

Aus dem
Otto-Warburg-Laboratorium
am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik
Arbeitsgruppe Dr. A. Vortkamp

Inaugural-Dissertation

**Identifizierung neuer Zielgene im
Indian-Hedgehog Signalweg**

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

des Fachbereichs
Biologie / Chemie / Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hans Markus Wenzel
aus Hoya / Weser

Berlin, im März 2003

1. Gutachter:

Prof. Dr. G. Korge, Institut für Genetik

2. Gutachter:

Prof. Dr. W. Messer, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik

Tag der Disputation: 04. Juli 2003

Für meine Eltern und meine Großmutter

Zusammenfassung

Die Knochenentwicklung bei Vertebraten beginnt während der Embryonalentwicklung. Die meisten Knochen entstehen auf dem Weg der endochondralen Ossifikation. Hierbei kondensieren aus mesenchymalen Vorläuferzellen Chondrozyten. Diese proliferieren und differenzieren zu hypertrophen Chondrozyten, die schließlich durch Knochen ersetzt werden. Dieser Mechanismus der Knochenbildung findet postnatal bis zur Schließung der Wachstumsfuge statt und wird bei der Heilung von Knochenbrüchen reaktiviert. Ein wichtiger Signalfaktor, der sowohl die Differenzierung als auch die Proliferation und Knocheninduktion kontrolliert, ist der sekretierte Signalfaktor Indian-Hedgehog (Ihh). Frühere Studien haben gezeigt, daß die Kontrolle der Chondrozytendifferenzierung durch Ihh im Rahmen des Ihh/PTHrP-Rückkopplungs-kreises kontrolliert wird. Dabei reguliert Ihh durch die Induktion von Parathyroid Hormone related peptide (PTHrP) die Differenzierung von Chondrozyten zu hypertrophen Chondrozyten und ist proportional zur Menge der sich differenzierenden Chondrozyten exprimiert.

Ziel dieser Arbeit war es, frühe Zielgene von Ihh zu identifizieren. Es konnte erstmals gezeigt werden, daß durch Cyclopamin eine Blockade des Ihh-Signalweges in der Kultur embryonaler Mausgliedmaßen erreicht wird. Diese Blockade führt zu einer ausbleibenden Induktion von PTHrP und einer verstärkten Differenzierung. Die Stimulation des Ihh-Signalweges wurde mit rekombinantem Shh-Protein erreicht. Auf dieser Grundlage wurde ein Screen nach Ihh-Zielgenen mit PCR-basierter subtraktiver Hybridisierung durchgeführt. Es wurden 60 Gene für die Aktivierung und 74 Gene für die Inhibition des Ihh-Signalweges gefunden. Von diesen 134 Klonen zeigten 32 ein chondrozytenspezifisches Expressionsmuster. Über die Transkriptquantifizierung dieser 32 Kandidaten mittels RNase-Protection Assay konnten zwei Gene identifiziert werden, die in Antwort auf eine Inhibition des Ihh-Signalweges herabreguliert werden. Beide Gene werden von Ihh-defizienten Mäusen nicht exprimiert. Darüberhinaus zeigen Ihh-überexprimierende Mäuse eine Aktivierung der Expression dieser Gene in ihren Gliedmaßenanlagen.

Eines der gefundenen Gene kodiert für Legumain, eine Cystein-Endopeptidase. Aufgrund des Expressionsmusters, das teilweise mit dem von Ihh überlappt, ist es möglich, daß Legumain ein negativer Regulator des Ihh-Signalweges ist. Weiterhin wird Legumain im Knochen exprimiert. Dies läßt auf eine unterstützende Rolle bei der Deposition der Knochenmatrix in dieser Region schließen.

Das zweite Gen konnte einer neuen Genfamilie zugeordnet werden, die sich durch die computerannotierte Domäne unbekannter Funktion 590 (DUF 590) auszeichnet. Die Analyse der murinen EST-Datenbank ergab eine Transkriptsequenz von 5,9 kb mit einem offenen Leserahmen von 2727 Basen, entsprechend 909 Aminosäuren. Der Locus für dieses Gen konnte identifiziert werden. Er liegt auf dem Mauschromosom 15 in der Bande 15E3. Der Genlocus erstreckt sich über 185 kbp und umfaßt 20 Exons sowie ein alternatives Exon.

In dieser Arbeit wurde ein neuer methodischer Ansatz zur effektiven Inhibition des Ihh-Signalweges etabliert. Die darauf aufbauende Identifikation von zwei neuen Zielgenen ist die Grundlage für ein tiefergehendes Verständnis des Ihh-Signalweges.

Inhalt

Zusammenfassung	4
1 Einleitung	9
1.1 Der Hedgehog Signalweg	9
1.1.2 Funktion der Hedgehog-Genfamilie	9
1.1.3 Bildung der biologisch aktiven Form von Hedgehog-Signalfaktoren	10
1.1.3 Der Signaltransduktionsweg von Shh	11
1.2 Die Knochenentwicklung bei Säugetieren	13
1.2.1 Die endochondrale Ossifikation	14
1.2.2 Die endochondrale Ossifikation während der Embryonalentwicklung der Maus	15
1.2.3 Die Regulation der Chondrozytendifferenzierung durch Ihh und PTHrP	16
1.3 Die <i>in-vitro</i> -Organkultur	19
1.4 Subtraktive PCR-basierte Hybridisierung	20
1.5 Zielsetzung der Arbeit	21
2 Material	22
2.1 Tierstämme	22
2.2 Zelllinien	22
2.3 Bakterienstämme	22
2.4 Plasmid-Vektoren	22
2.4.1 Klonierungsvektoren	22
2.4.2 Vektoren zur <i>in-ovo</i> -Genmißexpression	22
2.4.3 Vektoren zur Herstellung von Hybridisierungsproben	22
2.5 I.M.A.G.E.-Klone	23
2.6 Oligonukleotide	23
2.7 Gewebekultur-Medien und Seren	24
2.8 Pufferlösungen	24
2.9 Enzyme und Kits	24
2.10 Chemikalien	24
2.11 Radiochemikalien	24
2.12 Antikörper	25
2.13 Supplemente für die Gliedmaßenkultur	25
2.14 Software	25
2.14.1 Bildverarbeitung	25
2.14.2 Textverarbeitung und Layout	25
2.14.4 Sequenzdatenvergleich	25
2.14.4 Webtools	25
2.14.5 Bildquantifizierung	25
3 Methoden	26
3.1 DNA-Präparationen	26
3.1.1 Genomische DNA-Präparation aus Mausschwanzspitzen	26
3.2 Isolierung von RNA	26
3.2.1 RNA-Präparationen	26

3.3 Reverse Transkription	27
3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	27
3.5 Gelelektrophoresen	27
3.5.1 DNA-Agarose-Gelelektrophorese	27
3.5.2 RNA-Agarose-Gelelektrophorese	28
3.5.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
3.6 Transfer von DNA und RNA	29
3.6.1 Southern Blot	29
3.6.2 Northern Blot	29
3.6.3 Radioaktive Markierung von DNA und Filterhybridisierung	30
3.7 PCR-Methoden	30
3.7.1 Präparative PCR	30
3.7.2 Analytische PCR	31
3.7.3 PCR zur Genotypisierung von transgenen Mäusen	31
3.8 PCR-basierte cDNA-Subtraktion	32
3.9 Quantifizierung der mRNA mit dem RNase-Protection Assay	34
3.10 DNA-Klonierungstechniken	35
3.10.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	35
3.10.2 Ligation von DNA	35
3.11 Transformation kompetenter Bakterien	35
3.11.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	36
3.12 Sequenzierung	36
3.13 Analyse und Reinigung von Proteinen	36
3.13.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
3.13.2 Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Brilliant-Blue	37
3.13.3 Western Blot	37
3.13.4 Färbung von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen mit Ponceau S	37
3.13.5 Spezifischer Proteinnachweis durch Antikörper mittels Alkalischer Phosphatase	38
3.13.6 Proteinbestimmung (BCA-Methode)	38
3.13.7 Aufreinigung von Maus IgG1 aus Ascites	38
3.13.8 Spaltung von Maus IgG1 in Fab- und Fab2-Fragmente	39
3.14 Gewebe-Präparationen und -Kulturen	40
3.14.1 Präparation gezielt angepaarter Mausembryonen	40
3.14.2 Präparation und Kultur von Maus-Gliedmaßenanlagen	40
3.14.3 Präparation von Hühnerembryonen	40
3.14.4 Gliedmaßenorgankulturen	40
3.15 Einbett- und Schnitt-Techniken	41
3.15.1 Einbetten und schneiden von Gliedmaßen in Paraffin	41
3.16 RNA <i>in-situ</i> -Hybridisierung von Paraffinschnitten	41
3.16.1 Herstellung radioaktiv-markierter RNA-Proben durch <i>in-vitro</i> -Transkription	41
3.16.2 <i>In-situ</i> -Hybridisierung	42
3.17 Überexpression von Genen in Hühnerembryonen mit Hilfe replikations-kompetenter Retroviren	43
3.17.1 Klonierung der Injektionskonstrukte	44
3.17.2 Produktion der Retroviren	44
3.17.3 Titration der Retroviren	44
3.17.4 Injektion in Hühnerembryonen	45

4 Ergebnisse	46
4.1 Inhibition und Stimulation des Ihh-Signalweges	46
4.1.1 Inhibition des Ihh-Signalweges mit Antikörpern und Antikörperfragmenten	46
4.1.2 Inhibition des Ihh-Signalweges mit Cyclopamin	50
4.1.3 Cyclopamin ist ein effektiver Inhibitor des Ihh-Signalweges	51
4.1.4 Zeitlicher Verlauf der Ihh-Zielgenrepression	54
4.1.3 Stimulation des Ihh-Signalweges mit rekombinantem Shh-Protein	55
4.2 PCR-basierte Subtraktion von cDNA	56
4.3 Analyse von klonierten Fragmenten	58
4.2.1 Analyse der Klonbibliotheken	58
4.2.2 <i>In-situ</i> -Hybridisierung differentiell exprimierter Kandidaten	61
4.3.1 Funktionale Analyse bekannter gefundener Klone	63
4.3.2 Mißexpression von PMP22 und Tsg in Hühnchengliedmaßen	65
4.4 RNase-Protection Assays	67
4.5 <i>In-vivo</i> -Expressionsanalyse der Klone CT1H8 und ST2C6	71
4.6 Rückbestätigung der differentiellen Genexpression	71
4.7 Das Transkript von ST2C6	78
5 Diskussion	81
5.1 Identifikation von Zielgenen im Indian Hedgehog-Signalweg	81
5.2 Inhibition des Ihh-Signalweges durch Antikörper	82
5.3 Cyclopamin als Inhibitor des Hedgehog-Signalweges bei Vertebraten	83
5.4 Aktivierung des Ihh-Signalweges	85
5.4 Screen nach Zielgenen im Indian Hedgehog-Signalweg	86
5.5 Rückbestätigung der isolierten Klone	90
5.5.1 Erste Stufe der Rückbestätigung: Transkriptquantifizierung	90
5.5.2 Zweite Stufe der Rückbestätigung: konditionierte Gliedmaßenkultur	91
5.5.3 Dritte Stufe der Rückbestätigung: transgene Mausstämme	91
5.6 Analyse des Klones CT1H8	93
5.7 Analyse des Klones ST2C6	95
5.8 Vervollständigung des Transkriptes von ST2C6	97
5.9 Der Klon ST3C7 (PMP22)	99
5.10 Mißexpression von potentiellen Zielgenen mit RCAS	100
5.11 Ausblick	103
6 Literatur	104
7 Anhang	120
7.1 Abkürzungen	120
7.2 Genverzeichnis	121
7.3 Lebenslauf	122
7.4 Danksagung	123
7.5 Erklärung	124