signalintensität der Expressionsdomänen zeigen. Im dritten Schritt wurde die Genexpression positiver Kandidaten in transgenen Mäusen untersucht. Dafür wurden Gliedmaßen von *Ihh*-überexprimierenden und *Ihh*-defizienten Mausembryonen in der *in-situ*-Hybridisierung getestet.

### 5.5.1 Erste Stufe der Rückbestätigung: Transkriptquantifizierung

Die 32 Klone, für die eine Genexpression in den Gliedmaßenanlagen von Mausembryonen nachgewiesen werden konnte, wurden mittels RNase-Protection Assay untersucht. Hierfür wurde RNA aus Gliedmaßenkulturen gewonnen, die mit *Shh* oder Cyclopamin behandelt wurden. Die anschließende Analyse der 32 Klone ergab für **zwei Klone** eine Regulation in Antwort auf die Behandlung mit Cyclopamin oder *Shh*. Dies waren die Klone ST2C6 und CT1H8. Die Transkriptmenge für ST2C6 und CT1H8 wird 12 h nach Cyclopaminbehandlung herabreguliert (67 % bzw. 77 %) und 12 h nach *Shh*-Behandlung leicht heraufreguliert (107 % bzw. 108 %). Das Transkript des Klones ST2C6 wird bei der cDNA-Subtraktion in der subtrahierten (*Shh*-behandelten) ST-cDNA angereichert. Dieser Klon verhält sich den Erwartungen entsprechend: Er wird nach *Shh*-Behandlung herauf- und nach Cyclopaminbehandlung herabreguliert. Dagegen ist der Klon CT1H8 nach *Shh*-Behandlung

---

herauf- und nach Cyclopaminbehandlung herabreguliert. Erwartet wurde jedoch der umgekehrte Fall, da dieser Klon aus der CT-cDNA stammt. Es handelt sich wahrscheinlich um ein unspezifisches PCR-Produkt der sekundär PCR mit chondrozytenspezifischer Genexpression.

### **5.5.2 Zweite Stufe der Rückbestätigung: konditionierte Gliedmaßenkultur**

Die zweite Stufe der Rückbestätigung erfolgte durch Gliedmaßenkultur und anschließende *in-situ*-Hybridisierung. Für diese Experimente wurden die im RNase-Protection Assay rückbestätigten Klone, ST2C6 und CT1H8 verwendet. Bei CT1H8 konnte entsprechend der ersten Stufe der Rückbestätigung eine Herabregulation der Genexpression nach Cyclopaminbehandlung in der Gliedmaßenkultur bestätigt werden. Im selben Versuchsansatz war es nicht möglich, eine signifikante Regulation des Klones ST2C6 festzustellen. Aufgrund der Freipräparation der Skelettanlagen in der Gliedmaßenkultur mit Entfernung der Haut und des Muskelgewebes wurde das Gewebe in Nähe der ST2C6-Expressionsdomäne beschädigt. Daher ist die Expressionsdomäne des Klones ST2C6 nur sehr schwach erkennbar. Hinzu kommt, daß ST2C6 nur schwach exprimiert wird. Die daraus folgende geringe Signalintensität von ST2C6 erschwert es zusätzlich, eine eindeutige Regulation dieses Klones nach Shh- oder Cyclopamin-Behandlung nachzuweisen.

### **5.5.3 Dritte Stufe der Rückbestätigung: transgene Mausstämmе**

Im letzten Schritt wurde die Genexpression von ST2C6 und CT1H8 durch *in-situ*-Hybridisierung an Schnitten von embryonalen Mausgliedmaßen transgener Stämme untersucht. Hierfür wurden zunächst Gliedmaßen von *Ihh*-defizienten Mäusen genutzt. Bei diesen Schnitten konnte im Vergleich zu Kontrollschnitten weder eine ST2C6- noch eine CT1H8-Expression nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, daß die Expression dieser Gene von *Ihh* abhängig ist. Ein zweiter Ansatz war die Expressionsanalyse dieser Gene in Gliedmaßenanlagen von *Ihh*-überexprimierenden Mausembryonen. Diese Tiere exprimieren das Huhn-Ortholog von *Ihh* unter der Kontrolle des *Kollagen Typ-II*-Promotors. Folglich findet bei diesen Tieren eine stärkere

Induktion des *Ihh*/PTHrP-Signalweges mit einer Inhibition der Chondrozyten-differenzierung statt. Diese Mäuse zeigen eine Induktion der Expression von CT1H8 und ST2C6.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, daß die Genexpression von ST2C6 und CT1H8 von *Ihh* abhängig ist. Diese Gene sind nach der Stimulation des *Ihh*-Signalweges herauf- und nach der Inhibition des *Ihh*-Signalweges herabreguliert. Diese Ergebnisse werden durch die Analyse der Gliedmaßenkulturen, der *Ihh*-defizienten Mäuse und der *Ihh*-überexprimierenden Mäuse bestätigt. Obwohl 576 Klone isoliert wurden, konnten lediglich zwei als positiv bestätigt werden.

Die Ursache dafür kann in der Wahl des experimentellen Ansatzes liegen. Die Methode der subtraktiven PCR erlaubt die Amplifikation schwach exprimierter Gene. Es kann vorkommen, daß solche Gene aufgrund der geringen Expression keine Signale in der *in-situ*-Hybridisierung zeigen. Diese Methode konnte in dieser Arbeit nicht für jedes zu untersuchende Gen optimiert werden. Aufgrund der großen Zahl von 134 untersuchten Genen wurden Standardbedingungen zur Detektion der Genexpression gewählt. Da die *in-situ*-Hybridisierung unter verschiedenen Bedingungen, wie den gewählten Sonden oder den Hybridisierungstemperaturen oft unterschiedliche Signalintensitäten zeigt, kann es passieren, daß schwach exprimierte Gene nicht detektiert wurden.

Ebenso könnten die im Screen gefundenen und als ubiquitär exprimiert eingestuft Genen durch *Ihh* reguliert werden. Darüberhinaus ist die Transkription oft nur graduell reguliert und nicht einfach ein- oder abgeschaltet. Es kann davon ausgegangen werden, daß bei den in die Subtraktion eingesetzten cDNAs einige Transkripte nach *Shh*- oder Cyclopamin-Behandlung nur graduell reguliert sind. Diese graduell regulierten Genen können mit der genutzten Methode nicht nachgewiesen werden, da diese Transkripte durch Zugabe der Tester-cDNA "heraus subtrahiert" werden.

Das Ergebnis dieser Arbeit erbrachte zwei von Ihh-abhängig regulierte Transkripte unter 576 untersuchten Transkripten. Der Grund für diese Ausbeute liegt in der Methodik des durchgeführten differentiellen Screeningansatzes. Es wurde kein fester Satz von cDNAs auf eine mögliche Regulation untersucht (wie bei Microarray-Experimenten) sondern es wurde eine neue, "vorgefilterte" Klonbibliothek, die für mögliche Zielgene angereichert ist, angefertigt und untersucht.

Auch andere Arbeiten haben bei einer ähnlichen Fragestellung vergleichbare Ausbeuten erzielt. Kato et al. (2001) haben eine neuroepitheliale Zelllinie mit einem Shh-Expressionskonstrukt transfiziert. Es wurden hierbei 2304 Klone untersucht. 48 h nach der Transfektion konnten zwei Zielgene für Shh identifiziert werden. Das entspricht einer Trefferquote von einem positiven Kandidaten unter 1152 getesteten Klonen. Die Veröffentlichung von Ingram et al. (2002) hat bei einem vergleichbaren Transfektionsansatz eine mesenchymale embryonale Mauszelllinie untersucht. Hierbei wurde ein Satz von 3936 Klonen auf eine mögliche Regulation hin untersucht. In einem Zeitfenster von 48 h bis 72 h wurden sieben Gene identifiziert, die transkriptionell heraufreguliert sind und vier Gene, deren Transkription reprimiert wurde. Dieses Ergebnis entspricht einer Trefferquote von einem Klon unter 358 untersuchten Klonen. Yoon et al. (2002) haben 4608 UniGene-Klone untersucht und 30 Klone als Zielgene für Gli1 in epithelialen Nierenzellen der Ratte identifiziert. Hier lag die Trefferquote bei einem Klon pro 154 untersuchten Klonen. Weitere Untersuchungen von anderen Signalwegen weisen eine ähnliche Statistik auf: Kluppel et al. 2002 haben für den BMP-Signalweg in einem Gentransfektionsansatz von 1920 Klonen zwei Klone als positiv identifiziert (ein Klon unter 960).

## **5.6 Analyse des Klones CT1H8**

Der Klon CT1H8 kodiert einen Teil der Proteinsequenz für die lysosomale Cystein-Endopeptidase Legumain, die Proteine C-terminal von Asparagin (-Asn-|-Xaa) spaltet (Chen et al. 1997; Chen et al. 1998). Legumain wirkt osteoklasteninhibitorisch und spielt eine Rolle bei der Prozessierung von mikrobiellen Antigenen (Choi et al. 1999;

Manoury et al., 1998). In dieser Arbeit konnten erstmals Legumain-Expressionsdomänen in sich entwickelnden Mausgliedmaßenanlagen nachgewiesen werden. Legumain wird in der Zone des sich entwickelnden Knochens und in den proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten exprimiert. Die funktionale Rolle von Legumain in den sich entwickelnden Knochen könnte in der Hemmung der Osteoklastenaktivität bei der Resorption der Knochenmatrix liegen. Tatsächlich konnte hier nachgewiesen werden, daß die Expressionsdomäne von Legumain in dieser Region liegt. Eine funktionale Bedeutung der Expressionsdomäne von Legumain in den prähypertrophen und proliferierenden Chondrozyten läßt sich schwer abschätzen. Eine mögliche Funktion von Legumain in dieser Region könnte der Umbau der extrazellulären Matrix sein. Bisher wurde veröffentlicht, daß Legumain die ubiquitär exprimierte Progelatinase A aktiviert und dadurch Einfluß auf den Aufbau der extrazellulären Matrix nimmt (Chen et al., 2001). Möglicherweise hat Legumain eine ähnliche Funktion wie die Genprodukte der Gene Exostosin 1 (Ext1) und Exostosin 2 (Ext2), die in den selben Regionen wie Legumain exprimiert werden (Stickens et al., 2000 und eigene Beobachtung). Ext1 und Ext2 kodieren für Glykosyltransferasen, die Heparansulphatketten für die extrazelluläre Matrix synthetisieren. (Lin und Perrimon, 2000; Lin et al., 2000). Es wird vermutet, daß die durch Ext1 und Ext2 gebildeten Heparansulphatketten die extrazelluläre Matrix so modulieren, daß Shh und Ihh-Signalfaktoren effektiv diffundieren können, und somit die Signalreichweite beeinflusst wird (Lin und Perrimon, 2000 und Lydia Koziel pers. Mitteilung). Möglicherweise kann Legumain ebenso wie die Exostosine durch den Umbau der extrazellulären Matrix die Ihh-Signalreichweite beeinflussen.

Eine weitere mögliche Aufgabe von Legumain könnte die Degradation und damit die Inaktivierung des Signalpeptides von Ihh sein. Da das Signalpeptid von Ihh mehrere mögliche Spaltungsstellen aufweist, ist dies grundsätzlich möglich. Durch proteolytische Spaltung könnte Ihh inaktiviert werden, was die Chondrozyten-differenzierung induziert. Die so hervorgerufene verstärkte Differenzierung ist auf den Entzug von Ihh aus dem Ihh/PTHrP-Rückkopplungskeis zurückzuführen.

## Vorhergesagte Proteinsequenz von ST2C6

```

ST2C6          SKKENNKKGTNEKQKRKRQAYESNLICHGLQLEATRSVSDDKLVFVKVHAPWEVLCTYAEIMHMKLPLKPNLDKTRSPFFG
prf:NLS_BP    <----->

ST2C6          NLNWFTKVLRVNESVIKPEQEFFTAPFEKSRMNDFYILDRDSFFNPATRSRIVYFILSRVKYQVMNNVKNKFGINRLVSSG

ST2C6          IYKAAPFLHDCRFNYESEDISCPSEYLLYREWAHPRSIYKKQPLDLIRKYYGEKIGIYFAWLGYYTQMLLLAAVVGVAC

ST2C6          FLYGYLDQDNCTWSKEVCDPDIGGQILMCPQCDRLCPFWRLNITCESSKKLCIFDSFGTLIFAVMGVVWTLFLEFWKRR

ST2C6          QAELEYEWDTVELQEEQARPEYEAQCNHVVINEITQEERIPFTTCGKCIRVTLCASAVFFWILLIIASVIGIIVYRLSV
pfam:YGGT    <----->

ST2C6          FIVFSTTLPKNPNGTDPIQKYLPQMATSITASIISFIIMILNTIYEKVAIMITNFLPRTQTDYENSLTMKMFLQFV
pfam:YGGT    ----->

ST2C6          NYYSSCFFYIAFFKGKFVGYPGPDVYLLGKYRSEECDPGGCLLELTTQLTIIMGGKAIWNNIQEVLLPWMNLIGRYKRVS
pfam:DUF590  <----->

ST2C6          GSEKITPRWEQDYHLQPMGKLGFYELEMIIQFGVTLFVASFPLAPLLALVNNILEIRVDAWKLTTQFRRMVPEKAQD
pfam:DUF590  =====

ST2C6          IGAWQPIMQGIAILAVTNAMIIAFTSMIPRLVYWSFSIPPYGDHTYTMDGYINNTLSVFNITDFKNTDKENPYIGLN
pfam:DUF590  =====

ST2C6          YTLCRYRDFRNPPGHPQEYKHNIYWHVIAAKLAFIIVMEHIIYSVKFFISYAIPDVSKITKSKIKREKYLTQKLLHESH
pfam:DUF590  =====>

ST2C6          LKDLTKNMGIIAERIGGTVDNSVRPKLE
    
```

## DUF590-Domäne

```

st2c6          49  ----- --K----- --LGLF YEYLEMIIQF GFVTLFVASF PLAPLLALVN NILEIRVDAW KLTTQFRRMV PEK-AQDIGA WQPIMQGIAI
gi|22062168 (homo) 109 ----- --K----- --LGLF YEYLEMIIQF GFVTLFVASF PLAPLLALVN NILEIRVDAW KLTTQFRRLV PEK-AQDIGA WQPIMQGIAI
gi|22204279 (Danio) 613 ----- --Q----- -FGLF YEYLEMIIQF GFITLFVASF PLAPLLALFN NILEIRVDAW KFTTQFRRRPM AAK-ARNIGA WEEILNVVAI
gi|21294988 (Anopheles) 616 ----- --K----- -LALF DEYLEMIVQY GFVTLFVAAF PLAPLFALLN NIAIRLDAY KMVTQSRRPL AER-VEDIGA WYGILRIITY
gi|7294638 (Droso.) 938 ----- --R----- -LALF DEYLEMIIQY GFVTLFVAAF PLAPLFALLN NVAIRLDAY KMVTQARRPL AER-VEDIGA WYGILRIITY
gi|20914339 (Mus) 710 EVDFNL----- -EPF----- -AGLT PEYMEMIIQF GFVTLFVASF PLAPLFALLN NIIIRLDAK KFVTELRRRPV AIR-AKDIGI WYNILRGVGK
gi|20379531 (Homo) 322 EVDFNL----- -EPF----- -AGLT PEYMEMIIQF GFVTLFVASF PLAPLFALLN NIIIRLDAK KFVTELRRRPV AVR-AKDIGI WYNILRGVGK
gi|11071793 (Leishm.) 854 PASLRRSSahg gssdspldea demldlYDIH MDFTEMLIQF GYILLFFATAY PLASFVALLS NIIEVRSHLF KMCVMRRRPV PRlgVQNAT WCGIMRGCVI
gi|15219343 (Arabidop.) 379 SASIGV----- -ELE----- -DGLF DSLELALQF GMIMFFACAF PLAFALAAVS NVMEIRTNAL KLLVTLRRRPV PRA-AATIGA WLNIWQFLV
gi|19112389 (S.Pombe) 195 TVTLKRARse aeKIE----- -YDCY NDYKDFVLMF GFLVMFSPIY PLAPIFSLVN CVLVYRSSVY RFTKMVKKPV PCR-VDSIAP WDQRLSLLSW
gi|17553646 (C.elegans) 611 ----- --VLMFASLF PLAPLLALII GFVDMRIDAH RLIWFNRKPI PTI-TNGIGI WLPILTFLQY
          *****          ***          ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
    
```

Abb. 34: Proteinsequenz von ST2C6 und Konservierung der Domäne DUF590.

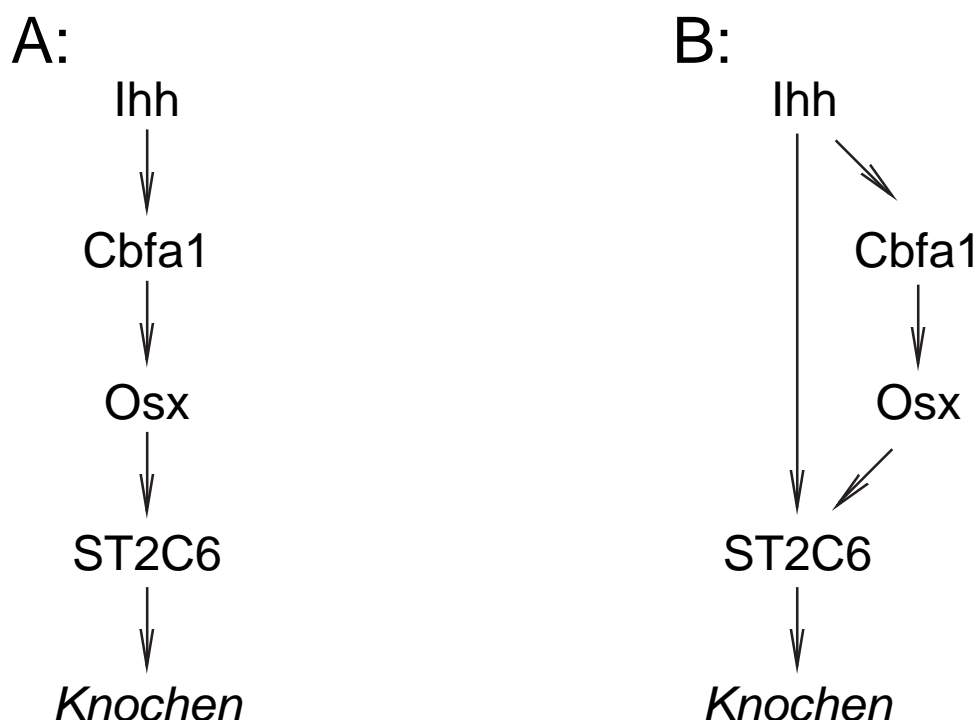
Oben ist die vorhergesagte Proteinsequenz von ST2C6 gezeigt. Mögliche funktionale und konservierte Domänen sind rot hervorgehoben und links in blauer Farbe benannt. Die DUF590-Domäne ist in mit = hervorgehoben. Unten ist ein Alignment eines Teils der DUF590-Domäne in verschiedenen Spezies gezeigt. An dieser Position ist die DUF590 in den gezeigten Arten hochkonserviert. Die physikalischen Eigenschaften der Aminosäuren sind unten farblich hervorgehoben. Basische Aminosäuren sind rot, nichtpolare Aminosäuren sind braun, ungeladene Aminosäuren sind türkis, saure Aminosäuren sind blau und aromatische Aminosäuren sind grün dargestellt.

### 5.7 Analyse des Klonen ST2C6

Der Klon ST2C6 kodiert für ein bisher unbekanntes Transkript. Es wurden Expressionsdomänen im sich entwickelnden Knochen und im Periosteum gefunden. In der Region des Periosteums intensiviert sich die ST2C6-Expressionsdomäne gegenüber der Region der prähypertrophen Chondrozyten, also der *Ihh*-Quelle. Die Expressionsdomänen im Periosteum liegen in sehr jungen verknöcherten Regionen und deuten auf eine Rolle von ST2C6 in der Einleitung der Ossifikation hin. Da *Ihh*-defiziente Mäuse keinen endochondralen Knochen entwickeln und ST2C6 in diesen Mäusen nicht nachweisbar ist, könnte ST2C6 eine Rolle bei der Induktion von Knochen

spielen. Diese Annahme wird durch die Aktivierung von ST2C6 in *Ihh*-überexprimierenden Mäusen gestützt.

Osteoblasten sind die knochenaufbauende Zellpopulation, sie differenzieren aus mesenchymalen Zellen. Die Bildung reifer, funktionaler Osteoblasten ist abhängig von der Expression verschiedener Faktoren. Unter anderen ist der Transkriptionsfaktor Core binding factor 1 (*Cbfa1*) Voraussetzung für die Reifung von Osteoblasten (Ducy et al., 1997). Die Deletion von *Cbfa1* führt dazu, daß kein endochondraler Knochen gebildet werden kann (Kim et al., 1999). Ein weiterer für die Entwicklung von endochondralen Knochen notwendiger Transkriptionsfaktor ist Osterix (*Osx*) (Nakashima et al., 2002). *Osx* ist im Periosteum und in unreifen Osteoblasten exprimiert. Vergleichende Untersuchungen des Expressionsmusters dieser Transkriptionsfaktoren in Mäusen, die defizient für *Osx* sind, haben gezeigt, daß eine *Cbfa1*-Expression nachweisbar ist (Nakashima et al., 2002). Auf der anderen



**Abb. 35: Modelle zur Beteiligung von ST2C6 an der Knocheninduktion**

A: Durch *Ihh* wird die *Cbfa1*-Expression stabilisiert, die *Osx*-Expression ist direkt abhängig von *Cbfa1*. *ST2C6* wird durch *Osx* aktiviert und induziert so den frühen Knochen. B: Die Signalwege von *Cbfa1* und *Ihh* agieren parallel, um *ST2C6* zu induzieren. Es ist sowohl *Ihh* als auch *ST2C6* nötig, um Knochen zu bilden.



Seite exprimieren *Cbfa 1*-defiziente Mäuse jedoch kein *Osx* (Nakashima et al., 2002). Aus diesen Experimenten wurde geschlossen, daß *Osx* durch *Cbfa1* induziert werden kann.

Eine vergleichende *in-situ*-Hybridisierung von ST2C6 auf Schnitten von *Cbfa1*-defizienten Tieren zeigte auch eine fehlende ST2C6-Expression. Weiterhin fehlt die ST2C6-Expression in Gliedmaßenschnitten von *Osx*-defizienten Mäusen (Milana Tchinenkova und Andrea Votkamp, pers. Mitteilung). Aus diesen Ergebnissen ergeben sich folgende mögliche Szenarien für die Rolle von ST2C6 in der *Ihh*-Signaltransduktion:

1. ST2C6 überträgt das *Ihh*-Signal zur Knocheninduktion unter der Voraussetzung, daß eine ununterbrochene Signalkette von *Ihh* über *Cbfa1* zu *Osx* und weiter zu ST2C6 gegeben ist.
2. ST2C6 überträgt der *Ihh*-Signal zur Knocheninduktion unter der Voraussetzung, daß eine ununterbrochene Signalkette zu *Osx* gleichzeitig mit einem vorhandenen *Ihh*-Signal aktiv ist.

Die weitere Analyse der sich in Vorbereitung befindenen ST2C6-defizienten Maus wird darüber Klarheit verschaffen (Milana Tchinenkova, pers. Mitteilung)

## **5.8 Vervollständigung des Transkriptes von ST2C6**

Da das Transkript für ST2C6 vollständig unbekannt ist, kann eine Funktion schwer aus der Expressionsdomäne hergeleitet werden. Das gefundene Transkriptfragment wurde daher computergestützt näher untersucht. Die Auswertung von sequenzierten EST-Klonen und deren Aneinanderlagerung (Alignment) bietet eine Möglichkeit, vollständige Transkripte von Genen, die nur teilweise bekannt sind, zu identifizieren (Haas et al. 2000; Krause et al. 2002). Für den Klon ST2C6 konnte mittels Datenbankrecherche ein Transkript mit einer Länge von 5890 Basen vorausgesagt werden. Dieses hypothetische Transkript wurde durch Überlagerung der in Datenbanken gespeicherten Sequenzen von über 150 EST-Klonen gefunden. Diese Größenvoraussage deckt sich mit der in dieser Arbeit im Northern-Blot ermittelten

Transkriptlänge von 6000 Basen. Im hypothetischen Transkript konnte ein offener Leserahmen (ORF) von 2727 Basen gefunden werden, der für ein Protein mit 909 Aminosäuren kodiert.

Die Analyse der Proteinsequenz hat mehrere mögliche Struktur motive in ST2C6 aufgezeigt. Im N-terminalen Bereich findet sich eine Proteinmotivähnlichkeit zum Zellkern-Lokalisierungssignal (NLS). Weiterhin findet sich eine konservierte Domäne, die durch automatische Computerannotierung in der Familie von eukaryotischen Proteinen mit unbekannter Funktion 590 (DUF590) zusammengefaßt wurde (<http://pfam.wustl.edu/>). Darüberhinaus enthält das putative Transkript für ST2C6 noch eine weitere Domäne unbekannter Funktion (YGGT-Domäne). Da ST2C6 über Transmembran-typische Motive verfügt, wird eine Membranlokalisierung postuliert (<http://pfam.wustl.edu/>). Eine Übersicht der Domänenstruktur von ST2C6 und ein Alignment der DUF590-Domäne zu ausgewählten Vertretern der DUF590-Proteinfamilie zeigt die Abbildung 34.

Da weder über das Strukturmotiv YGGT noch über DUF590 funktionelle Erkenntnisse vorliegen, kann anhand dieser Informationen keine funktionelle Bedeutung abgeschätzt werden. Außerdem ist das Vorkommen von einem funktionalen NLS und einer Membranlokalisierung in einem Protein nicht sehr wahrscheinlich. Zunächst ist es nötig, von dem ST2C6-Protein die korrekte Aminosäuresequenz zu identifizieren. Dafür könnte das Protein mit Antikörpern präzipitiert werden und die Sequenz durch Matrix unterstützte Laserdesorption/Ionisation-Massenspektrometrie (MALDI-MS) geklärt werden. Ebenso wäre es nötig, die subzelluläre Lokalisation von ST2C6 zu klären. Dies könnte durch Antikörperfärbung in Zellkultur oder durch Überexpression von mit einem Protein-Tag versehenen ST2C6 mit anschließender Analyse des Proteinnachweises im konfokalen Laser-Scan Mikroskop geschehen.

---

## 5.9 Der Klon ST3C7 (PMP22)

ST3C7 wurde in dieser Arbeit als Kandidat für ein Zielgen im Ihh-Signalweg gefunden. Im Rahmen der ersten Stufe der Rückbestätigung einer Ihh-abhängigen Genexpression wurde dieser Klon jedoch als nicht durch Ihh reguliert eingestuft. ST3C7 kodiert für das periphere Myelin Protein 22 kDa (PMP22). *PMP22* gehört zur Familie der Growth arrest-specific (Gas) Gene. Die Gas-Gene der Maus wurden durch subtraktive Hybridisierung von cDNA aus quieszenten und wachsenden Zellen identifiziert (Schneider et al., 1988). Es konnten bisher sechs Gas-Homologe in der Maus identifiziert werden. Eines dieser Homologe ist Gas3 oder peripheres Myelin Protein 22 kDa (PMP22), welches für ein Membranprotein unbekannter Funktion codiert (Manfioletti et al., 1990).

*PMP22* wurde vor kurzem in einer weiteren Veröffentlichung als ein Zielgen im Shh-Signalweg identifiziert (Ingram et al. 2002). In dieser Veröffentlichung findet eine transkriptionelle Aktivierung von *PMP22* erst 72 h nach der Transfektion mit einem Shh-Expressionsvektor statt. Hier könnte ein Grund für die fehlende Rückbestätigung von *PMP22* im vorliegenden Versuchsansatz liegen. Nach der gewählten Behandlungsdauer von 12 h ist der Unterschied im *PMP22*-Expressionsniveau bei den behandelten Gliedmaßenanlagen vermutlich so gering, daß er nicht durch den RNase-Protection Assay identifiziert werden kann. *PMP22* wird in proliferierenden Zellen aktiviert (Schneider et al., 1988). Da die Chondrozytenproliferation von Ihh abhängt, ist es möglich, daß auch *PMP22* durch Ihh aktiviert wird. Dies könnte jedoch in einem längeren als den untersuchten Zeitraum geschehen. Um dieses Problem zu klären könnte die *PMP22*-Expression in *Ihh*-defizienten Mäusen untersucht werden. Ist in diesen Tieren keine *PMP22*-Expression in Chondrozyten nachweisbar, wird *PMP22* abhängig von Ihh exprimiert.

## 5.10 Mißexpression von potentiellen Zielgenen mit RCAS

Eine Methode, um eine funktionelle Genanalyse im Vertebraten durchzuführen, ist die Infektion und daraus folgende Überexpression von Proteinen mit modifizierten Retroviren. Ein mögliches System hierfür ist der RCAS-Virus, das als Genfahre zur lokalen Überexpression von Genen im Hühnerembryo genutzt wird. In dieser Arbeit wurden direkt nach Durchführung des Screens nach *Ihh*-Zielgenen zwei Kandidaten ausgewählt. Die Rückbestätigung erfolgte erst im Anschluß an die Erzeugung der Retroviren. Die ausgewählten Kandidaten, *PMP22* und *Twisted gastrulation Protein* (*Tsg*) fungieren als potentielle Signalfaktoren (Suter und Snipes 1995; Ross et al. 2001; Ingram et al. 2002). Eine Expressionsdomäne von *Tsg* und *PMP22* wurde bisher nicht in Skelettanlagen beschrieben.

Der Klon ST3C7 (*PMP22*) wird im Bereich der prähypertrophen Chondrozyten exprimiert und scheint daher potentiell von *Ihh* reguliert zu sein. Die Expression von *PMP22* in Skelettanlagen ist bisher unbekannt. Hingegen ist bekannt, daß *PMP22* von Schwann'schen Zellen exprimiert wird und hauptsächlich im kompakten Myelin des peripheren Nervensystems lokalisiert ist (Suter und Snipes 1995).

```

Mus Tsg:      1 MKSHYIVLALASLTFLL  CLPV  21
                -----LL-----
Gallus Tag:   1 MRSPCAALSASLLLLLLLLLWARS  23
sig_peptide  1 *****  24

Mus Tsg:      22 SQSCNKALCASDVSKCLIQELCQCRPGE GNCPCCKECMLCLGALWDECCDCVGR CNPRNY  81
                S--CNKALCASDVSKCLIQELCQCRPGE GNC-CCKECMLCLG-LWDECCDCVG-CNPRNY
Gallus Tag:   24 SVGCNKALCASDVSKCLIQELCQCRPGE GNCSCCKECMLCLGTLWDECCDCVGM CNPRNY  83
sig_peptide  24 ***

Mus Tsg:      82 SDTPPTSKSTVEELHEPIPSLFRALTEGDTQLNWNIVSFPVAEELSHHENLVSFLETVNQ  141
                SDTPPTSKSTVEELHEPIPSLFRALTEGDTQLNWNIVSFPVAEELSHHENLVSFLETVNQ
Gallus Tag:   84 SDTPPTSKSTVEELHEPIPSLFRALTEGDTQLNWNIVSFPVAEELSHHENLVSFLETVNQ  143

Mus Tsg:      142 LHHQNVSVPSNNVHAPFSDKERMCTVVYFDDCMSIHQCKISCESMGASKYRWFHNACCE  201
                --HQNVSVPSNN+HAP+-SDKE-MCTVVYFDDCMSIHQCKISCESMGASKYRWFHNACCE
Gallus Tag:   144 PQHQNVSVPSNNIHAPYSSDKEH MCTVVYFDDCMSIHQCKISCESMGASKYRWFHNACCE  203

Mus Tsg:      202 CIGPECIDYGSKTVKCMNCF  222
                CIGPECIDYGSKTVKCMNCF
Gallus Tag:   204 CIGPECIDYGSKTVKCMNCF  224

```

### Abb. 35: Alignment von Maus *Tsg* und Huhn *Tsg* sowie Kennzeichnung des Signalpeptides (\*)

Erläuterung siehe Text. Das Signalpeptid ist durch grüne Sternchen (\*) hervorgehoben, identische Aminosäuren sind rot.

Ebenso konnte kürzlich eine Aktivierung von *PMP22* durch Shh nachgewiesen werden (siehe 5.9; Ingram et al. 2002). Zusätzlich besteht die Möglichkeit, daß *PMP22* im Zusammenspiel mit dem Protein *p53 apoptosis Effector Related to PMP22 (PERP)*, das in ähnlichen Regionen exprimiert wird, die Apoptose von Chondrozyten reguliert (Karl-Georg Lintermann und Andrea Vortkamp, pers. Mitteilung). Mäuse, die defizient für *PMP22* sind, zeigen keinen Phänotyp der Gliedmaßenanlagen (Suter und Snipes 1995). *PERP*-defiziente Mäuse zeigen in den selben Regionen ebenso keinen Phänotyp (Andrea Vortkamp, pers. Mitteilung). Eine Überexpression von *PMP22* sollte daher Aufschluß über die Funktion dieses Proteins während der endochondralen Ossifikation geben.

Das zweite für die Überexpression in Hühnchengliedmaßen gewählte Genprodukt ist *Tsg* (Graf et al. 2001). *Tsg* wirkt in Interaktion mit Chordin als Antagonist der Knochenmorphogenetischen Proteine (BMP) (Ross et al. 2001; Scott et al. 2001). Da die *BMP*-Expression durch *Ihh* induziert wird (Minina et al. 2001) und die *Chordin*-Expression positiv durch *Ihh* reguliert wird (Pathi et al. 1999) stellt sich die Frage, ob auch *Tsg* durch *Ihh* reguliert wird. Eine Expressionsdomäne von *Tsg* findet sich in der periartikulären Region, wo ebenso die *PTHrP*- und die *Chordin*-Expressionsdomänen zu finden sind. Dies ist ein weiterer Hinweis für eine *Ihh*-abhängige Expression.

Beide Gene wurden mittels retroviraler Infektion in den Gliedmaßenanlagen des Hühnerembryos überexprimiert. Die Injektion des RCAS-Virus erfolgte bei der embryonalen Entwicklungsstufe Hamburger-Hamilton (HH) 20. Die Embryonen wurden daraufhin noch weitere sieben Tage inkubiert. Die Analyse erfolgte nach morphologischer Untersuchung durch *in-situ*-Hybridisierung. Hierbei wurde die Expression des transfizierten Genes sowie *Ihh* und *Chordin* nachgewiesen. Es konnte weder bei den *PMP22*-überexprimierenden noch bei den *Tsg*-überexprimierenden Gliedmaßen ein abnormaler Phänotyp ermittelt werden. Auch vergleichende morphologische Untersuchungen der Chondrozytendifferenzierung der infizierten Gliedmaßen zeigten keinerlei Auffälligkeiten.

---

Ein solches negatives Ergebnis kann verschiedene Ursachen haben: Aufgrund des evolutionären Unterschiedes von Huhn und Maus können sich Unterschiede in der Proteinfunktion ergeben. So ist es möglich, daß in der Maus wirksame Proteine im Huhn keinerlei Wirkung zeigen, da durch eine Varianz in der Proteinstruktur und der Signalpeptide funktionale Bestandteile nicht erkannt werden oder die subzelluläre Lokalisation verfehlt wird. Diese Annahme wird gestützt durch den großen unterschiedlichen Bereich im N-Terminus von Tsg, der als Signalpeptid zur Sezernierung von Tsg identifiziert wurde. Ein Vergleich dieses Bereiches zeigt eine große Varianz in der Aminosäuresequenz (Scott et al. 2001 und Accession Nr. AAK27324 unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Die Proteinsequenz von Tsg im Huhn war während der Durchführung der RCAS-Injektionen nicht bekannt und konnte daher nicht berücksichtigt werden (Abb. 35). Im Falle von Tsg besteht darüber hinaus die Möglichkeit, daß die antagonistische Wirkung von Tsg durch eine Hochregulation von BMPs kompensiert werden kann. Weiterhin werden sekretierte Faktoren wie Tsg oft artspezifisch post-translational, z. B. durch Glykosilierungen, modifiziert. So kann es zu Unterschieden in der Wirksamkeit von gleichen Proteinen in verschiedenen Spezies kommen.

Die Überexpression von PERP im Huhn hat ebenfalls keinen Phänotyp gezeigt (Karl-Georg Lintermann, pers. Mitteilung). Es ist daher möglich, daß erst die Mißexpression von PMP22 in Kombination mit PERP einen Effekt zeigt. Eine vergleichende Analyse der Aminosäuresequenz von Maus-PMP22 und Huhn-PMP22 ist nicht möglich, da das Huhn-Homolog bisher nicht veröffentlicht wurde.

---

## 5.11 Ausblick

In dieser Arbeit wurde für das bekannte Gen Legumain und für das unbekannte Gen ST2C6 eine Ihh-Genaktivierung nachgewiesen. Folgende Studien sollten daher die Funktion dieser Gene untersuchen.

Ob ST2C6 tatsächlich im Zellkern lokalisiert ist, läßt sich nicht mit Sicherheit sagen, obwohl ein NLS-ähnliches Proteinmotiv gefunden wurde. Nach vollständiger Identifikation der kodierenden Sequenz für ST2C6 wäre es möglich, die subzelluläre Lokalisation durch Überexpressionsexperimente und mikroskopische Analyse zu klären. Auch die Herstellung von ST2C6-transgenen Tieren könnte Hinweise auf die Funktion dieses Genes liefern. Eine ST2C6-defiziente Maus befindet sich zur Zeit in Vorbereitung (Milana Tchinkova, pers. Mitteilung). Sollte ST2C6 eine entscheidende Aufgabe bei der Knocheninduktion übernehmen, könnte die Analyse des Phänotyps dieser Maus darüber Klarheit verschaffen. Eine weitere Analyse von ST2C6 schlosse die Aufklärung der Rolle von ST2C6 in anderen Spezies, wie z.B. *Drosophila* mit ein. Es ist wahrscheinlich, daß Orthologe zu ST2C6 auch in anderen Tierarten spezifisch exprimiert werden, woraus man weitere funktionale Erkenntnisse ziehen könnte.

Im Falle von Legumain (CT1H8) besteht die Möglichkeit, daß es sich um einen negativen Regulator von Ihh handelt. Auch hier würde sich die Herstellung einer Legumain-defizienten oder -überexprimierenden Maus lohnen. Falls eine stärkere Aktivierung von Ihh-Zielgenen (wie *Ptc*) in Legumain-defizienten Mäusen stattfindet, würde dies die Hypothese bestätigen, daß Legumain Ihh durch Proteolyse inaktiviert. Dies sollte sich auch im Phänotyp dieser Tiere niederschlagen, denn bei einer Inaktivierung des Ihh-Signalweges sollte eine stärkere Differenzierung sichtbar sein. Proteinextrakte aus Legumain-defizienten oder Legumain-überexprimierenden Mäusen könnten im Western-Blot auf ihren Ihh-Gehalt hin untersucht werden. Sollte in Legumain-defizienten Tieren ein höherer Ihh-Gehalt nachweisbar sein, würde dieses Ergebnis für eine Inhibition von Ihh durch Legumain sprechen.