

1 Einleitung

1.1 Der Hedgehog Signalweg

1.1.2 Funktion der Hedgehog-Genfamilie

Die *hedgehog* (*Hh*) Genfamilie kodiert für sezernierte Proteine und spielt während der Embryonalentwicklung vieler Tierarten eine wichtige Rolle. Erstmals wurde das *Drosophila*-Gen *hedgehog* bei einem Screen für Mutanten der Segmentierung identifiziert (Nüsslein-Volhard und Wieschaus 1980). Bei *Drosophila* ist *hedgehog* ein Segmentpolaritätsgen, das in den posterior lokalisierten Zellen jedes Segments exprimiert wird und in benachbarten, aber auch weiter entfernten, anterioren Zellen die Expression seiner Zielgene aktiviert. Darüber hinaus ist Hedgehog an der Gliedmaßen-, Flügel- und Kopfdifferenzierung der Fliegen beteiligt. Unter den Mammalia existieren drei Homologe des *Drosophila*-Proteins: Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) und Desert Hedgehog (Dhh) (Hammerschmidt et al. 1997).

Die Mitglieder der Hedgehog-Proteinfamilie werden oft als Morphogene bezeichnet (Gritli-Linde et al. 2001; Goetz et al. 2002). Sie werden in Organisationszentren, wie z. B. der ZPA (*zone of polarizing activity*) der Gliedmaßenknospen (Lopez-Martinez et al. 1995), der Neuralplatte im Neuralrohr (Ericson et al. 1996) oder in den Imaginalscheiben der Flügel von *Drosophila* (Strigini und Cohen 1997) gebildet und diffundieren von dort in das benachbarte Gewebe. Dabei bauen sie einen Konzentrationsgradienten im Gewebe auf. Innerhalb dieses Gradienten werden die Zielgene des Morphogens konzentrationsabhängig aktiviert oder reprimiert. Mit unterschiedlicher Distanz zum Organisationszentrum reagieren die Zellen so mit einer unterschiedlichen Differenzierung (Briscoe et al. 2001).

Eine wichtige Rolle spielt **Shh**, das schon kurz nach Einsetzen der Gastrulation exprimiert wird. In frühen Embryonalstadien initiiert Shh unter anderem die Rechts-Links-Asymmetrie. In späteren Stadien ist Shh an der Entwicklung des Neuralrohres, der Somiten, der Gliedmaßen sowie bei der Bildung von Haarfollikeln und epithelialen Organen beteiligt (Echelard et al. 1993; Bitgood und McMahon 1995; Ekker et al.

1995; Ericson et al. 1996). *Shh*-Mutanten sind nicht lebensfähig, sie sind zyklisch und zeigen schwere Defekte bei der Bildung des Neuralrohres und der distalen Gliedmaßenanlagen. Weiterhin bilden diese Tiere keine Wirbelsäule aus (Chiang et al. 1996).

Dhh wird in peripheren Nerven und geschlechtsspezifisch in den Hoden exprimiert (Bitgood et al. 1996; Parmantier et al. 1999). *Dhh*-defiziente männliche Mäuse sind lebensfähig, aber infertil. Weibchen mit inaktivierten *Dhh*-Allelen zeigen keinerlei Auffälligkeiten (Oldak et al. 2001).

Ihh wird in der Embryonalentwicklung in den Knochenanlagen während der endochondralen Ossifikation exprimiert (Iwasaki et al. 1997; Chung et al. 2001). Weiterhin wird *Ihh* im extraembryonalen Endoderm (Becker et al. 1997), dem Darm, den Milchdrüsenanlagen, sowie der Lunge exprimiert (Bitgood und McMahon 1995). *Ihh*-defiziente Mäuse zeigen schwere Skelettmissbildungen und sterben nach der Geburt (St-Jacques et al. 1999).

1.1.3 Bildung der biologisch aktiven Form von Hedgehog-Signalfaktoren

Der Hh-Signalweg wurde bei der Maus hauptsächlich am Beispiel von *Shh* aufgeklärt. Daher wird im Folgenden die Erläuterung des murinen Hh-Signalweges am Beispiel von *Shh* ausgeführt. Es wird jedoch davon ausgegangen, daß die Mechanismen zur Generierung der biologisch aktiven Form von *Shh* sowie die Signaltransduktion auch für die beiden Homologe, *Ihh* und *Dhh*, Gültigkeit besitzen (Hammerschmidt et al. 1997).

Eine Besonderheit im Hedgehog Signalweg ist die Generierung des aktiven Morphogens durch autoproteolytische Spaltung des Hh-Vorläuferproteins. Diese Vorgänge wurden im Mausmodell für *Shh* untersucht und beschrieben: Das *Shh*-Vorläuferprotein besteht aus zwei Strukturbestandteilen: einem Signalpeptid mit einer hochkonservierten N-terminalen Domäne sowie einer weniger konservierten C-terminalen Domäne. Das Molekulargewicht dieses Vorläuferproteins beträgt etwa

45 kDa. Die C-terminale Domäne besitzt autoproteolytische Aktivität und katalysiert die Spaltung des Vorläuferproteins in eine N-terminale Domäne (ShhN, ca. 20 kDa) und eine C-terminale Domäne (ShhC, ca. 25 kDa) (Bumcrot et al. 1995). Dieser Vorgang der Autoproteolyse besitzt große Ähnlichkeit mit der Selbstspaltungsreaktion von Inteinen, einer Familie prokaryotischer Proteine (Hall et al. 1997). Die N-terminale Domäne wird durch eine Folge chemischer Modifikationen zum biologisch aktiven Morphogen: An das C-terminale Ende wird kovalent ein Cholesterinrest gebunden (Porter et al. 1996a, 1996b). Im Anschluß wird an das N-terminale Ende ein Palmitatrest gebunden und ShhN wird glykosiliert (Taylor et al. 2001). Durch die beiden lipophilen Modifikationen (Cholesterinrest und Palmitatrest) wird ShhN in seine biologisch aktive Form überführt. ShhC besitzt nach bisherigen Erkenntnissen keine weiteren Funktionen (Porter et al. 1996). Über das *trans*-Golgi-Netzwerk wird ShhN zur Zellmembran transportiert und sezerniert. Der genaue Mechanismus dieses Sekretionsvorgangs ist noch nicht im Detail entschlüsselt. In jüngster Zeit wurde bei der Maus und bei *Drosophila* das Protein Dispatched (Disp) charakterisiert, welches für die Sekretion von ShhN notwendig ist (Burke et al. 1999; Kawakami et al. 2002; Ma et al. 2002). Es ist noch nicht geklärt, wie ShhN seine *long-range*-Wirkung erzielt, bei der es über eine Distanz von mehreren Zell-durchmessern hinweg diffundieren kann. Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (ECM) spielt sicher eine Rolle bei der Hh-Signalübertragung über große Distanzen. Bei *Drosophila*-Mutanten mit Defiziten in der Bildung der ECM ist auch die Fähigkeit zur Hh-Signaltransduktion beeinträchtigt (The et al. 1999).

1.1.3 Der Signaltransduktionsweg von Shh

Der Shh-Rezeptorkomplex in den Zielzellen besteht aus zwei Proteinen, dem 12-Transmembrandomänen-Rezeptor Patched (Ptc) und dem 7-Transmembrandomänen-Rezeptor Smoothed (Smo). Von *Ptc* sind bei den Mammalia zwei Homologe, *Ptc1* und *Ptc2* identifiziert worden (Hammerschmidt et al. 1997). In Abwesenheit von ShhN inhibiert Ptc Smo (Chen und Struhl 1998). Ist ShhN vorhanden, wird es von Ptc gebunden und die Inhibition von Smo durch Ptc wird aufgehoben (Murone et al. 1999). Smo aktiviert einen cytosolischen Multiprotein-Komplex aus

Fused, Costal-2 und dem Vorläuferprotein des Zinkfinger Transkriptionsfaktors Gli (Delattre et al. 1999; Park et al. 2000). Aus dem Gli-Vorläuferprotein wird bei Aktivierung des Hh-Signalweges eine Aktivator-Form gebildet. Diese Aktivator-Form von Gli verläßt den Proteinkomplex, transloziert in den Nukleus und aktiviert Hedgehog-Zielgene. In Abwesenheit von Shh erfolgt konstitutiv die Bildung der Repressor-Form. Diese differentielle Aktivität der Gli-Proteine ist durch proteolytische Prozessierung reguliert. Das gespaltene Gli-Protein bildet die Repressor-Form, das ungespaltene Protein die Aktivator-Form (Matise und Joyner 1999; Ruiz i Altaba 1999a, 1999b).

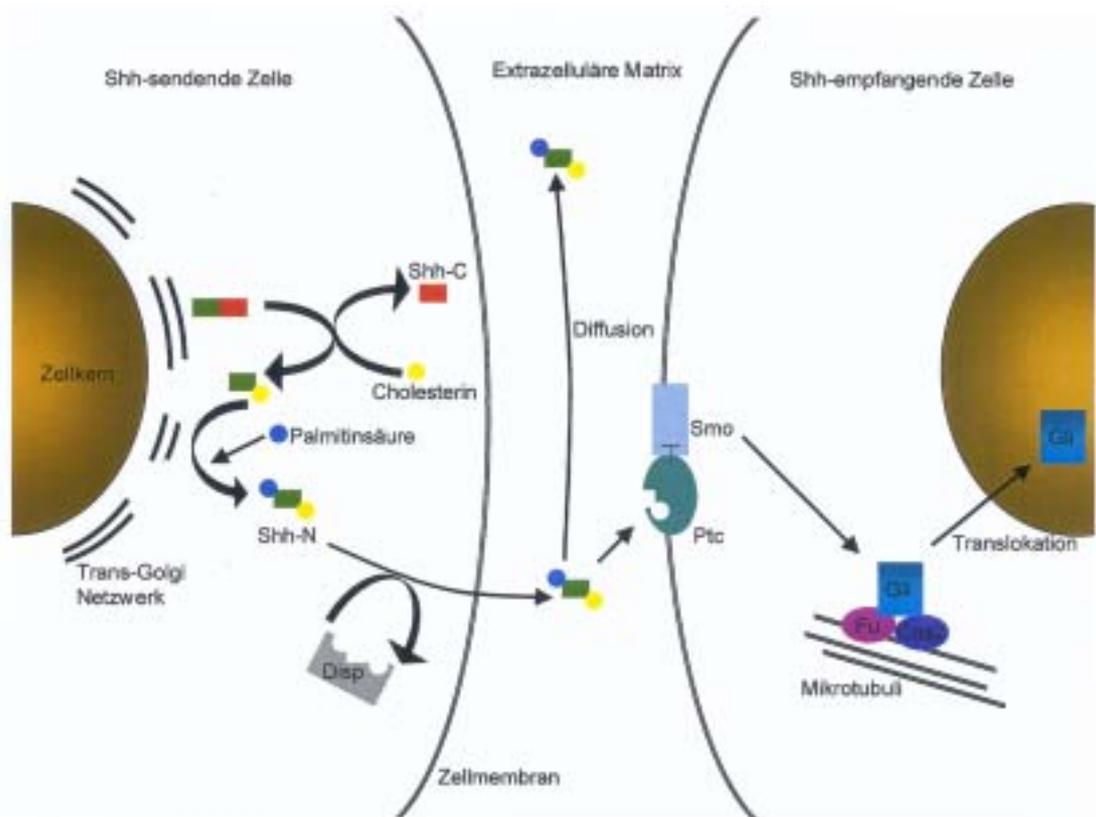


Abb. 1: Signaltransduktion von Shh

Schematische Darstellung der Hh-Signaltransduktion. Eine genaue Beschreibung ist dem Text zu entnehmen. Abkürzungen: Shh-N: N-terminales Signalpeptid von Shh; Disp: Dispatched; Fu: Fused; Cos2: Costal2.

Ein bekanntes direktes Zielgen für Hh-Signale ist *Ptc* selbst. Im Vertebraten findet man eine geringe Expression von *Ptc* in fast allen Geweben. Nach Erhalt eines Hh-Signales findet eine Induktion der Expression von *Ptc1* und *Ptc2* statt (Marigo und Tabin 1996; Vortkamp et al. 1996; Pearse et al. 2001). In Vertebraten wird in allen bisher untersuchten Geweben die *Ptc*-Expression durch Hh-Signale heraufreguliert (Hammerschmidt et al. 1997).

1.2 Die Knochenentwicklung bei Säugetieren

Die Bildung von Knochen bzw. funktionalen Skelettelementen ist ein kontinuierlicher Prozeß, der mit der Embryonalentwicklung beginnt und die gesamte Lebensdauer anhält. Dieser Prozeß wird in erster Linie von folgenden verschiedenen Zelltypen getragen: Den Chondrozyten als knorpelbildender Zelltyp sowie den Osteoblasten und Osteoklasten, die den Knochenaufbau bzw. die Knochenresorption steuern (Gilbert 2000).

Knochen können auf zwei Arten entstehen, entweder durch die desmale Ossifikation oder durch die endochondrale Ossifikation. Durch die desmale Ossifikation differenzieren Mesenchymzellen direkt zu Osteoblasten und bauen Knochen auf (Gilbert 2000). Durch diesen Prozeß werden hauptsächlich das Neurocranium, Teile der Claviculae sowie Teile der Kieferknochen gebildet. Durch die endochondrale Ossifikation wird das gesamte axiale und das appendikuläre Skelett sowie Teile der Gesichtsknochen gebildet. Dabei werden die späteren Skelettelemente in Form von Knorpelstrukturen angelegt, die man als "Blaupause" des späteren Knochen- bzw. Skelettapparates auffassen kann (Hinchcliffe und Johnson 1980; Erlebacher et al. 1995). Diese Knorpelstrukturen kondensieren aus Zellen mesenchymalen Ursprungs, die zu Chondrozyten differenzieren. Im Anschluß werden die ausdifferenzierten chondrogenen Skelettanlagen durch Knochen ersetzt.

Ihh kann als ein Schlüsselfaktor der endochondralen Ossifikation angesehen werden (Hammerschmidt et al. 1997). Die Analyse der von Ihh abhängigen Genregulation während der Chondrozytendifferenzierung in der endochondralen Ossifikation ist Gegenstand dieser Arbeit. Daher soll zunächst der Vorgang der endochondralen Ossifikation näher erläutert werden.

1.2.1 Die endochondrale Ossifikation

Zu Beginn der endochondralen Ossifikation findet eine Kondensation von mesenchymalen Zellen statt, die zu Chondrozyten differenzieren. Parallel dazu differenziert an den Randbereichen der Kondensationen das Perichondrium, eine Zellschicht aus flachen Fibroblasten. Das Perichondrium umhüllt die knorpeligen Skelettanlagen vollständig. Signale, die zwischen dem Perichondrium und den Chondrozyten ausgetauscht werden, steuern die weitere Differenzierung der Skelettanlage (Shum und Nuckolls 2002). Zunächst vollziehen die Chondrozyten mehrere Runden der Proliferation. Im Zentrum der Knochenanlage beginnt dann die Differenzierung: die Chondrozyten ändern postmitotisch ihre Morphologie sowie ihre biologischen Eigenschaften. Während dieser Chondrozytendifferenzierung kann eine starke Volumenzunahme der Zellen beobachtet werden, weshalb sie auch als hypertrophe Chondrozyten bezeichnet werden. Gleichzeitig zur hypertrophen Differenzierung findet eine Mineralisierung der Knorpelmatrix statt. Vollständig ausdifferenzierte Chondrozyten unterlaufen abschließend die Apoptose (Horton et al. 1998) und werden durch Knochengewebe ersetzt. Zeitgleich dazu findet eine Invasion von Blutgefäßen in dieser Region statt.

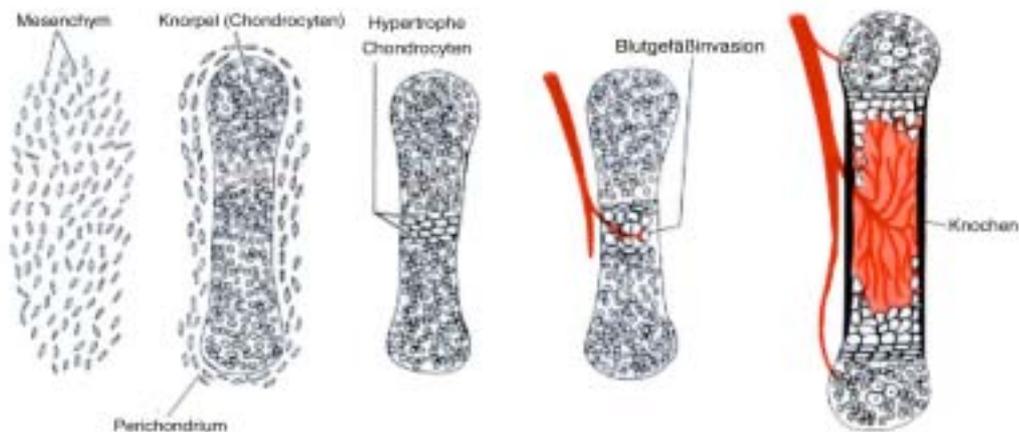


Abb. 2: Die endochondrale Ossifikation

Zu Beginn der endochondralen Ossifikation kondensieren Zellen mesenchymalen Ursprungs zu knorpeligen Skelettelementen. Gleichzeitig dazu bildet sich das Perichondrium, eine Umhüllung der Skelettelemente. Die Skelettelemente bestehen aus Chondrozyten, die zunächst proliferieren und später differenzieren. Im Laufe der Differenzierung bilden sich hypertrophe Chondrozyten, später findet in diesem Bereich die Blutgefäßinvasion und Knochenbildung statt. (Nach: Gilbert 2000)

Mit dem Blutstrom werden Osteoblasten in die Region gebracht, die damit beginnen, Knochenmatrix zu synthetisieren (Erlebacher et al. 1995; Hall und Miyake 2000a, 2000b). Dazu muß die Knorpelmatrix zuerst durch Chondroklasten, einem Subtyp der Osteoklasten abgebaut werden (Bronckers et al. 2000). Im Rahmen der Knochenbildung findet ein ständiger Auf- und Abbau der Knochensubstanz statt. Die Osteoblasten stellen hierbei die Zellpopulation dar, die für den Knochenaufbau verantwortlich ist. Die Osteoklasten sind der zelluläre Gegenspieler der Osteoblasten und führen die Knochenresorption durch.

Mit voranschreitender Embryonalentwicklung bildet sich ein sekundäres Ossifikationszentrum in den Knochenanlagen. Daraufhin werden die verschiedenen Stadien der Chondrozytendifferenzierung in einem immer schmaler werdenden Streifen, der Wachstumsfuge, konzentriert. Die Wachstumsfuge ist auch postnatal noch vorhanden, von ihr geht das Längenwachstum des Skelettelementes aus. Das Längenwachstum wird durch Schließung der Wachstumsfuge beendet, wenn alle Chondrozyten durch Knochen ersetzt sind. Der Knochen hat somit seine endgültige Größe erhalten. Mit Abschluß des Knochenwachstums wird die Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten jedoch nicht eingestellt. Die Remodellierung des Skelettes durch diese Zelltypen dauert lebenslang an. Ebenso ist bei der Heilung von Frakturen die Reaktivierung der embryonalen Prozesse mit der Anlage von Knorpel, dessen Differenzierung und daran anschließende Ossifikation ein lebenslang induzierbarer Vorgang (Ferguson et al. 1998; Vortkamp et al. 1998; Ferguson et al. 1999).

1.2.2 Die endochondrale Ossifikation während der Embryonalentwicklung der Maus

Ab dem Tag 12,5 der Embryonalentwicklung der Maus (E 12,5 oder 12,5 dpc) können die Anlagen fast aller knorpeligen Skelettelemente, die auf dem Wege der endochondralen Ossifikation kondensieren, nachgewiesen werden. Ebenso ist in diesem Stadium bereits eine Ihh-Expressionsdomäne im Zentrum einiger Skelettelemente vorhanden (Vortkamp et al. 1998).

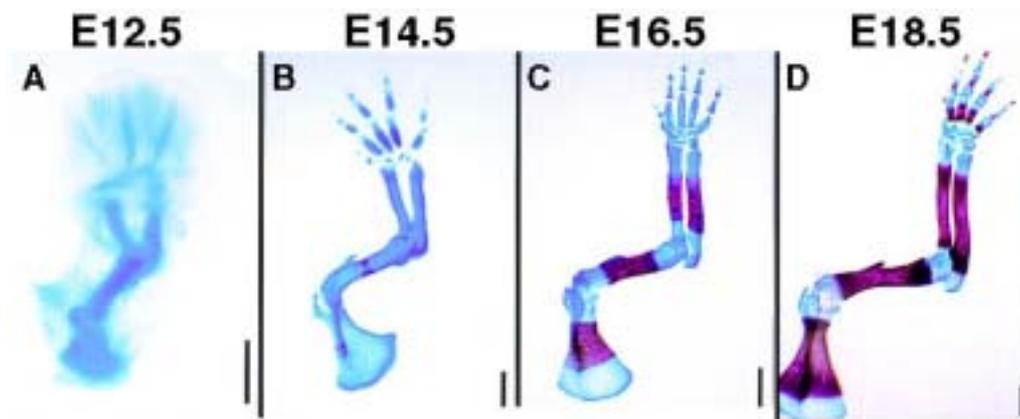


Abb. 3: Embryonale Entwicklung von vorderen Mausgliedmaßen

Vordere Gliedmaßenanlagen aus verschiedenen Entwicklungsstadien der Maus sind präpariert und mit Alcian-Blau und Alizarin-Rot gefärbt worden. Durch diese Färbemethode wird chondrogenes Gewebe mit dem Farbstoff Alcian-Blau blau angefärbt. Der Farbstoff Alizarin-Rot färbt mineralisiertes Knochengewebe rot. Im Stadium E12,5 der Mausembryonalentwicklung sind Kondensationen von Chondrozyten sichtbar (A). Mit Tag E14,5 ist die Chondrozytendifferenzierung gut sichtbar. Erste mit Alizarin-Rot anfärbbare Bereiche (hier im Zentrum des Humerus) werden sichtbar (B). Am Tag E16,5 findet sich zusätzlich eine deutliche Rotfärbung in Radius und Ulna sowie der Scapula (C). Mit dem Tag E18,5 ist die Ossifikation bereits weit fortgeschritten, Ossifikationszentren sind auch in den Fingern sichtbar (D). Maßstab: 0,5 mm.

Ab dem Tag 14,5 sind die verschiedenen Entwicklungsstufen der Chondrozyten erkennbar; die Zone der proliferierenden Chondrozyten hat sich nach außen verschoben und im Zentrum der Knochenanlagen sind nun hypertrophe Chondrozyten lichtmikroskopisch erkennbar. Die Population der hypertrophen Chondrozyten zeichnet sich neben einer veränderten Morphologie durch die Expression von *Kollagen Typ-X (col-X)* in der Matrix aus. Erste Anzeichen der Knochenbildung sind im Humerus bereits ab dem Tag 14,5 nach der Befruchtung zu erkennen, diese weiten sich an E 15,5 aus. Ab E 16,5 sind alle Entwicklungsstadien der Chondrozyten sowie Knochen deutlich erkennbar. Der wahrscheinlich wichtigste Regelkreis für die Steuerung der Chondrozytendifferenzierung ist der *Ihh* / Parathormon (PTHrP)-Rückkopplungskreis (Vortkamp et al. 1996; Lanske et al. 1996).

1.2.3 Die Regulation der Chondrozytendifferenzierung durch *Ihh* und PTHrP

Die Chondrozytenproliferation und -differenzierung in der Wachstumsfuge wird durch einen negativen Rückkopplungskreis reguliert, der aus den sezernierten Signalfaktoren Parathormon oder Parathyroid-hormone related peptide (PTHrP) und

Indian Hedgehog (Ihh) besteht (Vortkamp et al. 1996). PTHrP wird von den Chondrozyten in der Gelenksregion, den periartikulären Chondrozyten, exprimiert. Im Skelettelement ist PTHrP als Inhibitor der Chondrozytendifferenzierung identifiziert worden (Suda 1997). Das PTHrP-Signal wird von Zellen, die den PTHrP-Rezeptor

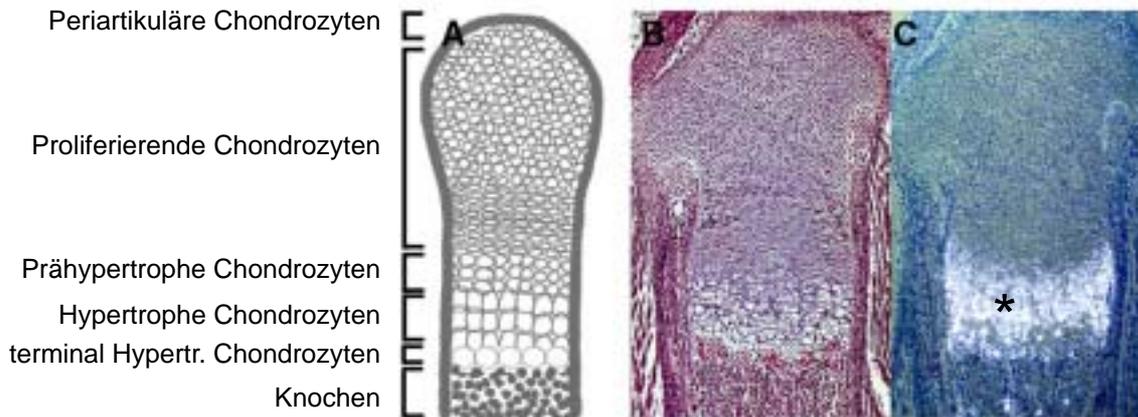


Abb. 4: Stufen der Chondrozytendifferenzierung und *in-situ*-Hybridisierung

In A sind die verschiedenen Entwicklungsstufen von Chondrozyten schematisch dargestellt. In B ist ein Paraffinschnitt eines Teils des Radius einer E 16,5 dpc alten Maus gezeigt. Der Schnitt wurde mit Hematoxylin angefärbt. Die *in-situ*-Hybridisierung mit Kollagen Typ-X ist in C gezeigt (*). Die Genexpression wird als weißes Streulicht im Dunkelfeld sichtbar.

(PTHR) exprimieren, perzipiert. Sie befinden sich im Bereich der proliferierenden und beginnenden differenzierenden Chondrozyten. Diese Zellen reagieren auf das PTHrP-Signal, indem die hypertrophe Differenzierung blockiert wird. *PTHrP*- und *PTHR*-defiziente Mäuse zeigen eine beschleunigte Differenzierung der Chondrozyten (Amizuka et al. 1996; Lanske et al. 1996). Diesem Phänotyp kann entgegengewirkt werden, indem die *PTHrP*-defiziente Mäuse mit einem Mausstamm gekreuzt werden, der eine konstitutiv aktive Form des PTH-Rezeptors (*PTHR**) trägt (Schipani et al. 1995; Karp et al. 2000).

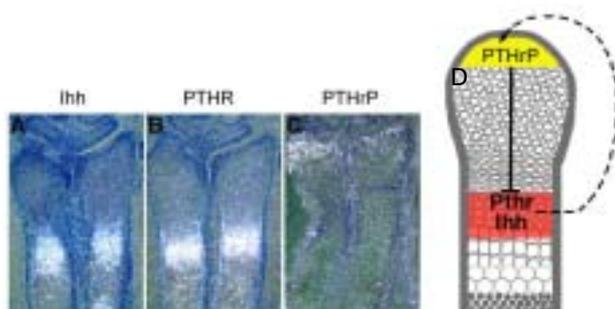


Abb. 5: Der Ihh/PTHrP-Feedback Loop

Die Expression von Ihh (A) hat eine Induktion der PTHrP-Expression zur Folge (C). PTHrP inhibiert bei den PTH-Rezeptor exprimierenden Zellen die weitere Differenzierung (B). Daraus folgt eine geringere Ihh-Expression mit einer geringeren PTHrP-Expression als Konsequenz. Das Modell des Feedback Loops ist in D schematisch dargestellt (Nach Vortkamp et al. 1996).

Chondrozyten, die mit der hypertrophen Differenzierung beginnen, exprimieren *Ihh*. Diese Zellen werden als prähypertrophe Chondrozyten bezeichnet; sie haben die Proliferation eingestellt und mit dem Differenzierungsprozeß begonnen (Vortkamp et al. 1996). Die Expression von PTHrP wird von *Ihh* positiv reguliert (Vortkamp et al. 1996). Eine starke Induktion der PTHrP-Expression durch Überexpression von *Ihh* in Gliedmaßen führt zu einer verzögerten Differenzierung der Chondrozyten (Vortkamp et al. 1996). Andererseits kann bei *Ihh*-defizienten Mausstämmen keine PTHrP-Expression nachgewiesen werden. Dies hat eine stark beschleunigte hypertrophe Differenzierung zur Folge (St-Jacques et al. 1999).

Zusammenfassend können diese Beobachtungen in einem Modell integriert werden, in dem *Ihh* und PTHrP in einem negativen Rückkopplungskreis interagieren: In diesem Modell wird davon ausgegangen, daß die Menge an *Ihh* in einem proportionalen Verhältnis zur Zellzahl der differenzierenden, prähypertrophen Chondrozyten steht. Diese Menge an *Ihh*-Morphogen induziert eine proportional abhängige Menge PTHrP in der periartikulären Region, die eine Inhibition der Differenzierung bewirkt. Nachdem die prähypertrophen Chondrozyten in der hypertrophen Differenzierung vorangeschritten sind, wird die *Ihh*-Expression abgeschaltet. Diese niedrigere *Ihh*-Expression resultiert in einer geringeren Induktion von PTHrP und als Folge davon einem erneuten Einsetzen der Chondrozytendifferenzierung. Dies hat durch den wieder erhöhten Anteil prähypertropher Chondrozyten eine erhöhte *Ihh*-Expression zur Folge (Vortkamp et al. 1996).

Die Analyse von *Ihh*-defizienten Mäusen zeigte neben der bereits erwähnten Rolle in der Regulation der hypertrophen Differenzierung weitere Funktionen von *Ihh* auf (St-Jacques et al. 1999): Bei diesen Mäusen ist die Proliferation der Chondrozyten blockiert und außerdem findet keine endochondrale Knochenbildung statt. Die durch desmale Ossifikation gebildeten Skelettelemente (wie z.B. die Schädelknochen) weisen jedoch keine Veränderung auf. Da diese Effekte nicht bei *PTHrP*- oder bei *PTHR*-defizienten Tieren erkennbar sind, kann davon ausgegangen werden, daß diese Prozesse unabhängig von PTHrP durch *Ihh* gesteuert werden.

Unmittelbar durch Ihh regulierte Zielgene, die die oben aufgeführten Prozesse direkt initiieren, sind bisher nicht identifiziert worden. Bisher sind bei Vertebraten für Ihh nur *Ptc*, *hedgehog-interacting protein (Hip)* und *Gli1* als Zielgene bekannt (Hahn et al. 1996; Marigo et al. 1996; Vortkamp et al. 1996). Das Membranprotein Hip bindet Ihh und begrenzt die Signalreichweite und somit die Signalkapazität. Die Überexpression von Hip in Chondrozyten zeigt einen mit Ihh-defizienten Tieren vergleichbaren Phänotyp (Chuang und McMahon 1999). Die Identifikation von Zielgenen im Ihh-Signalweg ist ein wichtiger Schritt, um die Prozesse, die der Chondrozytendifferenzierung auf molekularer Ebene zugrunde liegen, zu verstehen. Um die Zielgene zu identifizieren, müssen folgende experimentelle Grundlagen geschaffen werden: Erstens muß eine *in-vitro*-Simulation der Chondrozytendifferenzierung mit der Möglichkeit zur Modulation beteiligter Signalwege geschaffen werden. Dies kann durch die Methode der *in-vitro*-Organkultur ermöglicht werden. Zweitens muß ein experimenteller Ansatz gewählt werden, mit dem es möglich ist, aktivierte Gene in einer *in-vitro*-Organkultur zu identifizieren. Dies kann durch die subtraktive PCR-basierte Hybridisierung geschehen.

1.3 Die *in-vitro*-Organkultur

Die Organkultur von embryonalen Mausgliedmaßenanlagen in serumfreier Umgebung erlaubt die Manipulation und Analyse von Signalwegen während der endochondralen Ossifikation (Lanske et al. 1996; Vortkamp et al. 1996; Minina et al. 2001; Minina et al. 2002). Diese Manipulation erfolgt durch Applikation von Wachstumsfaktoren wie PTHrP oder Shh in das Kulturmedium. Hierbei werden Gliedmaßen von Mausembryonen des Stadiums E 14,5 oder E 16,5 verwendet.



Abb. 6: Organkultur

Die freipräparierten Gliedmaßen werden an der Grenzschicht von Zellkulturmedium und Atmosphäre platziert. Das Gewebe liegt auf einer flüssigkeitsdurchlässigen Membran auf. Diese Membran wird durch ein Edelmetallgitter an ihrer Position in der Kulturschale gehalten.

Die Chondrozyten in der Gliedmaßen-Organkultur sind mindestens vier Tage lebensfähig und proliferieren und differenzieren ähnlich den *in-vivo*-Bedingungen. Der Einfluß dieser Behandlung auf die Differenzierung wird durch anschließende *in-situ*-Hybridisierung analysiert (Lanske et al. 1996; Vortkamp et al. 1996).

1.4 Subtraktive PCR-basierte Hybridisierung

Mit der Methode der subtraktiven Hybridisierung ist es möglich, zwei mRNA Populationen zu vergleichen und Transkripte zu identifizieren, die exklusiv in einer der beiden RNA-Populationen vorhanden sind (Sargent und Dawid 1983). In dieser Arbeit wird die ursprünglich veröffentlichte Hybridisierungsstrategie mit der Methode der PCR verknüpft. Durch Verwendung der PCR ist es möglich, Gene zu identifizieren, die in einer geringen Kopienzahl vorliegen (Diatchenko et al. 1996; Diatchenko et al. 1999). Zusätzlich ist bei diesem experimentellen Ansatz auch eine Equalisierung (Normalisierung) der Repräsentationsrate der Transkripte möglich (Soares et al. 1994). Wichtig hierbei ist, von möglichst ähnlichen RNA-Populationen auszugehen, damit der PCR-Schritt spezifisch verlaufen kann. Diese möglichst große Ähnlichkeit der zu vergleichenden Gewebe legt die Nutzung der *in-vitro*-Organkultur nahe, da es hier gezielt möglich ist, ausgehend von einem identischen Differenzierungsstand, die Aktivität bestimmter Signalwege zu modulieren. Shh-Applikation in das Medium der Gliedmaßenkultur führt zu einer Aktivierung des Ihh-Signalweges und damit zu einer Inhibition der Chondrozytendifferenzierung. Die Applikation eines Ihh-Antagonisten in die Kultur sollte zu einer Hemmung des Ihh-Signalweges und damit zu einem starken Differenzierungsfortschritt der Chondrozyten führen. Der Vergleich dieser beiden Versuchsansätze sollte einen maximalen Unterschied im Aktivierungszustand des Ihh-Signalweges zeigen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die Identifikation von direkten Zielgenen des Ihh-Signalweges während der endochondralen Ossifikation. Das Morphogen Ihh wird während dieses Entwicklungsprozesses in den Skelettanlagen von Vertebraten exprimiert. Ihh ist ein Schlüsselregulator der Geschwindigkeit der Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten sowie der Knocheninduktion. Die Organkultur von embryonalen Mausgliedmaßen ermöglicht es, verschiedene Signalwege *in-vitro* im gesamten Organsystem zu studieren. Die Gliedmaßen von Embryonen der Maus sind dafür gut geeignet, da es sich um ein leicht zu bearbeitendes Gewebe handelt, das schnell in ausreichender Menge bereitgestellt werden kann. Unter Verwendung der Organkultur sollen Versuchsbedingungen gefunden werden, bei denen der Ihh-Signalweg möglichst effektiv stimuliert bzw. blockiert wird. Dies kann anhand des Differenzierungsstandes der Chondrozyten sowie der *Ptc*-Expression in den embryonalen Gliedmaßen nachgewiesen werden. Nach der Gliedmaßenkultur mit moduliertem Ihh-Signalweg soll aus dem Gewebe RNA isoliert und auf differentiell exprimierte Gene untersucht werden. Die so gefundenen Zielgene sollen in mehreren Stufen rückbestätigt werden. Erstens sollen durch komplexe Hybridisierung differentiell exprimierte Klone verifiziert werden. Zweitens werden diese Klone dann mittels *in-situ*-Hybridisierung auf chondrozytenspezifische Expression getestet. Drittens sollen die Kandidaten durch Quantifizierung ihrer Transkriptmenge mittels RNase-Protection Assay rückbestätigt werden. Viertens wird die Regulation der verbliebenen Kandidatengene in Antwort auf die Behandlung von Modulatoren des Ihh-Signalweges in der Organkultur untersucht. Abschließend soll die Analyse der positiven Kandidaten an Gliedmaßen von Ihh-defizienten und Ihh-überexprimierenden Mäusen das Ergebnis bestätigen. Die Identifizierung des Transkriptes sowie funktioneller Domänen der unbekanntenen Kandidatengene soll die Grundlage für die weitere Analyse der gefundenen Zielgene darstellen.