

Indian hedgehog signaling during endochondral ossification

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

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Lydia Koziel

aus Bremen

Berlin, im November 2004

1. Gutachterin:

Prof. Dr. Andrea Vortkamp

Otto Warburg Laboratorium

Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik

2. Gutachter:

Prof. Dr. Günther Korge

Institut für Genetik

Freie Universität Berlin

Tag der Disputation: 8. Februar 2005

1 Summary

The majority of skeletal elements in vertebrates is formed by endochondral ossification, a multistep process during which a cartilage template is gradually replaced by bone. Chondrocytes in the cartilage model proliferate and starting from the center they differentiate into hypertrophic chondrocytes, which are subsequently substituted by bone. Two secreted molecules, Indian hedgehog (Ihh) and Parathyroid hormone-like hormone (Pthlh), form a negative feedback loop to regulate hypertrophic differentiation: *Ihh*, which is expressed in early hypertrophic chondrocytes, activates *Pthlh* expression in periarticular cells at the distal end of the skeletal elements. Pthlh signals back to the proliferating chondrocytes to prevent the onset of hypertrophic differentiation. In addition, Ihh directly regulates the proliferation of chondrocytes. One of the critical question to understand the role of Ihh is, how the Ihh signal is propagated in the growth plate and how its different functions are mediated. Previous studies in *Drosophila* have shown that *tout-velu* (*ttv*), encoding for a heparan sulfate (HS) polymerase, is required for hedgehog movement. Furthermore, mutations in the human homolog of *ttv*, *EXT1*, lead to the ‘Hereditary Multiple Exostosis’ syndrome, a disorder characterized by the formation of benign bone tumors arising from growth plates of long bones.

In this study we have analysed, if HS regulates Ihh signaling during endochondral ossification. We investigated a mouse line carrying a hypomorphic allele of *Ext1* (*Ext1^{Gt/Gt}*). These mice produce only 3% of wild-type transcript leading to reduced levels of HS. Characterization of chondrogenesis in *Ext1^{Gt/Gt}* mice revealed that hypertrophic differentiation is severely delayed mimicking an *Ihh* overexpression phenotype. In addition, the proliferation rate of periarticular chondrocytes was upregulated. Analysis of Ihh distribution revealed that reduced levels of HS lead to an elevated range of Ihh signaling. In contrast, treatment with ectopic HS resulted in a restricted distribution of the Ihh protein. Together these experiments demonstrate that HS negatively regulates the range of Ihh signaling in a concentration dependent manner in cartilage. Additionally, our data strongly indicate that Ihh acts as a long range morphogen directly activating *Pthlh* expression. As binding of Fibroblast growth factors (Fgf) to their receptors has been shown to depend on HS, we analysed Fgf signaling in *Ext1^{Gt/Gt}* mice. Ectopic activation of Fgf signaling did not rescue the delayed onset of hypertrophic differentiation in *Ext1^{Gt/Gt}* mice. In addition,

Ext1^{Gt/Gt} limbs respond to treatment with Fgf protein. Therefore low levels of HS seem to be sufficient for Fgf signaling in this mouse model.

To understand how the *Ihh* signal is translated, we started to analyse downstream transcription factors of the *Gli* gene family. Several lines of evidence have shown, that Gli3 acts mainly as a repressor, whereas Gli1 and Gli2 function as activators downstream of Shh during neural tube development. To elucidate the role of Gli3 downstream of *Ihh* during endochondral ossification we analysed *Ihh*^{-/-};*Gli3*^{-/-} double mutant mice. *Ihh* deficient mice are characterized by severely reduced chondrocyte proliferation and an accelerated onset of hypertrophic differentiation. Remarkably, loss of *Gli3* rescues both aspects of chondrocyte differentiation in *Ihh* deficient mice. On molecular level the expression of *Patched* (*Ptch*) and *Pthlh*, which are lost in *Ihh* deficient mice, is restored in the double mutants. Therefore, *Ptch* and *Pthlh* seem to be transcriptional targets of the Gli3-repressor form. Surprisingly, *Gli3* mutant mice only display a weak phenotype. Detailed analysis revealed, however, that the zone of periarticular chondrocytes is reduced in *Gli3* mutant limbs. Furthermore, the expression domain of *Pthlh* is shifted to the most distal cells of the skeletal elements. Together these results revealed a new function of the *Ihh*-Gli3 signaling system in regulating the differentiation of periarticular into columnar chondrocytes.

2 Zusammenfassung

Die Mehrzahl der Skelettelemente der Vertebraten entsteht durch die endochondrale Ossifikation, ein mehrstufiger Prozess, bei dem eine Knorpelanlage sukzessiv durch Knochen ersetzt wird. Chondrozyten in der Knorpelanlage proliferieren und differenzieren ausgehend von der Mitte in hypertrophe Chondrozyten, welche anschließend durch Knochen ersetzt werden. Zwei sezernierte Signalfaktoren, Indian Hedgehog (Ihh) und ‚Parathyroid hormone like hormone‘ (Pthlh) bilden einen negativen Rückkopplungskreis, der die hypertrophe Differenzierung reguliert: *Ihh*, welches von frühen hypertrophen Chondrozyten exprimiert wird, aktiviert die Expression von *Pthlh* in den periartikulären Zellen am distalen Ende der Skelettelemente. *Pthlh* signalisiert zurück zu den proliferierenden Chondrozyten, um das Einsetzen der hypertrophen Differenzierung zu inhibieren. Zusätzlich reguliert *Ihh* direkt die Proliferation der Chondrozyten. Eine wichtige Frage, um die Rolle von *Ihh* zu verstehen, ist, wie das *Ihh* Signal in der Wachstumsfuge weitergeleitet wird und wie es die verschiedenen Funktionen auf transkriptioneller Ebene umsetzt. Studien in *Drosophila* haben gezeigt, dass *Tout-velu* (*ttv*), welches für eine Heparan Sulfat Polymerase kodiert, für den Hedgehog-Transport notwendig ist. Darüber hinaus führen Mutationen in dem humanen *ttv* Homolog *EXT1* zum „Hereditary Multiple Exostosis“ Syndrom, einer Erkrankung, die durch die Bildung von gutartigen Knochentumoren gekennzeichnet ist, welche aus der Wachstumsfuge der Röhrenknochen heraus entstehen.

Im Rahmen dieser Arbeit haben wir untersucht, ob HS den *Ihh* Signalweg während der endochondralen Ossifikation reguliert. Wir analysierten eine Mauslinie, die ein hypomorphes Allel von *Ext1* trägt (*Ext1^{Gt/Gt}*). Diese Mäuse produzieren nur 3% des Wildtyp Transkriptes, so dass reduzierte Mengen an HS gebildet werden. Die Charakterisierung der Chondrogenese dieser *Ext1^{Gt/Gt}* Mäuse ergab, dass das Einsetzen der hypertrophen Differenzierung stark verzögert ist und dem Phänotyp *Ihh* überexprimierender Mäuse ähnelt. Zusätzlich ist die Proliferationsrate der periartikulären Chondrozyten hochreguliert. Die Analyse der Verteilung des *Ihh* Proteins zeigte, dass reduzierte Mengen an HS eine erhöhte Reichweite des *Ihh* Signals ermöglichen. Im Gegensatz dazu führt die Behandlung mit ektopischem HS zu einer Einschränkung der Reichweite des *Ihh* Proteins. Folglich begrenzt HS konzentrationsabhängig die Reichweite

des *Ihh* Signals im Knorpel. Zusätzlich weisen unsere Daten darauf hin, dass *Ihh* als Morphogen über große Distanzen agiert und dabei direkt die Expression von *Pthlh* induziert. Da HS ebenfalls für die Bindung der ‚Fibroblast growth factors‘ (Fgfs) an ihren Rezeptors essentiell ist, haben wir den Fgf-Signalweg in *Ext1^{Gt/Gt}* Mäusen analysiert. Die ektopische Aktivierung des Fgf-Signalweges konnte der verzögerten hypertrophen Differenzierung der *Ext1^{Gt/Gt}* Mäuse nicht entgegenwirken. Zudem reagieren Gliedmaßen von *Ext1^{Gt/Gt}* Mäusen auf eine Behandlung mit Fgf-Protein. Folglich scheinen die geringen Mengen an HS der *Ext1^{Gt/Gt}* Mäuse ausreichend für die Aktivierung des Fgf-Signalweg zu sein.

Um zu verstehen, wie das *Ihh* Signal umgesetzt wird, haben wir begonnen, die Rolle der nachgeschalteten Transkriptionsfaktoren der *Gli* Genfamilie zu untersuchen. Verschiedene Untersuchungen der Entwicklung des Neuralrohrs haben gezeigt, dass *Gli3* hauptsächlich als Repressor wirkt, während *Gli1* und *Gli2* als Aktivatoren fungieren. Um die Rolle von *Gli3* downstream von *Ihh* während der endochondralen Ossifikation aufzuklären, haben wir *Ihh*^{-/-};*Gli3*^{-/-} Doppelmutanten untersucht. *Ihh* defiziente Mäuse sind durch eine stark verminderte Proliferationsrate ihrer Chondrozyten und durch ein beschleunigtes Einsetzen der hypertrophen Differenzierung charakterisiert. Bemerkenswerterweise, wirkt der Verlust von *Gli3* beiden Aspekten der Chondrozytendifferenzierung in *Ihh* defizienten Mäusen entgegen. Auf molekularer Ebene ist die Expression von *Patched* (*Ptch*) und *Pthlh*, die in *Ihh* defizienten Mäusen nicht detektierbar ist, in den Doppelmutanten wieder hergestellt. Daher scheinen *Ptch* und *Pthlh* transkriptionelle Zielgene des *Gli3* Repressors zu sein. Überraschenderweise zeigen *Gli3* Mutanten nur einen schwachen Phänotyp. Allerdings hat die detaillierte Analyse von Gliedmaßen mutanter *Gli3* Mäuse ergeben, dass sie eine reduzierte Zone von periartikulären Chondrozyten besitzen. Zusätzlich ist die Expressionsdomäne von *Pthlh* an den distalen Randbereich der Skelettelemente verschoben. Diese Ergebnisse zeigen eine neue Funktion des *Ihh*-*Gli3* Systems in der Regulierung der Differenzierung von periartikulären zu säulenartigen Chondrozyten auf.

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Summary | 3 |
| 2 | Zusammenfassung | 5 |
| 3 | Introduction..... | 10 |
| 3.1 | Hedgehog signaling..... | 10 |
| 3.1.1 | Function of the hedgehog gene family during development..... | 10 |
| 3.1.2 | Hedgehog processing and signal transduction..... | 10 |
| 3.1.3 | The morphogen concept..... | 11 |
| 3.2 | The vertebrate skeleton | 12 |
| 3.3 | The process of endochondral ossification..... | 13 |
| 3.4 | The Ihh/Pthlh feedback loop controls chondrocyte differentiation..... | 15 |
| 3.5 | Ext dependent heparan sulfate proteoglycans | 18 |
| 3.6 | Biological role of HS | 19 |
| 3.7 | The <i>Gli</i> family of transcription factors | 21 |
| 3.7.1 | Cytoplasmic components of the Hh signaling pathway..... | 21 |
| 3.7.2 | Mouse mutations of the vertebrate <i>Gli</i> genes..... | 22 |
| 3.7.3 | Gli3-repressor plays a major role during limb patterning | 23 |
| 3.7.4 | <i>Gli</i> genes acting downstream of Shh in the neural tube..... | 24 |
| 3.8 | Aim of the study..... | 25 |
| 4 | Material and methods..... | 27 |
| 4.1 | Material | 27 |
| 4.1.1 | Chemicals | 27 |
| 4.1.2 | Buffers and Solutions | 28 |
| 4.1.3 | Kits..... | 29 |
| 4.1.4 | Proteins and antagonists..... | 30 |
| 4.1.5 | Mouse and rat DNA probes for in situ transcription..... | 30 |
| 4.1.6 | Mouse lines | 31 |
| 4.1.7 | Bacterial strain..... | 31 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.2 | Methods | 31 |
| 4.2.1 | Quick preparation of genomic DNA for mouse genotyping | 31 |
| 4.2.2 | Preparation of high quality genomic DNA from mammalian tissue | 31 |
| 4.2.3 | Restriction digest of genomic DNA..... | 32 |
| 4.2.4 | Isolation of RNA from limb tissue | 32 |
| 4.2.5 | Determination of the concentration of nucleic acids | 33 |
| 4.2.6 | Reverse Transcription - cDNA synthesis | 33 |
| 4.2.7 | Gelelectrophoresis | 33 |
| 4.2.8 | Ligation of DNA | 33 |
| 4.2.9 | TOPO cloning | 34 |
| 4.2.10 | Heat shock transformation of bacteria | 34 |
| 4.2.11 | Sequencing | 34 |
| 4.2.12 | PCR-Methods..... | 34 |
| 4.2.12.1 | Genotyping of mice by PCR | 35 |
| 4.2.12.2 | Inverse PCR..... | 36 |
| 4.2.12.3 | RT-PCR..... | 38 |
| 4.2.12.4 | Real Time PCR..... | 38 |
| 4.2.13 | Organ cultures of embryonic limb explants | 39 |
| 4.2.14 | Harvesting and dehydration of limb tissue | 39 |
| 4.2.15 | Silanization of slides | 40 |
| 4.2.16 | Preparation of a murine <i>Pthlh</i> -probe for in situ hybridisation..... | 40 |
| 4.2.17 | Preparation of DNA template for in vitro transcription..... | 40 |
| 4.2.18 | Labeling of antisense riboprobes..... | 40 |
| 4.2.19 | Prehybridization and in situ hybridization | 41 |
| 4.2.20 | Washing of slides and dipping in photoemulsion | 41 |
| 4.2.21 | BrdU Labeling..... | 42 |
| 4.2.22 | Immunohistochemistry..... | 42 |
| 4.2.23 | Hematoxylin/Eosin staining | 43 |
| 4.2.24 | Safranin Weigert staining | 43 |
| 4.2.25 | Skeletal staining with alcian blue | 43 |
| 5 | Results | 44 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5.1 | Characterization of <i>Ext1^{Gt/Gt}</i> Mice | 44 |
| 5.2 | <i>Ext1^{Gt/Gt}</i> mice synthesize reduced amounts of HS | 45 |
| 5.3 | <i>Ext1^{Gt/Gt}</i> mice show delayed hypertrophic differentiation..... | 48 |
| 5.4 | <i>Pthlh</i> and <i>Ptch</i> are upregulated in <i>Ext1^{Gt/Gt}</i> embryos | 51 |
| 5.5 | Ihh distribution is extended in <i>Ext1^{Gt/Gt}</i> mice | 53 |
| 5.6 | Block of Ihh signaling rescues the delayed onset in hypertrophic differentiation in <i>Ext1^{Gt/Gt}</i> mice | 54 |
| 5.7 | Chondrocyte proliferation is increased in the periarticular region of <i>Ext1^{Gt/Gt}</i> mice | 56 |
| 5.8 | Ectopic HS restrict Ihh signaling | 57 |
| 5.9 | Regulation of <i>Pthlh</i> expression..... | 59 |
| 5.10 | Activated Fgf signaling does not rescue the delay in differentiation of <i>Ext1^{Gt/Gt}</i> mice.. | 61 |
| 5.11 | Expression of the <i>Gli</i> gene family of transcription factors in the growth plate | 63 |
| 5.12 | Analysis of <i>Gli3</i> mutant mice..... | 65 |
| 5.13 | Interaction of Ihh and Gli3 | 67 |
| 6 | Discussion..... | 72 |
| 6.1 | Reduced HS synthesis in <i>Ext1^{Gt/Gt}</i> mice | 72 |
| 6.2 | <i>Ext1</i> -dependent HS regulates Ihh signaling | 73 |
| 6.3 | Direct regulation of <i>Pthlh</i> by Ihh | 77 |
| 6.4 | HS and Fgf Signaling | 78 |
| 6.5 | Ihh Signaling and the Development of Exostoses | 79 |
| 6.6 | <i>Gli</i> genes have overlapping and distinct expression patterns in the growth plate..... | 80 |
| 6.7 | Gli3 acts as a repressor downstream of Ihh signaling..... | 80 |
| 6.8 | Chondrocyte differentiation is affected in <i>Gli3</i> deficient mice | 82 |
| 7 | Literatur..... | 84 |