

Molekulare Mechanismen der Gliedmaßenentwicklung :
Analyse der *Fused toes* Mausmutante und des *Dickkopf-1*
Gens

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Lars Grotewold

aus Bremen

2001

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent : Prof. Dr. Ulrich Rüter

Korreferent : Prof. Dr. Uwe A.O. Heinlein

Tag der mündlichen Prüfung : 04. Dezember 2001

Herrn Prof. Dr. Ulrich R  ther danke ich für die Möglichkeit, die experimentelle Arbeit in seinem Labor durchführen zu können, für die Ermöglichung des Forschungsaufenthalts am Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, sowie für seine permanente Unterstützung und sein Interesse an meiner Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Uwe A.O. Heinlein bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats.

Prof. Dr. Rolf Zeller danke ich für die Anfertigung eines externen Gutachtens.

Prof. Dr. Juan Carlos Izpis  a Belmonte danke ich für die freundliche Aufnahme in seinem Labor in La Jolla und seinen Mitarbeitern Concepci  n Rodr  guez Esteban, Dirk Büscher und Jennifer Ng für die Einführung in das Hühnerembryo-System.

Mein besonderer Dank gilt Jens Böse.

Meiner Familie

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AER	Apikale ektodermale Leiste
ANZ	anteriore nekrotische Zone
AP	Alkalische Phosphate
A/P	Antero-posterior
APC	adenomatous polyposis coli
Bambi	Bmp- and Activin-membrane-bound inhibitor
BCIP	X-phosphat/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
β -TrCP	β -Transducin repeat-containing protein
bzw.	beziehungsweise
c	Zenti-(10 ⁻²)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	zweiwertige Kalziumionen
cDNA	copy DNA
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
C-Terminus	Carboxy-Terminus
d	Tag
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
<i>Dbf</i>	<i>Doublefoot</i>
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
<i>Dh</i>	<i>Dominant hemimelia</i>
D.h..	das heißt
DIG	Digoxygenin
dist.	distal
Dkk	Dickkopf
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphatgemisch
ds	doppelsträngig
Dsh	Dishevelled
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
D/V	dorso-ventral
E	Tag der Embryonalentwicklung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>En-1</i>	<i>Engrailed-1</i>
FLU	Fluoreszein
FrzB	Frizbee

<i>Ft</i>	<i>Fused toes</i>
x g	Erdbeschleunigung; g = 9,81 m/s
g	Gramm
G	Guanin
Gdf	Growth and differentiation factor
GSK3 β	Glycogen-Synthase Kinase-3 β
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HH	Hamburger Hamilton
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
<i>Hprt</i>	<i>Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Hth	Homothorax
<i>Hx</i>	<i>Hemimelic extra-toe</i>
i.d.R.	in der Regel
IgG	Immunglobulin G
<i>Ihh</i>	<i>Indian Hedgehog</i>
INZ	interdigitale nekrotische Zone
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
<i>Irx</i>	<i>Iroquois</i>
K	Kilo- (10 ³)
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LB	Luria Bertani
LDL	low density Lipoprotein
LiCl	Lithiumchlorid
Lrp	LDL-receptor-related protein
μ	mikro- (10 ⁻⁶)
m	milli- (10 ⁻³)
m	Meter
M	Molar (mol/L)
mA	Milliampere
Mb	Megabasenpaare
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min.	Minute
Mol	Mol (6,023 x 10 ²³ Teilchen)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
n	Absolute Anzahl
n	nano- (10 ⁻⁹)
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	4-Nitro-blue-tetrazolium-chlorid
N-CAM	Neural cell adhesion molecule
NLK	NEMO-like kinase

N-terminal	amino-terminal
OD	Optische Dichte
o.g.	oben genannt
p	pico (10^{-12})
p	posterior
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
P/D	proximo-distal
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PLC	Phospholipase C
PNZ	posteriore nekrotische Zone
prox.	proximal
<i>Ptc-1</i>	<i>Patched-1</i>
PZT	programmierter Zelltod
RA	Retinsäure
<i>R-fng</i>	<i>Radical fringe</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunde
Smo	Smoothened
T	Thymidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	Transformationspuffer
TdT	Terminale deoxynukleotidyl Transferase
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TUNEL	Tdt-mediated dUTP nick end-labelling
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v	ventral
V	Volt
v.a.	vor allem
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
wg	wingless
WIF-1	Wnt-inhibitory factor-1
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
<i>Xt</i>	<i>Extra toes</i>
z.B.	zum Beispiel
ZPA	Zone polarisierender Aktivität
z.T.	zum Teil

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Grundlagen der Entwicklungsbiologie	1
1.2 Der Bmp-Signalweg	3
1.3 Der Wnt Signalweg	5
1.3.1 Der Wnt-Antagonist Dickkopf-1 (Dkk-1)	8
1.4 Gliedmaßenentwicklung	9
1.4.1 Organisation der frühen Vertebratenextremität	9
1.4.2 Initiation der Gliedmaßenknospe und AER-Induktion	10
1.4.3 Positionierung der AER und dorso-ventrale Musterbildung	12
1.4.4 Der <i>Shh/Fgf</i> -Regelkreis	13
1.4.5 Etablierung der ZPA	18
1.4.6 Skelettentwicklung und programmierter Zelltod	21
1.4.7 Die <i>Fused toes</i> Mausmutante	22
1.5 Fragestellungen	23
2. Material und Methoden	25
2.1 Sequenzspezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	25
2.2 Dephosphorylierung von DNA	25
2.3 Umwandlung kohäsiver Enden in glatte Enden	25
2.4 Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung	26
2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	26
2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	27
2.7 Ligation von DNA-Fragmenten	27
2.8 Transformation von Plasmiden in <i>Escherichia coli</i>	28
2.8.1 Herstellung kompetenter Zellen	28
2.8.2 Transformation	28
2.9 Präparation von Plasmid-DNA	29
2.9.1 Plasmid-Mini-Präparation	29
2.9.2 Plasmid-Maxi-Präparation	30
2.10 Isolierung von DNA aus eukaryontischen Zellen und Geweben	31
2.10.1 DNA-Isolierung aus extraembryonalen Membranen	31
2.10.2 DNA-Isolierung aus kultivierten Zellen	31
2.10.3 RNA-Isolierung aus Embryonen und kultivierten Zellen	32
2.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
2.12 Polymerase-Ketten-Reaktion	33

Inhaltsverzeichnis

2.12.1	Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide	33
2.12.2	PCR-Amplifikation	33
2.12.3	Reverse Transkription	34
2.13	DNA-Sequenzierung	34
2.14	„Whole mount“ <i>in situ</i> Hybridisierung	34
2.14.1	Synthese der komplementären RNA-Sonde	35
2.14.2	Vorbehandlung und Hybridisierung	36
2.14.3	Entfernung unspezifisch gebundener Sonde und Antikörperinkubation	37
2.14.4	Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper und Histochemie	38
2.15	Zwei Farben-„Whole mount“ <i>in situ</i> Hybridisierung	38
2.16	Knochen-Knorpel-Färbung	39
2.17	Histologische Techniken	39
2.17.1	Paraffindünnschnitte	39
2.17.2	Hämatoxylin/Eosin-Färbung	40
2.17.3	Vibratomschnitte	41
2.18	Nachweis des programmierten Zelltods (Apoptose)	41
2.18.1	Apoptose-Detektion auf Paraffindünnschnitten	41
2.18.2	Apoptose-Detektion im Gesamtorganismus	42
2.18.2.1	„Whole mount“ TUNEL	42
2.18.2.2	Nile Blue Färbung	44
2.18.3	Apoptose-Detektion in kultivierten Zellen	44
2.19	Zellkulturtechniken	44
2.19.1	Passagieren von Zellen	44
2.19.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	45
2.19.3	Zellzahlbestimmung	46
2.19.4	Zelllinien	46
2.19.4.1	Embryonale Fibroblasten der Maus (MEF)	46
2.19.4.2	Embryonale Stammzellen der Maus (ES 14-1)	49
2.19.4.3	NIH/3T3	49
2.19.4.4	Embryonale Fibroblasten des Huhns (CEF)	49
2.19.5	Kokultivierung von NIH/3T3 und embryonalen Stammzellen	50
2.19.6	Transiente Transfektion von NIH/3T3	51
2.19.7	Herstellung replikationskompetenter Hühner-Retroviren (RCAS)	51
2.19.7.1	Transfektion von CEF und Virusernte	52
2.19.7.2	Bestimmung des Virustiters	53
2.19.8	Herstellung von konditioniertem Medium	53

2.19.9 Hochdichte-Kultur mesodermaler Gliedmaßenknospenzellen	54
2.20 Proteinnachweis durch Immunodetektion	55
2.21 Embryologische Techniken	57
2.21.1 Quelle, Lagerung und Inkubation befruchteter Hühner- und Enteneier	57
2.21.2 Implantation von Mikrokugeln in die Gliedmaßenknospe von Hühnerembryonen	57
2.21.3 Mikrochirurgische Entfernung der AER	58
2.21.4 Transplantation von CEF in die Gliedmaßenknospe von Hühnerembryonen	58
2.21.5 Implantation von Mikrokugeln in die Interdigitalräume der Gliedmaßenknospen von Entenembryonen	59
2.21.6 UV-Bestrahlung von Hühnerembryonen	59
2.21.7 Explantat-Elektroporation und Organ-Kultur	59
2.22 Maushaltung	60
2.23 Isolierung definierter Embryonalstadien	60
2.24 Genotypisierung von Mausembryonen	60
2.25 Fotodokumentation	61
3. Ergebnisse	62
3.1 Morphologie der <i>Ft/Ft</i> Gliedmaßen	62
3.2 Expression von Kondensations-, Sehnen- und Gelenkmarkern in <i>Ft/Ft</i> Gliedmaßenknospen	64
3.2.1 <i>Noggin</i> - und <i>Sox-9</i> -Expression	64
3.2.2 <i>Pax-9</i> -Expression	65
3.2.3 <i>Sek-1</i> -Expression	66
3.2.4 <i>Gdf-5</i> -Expression	66
3.3 <i>Wnt-5a</i> -Expression in <i>Ft/Ft</i> Gliedmaßenknospen	68
3.4 Veränderte Aktivitäten der Fgf- und Bmp-Signalwege in <i>Ft/Ft</i> Gliedmaßenknospen	69
3.5 <i>Bmp-Irx</i> Interaktion	70
3.6 <i>Lmx-1b</i> -Expression in <i>Ft/Ft</i> Gliedmaßenknospen	71
3.7 Expression von A/P-Markergenen in <i>Ft/Ft</i> Gliedmaßenknospen	72
3.8 Expression von <i>Dkk-1</i> in frühen Stadien der Gliedmaßenentwicklung der Maus	76
3.9 Vergleich der Expression von <i>Dkk-1</i> und <i>Bmp-4</i> während der Gliedmaßenentwicklung der Maus	77

3.10 <i>Dkk-1</i> wird in den Regionen des physiologischen programmierten Zelltods exprimiert	78
3.11 <i>cDkk-1</i> -Expression in Gliedmaßenknospen des Hühnerembryos	79
3.12 Regulation von <i>Dkk-1</i> durch Bmp	80
3.12.1 Differentielle Regulation von <i>cDkk-1</i> durch rhBMP-4	80
3.12.2 <i>Dkk-1</i> -Expression und PZT in <i>Ft/+</i> Vordergliedmaßenknospen	83
3.12.3 <i>Dkk-1</i> -Expression und PZT in <i>Ft/Ft</i> Vordergliedmaßenknospen	85
3.13 Regulation von <i>cDkk-1</i> durch Fgf	86
3.14 Regulation von <i>Dkk-1</i> durch Shh	88
3.14.1 Räumliche Beziehung der <i>Dkk-1</i> - und <i>Shh</i> -Expressionsdomänen im posterioren Mesoderm	88
3.14.2 Regulation von <i>Dkk-1</i> durch Shh in Hühner- und Mausembryonen	88
3.14.3 Apoptose im anterioren Mesoderm polydaktyler Mausmutanten	90
3.15 Regulation von <i>cDkk-1</i> durch RA	90
3.16 Regulation von <i>Dkk-1</i> durch Wnt	90
3.17 Regulation der <i>Dkk-1</i> -Expression durch verschiedene apoptotische Stimuli	91
3.17.1 UV-Bestrahlung führt zur Induktion der <i>cDkk-1</i> -Expression	91
3.17.2 <i>p53</i> ist entbehrlich für die <i>Dkk-1</i> -Expression	92
3.17.3 Staurosporin induziert <i>cDkk-1</i> -Expression	93
3.18 Regulation von <i>Dkk-1</i> durch <i>c-Jun</i>	93
3.18.1 Expression von <i>c-Jun</i> während der Gliedmaßenentwicklung von Maus und Huhn	93
3.18.2 <i>cc-Jun</i> -Induktion durch UV-Strahlung	94
3.18.3 <i>c-Jun</i> Regulation durch rhBMP-4	95
3.18.4 <i>c-Jun</i> -Expression in <i>Ft/+</i> Vordergliedmaßenknospen	97
3.18.5 Koregulation von <i>c-Jun</i> und <i>Dkk-1</i>	97
3.18.6 <i>c-Jun</i> ist ausreichend für die Induktion von <i>Dkk-1</i>	98
3.18.7 <i>c-Jun</i> ist wichtig für die normale <i>Dkk-1</i> -Expression	99
3.18.8 <i>Jnk-1</i> ist notwendig für die <i>Dkk-1</i> -Expression	99
3.19 Funktionsanalyse von <i>Dkk-1</i>	100
3.19.1 Transiente Transfektion von NIH/3T3-Zellen	100
3.19.2 Konstruktion eines rekombinanten Retrovirus	101
3.19.3 Implantation von RCASBP(A)/ <i>Xdkk-1</i> -infizierten CEF in Gliedmaßenknospen	102
3.19.4 <i>Dkk-1</i> hat keinen Effekt auf die Knorpelentwicklung	103
3.19.5 Einfluß von <i>Dkk-1</i> auf PZT im interdigitalen Mesenchym	104

3.19.6 <i>Dkk-1</i> ist ausreichend für die Induktion von PZT in Gliedmaßenknospenexplantaten	105
4. Diskussion	106
4.1 Gestörte Balance zwischen Proliferation und Apoptose in <i>Ft/Ft</i> Gliedmaßenknospen	106
4.1.1 Gesteigerte Proliferation durch <i>dHAND</i> , <i>Shh</i> und <i>Wnt-5a</i>	106
4.1.2 Erhöhte Apoptose durch <i>Bmp-4</i> und <i>Dkk-1</i>	108
4.2 D/V-Musterbildung in <i>Ft/Ft</i> Gliedmaßenknospen	110
4.3 Besonderheiten der <i>Ft/Ft</i> Hinterextremitäten	112
4.4 Der <i>Shh/Fgf</i> -Regelkreis in <i>Ft/Ft</i> Gliedmaßenknospen	113
4.5 Expressionsmuster von <i>Dkk-1</i>	115
4.6 Regulation von <i>Dkk-1</i> durch Komponenten des A/P-Musterbildungssystems	116
4.7 <i>Dkk-1</i> induziert PZT	117
4.8 Bmp/Wnt/Fgf-Interaktionen – die Rolle von <i>Dkk-1</i>	119
4.9 Vermittlung des Bmp-Signals – die entscheidende Rolle von c-Jun	122
4.10 Regulation von <i>Dkk-1</i> durch Streßsignale	125
4.11 Integration von <i>Ft</i> und <i>Dkk-1</i> in das molekulare Netzwerk der Gliedmaßenentwicklung	126
5. Zusammenfassung	128
Literatur	130

Wenn eine Übersetzung englischer Fachtermini im deutschen Sprachgebrauch unüblich ist, wurde in dieser Arbeit stellenweise darauf verzichtet. Die entsprechenden Begriffe sind dann i.d.R. in Anführungszeichen gesetzt.

1. Einleitung

1.1 Grundlagen der Entwicklungsbiologie

Einer der wohl faszinierendsten biologischen Prozesse ist die Entwicklung eines komplexen, vielzelligen Organismus aus einer scheinbar völlig unstrukturierten befruchteten Eizelle, in deren Verlauf pluripotente Vorläuferzellen zu hochspezialisierten Zellen differenzieren. In dem fundamentalen Prozeß, der die dreidimensionale Gestalt des Organismus während der Entwicklung festlegt (Musterbildung), werden zunächst Zellschicksale innerhalb breiter Areale definiert, wodurch die drei Körperachsen determiniert werden. Diese Areale werden im Verlauf der Entwicklung immer feiner in sogenannte Sekundärfelder unterteilt, die dann semi-autonom die regionale Spezifizierung steuern. Die Musterbildung innerhalb dieser Sekundärfelder kann dann in vier Stadien unterteilt werden. Zunächst werden die Zellen definiert, die das Feld an sich darstellen, worauf spezifische Signalzentren innerhalb dieses Feldes etabliert werden, die die Quelle von Positionsinformationen darstellen. Die Vorstellung ist, daß diese Informationen von jeder einzelnen Zelle in Form einer spezifischen Genexpression registriert werden, woraufhin jede Zelle in Abhängigkeit von zusätzlichen Signalen auf der Basis ihrer schon etablierten Positionsinformation differenziert (Wolpert, 1969, 1971; Meinhardt, 1983a). Sezernierte Signalmoleküle vermitteln diese wechselseitige interzelluläre Kommunikation. Die Identifizierung dieser Signale und ihrer molekularen Wirkungsmechanismen, sowie die Frage nach der Umsetzung dieser molekularen Interaktionen in morphogenetische Prozesse, sind Gegenstand der modernen Entwicklungsbiologie. Diese Fragestellungen werden durch eine Kombination von genetischen und embryologischen Methoden v.a. in den Modellorganismen Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), dem Nematoden *Caenorhabditis elegans*, Frosch (*Xenopus laevis*), Zebrafisch (*Danio rerio*), Huhn (*Gallus gallus*) und Maus (*Mus ssp.*) bearbeitet. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Analyse von Mutanten, da nur durch die Korrelation von phänotypischer zu molekularer Veränderung auf die Funktion eines Gens geschlossen werden kann. Viele grundlegende Erkenntnisse über Genfunktionen während der Embryogenese sind zunächst an Invertebraten wie *Drosophila melanogaster* gewonnen worden. Sie eignet sich aufgrund ihres, im Vergleich zu Säugetieren, weit weniger komplexen Genoms, ihrer kurzen Generationszeit und der Verfügbarkeit einer großen Zahl von Mutanten besonders für genetische Ansätze. So führten im großen Maßstab durchgeführte Mutageneseexperimente u.a. zur Identifizierung solcher Entwicklungskontrollgene, die für die Achsenausbildung und die Segmentierung des frühen Fliegenembryos von entscheidender Bedeutung sind (Nüsslein-Vollhardt und Wieschaus, 1980). Das Huhn hingegen ist ein wertvolles System für experimental-embryologische Verfahren. Der Hühnerembryo ist vergleichsweise groß und

durch die extrauterine Entwicklung leicht zugänglich. Beispielsweise wurden viele der klassischen Experimente zur neuralen Induktion oder Somitogenese im Huhn durchgeführt (Lipton und Jacobson, 1974; Meier, 1979; Packard und Meier, 1983; Übersicht bei Stern, 1994). Auch die grundlegenden Erkenntnisse über die Gliedmaßenentwicklung wurden durch mikrochirurgische Manipulationen in diesem System etabliert (s. 1.4). Die Maus stellt ein herausragendes System dar, da sie z.B. durch die Einführung definierter Mutationen durch die sogenannte „Gene targeting“-Technologie (Capecchi, 1989a,b) Genfunktionsanalysen direkt im Säugerorganismus erlaubt. Neben diesen gezielt generierten, steht eine umfangreiche Sammlung induzierter oder spontaner Mutanten zur Verfügung (Übersichten bei Doolittle et al., 1996; Bedell et al., 1997), deren molekulare und phänotypische Charakterisierung ein wichtiger Schritt zum Verständnis der der Morphogenese zugrunde liegenden molekularen Mechanismen ist.

Ein erstaunlicher Befund der Vergleiche elementarer Entwicklungsmechanismen zwischen Invertebraten und Vertebraten war, daß diese zwischen evolutionär z.T. weit voneinander entfernten Organismen hochkonserviert sind. Ein Beispiel dafür ist die Determinierung von Positionsidentitäten entlang der antero-posterioren Achse des Embryos, die in *Drosophila* von einer Gruppe homöotischer Gene, dem *HOM*-Komplex, realisiert wird (Übersicht bei McGinnis und Krumlauf, 1992). Der grundsätzliche Mechanismus findet sich in Vertebraten in der Funktion der vier *Hox*-Komplexe wieder (Übersichten bei Krumlauf, 1994; Duboule, 1994a, 1995). Durch die gesteigerte Anzahl von Genen (13601 *Drosophila*-Gene gegenüber 30.000-40.000 Genen des Menschen, Adams et al., 2000; Lander et al., 2001; Venter et al., 2001) und der damit verbundenen um ein Vielfaches erhöhten Anzahl der Kombinationsmöglichkeiten molekularer Interaktionen auf Proteinebene, stellen sich diese Prozesse in Vertebraten allerdings wesentlich komplexer dar. Ein weiterer interessanter Befund war, daß trotz der unzähligen und verschiedenartigen Zellsignale nur ein relativ kleines Repertoire der im Genom vorhandenen Gene bzw. ihrer Genprodukte als hierarchisch geordnetes System von Signalmolekülen eingesetzt wird. Es stellte sich heraus, daß für die embryonale Zell-Zell-Kommunikation v.a. die sezernierten Moleküle der Egf- („Epidermal growth factor“), Fgf- („Fibroblast growth factor“), Wnt-, Tgf β - („Transforming growth factor- β “) und Hh- („Hedgehog“) Familien von zentraler Bedeutung sind (Übersichten bei Kingsley, 1994; Mason, 1994; Hammerschmidt et al., 1997; Schweitzer und Shilo, 1997; Wodarz und Nüsse, 1998). Eine Subfamilie der Tgf β -Moleküle wird durch die „Bone morphogenetic proteins“ (Bmp) konstituiert. Besondere Bedeutung für die vorliegende Arbeit haben neben den durch Bmp ausgelösten, auch die durch Wnt-Liganden aktivierten Signalkaskaden. Aus diesem Grund werden diese beiden Signalwege im Folgenden detaillierter beschrieben.

1.2 Der Bmp-Signalweg

Bmps sind sezernierte Polypeptid-Wachstumsfaktoren, die der Tgf β -Superfamilie angehören. Sie spielen eine zentrale Rolle in diversen zellulären Prozessen, wie der Kontrolle von Zellproliferation, Gewebemöostase, Differenzierung und programmiertem Zelltod (Übersichten bei Hogan, 1996; Massagué et al., 2000). Während der Embryonalentwicklung sind verschiedene Mitglieder der *Bmp*-Subfamilie in komplexen zeitlichen und gewebespezifischen Mustern exprimiert. Funktionsverluste von *Bmps* führen zu schweren Entwicklungsstörungen in den Organen ihrer Expression, wie z.B. des Skeletts, der Nieren und der Augen (Jena et al., 1997; Solloway et al., 1998) oder zu früher embryonaler Letalität (Winnier et al., 1995; Zhang und Bradley, 1996).

Bmps transmittieren ihr Signal über heteromere Rezeptoren, die zu den Serin/Threonin-Kinasen gehören und in TypI- (BmpR-I) und TypII-Rezeptoren (BmpR-II) unterteilt werden können. Nach Bindung des Liganden an den BmpR-II wird ein aktiver Ligand/Rezeptor-Komplex durch die Rekrutierung eines TypI-Rezeptors ausgebildet. Der TypII-Rezeptor aktiviert daraufhin den BmpR-I durch Phosphorylierungen (Übersichten bei Massagué, 1998; Massagué und Chen, 2000). Das ausgelöste Signal kann intrazellulär dann über mindestens zwei unterschiedliche Wege weitergeleitet werden (Übersicht bei von Bubnoff und Cho, 2001; Abb. 1.1). Der eine beinhaltet die zytoplasmatischen Proteine Smad-1,-5 und -8 (R-Smads = Rezeptor-regulierte Smads), die direkt vom TypI-Rezeptor durch Phosphorylierung aktiviert werden. Diese translozieren dann im Komplex mit dem gemeinsamen Signalmediator Smad-4 in den Nukleus. In Abwesenheit eines agonistischen Signals wird Smad-4 durch ein nukleäres Exportsignal aus dem Kern fern gehalten. Smads sind prinzipiell in der Lage, DNA zu binden, jedoch vermögen sie dies nur mit einer sehr geringen Affinität, so daß sowohl Koaktivatoren als auch Korepressoren rekrutiert werden müssen, um das Bmp-Signal in eine transkriptionelle Antwort von Zielgenen umzusetzen. Einige dieser Kofaktoren sind z.B. Fast1, c-Jun oder Tcf (Derynck et al., 1998; Shi et al., 1998; Liberati et al., 1999; Germain, et al., 2000; Labbe et al., 2000; Massagué und Chen, 2000; Massagué und Wotton, 2000; Massagué et al., 2000; Nishita et al., 2000). Interessanterweise ist die Aktivierung dieser Kofaktoren elementarer Bestandteil anderer Signalwege, wie z.B. des Wnt-Signalwegs im Falle von Tcf (s. 1.3). Allein dies deutet schon an, daß die Reaktion einer Zelle auf ein Bmp-Signal vom physiologischen Kontext, also den Interaktionen der parallel aktiven Signalwege abhängt. Durch solche Querverbindungen zwischen verschiedenen Signalwegen wird ein extrem komplexes molekulares Netzwerk etabliert, das Zellschicksale als Antwort auf extrazelluläre Signale reguliert.

Ein alternativer Weg der Bmp-Signaltransduktion beinhaltet eine Kaskade mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPK), in welchem eine mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase

(MAPKKK) jeweils eine untergeordnete MAPKK durch Phosphorylierung aktiviert (Übersicht bei Davis, 2000). Einige MAP Kinasen, wie z.B. Jnk (c-Jun N-terminale Kinase) können in Abhängigkeit vom Zelltyp und den experimentellen Bedingungen durch Tgfβ-Moleküle aktiviert werden (Übersicht bei Massagué et al., 2000). Die Aktivierung von Jnk führt zur Phosphorylierung der Serin-Reste 63 und 73 der c-Jun Aktivierungsdomäne. Hierdurch kommt es zu einer Steigerung der transaktivierenden Funktion von Ap-1-Komplexen, die sich aus Mitgliedern der Jun- und Fos-Familien zusammensetzen (Pulverer et al., 1991; Smeal et al., 1991; Ip und Davis, 1998). Die biochemische Verbindung zwischen dem Tgfβ-Rezeptor und dem MAPK-Weg scheint durch TAK-1 („Transforming growth factor-beta-activated kinase“-1) realisiert zu werden (Takatsu et al., 2000).

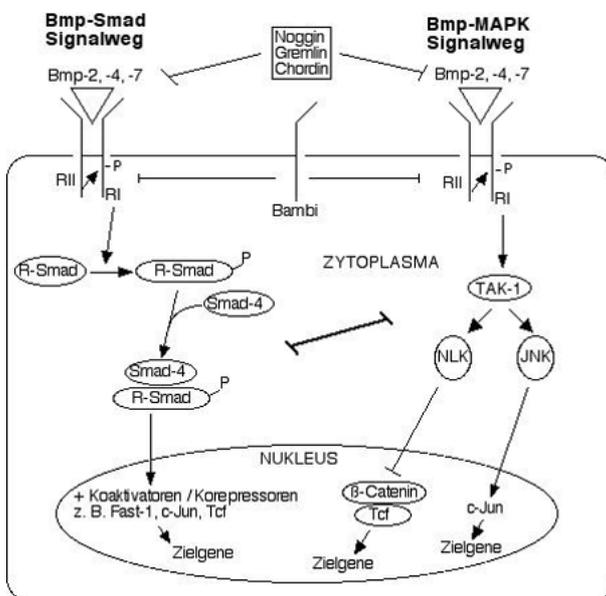


Abbildung 1.1 : Schematische Darstellung der alternativen Bmp-Signaltransduktionskaskaden. Nach Bindung von Bmp-2, -4 oder -7-Dimeren an einen TypII-Bmp-Rezeptor (RII), wird der TypI-Rezeptor (RI) in den Komplex rekrutiert und durch RII phosphoryliert (P). Die intrazelluläre Signalweiterleitung führt dann über Smads oder über eine MAPK-Kaskade, die durch die Aktivierung von TAK-1 initiiert wird. Der R-Smad/Smad-4-Komplex transloziert in den Nucleus, wo er in Kooperation mit verschiedenen Kofaktoren die Zielgenexpression reguliert. Die Aktivierung von TAK-1 kann die Phosphorylierung von NLK oder JNK auslösen.

NLK blockiert die Transaktivierung durch β-Catenin/Tcf-Komplexe und antagonisiert damit den Wnt-Signalweg (s. 1.3). JNK-Aktivität führt zur Phosphorylierung verschiedener Mitglieder der Ap-1-Familie wie z.B. c-Jun, das die Expression von Zielgenen reguliert. Beide Bmp-Signalwege werden durch die Aktivität der extrazellulären Proteine Noggin, Gremlin und Chordin und durch das Transmembran-Protein Bambi inhibiert. Die intrazellulären Signalwege können sich auch gegenseitig antagonisieren, was durch den Balken zwischen beiden Kaskaden dargestellt ist. Modifiziert nach Massagué et al., 2000 und von Bubnoff und Cho, 2001.

Wie bereits oben erwähnt, können Smads *in vitro* mit c-Jun interagieren. Dies impliziert, daß Bmp den Smad- und MAPK-Weg simultan aktivieren kann und die biochemische Interaktion der Signalmediatoren zur Aktivierung bestimmter Zielgene führt (Zhang et al., 1998; Hanafusa et al., 1999; Sano et al., 1999; Wong et al., 1999). Auf der anderen Seite sind auch antagonistische Interaktionen dieser beiden Signalwege beschrieben worden (Kimura et al., 2000; Pessah et al., 2001). Diese Befunde legen die Vermutung nahe, daß auch die Balance

dieser beiden intrazellulären Signalwege einer der Schlüssel zur koordinierten zellulären Reaktion auf ein Bmp-Signal im physiologischen Kontext ist.

Darüberhinaus sind eine Vielzahl extrazellulärer Antagonisten, wie z.B. Noggin (Zimmermann et al., 1996), Chordin (Piccolo et al., 1996), Gremlin (Hsu et al., 1998) oder das Transmembran-Protein Bambi (Onichtchouk et al., 1999) beschrieben worden, die gewebespezifische Effekte von Bmps modulieren (Übersichten bei Cho und Blitz, 1998; Smith, 1999; De Robertis et al., 2000; Massagué und Chen, 2000; Ray und Wharton, 2001).

1.3 Der Wnt Signalweg

Sezernierten Glykoproteinen der Wnt-Familie kommen zentrale Funktionen in Zelldeterminierungsprozessen und in der Wachstumskontrolle zu. Ihre entscheidende Bedeutung für die Embryonalentwicklung wird dadurch verdeutlicht, daß Mäuse mit Mutationen in Genen, deren Produkte an der Wnt Signaltransduktion beteiligt sind, schwere Entwicklungsstörungen einer Reihe von Organen aufweisen (Übersicht bei Cadigan und Nusse, 1997). Wnts binden einen Rezeptorkomplex, der aus einem Mitglied der Frizzled-Familie der Sieben-Transmembran-Proteine und dem LDL-Rezeptor-verwandten Lrp-5 oder Lrp-6 besteht (Übersicht bei Bejsovec, 2000). In der Maus sind mindestens neun Frizzled-Proteine identifiziert worden, die eine Cystein-reiche Domäne (CRD) besitzen, die die Interaktion mit Wnts vermittelt (Übersicht unter <http://www.stanford.edu/~rnusse/frizzleds/frizzlwnt.html>). Die Lrps wurden erst kürzlich als Bestandteile des ternären Wnt/Rezeptor-Komplexes identifiziert. So ist in *Drosophila* gezeigt worden, daß das Lrp-Homolog arrow für wg (Wnt-Homolog)-Signaltransduktion benötigt wird (Wehrli et al., 2000). Darüberhinaus führt der Funktionsverlust von *Lrp-6* in der Maus zu einer Phänokopie kombinierter *Wnt*-Nullallele (Pinson et al., 2000) und Überexpression von *Lrp-6* in *Xenopus* löst die Aktivierung des Wnt-Signalwegs aus (Tamai et al., 2000). Wnt-Liganden können die extrazelluläre Domäne von Lrp binden und so den ternären Ligand/Rezeptor-Komplex ausbilden (Tamai et al., 2000). Wie für Bmps (s. 1.2), sind auch für Wnts mehrere alternative Wege der Signaltransduktion in den Nukleus beschrieben worden (Abb. 1.2). Im klassischen Wnt/ β -Catenin Weg führt die Rezeptoraktivierung zur Hemmung der GSK3 β Kinase durch Dsh. Hierdurch entkommt β -Catenin der Erkennung durch β -TrCP und dem Ubiquitin/Proteasom-System, akkumuliert und transloziert in den Kern, wo es Zielgene in Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren wie den Produkten von *Tcf* und *Lef*, deren Expression selbst auch durch diese Kaskade aktiviert wird, reguliert (Übersichten bei Wodarz und Nusse, 1998; Polakis, 2000). Viele Wnts wirken proliferationsfördernd, was sich gut mit der Fähigkeit der entsprechenden Wnts, β -Catenin zu stabilisieren, korrelieren läßt. Diese proto-onkogene Wirkung wird in der großen Anzahl identifizierter Mutationen in

Komponenten des Wnt/ β -Catenin Wegs in Tumorerkrankungen des Menschen reflektiert (Übersicht bei Polakis, 2000). In Abwesenheit eines Wnt-Liganden wird β -Catenin durch die Aktivität eines zytoplasmatischen Multiproteinkomplexes schnell degradiert. In diesem Komplex, der aus Axin, APC, GSK3 β und β -Catenin besteht, wird β -Catenin phosphoryliert, poly-ubiquitiniert und schließlich degradiert (Übersichten bei Wodarz und Nusse, 1998; Behrens, 2000). Mit der Entdeckung, daß Lrp-5 an Axin bindet, ist kürzlich zum ersten Mal eine biochemische Verbindung vom Wnt-Rezeptorkomplex zu den zytoplasmatischen Komponenten etabliert worden (Mao et al., 2001). Es ist offensichtlich, daß die Aktivität eines so potenten Signalwegs zeitlich wie auch örtlich extrem genau reguliert werden muß. Neben der transkriptionellen Kontrolle, ist die Regulation auf der Proteinebene eine entscheidende Kontrollinstanz für diesen Signalweg. Es sind eine ganze Reihe extrazellulärer Moleküle beschrieben worden, die den Wnt/ β -Catenin Weg inhibieren, wie z.B. Cerberus (Piccolo et al., 1999), WIF-1 (Hsieh et al., 1999), FrzB (Finch et al., 1997; Leyns et al., 1997; Rattner et al., 1997; Wang et al., 1997) und Dkk-1 (Glinka et al., 1998; s. 1.3.1). Während Cerberus und WIF direkt an Wnt binden und so die Rezeptoraktivierung verhindern können, vermögen FrzBs neben den Liganden auch Frizzled zu binden, so daß sie vermutlich einen nicht-funktionellen Komplex mit den Rezeptoren bilden können (Bafico et al., 1999).

Wnts wurden klassischerweise in zwei Gruppen eingeteilt; die Mitglieder der einen (z.B. *Wnt-1*, *-3a*, *-8* und *-8b*) induzieren sekundäre Achsen im *Xenopus*-Embryo und transformieren C57mg epitheliale Zellen nach Überexpression, während andere (z.B. *Wnt-4*, *-5a* und *-11*) dies nicht vermögen (Wong et al., 1994; Du et al., 1995). Aber auch diese *Wnts* sind biologisch aktiv, da sie z.B. Zellbewegungen und Zelladhäsion modulieren, wenn sie im *Xenopus*-Embryo zur Überexpression gebracht werden (Du et al., 1995; Moon et al., 1995; Torres et al., 1996). Neben diesen unterschiedlichen zellulären Antworten, wurde beobachtet, daß einige Wnts auch die Effekte anderer antagonisieren können (Torres et al., 1996; Kühl et al., 2001). Darüberhinaus wurden Wnt-Effekte beschrieben, die unabhängig von β -Catenin sind, wie z.B. die Induktion von *Lmx-1* durch *Wnt-7a* in der Gliedmaßenknospe des Hühnerembryos (Kengaku et al., 1998; s. 1.4.3), was zu der Hypothese führte, daß funktional unterschiedliche Wnt-Signalwege existieren. Die erste Evidenz für einen mutmaßlichen β -Catenin-unabhängigen Wnt-Signalweg kam durch die Überexpression des für einen Serotoninrezeptor kodierenden *5HT1c* in *Xenopus*, die einen Phänotyp verursachte, der der Überexpression von *Wnt-5a* sehr ähnelte (Ault et al., 1996; Slusarski et al., 1997a). Von *5HT1c* war bekannt, daß dieser Rezeptor die intrazelluläre Freisetzung von Ca^{2+} in einer G-Protein-abhängigen Weise stimuliert. Es konnte dann gezeigt werden, daß auch *Wnt-5a* im Gegensatz zum transformierenden *Wnt-8* die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht (Slusarski et al., 1997a). Darüberhinaus wurde beobachtet, daß bestimmte Frizzleds

präferentiell den β -Catenin Weg aktivierten, andere hingegen die intrazelluläre Freisetzung von Ca^{2+} (Yang-Snyder et al., 1996; Slusarski et al., 1997b). Weitere Analysen zeigten dann, daß Wnt-5a zwei Ca^{2+} -sensitive Enzyme, die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Protein Kinase II (CamKII) und Protein Kinase C (PKC), aktiviert und die intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung die G-Protein-abhängige Aktivierung des Phosphatidylinositolwegs beinhaltet (Sheldahl et al., 1999; Kühl et al., 2000a). Dies führte zur Bezeichnung Wnt/ Ca^{2+} -Weg für diesen alternativen Wnt-Signalweg (Übersicht bei Kühl et al., 2000b; Abb. 1.2). Die Aktivierung des einen oder anderen Weges durch einen bestimmten Liganden scheint aber keineswegs absolut zu sein, da z.B. auch Wnt-5a den Wnt/ β -Catenin-Weg aktivieren kann, was u.a. von Ligand/Rezeptor-Kombinationen abzuhängen scheint (He et al., 1997; Deardorff et al., 1998; Itoh et al., 1998; s. auch 1.3.1). Wie bereits angedeutet, kann der Wnt/ Ca^{2+} -Weg den Wnt/ β -Catenin-Weg antagonisieren, was zu seiner Tumorsuppressor-Aktivität beitragen könnte (Übersicht bei Miller et al., 1999). Gewebespezifische Wnt-Effekte können jedoch nicht nur durch diese unterschiedlichen Signaltransduktionsmechanismen vermittelt werden, vielmehr kann auch die Vielfältigkeit der Interaktionsmöglichkeiten von Komponenten des klassischen Wnt/ β -Catenin-Weges unterhalb von β -Catenin zu gewebespezifischer Genaktivierung durch Wnt führen (Hamilton et al., 2001).

Es bestehen vielartige Querverbindungen zwischen Komponenten des Wnt-Signalwegs und Faktoren anderer Signaltransduktionskaskaden. Die gemeinsame Nutzung von Tcf als Signalmediator des Tgf β - (s. 1.2), als auch des Wnt-Signalwegs ist nur ein Beispiel dafür. Im *Drosophila*-Auge ist ein Mechanismus beschrieben worden, der eine Querverbindung zu einem MAPK-Weg herstellt. Hier rekrutiert dsh andere Kinasen als GSK3 β und aktiviert neben der wg-Kaskade auch den JNK-Signalweg (Boutros et al., 1998). Auch Wnt-1, Wnt-5a und Xwnt-11 können JNK aktivieren (Li et al., 1999; Heisenberg et al., 2000; Tada und Smith, 2000; Wallingford et al., 2000), was die Existenz von mindestens drei Signaltransduktionskaskaden unterhalb der Frizzled-Rezeptoren impliziert (Abb. 1.2). Andersherum unterliegen auch Wnt-Aktivitäten einer Kreuzregulation durch andere Signalwege. So kann z.B. die nukleäre Lokalisation und die DNA-Bindung von Tcf durch die Aktivität der MAPKKK TAK-1 blockiert werden (Ishitani et al., 1999; Übersicht bei Behrens, 2000). Da TAK-1 auch Bestandteil eines Bmp-Signalweges ist (s. 1.2) stellt dieser Befund eine Möglichkeit dar, wie der Bmp- und der Wnt-Signalweg antagonistisch zueinander wirken können.

Die genannten Mechanismen der Signalweiterleitung durch sezernierte Moleküle der Bmp- und Wnt-Familien, ihre Querverbindungen und die Nutzung redundanter Signalmediatoren machen deutlich, daß es sich bei diesen Signaltransduktionskaskaden sicherlich nicht um

lineare Abfolgen handelt, obwohl sie der Einfachheit halber zumeist so dargestellt werden. Die Realität ist aber offensichtlich wesentlich komplexer, so daß der Begriff des „Signalnetzwerkes“ angebrachter erscheint. Im Folgenden wird trotzdem weiter der gebräuchlichere Terminus „Signalweg“ benutzt.

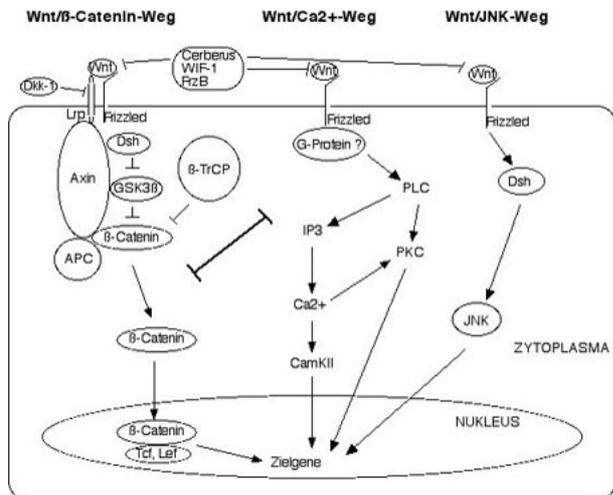


Abbildung 1.2 : Schematische Darstellung der alternativen Wnt-Signaltransduktionskaskaden.

Die Bindung eines Wnt-Liganden an ein Zelloberflächenmolekül der Frizzled-Familie ist ausreichend, um den Wnt/JNK-Signalweg zu aktivieren. Die Aktivierung von JNK führt zu zellulären Antworten auf das Wnt-Signal. Für die Signalweiterleitung über den β -Catenin-Weg ist außerdem das Korezeptormolekül Lrp notwendig. Für die Aktivierung des Wnt/ Ca^{2+} -Wegs ist dies bisher nicht gezeigt worden. Im β -Catenin-Weg führt die Rezeptoraktivierung zur Hemmung von

GSK3 β durch Dsh. Hierdurch unterbleibt die Phosphorylierung von β -Catenin, wodurch es der Polyubiquitinierung und der Zerstörung durch β -TrCP und das Ubiquitin-System entkommt. β -Catenin wird aus dem zytoplasmatischen Multiproteinkomplex, der außerdem GSK3 β , Axin und APC beinhaltet, gelöst, akkumuliert und transloziert in den Nukleus. Hier moduliert es die Aktivität von Zielgenen in Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren wie z.B. denen der Tcf- und Lef-Familien. Dieser Weg wird spezifisch durch Dkk-1 durch dessen Bindung an das Lrp-Molekül inhibiert. Bestimmte Ligand/Rezeptor-Kombinationen führen zur, vermutlich G-Protein-vermittelten, Aktivierung von PLC und PKC und zur Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Dies wiederum aktiviert die CamKII. Der Wnt/ Ca^{2+} - und der Wnt/ β -Catenin-Weg können antagonistisch zueinander wirken, wie durch den Balken zwischen diesen beiden Kaskaden angedeutet ist. Die Aktivität aller drei Kaskaden wird durch die Bindung von Cerberus, WIF-1 oder FrzB an den Liganden inhibiert. Modifiziert nach Miller et al., 1999; Kühl et al., 2000b; Hamilton et al., 2001; Zorn, 2001.

1.3.1 Der Wnt-Antagonist Dickkopf-1 (Dkk-1)

Dkk-1 wurde als sezerniertes Protein identifiziert, das in *Xenopus* sowohl ausreichend als auch notwendig für die Kopfinduktion ist (Glinka et al., 1998). In der frühen Frosch-Gastrula ist *Dkk-1* im Spemann Organisator exprimiert und später in einer endomesodermalen Domäne, die der prospektiven Prächordalplatte entspricht, zwei longitudinalen Streifen, die das anteriore Chordamesoderm flankieren und in den Vorläufern der Leber (Glinka et al., 1998). In der Neuralplatte wird *Dkk-1* sowohl für die antero-posteriore (A/P) als auch die dorso-ventrale (D/V) Musterbildung zwischen Mes- und Telenzephalon benötigt (Kazanskaya et al., 2000). In der Maus können *Dkk-1*-Trankripte zuerst am Tag (E) 6,5 der

Embryonalentwicklung in mesodermalen Zellen in Nachbarschaft zur Grenze zwischen embryonalen und extraembryonalen Geweben detektiert werden. An E8,5 ist *Dkk-1* im Kopfmesenenchym und den Somiten aktiv (Glinka et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, daß *Dkk-1* seine kopfinduzierende Wirkung in *Xenopus* durch eine Inhibition von Wnt/ β -Catenin-Signalen bewirkt (Glinka et al., 1998). Diese Wnt/ β -Catenin-antagonisierende Wirkung von *Dkk-1* wurde auch durch Überexpression im Zebrafisch und im Hühnerembryo bestätigt (Hashimoto et al., 2000; Shinya et al., 2000; Marvin et al., 2001). Der Mechanismus dieser Wnt-Interferenz unterscheidet *Dkk-1* von allen anderen bisher bekannten sezernierten Wnt-Antagonisten (s. 1.3) und impliziert eine qualitativ unterschiedliche Funktion, da *Dkk-1* den Korezeptor Lrp-6 bindet (Bafico et al., 2001; Mao et al., 2001; Semenov et al., 2001; Übersicht bei Nusse, 2001). Durch diese Interaktion wird offensichtlich eine spezifische Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Weges erreicht, da zum einen Wnt-5a-Signale, die hauptsächlich über den Wnt/ Ca^{2+} -Weg vermittelt werden, nicht durch *Dkk-1* blockiert werden (Wu et al., 2000), und zum anderen der Verlust der *arrow*-Funktion in *Drosophila* (s. 1.3) nicht zu Störungen des Wnt/JNK-Signalwegs führt (Wehrli et al., 2000). Alle anderen extrazellulären Wnt-Antagonisten (s. 1.3) hingegen blockieren sämtliche intrazellulären Signalwege unterhalb von Frizzled durch die Bindung an Wnt. D.h. die Aktivität von *Dkk-1*, das selektiv Wnt/ β -Catenin-Signale inhibiert, während andere Wnt-Signalkaskaden noch aktivierbar sind, könnte auch eine wichtige Rolle bei der Entscheidung spielen, welcher Signalweg durch Wnt aktiviert wird (Zorn, 2001). Die *Dickkopf*-Gene, von denen vier im Genom des Menschen identifiziert worden sind, kodieren eine neue Proteinfamilie, für die bisher keine Nicht-Vertebratenhomologe bekannt sind (Krupnik et al., 1999). Die einzelnen Mitglieder unterscheiden sich in ihrer Affinität zum Lrp-6-Molekül (Mao et al., 2001), wie auch in ihrer biologischen Wirkung. *Dkk-2* z.B. ist eher ein Aktivator als ein Inhibitor des Wnt-Signalwegs und kann *Dkk-1*-Wirkung antagonisieren (Wu et al., 2000). Abhängig vom physiologischen Kontext kann *Dkk-2* allerdings auch synergistisch zu *Dkk-1* wirken (Wu et al., 2000).

1.4 Gliedmaßenentwicklung

1.4.1 Organisation der frühen Vertebratenextremität

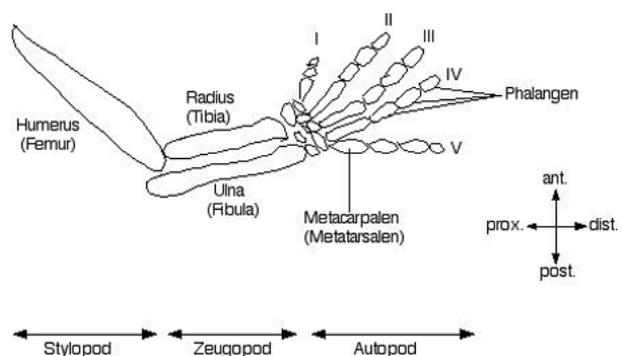
Eines der o.g. embryonalen Sekundärfelder ist die sich entwickelnde Vertebratenextremität. Sie stellt ein relativ einfach aufgebautes System dar, an dem die Etablierung embryonaler Achsen und Musterbildungsprozesse modellhaft analysiert werden können. Wie auch während der Entwicklung anderer Sekundärfelder kooperieren verschiedene Signalmechanismen während der Gliedmaßenentwicklung, um den Zellen dieses Feldes Positionsinformationen zu geben. Diese Kommunikation der Signalwege beinhaltet auch die reziproke Interaktion

unterschiedlicher Gewebe (Übersichten bei Duboule, 1994b; Martin, 1995; Tickle, 1995; Johnson und Tabin, 1997; Schwabe et al., 1998).

Gliedmaßenknospen entstehen an wohldefinierten Positionen entlang der antero-posterioren (A/P) Achse des Embryos durch eine höhere Proliferationsrate der Zellen des lateralen Plattenmesoderms an diesen Stellen im Vergleich zu benachbarten Regionen der Flanke (Searls und Janners, 1971). Kurze Zeit später wandern Zellen des somitischen Mesoderms in die sich formende Knospe ein, aus denen später die gesamte Muskulatur der adulten Extremität entsteht. Während die Muskulatur, die Nerven und die Blutgefäße ihren Ursprung außerhalb des Gliedmaßenfeldes haben, entstehen alle anderen Gewebe, wie das Skelett, Knorpel und Sehnen aus dem lateralen Plattenmesoderm. Somit leisten zwei mesodermale Anteile einen Beitrag zur Gliedmaßenknospe (Chevallier et al., 1977; Christ et al., 1977), die noch von einem ektodermalen Epithel umhüllt ist. Die Musterbildung entlang der drei Achsen der Extremität (A/P, proximo-distal=P/D und dorso-ventral=D/V) wird dann durch die Kooperation der Signalzentren der Gliedmaßenknospe dirigiert. Diese wurden durch Transplantationsexperimente im Hühnerembryo definiert und werden von der apikalen ektodermalen Leiste (AER – „apical ectodermal ridge“, Saunders, 1948; Fallon und Kelley, 1977; Todt und Fallon, 1984), der Zone polarisierender Aktivität (ZPA, Saunders und Gasseling, 1968) und vom distalen Nicht-AER-Ektoderm repräsentiert. Die zeitliche und räumliche Koordination der Signale dieser gegenseitig voneinander abhängigen spezialisierten Areale ist die Grundvoraussetzung für die korrekte Entwicklung der Gliedmaßen. In Abb. 1.3 ist das Schema einer Vertebratenextremität gezeigt. Hierin werden die in dieser Arbeit verwendeten Bezeichnungen der Skelettelemente deutlich.

Abbildung 1.3 : Schematische Darstellung einer

Vertebratenextremität. Von proximal nach distal ist die Vertebratenextremität in Stylo-, Zeugopod- und Autopod gegliedert. Die Bezeichnung des jeweiligen Skelettelements des hinteren Extremitätenpaares ist in Klammern gesetzt. Der anteriore Finger (Zeh) ist mit I gekennzeichnet. Dieser besteht im Gegensatz zu den anderen vier



nur aus zwei phalangealen Elementen. ant. = anterior, dist. = distal, post. = posterior, prox. = proximal.

1.4.2 Initiation der Gliedmaßenknospe und AER-Induktion

Für die Initiation der Gliedmaßenknospe sind Mitglieder der Fgf-Familie von entscheidender Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, daß die Applikation von Fgf in die Flanke zwischen beiden Extremitätenpaaren des Hühnerembryos ausreicht, um komplette ektopische

Gliedmaßen zu induzieren (Cohn et al., 1995; Ohuchi et al., 1995; Crossley et al., 1996; Vogel et al., 1996; Ohuchi et al., 1997a). *Fgf-2* und *-8* sind im Huhn über die gesamte Länge der AER exprimiert, in der Maus ist dies nur für *Fgf-8* der Fall, da *Fgf-2* hier überhaupt nicht in der AER detektiert werden kann (Savage et al., 1993; Dono und Zeller, 1994; Heikinheimo et al., 1994; Crossley und Martin, 1995; Vogel et al., 1996; Übersicht bei Martin, 1998). *Fgf-10* hingegen ist nur im lateralen Plattenmesoderm aktiv und galt als guter Kandidat, das endogene Initiationssignal darzustellen, da Mäuse, die homozygot für ein Funktionsverlustallel von *Fgf-10* sind, keine Gliedmaßen haben (Min et al., 1998). In einer unabhängigen Studie wurde allerdings beobachtet, daß *Fgf-10* für die frühen Stadien der Initiation nicht benötigt zu werden scheint, da diese offensichtlich in den *Fgf-10*^{-/-}-Mäusen noch stattfinden (Sekine et al., 1999). Darüberhinaus konnte aber im Huhn gezeigt werden, daß die Applikation von ektoischem Fgf zu einer Induktion der *Fgf-10*-Expression führte, bevor auch *Fgf-8* ektoisch aktiviert wurde (Isaac et al., 2000) und Fgf-10 ausreichend ist, *Fgf-8*-Transkription in der AER zu induzieren (Ohuchi et al., 1997a). Diese Aktivität von Fgf-10 wird im Hühnerembryo vom Wnt-3a/β-Catenin Signalweg vermittelt (Kawakami et al., 2001). In der Maus spielt *Wnt-3a* keine Rolle für die AER-Induktion (Takada et al., 1994), es kann aber durchaus davon ausgegangen werden, daß hier ein anderes Mitglied der *Wnt*-Familie diese Funktion übernimmt, da differentielle Expressionsmuster dieser Familie zwischen Maus und Huhn nicht ungewöhnlich sind (Parr et al., 1993; Hollyday et al., 1995). Fgf-8 ist auf der anderen Seite ein wichtiges Signal für die Aufrechterhaltung der *Fgf-10*-Expression im Mesoderm. Dieser Rückkopplungsmechanismus zwischen verschiedenen Mitgliedern der Fgf-Familie ist somit kritisch für die Etablierung der Gliedmaßenknospe. Kürzlich konnte im Huhn gezeigt werden, daß Wnt/β-Catenin-Signalen eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung dieses Fgf-Regulationskreises zukommt. Der Wnt/β-Catenin-Signalweg ist sowohl ausreichend als auch notwendig für die Induktion der vorderen wie auch der hinteren Gliedmaßen und wird von unterschiedlichen Liganden an den beiden axialen Positionen aktiviert (Kawakami et al., 2001). Im Falle der Flügelknospen ist *Wnt-2b*, für die Induktion der Beinknospen hingegen *Wnt-8c* von entscheidender Bedeutung. Noch bevor die Initiation der Gliedmaßenknospen sichtbar ist, sind beide Faktoren im lateralen Plattenmesoderm und dem benachbarten intermediären Mesoderm, jeweils spezifisch auf der Höhe der entsprechenden zukünftigen Knospe, exprimiert. Dort induzieren sie über β-Catenin *Fgf-10*, das den beschriebenen Rückkopplungsmechanismus etabliert (Abb. 1.4). Bisher ist dieser Mechanismus nicht für die Maus gezeigt worden. In Mutanten, die doppelt-homozygot für Funktionsverlustallele der beiden Wnt/β-Catenin Zielgene *Lef-1* und *Tcf-1* sind, kann allerdings eine extreme Reduktion der Gliedmaßenknospe und ein Fehlen der *Fgf-8*-Expression und AER-Formation beobachtet werden (Galceran et al., 1999). Der koordinierte

Informationsfluß zwischen zwei mesodermalen Geweben und dem Ektoderm, der offensichtlich nicht nur im Huhn von Mitgliedern der Wnt- und Fgf-Familien vermittelt wird, ist somit die Grundlage für die Induktion der AER und damit der Initiation der Gliedmaßenknospe.

1.4.3 Positionierung der AER und dorso-ventrale Musterbildung

Transplantationsexperimente im Hühnerembryo zeigten, daß Signale aus dem dorsalen und ventralen Ektoderm die Musterbildung der D/V-Achse der Gliedmaßenknospe regulieren. Eine 180°-Drehung des Ektoderms in Relation zum darunterliegenden Mesoderm induzierte eine Inversion der D/V-Polarität im Mesoderm (MacCabe et al., 1974; Pautou, 1977; Geduspan und MacCabe, 1987, 1989; Akita, 1996). Diese Aktivität wird offensichtlich von *Wnt-7a* vermittelt, das spezifisch im dorsalen Ektoderm exprimiert ist (Dealy et al., 1993; Parr et al., 1993). *Wnt-7a* ist notwendig für die Etablierung des D/V-Musters, da Mäuse ohne funktionelles *Wnt-7a* ventralisierte Extremitäten zeigen (Parr und McMahon, 1995). *Wnt-7a* ist außerdem ausreichend für die Induktion und Aufrechterhaltung der *Lmx-1*- (bzw. *Lmx-1b*-) Expression im Mesoderm, welches dorsale Identität in der Gliedmaßenknospe vermittelt (Riddle et al., 1995; Vogel et al., 1995; Chen et al., 1998). Das Homöoboxgen *En-1* hingegen ist spezifisch im ventralen Ektoderm exprimiert und verhindert hier die Aktivierung von *Wnt-7a* und damit die von *Lmx-1* und die Ausbildung dorsaler Identität (Davis und Joyner, 1988; Davis et al., 1991; Gardner und Barald, 1992; Loomis et al., 1996; Logan et al., 1997). Die weiteren Prozesse unterhalb von *Lmx-1*, die zur Etablierung des D/V-Musters führen, sind allerdings bisher unbekannt.

Die D/V-Musterbildung hängt mit der Positionierung der AER zusammen, da diese exakt an der Grenze zwischen dem dorsalen und dem ventralen Territorium der Gliedmaßenknospe ausgebildet wird (Ohuchi et al., 1997b; Tanaka et al., 1997; Loomis et al., 1996, 1998; Grieshammer et al., 1996; Noramly et al., 1996; Ros et al., 1996). Im Huhn spielt hierfür *R-fng*, das ausschließlich im dorsalen Ektoderm exprimiert wird, eine entscheidende Rolle, da die Grenze *R-fng*-exprimierender und nicht-exprimierender Zellen die Position der AER festlegt (Laufer et al., 1997; Rodriguez-Esteban et al., 1997). Die Fehlexpression von *R-fng* führt zur Bildung ektopischer AERs an den neuen Expressionsgrenzen. Für die AER-Etablierung spielt außerdem *En-1* eine wichtige Rolle, was durch die Fehlbildungen der AER in *En-1^{-/-}*-Mäusen demonstriert wurde (Loomis et al., 1996, 1998). *En-1* reprimiert *R-fng*-Expression im ventralen Teil der Gliedmaßenknospe und stellt damit die Aufrechterhaltung einer scharfen ventralen Grenze der *R-fng*-Transkription sicher (Laufer et al., 1997; Rodriguez-Esteban et al., 1997). Trotz dieser zweifellos bestehenden Verknüpfungen scheinen die Prozesse, die D/V-Zellschicksale und die Position der AER festlegen,

voneinander separierbar zu sein, wie zunächst die Analyse der *Eudiplopodia*-Mutante des Huhns (Rosenblatt et al., 1959) nahelegte. Diese Mutante besitzt ektopische AERs, die nur vom dorsalen *Wnt-7a*-exprimierenden Ektoderm geformt werden und somit doppel-dorsal sind (Laufer et al., 1997). Darüberhinaus befindet sich in *Wnt-7a*^{-/-}-Mäusen die AER trotz des doppel-ventralen Charakters der Extremität an der korrekten Position (Parr und McMahon, 1995). Unterstützt werden diese Befunde von einer Studie, die suggeriert, daß auch der ventrale Gegenspieler, *En-1*, zwar in die Regulation der AER-Formation, nicht aber in die Aufrechterhaltung der Trennung von dorsalen und ventralen Kompartimenten involviert ist. Dies wurde aus Experimenten geschlossen, in denen *En-1* im Huhn mit Hilfe eines Retrovirus überexprimiert wurde, was die Etablierung der AER verhinderte. In solchen infizierten Gliedmaßenknospen überschritten markierte Zellen dorsalen Ursprungs trotzdem nie die Grenze ins ventrale Kompartiment und umgekehrt (Altabef et al., 2000). Auch *En-1*-Überexpression in der AER transgener Mäuse führte in Abhängigkeit von der Expressionsstärke zu einer Verschiebung oder gar einer Blockade der AER-Formation. In diesen Analysen konnte allerdings auch gezeigt werden, daß die D/V-Grenze nicht scharf ausgebildet ist und *En-1* somit auch eine Rolle für die Positionierung und Aufrechterhaltung der Territorialgrenzen spielt (Kimmel et al., 2000). Die in diesem Punkt offensichtlich gegensätzlichen Befunde der beiden Studien können auf die unterschiedlichen experimentellen Vorgehensweisen und z.B. den genauen Zeitpunkt der Überexpression zurückzuführen sein, sie könnten aber auch bedeuten, daß es in diesem Prozeß fundamentale Unterschiede zwischen Huhn und Maus gibt.

1.4.4 Der *Shh/Fgf*-Regelkreis

Nach der Initiation der Gliedmaßenknospe hängt der P/D-Auswuchs sowie die Musterbildung der A/P-Achse hauptsächlich von reziproken Interaktionen der AER und der ZPA ab. Die bedeutende Rolle der AER für den distalen Auswuchs der Extremität wurde schon früh durch chirurgische Entfernung dieser Struktur erkannt. Dies führte zu Verstümmelungen der sich entwickelnden Extremität, wobei der Grad der Verstümmelung mit dem Zeitpunkt der AER-Entfernung korrelierte. Frühes Entfernen führte zu Extremitäten, die nur aus Stylopod-Anteilen bestanden, während sukzessiv mehr distale Strukturen gebildet wurden, wenn die Manipulation in späteren Embryonalstadien durchgeführt wurde (Saunders, 1948; Summerbell, 1974; Rowe and Fallon, 1982). Dies wurde so interpretiert, daß mesodermale Gliedmaßen-Vorläuferzellen am distalen Ende der Knospe im Zuge der Entwicklung immer mehr „distalisiert“ werden und so sequenziell zunächst die proximalen, später die distalen Skelettelemente gebildet werden (Summerbell et al., 1973). Da die Applikation von *Fgf-2*, *-4* oder *-8* in Gliedmaßenknospen, denen die AER entfernt wurde, ausreicht, den distalen

Auswuchs zu erhalten, werden die Fgfs als die hauptsächlichen Vermittler der AER-Aktivität und als distalisierende Faktoren angesehen (Übersicht bei Martin, 1998; Tabin, 1998). In der Maus ist *Fgf-8* als einziges *Fgf*-Familienmitglied über die gesamte Länge der AER exprimiert, während die Transkripte von *Fgf-9* und *-17* ähnlich wie die von *Fgf-4* auf die posterioren zwei Drittel beschränkt sind (Übersicht bei Martin, 1998; Colvin et al., 1999; Sun et al., 2000). Interessanterweise sind aber weder *Fgf-4*, *-9* noch *-17* notwendig für die normale Entwicklung der Gliedmaßen, was auf eine funktionelle Redundanz dieser Gene hindeutet (Moon et al., 2000; Sun et al., 2000, Xu et al., 2000; Colvin et al., 2001a,b). Nur der Funktionsverlust von *Fgf-8* führt zu verkürzten Extremitäten, was die einzigartige Bedeutung dieses Faktors für den distalen Auswuchs der Gliedmaßenanlage unterstreicht (Lewandowski et al., 2000; Moon und Capecchi, 2000). Allerdings war der Phänotyp der *Fgf-8*^{-/-}-Mäuse nicht vereinbar mit dem o.g. Modell der Fgf-Funktion für den distalen Auswuchs, da sowohl Stylo-, Zeugo-, als auch Autopod vorhanden waren. Alternativ wurde vorgeschlagen, daß die Funktion von Fgf-8 zu einem sehr frühen Zeitpunkt essentiell für die Etablierung der Vorläuferpopulationen aller drei Extremitätensegmente ist. Später würden Fgfs dann eher permissive Signale darstellen, die durch ihre proliferations- und überlebensfördernde Wirkung den distalen Auswuchs erlauben, als instruktive distalisierende Signale (Lewandowski et al., 2000). Abgesehen von *Fgf-8*, hängt die Expression aller übrigen AER-*Fgfs* von der ZPA ab (Sun et al., 2000). Dieses Signalzentrum wurde durch die Transplantation von posteriorem Gewebe in anteriore Positionen von Wirtsgliedmaßen identifiziert (Saunders und Gasseling, 1968). Die ektopischen Zellen induzierten zusätzliche, posteriorisierte Skelettelemente, d.h. die entstandenen Gliedmaßen wiesen eine spiegelbildliche Duplikation des Extremitätenmusters auf. Aufgrund dieser Eigenschaft, die A/P-Achse zu organisieren, wurde dieser Bereich im posterioren Mesoderm „Zone polarisierender Aktivität“ genannt (Saunders und Gasseling, 1968; Tickle et al., 1975). Die genannten Befunde legten nahe, daß ein sezerniertes Signal von der ZPA ausgeht, das dann im Sinne eines klassischen Morphogens einen molekularen Gradienten entlang der A/P-Achse bildet, wobei die höchste Konzentration des Morphogens posteriore Identität verleiht (Wolpert, 1969). Unterschiedliche Identitäten entlang der A/P-Achse lassen sich dann durch die differentielle Genaktivierung als Antwort auf unterschiedliche Konzentrationen des Morphogens erklären. Sonic hedgehog (*Shh*) gilt als allgemein akzeptierter Mediator der ZPA-Aktivität. Die Expression von *Shh* kolokalisiert mit der ZPA und die Applikation von *Shh* oder *Shh*-exprimierenden Zellen haben den gleichen Effekt wie die Transplantation der ZPA (Echelard et al., 1993; Krauss et al., 1993; Riddle et al., 1993; Chang et al., 1994; Roelink et al., 1994; Lopez-Martinez et al., 1995), wobei höhere Konzentrationen von *Shh* immer mehr posteriore Skelettelemente spezifizieren (Yang et al., 1997). Wie *Shh* seine Effekte über große Distanzen (Langstreckeneffekt, einige hundert

Mikrometer in der Gliedmaßenknospe) allerdings ausübt, ob direkt, z.B. durch eine frei diffundierende Form (Johnson and Tabin, 1995; McMahon, 2000), oder durch die Aktivierung von Sekundärvermittlern der Shh-Aktivität ist bis heute nicht vollständig geklärt. Einige Daten sprechen für die Existenz eines sekundären Signalmoleküls unterhalb von Shh. In *Drosophila* agiert das Shh-Homolog Hedgehog (Hh) durch das Bmp-Homolog decapentaplegic (dpp), um die Musterbildung und das Wachstum innerhalb der Flügelimaginalscheiben zu regulieren (Übersichten bei Hammerschmidt et al., 1997; Ingham, 1998). Im Huhn wurde *Bmp-2* als Zielgen von Shh identifiziert (Laufer et al., 1994; Yang et al., 1999; Zuniga et al., 1999). Bmp-2-getränkte Mikrokugeln können zwar den anterioren Finger in Hühnergliedmaßenknospen (Finger 2), dessen Spezifizierung offensichtlich auch in der Maus unabhängig von Shh ist (Kraus et al., 2001), induzieren (Duprez et al., 1996), für die Induktion von Finger 3 ist jedoch die vorherige Exposition zu Shh notwendig (Drossopoulou et al., 2000). Da nur für Shh gezeigt werden konnte, daß es den posterioren Finger 4 induzieren kann (Lopez-Martinez et al., 1995; Yang et al., 1997; Drossopoulou et al., 2000), impliziert die Summe dieser Befunde, daß Shh und Bmp-2 kooperieren, um das volle Spektrum der Fingeridentitäten zu spezifizieren. Darüberhinaus wurde gezeigt, daß Shh nicht weit von den Zellen seiner Produktion wegdiffundiert (Lopez-Martinez et al., 1995; Marti et al., 1995), was wiederum die Existenz eines Sekundärvermittlers der Langstreckeneffekte impliziert. Zur Generierung eines aktiven Shh-Signals ist die autoproteolytische Spaltung von Shh notwendig. Das N-terminale Signalpeptid wird dann posttranslational durch die kovalente Verknüpfung mit einem Cholesterin-Molekül an seinem C-Terminus modifiziert, was offensichtlich dazu führt, daß Shh an der Zelloberfläche gebunden bleibt (Lee et al., 1994; Bumcrot et al., 1995; Marti et al., 1995; Porter et al. 1995, 1996a,b). Diese Cholesterin-Modifikation verändert nicht die Affinität des Signalmoleküls für seinen Rezeptor Ptc-1 (Marigo et al., 1996a; Stone et al., 1996; Pepinsky et al., 1998), sie erhöht allerdings dessen biologische Aktivität unter einigen experimentellen Bedingungen (Pepinsky et al., 1998). Kürzlich konnte nun in zwei Studien gezeigt werden, daß diese lipophile Modifikation notwendig ist, damit das Shh-Molekül über einige hundert Mikrometer hinweg diffundieren kann (Lewis et al., 2001; Zeng et al., 2001). Es konnte sowohl ein Gradient dieser modifizierten Form über die A/P-Achse der Hühnergliedmaßenknospe nachgewiesen werden, als auch eine auf den posterioren Bereich der Mausgliedmaßenknospe beschränkte Wirkung eines N-terminalen Shh-Fragmentes ohne Cholesterin-Modifikation. Die Shh-Langstreckenwirkung wird somit offensichtlich durch mehrere Mechanismen sichergestellt. Nach Bindung an einen Rezeptor-Komplex bestehend aus Ptc-1 und Smo, wird das Shh-Signal dann hauptsächlich durch Mitglieder der Gli-Familie von Zinkfinger-

Transkriptionsfaktoren übermittelt. Sowohl *Ptc-1* als auch *Gli-1* sind darüberhinaus selbst Zielgene dieser Signalkaskade (Übersichten bei Hammerschmidt et al., 1997; Ingham, 1998). Die ZPA ist aber nicht nur für die korrekte Musterbildung der A/P-Achse von immenser Bedeutung, sondern auch für den distalen Auswuchs. Dies belegen Experimente, bei denen die ZPA-Aktivität reduziert wurde, entweder durch chirurgische Entfernung von ZPA-Zellen im Huhn oder durch Eliminierung der *Shh*-Genfunktion in der Maus (Pagan et al., 1996; Chiang et al., 1996), die auch zu distalen Verstümmelungen der Extremitäten führten. Die Auswirkungen auf die P/D-Achse können durch die reziproken Interaktionen der ZPA und der AER erklärt werden. Zwischen *Shh* und *Fgf-4* besteht ein Rückkopplungsmechanismus, so daß mit der Induktion der *Shh*-Expression im posterioren Mesenchym die *Fgf-4*-Induktion in der posterioren AER einhergeht (Laufer et al., 1994; Niswander et al., 1994a). *Shh* ist außerdem auch notwendig für die Aufrechterhaltung der *Fgf-4*-Expression und andersherum sind neben *Fgf-4* auch *Fgf-2*, -8 und -10 in der Lage, die *Shh*-Expression aufrechtzuerhalten (Niswander et al., 1993, 1994a; Savage et al., 1993; Vogel und Tickle, 1993; Laufer et al., 1994; Crossley et al., 1996; Ohuchi et al., 1997a). Wie die Analyse der *limb deformity (ld)* Mutante, die einen Defekt in der *Formin*-Genfunktion besitzt, ergab, ist der Bmp-Antagonist Gremlin von entscheidender Bedeutung für die Etablierung dieses *Shh/Fgf-4*-Rückkopplungsmechanismus (Chan et al., 1995; Haramis et al., 1995; Kuhlman und Niswander, 1997; Zuniga et al., 1999). In *ld* Gliedmaßenknospen wird *Shh* zunächst normal im posterioren Mesenchym aktiviert, dann aber aufgrund eines mesenchymalen Defekts, der die Aktivierung von *Fgf-4* in der AER verhindert, nicht aufrechterhalten. Es konnte nun gezeigt werden, daß die Aktivierung von *Formin*, *Gremlin* und *Fgf-4* unabhängig vom *Shh*-Signal ist, wohingegen *Shh* für die Aufrechterhaltung ihrer Expression jedoch benötigt wird. Offensichtlich ist die *Formin*-abhängige Aktivierung von *Gremlin* ausreichend, um durch die durch Gremlin vermittelte Inhibition von Bmp-Signalen, die *Fgf-4*-Expression in der AER zu erlauben. *Fgf-4* trägt dann zur Aufrechterhaltung der *Shh*-Expression bei, welches in dieser späteren Phase unabdingbar für den Fortbestand des genannten Rückkopplungsmechanismus ist (Zuniga et al., 1999; Abb. 1.4). Aus diesen Daten folgt, daß frühe Aspekte der A/P-Musterbildung unabhängig von *Shh* sind, was durch die Analyse der Gliedmaßen von *Shh*^{-/-}-Embryonen belegt wird. Während diese Embryonen Humerus bzw. Femur mit eindeutiger A/P-Polarität besitzen, fehlt diese den distal vom Ellenbogen- bzw. Kniegelenk gelegenen Skelettelementen des Zeugopods. D.h., daß *Shh* spezifisch an oder genau distal der Stylopod/Zeugopod-Grenze für die Entwicklung der Vertebratenextremität notwendig wird (Chiang et al., 2001).

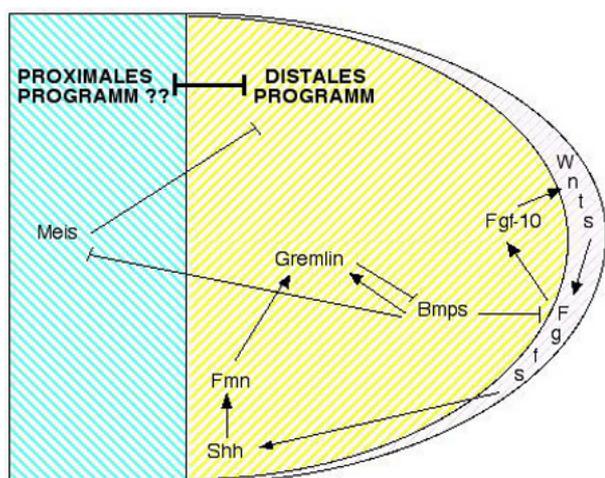
Die Beobachtung, daß die Suppression von Bmp-Signalen eine Vorbedingung für die Induktion der *Fgf-4*-Expression in der AER ist, stellt einen scheinbaren Kontrast zu

Experimenten dar, in denen gezeigt wurde, daß die Implantation von *Bmp-2*-exprimierenden Zellen ins anteriore Mesoderm der Gliedmaßenknospe zur Induktion von *Fgf-4* in der AER und zur Nachahmung bestimmter Shh-Effekte führte (Duprez et al., 1996). Zur Untersuchung der Frage, ob Bmp-Signale für den distalen Auswuchs der Extremität notwendig sind, wurden verschiedene Moleküle, die Bmp-Signale blockieren, wie Gremlin, Noggin und dominant-negativer BmpR-Ib in der Gliedmaßenknospe zur Überexpression gebracht. Diese übermäßige Blockade von Bmp-Signalen führte zur Abnahme der Expression von *Shh* und *Msx-1* in den distalen Zellen und Verstümmelungen der resultierenden Extremitäten (Capdevilla et al., 1999; Pizette und Niswander, 1999), was nahelegte, daß eine Minimalaktivität von Bmp-Signalen für den distalen Auswuchs benötigt wird. Eine zu hohe Bmp-Aktivität führt auf der anderen Seite zu vorzeitiger Regression und Funktionsverlust der AER (Macias et al., 1997; Zou et al., 1997). Da sowohl eine Über- wie auch eine Unterfunktion des Bmp-Signalweges zu Störungen der Musterbildung der Gliedmaßen führen, besteht die Notwendigkeit einer sehr präzisen Regulation von *Gremlin*, das als einziges der für Bmp-Inhibitoren kodierenden Gene, in frühen Gliedmaßenknospen in einer Weise exprimiert ist, die suggeriert, daß Gremlin der entscheidende Faktor zur Feinregulation früher Bmp-Signale ist (Capdevilla et al., 1999; Merino et al., 1999; Zuniga et al., 1999). In der Tat unterliegt *Gremlin* einer komplexen Regulation durch Shh, Bmp und Fgf. Während Shh und intermediäre Aktivitäten von Bmp *Gremlin*-Expression positiv beeinflussen, führt ektopische Fgf-Aktivität zur Inhibition der *Gremlin*-Transkription (Capdevilla et al., 1999; Merino et al., 1999). Eine feine Balance von Bmp-aktivierenden, wie -reprimierenden Aktivitäten stellt also die Aufrechterhaltung des distalen Auswuchses der Extremität sicher (Übersicht bei Dudley und Tabin, 2000).

Die Bedeutung von Bmp-Signalen für die Entwicklung distaler Skelettelemente scheint das Ergebnis ihrer Fähigkeit zu sein, mutmaßliche Skelettmusterbildungsgene wie z.B. *HoxD-13* in Nachbarschaft zur AER zu induzieren (Duprez et al., 1996). Ein überraschender Befund war, daß ektopische Bmp-Aktivität an der Grenze zwischen Gliedmaßenknospe und angrenzender Körperwand, die normalerweise nur distal exprimierten Gene *cSpalt* und *HoxD-13* induzieren konnte (Capdevilla et al., 1999). Dieser Effekt war allerdings nur dann zu beobachten, wenn simultan AER-Faktoren wie *Fgf-8* oder *Wnt-3a* überexprimiert wurden. Dies wurde als Distalisierung interpretiert, obwohl dies fraglich erscheint, da keine Beschreibung des resultierenden Phänotyps gegeben wurde, so daß die Transkription dieser Gene auch einfach eine Antwort auf diese Kombination der Faktoren sein kann. Trotzdem implizierten diese Resultate, daß Bmp-Signale wichtig für die Aufrechterhaltung einiger Aspekte distalen Charakters sind. Dies führt zwangsläufig zu der Frage, warum diese Zielgene in der frühen Gliedmaßenknospe nicht ubiquitär exprimiert sind, wenn höchst wahrscheinlich die überwiegende Mehrheit der Zellen zumindest minimale Bmp-, Fgf- und

Wnt-Signale empfangen. Die Antwort hierauf könnte in der Aktivität von *Meis1* und *Meis2* liegen. Beide Gene sind initial über die gesamte Gliedmaßenknospe exprimiert. Durch die Aktivität von *Bmp* und distalen *Hox*-Genen werden ihre Expressionsdomänen dann aber sukzessive auf den proximalen Bereich begrenzt, der später Humerus oder Femur bildet (Capdevilla et al., 1999; Mercader et al., 1999). Überexpression dieser beiden Transkriptionsfaktoren reduziert den distalen Auswuchs und zerstört das finale Skelettmuster der Extremität. Dies geht mit der Reduktion der Expression distaler Gene und einer distalen Verschiebung der Expressionsdomäne des proximal aktiven *HoxA-11* einher (Capdevilla et al., 1999; Mercader et al., 1999). Dies wurde so interpretiert, daß *Meis* proximale Identität vermittelt. Ob dies wirklich so zu interpretieren ist, erscheint zweifelhaft, da in allen berichteten Fällen Stylo-, Zeugo- und Autopod (wenn vorhanden) deutlich ausgebildet und in richtiger Abfolge zueinander angeordnet waren. D.h. es gibt wenig Evidenz für eine Proximalisierung der Gliedmaßen nach *Meis*-Überexpression. Auch die distale Verschiebung von *HoxA-11* ist im Kontext der normalen Gliedmaßenentwicklung schwer zu verstehen, da sich die normale *HoxA-11*-Expressiondomäne distal der der *Meis*-Gene befindet. Deshalb ist es unwahrscheinlich, daß *Meis*-Proteine direkt proximale Identität vermitteln können. Ihre Funktion könnte vielleicht eher ähnlich zu ihrem *Drosophila*-Homolog Hth sein, das offensichtlich eine funktionelle Barriere zwischen der Körperwand und dem Gliedmaßenfeld konstituiert. Fehlt Hth in proximalen Zellklonen, kommt es zu Fusionen der Körperwand mit Gliedmaßensegmenten (Wu und Cohen, 1999). Somit ist die Funktion von *Meis*-Genen in einem potentiellen proximalen Programm in der Entwicklung der Vertebratenextremität noch unklar.

Abbildung 1.4 : Molekulare Interaktionen in der frühen Gliedmaßenknospe. Die Abbildung faßt die wesentlichen unter 1.4.2 und 1.4.4 beschriebenen molekularen Vernetzungen während der Entwicklung der Vertebratenextremitäten zusammen. Der rot unterlegte Bereich repräsentiert die AER. Modifiziert nach Vogt und Duboule, 1999.



1.4.5 Etablierung der ZPA

Die Frage, die sich zwangsläufig aus der polarisierten *Shh*-Expression ergibt, ist, welche Mechanismen sie auf den posterioren Bereich des Mesenchyms begrenzen. Wie schon unter

1.4.4 dargelegt, sind die initialen Ereignisse der A/P-Musterbildung unabhängig von *Shh*. Nach der Etablierung der polarisierenden Region ist es dann allerdings absolut unerlässlich für diesen Prozeß. Die initiale Unabhängigkeit von *Shh* wird bestätigt durch den Befund, daß das Flankenmesoderm schon vor der Initiation der Gliedmaßenknospe polarisierende Aktivität besitzt (Hornbruch und Wolpert, 1991), obwohl *Shh* hier zu dieser Zeit nicht exprimiert ist. Wird dieses Gewebe nun allerdings unter die anteriore AER transplantiert, wird *Shh* in diesen Flankenmesodermzellen induziert (Yonei et al., 1995). Das bedeutet, daß nicht nur die Zellen der ZPA fähig sind, *Shh* zu exprimieren, sondern daß die Region dieser kompetenten Zellen viel größer ist. Dies wurde kürzlich auch in einer Reihe eleganter Transplantationsexperimente in Mausembryonen gezeigt (Tanaka et al., 2000). Daraus kann abgeleitet werden, daß es im anterioren Teil der Gliedmaßenknospe ein Programm gibt, das hier die Aktivierung von *Shh* verhindert. Diese Annahme wird durch die Analyse polydaktyler Mausmutanten gestützt, die anterior ektopische *Shh*-Expression zeigen (Masuya et al., 1995, 1997; Büscher et al., 1997; Qu et al., 1997). Während der Entwicklung der Extremitäten werden große Areale durch programmierten Zelltod eliminiert. Hierzu gehören v.a. das interdigitale Mesenchym (INZ - interdigitale nekrotische Zone), durch dessen Entfernung die Finger modelliert werden (s. 1.4.6), die anteriore (ANZ) und posteriore (PNZ) nekrotische Zone (Saunders und Fallon, 1966; Garcia-Martinez et al., 1993; Zakeri et al., 1994). Für die Funktion der Moleküle des Programms, das die anteriore *Shh*-Expression verhindert, bestehen also die zwei grundsätzlichen Möglichkeiten, daß sie dies entweder direkt durch transkriptionelle Repression bewirken könnten oder indirekt, indem sie programmierten Zelltod induzieren. Hierdurch könnten also Zellen entfernt werden, die ansonsten *Shh* exprimieren würden. Für Mitglieder der *Bmp*-Familie, insbesondere *Bmp-2* und *-4*, wird eine solche Rolle postuliert, da die Blockade des endogenen *Bmp*-Signalwegs zu einer Suppression der Apoptose mesodermaler Zellen führt, während die Implantation von *Bmp-4*-getränkten Mikrokugeln den interdigitalen Zelltod beschleunigt (Ganan et al., 1996; Yokouchi et al., 1996; Zou und Niswander, 1996, s. 1.4.6). Reduzierter programmierter Zelltod könnte somit die Ursache der präaxialen Polydaktylie in *Bmp-4^{+/-}*-Mäusen sein (Dunn et al., 1997). Für *Gli3*, dessen Funktionsverlust in der *Xt^l*-Mutante zur ektopischen *Shh*-Aktivierung führt, erscheint die erste Möglichkeit wahrscheinlicher, da es vielfache Hinweise für regulatorische Interaktionen zwischen *Shh* und *Gli3* gibt (Hui und Joyner, 1993; Marigo et al., 1996b; Büscher et al., 1997, 1998; Büscher und Rüther, 1998; Ruiz i Altaba, 1998; Wang et al., 2001). Interessanterweise ist der Phänotyp der einzeln-heterozygoten Mäuse mit den genannten Mutationen in doppelt-heterozygoten *Bmp-4^{+/-}, Xt^l/+*-Mäusen verstärkt (Dunn et al., 1997), was impliziert, daß ein Zusammenspiel beider Prozesse (Apoptose-Induktion durch *Bmp-4* und Hemmung von *Shh* z.B. durch *Gli3*) für die Entwicklung benötigt wird.

Darüberhinaus sind aber sicherlich auch positive Signale notwendig, um die korrekte *Shh*-Expressionsdomäne zu etablieren. Ein Molekül, das möglicherweise hierin involviert ist, ist *HoxB-8*, dessen Überexpression am anterioren Rand der Extremität zur Ausbildung einer ektopischen ZPA führt (Charite et al., 1994). Allerdings ist *HoxB-8* nicht ausreichend, um *Shh* zu aktivieren, da *HoxB-8*-exprimierende Zellen nur dann *Shh* transkribieren, wenn sie sich am distalen Rand der Gliedmaßenknospe befinden, was einmal mehr die Notwendigkeit von AER-Signalen für die *Shh*-Expression demonstriert (Riddle et al., 1993; Charite et al., 1994). Für die korrekte Expression von *HoxB-8* im lateralen Plattenmesoderm wiederum scheint Retinsäure (RA) eine wichtige Funktion zu haben. Als direkte Antwort auf RA-Applikation wird in der Abwesenheit von Proteinexpression sehr schnell *HoxB-8*-Expression in der Gliedmaßenknospe induziert (Lu et al., 1997). Darüberhinaus hemmen RA-Inhibitoren sowohl die endogene *HoxB-8* Expression als auch die initiale Induktion von *Shh* (Helms et al., 1996; Stratford et al., 1996; Lu et al., 1997). Retinsäurederivate spielen also mit Sicherheit eine entscheidende Rolle bei der initialen Etablierung der A/P-Asymmetrie der sich entwickelnden Gliedmaßen. Kürzlich wurde mit *dHAND* ein weiterer wichtiger Spieler in diesem Prozeß identifiziert (Übersicht bei Cohn, 2000). *dHAND* ist vor der Initiation der Gliedmaßenknospe im gesamten lateralen Plattenmesoderm exprimiert. Mit dem Erscheinen der Knospen werden die *dHAND*-Transkripte auf die posterioren Regionen von Vorder- und Hinterextremität und das Flankenmesoderm begrenzt (Charite et al., 2000; Fernandez-Teran et al., 2000; Yelon et al., 2000). Nur ein Teil dieser *dHAND*-exprimierenden Zellen wird später *Shh* aktivieren. *dHAND*-Überexpression führt sowohl in der Maus als auch im Huhn zu ektopischer *Shh*-Expression und Aktivierung des Shh-Signalwegs, was zu Duplikationen der Skelettelemente führt (Charite et al., 2000; Fernandez-Teran et al., 2000). Nach Applikation von RA in Gliedmaßenknospen wurde zunächst die beschriebene direkte Hochregulation von *HoxB-8* beobachtet, gefolgt von ektopischer *dHAND*-Aktivierung, bevor *Shh* ektopisch transkribiert wurde (Fernandez-Teran et al., 2000). Die Expression von *dHAND* geht nicht nur der von *Shh* voraus, sie ist auch dafür notwendig, wie sowohl in der Maus als auch im Zebrafisch gezeigt werden konnte (Charite et al., 2000; Yelon et al., 2000). Auch zwischen *dHAND* und *Shh* besteht ein regulatorischer Rückkopplungsmechanismus. Überexpression des einen Gens ist ausreichend, das jeweils andere zu induzieren. Wie bereits erwähnt, ist *dHAND* darüberhinaus notwendig für die *Shh*-Expression und andersherum ist auch die Expression von *dHAND* in *Shh*^{-/-}-Mäusen drastisch reduziert. Interessanterweise sind in *dHAND*^{-/-}-Embryonen vorhandene Defekte im Kiefer und Herz auf extensive Apoptose zurückzuführen (Thomas et al., 1998; Srivastava, 1999). Wenn man postuliert, daß für die Entwicklung der Extremitäten nicht nur massive Zellproliferation, sondern auch zusätzlich aktive Inhibition von Apoptose notwendig ist, wäre dies eine mögliche Erklärung der

beobachteten Gliedmaßendefekte in *dHAND*^{-/-}-Mäusen. Die schwer unterentwickelten Extremitäten würden sich dann dadurch erklären, daß Gliedmaßenknospenzellen in Abwesenheit von *dHAND* dem gleichen apoptotischen Schicksal zugeführt würden, wie Zellen des Gesichtes und des Herzens in diesen Mäusen. Auch die Folgen einer *dHAND*-Überexpression wären mit solch einer Interpretation vereinbar. Wenn es die normale Funktion von *dHAND* ist, Zellen mit polarisierendem Potential am Leben zu erhalten, würde dessen Überexpression Apoptose in anterioren Zellen verhindern und damit eine Polydaktylie verursachen. Die Fähigkeit von Shh, RA und der ZPA, *dHAND* zu induzieren, würde somit einen Mechanismus implizieren, durch den die ZPA ihr eigenes Fortbestehen sicherstellt. Diese Hypothese wird von Daten gestützt, die zeigen, daß *Shh*-Expression autoregulatorisch von seinem eigenen Produkt beeinflusst wird und außerdem programmierten Zelltod in der PNZ, die teilweise mit der ZPA überlappt, reguliert (Sanz-Ezquerro und Tickle, 2000). Offensichtlich existiert also ein Puffersystem, das die Zahl der *Shh*-exprimierenden Zellen und damit die polarisierende Aktivität in der Gliedmaßenknospe reguliert.

1.4.6 Skelettentwicklung und programmierter Zelltod

In der Vertebratenextremität erfolgt die Knochenbildung durch Ossifikation eines bestehenden Knorpelgerüsts (endochondrale Knochenbildung; Übersicht bei Erlebacher et al., 1995). Dieses Knorpelgerüst entsteht durch einen dreistufigen Prozeß, in dessen Verlauf zunächst mesodermale Zellen aggregieren, woraufhin die Verzweigung dieser Kondensation in Y-förmige Elemente und die axiale Segmentierung zur Generierung von Subelementen erfolgt. Dieser Prozeß läuft in einer P/D-Sequenz ab, wodurch schließlich das finale appendikulare Skelett gebildet wird (Shubin und Alberch, 1986; Oster et al., 1988). Nach der Initiation der Kondensation wird diese durch die erhöhte Expression von Zelloberflächenrezeptoren, Zelladhäsionsmolekülen und Molekülen der extrazellulären Matrix, wie Fibronectin, Tenascin, Syndecan und N-CAM, vom umgebenden Mesenchym abgegrenzt. Darauf folgt die Proliferation, die Rekrutierung benachbarter Mesenchymzellen in die *de novo* Kondensation, das Wachstum und schließlich die terminale Differenzierung zu Knochen (Übersicht bei Hall und Miyake, 2000). Mitglieder der Bmp-Familie sind ausreichend, um ektopische Knochenbildung zu induzieren (Wozney et al., 1988; Übersicht bei Hogan, 1996) und stellen Schlüsselmoleküle sowohl für die Initiation der prächondrogenen Kondensation als auch für die Differenzierung in Chondrozyten dar (Pizette und Niswander, 2000). Die finale Gestalt der Vertebratenextremität wird dann durch programmierten Zelltod geformt. Apoptose tritt in wohldefinierten Bereichen der Gliedmaßenknospe auf, wodurch Zellen zwischen den differenzierenden Knorpel-elementen eliminiert werden (Hurle et al., 1996). Auch für diesen Prozeß wurden Bmps als die

entscheidenden auslösenden Signale identifiziert (Yokouchi et al., 1996; Zou und Niswander, 1996; Pizette und Niswander, 1999). Diese Funktion von Bmp wird offensichtlich durch die Aktivität des Transkriptionsfaktors Msx-2 vermittelt (Marazzi et al., 1997; Ganan et al., 1998). Interessanterweise werden sowohl die Knochen-induzierende, als auch die Apoptose-induzierende Wirkung von Bmps durch denselben Rezeptor, BmpR-Ib, vermittelt (Zou et al., 1997), so daß hierin nicht die Begründung einer spezifischen Bmp-Wirkung liegen kann. Wie diese duale Funktion realisiert wird, ist bis heute nicht verstanden. Offensichtlich entscheidet das sehr komplexe Zusammenspiel verschiedener Mitglieder der Tgf β -Superfamilie, wie Tgf β , Bmp und Gdf, unterschiedlicher Bmp-Antagonisten wie Gremlin und Noggin und die Interaktionen mit Signalmolekülen z.B. der Fgf-Familie darüber, ob eine mesodermale Zelle in der Gliedmaßenknospe mit der Induktion von Apoptose oder der chondrogenen Differenzierung auf ein Bmp-Signal antwortet (Buckland et al., 1996; Ganan et al., 1996; Brunet et al., 1998; Merino et al., 1998, 1999; Macias et al., 1999; Baur et al., 2000).

Auch Mitglieder der Wnt-Familie modulieren die Skelettentwicklung, wie v.a. durch Überexpressionsstudien gezeigt werden konnte. Ektopische Expression sowohl von *Wnt-1*, als auch von *Wnt-7a* führte in verschiedenen Systemen zu einer starken Inhibition der Chondrogenese und distalen Verstümmelungen der Extremitäten, was offensichtlich auf die proliferationsfördernde Wirkung dieser *Wnts* zurückzuführen war (Zakany und Duboule, 1993; Rudnicki und Brown, 1997). In einer neueren Studie wurde für Wnt-4/ β -Catenin-Signale eine Chondrogenese-fördernde Wirkung gezeigt, während die Überexpression von *Wnt-5a* in Hühnergliedmaßenknospen zu verzögerter Chondrogenese und verkürzten Skelettelementen führte (Kawakami et al., 1999; Hartmann und Tabin, 2000). Der Funktionsverlust von *Wnt-5a* allerdings, welches im distalen Mesoderm der sich entwickelnden Extremität exprimiert ist, führt auch zu extremen distalen Verkürzungen, offensichtlich verursacht durch eine verminderte Proliferation der mesodermalen Vorläuferzellen (Yamaguchi et al., 1996). Aufgrund dieser teilweise widersprüchlichen Befunde fehlt somit bis heute auch ein tieferes Verständnis des Beitrags von Mitgliedern der Wnt-Familie zur Regulation der Chondrogenese *versus* Apoptose in den sich entwickelnden Gliedmaßen.

1.4.7 Die *Fused toes* Mausmutante

Die dominante *Fused toes* (*Ft*) Mutation wurde durch eine Transgen-Integration in Chromosom 8 generiert (van der Hoeven et al., 1994), wodurch eine Deletion von ca. 1,6 Mb hervorgerufen wurde. Hierdurch kam es zum Verlust der kodierenden Sequenzen von sechs Genen, worunter sich einer der beiden *Irx*-Komplexe, der *Irx-3*, -5 und -6 beinhaltet (Peters et al., 2000) befand (T. Peters, K. Ausmeier, R. Dildrop und U. Rüter, Manuskript zur

Publikation eingereicht). Heterozygote *Ft/+*-Tiere zeigen eine charakteristische Fusion der Finger 1-4 der Vorderpfoten (Syndaktylie) und Thymus-Hyperplasie (van der Hoeven et al., 1994; Volkmann et al., 1996; Heymer und R ther, 1999). Die Analyse heterozygoter Embryonen ergab, daß die grundsätzliche Musterbildung in den betroffenen Gliedmaßen nicht gestört ist, da keine Veränderungen der Expression relevanter Markergene in der frühen Phase der Extremitätenentwicklung gefunden werden konnten (Heymer und R ther, 1999). Ab E11,5-12,0 konnte aber eine ektopische Aktivierung der *Bmp-2*, *-4* und *-7*-Expression, sowie der *Bmp*-Zielgene *Msx-1* und *-2* im anterior/distalen Teil der Knospe nachgewiesen werden. Hiermit ging außerdem ein Verlust der *Fgf-8*-Expression im distalen Teil der AER einher, so daß postuliert wurde, daß diese deregulierte Balance zwischen *Bmp*- und *Fgf*-Signalen die Basis des Syndaktylie-Phänotyps ist (Heymer und R ther, 1999). Homozygote Embryonen weisen u.a. schwere Gehirnabnormalit ten und Störungen in der Etablierung der links/rechts-Achse auf (Heymer et al., 1997). Auf einem C57Bl/6 oder NMRI genetischen Hintergrund sterben diese *in utero* zwischen E9 und E12, wohingegen einige homozygote Embryonen mit einem C3H-Hintergrund bis E15,5  berleben (K. Ausmeier und U. R ther, unpublizierte Beobachtung).

1.5 Fragestellungen

Heterozygote *Ft*-Mäuse sind durch eine Syndaktylie in den Vordergliedmaßen charakterisiert. Potentielle Fehlentwicklungen der Extremitäten homozygoter Embryonen hingegen sind bisher nicht untersucht worden. Die Analyse der Auswirkungen einer Homozygotie der *Ft*-Mutation auf die Gliedmaßenentwicklung kann durch die Korrelation von morphologischen und molekularen Veränderungen wichtige neue Einblicke in die Funktion von Genen am *Ft*-Lokus erbringen. Von besonderem Interesse sind hierbei sicherlich molekulare Interaktionen des *Ft*-Lokus und des *Bmp*-Signalwegs, da dessen Überfunktion offensichtlich mit der Ausprägung des Gliedmaßenphänotyps der *Ft/+*-Mäuse zusammenhängt (s. 1.4.7). Im Frosch sind regulatorische Interaktionen zwischen einem *Xenopus*-Homolog (*Xiro1*) der durch die *Ft*-Mutation deletierten *Irx*-Gene und den *Bmp*- und *Wnt*-Signalwegen beschrieben worden (Gomez-Skarmeta et al., 2001). Für das Verständnis des *Ft*-Phänotyps stehen also auch solche Gene im Blickpunkt, von denen Wechselwirkungen mit *Bmp*- und *Wnt*-Signalen gezeigt worden sind. Ein solches Gen ist das für einen potenten *Wnt*-Antagonisten kodierende *Dkk-1*, das in *Xenopus* sowohl notwendig als auch ausreichend für die Kopfinduktion ist (s. 1.3.1). In diesem Prozeß wirkt *Dkk-1* synergistisch mit Inhibitoren des *Bmp*-Signalwegs (Glinka et al., 1998). Zu Beginn dieser Arbeit gab es außer diesen Daten aus *Xenopus* keine Erkenntnisse zur Funktion, sowie zur Regulation der Expression von *Dkk-1* in anderen Vertebraten. Daher öffnet sich über die Analyse der *Dkk-1*-Expression während normaler und fehlgesteuerter

Entwicklung der Extremitäten der Maus und des Huhns, sowie die Identifizierung der Moleküle/Signalwege, die die Transkription von *Dkk-1* regulieren und schließlich dessen funktionelle Untersuchung, die Möglichkeit, potentielle Verknüpfungen der Bmp- und Wnt-Signalwege während der Gliedmaßenentwicklung und deren Bedeutung für die Entstehung des *Ft*-Phänotyps zu untersuchen. Schließlich kann die Integration von *Dkk-1* und *Ft* in das molekulare Netzwerk der Gliedmaßenentwicklung zu einem tieferen Verständnis komplexer Signalsysteme während der Embryogenese beitragen.

2. Material und Methoden

Die im Verlauf dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme wurden, soweit nicht anders erwähnt, von den Firmen Applichem GmbH, J.T. Baker, Fluka, New England Biolabs (NEB), Merck, Riedel de Haën, Roche Molecular Biochemicals, Roth und Sigma bezogen. Die erforderlichen Lösungen, Puffersysteme und Spezialchemikalien werden bei den einzelnen Methoden beschrieben. Die Lösungen wurden mit Wasser aus einer hauseigenen Millipore-MilliQ-Anlage angesetzt. Bei Bedarf wurden die Lösungen, Gefäße, Geräte und Verbrauchsmaterialien durch Autoklavieren bei 121°C und 2 bar für 30 min., Filtrieren oder Backen in trockener Hitze bei 180°C für 30 min. sterilisiert.

Die eingesetzten Geräten und Verbrauchsmaterialien, sofern nicht bei den einzelnen Methoden besonders erwähnt, sind die in einem molekularbiologisch arbeitenden Labor im Allgemeinen verwendeten.

2.1 Sequenzspezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Enzyme und Puffersysteme wurden von NEB oder Roche bezogen und entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Pro μg DNA wurden 1-10 U Enzym in 1x Enzympuffer eingesetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Für einige Enzyme galten andere Inkubationstemperaturen, die den Angaben des Herstellers zu entnehmen waren. Danach wurde der Ansatz in der Regel gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.5). Bei der Linearisierung von Plasmiden für die „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung (s. 2.14) wurde ein Aliquot des Reaktionsansatzes auf einem Agarosegel überprüft, der Rest zur Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen mit Phenol/Chloroform extrahiert (s. 2.4).

2.2 Dephosphorylierung von DNA

Nach der Spaltung von Vektoren mit nur einem Restriktionsenzym erfolgte die Dephosphorylierung der entstandenen Enden mit alkalischer Phosphatase (Roche), um die Frequenz der Vektor-Religation zu verringern. Hierzu wurden dem Restriktionsansatz die entsprechende Menge Reaktionspuffer und eine Enzymaktivität von 1 U alkalischer Phosphatase zugesetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurde der Ansatz mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit Ethanol ausgefällt (s. 2.4).

2.3 Umwandlung kohäsiver Enden in glatte Enden

Für einige Klonierungsansätze war es notwendig, die durch eine enzymatische Spaltung erzeugten überhängenden kohäsiven Enden der DNA-Fragmente oder Vektoren in glatte

aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Gele mit einem Anteil von 0,8 - 2 % (w/v) Agarose eingesetzt. Die aufgekochte Agaroselösung wurde mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid versetzt und die zu analysierenden Proben vor Beladung des Gels mit 0,2 Volumen DNA-Auftragspuffer vermischt. Zur Größen- und Mengenabschätzung der aufgetrennten DNA-Fragmente wurden zusätzlich folgende, ebenfalls mit DNA-Auftragspuffer versetzte, Längenstandards eingesetzt:

1kb-DNA-Leiter : 12.216; 11.198; 10.180; 9.162; 8.144; 7.126; 6.108; 5.090; 4.072; 3.054; 2.036; 1.636; 1.018; 506,517; 396; 344; 298; 220; 201; 154; 134; 75 bp (GibcoBRL #15615-024)

λ -HindIII : 23.130; 9.416; 6.557; 4.361; 2.322; 2.027; 564; 125 bp (Stratagene #201109)

Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm bei Raumtemperatur. Die DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht (254 nm) durch die Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar gemacht und mit einer PC-gestützten Videodokumentationsanlage fotografiert.

Lösungen :	TAE	40 mM Tris/Acetat	
		2 mM EDTA	
		pH 8,2	
	Agarose		- Applichem #A1091
	Ethidiumbromid	10 mg/ml	- Applichem #A1152
	Auftragspuffer	50% (v/v) Glycerin	
		2% (w/v) Orange G	- Merck #14277
		in TAE	

2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die zu isolierenden DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell unter UV-Licht so exakt wie möglich ausgeschnitten. Zur Isolierung wurde der „High Pure PCR Purification Kit“ (Roche #1732676) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Qualität und Konzentration der gereinigten DNA wurde durch Agarosegelelektrophorese (s. 2.5) überprüft.

2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Der Vektor und das zu ligierende DNA-Fragment wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Für einen 30 μl -Ansatz wurden 3 μl 10x Ligase-Puffer, 2 μl T4-Ligase (beides GibcoBRL) und 3 μl dATP (10 mM) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 16°C für 12-16 h. Die Hälfte des Ligationsansatzes wurde im Anschluß für die Transformation von kompetenten Bakterien (s. 2.8.2) eingesetzt, der Rest bei 4°C gelagert.

2.8 Transformation von Plasmiden in *Escherichia coli*

2.8.1 Herstellung kompetenter Zellen

Als bakterieller Wirt wurde der *Escherichia coli* Stamm JM109 (*recA1*, *lacZ*ΔM15) verwendet. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde das Protokoll nach Inoue et al. (1990) angewandt. Hierzu wurde von einer Einzelkolonie eine Vorkultur in 20 ml LB-Medium angeimpft, die über Nacht bei 37°C auf einem Plattformschüttler (120 Upm) inkubiert wurde. Diese diente als Inokkulum für eine 250 ml-Hauptkultur in SOB-Medium. Die Kultur wurde bei Raumtemperatur unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀=0,93 inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde dann für 10 min. auf Eis gestellt und 10 min. bei 2.500 x g (Heraeus, Megafuge 1.0R) und 4°C zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde dann in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und erneut wie oben zentrifugiert. Nach erneuter Resuspension in 20 ml eiskaltem TB-Puffer und Zugabe von DMSO zu einer Endkonzentration von 7 % (v/v), wurden die Zellen für 10 min. auf Eis inkubiert. Nach Aliquotierung à 200 µl wurden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Lösungen :	LB-Medium	1% (w/v) NaCl	
		1% (w/v) Trypton	- Applichem #A1553
		0,5% (w/v) Hefe-Extrakt	- Applichem #A1552
		in H ₂ O	
		autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min.	
SOB-Medium		2% (w/v) Trypton	- Applichem # A1553
		0,5% (w/v) Hefe-Extrakt	- Applichem # A1552
		10 mM NaCl	
		2,5 mM KCl	
		10 mM MgCl ₂	
		10 mM MgSO ₄	
		pH 6,7-7	
	autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min.		
TB-Puffer		10 mM PIPES	- Applichem #A1080
		55 mM MnCl ₂	
		15 mM CaCl ₂	
		250 mM KCl	
		pH 6,7	

2.8.2 Transformation

Zur Transformation wurden die bei -80°C gelagerten kompetenten Bakterien zügig aufgetaut und zusammen mit der Plasmid-DNA (20-100 ng) für 15 min. auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (5 min., 37°C) erfolgte eine erneute Inkubation auf Eis für 15 min. Nach Zugabe von 1,5 ml LB-Medium wurden die Zellen dann 30 min. bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend abzentrifugiert (5 min., 5.000 Upm, Eppendorf 5415D). Der

Niederschlag wurde in ungefähr 100 μ l LB-Medium resuspendiert, auf einem antibiotikahaltigen Nährboden ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Bakterienkolonien transformierter Zellklone konnten für das Animpfen von Flüssigkulturen verwendet werden, die primär eine Analyse der Klone ermöglichten und schließlich der Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA dienten.

Lösungen : LB-Medium	1% (w/v) NaCl	
	1% (w/v) Trypton	- Applichem #A1553
	0,5% (w/v) Hefe-Extrakt in H ₂ O	- Applichem #A1552
	autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min.	
Nährböden	1,5% (w/v) Bakto-Agar	- Applichem #A0949
	50 μ g/ml Ampicillin oder	- Applichem #A0839
	25 μ g/ml Kanamycin	- Applichem #A1493
	80 μ g/ml X-Gal	- Applichem #A1007
	0,2 mM IPTG in LB-Medium	- Applichem #A1008

2.9 Präparation von Plasmid-DNA

Die beiden hier beschriebenen Methoden stellen Modifikationen der alkalischen Lyse-Methode von Birnboil und Doly (1979) und Birnboil (1983) dar.

2.9.1 Plasmid-Mini-Präparation

Jeweils 2 ml Selektionsmedium wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und für minimal sechs Stunden oder über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. 1,5 ml der Kulturen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, zentrifugiert (5 min., 5.000 Upm, Eppendorf 5415D) und das Bakteriensediment in 100 μ l kalter Lösung I vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von Lösung II zur alkalischen Lyse wurden die Proben durch Zugabe von 150 μ l kalter Lösung III neutralisiert. Die voluminösen Niederschläge wurden sedimentiert (10 min., 13.200 Upm, Eppendorf 5415D) und die klaren plasmidhaltigen Überstände in neue Gefäße überführt. Die Nukleinsäuren wurden durch Ethanol-Fällung (s. 2.4) präzipitiert und das kurz an der Luft getrocknete Sediment in 25 μ l TE aufgenommen. 5 μ l der resuspendierten DNA wurden für eine restriktionsenzymatische Spaltung (s. 2.1) eingesetzt und die Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.5).

Lösungen : LB-Medium	1% (w/v) NaCl	
	1% (w/v) Trypton	- Applichem #A1553
	0,5% (w/v) Hefe-Extrakt in H ₂ O	- Applichem #A1552
	autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min.	
Selektionsmedium	50 μ g/ml Ampicillin oder	- Applichem #A0839
	25 μ g/ml Kanamycin	- Applichem #A1493
	in LB-Medium	

Material und Methoden

Lösung I	25 mM Tris/HCl 10 mM EDTA 100 mg/ml RNase A pH 8,0
Lösung II	0,2 N NaOH 1% (w/v) SDS
Lösung III	294,5 g Kaliumacetat 110 ml Eisessig ad 1 l H ₂ O pH 5,5
Ethanol abs. 70% Ethanol	
TE	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA pH 8,0

2.9.2 Plasmid-Maxi-Präparation

Um Plasmid-DNA von hoher Reinheit und in größerem Maßstab (100 μg bis zu 1 mg) zu isolieren, wurde der „QIAGEN Plasmid Kit“ („Midi“ bis 100 μg - QIAGEN GmbH #12145, „Maxi“ bis 500 μg - QIAGEN GmbH #12163) verwendet. Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden je nach benötigter Plasmid-Menge 50 oder 100 ml Selektionsmedium mit einem Teil der aufbewahrten Bakteriensuspension der zuvor analysierten Plasmid-Mini-Präparation angeimpft. Nach erfolgter Inkubation auf einem Plattformschüttler (120 Upm) über Nacht bei 37°C wurde entsprechend den Angaben des Herstellers verfahren. Die an der Luft vollständig getrocknete Plasmid-DNA wurde in einem angemessenen Volumen TE oder H₂O aufgenommen und die gelöste DNA wurde spektralphotometrisch quantifiziert (s. 2.11) und durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen (s. 2.1) analysiert.

Lösungen :

LB-Medium	1% (w/v) NaCl 1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt in H ₂ O autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min.		
Selektionsmedium	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin oder 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin in LB-Medium		- Applichem #A0839 - Applichem #A1493
70% Ethanol			
TE	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA pH 8,0		

2.10 Isolierung von DNA aus eukaryontischen Zellen und Geweben

2.10.1 DNA-Isolierung aus extraembryonalen Membranen

Extraembryonale Membranen isolierter Embryonen wurden mit 700 μ l Lyse-Puffer und 50 μ l Proteinase K versetzt und über Nacht bei 56°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Zur Fällung der Proteine wurden 250 μ l gesättigte Kochsalzlösung zugegeben, kurz geschüttelt und 10 min. bei 13.200 Upm (Eppendorf 5415D) zentrifugiert. Anschließend wurden 750 μ l des Überstands vorsichtig abgenommen und mit 500 μ l Isopropanol zur DNA-Präzipitation vermischt. Nach kurzem Schütteln wurden die Proben zwei Minuten bei 13.200 Upm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, der Niederschlag mit 500 μ l 70% Ethanol gewaschen und nach Lufttrocknung in 50 μ l H₂O resuspendiert. Die erhaltene genomische DNA konnte direkt für die folgenden Analysen eingesetzt werden.

Lösungen :	Lyse-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 8 100 mM EDTA, pH 8 100 mM NaCl 1% (w/v) SDS	
	Proteinase K	10 mg/ml	- Roche #1000144
	gesättigte Kochsalzlösung		
	Isopropanol		
	70% Ethanol		

2.10.2 DNA-Isolierung aus kultivierten Zellen

Hierzu wurde zunächst das Medium von den Zellkulturschalen abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Auf eine 10 cm Kulturschale wurden dann 10 ml Lysis-Puffer gegeben, worauf eine zweistündige Inkubation bei 37°C erfolgte. Die entstandene zähflüssige Suspension wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit dem doppelten Volumen eiskalter NaCl/Ethanol-Lösung versetzt. Nach Durchmischung und Zentrifugation (Heraeus Megafuge 1.0R) wurde der Niederschlag mit 70% Ethanol gewaschen und das luftgetrocknete DNA-Sediment in einem angemessenen Volumen H₂O aufgenommen.

Lösungen :	PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3 autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min.	
	Lysis-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8 10 mM EDTA, pH 8 10 mM NaCl 0,5% (w/v) Sarcosyl Proteinase K (1 mg/ml) RNase A (100 μ g/ml)	- Fluka #61743 - Roche #1000144 - Roche #109142
	NaCl/Ethanol	10 ml Ethanol abs. + 150 μ l 5 M NaCl	

2.10.3 RNA-Isolierung aus Embryonen und kultivierten Zellen

Frisches oder nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagertes Material wurde gewogen und mit 1 ml TRIZOL-Reagenz pro 100 mg Gewebe versetzt. Die Proben wurden im Polytron (Stufe 4, Kinematica AG, Luzern) homogenisiert und entsprechend den Angaben des Herstellers weiter verarbeitet. Bei kultivierten Zellen wurde 1 ml TRIZOL-Reagenz pro 10 cm² der Kulturschalen verwendet und die Zellen durch mehrmaliges Pipettieren lysiert. Nach Präzipitation der RNA erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 37°C mit DNase I (Roche #1284932) zur Eliminierung von potentiellen DNA-Kontaminationen. Danach folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung (s. 2.4). Das RNA-Sediment wurde dann nach Lufttrocknung in einem angemessenen Volumen DEPC-H₂O aufgenommen und bei -80°C gelagert.

Lösungen : TRIZOL Reagenz - GibcoBRL #15596
Chloroform
Phenol/Chloroform 3:1, H₂O-gesättigt
Isopropanol
70% Ethanol
Ethanol (abs.)
DEPC-H₂O H₂O
+0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonate (DEPC) - Sigma #D5758
über Nacht inkubiert; autoklaviert; 121°C , 2 bar, 30 min.

2.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Der gemessene Absorptionswert von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm einer Nukleinsäurelösung gegen das entsprechende Lösungsmittel entspricht ungefähr einer Konzentration von :

$$\begin{array}{lcl} \text{dsDNA} & = & 50 \mu\text{g/ml} \\ \text{RNA} & = & 25 \mu\text{g/ml} \end{array}$$

Die Messungen wurden in einem Spektralphotometer (Pharmacia; Ultrospec2000) mit verdünnten Nukleinsäurelösungen (1:100 bis 1:500 (v/v)) in Quarzglasküvetten unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Der Grad der Verunreinigung der Nukleinsäurepräparationen konnte durch Bestimmung des Quotienten der bei 260 nm und 280 nm gemessenen Absorptionskoeffizienten bestimmt werden. Gering verunreinigte Proben sollten hierbei Werte von 1,8 bis 2,0 ergeben.

2.12 Polymerase-Ketten-Reaktion

2.12.1 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'-> 3')
<i>3' F4</i>	GGGTGAACAGCATCAAAATGGAG
<i>3' B1</i>	TATCGGTACAACCACCACGGGTAC
<i>Bambi-EST-F2</i>	GCCCACTTTGGAATGCTGTCAC
<i>Bambi-EST-B2</i>	CTTGCCCCTTCTTGGAATGG
<i>ccJ-ORF-F1</i>	CTATGAGTGCAAAGATGGAGCCTAC
<i>ccJ-ORF-B1</i>	GCAACCTGTTCTCTGAGCATGTTG
<i>Cdx-1-F1</i>	ACAAGATTGAGGCTTCAGCGTC
<i>Cdx-1-B2</i>	GACTCATAGTGCCTTCTCTCCATCC
<i>CycG-Full-F1</i>	CTGCGGCTTGAAACTAATTGAGTC
<i>CycG-Full-B1</i>	TGTTGTTCTGCATGGGCTTATG
<i>Ft</i>	GTCCTTTCTCCATGGGTATG
<i>Gdf-5-F1</i>	AATCCACACCACCCACTTGTTG
<i>Gdf-5-B2</i>	GCTCATACTCTTCTCTCACCCCTG
<i>Hprt-5'</i>	CACAGGACTAGAACACCTGC
<i>Hprt-3'</i>	GCTGGTGAAAAGGACCTCT
<i>mcJ-3'UTR-F1</i>	GTAGTGCTCCTTAACACAAAGCAGG
<i>mcJ-3'UTR-B1</i>	AAGAAACACCACACCATCTTCTGG
<i>mcJ-Full-F1</i>	CCGTTCTATGACTGCAAAGATGG
<i>mcJ-Full-B1</i>	CTGTCGCAACCAGTCAAGTTCTC
<i>mdkk-1-F1</i>	GGGATCCCGTCCCTTCGGAGATGATGGTTG
<i>mdkk-1-B2</i>	GCTCTAGAGCTGCCACACTGAGGATTTACAACAC
<i>Oligo(dT)</i>	TTTTTTTTTTTTTTTTT
<i>p53-Nat.-4B</i>	GGGACAGCCAAGTCTGTTATGTGC
<i>p53-Nat.-10</i>	CTCCCGGAACATCTCGAAGC
<i>Wt</i>	GTGGAACCCCTTCTGTACATG
<i>Wt/Ft</i>	CTGAAAGGTTGTAAGTACTGAGCC
<i>Xdkk-F1</i>	TCTCATCCTGCCATTGTGGTTAC
<i>Xdkk-B2</i>	TGGCAAGTGTGAAGTCTCGATG

2.12.2 PCR-Amplifikation

PCR-Reaktionen wurden in Eppendorf- (Mastercycle Gradient) oder MWG- (Primus 25) Maschinen unter Verwendung von dünnwandigen 0,2 ml-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Alle Reaktionen wurden auf Eis angesetzt und als Enzym wurde die *Taq*-Polymerase und das zugehörige Puffersystem von Roche (#1146165) eingesetzt. Der 20 µl-Standardansatz enthielt 0,2 µl *Taq*-Polymerase (2U), 2 µl 10x Reaktionspuffer, 25 pmol dNTP-Gemisch und jeweils 20 pmol der spezifischen Oligonukleotide. Standardmäßig wurden folgende Reaktionsbedingungen für die Amplifikation der DNA-Fragmente gewählt :

1x	25-35x	1x
2 min., 94°C		
	10 sec., 94°C	
	30 sec., 56°-60°C	
	30 sec., 72°C	
		7 min., 72°C

Anschließend wurden die PCR-Reaktionen bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung (s. 2.5) bei 4°C gelagert.

Lösungen :	dNTP-Gemisch	10 mM dATP	- Roche #1969064
		10 mM dCTP	
		10 mM dGTP	
		10 mM dTTP	
	Oligonukleotide	100 pmol/μl in H ₂ O	- MWG-Biotech
	H ₂ O	autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min.	

2.12.3 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurde das „Expand Reverse Transcriptase“-System (Roche #1785834) verwendet. Es wurden 100 ng - 2 μg Gesamt-RNA und 25 pmol *Oligo(dT)*-Oligonukleotide eingesetzt und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Alle Inkubationsschritte wurden in PCR-Maschinen durchgeführt und die Reaktionen anschließend bei 4°C gelagert. Für die anschließende PCR-Amplifikation (s. 2.12.2) wurden 2 μl des 20 μl-Ansatzes verwendet.

2.13 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von klonierten DNA-Fragmenten erfolgte als Auftragssequenzierung. Diese wurden mit spezifischen oder Standard-Oligonukleotiden an der Heinrich-Heine-Universität im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) mittels „ABI Prism“-Sequenzierautomat oder von der Firma AGOWA GmbH, Berlin durchgeführt. Die zu sequenzierende DNA aus Plasmid-Maxi-Präparationen (s. 2.9.2) wurde hierzu in H₂O aufgenommen.

2.14 „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung

Die im folgenden beschriebene Methode ermöglicht es, Transkripte im gesamten Embryo („Whole mount“) durch Hybridisierung mit einer markierten komplementären RNA-Sonde nachzuweisen. Die markierte Sonde kann mittels spezifischer enzymgekoppelter Antikörper nach Umsetzung eines Farbsubstrates detektiert werden.

Probe	Linearisierung für komplementäre RNA	RNA-Polymerase für komplementäre RNA	Quelle
<i>Bmp-4</i>	<i>EcoRI</i>	sp6	Dr. B.L.M. Hogan
<i>cBmp-4</i>	<i>SmaI</i>	T7	Dr. J.C. Izpisua Belmonte
<i>cc-Jun</i>	<i>SacII</i>	sp6	vorliegende Arbeit
<i>cDkk-1</i>	<i>SalI</i>	T3	Dr. J.C. Izpisua Belmonte
<i>c-Jun</i>	<i>SpeI</i>	T7	vorliegende Arbeit
<i>cLef-1</i>	<i>SalI</i>	T3	Dr. J.C. Izpisua Belmonte
<i>dHAND</i>	<i>EcoRI</i>	T7	Dr. E.N. Olson
<i>Dkk-1</i>	<i>SalI</i>	T7	Dr. C. Niehrs
<i>Fgf-4</i>	<i>SacI</i>	T3	Dr. G. Martin
<i>Fgf-8</i>	<i>PstI</i>	T7	Dr. G. Martin
<i>Fgf-10</i>	<i>NcoI</i>	sp6	Dr. J. Heymer
<i>gag</i>	<i>SalI</i>	T3	Dr. J.C. Izpisua Belmonte
<i>Gdf-5</i>	<i>SpeI</i>	T7	vorliegende Arbeit
<i>Gremlin</i>	<i>PstI</i>	T3	Dr. R. Zeller
<i>HoxD-11</i>	<i>HindIII</i>	T7	Dr. D. Duboule
<i>HoxD-12</i>	<i>BamHI</i>	T7	Dr. D. Duboule
<i>HoxD-13</i>	<i>PvuII</i>	T7	Dr. D. Duboule
<i>Irx-1</i>	<i>XbaI</i>	T3	Dr. P. Gruss
<i>Lmx-1b</i>	<i>HindIII</i>	T3	Dr. R.L. Johnson
<i>Msx-1</i>	<i>BglII</i>	sp6	Dr. B. Robert
<i>Msx-2</i>	<i>HindIII</i>	T7	Dr. B. Robert
<i>Noggin</i>	<i>NotI</i>	T7	Dr. R.M. Harland
<i>p53</i>	<i>SpeI</i>	T7	vorliegende Arbeit
<i>Pax-9</i>	<i>EcoRI</i>	T7	Dr. R. Balling
<i>Ptc-1</i>	<i>NcoI</i>	sp6	Dr. D. Büscher
<i>Sek-1 (Eph-A4)</i>	<i>HindIII</i>	T3	Dr. D.G. Wilkinson
<i>Shh</i>	<i>HindIII</i>	T3	Dr. A.P. McMahon
<i>Sox-9</i>	<i>EcoRV</i>	T3	Dr. R. Lovell-Badge
<i>Tbx-2</i>	<i>EcoRV</i>	T7	Dr. V.E. Papaioannou
<i>Wnt-5a</i>	<i>SmaI</i>	sp6	Dr. B. Gavin

2.14.1 Synthese der komplementären RNA-Sonde

In einem 20 μ l-Ansatz wurde ca. 1 μ g des linearisierten Plasmids mit 2 μ l 10x Transkriptionspuffer (Roche #1465384), 2 μ l 10x DIG-Nukleotidmix (Roche #1277073), 1 μ l RNase Inhibitor (40 U), 2 μ l RNA-Polymerase (T3 - Roche #1031163; T7 – Roche #881767; sp6 – Roche #810274) und DEPC-H₂O vermischt und 2-4 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden zur Fällung der *in vitro* transkribierten RNA 2 μ l EDTA, 2,5 μ l LiCl und 75 μ l

Ethanol (abs.) hinzugegeben und nach Durchmischung für 30 min. bei -20°C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (10 min., 13.000 Upm, 4°C , Heraeus Biofuge 13) wurde der Niederschlag zweimal mit Ethanol (70%) gewaschen und nach kurzer Lufttrocknung in $60\ \mu\text{l}$ 50% Formamid aufgenommen. Ein Aliquot der Probe wurde gelelektrophoretisch (s. 2.5) überprüft und der Rest bei -20°C gelagert.

Lösungen :

DEPC-H ₂ O	H ₂ O	
	+0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonate (DEPC)	- Sigma #D5758
	über Nacht inkubiert; autoklaviert; 121°C , 2 bar, 30 min.	
EDTA	0,5 M, pH 8,0	
LiCl	4 M	
Ethanol abs		
70% Ethanol		
50% Formamid	50% (v/v) Formamid	
	50% (v/v) DEPC-H ₂ O	

2.14.2 Vorbehandlung und Hybridisierung

Das im Folgenden beschriebene Protokoll wurde sowohl auf Maus- wie auch auf Hühnerembryonen angewandt. Die Embryonen wurden soweit wie möglich von den extra-embryonalen Membranen befreit und in kaltem PBS gewaschen. Nach Fixierung über Nacht bei 4°C in Paraformaldehyd (PFA), wurden sie für jeweils 15 min. zweimal in PBT, je einmal in 25% Methanol, 50% Methanol, 75% Methanol und zweimal in Methanol inkubiert. Danach wurden die Embryonen in der Regel bei -20°C gelagert, konnten aber auch direkt für die nächsten Schritte der „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung eingesetzt werden. Hierzu wurden die Embryonen zunächst durch Inkubation in 75%, 50%, 25% Methanol und zweimaliges Waschen in PBT für jeweils 10 min. rehydriert. Danach wurden die Embryonen bei Bedarf in H₂O₂ gebleicht und in PBT gewaschen, gefolgt von einer, vom Alter der Embryonen abhängigen, Proteinase K-Behandlung. Im Anschluß hieran erfolgte die Inaktivierung der Proteinase K durch 5-minütige Inkubation in Glycin. Nach dem darauf folgenden Waschschrift in PBT (5 min.) wurden die Embryonen auf Eis in PFA/Glutaraldehyd für 20 min. postfixiert. Nach kurzem Waschen in PBT erfolgte die Prähybridisierung in Hybridisierungsmix für 2 h bei 65°C . Anschließend wurde die Lösung durch Hybridisierungsmix mit der spezifischen RNA-Sonde ($1\ \mu\text{g/ml}$) ersetzt und über Nacht bei 65°C inkubiert.

Lösungen :

PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O
	16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O
	150 mM NaCl
	pH 7,3
Paraformaldehyd	4% (w/v) in PBS
PBT	PBS
	+ 1% (v/v) Tween-20

Material und Methoden

25% Methanol	25% (v/v) Methanol in PBT	
50% Methanol	50% (v/v) Methanol in PBT	
75% Methanol	75% (v/v) Methanol in PBT	
H ₂ O ₂	6% (v/v) H ₂ O ₂ in PBT	
Proteinase K	5-10 µg/ml in PBT	
Glycin	2 mg/ml in PBT	
PFA/Glutaraldehyd	4% (w/v) PFA 0,1% (v/v) Glutaraldehyd	
Hybridisierungsmix	50% Formamid 5x SSC, pH 4,5 0,1% (v/v) Triton X-100 50 µg/ml Heparin 0,5 mg/ml tRNA 5 mM EDTA, pH 8,0 in DEPC-H ₂ O	- Sigma #H9399 - Roche #109525

2.14.3 Entfernung unspezifisch gebundener Sonde und Antikörperinkubation

Nach der Hybridisierung wurden die Embryonen mit vorgewärmten Lösungen zweimal für 30 min. mit Hybridisierungsmix, zweimal 30 min. mit Lösung I, einmal 20 min. mit Lösung I/MABT bei 65°C und schließlich zweimal für 10 min. mit MABT bei Raumtemperatur gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindestellen wurden die Embryonen 3-4 h in Blocklösung bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Blocklösung durch den alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-DIG Antikörper (Roche #1093274, 1:1000-Verdünnung in Blocklösung) ersetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Lösungen : Hybridisierungsmix

mix	50% Formamid 5x SSC, pH 4,5 0,1% (v/v) Triton X-100 50 µg/ml Heparin 0,5 mg/ml tRNA 5 mM EDTA, pH 8,0 in DEPC-H ₂ O	
Lösung I	50% Formamid 1x SSC, pH 4,5 0,1% (v/v) Triton X-100 in DEPC-H ₂ O	
Lösung I/MABT	50% (v/v) Lösung I 50% (v/v) MABT	

Material und Methoden

MABT	100 mM Maleinsäure, pH 7,5 150 mM NaCl 0,1% (v/v) Triton X-100	
Blocklösung	2% (w/v) Blockierreagenz 20% Schafserum –hitzeinaktiviert- in MABT	- Roche #1096176 - Sigma #S2263

2.14.4 Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper und Histochemie

Die Embryonen wurden 6-8x für je 1 h bei Raumtemperatur und schließlich über Nacht bei 4°C in MABT inkubiert. Danach folgte zweimaliges Waschen mit NTMT für jeweils 30 min. und schließlich die Inkubation in Färbelösung im Dunkeln bei Raumtemperatur. Nach Abschluß der Farbreaktion wurden die Embryonen mehrmals in PBT gewaschen, in Paraformaldehyd fixiert und bei 4°C gelagert.

Lösungen :

MABT	100 mM Maleinsäure, pH 7,5 150 mM NaCl 0,1% (v/v) Triton X-100	
NTMT	100 mM NaCl 100 mM Tris/HCl, pH 9,5 50 mM MgCl ₂ 0,5% (v/v) Tween-20 0,2 mg/ml Levamisol	- Sigma #L9756
Färbelösung	2% (v/v) NBT/BCIP in NTMT	- Roche #1681451
PBT	PBS + 1% (v/v) Tween 20	
Paraformaldehyd	4% (w/v) in PBS	

2.15 Zwei Farben-, „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung

Die Vorbehandlung der Embryonen für die Doppelfärbung war identisch mit der unter 2.14.2 für Einfachfärbungen beschriebenen. Für die Hybridisierung wurden dann zwei RNA-Sonden, eine DIG-markierte und eine FLU-markierte, verwendet. Nach Wasch- und Blockschritten (s. 2.14.3) erfolgte die Entwicklung des ersten Signals mit einem alkalische Phosphatasegekoppelten anti-FLU-Antikörper (Roche #1426338) in 3,5 µl/ml BCIP (Roche #1383221) in NTMT. Nach Waschen mit PBS wurden die Embryonen 1 h in Paraformaldehyd postfixiert und nach erneutem Waschen mit PBS 1 h bei 65°C zur Inaktivierung des ersten Antikörpers inkubiert. Nach Blockierung (s. 2.14.3) wurde der anti-DIG-Antikörper zugegeben und die zweite Farbentwicklung mit NBT/BCIP in NTMT durchgeführt (s. 2.14.4).

2.16 Knochen-Knorpel-Färbung

Zur differentiellen Anfärbung der Knochen und des Knorpels in Mausembryonen wurden diese nach der Präparation für mindestens 24 h in 80% Ethanol fixiert, worauf die Dehydrierung in 96% Ethanol für 24 h und anschließend in Aceton für 1-3 Tage erfolgte. Die Färbung erfolgte für 6 h bei 37°C unter leichtem Schütteln in Färbelösung. Darauf folgte die Inkubation in 96% Ethanol für eine Stunde und anschließend in 1% KOH bis die blaugefärbten knorpeligen und die rotgefärbten verknöcherten Skelettstrukturen vollständig sichtbar waren. Hieran schloß sich eine aufsteigende Glycerin-Reihe (20%, 50% und 80% für jeweils 1-2 Tage) und die Lagerung in 100% Glycerin an.

Lösungen :

saurer Alkohol	Ethanol abs. + 1% (v/v) Essigsäure konz.	
Alizarin Red S	0,1% (w/v) Alizarin Red S in 95% Ethanol	- Sigma #A5533
Alcian Blue 8GX	0,3% (w/v) Alcian Blue in 95% Ethanol	- Sigma #A5268
Färbelösung	98 ml saurer Alkohol + 1 ml 0,1% (w/v) Alizarin Red S + 1 ml 0,3% (w/v) Alcian Blue	
Glycerin-Reihe	20%, 50%, 80% (v/v) Glycerin in 1% KOH	

Zur Knorpelfärbung in 9-11 Tage alten Hühnerembryonen wurden diese über Nacht in Trichloressigsäure fixiert, woran sich die Färbung mit Alcian Green ebenfalls über Nacht anschloß. Es folgten Inkubationen in 70% Ethanol und Ethanol (abs.) jeweils über Nacht. Die Skelettstrukturen wurden dann durch Inkubation der Embryonen in Salicylsäure-methylester sichtbar gemacht. Hierin wurden die Präparate auch gelagert.

Lösungen :

Trichloressigsäure	5% (v/v) in H ₂ O	- Roth #3744.1
Alcian Green 2GX	0,1% (w/v) Alcian Green in 1%HCl/70% Ethanol	- Sigma #A-1182
Salicylsäure-methylester		- Fluka #84330

2.17 Histologische Techniken

2.17.1 Paraffindünnschnitte

Es wurden in der Regel 14 µm dünne Gewebeschnitte von ganzen Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien nach Fixierung in Paraformaldehyd hergestellt. Hierzu wurden die Präparate zunächst durch Inkubation im 50-fachen Volumen von 70%, 80%, 90%, 96% und 100% Ethanol für jeweils 2 h unter leichtem Schütteln entwässert. Danach wurden sie in 1-Butanol überführt, worin sie über Nacht inkubiert wurden. Anschließend erfolgte eine mindestens vierstündige Inkubation in flüssigem Paraplast (Sherwood Medical Co. #8889-502005), abschließend für 2 h unter Vakuum. Nach Ausrichtung, Einbettung und Aushärtung der Präparate über Nacht wurden die Dünnschnitte an einem Mikrotom (Leica RM 2035) hergestellt. Nach Streckung der Schnitte im Wasserbad (45°C, GFL 1052) wurden diese auf Objektträger gezogen, für 30-60 min. bei 45°C (Streckbank, OMNILAB Jürgens) inkubiert,

über Nacht bei 37°C vollständig getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

2.17.2 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Zur Hämatoxylin/Eosin-Übersichtsfärbung wurden die zu färbenden Paraffindünnschnitte in Glasgondeln gestellt und durchliefen folgende Inkubationsschritte :

Xylol	3x 7 min.
Xylol/Ethanol	2 min.
Ethanol abs.	2x 2 min.
96% Ethanol	1 min.
90% Ethanol	1 min.
70% Ethanol	1 min.
50% Ethanol	1 min.
H ₂ O bidest.	2 min.
Hämalaun	1,5 min.
H ₂ O	10 min.
H ₂ O bidest.	10 sec.
Eosin	30 sec.
H ₂ O bidest.	10 sec.
50% Ethanol	10 sec.
70% Ethanol	10 sec.
90% Ethanol	10 sec.
96% Ethanol	10 sec.
Ethanol abs.	2x 10 sec.
Xylol/Ethanol	1 min.
Xylol	3x 5 min.

Zum Eindeckeln wurden die einzelnen Objektträger aus dem Xylol genommen, mit Entellan-Eindeckelmedium versehen und mit einem zuvor in Xylol geschwenkten Deckgläschen bedeckt. Zum Trocknen wurden sie dann auf einen ebenen Untergrund gelegt. Nach der Hämatoxylin/Eosin-Färbung erschienen die basophilen Zell- und Gewebeanteile der Präparate blau-violett und die azidophilen Bestandteile rosa-rot.

Lösungen :

Xylol/Ethanol	50% (v/v) Ethanol abs.	
	50% (v/v) Xylol	
Hämalaun	MAYER, Mayers Hämalaun Lösung (1:4)	- Merck #1.09249.2500
Eosin	96% (v/v) Ethanol	
	2% (w/v) Eosin G	- Merck #1.15935.0100
	1% (v/v) Essigsäure	
	nach dem Lösen filtriert	

2.17.3 Vibratomschnitte

Es wurden in der Regel 50-100 μm dicke Gewebeschnitte von ganzen Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien nach „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung (s. 2.14) hergestellt. Hierzu wurden die gefärbten Präparate zunächst in Agarose ausgerichtet, eingebettet und nach Aushärtung wurden die Schnitte unter PBS an einem Vibratom (Leica VT1000S) hergestellt. Die Schnitte wurden auf Objektträger gezogen und sofort fotografiert.

Lösungen : Agarose 3% (w/v) in H_2O - Applichem #A1152
 PBS 4 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
 16 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 150 mM NaCl
 pH 7,3
 autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min.

2.18 Nachweis des programmierten Zelltods (Apoptose)

Die Fragmentierung der genomischen DNA als eines der charakteristischen Merkmale der Apoptose bildet die Grundlage für den hier eingesetzten Nachweis des programmierten Zelltods. Bei der TUNEL-Methode (Gavrieli et al., 1992) werden chemisch modifizierte Nukleotide durch das Enzym Terminale Transferase (TdT) auf die freien 3'-OH-Gruppen der DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche übertragen, die während des programmierten Zelltods vermehrt entstehen. Diese Nukleotide können anschließend mittels spezifischer enzymgekoppelter Antikörper nach Umsetzung eines Farbsubstrates detektiert werden und ermöglichen die Identifikation der apoptotischen Zellen.

2.18.1 Apoptose-Detektion auf Paraffindünnschnitten

In der vorliegenden Arbeit wurde der „APOPDTECT™ Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit“ (Q-BIOgene #APOD7401) eingesetzt. Die Paraffindünnschnitte wurden hierzu folgendermaßen behandelt :

Xylol	3x 7 min.
Xylol/Ethanol	2 min.
Ethanol abs.	2x 2 min.
96% Ethanol	1 min.
90% Ethanol	1 min.
70% Ethanol	1 min.
50% Ethanol	1 min.
PBS	5 min.

Danach wurde weiter nach den Angaben des Herstellers verfahren und nach der Farbentwicklung im Peroxidase-Substrat und der Gegenfärbung mit Methylgrün durchliefen die Schnitte folgende Inkubationsschritte :

50% Ethanol	10 sec.
70% Ethanol	10 sec.
90% Ethanol	10 sec.
96% Ethanol	10 sec.
Ethanol abs.	2x 10 sec.
Xylol/Ethanol	1 min.
Xylol	3x 5 min.

Abschließend wurden die einzelnen Objektträger aus dem Xylol genommen, mit Entellan-Eindeckelmedium betropft und mit einem zuvor in Xylol geschwenkten Deckgläschen bedeckt. Zum Trocknen wurden sie auf einen ebenen Untergrund gelegt.

Lösungen :	PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3 autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min.	
	Methylgrün	0,5% (w/v) in 0,1 M Natriumacetat, pH 4,0	- Sigma #M5015
	Xylol/Ethanol	50% (v/v) Ethanol abs. 50% (v/v) Xylol	
	Entellan		- Merck #1.07961.0500

2.18.2 Apoptose-Detektion im Gesamtorganismus

2.18.2.1 „Whole mount“ TUNEL

Die im folgenden beschriebene Methode ermöglicht es, apoptotische Zellen im gesamten Embryo bzw. in einzelnen Organsystemen („Whole mount“) nachzuweisen. Das eingesetzte Protokoll wurde modifiziert nach Conlon und Rossant (1992) und Conlon et al. (1995). Nach der Präparation wurden die Embryonen über Nacht bei 4°C in Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden sie für jeweils 10 min. zweimal in PBT, zweimal in 50% Methanol und zweimal in Methanol inkubiert. Zur Detektion der apoptotischen Zellen im Embryo wurden diese zunächst in Methanol/H₂O₂ für 2-4 h gebleicht und in 75%, 50%, 25% Methanol (jeweils 10 min.) rehydriert. Anschließend wurden die Embryonen mehrmals in PBT gewaschen, für 3 min. mit Proteinase K behandelt und diese durch zweimalige Inkubation in PBT inaktiviert. Danach erfolgte die Postfixierung in PFA/Glutaraldehyd für 20 min. bei Raumtemperatur und die Zugabe von Natriumborohydrid. Nach dreimaligem Waschen in PBT (jeweils 20 min.) wurden die Embryonen in Äquilibriumspuffer („APODETECT Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit“, Q-BIOgene #APOD7401) überführt und

schließlich für 2 h bei 37°C in Reaktionspuffer mit dem TdT Enzym (beides „APODETECT Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit“, Q-BIOgene #APOD7401) unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Hiernach wurde 3-5x mit PBT gewaschen und während des letzten Waschschriffs für 20 min. auf 70°C erhitzt. Die Embryonen wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blocklösung inkubiert; parallel erfolgte die Präabsorption des Antikörpers mit Embryo-Pulver. Schließlich wurden die Embryonen in einer 1:5000-Verdünnung des präabsorbierten alkalische Phosphatase-gekoppelten Anti-DIG-Antikörpers (Roche #1093274) in Blocklösung über Nacht inkubiert. Danach wurden sie dreimal für jeweils 10 min. und 6-8x für je 1 h bei Raumtemperatur und schließlich über Nacht bei 4°C in PBT/Levamisol gewaschen. Schließlich wurden die Embryonen nach zweimaligem Waschen in NTMT in Färbelösung im Dunkeln gefärbt. Nach Abschluß der Farbreaktion wurden die Embryonen mehrmals in PBT gewaschen, in Paraformaldehyd fixiert und bei 4°C gelagert.

Lösungen :	Paraformaldehyd	4% (w/v) in PBS	
	PBT	PBS + 1% (v/v) Tween-20	
	25% Methanol	25% (v/v) Methanol in PBT	
	50% Methanol	50% (v/v) Methanol in PBT	
	75% Methanol	75% (v/v) Methanol in PBT	
	Methanol/H ₂ O ₂	Methanol : 30% H ₂ O ₂ 5:1	
	Proteinase K	5 µg/ml in PBT	
	Natriumborohydrid	0,1% (w/v)	- Fluka #71320
	PFA/Glutaraldehyd	4% (w/v) PFA 0,1% (v/v) Glutaraldehyd	
	Blocklösung	0,5% (w/v) Blockierreagenz 2 mM Levamisol in PBT	- Roche #1096176 - Sigma #L9756
	PBT/Levamisol	2 mM Levamisol in PBT	- Sigma #L9756
	NTMT	100 mM NaCl 100 mM Tris/HCl, pH 9,5 50 mM MgCl ₂ 0,5% (v/v) Tween-20	
	Färbelösung	0,2 mg/ml Levamisol 2% (v/v) NBT/BCIP in NTMT	- Sigma #L9756 - Roche #1681451

	pH 7,3 autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min.	
Trypsin/EDTA		- GibcoBRL #45300-027

Embryonale Stammzellen :

Die Passage der embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) erfolgte nicht unter dem Gesichtspunkt der Konfluenz, sondern der Erhaltung eines undifferenzierten Zustands. Als Hauptkriterium diente hierbei die Morphologie der einzelnen Kolonien einer Kultur. Diese durften nicht zu dicht wachsen, nicht zu groß werden und sie durften nicht ihre charakteristische Morphologie verlieren, so daß eine Passage in der Regel jeden zweiten Tag erforderlich war. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen vorsichtig mit PBS gespült und wie bereits beschrieben trypsinisiert. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in frischem ES-Medium gründlich resuspendiert, um die Zellaggregate vollständig aufzulösen. Die Zellen wurden in neue Kulturgefäße ausgesät, in denen zuvor Mitomycin C-behandelte Nährzellen in der erforderlichen Dichte ausgesät und kultiviert worden waren (s. 2.19.4.1). Die ES-Zellen mußten in der Regel 1:5 oder 1:10 verdünnt werden, wenn sie in Kulturgefäße derselben Größe umgesetzt wurden. Bei Größenzunahme des Kulturgefäßes wurde die Zellsuspension vollständig oder 1:2 verdünnt auf die Nährzellen gegeben.

Lösungen :	PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3 autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min.	
	Trypsin/EDTA		- GibcoBRL #45300-027
	ES-Medium	500 ml DMEM + 5 ml Penicillin/Streptomycin (10 ³ U/ml) + 5 ml L-Glutamin (200 mM) + 600 µl β-Mercaptoethanol (100 mM) + 75 ml Fötale Kälberserum (FCS) (Hitze-inaktiviert 30 min., 56°C)	- GibcoBRL #41965-039 - GibcoBRL #14140-114 - GibcoBRL #15140-114 - Sigma #M7522 - Biochrom KG #S0115 Charge 244S

2.19.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie bereits beschrieben trypsinisiert und in Medium resuspendiert. Die erhaltene Suspension wurde in Falcon-Röhrchen abzentrifugiert (7 min., 800 Upm, Heraeus Megafuge 1.0), das überstehende Medium abgesaugt, die Zellen zügig in 1 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryo-Röhrchen (Nunc #375353) überführt. Anschließend wurden die Zellen bei -80°C eingefroren und bis zu sechs Monate hier gelagert. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen nach 1-3 Tagen in flüssigen Stickstoff transferiert.

Das Auftauen der zuvor bei -80°C oder unter Stickstoff gelagerten Zellen erfolgte möglichst zügig, indem die Gefäße bei 37°C inkubiert wurden bis die Suspension vollständig aufgetaut war. Die Zellsuspension wurde tropfenweise in 9 ml kaltes Medium überführt, die Zellen wie zuvor abzentrifugiert, erneut in einem angemessenen Volumen des entsprechenden Mediums aufgenommen und ausgesät. Hierbei war zu beachten, daß die Zellen stets auf Kulturgefäße der Ausgangsgröße oder kleiner ausgebracht wurden.

Lösungen :	Einfriermedium	45 % (v/v) Kulturmedium	
		45 % (v/v) Fötale Kälberserum (FCS)	- Biochrom KG #S0115
		(Hitze-inaktiviert 30 min., 56°C)	Charge 244S
		10 % (v/v) DMSO	- Merck #1.02950.0500

2.19.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl einer Suspension erfolgte durch Auszählen der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurden die Zellen gründlich resuspendiert und ihre Anzahl innerhalb der 8 Großquadrate der Zählkammer bestimmt. Aus diesem Wert wurde mit Hilfe der folgenden Formel die Zellzahl berechnet :

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{Anzahl der Großquadrate}} \times 10^4$$

2.19.4 Zelllinien

2.19.4.1 Embryonale Fibroblasten der Maus (MEF)

Bei embryonalen Mausfibroblasten (MEF – „mouse embrionic fibroblast“) handelt es sich um fibroblastenartige primäre Zellen, die nur eine begrenzte wachstumsfördernde Aktivität und Lebensdauer besitzen. Diese Eigenschaften erforderten eine erneute Isolierung dieser Zellen in regelmäßigen Abständen bzw. die Verwendung von jungen Kulturen. Sie wurden unter anderem verwendet, um eine spontane Differenzierung von kultivierten embryonalen Stammzellen der Maus (ES-Zellen) zu verhindern.

Gewinnung von MEF :

Die Gewinnung von MEF erfolgte aus Mausembryonen am Tag 12,5 der Embryogenese, die nach Entnahme des Uterus unter der Sterilwerkbank in PBS isoliert wurden. Danach wurden die Embryonen mehrmals in PBS geschwenkt und mit einer sterilen Pinzette und Schere in kleine Stücke zerkleinert. Diese wurden in einen sterilen 250 ml-Erlenmeyerkolben überführt, der bereits zwei Lagen steriler Glasperlen (\varnothing 2,85-3,3mm, Roth #A557.1) und einen magnetischen Rührstab enthielt. Nach Zugabe von 10 ml Trypsin/EDTA und einigen Tropfen DNase I-Lösung wurde unter leichtem Rühren für 30 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden weitere 10 ml Trypsin/EDTA zugegeben und erneut für 30 min. bei 37°C leicht gerührt. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Nach der letzten Inkubation wurde die Suspension in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, mit MEF-Medium auf 50 ml aufgefüllt, zentrifugiert (7 min., 800 Upm, Heraeus Megafuge 1.0) und das Zellsediment in 50 ml MEF-Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in 15 cm Zellkulturschalen überführt (2,5 Embryonen pro Schale). Nach 24 h wurde das Medium gegen frisches Medium ausgetauscht und nach Erreichen der Konfluenz, in der Regel nach weiteren 24 h, erfolgte die erste Passage der embryonalen Mausfibroblasten. Hierbei wurde jede Platte auf fünf neue Platten aufgeteilt und weiter inkubiert. Nach einer weiteren Passage wurden alle Zellen vereinigt und für ihre spätere Verwendung in Aliquots eingefroren (eine Schale pro Aliquot).

Material und Methoden

Lösungen :	PBS 4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3 autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min.	
Trypsin/EDTA		- GibcoBRL #45300-027
DNase I	10 mg/ml	- Roche #1284932
MEF-Medium	500 ml DMEM + 5 ml Penicillin/Streptomycin (10 ³ U/ml) + 5 ml L-Glutamin (200 mM) + 50 ml Fötale Kälberserum (FCS) (Hitze-inaktiviert 30 min., 56°C)	- GibcoBRL #41965-039 - GibcoBRL #14140-114 - GibcoBRL #15140-114 - Biochrom KG #S0115 Charge 244S

Herstellung von Nährzellen aus MEF :

Die Kokultivierung von MEF und ES-Zellen erforderte die Herstellung von mitotisch inaktiven Nährzellen. Dieses wurde durch die Behandlung der MEF mit Mitomycin C, das Verknüpfungen zwischen der DNA hervorruft und somit die Zellproliferation verhindert, erreicht. Hierzu wurde ein Aliquot der MEF aufgetaut, auf drei 15 cm Zellkulturschalen verteilt und unter normalen Kulturbedingungen bis zum Erreichen der Konfluenz inkubiert. Danach konnten die Zellen ein weiteres Mal 1:3 bis 1:5 passagiert werden oder direkt für die Herstellung der Nährzellen verwendet werden. Hierzu wurde das zur Kultivierung verwendete MEF-Medium mit Mitomycin C versetzt (final 10 µg/ml) und die Zellen für 2,5 – 3 h weiter inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal gründlich mit PBS gespült, trypsinisiert, in MEF-Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden anschließend nach Bedarf mit einer Dichte von 2,5 x 10⁴ Zellen/cm² in die unterschiedlichen Kulturgefäße ausgesät, in der Regel über Nacht kultiviert und vor der Kokultur mit den ES-Zellen gründlich mit PBS gespült.

Lösungen :	PBS 4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3 autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min.	
MEF-Medium	500 ml DMEM + 5 ml Penicillin/Streptomycin (10 ³ U/ml) + 5 ml L-Glutamin (200 mM) + 50 ml Fötale Kälberserum (FCS) (Hitze-inaktiviert 30 min., 56°C)	- GibcoBRL #41965-039 - GibcoBRL #14140-114 - GibcoBRL #15140-114 - Biochrom KG #S0115 Charge 244S
Mitomycin C	1 mg/ml	- Sigma #M-0503

c-Jun^{-/-} und *Jnk-1*^{-/-} MEF wurden freundlicherweise von Dr. Erwin Wagner, IMP Wien, zur Verfügung gestellt.

Serumentzug :

MEF wurden aufgetaut und so passagiert, daß sie einen Tag vor Serumentzug exponentiell in MEF-Medium wuchsen. Am nächsten Tag wurden sie zweimal mit PBS gewaschen, dann wurde das Medium durch MEF-Medium ohne fötales Kälberserum ersetzt. Nach bestimmten Zeitpunkten wurde dann die RNA aus den Zellen isoliert (s. 2.10.3).

Lösungen :	PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3 autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min.	
	MEF-Medium	500 ml DMEM + 5 ml Penicillin/Streptomycin (10 ³ U/ml) + 5 ml L-Glutamin (200 mM) + 50 ml Fötales Kälberserum (FCS) (Hitze-inaktiviert 30 min.,56°C)	- GibcoBRL #41965-039 - GibcoBRL #14140-114 - GibcoBRL #15140-114 - Biochrom KG #S0115 Charge 244S

Addition von H₂O₂ :

Zur Apoptose-Induktion durch oxidativen Streß wurde H₂O₂ zu exponentiell in MEF-Medium wachsenden Zellen gegeben. Nach bestimmten Zeitpunkten wurde dann die RNA aus den Zellen isoliert (s. 2.10.3).

Lösungen :	MEF-Medium	500 ml DMEM + 5 ml Penicillin/Streptomycin (10 ³ U/ml) + 5 ml L-Glutamin (200 mM) + 50 ml Fötales Kälberserum (FCS) (Hitze-inaktiviert 30 min.,56°C)	- GibcoBRL #41965-039 - GibcoBRL #14140-114 - GibcoBRL #15140-114 - Biochrom KG #S0115 Charge 244S
	H ₂ O ₂	100 µM	- Merck #8.222.87.1000

Addition von rekombinatem humanen BMP-4 (rhBMP-4) :

MEF wurden bis zur Konfluenz auf 10 cm Kulturschalen in MEF-Medium kultiviert. Einen Tag vor Zugabe von rhBMP-4 wurden die Zellen trypsiniert und gezählt. 10⁵ Zellen wurden dann pro Loch einer 24-Loch-Kulturschale ausgesät und in OPTIMEM1 über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen OPTIMEM1 mit rhBMP-4 ersetzt. Nach bestimmten Zeitpunkten wurde dann die RNA aus den Zellen isoliert (s. 2.10.3).

Lösungen :	MEF-Medium	500 ml DMEM + 5 ml Penicillin/Streptomycin (10 ³ U/ml) + 5 ml L-Glutamin (200 mM) + 50 ml Fötales Kälberserum (FCS) (Hitze-inaktiviert 30 min.,56°C)	- GibcoBRL #41965-039 - GibcoBRL #14140-114 - GibcoBRL #15140-114 - Biochrom KG #S0115 Charge 244S
	OPTIMEM1	500 ml OPTIMEM1 + 5 ml Penicillin/Streptomycin (10 ³ U/ml) + 5 ml L-Glutamin (200 mM) + 10 ml Fötales Kälberserum (FCS) (Hitze-inaktiviert 30 min.,56°C)	- GibcoBRL #31985-047 - GibcoBRL #14140-114 - GibcoBRL #15140-114 - Biochrom KG #S0115 Charge 244S
	rhBMP-4	100 ng/ml in OPTIMEM1	- R&D Systems #314-BP

Alle Experimente wurden parallel auf drei Kulturschalen durchgeführt und mindestens zweimal wiederholt.

2.19.4.2 Embryonale Stammzellen der Maus (ES 14-1)

In der vorliegenden Arbeit wurde die ES-Zelllinie ES 14-1 (Kühn et al., 1991) verwendet, die eine Sublinie der ES-Zelllinie ES 14 (Hooper et al., 1987) darstellt. Um eine spontane Differenzierung der pluripotenten embryonalen Stammzellen der Maus zu verhindern, erfolgte die Kultivierung auf einer Schicht von Nährzellen aus MEF (s. 2.19.4.1). Die Kultivierung wurde in ES-Medium durchgeführt, das bei Bedarf mit ESGRO™ („leucemia inhibitory factor“, final 10^3 U/ml) supplementiert wurde, was ebenfalls der Differenzierung entgegenwirken sollte.

Lösungen :	ES-Medium	500 ml DMEM	- GibcoBRL #41965-039
		+ 5 ml Penicillin/Streptomycin (10^3 U/ml)	- GibcoBRL #14140-114
		+ 5 ml L-Glutamin (200 mM)	- GibcoBRL #15140-114
		+ 600 μ l β -Mercaptoethanol (100 mM)	- Sigma #M7522
		+ 75 ml Fötale Kälberserum (FCS)	- Biochrom KG #S0115
		(Hitze-inaktiviert 30 min., 56°C)	Charge 244S
	ESGRO™	10^7 U/ml	- Chemicon #ESG1107

2.19.4.3 NIH/3T3

NIH/3T3-Fibroblasten stellen eine kontinuierliche Zelllinie dar, die aus NIH Swiss Mausembryonen etabliert und über mehr als fünf Zyklen subkloniert wurde (Jainchill et al., 1969). Sie zeigen Kontaktinhibition und eignen sich besonders für DNA-Transfektionsexperimente. In der vorliegenden Arbeit wurden auch NIH/3T3-Zellen verwendet, die stabil mit Expressionskonstrukten für verschiedene *Wnt*-Gene bzw. *lacZ* transfektioniert waren. Diese wurden freundlicherweise von Dr. Rolf Kemler, MPI Freiburg, zur Verfügung gestellt.

Lösungen :	MEF-Medium	500 ml DMEM	- GibcoBRL #41965-039
		+ 5 ml Penicillin/Streptomycin (10^3 U/ml)	- GibcoBRL #14140-114
		+ 5 ml L-Glutamin (200 mM)	- GibcoBRL #15140-114
		+ 50 ml Fötale Kälberserum (FCS)	- Biochrom KG #S0115
		(Hitze-inaktiviert 30 min., 56°C)	Charge 244S

2.19.4.4 Embryonale Fibroblasten des Huhns (CEF)

Bei embryonalen Fibroblasten des Huhns (CEF - „chicken embryonic fibroblast“) handelt es sich genau wie bei ihrem murinen Gegenstück (MEF) um fibroblastenartige primäre Zellen. Sie wurden in der vorliegenden Arbeit zur Herstellung replikationskompetenter RCAS-Viren (s. 2.19.7) benötigt. Zur Gewinnung der Zellen wurde das Protokoll zur Gewinnung von MEF (s. 2.19.4.1) angewandt, mit dem Unterschied, daß 10 Tage alte Hühnerembryonen benutzt und die Zellen in einem für Hühnerzellen spezifischen Medium kultiviert wurden.

Material und Methoden

Lösungen : CEF-Medium	500 ml DMEM + 5 ml Penicillin/Streptomycin (10 ³ U/ml) + 5 ml L-Glutamin (200 mM) + 50 ml Fötale Kälberserum (FCS) (Hitze-inaktiviert 30 min., 56°C) + 10 ml Hühnerserum (Hitze-inaktiviert 30 min., 56°C)	- GibcoBRL #41965-039 - GibcoBRL #14140-114 - GibcoBRL #15140-114 - Biochrom KG #S0115 Charge 244S - Sigma #C5405
------------------------------	---	--

2.19.5 Kokultivierung von NIH/3T3 und embryonalen Stammzellen

Zur Kokultivierung wurden die unter 2.19.4.3 erwähnten NIH/3T3-Zellen verwendet, die stabil mit Expressionsvektoren für *lacZ* oder eines der folgenden Gene: *Wnt-1*, *Wnt-3a*, *Wnt-4*, *Wnt-5a*, *Wnt-7a*, *Wnt-7b* transfektioniert waren. Die Zellen wurden auf 10 cm Kulturschalen aufgetaut (s. 2.19.2), in MEF-Medium inkubiert und einmal passagiert. Parallel wurden ES-Zellen wie unter 2.19.4.2 beschrieben auf einer Nährschicht von MEF kultiviert. 2-3 Tage vor der Kokultur mit NIH/3T3-Fibroblasten wurden die ES-Zellen auf Gelatinebeschichtete 10 cm Kulturschalen ausgebracht und jeden Tag bis zur Kokultur passagiert, wobei das ES-Medium mit ESGRO™ supplementiert wurde. Einen Tag vor der Kokultur wurden pro Linie jeweils 10⁶ NIH/3T3-Zellen auf 10 cm Kulturschalen ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit ES-Medium vier weitere Stunden inkubiert. Die ES-Zellen wurden trypsinisiert, vereinigt und gezählt. 2x10⁶ ES-Zellen wurden dann auf jede der vorbereiteten Kulturschalen mit NIH/3T3-Fibroblasten gegeben. Nach 24 h der Kokultur wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und RNA wie unter 2.10.3 beschrieben isoliert.

Lösungen : MEF-Medium	500 ml DMEM + 5 ml Penicillin/Streptomycin (10 ³ U/ml) + 5 ml L-Glutamin (200 mM) + 50 ml Fötale Kälberserum (FCS) (Hitze-inaktiviert 30 min., 56°C)	- GibcoBRL #41965-039 - GibcoBRL #14140-114 - GibcoBRL #15140-114 - Biochrom KG #S0115 Charge 244S
ES-Medium	500 ml DMEM + 5 ml Penicillin/Streptomycin (10 ³ U/ml) + 5 ml L-Glutamin (200 mM) + 600 µl β-Mercaptoethanol (100 mM) + 75 ml Fötale Kälberserum (FCS) (Hitze-inaktiviert 30 min., 56°C)	- GibcoBRL #41965-039 - GibcoBRL #14140-114 - GibcoBRL #15140-114 - Sigma #M7522 - Biochrom KG #S0115 Charge 244S
ESGRO™	10 ⁷ U/ml	- Chemicon #ESG1107
PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3 autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min.	
Gelatine	0,2% (w/v) in H ₂ O	- Sigma #G1890

2.19.6 Transiente Transfektion von NIH/3T3

Zur transienten Transfektion wurden die NIH/3T3-Zellen in MEF-Medium auf 6-Loch-Platten kultiviert bis sie 40-60% Konfluenz erreicht hatten. Zur Transfektion wurde dann LIPOFECTIN® Reagenz verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren. 48 h nach der Transfektion der Zellen mit pCS2+-*Xdkk-1* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Christof Niehrs), pCS2+-*c-Jun* bzw. pCS2+ (konstruiert von Dr. D. Turner, Dr. R. Rupp und Dr. J. Lee in Dr. H. Weintraub's Labor) wurde DNA aus den Zellen isoliert (s. 2.10.2), die auf Fragmentierung als Zeichen für programmierten Zelltod untersucht (s. 2.18.3) wurde. Pro Konstrukt wurden drei Kulturschalen transfektioniert und das Experiment dreimal wiederholt. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden parallel mindestens sechs Kulturschalen mit pEQ176 (konstruiert von Dr. A. Geballe) transfektioniert. Dieser Vektor exprimiert das *lacZ* Gen unter der Kontrolle des CMV-Promoters, so daß die Transfektion durch Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität kontrolliert werden kann. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann für 10 min. mit Paraformaldehyd fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Färbung bei 37°C im Dunkeln in Färbelösung. Das Experiment wurde nur dann gewertet, wenn alle Kontrollplatten eine vergleichbare Transfektionseffizienz zeigten.

Lösungen :	MEF-Medium	500 ml DMEM + 5 ml Penicillin/Streptomycin (10^3 U/ml) + 5 ml L-Glutamin (200 mM) + 50 ml Fötale Kälberserum (FCS) (Hitze-inaktiviert 30 min., 56°C)	- GibcoBRL #41965-039 - GibcoBRL #14140-114 - GibcoBRL #15140-114 - Biochrom KG #S0115 Charge 244S
	LIPOFECTIN®		- GibcoBRL #18292-011
	OPTIMEM1		- GibcoBRL #31985-047
	PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3 autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min.	
	Paraformaldehyd	4% (w/v) in PBS	
	Färbelösung	5 mM K ₃ Fe(CN) ₆ 5 mM K ₄ Fe(CN) ₆ *3H ₂ O 2 mM MgCl ₂ 0,2% (v/v) NP-40 1 mg/ml X-Gal in PBS	- Applichem #A1007

2.19.7 Herstellung replikationskompetenter Hühner-Retroviren (RCAS)

cDNAs mit einer Größe bis zu 2 kb können im Hühnersystem sehr effizient mit Hilfe rekombinanter replikationskompetenter Retroviren überexprimiert werden (Morgan und Fekete, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde der RCASBP(A)-Vektor verwendet. RCASBP(A)/AP wurde freundlicherweise von Dr. Astrid Buchberger, TU Braunschweig, zur Verfügung gestellt.

2.19.7.1 Transfektion von CEF und Virusernte

Zur Transfektion der rekombinanten Viruskonstrukte wurden CEF auf 10 cm Kulturschalen aufgetaut und in CEF-Medium kultiviert, bis die Kulturen ca. 60% Konfluenz erreicht hatten. Für die Transfektion wurden dann 10 µg DNA und LIPOFECTIN® Reagenz eingesetzt und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Nach Inkubation über Nacht im DNA-haltigen Medium, wurden die Zellen am nächsten Tag zweimal mit PBS gewaschen und dann bis zum Erreichen der Konfluenz in CEF-Medium inkubiert. Die Zellen wurden passagiert bis sechs konfluente 15 cm Kulturschalen pro Virus vorlagen. Bei den einzelnen Passagen wurde auch immer ein Teil des virushaltigen Mediums in die neuen Kulturschalen überführt bevor die Zellen zum Trypsinieren mit PBS gewaschen wurden. Das CEF-Medium wurde dann von den konfluenten Kulturschalen abgesaugt und nach einmaligem Waschen mit PBS gegen ein minimales Volumen (12 ml) Erntemedium ersetzt. An drei aufeinander folgenden Tagen wurde das virushaltige Erntemedium gesammelt und mit Hilfe eines 150 ml „Bottle Top Filters“ (Porengröße 0,45 µm, Falcon #7109) sterilfiltriert. Das sterilfiltrierte Medium wurde zwecks Aufkonzentrierung des Virustiters in Zentrifugenröhrchen (Beckmann #331372) überführt und 3 h bei 4°C in einer Ultrazentrifuge (Beckmann L7-65) zentrifugiert (25.000 Upm, SW-41 Rotor). Danach wurde der Überstand verworfen und der Virusniederschlag in 1% des Ausgangsvolumens aufgenommen. Zur Resuspension der Viren wurden die Röhrchen 1 h bei 4°C auf einem Plattformschüttler (120 Upm) inkubiert. Das virushaltige Medium wurde dann à 10 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Lösungen :	CEF-Medium	500 ml DMEM	- GibcoBRL #41965-039
		+ 5 ml Penicillin/Streptomycin (10 ³ U/ml)	- GibcoBRL #14140-114
		+ 5 ml L-Glutamin (200 mM)	- GibcoBRL #15140-114
		+ 50 ml Fötale Kälberserum (FCS)	- Biochrom KG #S0115
		(Hitze-inaktiviert 30 min.,56°C)	Charge 244S
		+ 10 ml Hühnerserum	- Sigma #C5405
		(Hitze-inaktiviert 30 min.,56°C)	
		LIPOFECTIN®	- GibcoBRL #18292-011
		OPTIMEM1	- GibcoBRL #31985-047
		PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O
		16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	
		150 mM NaCl	
		pH 7,3	
		autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min.	
	Erntemedium	500 ml OPTIMEM1	- GibcoBRL #31985-047
		+ 5 ml Penicillin/Streptomycin (10 ³ U/ml)	- GibcoBRL #14140-114
		+ 5 ml L-Glutamin (200 mM)	- GibcoBRL #15140-114
		+ 10 ml Fötale Kälberserum (FCS)	- Biochrom KG #S0115
		(Hitze-inaktiviert 30 min.,56°C)	Charge 244S
		+ 1 ml Hühnerserum	- Sigma #C5405
		(Hitze-inaktiviert 30 min.,56°C)	

2.19.7.2 Bestimmung des Virustiters

Zur Titration des Virus wurden CEF auf 10 cm Kulturschalen aufgetaut. Sie wurden danach so in 24-Loch-Platten ausgesät, daß sie nach Kultivierung über Nacht ca. 20% Konfluenz hatten. Am nächsten Tag wurden 100 µl verschiedener Verdünnungen der konzentrierten Viruslösungen in CEF-Medium zu den in 900 µl CEF-Medium inkubierten Zellen gegeben und 48 h inkubiert. Zur Kontrolle wurden zwei Löcher der Platte nicht mit Virus infiziert. Hiernach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann 30 min. in MST inkubiert. Danach wurde der Primärantikörper (gegen virales gag-Protein, AMV-3C2, Developmental Studies Hybridoma Bank, IA) in einer 1:5000-Verdünnung in 0,5 ml MST auf die Zellen gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation wurde fünfmal für je 20 min. mit MST gewaschen. Die folgenden Schritte, beginnend mit der Inkubation mit einem sekundären Antikörper bis zur Färbung wurden mit dem „Vectastain Elite ABC Peroxidase Kit RTU Universal“ (Vector Laboratories #PK-7200) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach erfolgter Farbreaktion mit DAB (Sigma #D4168) konnten infizierte Zellklone durch Braunfärbung identifiziert werden und der Titer durch Auszählen dieser Zellklone und Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor der Viruslösung errechnet werden.

Lösungen :	CEF-Medium	500 ml DMEM	- GibcoBRL #41965-039
		+ 5 ml Penicillin/Streptomycin (10 ³ U/ml)	- GibcoBRL #14140-114
		+ 5 ml L-Glutamin (200 mM)	- GibcoBRL #15140-114
		+ 50 ml Fötale Kälberserum (FCS) (Hitze-inaktiviert 30 min.,56°C)	- Biochrom KG #S0115 Charge 244S
		+ 10 ml Hühnerserum (Hitze-inaktiviert 30 min.,56°C)	- Sigma #C5405
	PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3 autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min.	
	MST	DMEM	- GibcoBRL #41965-039
		+ 10% (v/v) Fötale Kälberserum (FCS) (Hitze-inaktiviert 30 min.,56°C)	- Biochrom KG #S0115 Charge 244S
		+ 0,2% (v/v) Triton X-100	

2.19.8 Herstellung von konditioniertem Medium

Zur Herstellung von konditioniertem Medium wurden CEF mit RCASBP(A)/*Xdkk-1* bzw. RCASBP(A)/*AP* infiziert und bis zur Konfluenz der 10 cm Kulturschale in CEF-Medium inkubiert. Nach mehrmaligem Passagieren wurde das Medium von konfluenten 15 cm Kulturschalen abgesaugt und gegen Erntemedium ersetzt. Die Zellen wurden 72 h inkubiert und das konditionierte Medium gesammelt. Zur Sedimentation toter Zellen aus dem Überstand wurde das Medium 30 min. zentrifugiert (5.000 Upm, Heraeus Megafuge 1.0) und der Überstand in ein steriles Gefäß dekantiert. Alle Gefäße und Pipettenspitzen, die mit dem konditionierten Medium in Berührung kamen, wurden zuvor mit 0,1% BSA (ICN #810684) in

PBS gespült. Das konditionierte Medium wurde mit Hilfe von zuvor mit 70% Ethanol sterilisierten VIVASPIN 15-Säulen (Vivascience Ltd. #VS1502) zehnfach aufkonzentriert. Hierzu wurden 15 ml des Mediums in eine Säule gegeben und zentrifugiert. Das konzentrierte Medium wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Lösungen :	CEF-Medium	500 ml DMEM + 5 ml Penicillin/Streptomycin (10^3 U/ml) + 5 ml L-Glutamin (200 mM) + 50 ml Fötale Kälberserum (FCS) (Hitze-inaktiviert 30 min., 56°C) + 10 ml Hühnerserum (Hitze-inaktiviert 30 min., 56°C)	- GibcoBRL #41965-039 - GibcoBRL #14140-114 - GibcoBRL #15140-114 - Biochrom KG #S0115 Charge 244S - Sigma #C5405
	Erntemedium	500 ml OPTIMEM1 + 5 ml Penicillin/Streptomycin (10^3 U/ml) + 5 ml L-Glutamin (200 mM) + 10 ml Fötale Kälberserum (FCS) (Hitze-inaktiviert 30 min., 56°C) + 1 ml Hühnerserum (Hitze-inaktiviert 30 min., 56°C)	- GibcoBRL #31985-047 - GibcoBRL #14140-114 - GibcoBRL #15140-114 - Biochrom KG #S0115 Charge 244S - Sigma #C5405
	PBS	4 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 16 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 150 mM NaCl pH 7,3 autoklaviert; 121°C , 2 bar, 30 min.	
	70% Ethanol		

2.19.9 Hochdichte-Kultur mesodermaler Gliedmaßenknospenzellen

Mesodermale Zellen der Gliedmaßenknospe rekapitulieren das *in vivo* Programm ihrer Differenzierung in Korpel und Knochen *in vitro*, wenn sie in sehr hoher Dichte ausgesät werden (Ahrens et al., 1977). Hierzu wurde das distale Drittel der Flügelknospen von HH22-24 Hühnerembryonen präpariert und zur Entfernung des Ektoderms in Dispase I/DNase I für 45 min. bei 37°C inkubiert. Danach konnte die ektodermale Hülle mit Hilfe von Wolframnadeln und Pinzetten vom mesodermalen Kern abgetrennt werden. Zur Vereinzelung der mesodermalen Zellen wurden sie für 15 min. in Trypsin/EDTA inkubiert, worauf zweimaliges Waschen in PBS/Serum zur Inaktivierung des Trypsins folgte. Die Einzelzellsuspension wurde nach dem Resuspendieren in PBS/Serum auf 2×10^7 Zellen/ml eingestellt und jeweils ein $10 \mu\text{l}$ -Tropfen pro Loch einer 24-Loch-Kulturschale ausgesät. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde die Kultur vorsichtig mit 1 ml Medium überschichtet und weiter inkubiert. Hierzu wurden die aufkonzentrierten konditionierten Medien (s. 2.19.8) wieder 1:10 in CEF-Medium verdünnt. Jeden Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Nach ca. drei Tagen waren die ersten Knorpelkondensationen sichtbar, die mit Alcian Blue angefärbt werden konnten. Dazu wurden die Kulturen nach 3-6 Tagen Inkubation mit PBS gewaschen und für 10 min. in Essigsäure fixiert. Die Färbung mit Alcian Blue erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Kulturen zur Entfernung des

überschüssigen Farbstoffs mehrmals mit Essigsäure gewaschen und schließlich fotografiert. Zur photometrischen Quantifizierung wurden die Zellen über Nacht in Guanidinhydrochlorid bei 4°C lysiert. Die optische Dichte des durch den freigesetzten Farbstoff getrüben Überstands wurde dann bei 650 nm in einem Spektralphotometer (Pharmacia, Ultrospec2000) gemessen.

Lösungen :	CEF-Medium	500 ml DMEM + 5 ml Penicillin/Streptomycin (10 ³ U/ml) + 5 ml L-Glutamin (200 mM) + 50 ml Fötale Kälberserum (FCS) (Hitze-inaktiviert 30 min.,56°C) + 10 ml Hühnerserum (Hitze-inaktiviert 30 min.,56°C)	- GibcoBRL #41965-039 - GibcoBRL #14140-114 - GibcoBRL #15140-114 - Biochrom KG #S0115 Charge 244S - Sigma #C5405
	PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3 autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min.	
	PBS/Serum	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3 autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min. + 10% Fötale Kälberserum (FCS) (Hitze-inaktiviert 30 min.,56°C)	- Biochrom KG #S0115
	Dispase I	1,5 U/ml in PBS	- Roche #210455
	Trypsin/EDTA	0,1% (v/v) in PBS	- GibcoBRL #45300-027
	DNase I	10 mg/ml	- Roche #1284932
	Essigsäure	3% (v/v) pH 1.0	
	Alcian Blue 8GX	0,5% (w/v) in 3% Essigsäure	- Sigma #A5268
	Guanidin- hydrochlorid	4 M	

2.20 Proteinnachweis durch Immunodetektion

Zum Nachweis des *Xenopus* Dkk-1 wurden die konditionierten Zellkulturüberstände der mit RCASBP(A)/*Xdkk-1*- bzw. als Kontrolle RCASBP(A)/*AP*-infizierten CEF (s. 2.19.8) verwendet. Hierzu wurden 10 µg Proteinlösung mit Probenpuffer versetzt, für 5 min. bei 95°C inkubiert und auf einem 10%igen Polyacrylamid-Gel bei 25 mA für ca. 1,5 h gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard wurde die „High molecular weight standard mixture“ (Sigma #SDS-6H) verwendet. Nach dem Gellauf wurden die Proteine mit Hilfe eines CTI Elektrobotters auf eine Nitrozellulose-Membran (Hybond-P, amershampharmacia biotech) übertragen. Hierzu wurden sechs in Anodenpuffer 1 getränkte Gel-Blotting-Papierstreifen (Schleicher & Schuell #426693) auf eine Graphitelektrode des Elektrobotters gelegt. Hierauf wurden nun drei in Anodenpuffer 2 getränkte Gel-Blotting-Papierstreifen, die Membran, das Polyacrylamidgel und acht weitere in Kathodenpuffer getränkte Gel-Blotting-Papierstreifen geschichtet. Der Transfer erfolgte bei 1 mA/cm² für 1 h.

Danach wurde der erfolgreiche Transfer durch Anfärbung der Proteine auf der Membran mit Ponceau S kontrolliert. Nach Spülen mit H₂O wurde die Membran mit TBST gewaschen, bevor unspezifische Antikörperbindestellen durch Blockierung mit Blotto/Tween für 1 h bei Raumtemperatur abgesättigt wurden. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Anti-15, polyklonales Serum gegen die intra- und extrazelluläre Form von *Xenopus* Dkk-1, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Christof Niehrs) in einer 1:10.000-Verdünnung über Nacht. Nach dreimaligem Waschen à 15 min. in TBST folgte dann eine zweistündige Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Maus-anti-Kaninchen-IgG). Nach wiederholtem Waschen (dreimal 15 min. in TBST) erfolgte die Signalentwicklung mit dem „ECL™ Western Blotting detection kit“ (amershampharmacia biotech #RPN2106) nach den Angaben des Herstellers und BIOMAX MR-Filmen (Kodak #8929655).

Lösungen :	Trenngel	3,7 ml 40% (w/v) Acrylamid	- Merck #1.00640.0100	
		1,9 ml 2% (w/v) Bisacrylamid	- Applichem #A1574	
		5,3 ml 1,5M Tris/HCl pH 8,7		
		20 µl 20% (w/v) SDS		
		6,8 µl TEMED	- Merck #1.10732.1000	
		32 µl 40% (w/v) APS	- Serva #13375	
		9,5 ml H ₂ O		
		Sammelgel	1 ml 30% (w/v) Acrylamid	- Merck #1.00639.0100
			1 ml 1M Tris/HCl pH 6,8	
			31,5 µl 20% (w/v) SDS	
		5,25 µl TEMED	- Merck #1.10732.1000	
		11,25 µl 40% (w/v) APS	- Serva #13375	
		5,9 ml H ₂ O		
	Laufpuffer	3 g Tris/HCl		
		14,4 g Glycin		
		ad 1 l H ₂ O		
		pH 8,3		
	2x Probenpuffer	200 mM Tris/HCl pH 8,8		
		20% (v/v) Glycerin		
		6% (w/v) SDS		
		4% (v/v) β-Mercaptoethanol	- Sigma #M7522	
		0,1% (w/v) Bromphenolblau	- Merck #1.59102.0001	
	Kathodenpuffer	40 mM ε-Aminocapronsäure	- Merck #8.17010.1000	
	Anodenpuffer 1	25 mM Tris/Base, 25% Methanol		
	Anodenpuffer 2	300 mM Tris/Base, 25% Methanol		
	Ponceau S	1:10 Ponceau S Konzentrat:H ₂ O	- Sigma #P7767	
	TBST	10 mM Tris/HCl		
		100 mM NaCl		
		1 mM EDTA		
		0,1% (v/v) Tween-20		
		pH 7,2		
	Blotto/Tween	TBST		
		+ 5% (w/v) Magermilchpulver		
	1-Butanol			

2.21 Embryologische Techniken

2.21.1 Quelle, Lagerung und Inkubation befruchteter Hühner- und Enteneier

Befruchtete Hühner- und Enteneier wurden von Deindl GmbH, Rietberg-Varensell bezogen. Bis zur Inkubation wurden sie in einem Kühlschrank bei 14°C gelagert. Die Inkubation erfolgte bei 38°C in einem Heraeus T20 Trockenschrank, der mit offenen, mit Wasser gefüllten Gefäßen bestückt wurde, um eine Luftfeuchtigkeit von ca. 45% zu erzeugen. Die Eier wurden dabei so ausgerichtet, daß ihre Längsachse waagrecht lag. Die Position des Embryos wurde auf dem Ei markiert.

2.21.2 Implantation von Mikrokugeln in die Gliedmaßenknospe von Hühnerembryonen

Zum Studium der Konsequenzen einer lokalen Konzentrationserhöhung oder ektopischen Aktivität bestimmter Proteine oder anderer Agenzien, können diese an Mikrokugeln gebunden werden, die dann in den Hühnerembryo implantiert werden können.

Zum Tränken der Mikrokugeln wurden diese mit einer Pipette in eine 3,5 cm Zellkulturschale transferiert und vorsichtig mit einem Papier unter einer Wild M3 Stereolupe getrocknet. Es folgte zweimaliges Waschen mit PBS, bevor sie für mindestens 1 h im jeweiligen Agenz getränkt wurden. Für rhBMP-4, Shh-N, Staurosporin und konditioniertes Medium wurden „Affi-Gel Blue“-Kugeln (BIO-RAD #153-7302) verwendet, wohingegen eine Heparin-Matrix (Sigma #H5263) für Fgf-8 benutzt wurde. Für *all-trans* Retinsäure wurden AG1-X2 Ionenaustauschkugeln (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Juan Carlos Izpisúa Belmonte) verwendet, die nach mindestens einstündiger Inkubation in *all-trans* Retinsäure mit Neutral Rot gespült wurden. Beschädigte Kugeln färbten sich hierbei rot und wurden nicht verwendet.

Die Stammlösungen für rhBMP-4 (100 µg/ml), Shh-N (2,5 mg/ml) und Fgf-8 (1 mg/ml) wurden in 0,1% BSA/PBS angesetzt und wenn benötigt auch hierin verdünnt. *All-trans* Retinsäure wurde als 0,1 mg/ml Lösung in DMSO verwendet. Staurosporin wurde als 1 mM Stammlösung in DMSO angesetzt und dann in DMEM/Hepes verdünnt.

Die Operation wurde unter einer Wild M8 Stereolupe mit Ethanol-sterilisierten Bestecken durchgeführt. Hierzu wurde das Ei zunächst mit 70% Ethanol desinfiziert und vorsichtig mit Hilfe einer Kanüle ein Loch am Boden des Eies über der Luftblase gestochen. Durch dieses Loch wurden mit einer Spritze einige Milliliter des Albumins abgesaugt, um das Flüssigkeitsniveau innerhalb des Eies abzusenken und so ein Ankleben des Embryos an der Eischale zu verhindern. Danach wurde die zuvor markierte Stelle auf der Schale, unter der sich der Embryo befindet, mit Tesafilm abgeklebt. Hier wurde mit einer Schere ein Fenster in die Eischale geschnitten, das den Blick auf den Dotter mit dem daraufliegenden Embryo freigab. Mit zwei feinen Pinzetten wurden vorsichtig die Membranen (Vitellinmembran und

Amnion) über der rechten Flügelknospe eingerissen, um diese für die Operation zu exponieren. An der gewünschten Stelle wurde dann mit einer sehr feinen Wolframnadel ein Schlitz in die Gliedmaßenknospe gemacht. Die zu implantierende Mikrokugel wurde mit einer Pinzette aufgenommen und mit Hilfe dieser und der Wolframnadel in den zuvor gemachten Schlitz eingeführt und in das Mesenchym gedrückt. Um das Austrocknen des Eies bei der weiteren Inkubation (s. 2.21.1) zu verhindern, wurde das Fenster mit Tesafilm verklebt.

Lösungen :	PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3 autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min.	
	Neutral Rot	0,01 mg/ml	- Sigma #N7005
	DMSO		- Merck # 1.02950.0500
	rhBMP-4		- R&D Systems #314-BP
	Fgf-8		- R&D Systems #423-F8
	Shh-N		- R&D Systems #461-SH
	Staurosporin		- Sigma #S4400
	<i>all-trans</i> Retinsäure		- Sigma #R2625
	DMEM/Hepes	500 ml DMEM + 5 ml Penicillin/Streptomycin (10 ³ U/ml) + 5 ml L-Glutamin (200 mM) + 50 ml Fötale Kälberserum (FCS) (Hitze-inaktiviert 30 min., 56°C) + 1 x Hepes	- GibcoBRL #41965-039 - GibcoBRL #14140-114 - GibcoBRL #15140-114 - Biochrom KG #S0115 Charge 244S

2.21.3 Mikrochirurgische Entfernung der AER

Zur chirurgischen Entfernung der AER wurde die rechte Flügelknospe wie unter 2.21.2 beschrieben exponiert. Dann wurde mit der Wolframnadel ein Loch zwischen dem posterioren Ende der AER und dem darunterliegenden Mesoderm gemacht. Von hier aus wurde die AER mit der Wolframnadel und einer feinen Pinzette sukzessive nach anterior abgetragen.

2.21.4 Transplantation von CEF in die Gliedmaßenknospe von Hühnerembryonen

Hierzu wurden RCASBP(A)/*Xdkk-1*- bzw. RCASBP(A)/*AP*-infizierte CEF einen Tag vor der Transplantation auf mikrobiologische Petrischalen umgesetzt, wodurch sie sphärische Aggregate bildeten. Am Tag der Transplantation wurde dann ihre Proliferation durch Mitomycin C-Behandlung (s. 2.19.4.1) irreversibel blockiert. Danach wurde eine Trypan Blue (Sigma #T6146) Färbung durchgeführt, um nur solche Aggregate zu transplantieren, deren Zellen zu diesem Zeitpunkt vital waren. Diese Zellaggregate wurden dann in Gliedmaßenknospen von HH21-23 Embryonen transplantiert, die wie unter 2.21.2 beschrieben vorbereitet worden waren. Nach 20 h Inkubation wurden die Embryonen isoliert und eine Nile Blue Färbung (s. 2.18.2.2, 15 min.) durchgeführt, wobei auch der Waschschrift

verkürzt wurde (30 min.). Danach wurden die Embryonen fotografiert und für die „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung (s. 2.14) vorbereitet.

Lösungen :	Nile Blue A	0,001% (w/v) in PBS	- Sigma #N0766
	PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3 autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min.	
	Mitomycin C	1 mg/ml	- Sigma #M-0503
	CEF-Medium	500 ml DMEM + 5 ml Penicillin/Streptomycin (10 ³ U/ml) + 5 ml L-Glutamin (200 mM) + 50 ml Fötale Kälberserum (FCS) (Hitze-inaktiviert 30 min.,56°C) + 10 ml Hühnerserum (Hitze-inaktiviert 30 min.,56°C)	- GibcoBRL #41965-039 - GibcoBRL #14140-114 - GibcoBRL #15140-114 - Biochrom KG #S0115 Charge 244S - Sigma #C5405

2.21.5 Implantation von Mikrokugeln in die Interdigitalräume der Gliedmaßenknospen von Entenembryonen

Die Enteneier wurden wie oben für Hühnereier beschrieben inkubiert und geöffnet. Zur Implantation von Mikrokugeln in die Interdigitalräume wurden die Eier 10 Tage inkubiert. Der rechte Fuß wurde exponiert, wobei darauf zu achten war, daß die Allantois, die zu diesem Zeitpunkt die gesamte Oberfläche bedeckte, nicht verletzt wurde. Die Implantation der Kugeln erfolgte dann analog zu der in 2.21.2 beschriebenen Operation.

2.21.6 UV-Bestrahlung von Hühnerembryonen

Zur Induktion des programmierten Zelltods durch UV-induzierte DNA-Schäden wurden 3,5 Tage inkubierte Hühnereier wie unter 2.21.2 geöffnet. Sie wurden dann in einem UV Stratalinker™1800 (Stratagene) mit UV Licht einer Energie von 600 µJ bestrahlt. Die Eier wurden anschließend mit Tesafilm verschlossen, weiter inkubiert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten für die Nile Blue Färbung (s. 2.18.2.2) oder „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung (s. 2.14) vorbereitet.

2.21.7 Explantat-Elektroporation und Organ-Kultur

Zur Elektroporation isolierter Gliedmaßenknospen wurden diese von HH21-23 Embryonen entfernt, in PBS gewaschen und in einen 25 µl-Tropfen der jeweiligen DNA-Lösung (2 µg/µl) überführt. Zur Elektroporation wurde ein BTX ECM® 830 „Square wave Elektroporator“ und Platindrähte als Elektroden verwendet, wobei die Plus-Elektrode am Ende L-förmig umgebogen wurde. Die Minus-Elektrode wurde dann mit dem Explantat in Kontakt gebracht, während ein Zwischenraum von ca. 5 mm zwischen Explantat und Plus-Elektrode gelassen

wurde. Das Explantat wurde mit drei Pulsen à 70V, jeder für 50 msec. elektroporiert. Danach wurde das Gewebe mit BGJb Medium gewaschen und in Organkulturschalen (Falcon #3037) kultiviert. Hierzu wurde ein minimales Volumen (ca. 700 µl) Medium in die Kulturschalen gegeben und hierüber ein Metallgitter (Wire Mesh Corp., CA) mit einem Filter (Nucleopore, Porengröße 0,8 µm) gelegt. Hierauf wurden die Explantate gebracht, um sie an der Luft/Medium-Grenze zu kultivieren. Nach 6-8 h Inkubation bei 37°C wurden die Explantate für „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung (s. 2.14) oder Nile Blue Färbung (s. 2.18.2.2) vorbereitet.

Lösungen :	PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3 autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min.	
	BGJb Medium	1 l BGJb + 10 ml Penicillin/Streptomycin (10 ³ U/ml) + 46,4 ml Natrium-Bikarbonat (7,5% w/v) + 0,2 mg/ml L-Ascorbinsäure	- Sigma #B6644 - GibcoBRL #14140-114 - GibcoBRL #25080-102 - Sigma #A5960

2.22 Maushaltung

Die Maushaltung und -zucht erfolgte in der Tierversuchsanlage der Medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

2.23 Isolierung definierter Embryonalstadien

Ein Männchen wurde mit einem oder zwei Weibchen in einen Käfig gesetzt und die Weibchen am nächsten Morgen auf einen Vaginalpfropf hin untersucht. 12 Uhr mittags am Tag des Auftretens des Vaginalpfropfes wurde als E0,5 der Embryonalentwicklung definiert. Nach Erreichen des gewünschten Alters wurden die Muttertiere durch zervikale Dislokation getötet, die Uteri präpariert und die Embryonen, sowie die extraembryonalen Membranen in PBS unter dem Stereomikroskop isoliert.

Die Stadien der Hühnerembryonen wurden nach dem System von Hamburger und Hamilton (HH) (1951) bestimmt. Die Embryonen wurden aus dem Ei präpariert und unter dem Stereomikroskop soweit wie möglich von den extraembryonalen Membranen befreit.

Lösungen :	PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3 autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min.	
-------------------	-----	--	--

2.24 Genotypisierung von Mausembryonen

Zur Identifikation von Wildtyp- bzw. heterozygoten oder homozygoten *Ft*-Embryonen wurde DNA aus den extraembryonalen Membranen isoliert (s. 2.10.1). Anschließend wurde eine

PCR (s. 2.12) mit den Oligonukleotiden *Wt*, *Ft*, *Wt/Ft* (s. 2.12.1) durchgeführt. Während *Wt/Ft* mit der DNA aller Genotypen hybridisiert, ist *Ft* spezifisch für das Transgen und *Wt* bindet in einem Bereich, der durch die *Ft*-Mutation deletiert ist, so daß ein für das Wildtyp-Allel charakteristisches Produkt von 300 bp entsteht, während das *Ft*-spezifische Fragment 400 bp lang ist. *Xt'/Xt'*-Embryonen konnten ab E11,5 durch ihren Phänotyp identifiziert werden. Für frühere Embryonalstadien wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden 3'*F4*/3'*B1* durchgeführt. Diese Sequenzen sind in homozygoten *Xt'*-Embryonen deletiert, so daß mit dieser PCR zwischen homozygoten und nicht-homozygoten Embryonen unterschieden werden konnte (Büscher et al., 1998). Da hier auf Abwesenheit eines Fragments untersucht wurde, wurde zusätzlich eine PCR mit *Hprt*-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt, die die erfolgreiche DNA-Isolierung bestätigten. *Hx/+*-Embryonen wurden durch ihrem ab E11.5 erkennbaren Gliedmaßenphänotyp identifiziert (Clark et al., 2000).

2.25 Fotodokumentation

Die Fotodokumentation erfolgte mit Hilfe einer digitalen Kamera (Fuji HC-300Z) auf einem Zeiss StemiSV11 Stereomikroskop bzw. einem Zeiss Axioplan-Mikroskop. Die anschließende Bildverarbeitung und Quantifizierung erfolgte mit Photoshop 6.0 bzw. NIH Image 1.62 auf einem PowerMac G4.

3. Ergebnisse

3.1 Morphologie der *Ft/Ft* Gliedmaßen

Zur Analyse potentieller Fehlentwicklungen der Extremitäten in *Ft/Ft*-Embryonen wurde zunächst die Morphologie der Gliedmaßen am Tag E14,5 untersucht. Schon bei makroskopischer Betrachtung fielen hier mehrere Anomalitäten auf. Hierzu gehörten v.a. die extreme P/D-Verkürzung der gesamten Extremität, sowie eine Wucherung ektopischen Gewebes am distalen Ende des Autopods, die sich vom anterioren Rand bis vor die posteriore Fingeranlage erstreckt und hierdurch zu einer Verbreiterung sowohl der A/P- als auch im besonderen der D/V-Achse führt. Häufig enthält dieses Gewebe massive Blutansammlungen (Abb. 3.1A,B). Zur genaueren Charakterisierung wurde zunächst eine Färbung der Knorpelstrukturen durchgeführt. Abb. 3.1A zeigt, daß der Zeugopod von *Ft/Ft* Vordergliedmaßen an E14,5 stark verkürzt ist und der Radius außerdem eine anomale Krümmung aufweist. Ein besonders drastisches Merkmal dieser Extremitäten ist die distale Verstümmelung der Knorpel-elemente des Autopods. Hier kommt es nur zur Ausbildung proximaler Elemente, die vermutlich den Metacarpalen entsprechen, die blind an der Grenze der ektopischen Gewebewucherung enden. Da Phalangen völlig fehlen, sind keine typischen Fingerstrahlen zu beobachten (Abb. 3.1A,B). Das posteriore Fingerelement ist länger als alle anderen und scheinbar nicht so massiv von den genannten Störungen betroffen (Abb. 3.1A, s. unten). Die gleichen phänotypischen Veränderungen treten in den Hintergliedmaßen auf. Auch hier kommt es zur Ausbildung rudimentärer Zehenanlagen, die nur aus den Metatarsalen bestehen. Spezifisch für das hintere Extremitätenpaar ist zudem eine massive Deletion anteriorer Skelettelemente, die sowohl den Zeugo- als auch den Autopod betrifft (Abb. 3.1B). Die Tibia fehlte vollständig in allen analysierten Embryonen, im Autopod kommt es zum Verlust des ersten bzw. der ersten beiden Kondensationen (Abb. 3.1 B; Abb. 3.4E,F).

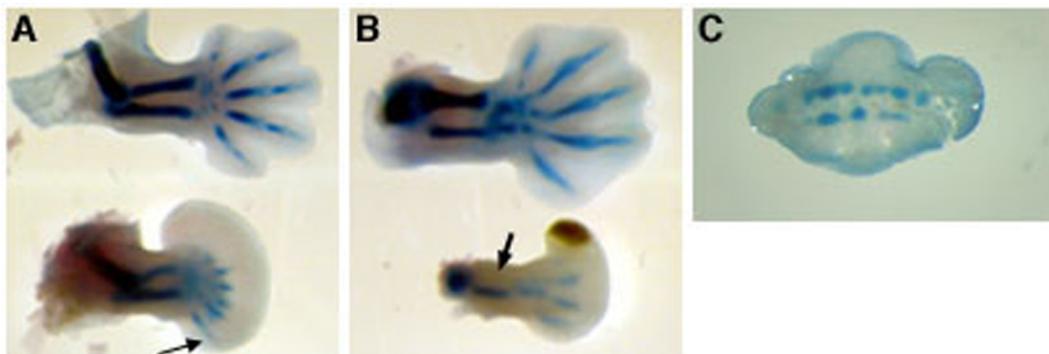


Abbildung 3.1 : Färbung der verknorpelten Strukturen von Wildtyp und *Ft/Ft* Gliedmaßen am Tag E14,5. In A und B ist jeweils oben eine Wildtyp-, unten eine *Ft/Ft* Extremität dargestellt. Die Gliedmaßen sind so orientiert, daß anterior oben und proximal links liegt. A) Die Alcian Blue Färbung zeigt die extreme

P/D-Verkürzung von Zeugo- und Autopod in den Vordergliedmaßen homozygoter *Ft*-Embryonen. Der Radius zeigt eine anomale Biegung. Im Autopod ist der komplette Verlust der Phalangen sichtbar; die Finger bestehen nur aus einem proximalen Element, das vermutlich einem Metacarpalen entspricht. Das posteriore Fingerelement überragt alle anderen im *Ft/Ft* Autopod und stellt sich im Vergleich zum Wildtyp nicht massiv verändert dar (Pfeil). **B**) Vergleich der Hinterextremitäten von Wildtyp- und *Ft/Ft*-Embryonen. Zusätzlich zu den für die Vordergliedmaßen genannten Veränderungen ist hier der Verlust der Tibia (Pfeil) und der beiden anterioren Zehenanlagen zu beobachten. Die dunkle Färbung im anterioren Teil der *Ft/Ft* Extremität wurde durch eine massive Blutung hervorgerufen. **C**) Querschnitt einer *Ft/Ft* Vorderextremität auf der Höhe der Metacarpalen. Diese proximalen Autopod-Elemente sind in der D/V-Achse dupliziert. In einer Reihe sind häufig mehr als fünf Kondensationen zu beobachten. Dorsal ist oben, anterior rechts.

Ein weiteres ungewöhnliches Merkmal der *Ft/Ft* Gliedmaßen ist eine Duplikation der proximalen Knorpel-elemente des Autopods in bezug auf die D/V-Achse, die im Querschnitt offensichtlich wird (Abb. 3.1C). Dieser Phänotyp tritt in 80% der Vordergliedmaßen auf und stellt sich in seiner Ausprägung variabel dar. Es können sowohl Duplikationen aller vorhandenen proximalen Fingerelemente als auch die Verdopplung nur einzelner Strukturen auftreten, wie durch Knorpel- und Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung gezeigt werden konnte (Abb. 3.1C; Abb. 3.2B,C). Hierbei können auch mehr als fünf Knorpel-elemente pro Reihe beobachtet werden, so daß es auch zu einer Erhöhung der Anzahl der Kondensationen in der A/P-Achse kommen kann (Abb. 3.1C; Abb. 3.4C). Die HE-Übersichtsfärbung der Querschnitte in Abb. 3.2 verdeutlicht zudem die extreme D/V-Verdickung des distalen Autopods, die im anterioren Teil besonders stark ausgeprägt ist.

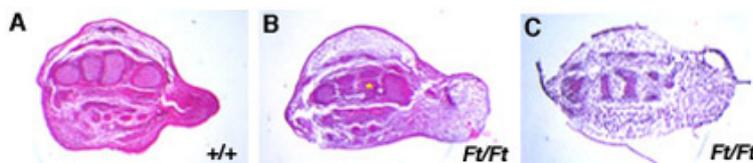


Abbildung 3.2 : Hämatoxylin/Eosin-Übersichtsfärbung von Querschnitten durch Wildtyp (A) bzw. *Ft/Ft* Vordergliedmaßen am Tag E14,5

(B,C) auf Höhe der Metacarpalen. Die dorsale Seite ist in allen Fällen oben, anterior ist rechts. **A**) Im Wildtyp ist das reguläre Muster der Kondensationen zu beobachten. **B,C**) zeigen zwei Beispiele für die Veränderungen in *Ft/Ft* Vordergliedmaßen. **B**) zeigt die Duplikation einer Kondensation (gelber Stern), in **C**) sind die drei zentralen Kondensationen in der D/V-Achse dupliziert. Darüberhinaus ist in **B**) und **C**) die Verdickung der D/V-Achse durch die distale Gewebewucherung besonders im anterioren Teil evident.

Für die Knochen-Knorpel-Färbungen in Abb. 3.1 wurden fünfzehn unabhängige Geschwisterpaare analysiert. Für alle folgenden Vergleiche zwischen Wildtyp und Mutante wurden, wenn nicht anders angegeben, mindestens sechs unabhängige Geschwisterpaare untersucht.

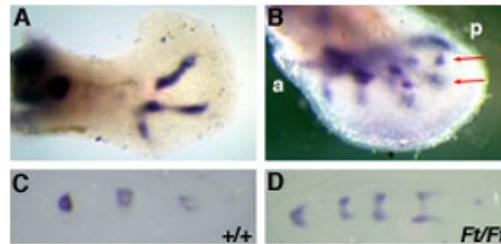
3.2 Expression von Kondensations-, Sehnen- und Gelenkmarkern in *Ft/Ft*

Gliedmaßenknospen

3.2.1 *Noggin*- und *Sox-9*-Expression

Zur detaillierten Charakterisierung der Fehlentwicklungen in *Ft/Ft* Gliedmaßen, sowie zur Untersuchung der Frage, ob die unter 3.1 beschriebenen Veränderungen schon früher in der Entwicklung manifestiert sind, wurde die Expression von *Noggin* und *Sox-9* analysiert. Beide Gene sind in den entstehenden Kondensationen exprimiert und das Muster ihrer Aktivität zeichnet die späteren Knorpelstrukturen vor, bevor diese morphologisch klar zu erkennen sind (Brunet et al., 1998; Bi et al., 1999). *Sox-9* ist darüberhinaus einer der frühesten Marker für prächondrogene Kondensationen und essentiell für die Knorpelentwicklung (Bi et al., 1999). Abb. 3.3 zeigt, daß die *Noggin*-Expression exakt mit den zwei Tage später beobachteten Veränderungen (s. 3.1) übereinstimmt. Sowohl der Verlust der anterioren Skelettelemente des Autopods der Hintergliedmaßen (Abb. 3.3A), als auch die Duplikation der Kondensationen in den Vorderextremitäten (Abb. 3.3B,D) sind am Tag E12,5 durch *Noggin*-Expression nachweisbar.

Abbildung 3.3 : *Noggin*-Expression in Gliedmaßenknospen am Tag E12,5. A) Dorsale Ansicht, anterior ist oben. In den Hintergliedmaßen von *Ft/Ft* Embryonen zeichnen sich drei Fingerstrahlen durch die Expression von *Noggin* ab. B) Ventrale Ansicht einer *Ft/Ft*



Vorderextremität, die zwei dorso-ventral versetzte Reihen von Kondensationen andeutet (rote Pfeile). C,D) Querschnitte von Wildtyp (C) und *Ft/Ft* (D) Vordergliedmaßen. Anterior ist dabei links, dorsal oben. C) Während die Expression von *Noggin* im Wildtyp eine Reihe von Kondensationen in einer Ebene abzeichnet, sind zwei parallele Reihen von Kondensationen, die in ihrem Durchmesser im Vergleich zum Wildtyp reduziert sind, in *Ft/Ft* Gliedmaßen zu beobachten (D). a = anterior, p = posterior.

Abb. 3.4A,D zeigen, daß die *Sox-9*-Expression am Tag E11,5, abgesehen von einer Verkleinerung der Domäne in *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen, normal ist. D.h. die initialen Prozeße der mesodermalen Kondensation im Zentrum der Gliedmaßenknospen sind in den Mutanten nicht gestört. Am Tag E12,5 zeichnet sich die Variabilität des Phänotyps, die schon durch die Analyse am Tag E14,5 festgestellt wurde (s. 3.1), ab. Die Vordergliedmaßen lassen fehlgebildete, verkürzte Kondensationen erkennen, von denen fünf (Abb. 3.4B) oder mehr (Abb. 3.4C) vorhanden sein können. Auch schon am Tag E12,5 zeichnet sich der Verlust der Tibia in den Hintergliedmaßen der Mutanten (Abb. 3.4E,F), sowie der variable Verlust des ersten (Abb. 3.4F) oder der ersten beiden (Abb. 3.4E) Zehenanlagen ab. Am Tag E13,5 sind im anterior/distalen Teil der Hinterextremitäten irreguläre, ektopische Kondensationen durch

Sox-9-Expression sichtbar (Abb. 3.4G). Diese scheinen aber nicht in reifen Knorpel zu differenzieren, da später an diesen Stellen nie Alcian Blue positive Kondensationen gefunden wurden (s. Abb. 3.1B).

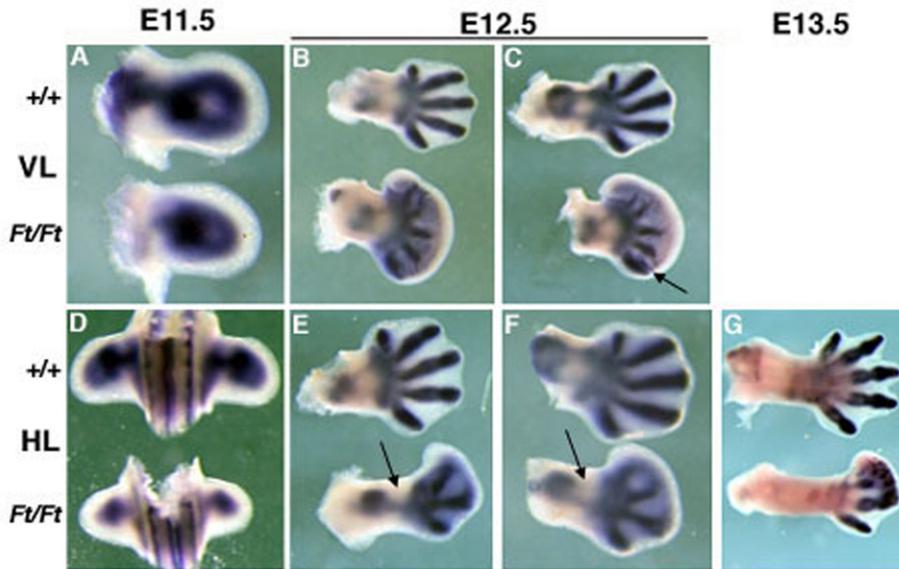


Abbildung 3.4 : *Sox-9*-Expression in *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen. Die obere Reihe (A-C) zeigt Vordergliedmaßenknospen (VL), die untere (D-G) Hintergliedmaßenknospen (HL), wobei oben im Bild jeweils die Wildtyp-Kontrolle, unten die *Ft/Ft* Extremität abgebildet ist. Anterior ist in allen Fällen oben, proximal links. A) An E11,5 ist außer einer

geringfügigen Verkleinerung der *Sox-9*-Expressionsdomäne in *Ft/Ft* Extremitäten keine Veränderung im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen. B,C) Am Tag E12,5 zeichnen sich in den Mutanten unregelmäßig angeordnete, verkürzte Kondensationen durch die Expression von *Sox-9* ab. Hier können fünf (B) oder mehr (C) Hauptstrahlen beobachtet werden. Der Pfeil in C deutet auf eine zusätzliche Kondensation in direkter Nachbarschaft zur posterioren Fingeranlage. D) In E11,5 Hintergliedmaßenknospen ist die Expressionsdomäne von *Sox-9* drastischer verkleinert als im vorderen Extremitätenpaar (vergleiche mit A), da auch die Gesamtgröße der Knospen extrem reduziert ist. E,F) am Tag E12,5 zeigt sich die Variabilität des Phänotyps durch die Expression von *Sox-9* in drei (E) bzw. vier (F) Zehenanlagen. Auch der Verlust der Tibia läßt sich in diesem Stadium erkennen (Pfeile). G) Am Tag E13,5 sind irreguläre, ektopische *Sox-9*-exprimierende Aggregate im anterior/distalen Mesoderm der Hintergliedmaßen in den Mutanten zu erkennen. Der posteriore Fingerstrahl ist nur minimal verkürzt im Vergleich zum Wildtyp.

3.2.2 *Pax-9*-Expression

Wie oben beschrieben, fehlen den *Ft/Ft* Hintergliedmaßen anteriore Skelettelemente des Zeugo- und Autopods. Zur Analyse der Frage, ob diese Deletion anterioren Gewebes auch schon zu frühen Zeitpunkten der Gliedmaßenentwicklung vorhanden ist, wurde die Expression von *Pax-9* untersucht. *Pax-9* wird in einer distinkten Domäne im anterioren Mesoderm der frühen Gliedmaßenknospe exprimiert und sein Verlust führt zu präaxialer Polydaktylie (Peters et al., 1998). Wie in Abb. 3.5A gezeigt, ist *Pax-9* normal in den Vordergliedmaßen der *Ft/Ft* Embryonen an E11,5 exprimiert. Im hinteren Extremitätenpaar allerdings fehlt diese Expressionsdomäne (Abb. 3.5B). Das heißt, daß schon zu diesem frühen

Zeitpunkt der Gliedmaßenentwicklung ein Verlust von anteriorem Mesoderm in *Ft/Ft* Hinterextremitäten detektiert werden kann.

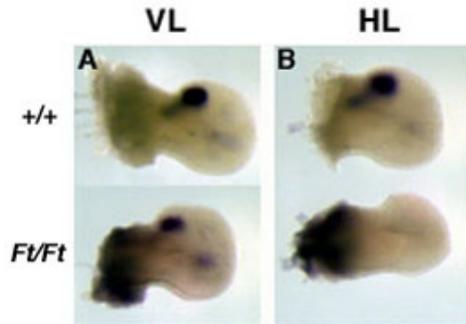


Abbildung 3.5 : *Pax-9*-Expression in E11,5 Gliedmaßenknospen. Anterior ist in allen Fällen oben, distal rechts. **A)** In den Vordergliedmaßenknospen (VL) von Wildtyp (oben) und homozygotem *Ft*-Embryo (unten) ist *Pax-9* in einer anterioren mesodermalen Domäne exprimiert. **B)** In *Ft/Ft* Hintergliedmaßenknospen (HL, unten) fehlt die *Pax-9*-Expressionsdomäne.

3.2.3 *Sek-1*-Expression

Zur Untersuchung, ob mit der Duplikation der Kondensationen in den Vordergliedmaßen der Mutanten auch eine Duplikation der Sehnen einhergeht und um hierüber möglicherweise eine Definition der Polaritäten der beiden Kondensationsreihen zu erreichen, wurde die Expression von *Sek-1* (*Eph-A4*), einem der frühesten Marker für die sich entwickelnden Sehnen (Patel et al., 1996), analysiert. Im Wildtyp ist *Sek-1* nur in den ventralen Sehnen der sich entwickelnden Finger exprimiert (Abb. 3.6A). Die ventrale Ansicht der Gliedmaßenknospen in Abb. 3.6B zeigt, daß die Sehnendifferenzierung in *Ft/Ft* Extremitäten schwerwiegend verändert ist. Nur im ventralen anterioren Teil der Knospe konnte *Sek-1*-Expression detektiert werden, allerdings auch hier nicht im normalen Muster. D.h. den duplizierten Kondensationen fehlen wohldefinierte Sehnen, was auch die Bestimmung ihrer D/V-Polarität verhindert.

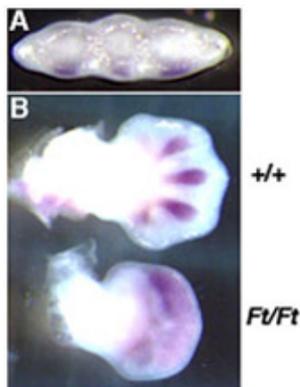


Abbildung 3.6 : *Sek-1*-Expression in E14,5 Gliedmaßenknospen. **A)** 80 μm -Vibratom-Querschnitt durch den distalen Teil einer Wildtypextremität zeigt *Sek-1*-Expression in den sich entwickelnden Sehnen ventral der Kondensationen. **B)** Ventrale Ansichten von Wildtyp (oben) und *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen (unten), anterior ist oben. Während im Wildtyp *Sek-1*-Expression in einem regelmäßigen Muster in den sich entwickelnden ventralen Sehnen zu beobachten ist, ist diese in den homozygoten *Ft*-Gliedmaßenknospen auf eine kleine anteriore Domäne beschränkt, die kein geordnetes, mit dem Wildtyp vergleichbares, Muster erkennen läßt.

3.2.4 *Gdf-5*-Expression

Zur weiteren Charakterisierung dieses ungewöhnlichen Gliedmaßenphänotyps wurde die Expression von *Gdf-5* als Marker für Gelenke (Storm et al., 1994) untersucht. Am Tag E14,5 ist *Gdf-5* stark in allen Gelenken des Wildtyp-Autopods exprimiert (Abb. 3.7 A,B,C). Dieses

Muster ist in *Ft/Ft* Gliedmaßen auffällig verändert. In den Vordergliedmaßen ist *Gdf-5* nur im posterioren Fingeransatz in den charakteristischen zwei Streifen, die die bis dahin spezifizierten Gelenke repräsentieren, exprimiert (Abb. 3.7A). Nur an der Spitze der nach anterior hierauf folgenden Kondensation ist *Gdf-5* schwach exprimiert, jedoch überhaupt nicht in den weiter anterioren Fingerstrahlen (Abb. 3.7A,D), was darauf hindeutet, daß es hier nicht zur Differenzierung von Gelenkstrukturen kommt. Darüberhinaus konnte eine starke ektopische *Gdf-5*-Transkription in den proximalen Regionen der Interdigitalräume zwischen den prominenten Fingerstrahlen beobachtet werden (Abb. 3.7A,D). Auch die Hintergliedmaßen zeigen kein normales Gelenkmuster. Hier kommt es zwar mit Ausnahme der anterioren Zehenanlage zur Ausbildung des Gelenkes distal der Metatarsalen und gelegentlich dem ersten interphalangealen Gelenk, alle übrigen Gelenke fehlen jedoch (Abb. 3.7B). Wie auch in den Vordergliedmaßen zeigt die posteriore Kondensation ein normales Muster der *Gdf-5*-Expression, was den Befund der Knochen-Knorpel-Färbungen (s. 3.1) bestätigt, daß diese Zehenanlage nicht von den drastischen Veränderungen, die in den anderen zu beobachten sind, betroffen ist. In einigen Fällen konnte auch eine zweite *Gdf-5*-Expressiondomäne in der nach anterior folgenden Kondensation beobachtet werden. Die Position dieses entstehenden Gelenks suggeriert eine Verzweigung oder anomale Biegung der betreffenden Kondensation (Abb. 3.7B).

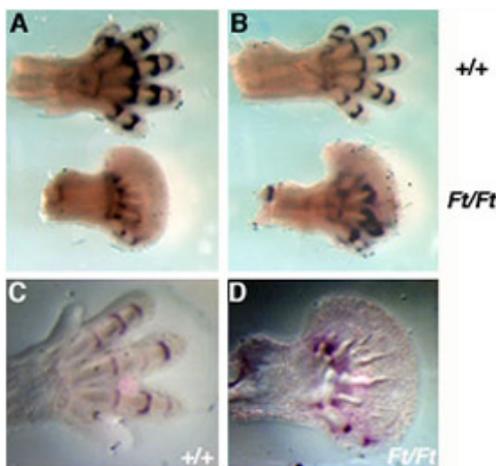


Abbildung 3.7 : *Gdf-5*-Expression am Tag E14,5. In **A** und **B** ist jeweils oben eine Wildtyp-Kontrolle, unten eine *Ft/Ft* Extremität dargestellt. Die Gliedmaßen sind so orientiert, daß anterior oben und distal rechts ist. **A**) In den Vordergliedmaßen ist nur im posterioren Fingerstrahl der *Ft/Ft* Extremität das normale *Gdf-5*-Expressionsmuster zu detektieren. Im nach anterior nächstfolgenden Fingerstrahl ist die *Gdf-5*-Transkription auf das distale Ende der Kondensation beschränkt. In allen anderen Kondensationen fehlt die *Gdf-5*-Expression vollständig. Zwischen den Hauptfingerstrahlen ist eine

starke ektopische *Gdf-5*-Expression nachweisbar. **B**) Mit Ausnahme der anterioren Kondensation ist *Gdf-5* an der Spitze der rudimentären Zehenanlagen in *Ft/Ft* Hintergliedmaßen exprimiert. Die posteriore Kondensation zeigt ein normales Muster der *Gdf-5*-Transkription, während die Lokalisation der *Gdf-5*-Transkripte im nach anterior folgenden Zehenansatz eine anomale Biegung dieser Kondensation nach posterior impliziert. **C**) 100 μ m-Vibratom-Schnitt zeigt das normale *Gdf-5*-Expressionsmuster in den Gelenken einer Wildtypextremität. **D**) zeigt *Gdf-5*-Expression wie in **A** für *Ft/Ft* beschrieben. Darüberhinaus zeigt dieser Schnitt ektopische Kondensationen im anterior/distalen Bereich der Knospe, die irregulär zwischen den Hauptfingerstrahlen angeordnet und nicht mit den Knochen des Handtellers in Verbindung sind.

Zusammenfassend kommt es also in den Extremitäten der homozygoten *Ft*-Embryonen weder zu einer normalen Knorpel-, Sehnen- noch Gelenkbildung in dem Bereich, der von der ektopischen Gewebewucherung betroffen ist. Das posteriore Skelettelement ist bis auf eine minimale Verkürzung nicht von diesen Veränderungen betroffen. Dies gilt sowohl für das vordere als auch das hintere Extremitätenpaar. Spezifisch für die Vordergliedmaßen ist die Duplikation der proximalen Elemente des Autopods, während in den Hinterextremitäten anteriore Skelettelemente wie Tibia und anteriore Zehen fehlen.

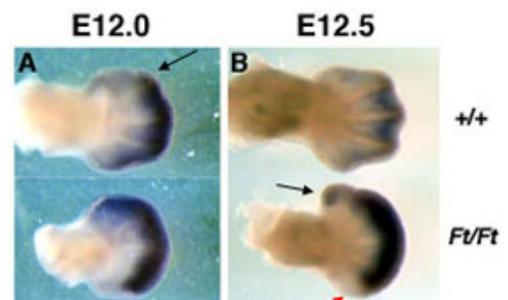
Bei den folgenden molekularen Analysen werden i.d.R. nur die Vordergliedmaßenknospen gezeigt. Wenn nicht besonders darauf hingewiesen wird, gelten die gleichen Veränderungen auch für das hintere Extremitätenpaar.

3.3 *Wnt-5a*-Expression in *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen

Die distalen Verstümmelungen der Kondensationen in den Extremitäten homozygoter *Ft*-Embryonen haben Ähnlichkeit zum Gliedmaßenphänotyp von *Wnt-5a*^{-/-}-Mäusen, in deren Extremitäten auch ein Verlust der distalen Phalangen zu beobachten ist (Yamaguchi et al., 1999). Aus diesem Grund wurde die Expression von *Wnt-5a* in den Extremitäten homozygoter *Ft*-Embryonen untersucht. Am Tag E12,0 ist die *Wnt-5a*-Expressionsdomäne in den Mutantengliedmaßenknospen anterior expandiert, wohingegen der posteriore Bereich des Autopods frei von *Wnt-5a*-Transkripten ist (Abb. 3.8A). Wie auch am Tag E12,0, ist in E12,5 *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen keine Reduktion der *Wnt-5a*-Transkription zu erkennen. Die Expression ist im Gegenteil offensichtlich sogar stärker als in Wildtyp-Kontrollen (Abb. 3.8B). Die distalen Verstümmelungen der *Ft/Ft* Extremitäten sind somit nicht auf eine verminderte *Wnt-5a*-Expression zurückzuführen.

Abbildung 3.8 : *Wnt-5a*-Expression in *Ft/Ft* Vordergliedmaßenknospen.

Die obere Reihe zeigt jeweils eine Wildtyp-Kontrolle, unten sind die Mutantengliedmaßen dargestellt. In allen Fällen ist jeweils anterior oben und distal rechts. **A)** Am Tag E12,0 ist *Wnt-5a* im Wildtyp wie in der Mutante stark im distalen Mesoderm exprimiert. Der Pfeil deutet auf die anteriore Expressionsgrenze von *Wnt-5a* im Wildtyp. Zu diesem Zeitpunkt ist eine anteriore Expansion der *Wnt-5a*-Expressionsdomäne in *Ft/Ft* Extremitäten zu beobachten. **B)** Am Tag E12,5 ist im Wildtyp eine schwächere Transkription von *Wnt-5a* im distalen interdigitalen Mesenchym und an den Spitzen der entstehenden Kondensationen zu beobachten. In der Mutante wird *Wnt-5a* stark in der distalen Gewebewucherung exprimiert. Am anterioren Rand ist eine ektopische Domäne von *Wnt-5a*-Transkripten zu detektieren (Pfeil). Der posteriore Bereich der Extremität hingegen ist frei von *Wnt-5a*-Expression (rote Pfeilspitze).



3.4 Veränderte Aktivitäten der Fgf- und Bmp-Signalwege in *Ft/Ft*

Gliedmaßenknospen

Zur Analyse der molekularen Basis dieses komplexen Gliedmaßenphänotyps wurde die Expression verschiedener Gene, die Bestandteile der für die Gliedmaßenentwicklung essentiellen Signalwege sind, analysiert. Die distalen Verstümmelungen der Kondensationen in *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen suggerieren zunächst eine Veränderung der AER-Struktur und/oder AER-Funktion. Diese Annahme wird weiter bestärkt durch die Analyse der Extremitäten heterozygoter *Ft*-Embryonen, in denen eine vorzeitige Regression der AER festgestellt wurde (s. 1.4.7). Wie in Abb. 3.9A gezeigt, kommt es auch im distalen Bereich der AER in *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen zu einer vorzeitigen Verminderung der *Fgf-8*-Expression. Im posterioren Teil der AER ist *Fgf-8* hingegen normal exprimiert, anterior sogar hochreguliert (Abb. 3.9A). Ein weiteres Phänomen offenbart die distale Ansicht dieser Gliedmaßenknospen. In der distalen Region kommt es neben der Runterregulation auch zu einer Aufspaltung der *Fgf-8*-Expressionsdomäne in zwei Streifen, die außerdem nicht kontinuierlich sind, sondern einige Unterbrechungen aufweisen (Abb. 3.9B), was indikativ für eine Strukturveränderung der AER ist. Diese verminderte *Fgf-8*-Expression im Ektoderm führt auch zu einer reduzierten Expression des *Fgf-8*-Zielgens *Fgf-10* im distalen Mesoderm (Abb. 3.9C), was die verminderte Aktivität des Fgf-Signalwegs im distalen Bereich des Autopods von *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen belegt.

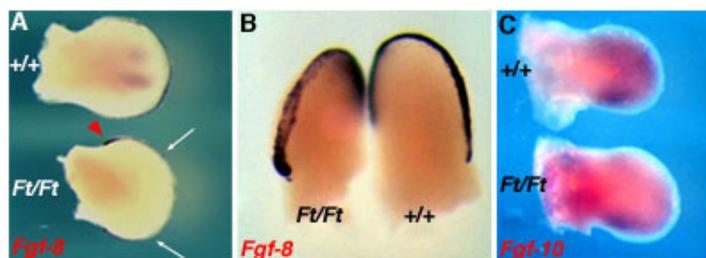


Abbildung 3.9 : Reduzierte Expression von *Fgf*-Familienmitgliedern im distalen Bereich der *Ft/Ft* Gliedmaßenknospe. **A)** Oben : Wildtypextremität zeigt die normale *Fgf-8*-Expression am Tag E12.0 in der

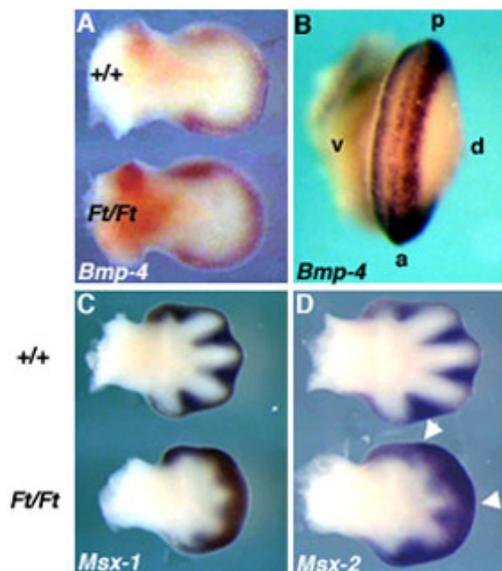
AER. In der Mutante (unten) ist die *Fgf-8*-Expression im distalen Bereich der AER drastisch reduziert (weiße Pfeile), während sie anterior sogar hochreguliert ist (rote Pfeilspitze). **B)** Distale Ansicht von E11,5 Gliedmaßenknospen, links : Mutante, rechts : Wildtyp. In der Mutantenextremität kommt es zu einer Aufspaltung der *Fgf-8*-Expressionsdomäne, die auch sporadische Unterbrechungen aufweist. **C)** Die *Fgf-10*-Expression ist reduziert im distalen Mesoderm der *Ft/Ft* Gliedmaßenknospe am Tag E11,5.

Während der Gliedmaßenentwicklung sind antagonistische Interaktionen der Fgf- und Bmp-Signalwege beschrieben worden (Buckland et al., 1997; Macias et al., 1997; Zou et al., 1997; Zuniga et al., 1999). Auch in den Extremitäten heterozygoter *Ft*-Embryonen ist die Verminderung der *Fgf-8*-Expression von einer Überaktivität des Bmp-Signalwegs begleitet (s. 1.4.7). *Bmp-2*, -4 und -7 werden während der Gliedmaßenentwicklung in sehr ähnlichen

Mustern exprimiert, so daß exemplarisch die Expression von *Bmp-4* analysiert wurde. *Bmp-4* ist ab E11,5 im anterioren und distalen Mesoderm der *Ft/Ft* Gliedmaßenknospe stärker exprimiert als in vergleichbaren Wildtyp-Kontrollen, während die Expression in der distalen AER ähnlich wie die von *Fgf-8* diskontinuierlich ist (Abb. 3.10A,B). Zur Untersuchung, ob diese erhöhte mRNA-Expression auch zu einer höheren Aktivität des Signalwegs führte, wurde die Expression der Bmp-Zielgene *Msx-1* und *-2* analysiert. Beide Gene sind von E11,5 bis ungefähr E13,0 hochreguliert, so daß es zu einer Verbindung der interdigitalen Expressionsdomänen ab E12,5 kommt, die im anterioren Bereich besonders stark ausgeprägt ist (Abb. 3.10C,D). Zwischen E11,5 und E13,0 ist also eine Überfunktion des Bmp-Signalwegs und eine Unterfunktion des Fgf-Signalwegs im Autopod der *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen festzustellen.

Abbildung 3.10 : Überexpression von *Bmp-4* und den Bmp-Zielgenen *Msx-1* und *-2*.

A) Im anterioren und distalen Mesoderm von E11,5 *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen ist die Expression von *Bmp-4* im Vergleich zum Wildtyp (oben) hochreguliert. Anterior ist oben, distal rechts. **B)** Distale Ansicht einer E11,5 *Ft/Ft* Gliedmaßenknospe zeigt die starken *Bmp-4*-Expressionsdomänen im distalen Mesoderm, die unterschiedliche Distanzen von der AER haben, während die AER-Färbung für *Bmp-4*-Transkripte Unterbrechungen im distalen Bereich zeigt. In **C,D** ist jeweils oben im Bild eine Wildtyp-gliedmaßenknospe, unten die eines *Ft/Ft* Embryos dargestellt, wobei anterior oben und distal rechts ist. **C)** Die *Msx-1*-Expression ist hochreguliert in *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen am Tag E12,5, so daß es zu einer Verbindung der interdigitalen Expressionsdomänen kommt. **D)** Das gleiche gilt für die *Msx-2*-Expression am Tag E12,5. Die massive Überexpression ist im anterioren Teil der Knospe besonders betont (weiße Pfeilspitzen). a = anterior, d = dorsal, p = posterior, v = ventral.



3.5 *Bmp-Irx* Interaktion

Wie bereits unter 1.4.7 beschrieben, führte die Transgen-Integration, die die *Ft*-Mutation hervorrief, zur Deletion des *Irx*-Genkomplexes auf Chromosom 8, der *Irx-3*, *-5* und *-6* umfaßt. Im Frosch konnte gezeigt werden, daß das *Irx*-Homolog *Xiro1* die *Bmp-4*-Expression negativ reguliert und *Bmp-4* wiederum *Xiro1*-Expression reprimiert (Gomez-Skarmeta et al., 2001). Die *Ft*-Mutante eignet sich zur Analyse der Frage, ob ein ähnlicher Regelkreis auch in den Gliedmaßenknospen der Maus realisiert ist, da hier wie gesagt drei der sechs *Irx*-Gene deletiert sind und es zu einer Hochregulation der *Bmp*-Expression kommt. Für diese Analysen

wurden heterozygote Embryonen aufgrund ihrer leichteren Verfügbarkeit genutzt. Von den in *Ft*-Mutanten nicht-deletierten *Irx*-Genen ist *Irx-1* stark im distalen Mesoderm in einem A/P-gerichteten Gradienten exprimiert (Abb. 3.11A,B; Houweling et al., 2001; Zülch et al., 2001), so daß sich die in diesem Bereich erhöhte *Bmp*-Aktivität bei der mutmaßlichen regulatorischen Interaktion zwischen *Bmp* und *Irx* auf die Expression dieses Gens auswirken sollte. Abb. 3.11A,B zeigen, daß *Irx-1* in der Tat von E11,75 bis E12,0 transient schwächer exprimiert ist als in Wildtyp-Kontrollen. Die verminderte Expression ist im anterioren Teil des distalen Mesoderms besonders ausgeprägt, während am Tag E12,0 der posteriore Teil der *Irx-1*-Expressionsdomäne sichtbar wird; allerdings ist auch diese Domäne wesentlich schwächer als im Wildtyp (Abb. 3.11A,B). Am Tag E12,5 hat die *Irx-1*-Expression fast das normale Niveau erreicht und ist nun auch im anterioren Bereich der Knospe nachzuweisen (Abb. 3.11C). Abb. 3.11D zeigt darüberhinaus, daß die transiente Verringerung der *Irx-1*-Expression spezifisch für die Regionen der *Bmp*-Überaktivität in den sich entwickelnden Gliedmaßen ist, da *Irx-1* in anderen Bereichen des Embryos in seiner normalen Stärke in heterozygoten *Ft*-Embryonen exprimiert ist.

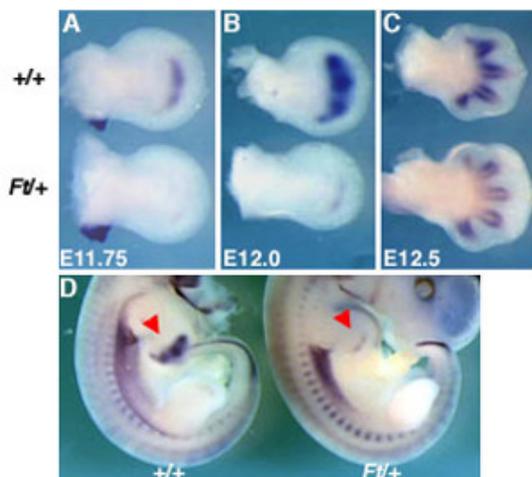


Abbildung 3.11 : *Irx-1*-Expression in *Ft/+* Gliedmaßenknospen. In A-C ist oben jeweils eine Wildtypextremität, unten die eines *Ft/+*-Embryos dargestellt. Sie sind so orientiert, daß anterior oben und distal rechts ist. A) Am Tag E11,75 ist in Wildtypgliedmaßenknospen eine sichelförmige *Irx-1*-Expressionsdomäne im distalen Mesoderm nachweisbar, während diese in den Mutantenknospen fast komplett fehlt. B) Am Tag E12,0 ist diese Domäne im Wildtyp deutlich vergrößert und zeigt eine von anterior nach posterior abnehmende Transkription von *Irx-1*. In den

Ft/+ Gliedmaßenknospen ist nur der posteriore Teil dieser Expressionsdomäne rudimentär vorhanden. C) Am Tag E12,5 ist die *Irx-1*-Transkription auf das Perichondrium beschränkt. Auch in der Mutante ist nun im anterioren Bereich der Knospe *Irx-1* detektierbar. Insgesamt hat die Expressionsstärke fast das Niveau des Wildtyps erreicht. D) links : Wildtyp-Embryo, rechts *Ft/+*. Die Reduktion der *Irx-1*-Expression ist spezifisch für die Vordergliedmaßenknospen (rote Pfeilspitzen), da die Transkription in anderen Bereichen des Embryos, wie z.B. dem Somitenmesoderm, nicht reduziert ist.

3.6 *Lmx-1b*-Expression in *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen

Aufgrund der beschriebenen Veränderungen der Kondensationen in *Ft/Ft* Vordergliedmaßen in bezug auf die D/V-Achse der Extremität, wurde die Expression von *Lmx-1b* untersucht. *Lmx-1b* ist im Wildtyp spezifisch im dorsalen Mesoderm exprimiert und ist notwendig für die

Spezifizierung dorsaler Identität (Riddle et al., 1995; Vogel et al., 1995; s. 1.4.3). In E11,5-E12,5 *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen ist *Lmx-1b* bis auf den anterioren Rand der Extremität, wo auch im ventralen Mesoderm *Lmx-1b*-Transkripte detektiert werden konnten, normal exprimiert (Abb. 3.12). Die anteriore Region der ektopischen ventralen *Lmx-1b*-Expression (Abb. 3.12B) entspricht ungefähr der der diskontinuierlichen *Fgf-8*-Expression (s. Abb. 3.9B).

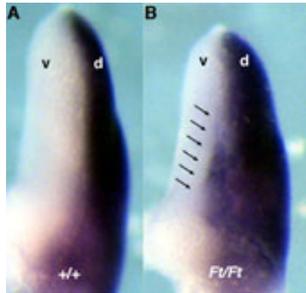


Abbildung 3.12 : *Lmx-1b*-Expression in E11,5 *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen. Anteriore Ansichten von Wildtyp (A) und *Ft/Ft* (B) Gliedmaßen, dorsal ist rechts. A) *Lmx-1b*-Expression im dorsalen Mesoderm der Wildtypextremität. B) Am anterioren Rand der Mutantenextremität ist eine kleine ektopische ventrale *Lmx-1b*-Expressionsdomäne nachweisbar (Pfeile). d = dorsal, v = ventral.

3.7 Expression von A/P-Markergenen in *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen

Da die Anzahl der Kondensationen in den *Ft/Ft* Vordergliedmaßenknospen in der A/P-Achse fünf übersteigen kann (s. 3.1), wurde die Expression von *Shh*, das maßgeblich die Anzahl und Identität der Skelettelemente bestimmt (s. 1.4.4), analysiert. Am Tag E11,5 ist *Shh* normalerweise in einem definierten Bereich des posterioren Mesoderms (ZPA) exprimiert (Abb. 3.13A, s. 1.4.4). In den Gliedmaßenknospen von *Ft/Ft*-Embryonen ist zu diesem Zeitpunkt immer eine distale Expansion dieser Domäne zu beobachten. Häufig reicht diese Domäne über bis zu zwei Drittel der A/P-Achse nach anterior (Abb. 3.13B). In den Hintergliedmaßenknospen kann an E12,5 darüberhinaus eine kleine ektopische *Shh*-Expressionsdomäne am anterioren Rand detektiert werden (Abb. 3.13C).

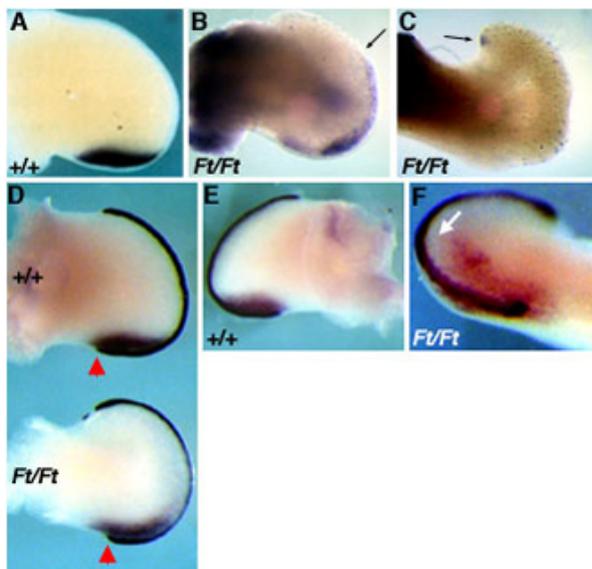


Abbildung 3.13 : *Shh*-Expression in *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen. Extremitäten in A-D sind so orientiert, daß anterior oben und distal rechts ist. A) E11,5 Wildtypgliedmaßenknospe, die *Shh*-Expression in der ZPA zeigt. B) In *Ft/Ft* Extremitäten ist der Bereich der *Shh*-Expression weit nach anterior/distal expandiert (Pfeil). C) Am Tag E12,5 ist eine ektopische *Shh*-Expressionsdomäne im anterioren Mesenchym der *Ft/Ft* Hintergliedmaßenknospen zu detektieren (Pfeil). D) Die *Shh/Fgf-8*-Doppelfärbung am Tag E11,5 zeigt, daß das proximale Ende von ZPA und AER im Wildtyp (oben) fast genau überlappen (rote

Pfeilspitze), während in *Ft/Ft* Vordergliedmaßenknospen (unten) eine größere Distanz zwischen den proximalen Endpunkten von ZPA und AER liegt (rote Pfeilspitze). Hier ist ebenfalls die distale Expansion der *Shh*-Expression und die Runterregulation der *Fgf-8*-Transkription im distalen Teil der AER erkennbar. **E)** Die E11,5 Wildtypgliedmaßenknospe zeigt die direkt aneinander grenzenden Expressionsdomänen von *Fgf-8* und *Shh*. Distal ist links, anterior oben. **F)** Ventrale Ansicht. In *Ft/Ft* Vorderextremitäten besteht ein Spalt nicht-*Shh*-exprimierender Zellen zwischen der AER und dem ventralen Teil der ZPA (weißer Pfeil).

Die Doppelfärbung für *Shh*- und *Fgf-8*-Transkripte offenbart zwei weitere interessante Merkmale der *Ft/Ft* Vordergliedmaßen. Im Wildtyp entspricht das proximale Ende der *Shh*-Expression ungefähr der Position, an der auch die AER endet (Abb. 3.13D). In *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen hingegen liegt zwischen diesen beiden Punkten eine deutlich größere Distanz, was entweder eine proximale Ausdehnung der ZPA oder eine A/P-Verkürzung der AER suggeriert (Abb. 3.13D). Darüberhinaus grenzen im Wildtyp die Expressionsdomänen von *Shh* und *Fgf-8* direkt aneinander (Abb. 3.13E), wohingegen sich in der Mehrzahl der *Ft/Ft* Vordergliedmaßenknospen der ventrale Teil der *Shh*-Expressionsdomäne nach anterior von der AER entfernt, wodurch eine deutliche Lücke von Zellen, die nicht *Shh* exprimieren zwischen AER und diesem Teil der ZPA entsteht (Abb. 3.13F).

Zur Untersuchung der Frage, ob diese erhöhte Expression von *Shh* auch zur Überfunktion des Shh-Signalwegs führt, wurde die Expression diverser Shh-Zielgene analysiert. Die Untersuchung vieler polydaktyler Mausmutanten hat gezeigt, daß ektopische *Shh*-Expression im anterioren Mesoderm zu ektopischer Transkription von verschiedenen *Fgf*-Genen in der AER führt (s. 1.4.4). Obwohl in den Vordergliedmaßenknospen zu keinem Zeitpunkt eine distinkte anteriore *Shh*-Expressionsdomäne nachgewiesen werden konnte, ist, wie bereits gezeigt, schon am Tag E11,5 eine Hochregulation von *Fgf-8* am anterioren Rand der AER zu beobachten (s. Abb. 3.9A). Auch einen Tag später, wenn ansonsten keine *Fgf-8*-Expression mehr nachweisbar ist, wird eine sehr kleine Expressionsdomäne von *Fgf-8* hier aufrechterhalten (Abb. 3.14A). Diese Domäne ist in den Hintergliedmaßen, die anterior *Shh*-Expression zeigen, deutlicher ausgeprägt (Abb. 3.14B). Auch *Fgf-4*, dessen Expression normalerweise auf die posterioren zwei Drittel der AER beschränkt ist, ist am Tag E12,5 ektopisch anterior aktiviert. Ebenso zeigt *Ptc-1*, das einen Bestandteil des Shh-Rezeptors kodiert und ein direktes Zielgen der Shh-Kaskade ist, eine vergrößerte und nach anterior expandierte Domäne der Transkription (Abb. 3.14D). *Gremlin*, das entscheidend für die Etablierung des *Shh/Fgf*-Regelkreises ist und sowohl von Shh, als auch Bmp positiv reguliert wird (s. 1.4.4), zeigt eine Erhöhung und anteriore Expansion seiner Expression (Abb. 3.14E). Darüberhinaus ist ein Mitglied der T-Box-Genfamilie, *Tbx-2*, dessen Expression am Tag

E12,5 im Wildtyp auf den posterioren Bereich begrenzt ist, in *Ft/Ft* Vordergliedmaßenknospen ektopisch anterior aktiviert (Abb. 3.14F).

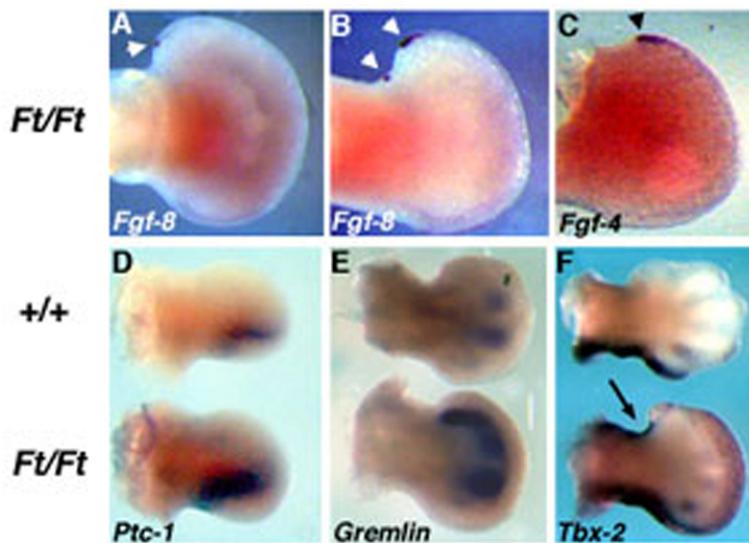


Abbildung 3.14 : Expression von Shh-Zielgenen in *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen. Alle Extremitäten sind so orientiert, daß anterior oben und distal rechts ist. In **D-F** ist jeweils in der oberen Reihe eine Wildtyp-gliedmaßenknospe, unten die eines *Ft/Ft*-Embryos dargestellt. **A**) Die *Fgf-8*-Expression ist in einer kleinen Domäne in der anterioren AER (weiße Pfeilspitze) von *Ft/Ft* Vordergliedmaßenknospen am Tag E12,5 aufrechterhalten. **B**) In der

Hintergliedmaßenknospe sind zwei Domänen fortbestehender, bzw. ektopischer Aktivierung von *Fgf-8* an E12,5 detektierbar (weiße Pfeilspitzen). **C**) *Fgf-4* ist in einer E12,5 *Ft/Ft* Hintergliedmaßenknospe ektopisch am anterioren Ende der AER exprimiert (Pfeilspitze). **D**) Die *Ptc-1*-Expressionsdomäne ist in E11,5 *Ft/Ft* Vordergliedmaßenknospen distal und anterior expandiert. **E**) *Gremlin* ist in E12,0 *Ft/Ft* Vordergliedmaßenknospen stärker exprimiert als im Wildtyp. Darüberhinaus ist der Bereich der *Gremlin*-Transkription nach anterior vergrößert. **F**) *Tbx-2* ist in E12,5 *Ft/Ft* Vordergliedmaßenknospen ektopisch im anterioren Mesoderm exprimiert (Pfeil).

Weiterhin ist die Expression der 5'-Mitglieder des *HoxD*-Komplexes (*HoxD-11*, *-12*, *-13*), die eine wichtige Funktion für die Differenzierung des Autopod-Skeletts haben und auch positiv von *Shh* reguliert werden (Masuya et al., 1995; Zakany und Duboule, 1999) sowohl in den Vorder- als auch in den Hintergliedmaßenknospen nach anterior erweitert (Abb. 3.15). Konsistent mit der distal expandierten *Shh*-Expressionsdomäne sind also auch die Bereiche der Transkription von verschiedenen Zielgenen der *Shh*-Kaskade expandiert. Darüberhinaus läßt sich allerdings für alle untersuchten *Shh*-Zielgene eine ektopische Aktivierung am anterioren Rand der Extremität detektieren, ohne daß *Shh* selbst hier in nachweisbaren Größenordnungen überexprimiert ist.

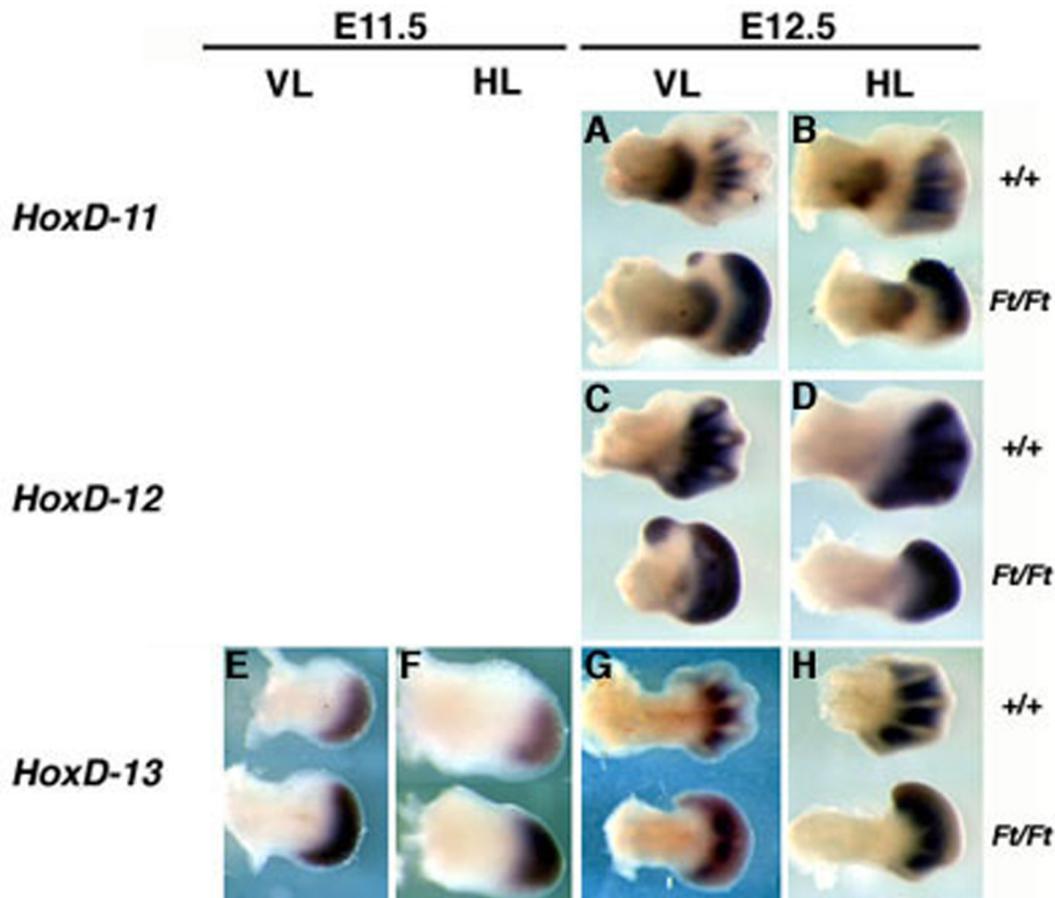
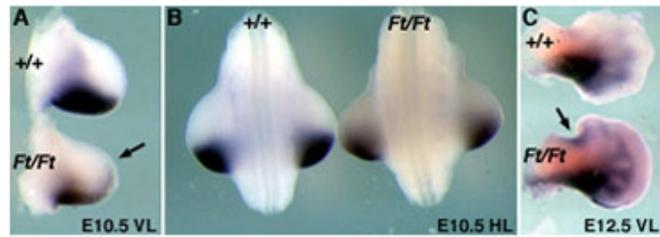


Abbildung 3.15 : Expression von *HoxD-11*, *-12* und *-13* in *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen. Alle Extremitäten sind so orientiert, daß anterior oben und distal rechts ist. In jedem Bild ist oben eine Wildtypgliedmaßenknospe, unten die eines *Ft/Ft*-Embryos dargestellt. **A,B)** *HoxD-11* ist ektopisch anterior in E12,5 *Ft/Ft* Vordergliedmaßenknospen (VL, **A**) und Hintergliedmaßenknospen (HL, **B**) exprimiert. Das gleiche gilt für *HoxD-12* (**C,D**). **E-H)** Die *HoxD-13*-Expression ist hochreguliert und anterior expandiert in E11,5 und E12,5 *Ft/Ft* Vorder- (**E,G**) und Hintergliedmaßenknospen (**F,H**).

Für die Etablierung der A/P-Asymmetrie der Extremität ist, wie unter 1.4.5 beschrieben, auch der Transkriptionsfaktor *dHAND* von entscheidender Bedeutung. In *Ft/Ft* Vorderextremitäten ist die *dHAND*-Expression am Tag E10,5, also schon bevor die vergrößerte *Shh*-Expressionsdomäne detektierbar ist, distal expandiert (Abb. 3.16A). In den Hintergliedmaßenknospen ist die Expression zu diesem Zeitpunkt hingegen unverändert (Abb. 3.16B). Am Tag E12,5 ist auch *dHAND* ektopisch im anterioren Mesoderm der *Ft/Ft* Vordergliedmaßenknospen exprimiert (Abb. 3.16C).

Abbildung 3.16 : *dHAND*-Expression in *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen. **A**) In E10,5 *Ft/Ft* Vordergliedmaßenknospen (VL) ist die *dHAND*-Expressionsdomäne distal expandiert (Pfeil). **B**) Dorsale Ansicht von E10,5 Wildtyp (links) und *Ft/Ft* Hintergliedmaßenknospen (HL). *dHAND*-Transkription ist hier unverändert. **C**) Im anterioren Mesenchym der *Ft/Ft* Vorderextremität (unten) ist ektopische Expression von *dHAND* am Tag E12,5 nachweisbar (Pfeil). Gliedmaßenknospen in **A** und **C** sind so orientiert, daß anterior oben und distal rechts ist.



In der Entwicklung der *Ft/Ft* Gliedmaßen ist also eine Fehlregulation sowohl des Shh-, des Fgf-, als auch des Bmp-Signalwegs zu beobachten. Besonders interessant für das Verständnis des Phänotyps ist sicherlich die gesteigerte Aktivität des Bmp-Signalwegs, die auch in heterozygoten *Ft*-Embryonen zu beobachten ist und hier offensichtlich zur Syndaktylie führt. Interessant wird der Bmp-Signalweg für den Phänotyp der Gliedmaßen von *Ft*-Embryonen (hetero-, wie auch homozygot) auch durch seine Interaktion mit Mitgliedern der *Irx*-Genfamilie (s. 3.5), von denen drei durch die *Ft*-Mutation deletiert wurden. Deshalb ist die Identifizierung neuer Komponenten des genetischen Netzwerks der Gliedmaßenentwicklung, die potentiell einen Beitrag zum *Ft*-Phänotyp leisten können, von großem Interesse. Wie in 1.5 dargelegt, ist das für einen potenten Wnt-Antagonisten kodierende *Dkk-1* ein vielversprechender Kandidat für eine solche Rolle. Im Folgenden wurde deshalb eine detaillierte Analyse der Expression, Regulation und Funktion von *Dkk-1* durchgeführt.

3.8 Expression von *Dkk-1* in frühen Stadien der Gliedmaßenentwicklung der Maus

Am Tag E9,0, also kurz bevor der Auswuchs des vorderen Gliedmaßenpaares beginnt, sind die Transkripte von *Dkk-1* auf das ventrale Dienzephalon und das präsomitische Mesoderm begrenzt (Abb. 3.17A). Im Rumpfmesoderm konnte zu diesem Zeitpunkt noch keine Expression von *Dkk-1* in den späteren extremitätenformenden Regionen beobachtet werden. Einen halben Tag später, zeitgleich mit den ersten morphologischen Anzeichen der Gliedmaßeninitiation konnte ein schmaler Streifen *Dkk-1*-exprimierender Zellen am proximalen Rand der entstehenden Vorderextremität detektiert werden (Abb. 3.17B,C). Darüberhinaus ist *Dkk-1* in einer posterioren ventralen Domäne im Mesoderm der Vordergliedmaßenknospen und in einem dünnen Streifen kaudal von Somat 19, in der späteren hintergliedmaßenformenden Region, exprimiert (Abb. 3.17B). D.h., bevor eine morphologisch distinkte Hintergliedmaßenknospe sichtbar ist, ist *Dkk-1* in der

korrespondierenden Region transkribiert. Auffälligerweise ist die *Dkk-1*-Expression auf die Gliedmaßenfelder beschränkt, während im Flankenmesoderm zwischen den beiden Extremitätenpaaren zu diesem Zeitpunkt keine Transkripte detektiert werden können.

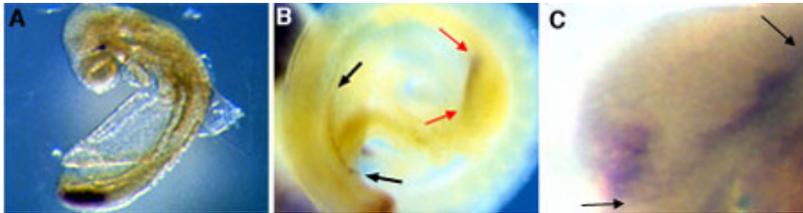


Abbildung 3.17 : *Dkk-1*-Expression in frühen Stadien der Gliedmaßenentwicklung der Maus. A) Der E9,0 Embryo zeigt die Expression von *Dkk-1* im ventralen Dienzephalon und

dem präsomitischen Mesoderm. B) Laterale Ansicht eines E9,5 Embryos. *Dkk-1*-Transkription ist in einem schmalen Streifen auf der Höhe der späteren Hintergliedmaßen (schwarze Pfeile) und im ventralen proximalen Mesoderm der Vordergliedmaßenknospe (rote Pfeile) zu detektieren. C) Ventrale Ansicht der Vordergliedmaßenknospe aus B zeigt die *Dkk-1*-Expression in einem proximalen Streifen an der Grenze zur Körperwand (Pfeile) und in einer posterioren mesenchymalen Domäne.

3.9 Vergleich der Expression von *Dkk-1* und *Bmp-4* während der Gliedmaßenentwicklung der Maus

Im Verlauf der Entwicklung wird die Expression von *Dkk-1* in den sich entwickelnden Gliedmaßen immer mehr auf distinkte Regionen beschränkt. Am Tag E10,5 ist eine Verkürzung des proximalen *Dkk-1*-exprimierenden Bereichs zu beobachten (Abb. 3.18A), so daß schließlich nur noch eine kleine Expressionsdomäne im anterioren Mesoderm besteht, die am Tag E11,5 nicht mehr vorhanden ist (Abb. 3.18C). Darüberhinaus dehnt sich die schon am Tag E9,5 detektierbare posteriore mesenchymale Expressionsdomäne distal aus (Abb. 3.18A), bevor sie am Tag E11,5 wieder auf die proximale Grenze zwischen posteriorem Ende der Gliedmaßenknospe und der Körperwand begrenzt wird (Abb. 3.18C). Am Tag E11,5 ist *Dkk-1*-Transkription darüberhinaus in der AER detektierbar (Abb. 3.18C). Ab E12,5 beginnt die Expression von *Dkk-1* im interdigitalen Mesenchym (Abb. 3.18E), wo sie bis E14,5 anhält (Grotewold et al., 1999), während die Aktivität an den vorherigen Orten abnimmt und schließlich nicht mehr nachweisbar ist. Für das vordere und hintere Extremitätenpaar wurde die gleiche Dynamik der *Dkk-1*-Expression mit der natürlichen Verzögerung durch die spätere Initiation der Hintergliedmaßenknospen beobachtet. In diesem Zeitraum ist das Expressionsmuster von *Dkk-1* auffällig ähnlich zu dem von *Bmp-4*, das auch in einer distinkten posterioren mesodermalen Domäne und in der AER exprimiert wird (vergleiche Abb. 3.18A,B; C,D). Nur die Expressionsdomäne von *Bmp-4* im anterioren Mesenchym der E11,5 Gliedmaßenknospe findet nicht ihr Äquivalent in den *Dkk-1*-Färbungen (Abb.

3.18C,D). Am Tag E12,5 ist *Bmp-4*, wie auch *Dkk-1*, im interdigitalen Mesenchym exprimiert, zudem auch noch stark in der AER (Abb. 3.18F).

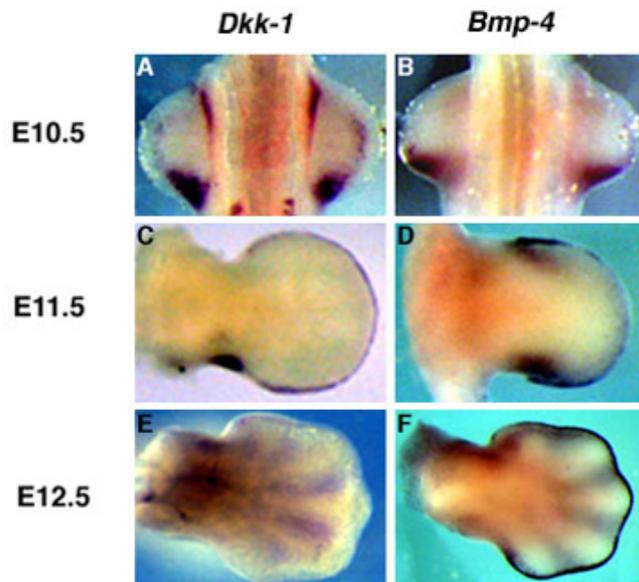


Abbildung 3.18 : Vergleichende Expression von *Dkk-1* und *Bmp-4* in den Vordergliedmaßenknospen der Maus von E10,5-E12,5. A,B) Dorsale Ansichten des vorderen Extremitätenpaares von E10,5 Embryonen zeigen die Expression von *Dkk-1* (A) in der anterioren proximalen Region sowie einer posterioren Domäne und von *Bmp-4* (B) in einer überlappenden posterioren mesenchymalen Expressionsdomäne. Gliedmaßenknospen in C-F sind so orientiert, daß anterior oben und distal rechts ist. C,E) Expression von *Dkk-1* am Tag E11,5 (C) und E12,5 (E) im posterioren Mesoderm, in der

AER und dem interdigitalen Mesenchym. D,F) *Bmp-4*-Expression am Tag E11,5 (D) in einer anterioren und einer posterioren mesodermalen Expressionsdomäne und in der AER und am Tag E12,5 (F) im interdigitalen Mesenchym und der AER.

3.10 *Dkk-1* wird in den Regionen des physiologischen programmierten Zelltods exprimiert

Ein wichtiger Prozeß in der Morphogenese der Gliedmaßen ist die Eliminierung von Zellen zwischen den differenzierenden Knorpelstrukturen durch programmierten Zelltod (PZT, s. 1.4.6). Die Expressionsdomänen von *Dkk-1* ähneln auf den ersten Blick den Regionen, in denen massive Apoptose stattfindet. Um dies genauer zu analysieren, wurden apoptotische Zellen durch die „Whole mount“ TUNEL-Methode angefärbt und ihre Verteilung mit der *Dkk-1*-exprimierender Zellen verglichen. Abb. 3.19A zeigt die Expression von *Dkk-1* am Tag E11,5 im posterioren Mesoderm und der AER. Die Apoptose-Färbung in Abb. 3.19B verifiziert, daß die posteriore Expressionsdomäne mit der posterioren nekrotischen Zone (PNZ) überlappt und auch in der AER zu diesem Zeitpunkt massiver PZT stattfindet. Diese auffällige Kolokalisation von *Dkk-1*-Transkripten und apoptotischen Zellen konnte auch zwei Tage später in der Entwicklung detektiert werden, wenn das interdigitale Mesenchym durch großflächigen PZT eliminiert wird (vergleiche Abb. 3.19C,D). Hier ist *Dkk-1* auch mit den pro-apoptotischen Genen *Msx-2* (Abb. 3.19E) und *p53* (Abb. 3.19F) koexprimiert. Sowohl in frühen als auch in späten Stadien der Gliedmaßenentwicklung ist die *Dkk-1*-Expression also auf die Regionen physiologischen Zelltods beschränkt.

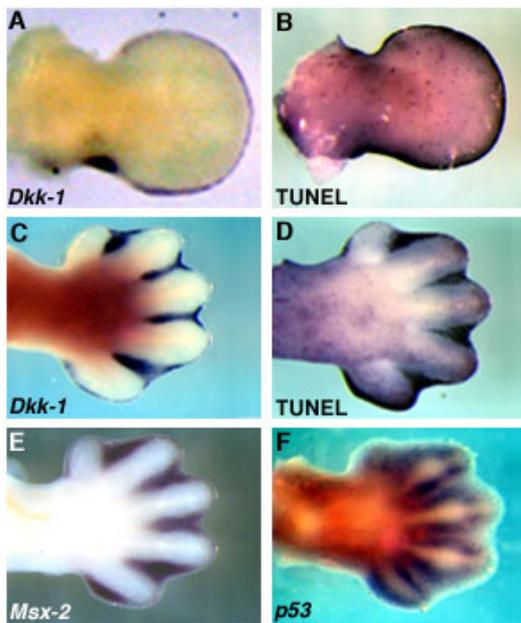


Abbildung 3.19 : Kolokalisation von *Dkk-1*-Transkripten und Regionen des PZT. Alle Gliedmaßenknospen sind so orientiert, daß anterior oben und distal rechts ist. **A)** Am Tag E11,5 ist *Dkk-1* im posterioren Mesoderm und in der AER exprimiert. **B)** Dies sind auch die Regionen des physiologischen Zelltods zu diesem Zeitpunkt, wie die TUNEL-Färbung zeigt. **C)** Am Tag E13,5 ist *Dkk-1*-Expression auf das interdigitale Mesenchym begrenzt, in dem auch massive Apoptose stattfindet (**D**). **E,F)** Expression von *Msx-2* (**E**) und *p53* (**F**) im interdigitalen Mesenchym von E13,5 Vordergliedmaßenknospen.

3.11 *cDkk-1*-Expression in Gliedmaßenknospen des Hühnerembryos

Da viele experimentelle Ansätze zur Regulation der Genexpression durch sezernierte Signalmoleküle einfacher im Hühnerembryo durchzuführen sind, wie z.B. die Implantation von Mikrokugeln, wurde zunächst die Expression des *Dkk-1*-Homologes des Huhns (*cDkk-1*) analysiert. Abb. 3.20A,D zeigen, daß *cDkk-1* zwischen HH23 und HH25 in zwei mesenchymalen Domänen am anterioren bzw. posterioren Rand der Knospe exprimiert ist. Dieses Muster ähnelt dem in 3.9 beschriebenen für Gliedmaßenknospen der Maus. Später sind *cDkk-1*-Transkripte ebenfalls in der AER und dem interdigitalen Mesenchym detektierbar (Abb. 3.20G,K). Darüberhinaus ist *cDkk-1* an HH35 auch in den sich entwickelnden Gelenken aktiv (Abb. 3.20K). Auch in den Gliedmaßenknospen des Hühnerembryos überlappen die *cDkk-1*-Expressionsdomänen zu einem hohen Grad mit den Regionen des PZT, wie durch den Vergleich mit Nile Blue-gefärbten Extremitätenknospen gezeigt werden konnte (Abb. 3.20C,F,J). *cDkk-1* ist außerdem auch in der ANZ und dem interdigitalen Mesenchym mit *cBmp-4* koexprimiert (vergleiche Abb. 3.20A,B; D,E; G,H). In der PNZ ist dieser Überlapp durch die stark asymmetrische *cBmp-4*-Expression in der Gliedmaßenknospe des Huhns nicht gegeben. Funktionell redundante *cBmp*-Familienmitglieder wie *cBmp-2* und *-7* sind allerdings hier stark exprimiert (Montero et al., 2001), so daß auch im posterioren Mesoderm die Bereiche hoher Bmp-Aktivität mit denen der *cDkk-1*-Expression korrelieren. Die Kolokalisation von *Dkk-1*- und *Bmp*-Transkripten mit den Regionen des PZT ist also zwischen Maus und Huhn konserviert, was impliziert, daß sehr wahrscheinlich auch die transkriptionelle Regulation von *Dkk-1* in beiden Spezies durch die gleichen Mechanismen realisiert wird.

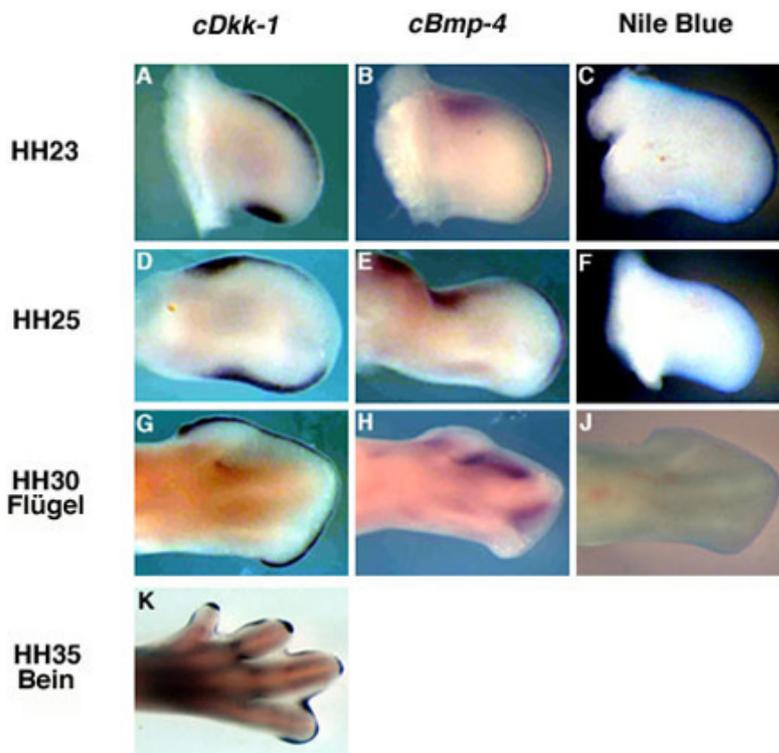


Abbildung 3.20 : *cDkk-1*-Expression während der Gliedmaßenentwicklung des Huhns. Alle Flügel- und Beinknospen sind so orientiert, daß anterior oben und distal rechts ist. **A,D,G,K** zeigen *cDkk-1*-Expression in zwei mesodermalen Domänen an HH23 (**A**) und HH25 (**D**) und in der AER, dem interdigitalen Mesenchym und den Gelenken an HH30 (**G**) und HH35 (**K**). *cBmp-4* ist an HH23 (**B**) und HH25 (**E**) im anterioren Mesoderm und der AER, an HH30 (**H**) im interdigitalen Mesenchym transkribiert. **C,F,J**

zeigen Nile Blue Färbungen von HH23 (**C**), HH25 (**F**) und HH30 (**J**) Flügelknospen. Massive Apoptose ist im anterioren, sowie posterioren Mesoderm und der AER zu detektieren.

3.12 Regulation von *Dkk-1* durch Bmp

3.12.1 Differentielle Regulation von *cDkk-1* durch rhBMP-4

Aufgrund der auffälligen Koexpression von *Dkk-1* und Mitgliedern der *Bmp*-Familie und ihren Zielgenen in Regionen des PZT und der Tatsache, daß Bmps wichtige Signale für die Induktion der Apoptose während der Gliedmaßenentwicklung sind (s. 1.4.6), wurde zunächst eine potentielle Regulation der *Dkk-1*-Transkription durch Bmp untersucht. Hierzu wurden in rhBMP-4 getränkte Mikrokugeln in die Flügelknospen von Hühnerembryonen implantiert. Kontrollkugeln, die in BSA getränkt waren, beeinflussten die Expression von *cDkk-1* nicht (Abb. 3.21A, n=8/8). Auch in sehr geringen Konzentrationen rhBMP-4 (1 μ g/ml) getränkte Kugeln veränderten die *cDkk-1*-Expression nicht (Abb. 3.21B, n=5/5). Die Applikation von 100 μ g/ml rhBMP-4 in das anteriore Mesoderm von HH20-23 Flügelknospen allerdings führte zu einer massiven Hochregulation der *cDkk-1*-Transkription innerhalb von 2 Stunden (Abb. 3.21C, n=6/6). Die ektopische Aktivierung von *cDkk-1* war auch nach 4 Stunden (Abb. 3.21D, n=10/10) und 8 Stunden (Abb. 3.21E, n=8/8) zu beobachten. *cDkk-1*-Expression wird also sehr schnell als Antwort auf rhBMP-4 transkriptionell induziert. Zur Untersuchung, ob diese massiv gesteigerte Expression von *cDkk-1* auch zu einer gesteigerten Inhibition des Wnt/ β -Catenin Signalwegs führt, wurde die Expression des Wnt/ β -Catenin Zielgens *cLef-1*

analysiert. Abb. 3.21F zeigt, daß die Expression von *cLef-1* in der Tat in einer großen Region um die BMP-4-Kugel herum, die sich gut mit der Region der ektopischen Hochregulation von *cDkk-1* korrelieren läßt (vergleiche mit Abb. 3.21E), reprimiert ist (n=6/6). Dies ist ein guter Hinweis darauf, daß die Überexpression von *cDkk-1* mit der Inhibition von Wnt/ β -Catenin Signalen einhergeht. Eine rhBMP-4-getränkte Mikrokugel, die wie in diesen Analysen in das undifferenzierte anteriore Mesoderm implantiert wird, führt zu massiver Apoptose nach 20 Stunden (Abb. 3.21G; Pizette und Niswander, 1999). 20 Stunden nach der Implantation einer solchen Kugel ist auch die Expression von *cDkk-1* in der endogenen anterioren mesodermalen Domäne komplett inhibiert (Abb. 3.21H, n=7/8).

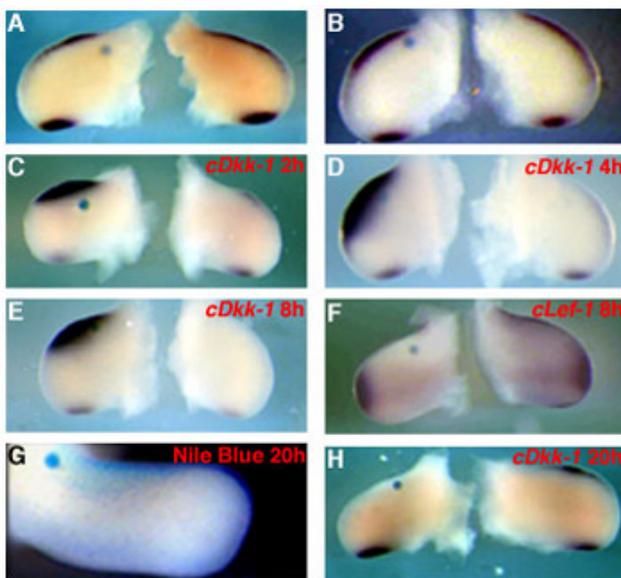


Abbildung 3.21 : Regulation der *cDkk-1*-Expression durch rhBMP-4. Alle Manipulationen in A-H wurden zwischen HH20 und HH23 durchgeführt. Es sind jeweils eine experimentelle (linke Seite jedes Bildes) und die kontralaterale Kontrollflügelknospe (rechte Seite) gezeigt. A) Eine Mikrokugel, die in BSA getränkt wurde, hat keinen Einfluß auf die *cDkk-1*-Expression nach 8h. B) Das gleiche gilt für eine in 1 μ g/ml rhBMP-4 getränkte Kugel. C) Die Applikation von 100 μ g/ml rhBMP-4 führt zur Induktion der *cDkk-1*-Transkription nach 2h, 4h (D) und 8h (E). F) 8h nach

Implantation einer 100 μ g/ml rhBMP-4 Kugel ist die Expression von *cLef-1* in einem großen Bereich um die Kugel drastisch reduziert. G) Die Nile Blue Färbung zeigt, daß die Implantation einer Kugel, die in 100 μ g/ml rhBMP-4 getränkt wurde, zu massiver Apoptose 20h nach der Operation führt. H) Nach 20h ist auch die Expression von *cDkk-1* in der der Kugel benachbarten endogenen Expressionsdomäne inhibiert. h = Stunden.

Wie in Abb. 3.21G gezeigt, führt die Implantation einer rhBMP-4-getränkten Kugel in das undifferenzierte Mesoderm von HH20-23 Flügelknospen zur Induktion massiver Apoptose nach 20 Stunden. Einige der so behandelten Embryonen wurden weitere 6-7 Tage inkubiert, um die morphologischen Konsequenzen dieses ektopischen PZT zu analysieren. In allen Fällen (n=8/8) konnte ein kompletter Verlust des Radius beobachtet werden (Abb. 3.22D), was konsistent mit der Region ektopischen Zelltods in Abb. 3.21G ist. Wie schon gezeigt, geht dem gesteigerten PZT eine dramatische Hochregulation der *cDkk-1*-Expression voraus (Abb. 3.22C). Interessanterweise führt die Implantation einer Kugel, die in derselben Konzentration rhBMP-4 getränkt wurde, in das Mesoderm von HH26-27 Gliedmaßenknospen

zu einem komplett gegenteiligen Phänotyp, nämlich einer Zunahme der Knochenmasse (Buckland et al., 1998). Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit reproduziert werden (vergleiche Abb. 3.22F,H, n=9/12). Auffälligerweise konnte in keiner der so behandelten Flügelknospen eine Hochregulation der *cDkk-1*-Expression nach 4-10 Stunden beobachtet werden (Abb. 3.22G, n=12/12).

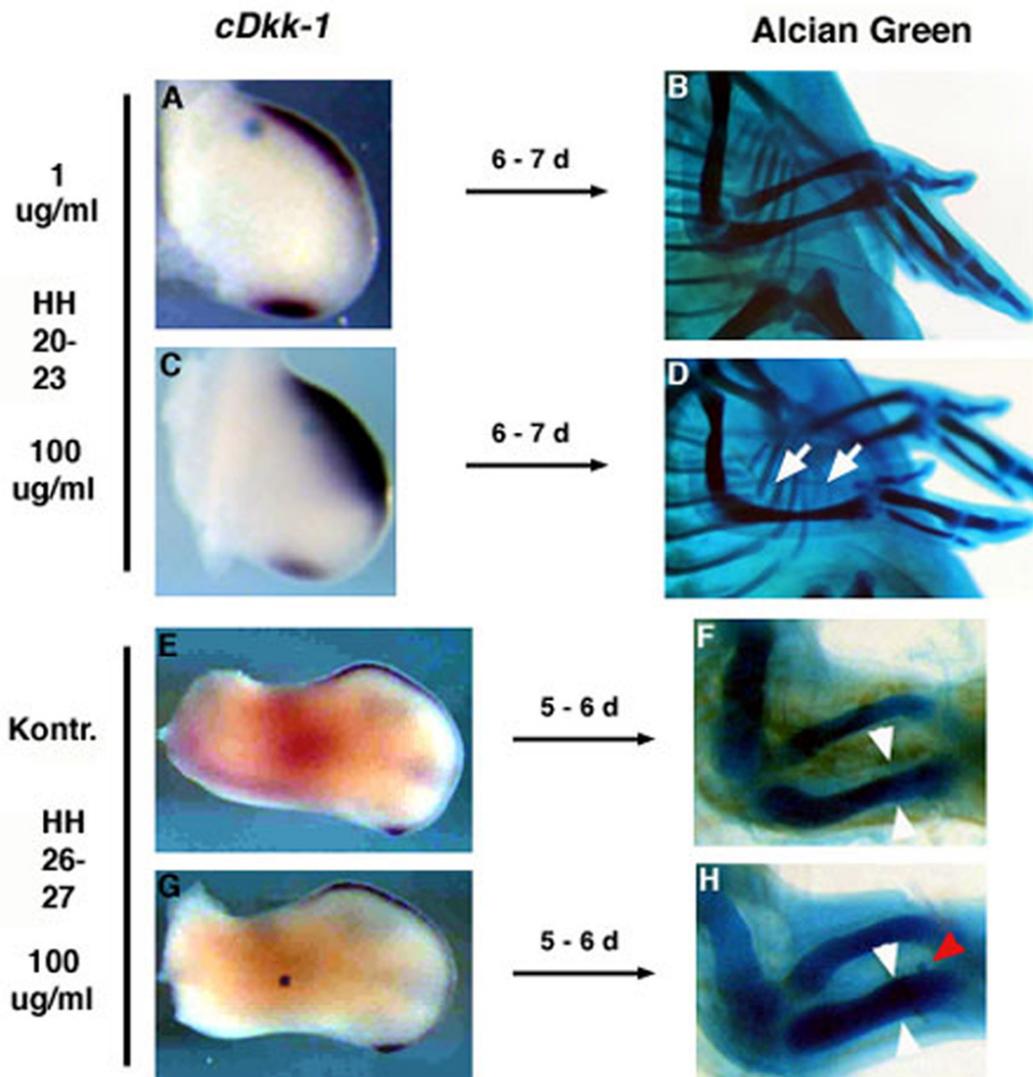


Abbildung 3.22 : Differentielle Regulation von *cDkk-1* durch rhBMP-4 unter Apoptose- und Knochen-induzierenden Bedingungen. Die Implantationen in **A-D** wurden in HH20-23 Flügelknospen, die in **E-H** an HH26/27 durchgeführt. **A)** Die Implantation einer Kontroll-BSA-Kugel beeinflusst die Expression von *cDkk-1* nicht. **B)** Wildtyp-Skelettmuster eines Flügels 6-7 Tage nach Implantation einer BSA-Kugel. **C)** 100 $\mu\text{g/ml}$ rhBMP-4 induziert *cDkk-1*-Expression und massive Apoptose (s. Abb. 3.21G), was zum kompletten Verlust des Radius 6-7 Tage nach der Manipulation führt (**D**, weiße Pfeile). **E)** Eine Kontroll-Flügelknospe zeigt das Wildtyp-Expressionsmuster von *cDkk-1* an HH26. **F)** zeigt die Größe von Radius und Ulna eines Wildtyp-Flügels. **G)** Die Applikation von 100 $\mu\text{g/ml}$ rhBMP-4 in das Zentrum einer HH26/27 Flügelknospe induziert nicht die Expression von *cDkk-1*. **H)** Diese Behandlung führt zu einer

deutlichen Verdickung von Radius und Ulna 5-6 Tage später. Die weißen Pfeilspitzen haben den gleichen Abstand wie in F, die rote Pfeilspitze deutet auf die Mikrokugel. d = Tage.

Auch die Expression von *cLef-1* wurde unter diesen Bedingungen nicht von rhBMP-4 beeinflusst (Abb. 3.23, n=4/4), was impliziert, daß der Effekt auf *cLef-1*-Transkription an HH20-23 (s. Abb. 3.21F) von *cDkk-1* vermittelt wird und nicht direkt auf das Bmp-Signal zurückzuführen ist. BMP-4 induziert also nur unter Apoptose-induzierenden Bedingungen die Expression von *cDkk-1*, nicht aber wenn das Bmp-Signal zur Knocheninduktion führt.

Abbildung 3.23 : *cLef-1*-Expression nach Implantation einer rhBMP-4-Kugel in HH26 Flügelknospen. Die in 100 µg/ml rhBMP-4 getränkte Mikrokugel wurde in unmittelbare Nähe der proximalen *cLef-1*-Expressionsdomäne implantiert. Hier ist keine Inhibition der *cLef-1*-Transkription nach 8 Stunden zu detektieren (Pfeil). Links ist die kontralaterale Kontrollflügelknospe gezeigt. h = Stunden.



3.12.2 *Dkk-1*-Expression und PZT in *Ft/+* Vordergliedmaßenknospen

Bmp-4 ist im anterior/distalen Mesoderm von *Ft/+* Vordergliedmaßenknospen überexprimiert (s. 1.4.7). Daraus ergab sich die Frage, ob diese, im Vergleich zu den in den Kugelimplantationsexperimenten benutzten, eher physiologischen Mengen entsprechenden Bmp-Konzentrationen auch zu einer gesteigerten *Dkk-1*-Aktivität und mehr Zelltod führen. Am Tag E11,5 ist erstmals eine starke ektopische Expressionsdomäne von *Dkk-1* im distalen Mesoderm der *Ft/+* Vordergliedmaßenknospe nachzuweisen (vergleiche Abb. 3.24A,C). Zu diesem Zeitpunkt sind keine Veränderungen im Muster des PZT durch „Whole mount“ TUNEL zu detektieren (vergleiche Abb. 3.24B,D). Einen Tag später jedoch, wenn die *Dkk-1*-Expression im Wildtyp im interdigitalen Mesenchym beginnt (Abb. 3.24E), wo zu dieser Zeit noch kaum Apoptose nachzuweisen ist (Abb. 3.24F), ist eine Region starken ektopischen Zelltods im anterior/distalen Mesoderm in *Ft/+* Vordergliedmaßenknospen zu detektieren (Abb. 3.24H). Diese Region entspricht exakt der ektopischen *Dkk-1*-Aktivierung zu diesem Zeitpunkt (vergleiche Abb. 3.24G,H). D.h., auch während der fehlgesteuerten Entwicklung der Vordergliedmaßen der *Ft/+*-Embryonen ist *Dkk-1*-Expression an Orten hoher Bmp-Aktivität und Apoptose zu detektieren. Bemerkenswerterweise geht auch hier die ektopische *Dkk-1*-Expression dem gesteigerten Zelltod voraus.

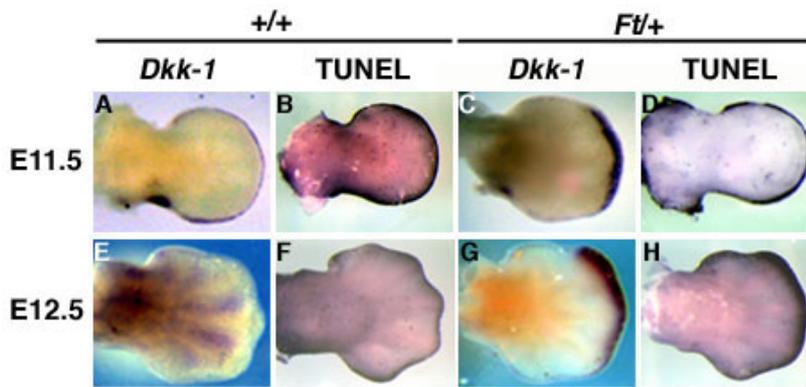


Abbildung 3.24 : *Dkk-1*-Expression und Apoptose in *Ft/+* Vordergliedmaßenknospen. Alle Vordergliedmaßenknospen sind so orientiert, daß anterior oben und distal rechts ist. **A, B)** Die Regionen der *Dkk-1*-Expression (**A**) und des PZT (**B**) überlappen in der E11,5 Wildtypextremität. **C)**

Ektopische Expression von *Dkk-1* im distalen Mesoderm einer *Ft/+* Vordergliedmaßenknospe. **D)** Normales Muster des PZT in E11,5 *Ft/+* Vorderextremität. **E)** Interdigitale Expression von *Dkk-1* in einer E12,5 Wildtypvordergliedmaßenknospe. **F)** Die TUNEL-Färbung zeigt, daß die Bereiche der Apoptose in der E12,5 Wildtypextremität zu diesem Zeitpunkt hauptsächlich auf die AER beschränkt sind. **G)** *Dkk-1* ist ektopisch exprimiert im Bereich der späteren Fusion in *Ft/+* Vorderextremitäten. **H)** Diese Region zeigt massive ektopische Apoptose am Tag E12,5.

Aus den bisherigen Resultaten läßt sich die Hypothese ableiten, daß *Dkk-1* ein positives Signal für programmierten Zelltod während der Entwicklung der Extremitäten sein könnte. In diesem Zusammenhang scheint die Überexpression von *Dkk-1* im Bereich der späteren knöchernen Fusion der Fingerspitzen in *Ft/+*-Embryonen ein Widerspruch zu dieser Annahme zu sein. Aus diesem Grund wurde die räumliche Beziehung der Expressionsdomäne des chondrogenen Markers *Sox-9*, mit den Regionen des Zelltods, repräsentiert durch die *Dkk-1*-Expression, während der Entwicklung der Wildtyp- und *Ft/+*-Extremitäten analysiert. Abb. 3.25 zeigt, daß sich die Expressionsdomänen von *Dkk-1* (Abb. 3.25A,E) und *Sox-9* (Abb. 3.25C,G) während der Normalentwicklung an den Tagen E12,5 und E13,5 gegenseitig ausschließen. Während *Dkk-1*-Transkripte auf das interdigitale Mesenchym begrenzt sind, findet sich die *Sox-9*-Expression in den entstehenden Kondensationen. Bemerkenswerterweise gilt dies auch für die *Ft/+* Vordergliedmaßenknospen. Wie schon beschrieben, ist *Dkk-1* im distalen Mesoderm der *Ft/+* Vordergliedmaßenknospen ektopisch exprimiert, in einem Bereich, der mit der späteren Knochenfusion übereinstimmt (Abb. 3.25B). Auch *Sox-9* ist zu diesem Zeitpunkt schwach ektopisch in der Region exprimiert (Abb. 3.25D). Diese Domäne scheint sich aber direkt proximal an die ektopische Domäne von *Dkk-1* anzuschließen und nicht mit ihr zu überlappen (vergleiche Abb. 3.25B,D).

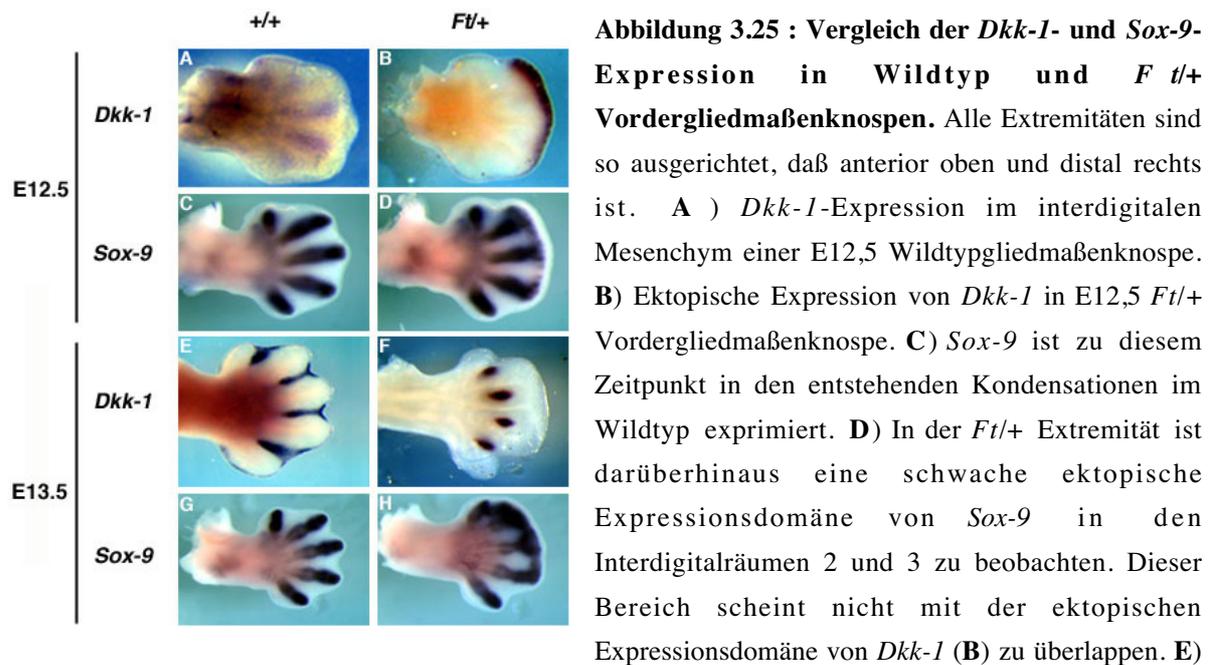


Abbildung 3.25 : Vergleich der *Dkk-1*- und *Sox-9*-Expression in Wildtyp und *Ft/+* Vordergliedmaßenknospen. Alle Extremitäten sind so ausgerichtet, daß anterior oben und distal rechts ist. **A**) *Dkk-1*-Expression im interdigitalen Mesenchym einer E12,5 Wildtypgliedmaßenknospe. **B**) Ektopische Expression von *Dkk-1* in E12,5 *Ft/+* Vordergliedmaßenknospe. **C**) *Sox-9* ist zu diesem Zeitpunkt in den entstehenden Kondensationen im Wildtyp exprimiert. **D**) In der *Ft/+* Extremität ist darüberhinaus eine schwache ektopische Expressionsdomäne von *Sox-9* in den Interdigitalräumen 2 und 3 zu beobachten. Dieser Bereich scheint nicht mit der ektopischen Expressionsdomäne von *Dkk-1* (**B**) zu überlappen. **E**)

Am Tag E13,5 sind die *Dkk-1*-Transkripte weiterhin auf das interdigitale Mesenchym der Wildtypknospe begrenzt. **F**) *Dkk-1* ist am Tag E13,5 nicht länger ektopisch in der *Ft/+* Extremität exprimiert, sondern auf den proximalen Bereich des interdigitalen Mesenchyms beschränkt. **G**) *Sox-9*-Expression in den Kondensationen einer E13,5 Wildtypextremität. **H**) Massive ektopische Expression von *Sox-9* im distalen Bereich der Interdigitalräume zwischen den Kondensationen 1-4 in der E13,5 *Ft/+* Vordergliedmaßenknospe, die den Bereich der späteren Knochenfusion vorzeichnet.

Am Tag E13,5 ist *Sox-9* massiv distal überexprimiert und zeichnet die spätere knöcherne Fusion vor (Abb. 3.25H). Zu diesem Zeitpunkt ist die *Dkk-1*-Expression interessanterweise in diesem Bereich komplett verlorengegangen und auf die proximalen Bereiche des interdigitalen Mesenchyms beschränkt (Abb. 3.25F). D.h., auch während der Entwicklung der *Ft/+* Vorderextremitäten bleibt die sich gegenseitig ausschließende Expression von *Sox-9* und *Dkk-1* erhalten. Der komplette Verlust der *Dkk-1*-Expression im Bereich der Fingerfusion am Tag E13,5 bestärkt weiter die Annahme, daß es sich bei *Dkk-1* um einen Apoptose-auslösenden Faktor handeln kann.

3.12.3 *Dkk-1*-Expression und PZT in *Ft/Ft* Vordergliedmaßenknospen

Wie unter 3.4 beschrieben, sind auch in *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen *Bmp-4* und dessen Zielgene *Msx-1* und *-2* massiv überexprimiert. Auch in diesen Extremitäten wurde die *Dkk-1*-Expression, sowie das Ausmaß des PZT untersucht. Abb. 3.26A zeigt, daß auch in den Vordergliedmaßenknospen von *Ft/Ft*-Embryonen *Dkk-1* ektopisch am Tag E11,5 im distalen Mesoderm exprimiert ist (vergleiche mit Abb. 3.24A). Diese Expressionsdomäne scheint in ihrer A/P-Ausdehnung noch größer zu sein, als die in *Ft/+* Vordergliedmaßenknospen (vergleiche mit Abb. 3.24B). Am Tag E12,5 ist *Dkk-1* massiv in der gesamten ektopischen

Gewebewucherung exprimiert (Abb. 3.26B). Nur der posteriore Bereich des Autopods ist frei von *Dkk-1*-Transkripten. Zur Analyse des PZT wurden Querschnitte von E12,5 *Ft/Ft* Vordergliedmaßenknospen angefertigt, mit denen eine TUNEL-Analyse durchgeführt wurde. Während die Zellen des proximalen Autopods außerhalb der *Dkk-1*-Expressionsdomäne vital sind (Abb. 3.26D), zeigt ein Schnitt durch den distalen Bereich, daß hier massive Apoptose im Großteil der mesodermalen Zellen stattfindet (Abb. 3.26C). Die Zellen des Ektoderms hingegen, in denen *Dkk-1* nicht exprimiert ist, zeigen keine Anzeichen erhöhter Apoptose.

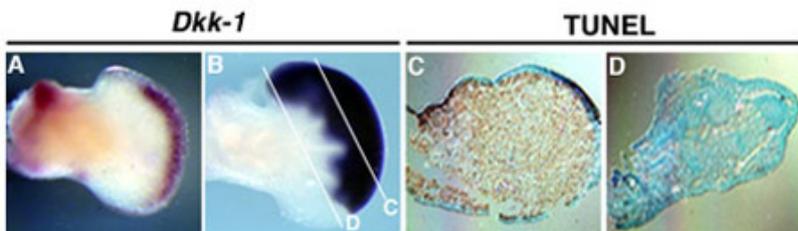


Abbildung 3.26 : *Dkk-1*-Expression und Apoptose in *Ft/Ft* Vordergliedmaßenknospen. A) Am Tag E11,5 ist eine ektopische anteriore Expressionsdomäne von

Dkk-1 im distalen Mesoderm zu beobachten, die am Tag E12,5 (B) den gesamten distalen Autopod mit Ausnahme des posterioren Bereiches umfaßt. Die weißen Linien in B deuten die Schnittebenen von C und D an. C) Die TUNEL-Analyse zeigt massive Apoptose (Braunfärbung) in den mesodermalen Zellen des distalen Autopods. Die Grünfärbung der ektodermalen Zellen zeigt, daß diese vital sind. D) Kontrollschnitt am proximalen Ende des Autopods zeigt die Vitalität der Zellen in diesem Bereich.

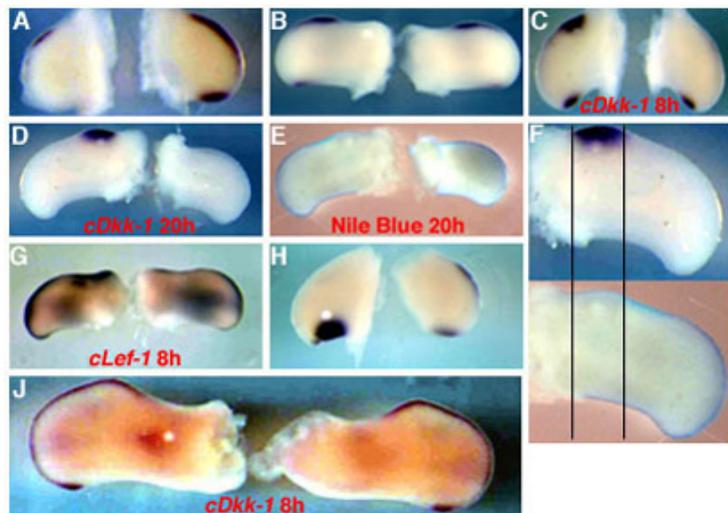
Zusammenfassend kann also festgestellt werden, daß sowohl während normaler als auch fehlgesteuerter Entwicklung der Gliedmaßen, die Expression von *Dkk-1* auf die Bereiche hoher Bmp-Aktivität begrenzt ist. In diesen Regionen geht die *Dkk-1*-Expression immer der massiven Apoptose voraus. Außerdem wird *Dkk-1* nur von Bmp-Signalen induziert, die zu vermehrtem PZT, nicht aber solchen, die zu einer Steigerung der Knochenmasse führen.

3.13 Regulation von *cDkk-1* durch Fgf

Die Inhibition der *cDkk-1*-Expression 20 Stunden nach Implantation einer rhBMP-4-Kugel in das anteriore Mesoderm von HH20-23 Flügelknospen (s. Abb. 3.21H) könnte eine Konsequenz der gesteigerten Apoptose (s. Abb. 3.21G) sein. Alternativ kann dies aber auch bedeuten, daß die *cDkk-1*-Expression von Signalen der AER, deren Struktur und Funktion unter diesen experimentellen Bedingungen negativ von Bmp reguliert werden, abhängt. Um die letztere Hypothese zu testen, wurde die AER chirurgisch von frühen Flügelknospen entfernt. Wie Abb. 3.27A zeigt, resultierte diese Manipulation in einer drastischen Absenkung der *cDkk-1*-Expression innerhalb von 6 Stunden (n=6/6). Da, wie in 1.4.2 und 1.4.4 dargelegt, Mitglieder der Fgf-Familie als die Hauptvermittler der AER-Aktivität gelten, wurden in Fgf-8 (1 mg/ml) getränkte Mikrokugeln in das Mesoderm von HH20-23 Flügelknospen implantiert, um zu analysieren, ob dies ausreicht, *cDkk-1*-Expression zu

induzieren. Sowohl nach 8 Stunden (Abb. 3.27C, n=8/8) als auch nach 20 Stunden (Abb. 3.27D, n=7/7) führte die ektopische Fgf-Aktivität zu einer transkriptionellen Induktion von *cDkk-1*. Nach 20 Stunden war außerdem ein deutlicher mesodermaler Auswuchs im Bereich der Kugel zu beobachten. Die Nile Blue Färbung in Abb. 3.27E zeigt, daß trotz der gesteigerten *cDkk-1*-Transkription keine ektopische Apoptose detektierbar war. Der genaue Vergleich der ektopischen *cDkk-1*-Expressionsdomäne mit der Region des PZT in derselben Flügelknospe (Abb. 3.27F), belegt, daß diese Bereiche nicht überlappen. Auch die Expression von *cLef-1* ist trotz der erhöhten *cDkk-1*-Expression nicht herunter-, sondern im Gegenteil sogar hochreguliert in einem Bereich um die Fgf-Kugel herum (Abb. 3.27G). Auch nach der Entfernung der AER ist Fgf-8 ausreichend, *cDkk-1*-Expression zu induzieren (Abb. 3.27H). Im Gegensatz zu Bmp (s. Abb. 3.22G) ist auch eine leichte Induktion der Transkription von *cDkk-1* nach Implantation einer Fgf-Kugel in das zentrale Mesoderm einer HH26 Flügelknospe zu beobachten (Abb. 3.27J).

Abbildung 3.27 : Regulation von *cDkk-1* durch Fgf. Die Manipulationen in A - H wurden in HH20-23 Flügelknospen durchgeführt. Jeweils links in jedem Bild ist die experimentelle, rechts die kontralaterale Kontroll-Flügelknospe gezeigt. A) Die Entfernung der AER führt zum Absinken der *cDkk-1*-Expression im Mesoderm nach 6h. B) Die Implantation einer Kontroll-BSA-Kugel hat keinen Effekt auf die *cDkk-1*-Expression. C,D) Nach



Implantation einer in 1 mg/ml Fgf-8 getränkten Mikrokugel ist *cDkk-1* deutlich nach 8h (C) und 20h (D) induziert. E) Nile Blue Färbung der Flügelknospen aus D zeigt keine ektopische Apoptose im Bereich der Fgf-8-Kugel nach 20h. F) Höhere Vergrößerung der experimentellen Flügelknospen aus D und E zeigt, daß der Bereich der ektopischen *cDkk-1*-Expression (zwischen den schwarzen Linien) nicht mit der apoptotischen Region in derselben Knospe überlappt. G) *cLef-1*-Expression ist 8h nach Implantation einer Fgf-8-Kugel hochreguliert. H) Auch nach der Entfernung der AER ist Fgf-8 ausreichend, *cDkk-1*-Expression zu induzieren. Diese Wirkung ist auch ortsunabhängig, wie diese am posterioren Rand der Extremität durchgeführte Manipulation belegt. J) Leichte Induktion der *cDkk-1*-Expression 8h nach Implantation einer Fgf-8-Kugel in das zentrale Mesoderm einer HH26 Flügelknospe. h = Stunden.

3.14 Regulation von *Dkk-1* durch Shh

3.14.1 Räumliche Beziehung der *Dkk-1*- und *Shh*-Expressionsdomänen im posterioren Mesoderm

Wie in 3.10 gezeigt, korrespondiert die Expressionsdomäne von *Dkk-1* im posterioren Mesoderm zur PNZ. Da auch *Shh*-Expression in der ZPA mit der PNZ teilweise überlappt und hier auch PZT moduliert (Sanz-Ezquerro und Tickle, 2000), wurde die räumliche Beziehung der Expressionsdomänen dieser beiden Gene, sowie eine potentielle Regulation von *Dkk-1* durch Shh analysiert. Die Zwei-Farben *in situ* Hybridisierungen in Abb. 3.28 zeigen, daß der distale Bereich der *Dkk-1*-Expressionsdomäne in E10,5 Hintergliedmaßenknospen der Maus zunächst mit dem proximalen Bereich der *Shh*-Expressionsdomäne überlappt (Abb. 3.28A,B). Zur gleichen Zeit sind beide Domänen im vorderen Extremitätenpaar allerdings schon voneinander separiert (Abb. 3.28A,C). Die schon unter 3.9 beschriebene proximale Restriktion der initial distal expandierenden *Dkk-1*-Domäne führt also dazu, daß *Dkk-1* ab E10,5 in den Vordergliedmaßenknospen nicht mehr in der ZPA exprimiert wird.

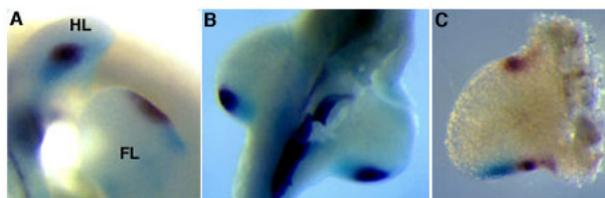


Abbildung 3.28 : Räumliche Beziehung der Expressionsdomänen von *Dkk-1* und *Shh*.

A) Während die Expressionsdomänen der beiden Gene (dunkelblau – *Shh*, hellblau – *Dkk-1*) in E10,5 Hintergliedmaßenknospen (HL) überlappen, sind sie zu diesem Zeitpunkt im vorderen Extremitätenpaar (FL) voneinander getrennt. **B)** Ventrale Ansicht eines Hintergliedmaßenpaares am Tag E10,5 verdeutlicht den Überlapp der *Dkk-1*- (hellblau) und *Shh*- (dunkelblau) Expressionsdomänen. **C)** Dorsale Ansicht einer E10,5 Vordergliedmaßenknospe zeigt die *Dkk-1*-Expression (violett) am proximalen Rand des anterioren, wie auch posterioren Mesoderms. Hier besteht kein Überlapp mehr mit der *Shh*-Expression (hellblau).

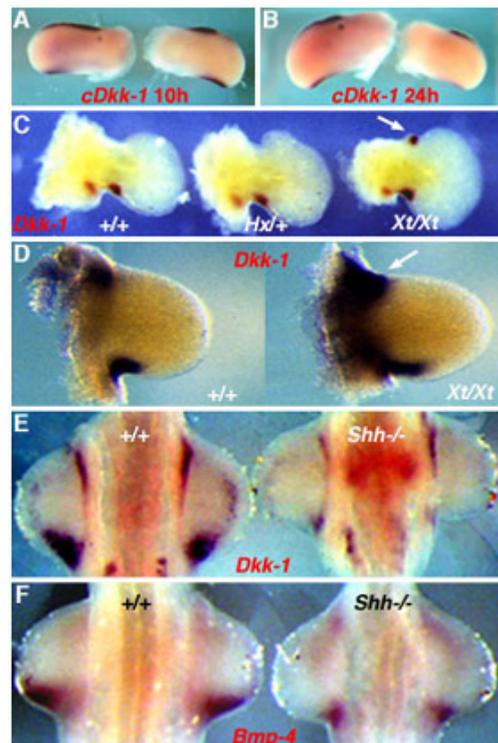
3.14.2 Regulation von *Dkk-1* durch Shh in Hühner- und Mausembryonen

Zur Untersuchung, ob Shh ausreichend ist, *Dkk-1*-Expression zu induzieren, wurden Shh-getränkte Mikrokugeln (2,5 mg/ml) in die Flügelknospen von HH23 Hühnerembryonen implantiert. Weder 4 Stunden (n=5/5, Daten nicht gezeigt), 10 Stunden (Abb. 3.29A, n=4/4), noch 24 Stunden (Abb. 3.29B, n=5/5) nach Shh-Applikation konnte eine Veränderung der *cDkk-1*-Expression beobachtet werden, was bedeutet, daß Shh nicht ausreicht, *cDkk-1*-Transkription zu aktivieren. Diese Resultate aus Hühnerembryonen wurden durch die Analyse der polydaktylen Mausmutanten *Xt^f* (Johnson, 1967) und *Hx* (Dickie, 1968) bestätigt. Sowohl *Xt^f/Xt^f* als auch *Hx/+* Vordergliedmaßenknospen zeigen eine starke anteriore ektopische *Shh*-Expressionsdomäne am Tag E12,0 (Büscher und Rüther, 1998). Wie Abb. 3.29C zeigt, entspricht die *Dkk-1*-Expression in *Hx/+*-Embryonen der im Wildtyp, während eine deutliche

anteriore Expressionsdomäne von *Dkk-1*, die eine vergleichbare Intensität wie die posteriore hat, in E12,0 *Xt^f/Xt^f* Vordergliedmaßenknospen detektiert werden konnte. Zu keinem analysierten Zeitpunkt (E11,0-E12,5) konnte ektoische anteriore *Dkk-1*-Aktivität in *Hx/+* Extremitäten nachgewiesen werden. In *Xt^f/Xt^f* Vordergliedmaßenknospen hingegen ist schon am Tag E10,5 eine Hochregulation der *Dkk-1*-Transkription zu erkennen (Abb. 3.29D), die damit der von *Shh* vorausgeht (Bücher und Rüther, 1998). Das bedeutet, daß die Steigerung der *Dkk-1*-Transkription in *Xt^f/Xt^f* Gliedmaßenknospen unabhängig von *Shh* ist. Zur Analyse der Frage, ob *Shh* notwendig für die normale *Dkk-1*-Aktivierung ist, wurde dessen Expression in *Shh^{-/-}*-Embryonen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Thomas Brand) untersucht. Abb. 3.29E zeigt, daß *Dkk-1* in E10,5 *Shh^{-/-}* Gliedmaßenknospen exprimiert ist, allerdings auf einem deutlich reduzierten Niveau (n = 3/3). Dies zeigt, daß *Shh* für die initiale Induktion von *Dkk-1* in den Extremitätenknospen nicht benötigt wird, dafür aber für den Fortbestand der *Dkk-1*-Expression. Auch die *Bmp-4*-Expression ist dramatisch reduziert in E10,5 *Shh^{-/-}*-Gliedmaßenknospen (Abb. 3.29F, n = 2/2). Da BMP-4 ein starker Induktor der *Dkk-1*-Expression ist (s. 3.12.1), impliziert dieses Resultat, daß *Bmp-4* den Effekt von *Shh* auf den Fortbestand der *Dkk-1*-Expression vermittelt.

Abbildung 3.29 : Regulation der *Dkk-1*-Expression durch *Shh*.

A) 10h nach der Implantation einer Mikrokugel, die in 2,5 mg/ml *Shh* getränkt wurde, ist die Expression von *cDkk-1* unverändert. Rechts ist der kontralaterale Kontrollflügel dargestellt. **B)** Auch nach 24h war keine Auswirkung des ektoischen *Shh*-Proteins auf die *cDkk-1*-Expression nachweisbar. Der vergrößerte Durchmesser der A/P-Achse im experimentellen Flügel zeigt, daß das *Shh*-Protein aktiv war. **C)** *Dkk-1*-Expression in E12,0 Vordergliedmaßenknospen von Wildtyp- (links), *Hx/+*- (Mitte) und *Xt^f/Xt^f*- (rechts) Embryonen. Im anterioren Mesoderm der *Xt^f/Xt^f* Gliedmaßenknospe ist eine starke anteriore Expressionsdomäne erkennbar (weißer Pfeil). **D)** Die Hochregulation der *Dkk-1*-Expression in *Xt^f/Xt^f* Vordergliedmaßenknospen (rechts) ist schon am Tag E10,5 nachweisbar (weißer Pfeil). **E)** Dorsale Ansicht der Vordergliedmaßen von E10,5 Wildtyp- (links) und *Shh^{-/-}*- (rechts) Embryonen. Die *Dkk-1*-Expression ist drastisch reduziert in den Mutantenembryonen. **F)** Auch die *Bmp-4*-Expression ist deutlich reduziert in den Gliedmaßenknospen von E10,5 *Shh^{-/-}*-Embryonen (rechts). Links im Bild ist der Wildtyp-Kontrollembryo dargestellt. h = Stunden.



3.14.3 Apoptose im anterioren Mesoderm polydaktyler Mausmutanten

Im Folgenden wurde untersucht, ob auch die massive *Dkk-1*-Expression im anterioren Mesoderm der *Xt^f/Xt^f* Gliedmaßenknospen mit einer Steigerung des PZT einhergeht. Wie Abb. 3.30 belegt, ist die Apoptose im anterioren Mesoderm der E11,5 *Xt^f/Xt^f* Extremitäten im Vergleich zum Wildtyp und zu Vordergliedmaßenknospen von *Hx/+*-Embryonen deutlich erhöht. In dem mesodermalen Auswuchs der *Hx/+* Gliedmaßenknospe hingegen, erscheint das Ausmaß des PZT im Vergleich zum Wildtyp reduziert zu sein. Auch in den polydaktylen Mausmutanten korreliert also gesteigerte Expression von *Dkk-1* mit der Erhöhung des PZT.

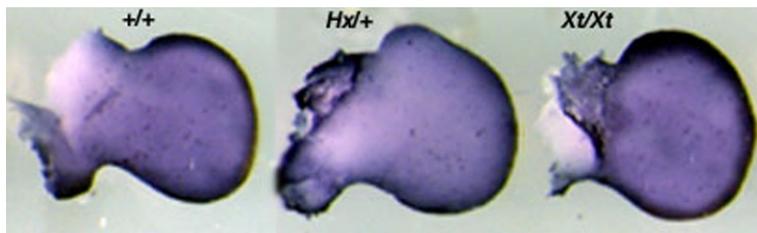


Abbildung 3.30 : Apoptose in E11,5 Vordergliedmaßenknospen der polydaktylen Mausmutanten *Hx/+* und *Xt^f/Xt^f* im Vergleich zum Wildtyp. Alle Extremitätenknospen sind so orientiert, daß anterior oben und distal rechts ist.

Die „Whole mount“ TUNEL Färbung zeigt, daß das Ausmaß der Apoptose im anterioren Mesoderm in der *Hx/+* Gliedmaßenknospe (Mitte) im Vergleich zum Wildtyp (links) reduziert ist, während eine deutliche Steigerung des PZT im anterioren Mesoderm der *Xt^f/Xt^f* Extremität (rechts) detektiert werden kann.

3.15 Regulation von *cDkk-1* durch RA

Wie unter 1.4.5 beschrieben, ist RA ein starker Induktor der *Shh*-Expression. Auch dessen potentieller Effekt auf *cDkk-1* wurde durch Implantation von Mikrokugeln untersucht. Abb. 3.31 zeigt, daß auch RA zu keinem untersuchten Zeitpunkt (6 Stunden, n=4/4, Abb. 3.31A; 12 Stunden, n=4/4, Abb. 3.31B) einen Einfluß auf die Transkription des *cDkk-1*-Gens hatte.

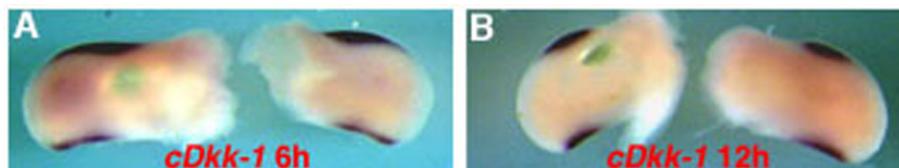


Abbildung 3.31 : RA hat keinen Einfluß auf die *cDkk-1*-Expression. Jeweils links im Bild sind die experimentellen

HH23 Flügelknospen, rechts die kontralateralen Kontrollflügel dargestellt. Unveränderte Expression von *cDkk-1* 6h (A) und 12h (B) nach Applikation von 0,1 mg/ml RA. h = Stunden.

3.16 Regulation von *Dkk-1* durch Wnt

Viele der bisher beschriebenen Antagonisten eines Signalwegs werden von den zu inhibierenden Signalen selbst transkriptionell induziert (Strigini und Cohen, 1999; Vogt und Duboule, 1999). Deshalb wurde analysiert, inwiefern *Dkk-1*-Expression auf die Aktivität

unterschiedlicher Wnt-Liganden reagiert. Da keine gereinigten Wnt-Proteine zur Verfügung stehen, mußte hier ein anderes System zur Untersuchung dieser Frage verwendet werden. Von Arnold et al. (2000) und Lickert et al. (2000) wurde beschrieben, daß die Kokultivierung von ES-Zellen und NIH/3T3-Fibroblasten, die stabil mit Expressionskonstrukten verschiedener *Wnt*-Gene transfektioniert waren, zur Induktion der Wnt-Zielgene *Brachyury* und *Cdx-1* in den ES-Zellen führte. Dieses System sollte auch die Analyse erlauben, ob *Dkk-1* ein Zielgen bestimmter Wnt-Signale ist. Zunächst wurde versucht, die Ergebnisse von Lickert et al. (2000) anhand der Induktion von *Cdx-1* zu reproduzieren, um die Durchführung des Experimentes zu kontrollieren. Wie Abb. 3.32 zeigt, konnte wie beschrieben, eine Induktion von *Cdx-1* durch *Wnt-1*, *-3a*, *-4* und schwächer durch *Wnt-7a* und *-7b* per RT-PCR nachgewiesen werden. Die Analyse mit *Dkk-1*-spezifischen Oligonukleotiden zeigte, daß *Dkk-1* von *Wnt-1*, *-3a* und *-4* transkriptionell induziert wurde (Abb. 3.32).

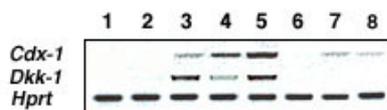


Abbildung 3.32 : Regulation von *Dkk-1* durch Wnt. RT-PCR-Analyse nach Kokultivierung von ES- und NIH/3T3-Zellen, die unterschiedliche *Wnt*-Gene überexprimieren. Zur Standardisierung

wurden *Hprt*-spezifische Oligonukleotide verwendet (381 bp-Fragment der Oligonukleotide *Hprt-5'/Hprt-3'*). 1= NIH/3T3-*Wnt-1* ohne ES-Zellen : Kontrolle, die zeigt, daß die Induktion der Zielgen-Transkription in den ES-Zellen und somit durch sezerniertes Wnt stattfindet. 2 = NIH/3T3-*lacZ* + ES : Negativ-Kontrolle. 3 = NIH/3T3-*Wnt-1* + ES : Induktion von *Cdx-1* (349 bp-Fragment der Oligonukleotide *Cdx-1-F1/Cdx-1-B2*) und *Dkk-1* (1049 bp-Fragment der Oligonukleotide *mdkk-1-F1/mdkk-1-B2*), wie auch durch NIH/3T3-*Wnt-3a* + ES (4) und NIH/3T3-*Wnt-4* + ES (5). 6 = NIH/3T3-*Wnt-5a* + ES. 7 = NIH/3T3-*Wnt-7a* + ES. 8 = NIH/3T3-*Wnt-7b* + ES.

3.17 Regulation der *Dkk-1*-Expression durch verschiedene apoptotische Stimuli

3.17.1 UV-Bestrahlung führt zur Induktion der *cDkk-1*-Expression

Die bisherigen Analysen zeigten den Zusammenhang der *Dkk-1*-Expression und PZT während der Entwicklung der Vertebratenextremitäten. Da ein Apoptose-induzierendes Bmp-Signal *Dkk-1*-Transkription auslöst (s. 3.12.1) und *Dkk-1* kürzlich darüberhinaus als Zielgen des Tumorsuppressorgens *p53*, eines der wichtigsten Regulatoren des PZT, mit dessen Expression die *Dkk-1*-Transkription auch in späten Stadien der Gliedmaßenentwicklung überlappt (s. 3.10), identifiziert wurde (Wang et al., 2000), stellte sich die Frage, ob *Dkk-1*-Expression auch von anderen apoptotischen Signalen induziert wird. Um dies zu analysieren wurden Hühnerembryonen mit ultraviolettem (UV) Licht bestrahlt, da die UV-induzierte DNA-Schädigung zu einer Stabilisierung des *p53*-Proteins führt, das dann das Zellzyklus-Arretierungs- oder PZT-Programm auslöst (Übersicht bei Vogelstein et al., 2000). Abb. 3.33A zeigt, daß 10 Stunden nach dieser Behandlung massive Apoptose in den bestrahlten Arealen

nachzuweisen war (n=16/16). Die Analyse der Expression von *cDkk-1* zeigte, daß das Gen nach 8 Stunden stark ektopisch in einem der Apoptosefärbung vergleichbaren Muster im gesamten Mesoderm, wie auch dem Ektoderm aktiviert war (Abb. 3.33B, n=12/12).

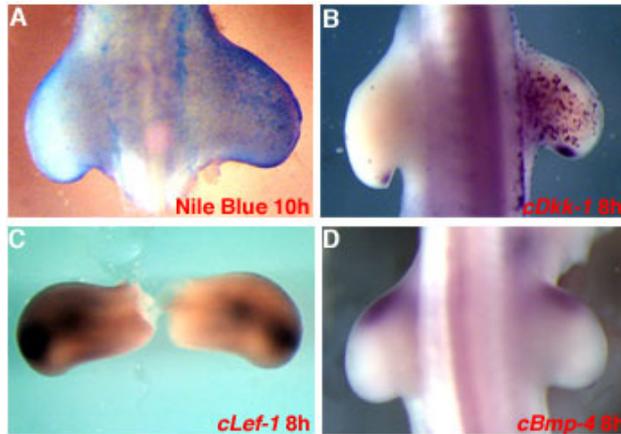


Abbildung 3.33 : Apoptose und Genexpressionsmuster nach UV-Bestrahlung von Hühnerembryonen. A) 10h nach UV-Bestrahlung ist massive Apoptose in den betroffenen Arealen des Embryos durch Nile Blue Färbung nachzuweisen (rechte Hälfte des Embryos). Die linke, durch die Lage des Embryos im Ei nicht bestrahlte Seite, diente als interne Kontrolle in allen hier gezeigten Analysen. B) Ektopische Expression von *cDkk-1* 8h nach UV-Bestrahlung. C) Nach 8h ist eine Runterregulation

der *cLef-1*-Expression in den bestrahlten Regionen zu beobachten. D) Normale *cBmp-4*-Expression 8h nach UV-Bestrahlung. h = Stunden.

Dies führte wiederum zu einer Reduktion der *cLef-1*-Expression, wie Abb. 3.33C belegt (n=4/4). *cDkk-1* wird also vom p53-abhängigen UV-induzierten PZT-Signalweg *in vivo* aktiviert, was auch zu einer Inhibition des Wnt/ β -Catenin Signalwegs führt. Wie bereits beschrieben, ist BMP-4 ein starkes *Dkk-1*-induzierendes Signal. Um zu analysieren, ob die UV-induzierte *cDkk-1*-Aktivierung von *cBmp-4* vermittelt wird, wurde dessen Expression in bestrahlten Embryonen gemessen. *cBmp-4* war an allen analysierten Zeitpunkten (1 Stunde n=3/3, 4 Stunden n=5/5, 8 Stunden n=8/8 Abb. 3.33D, 16 Stunden n=6/6) normal in den bestrahlten Gliedmaßenknospen exprimiert. Dies impliziert, daß die ektopische Aktivierung von *cDkk-1* unter diesen experimentellen Bedingungen unabhängig von *cBmp-4* ist.

3.17.2 *p53* ist entbehrlich für die *Dkk-1*-Expression

Um zu analysieren, ob *p53* notwendig für die normale Expression von *Dkk-1* während der Gliedmaßenentwicklung ist, wurde dessen mRNA-Muster in E11,5 *p53*^{-/-}-Embryonen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Erwin Wagner) analysiert. Wie Abb. 3.34 zeigt, ist kein Unterschied, weder im Expressionsniveau, noch im -muster von *Dkk-1* in *p53*^{-/-} Gliedmaßenknospen im Vergleich zum Wildtyp festzustellen. Für die endogene Expression von *Dkk-1* während der Entwicklung der Extremitäten ist *p53* also nicht notwendig.

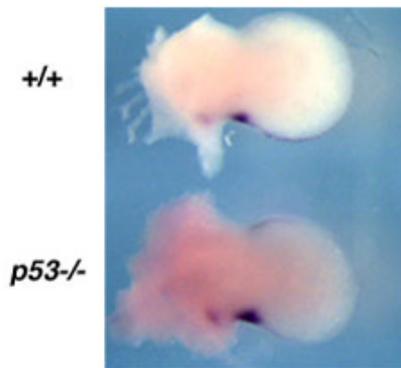
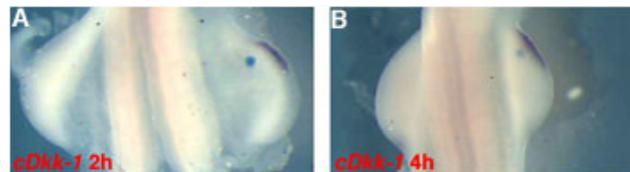


Abbildung 3.34 : *Dkk-1*-Expression in E11,5 Vordergliedmaßenknospen von *p53*^{-/-}-Embryonen. Es ist kein Unterschied im Expressionsniveau oder -muster von *Dkk-1* in *p53*^{-/-} Extremitäten (unten) im Vergleich zum Wildtyp (oben) festzustellen.

3.17.3 Staurosporin induziert *cDkk-1*-Expression

Im folgenden Experiment wurden Mikrokugeln, die in Staurosporin, einem Proteinkinase Inhibitor, getränkt wurden, in die Gliedmaßenknospen von Hühnerembryonen implantiert. Dies führt zur raschen Induktion von PZT, wie Sanz-Ezquerro und Tickle (2000) zeigen konnten. Auch diese Behandlung führte zu einer Induktion der *cDkk-1*-Expression nach 2 Stunden (Abb. 3.35A, n=5/5) und 4 Stunden (Abb. 3.35B, n= 6/6). Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß viele verschiedene apoptotische Signale zur Induktion der *Dkk-1*-Expression führen.

Abbildung 3.35 : Staurosporin induziert *cDkk-1*-Expression. Die Implantationen der Mikrokugeln wurden an HH20 Flügelknospen durchgeführt. Induktion der *cDkk-1*-Expression nach Applikation von Staurosporin nach 2h (A) und 4h (B). h = Stunden.



3.18 Regulation von *Dkk-1* durch *c-Jun*

3.18.1 Expression von *c-Jun* während der Gliedmaßenentwicklung von Maus und Huhn

Die Tatsache, daß sehr unterschiedliche Stimuli zu einer Induktion der *Dkk-1*-Expression führten, legte die Frage nahe, ob diese Aktivitäten möglicherweise von einem gemeinsam genutzten Signalmediator vermittelt werden. Für eine solche Rolle waren *Cyclin G* (*CycG*), das als Konvergenzpunkt der apoptotischen p53- und Bmp-Signalwege vorgeschlagen wurde (Okamoto und Prives, 1999) und *c-Jun*, das wie unter 1.2 dargelegt von Bmp aktiviert werden kann und außerdem unerlässlich für die UV-induzierte Apoptose ist (Shaulian et al., 2000), gute Kandidaten. Auch Staurosporin induziert Apoptose offensichtlich über eine Jnk-vermittelte Steigerung der Ap-1-Aktivität (Chae et al., 2000). Zunächst wurde analysiert, ob *c-Jun* und *CycG* während der Entwicklung der Extremitäten in einer Weise exprimiert sind, die mit solch einer Rolle vereinbar wäre. Durch „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung konnten keine *CycG*-Transkripte zu verschiedenen Zeitpunkten der Gliedmaßenentwicklung

detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Zur Klonierung der *c-Jun*- bzw. *cc-Jun*-Proben für die *in situ* Hybridisierung wurden die offenen Leserahmen mit den Oligonukleotiden *mcJ-Full-F1/mcJ-Full-B1* bzw. *ccJ-ORF-F1/ccJ-ORF-B1* amplifiziert und in den Vektor pGEM[®]-T (Promega) kloniert. Diese offenbarten ein sehr dynamisches Expressionsmuster während der Gliedmaßenentwicklung sowohl der Maus als auch des Huhns. Am Tag E11,5 der Entwicklung der Maus, waren *c-Jun*-Transkripte auf das zentrale Mesoderm der Gliedmaßenknospe beschränkt, sowie auf zwei proximale Domänen im späteren Schulterbereich (Abb. 3.36A). Ein sehr ähnliches Muster konnte für vergleichbare Stadien der Huhnentwicklung beobachtet werden (Abb. 3.36D). Am Tag E12,5 war neben der starken Expression in der Handfläche auch deutliche *c-Jun*-Aktivität im interdigitalen Mesoderm zu detektieren (Abb. 3.36B). Diese war in HH26 Flügelknospen besonders auffällig (Abb. 3.36E). Am Tag E13,5 bzw. HH34 konnten *c-Jun*-Transkripte noch im interdigitalen Mesoderm, den Überresten der AER an den Spitzen der Kondensationen, sowie in den sich entwickelnden Gelenken detektiert werden (Abb. 3.36C,F). Besonders während der späten Stadien der Gliedmaßenentwicklung ist *c-Jun* also in den Bereichen der Apoptose exprimiert. An diesen Orten ist außerdem eine Koexpression mit *Dkk-1* gegeben (vergleiche mit Abb. 3.19 und Abb. 3.20). Somit ist *c-Jun* ein vielversprechender Kandidat als Regulator der *Dkk-1*-Expression während apoptotischer Stimuli.

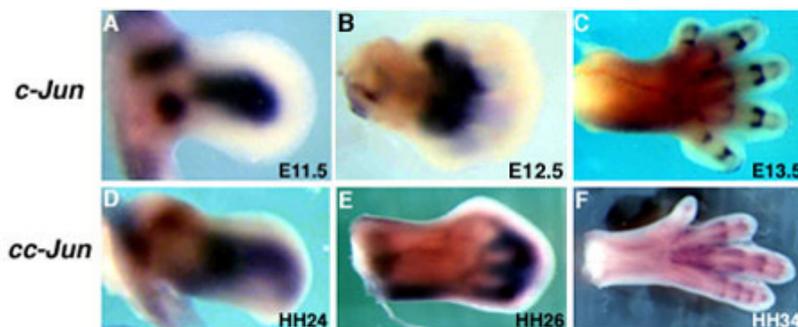


Abbildung 3.36 : *c-Jun*-Expression in Gliedmaßenknospen der Maus und des Huhns.

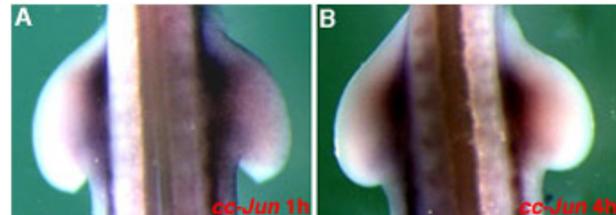
Alle Gliedmaßenknospen sind so orientiert, daß anterior oben und distal rechts ist. **A)** Am Tag E11,5 ist *c-Jun* im zentralen Mesoderm und in zwei distinkten proximalen mesodermalen Domänen exprimiert. **B)** Am Tag E12,5 finden sich *c-Jun*-Transkripte in der gesamten Handfläche, sowie dem interdigitalen Mesenchym. **C)** *c-Jun*-Expression in E13,5 Extremitäten in den Gelenken, dem interdigitalen Mesenchym und den Überresten der AER an den Spitzen der Kondensationen. **D)** *cc-Jun*-Transkripte sind an HH24 auf das zentrale Mesoderm, sowie auf zwei proximale Expressionsdomänen beschränkt. **E)** Massive *cc-Jun*-Expression im interdigitalen Mesenchym einer HH26 Flügelknospe. **F)** *cc-Jun*-Expression im interdigitalen Mesenchym und den Gelenken einer HH34 Beinknospe.

3.18.2 *cc-Jun*-Induktion durch UV-Strahlung

Als nächstes wurde analysiert, ob *c-Jun* als Induktor der *Dkk-1*-Expression nach UV-Bestrahlung in Frage kommt. Hierzu wurden Hühnerembryonen wiederum mit UV-Licht

bestrahlt und die *cc-Jun*-Expression nach unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. Es konnte eine drastische Hochregulation von *cc-Jun* in den bestrahlten Arealen nach 1 Stunde nachgewiesen werden (Abb. 3.37A). Diese war allerdings transient, da sie nach 4 Stunden nicht mehr detektierbar war (Abb. 3.37B). Somit kommt *cc-Jun* als Aktivator der *cDkk-1*-Transkription unter diesen Umständen in Frage.

Abbildung 3.37 : *cc-Jun*-Induktion nach UV-Exposition. Dorsale Ansichten der vorderen Extremitätenpaare. **A)** Massive Induktion von *cc-Jun* in der rechten (bestrahlten) Flügelknospe nach 1h. **B)** Nach 4h ist die initiale Hochregulation nicht mehr detektierbar. h = Stunden.



3.18.3 *c-Jun* Regulation durch rhBMP-4

Die Frage, die sich hieran anschloß war, ob auch eine *c-Jun*-Aktivierung durch Bmp unter Bedingungen, unter denen auch *Dkk-1* induziert wird, stattfindet. Dies konnte nicht durch Implantation von Bmp-Kugeln getestet werden, da *cc-Jun* schon durch die unvermeidliche Verwundung des Embryos bei dieser Manipulation induziert wurde (Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt interferiert ganz offensichtlich mit der Interpretation eines solchen Experiments. Aus diesem Grund wurde ein Zellkultursystem etabliert, mit dem schon der Nachweis der Induktion von *Bambi* durch Bmp gelungen ist (Grotewold et al., 2001). Hierbei wurde rhBMP-4 (100 ng/ml) zum Kulturmedium gegeben, in dem MEF inkubiert wurden. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurde dann die RNA isoliert und die Expression verschiedener Gene per RT-PCR nachgewiesen und quantifiziert. Für einen solchen Ansatz mußten zunächst die optimalen PCR-Bedingungen für die einzelnen Oligonukleotidpaare etabliert werden, da die Analyse nur in einem linearen Bereich der Amplifikation aussagekräftig ist. Bei hohen Zyklenzahlen (ungefähr ab Zyklus 28-30) wird aufgrund des Nukleotidverbrauchs und Enzymermüdung der Sättigungsbereich erreicht, in dem Quantitätsunterschiede in den entsprechenden Transkriptmengen nicht mehr nachweisbar sind. Zur Etablierung dieser Bedingungen wurde eine reverse Transkription mit 100 ng bzw. 200 ng Total-RNA durchgeführt. Mit diesen beiden Reaktionsansätzen wurde dann eine semiquantitative PCR durchgeführt, indem aus einem 50 μ l Standard-PCR-Ansatz nach den in Abb. 3.38 für jedes Oligonukleotidpaar angegebenen Zyklenzahlen jeweils 10 μ l entnommen und per Agarosegelelektrophorese analysiert wurden. Im linearen Amplifikationsbereich muß also jeweils der Faktor 2 zwischen den Intensitäten der Produkte zwischen Ansatz 1 (100 ng Total-RNA) und Ansatz 2 (200 ng Total-RNA) nachweisbar sein. Dies ist in Abb. 3.38 für alle in dieser Arbeit in einem solchen Experiment verwendeten Oligonukleotidpaare gezeigt.

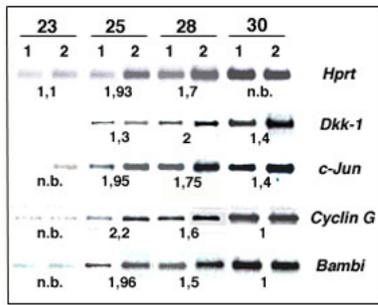


Abbildung 3.38 : Etablierung der Bedingungen der semiquantitativen RT-PCR. Mit 100 ng (jeweils Spalte 1) bzw. 200 ng (jeweils Spalte 2) Total-RNA wurde eine reverse Transkription durchgeführt. Darauf folgte eine PCR mit den in der jeweiligen Zeile angegebenen spezifischen Oligonukleotidpaaren (*Hprt* : *Hprt-5'*/*Hprt-3'* – 381bp; *Dkk-1* : *mdkk-1-F1/mdkk-B2* – 1049 bp; *c-Jun* : *mcJ-3'UTR-F1/mcJ-3'UTR-B1* – 552 bp; *Bambi* : *Bambi-EST-F2/Bambi-EST-B2* : 341 bp; *Cyclin G* : *CycG-Full-F1/CycG-Full-B1* :

1174 bp), wobei nach der oben angegebenen Zyklenzahl jeweils 10 µl des Ansatzes entnommen wurden. Jeweils unter den zu vergleichenden Signalen ist der Faktor dargestellt (kalkuliert mit NIH Image 1.62), um den die Intensität des Signals in Spalte 2 höher ist als die in Spalte 1. n.b. = nicht bestimmt.

Demnach wurden für die Amplifikation mit *Hprt*-, *c-Jun*, *CycG*- und *Bambi*-spezifischen Oligonukleotidpaaren 25 Zyklen, für die mit *Dkk-1*-spezifischen 28 Zyklen gewählt.

Mit diesen Bedingungen wurde nun das oben erwähnte Experiment zur Analyse der Regulation der *Dkk-1*- und *c-Jun*-Expression durch BMP-4 durchgeführt. Auch eine mögliche Induktion der *CycG*-Transkription durch BMP-4 wurde untersucht. Abb. 3.39 zeigt, daß sowohl *Dkk-1*, als auch *c-Jun* eine halbe Stunde nach rhBMP-4-Applikation stark transkriptionell induziert waren. Diese erhöhte Expression von *Dkk-1* hielt zu allen analysierten Zeitpunkten bis 8 Stunden nach rhBMP-4-Gabe an, während die Induktion von *c-Jun* auch unter diesen Bedingungen transient war. Nach 4 Stunden war die *c-Jun*-Expression auf das Basalniveau zurückgegangen. Die *CycG*-Expression hingegen war nach rhBMP-4-Applikation zu allen analysierten Zeitpunkten unverändert (Abb. 3.39). Die Koinduktion von *c-Jun* und *Dkk-1* nach 30 min. ist also konsistent mit der Hypothese, daß *c-Jun*, nicht aber *Cyclin G* ein entscheidender Faktor zur Induktion von *Dkk-1* durch unterschiedliche Stimuli ist.

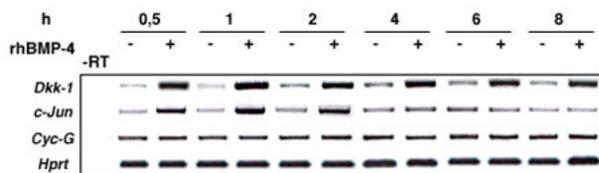


Abbildung 3.39 : Genexpression in MEF nach rhBMP-4-Applikation. RT-PCR mit den in der jeweiligen Zeile angegebenen spezifischen Oligonukleotidpaaren (*Dkk-1* : *mdkk-1-F1/mdkk-B2* – 1049 bp; *c-Jun* : *mcJ-3'UTR-F1/mcJ-3'UTR-B1* – 552 bp; *Cyc-G* : *CycG-Full-F1/CycG-Full-B1* : 1174 bp) zu den oben angegebenen Zeitpunkten nach rhBMP-4-Applikation. *Hprt*-spezifische Oligonukleotide wurden zur Standardisierung verwendet (*Hprt-5'*/*Hprt-3'* – 381bp). Während im Expressionsniveau von *Cyclin G* zu keinem analysierten Zeitpunkt ein Unterschied als Antwort auf rhBMP-4 festgestellt werden konnte, waren *Dkk-1* und *c-Jun* nach 30 min., 1h und 2h koinduziert. h = Stunden, -RT = Kontrolle ohne Reverse Transkriptase.

Während im Expressionsniveau von *Cyclin G* zu keinem analysierten Zeitpunkt ein Unterschied als Antwort auf rhBMP-4 festgestellt werden konnte, waren *Dkk-1* und *c-Jun* nach 30 min., 1h und 2h koinduziert. h = Stunden, -RT = Kontrolle ohne Reverse Transkriptase.

3.18.4 *c-Jun*-Expression in *Ft/+* Vordergliedmaßenknospen

Zur Analyse der wichtigen Frage, ob *Bmp-4* nicht nur unter diesen Zellkulturbedingungen, sondern auch *in vivo c-Jun* aktiviert, wenn *Dkk-1* induziert wird, wurde die *Ft*-Mutante genutzt. Wie unter 3.12.2 beschrieben, korreliert hier die ektopische Expression von *Bmp-4* mit der ektopischen Aktivierung von *Dkk-1* und vermehrter Apoptose. In der Tat ist in E12,5 Vordergliedmaßenknospen von *Ft/+*-Embryonen im Bereich der ektopischen *Bmp*-Aktivität auch eine erhöhte Transkription von *c-Jun* nachzuweisen (Abb. 3.40). Dies ist ein weiterer guter Hinweis auf eine wichtige endogene Funktion von *c-Jun* in der Übermittlung eines *Bmp*-Signals, das zur Induktion der *Dkk-1*-Expression führt.

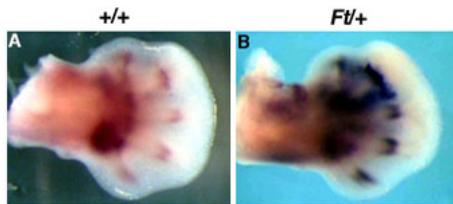


Abbildung 3.40 : *c-Jun*-Expression in E12,5 *Ft/+* Vordergliedmaßenknospen. Die Extremitäten sind so orientiert, daß anterior oben und distal rechts ist. **A)** Wildtyp-Expression von *c-Jun*. **B)** *c-Jun* ist massiv hochreguliert im anterioren Bereich der *Ft/+* Gliedmaßenknospe, sowohl im interdigitalen Mesenchym zwischen den Fingern 1 bis 3 als auch in der distalen Expressionsdomäne in der zweiten Kondensation.

3.18.5 Koregulation von *c-Jun* und *Dkk-1*

Für *c-Jun* ist gezeigt worden, daß dessen Expression sowohl von Serumfaktoren abhängt, als auch von diversen Streßsignalen induziert wird (Lamph et al., 1988; Ryder und Nathans, 1988). Wenn *Dkk-1* von *c-Jun* reguliert wird, sollte eine parallele Veränderung der *Dkk-1*-Expression unter den entsprechenden Bedingungen nachweisbar sein. Abb. 3.41A zeigt, daß die *Dkk-1*-Expression in der Tat wie die von *c-Jun* nach Serumentzug in MEF drastisch absinkt. Die Apoptose-Induktion durch oxidativen Streß beinhaltet die Induktion von *c-Jun* in verschiedenen Zelltypen (Richter-Landsberg und Vollgraf, 1998; Janssen et al., 1997). Durch die Applikation von H_2O_2 konnte gezeigt werden, daß dies auch in MEF der Fall ist (Abb. 3.41B). Unter diesen Bedingungen ist auch eine massive Erhöhung der *Dkk-1*-Expression detektierbar (Abb. 3.41B), was zeigt, daß die Expression der beiden Gene unter diversen experimentellen Bedingungen koreguliert ist.

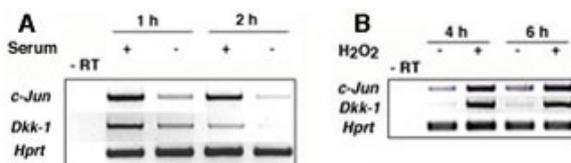


Abbildung 3.41 : Koregulation von *c-Jun* und *Dkk-1* in MEF. RT-PCR-Analysen nach Serumentzug (**A**) und H_2O_2 -Applikation (**B**). *Hprt*-spezifische Oligonukleotide wurden zur Standardisierung verwendet (*Hprt-5'/Hprt-3'* –

381bp). **A)** 1h und 2h nach Serumentzug ist die Expression von *c-Jun* (*mcJ-3'UTR-F1/mcJ-3'UTR-B1* – 552 bp) und *Dkk-1* (*mdkk-1-F1/mdkk-B2* – 1049 bp) in MEF drastisch reduziert. **B)** 4h und 6h nach

Applikation von H₂O₂ sind *c-Jun* und *Dkk-1* massiv induziert. h = Stunden, -RT = Kontrolle ohne Reverse Transkriptase.

3.18.6 *c-Jun* ist ausreichend für die Induktion von *Dkk-1*

Die anschließende Untersuchung wurde durchgeführt, um zu analysieren, ob *c-Jun*-Überexpression ausreichend ist, *Dkk-1*-Transkription zu induzieren. Um dies direkt in der Gliedmaßenknospe zu analysieren, wurde ein *ex vivo* Elektroporationssystem angewendet. Hierzu wurden HH21-23 Extremitätenknospen isoliert, *in vitro* mit einem *c-Jun*-Expressionsvektor bzw. einem Kontrollvektor elektroporiert und schließlich für 6 Stunden kultiviert. Danach erfolgte die Analyse der *cDkk-1*-Expression durch „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung. Zur Konstruktion von pCS2+*c-Jun* wurde der offene Leserahmen von *c-Jun* mit den Oligonukleotiden *mcJ-Full-F1/mcJ-Full-B1* amplifiziert und in den Vektor pGEM[®]-T kloniert. Anschließend wurde dieses Fragment mit *ApaI* und *NotI* herausgelöst und in pSL1180 (GenBank Nr. U13865) ligiert. Nach Spaltung mit *ClaI* und *EcoRI* wurde das Fragment schließlich in den mit denselben Enzymen gespaltenen Vektor pCS2+ inseriert. Abb. 3.42 zeigt zunächst einen Vorversuch, in dem ein *lacZ*-Expressionskonstrukt benutzt wurde. Die β -Galaktosidase-Färbung zeigt zufällig verteilte *lacZ*-positive Zellen im Ekto- und v.a. auch dem Mesoderm der Gliedmaßenknospe und verifiziert damit die Funktionalität des Systems.

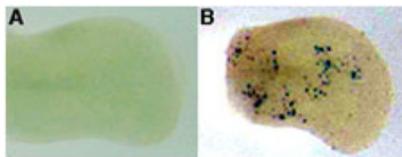


Abbildung 3.42 : β -Galaktosidase-Färbung nach *ex vivo* Elektroporation von Hühnergliedmaßenknospen mit einem *lacZ*-Expressionsplasmid. Anterior ist oben, distal rechts. **A)** Kontrollgliedmaßenknospe elektroporiert mit pCS2+ zeigt keine *lacZ*-positiven Zellen. **B)** Elektroporation mit pEQ176 führt zu massivem Auftreten *lacZ*-positiver Zellen im Ektoderm und dem Mesoderm der Gliedmaßenknospe.

Nach Elektroporation mit einem Kontrollvektor und anschließender *in situ* Hybridisierung mit einer Probe gegen *cDkk-1* zeigte sich, daß in den so behandelten Extremitätenknospen das endogene *cDkk-1*-Muster rekapituliert wurde (Abb. 3.43A). Nach Elektroporation mit pCS2+*c-Jun* hingegen war eine massive ektopische Überexpression von *cDkk-1* zu beobachten (Abb. 3.43B). Dieses Resultat zeigt, daß *c-Jun* ausreicht, um *cDkk-1*-Expression *in vivo* zu induzieren.

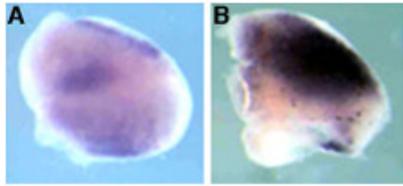


Abbildung 3.43 : *cDkk-1*-Expression nach Überexpression von *c-Jun*. Anterior ist oben, distal rechts. **A)** Das endogene *cDkk-1*-Expressionsmuster wird in einer Flügelknospe, die mit pCS2+ elektroporiert wurde, rekapituliert. **B)** Die Flügelknospe, die mit pCS2+-*c-Jun* elektroporiert wurde, zeigt massive ektopische *cDkk-1*-Expression.

3.18.7 *c-Jun* ist wichtig für die normale *Dkk-1*-Expression

Um zu analysieren, ob *c-Jun* notwendig für die *Dkk-1*-Expression und dessen Induktion durch rhBMP-4 ist, wurde die *Dkk-1*-Expression in *c-Jun*^{-/-}-MEF gemessen. Abb. 3.44 zeigt, daß schon die endogene Expression um ca. 40% reduziert ist (vergleiche +/+ und *c-Jun*^{-/-} ohne rhBMP-4). Nach Applikation von rhBMP-4 zu Wildtyp-MEF war die *Dkk-1*-Expression nach 4 Stunden 5,2-fach gesteigert. In *c-Jun*^{-/-}-MEF wurde *Dkk-1* zwar noch induziert, aber um einen wesentlich geringeren Faktor (1,7-fach) verglichen mit den Wildtypzellen (Abb. 3.44). Ein anderes Gen, von dem gezeigt werden konnte, daß seine Expression von rhBMP-4 in diesem System induzierbar ist, ist *Bambi* (Grotewold et al., 2001). Sowohl das Basalniveau der *Bambi*-Expression als auch dessen Induktion durch rhBMP-4 waren unverändert in *c-Jun*^{-/-}-MEF (Abb. 3.44), was zeigt, daß diese Zellen keinen grundsätzlichen Defekt in der Bmp-Signaltransduktion besitzen. D.h. *c-Jun* ist notwendig für die normale *Dkk-1*-Expression wie auch für das volle Ausmaß der Induktion von *Dkk-1* durch rhBMP-4.

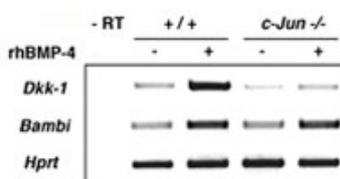


Abbildung 3.44 : *c-Jun* ist wichtig für die normale *Dkk-1*-Expression.

RT-PCR-Analyse 4h nach Applikation von rhBMP-4 zu Wildtyp (+/+) oder *c-Jun*^{-/-}-MEF. In +/+MEF ist *Dkk-1* (*mdkk-1-F1/mdkk-B2* – 1049 bp) 5,2-fach nach Gabe von rhBMP-4 induziert. In *c-Jun*^{-/-}-MEF ist das Basalniveau der *Dkk-1*-Expression um 40% des Wildtyp-Niveaus reduziert und *Dkk-1* ist nur 1,7-fach nach rhBMP-4-Applikation induziert. *Bambi* (*Bambi-EST-F2/Bambi-EST-B2* : 341 bp) hingegen ist in *c-Jun*^{-/-}-MEF normal exprimiert wie auch durch rhBMP-4 induziert. *Hprt*-spezifische Oligonukleotide wurden zur Standardisierung benutzt (*Hprt-5'/Hprt-3'* – 381bp). h = Stunden, –RT = Kontrolle (mit +/+RNA) ohne Reverse Transkriptase.

3.18.8 *Jnk-1* ist notwendig für die *Dkk-1*-Expression

Die residuale Induktion von *Dkk-1* durch rhBMP-4 in *c-Jun*^{-/-}-MEF impliziert, daß weitere Transkriptionsfaktoren hierzu beitragen. Dies könnten Mitglieder der Smad-Familie sein, oder andere Mitglieder der Ap-1-Familie, die wie *c-Jun* von *Jnk-1* aktiviert werden. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde die *Dkk-1*-Expression in *Jnk-1*^{-/-}-MEF

untersucht. Wie Abb. 3.45 zeigt, konnten per RT-PCR keine *Dkk-1*-Transkripte in *Jnk-1*^{-/-}-MEF nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis betont die entscheidende Rolle von *Jnk-1* für die physiologische Expression von *Dkk-1*.

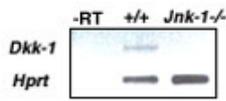


Abbildung 3.45 : *Dkk-1*-Expression in *Jnk-1*^{-/-}-MEF. RT-PCR zeigt die Abwesenheit von *Dkk-1*-Transkripten (*mdkk-1-F1/mdkk-B2* – 1049 bp) in *Jnk-1*^{-/-}-Zellen nach 35 PCR-Zyklen. *Hprt*-spezifische Oligonukleotide wurden zur Standardisierung verwendet (*Hprt-5′/Hprt-3′* – 381bp). –RT = Kontrolle (mit +/+-RNA) ohne Reverse Transkriptase.

3.19 Funktionsanalyse von *Dkk-1*

3.19.1 Transiente Transfektion von NIH/3T3-Zellen

Die bisher gezeigten Daten zur Expression und Regulation von *Dkk-1* implizieren eine wichtige Funktion dieses Gens während des PZT. Um zu analysieren, ob die Überexpression von *Dkk-1* ausreicht, um Apoptose zu induzieren, wurden der Expressionsvektor pCS2+*Xdkk-1*, der *Xenopus Dkk-1* konstitutiv unter der Kontrolle des CMV-Promoters exprimiert, und pCS2+ als Negativkontrolle für transiente Transfektionen von NIH/3T3-Fibroblasten verwendet. Als Positivkontrolle wurde pCS2+*-c-Jun* verwendet, da *c-Jun*-Überexpression in NIH/3T3-Zellen zur Induktion des apoptotischen Zelltods führt (Bossy-Wetzel et al., 1997). PZT wurde dann durch die hiermit verbundene charakteristische „DNA-Leiter“, also dem Auftreten von sich in der Länge von ca. 180 bp unterscheidenden DNA-Fragmenten, durch Agarosegelelektrophorese nachgewiesen. Abb. 3.46 zeigt, daß die Überexpression von *c-Jun* in der Tat zu Apoptose führt, die Überexpression von pCS2+ oder pCS2+*Xdkk-1* allerdings nicht. In diesem System ist *Dkk-1* also nicht ausreichend, um PZT zu induzieren.

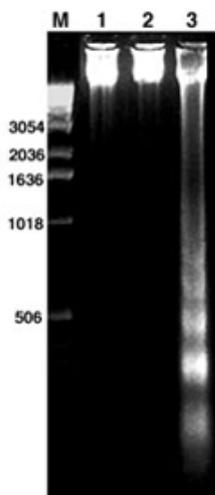


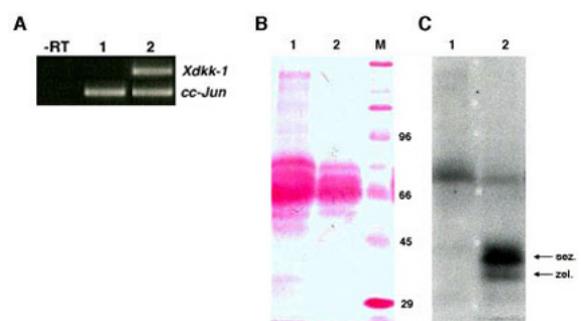
Abbildung 3.46 : *Dkk-1* induziert keine Apoptose nach Überexpression in NIH/3T3-Fibroblasten. NIH/3T3 wurden transient mit pCS2+ (1), pCS2+*Xdkk-1* (2) oder pCS2+*-c-Jun* (3) transfektiert. 48 Stunden später wurde die DNA isoliert. Sowohl in 1 als auch in 2 ist die genomische DNA intakt, während die für Apoptose charakteristische Spaltung der DNA in Fragmente mit einer Größe von ca. 180 bp und einem Vielfachen davon in 3 nachweisbar ist. M = Längenstandard. Die Zahlen links neben dem Foto geben die Größe des jeweiligen Fragments des Längenstandards in bp an.

3.19.2 Konstruktion eines rekombinanten Retrovirus

Zur Konstruktion eines rekombinanten Retrovirus wurde der offene Leserahmen von *Xdkk-1* aus dem Plasmid pdkk-1-FLAG (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Christof Niehrs) durch Spaltung mit *NcoI* und *XhoI* isoliert. Dieses Fragment wurde in den mit *NcoI* und *SalI* geöffneten Vektor pSL1180 ligiert und mit den Enzymen *NcoI* und *PstI* wieder herausgelöst. Mit denselben Restriktionsendonukleasen wurde der Vektor SLAX12 (Morgan und Fekete, 1996) gespalten, in den das *Xdkk-1*-Fragment kloniert wurde. Schließlich wurde es mit *ClaI* isoliert und in den mit *ClaI* gespaltenen und dephosphorylierten RCASBP(A)-Vektor (Hughes und Kosick, 1984; Greenhouse et al., 1988) inseriert. Zur Überprüfung, ob *Xdkk-1* von diesem Virus exprimiert wird, wurden CEF hiermit und als Negativkontrolle mit RCASBP(A)/AP, das das menschliche *alkalische Phosphatase*-Gen exprimiert, infiziert und 48 h später die RNA isoliert. Abb. 3.47A zeigt, daß sich *Xdkk-1*-Transkripte nur in RCASBP(A)/*Xdkk-1*-infizierten CEF amplifizieren lassen. Zur Kontrolle, ob diese RNA-Expression auch in der Produktion des entsprechenden Proteins resultiert, wurden die durch RCASBP(A)/*Xdkk-1* bzw. RCASBP(A)/AP-konditionierten Zellkulturüberstände der infizierten CEF zur Immunodetektion des *Xdkk-1*-Proteins verwendet. Hierzu wurde der Anti-15 Antikörper benutzt, der sowohl die intra- als auch die extrazelluläre Form von *Xdkk-1* erkennt (Glinka et al., 1998). Wie in Abb. 3.47C dargestellt, ist in den Überständen der mit RCASBP(A)/*Xdkk-1*-infizierten CEF das *Xdkk-1*-Protein nachweisbar. Neben dem prominenteren Signal der sezernierten Form, ist auch die schneller migrierende intrazelluläre Form detektierbar, was auf eine leichte Kontamination der Zellkulturüberstände mit intrazellulären Proteinen hindeutet (Abb. 3.47C).

Abbildung 3.47 : RNA- und Proteinexpression durch

RCASBP(A)/*Xdkk-1*. **A)** *Xdkk-1*-Transkripte lassen sich in der RNA-Präparation aus mit RCASBP(A)/*Xdkk-1*-infizierten CEF (2), nicht aber aus RCASBP(A)/AP-infizierten CEF per RT-PCR nachweisen. Spalte „2“ zeigt das 813 bp große spezifische Produkt der Oligonukleotide *Xdkk-F1/Xdkk-B2*. Zum Nachweis der erfolgreichen RNA-Isolierung wurden *cc-Jun*-spezifische Oligonukleotide verwendet (*ccJ-ORF-F1/ccJ-ORF-B1* – 867 bp), mit denen in „1“ und „2“ das entsprechende Fragment nachgewiesen werden konnte. –RT = Kontrolle ohne Reverse Transkriptase **B)** Ponceau-Färbung der zur Immunodetektion in **C** verwendeten Membran. Die Proteinmenge in „1“ übersteigt die in „2“ wie die intensivere Färbung verdeutlicht. 1 : konzentrierter Zellkulturüberstand von RCASBP(A)/AP-infizierten CEF, 2 : konzentrierter Zellkulturüberstand von RCASBP(A)/*Xdkk-1*-infizierten CEF. M = Längenstandard. Die Zahlen rechts repräsentieren die Größen der entsprechenden Polypeptide des Längenstandards in kDa. **C)** Immunodetektion des *Xdkk-1*-Proteins mit dem Anti-15 Antikörper. „1“ und



2 : konzentrierter Zellkulturüberstand von RCASBP(A)/*Xdkk-1*-infizierten CEF. M = Längenstandard. Die Zahlen rechts repräsentieren die Größen der entsprechenden Polypeptide des Längenstandards in kDa. **C)** Immunodetektion des *Xdkk-1*-Proteins mit dem Anti-15 Antikörper. „1“ und

„2“ wie in **B**. In „2“ kann das charakteristische Doppelsignal der sezernierten (sez.) und zellulären (zel.) Form von Xdkk-1 mit einer Größe von ca. 40 kDa nachgewiesen werden.

Zur Bestimmung des Virustiters wurden CEF mit unterschiedlichen Verdünnungen der Virus-Stammlösung infiziert und nach 48 Stunden die Anzahl der infizierten Zellklone durch eine Antikörperfärbung bestimmt. In nicht-infizierten Kulturen waren keine positiven Klone zu detektieren. Tab. 3.1 zeigt die Ergebnisse dieser Analyse. Demnach hat RCASBP(A)/*Xdkk-1* einen Titer von ca. 10^7 IE/ml (IE = Infektiöse Einheiten) und RCASBP(A)/*AP* einen Titer von ca. 5×10^7 IE/ml.

Virus	Anzahl positiver Zellklone in Verdünnungsstufe		
	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
RCASBP(A)/ <i>Xdkk-1</i>	12, 11, 8, 11 / 10,5	1, 1, 1, 0 / 0,75	0, 0, 0, 0
RCASBP(A)/ <i>AP</i>	n.b.	5, 3, 5, 5 / 4,5	0, 0, 0, 0

Tab. 3.1 : Bestimmung des Virustiters. Dargestellt sind die Anzahl der positiven Zellklone in der jeweiligen Verdünnungsstufe. Es sind die Werte von vier mit dem entsprechenden Virus infizierten CEF-Kulturen gezeigt. Der fünfte Wert gibt jeweils den Mittelwert der vorausgehenden vier Werte an. Verdünnungsstufe = Verdünnung der Virus-Stammlösung $\times 10^{-1}$. n.b. = nicht bestimmt.

3.19.3 Implantation von RCASBP(A)/*Xdkk-1*-infizierten CEF in Gliedmaßenknospen

Die mit RCASBP(A)/*Xdkk-1* infizierten CEF zeigten keine Veränderung in ihrem Wachstumsverhalten im Vergleich zu den mit RCASBP(A)/*AP* infizierten Zellen. Auch konnten in diesen Zellen keine Anzeichen für gesteigerte Apoptose gefunden werden, da die genomische DNA, die aus diesen Zellen isoliert wurde, intakt war (Daten nicht gezeigt). Da also auch die Infektion von CEF mit RCASBP(A)/*Xdkk-1* nicht ausreicht, um in diesen Zellen Apoptose zu induzieren, wurde durch die Transplantation von RCASBP(A)/*Xdkk-1*-infizierten CEF analysiert, ob die Überexpression von *Dkk-1* in Gliedmaßenknospen zur Induktion von PZT führt. Hierbei wurde durch vorausgehende Trypan Blue Färbung sichergestellt, daß nur solche Zellen transplantiert wurden, die zum Zeitpunkt der Operation keine Anzeichen von PZT zeigten. 20 Stunden später wurde eine Nile Blue Färbung zur Detektion apoptotischer Zellen im Embryo durchgeführt. Außerdem wurde mit denselben Embryonen eine *in situ* Hybridisierung mit einer Probe, die die Transkripte des viralen *gag*-Gens detektiert, durchgeführt, um die Regionen der *gag*-Expression mit denen des PZT vergleichen zu können. Als Negativkontrolle wurden RCASBP(A)/*AP*-infizierte CEF verwendet, deren Implantation in die Gliedmaßenknospe nicht zu ektopischer Apoptose führte (Abb. 3.48A,C, n=5/5). Abb. 3.48B,D zeigen, daß in der Region, in der sich RCAS(BP)/*Xdkk-1*-infizierte CEF befinden, auch ektopische Apoptose zu detektieren war (n = 3/8).

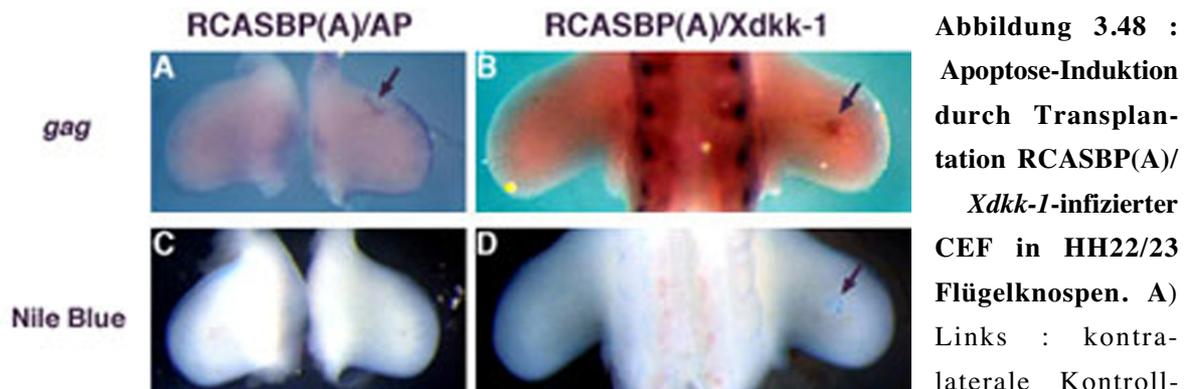


Abbildung 3.48 :
Apoptose-Induktion
durch Transplan-
tation RCASBP(A)/
***Xdkk-1*-infizierter**
CEF in HH22/23
Flügelknospen. A)
 Links : kontra-
 laterale Kontroll-

flügelknospe, rechts : experimentelle Flügelknospe. *gag*-Expression in einem CEF-Transplantat, das mit RCASBP(A)/AP infiziert wurde (Pfeil). **B)** Dorsale Ansicht des vorderen Extremitätenpaares. Links : Kontrollflügelknospe, rechts : experimentelle Flügelknospe. *gag*-Expression in einem CEF-Transplantat, das mit RCASBP(A)/*Xdkk-1* infiziert wurde (Pfeil). **C)** In den Flügelknospen aus **A** ist keine Veränderung des Musters des PZT zu detektieren. **D)** Embryo aus **B**. Ektopische Apoptose im Bereich des Transplantats (Pfeil).

3.19.4 *Dkk-1* hat keinen Effekt auf die Knorpelentwicklung

Wie unter 3.12.2 dargelegt, sind die Regionen der Gliedmaßenknospen, in denen Knochendifferenzierung erfolgt, immer frei von *Dkk-1*-Transkripten. Dies könnte bedeuten, daß *Dkk-1* die chondrogene Differenzierung hemmt. Um dies zu testen, wurden Hochdichtekulturen von mesodermalen Gliedmaßenknospenzellen angelegt, in denen alle Stadien der Knochendifferenzierung *in vitro* nachvollzogen werden können. Sollte *Dkk-1* diesen Prozeß inhibieren, müßte sich dies in der Zahl der Knorpelkondensationen in diesen Kulturen äußern, wenn sie in *Xdkk-1*-konditioniertem Medium inkubiert werden. Wie Abb. 3.49A-D zeigen, war aber weder nach 3 Tagen, noch nach 5 Tagen ein Effekt auf die Anzahl dieser Aggregate zu erkennen. Auch die photometrische Quantifizierung des in den Kondensationen eingeschlossenen Alcian Blue, das zur Visualisierung der Knorpelentstehung verwendet wurde, zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollkulturen und den in *Xdkk-1*-konditioniertem Medium kultivierten (Abb. 3.49E). Somit konnte kein Effekt von *Dkk-1* auf die Knorpeldifferenzierung nachgewiesen werden.

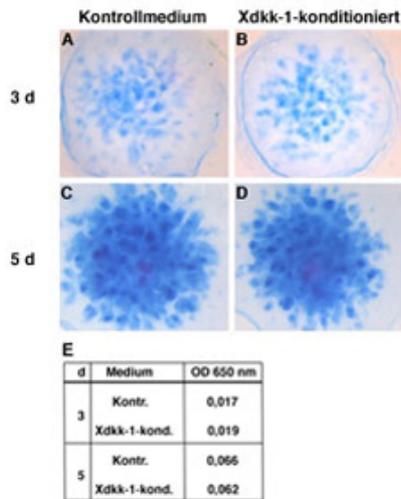
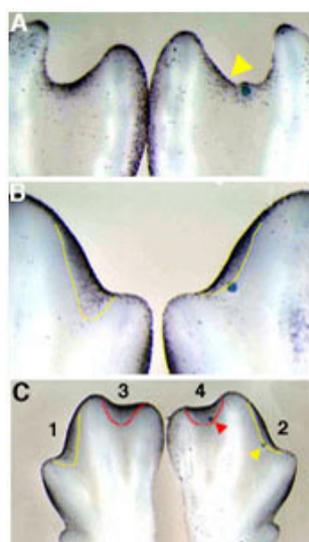


Abbildung 3.49 : Dkk-1 hat keinen Effekt auf die Knorpeldifferenzierung *in vitro*. A-D zeigen eine repräsentative von jeweils 12 Hochdichtekulturen, die mit Alcian Blue gefärbt wurden. A,B) Zwischen in Kontrollmedium inkubierten (A) und in Xdkk-1-konditioniertem Medium inkubierten (B) Hochdichtekulturen ist kein signifikanter Unterschied in der Anzahl Alcian Blue positiver Knorpelkondensationen nach 3 d festzustellen. C,D) Das gleiche gilt für 5 d inkubierte Kulturen. C : Kontrollmedium, D : Xdkk-1-konditioniertes Medium. E) Die Zellen aller 12 Kulturen der jeweiligen Gruppe wurden lysiert und die Überstände mit dem freigesetzten Farbstoff vereinigt. Die Messung der optischen Dichte (OD) bei 650 nm dieser Überstände zeigte keinen signifikanten

Unterschied zwischen den in den unterschiedlichen Medien inkubierten Kulturen. Es sind die Mittelwerte von jeweils drei Messungen gezeigt. d = Tage.

3.19.5 Einfluß von Dkk-1 auf PZT im interdigitalen Mesenchym

Zum Studium des PZT während der Gliedmaßenentwicklung eignen sich besonders die Beinknospen von Entenembryonen, da hier die Regionen des Zelltods im interdigitalen Mesenchym auf die ganz distalen Bereiche beschränkt sind. Die mutmaßliche Apoptose-fördernde Wirkung von Dkk-1 wurde in diesem System durch Implantation von Mikrokugeln, die in Xdkk-1-konditioniertem Medium getränkt wurden, analysiert. Als Kontrolle diente hierbei das von RCASBP(A)/AP-infizierten CEF konditionierte Medium. Der Einfluß auf die interdigitale Apoptose wurde dann per „Whole mount“ TUNEL analysiert. In Abb. 3.50A und B ist gezeigt, daß das zehnfach konzentrierte Kontrollmedium einen Apoptose-hemmenden Einfluß auf das interdigitale Mesenchym ausübte. Das Ausmaß des PZT war in den so behandelten Extremitätenknospen deutlich reduziert (n=5/5). In direkter Nachbarschaft zur Mikrokugel war sogar in einigen Fällen ein geringer mesodermaler Auswuchs zu erkennen (Abb. 3.50A). Nach der Implantation von Kugeln, die im zehnfach konzentrierten Xdkk-1-konditionierten Medium getränkt waren, konnte hingegen keine Reduktion des PZT festgestellt werden (n= 3/3), in einem Fall sogar eine leichte Erhöhung (Abb. 3.50C). Dieser Eindruck wurde durch die computergestützte Quantifizierung des Ausmaßes des PZT bestätigt (Abb. 3.50D).



D

Fläche Nr.	RAE
1	100
2	71
3	100
4	113

Abbildung 3.50 : Dkk-1-Effekt auf PZT im interdigitalen Mesenchym von Beinknospen des Entenembryos. A-C zeigen „Whole mount“ TUNEL Färbungen von E9-10 Beinknospen der Ente. **A**) Links: kontralaterale Kontroll Extremität. Die Implantation einer Mikrokugel, die in Kontrollmedium getränkt wurde, in den dritten Interdigitalraum führt zu einer Reduktion des PZT (gelbe Pfeilspitze). Direkt oberhalb der Kugel ist ein geringer mesodermaler Auswuchs festzustellen. **B**) zeigt ein weiteres Beispiel für die Verkleinerung der Region des PZT nach Implantation einer Kontrollkugel, hier im zweiten Interdigitalraum. Die gelben Linien verdeutlichen die Größe der Regionen der Apoptose, die in der kontralateralen Knospe (links) weiter nach proximal reicht. Dieser Effekt des Kontrollmediums ist unabhängig vom Interdigitalraum. **C**) Kleinere Vergrößerung der Beinknospen aus **B**, die die Implantation einer Kontrollkugel in den zweiten Interdigitalraum (gelbe Pfeilspitze) und die Implantation einer in Xdkk-1-konditioniertem Medium getränkten Kugel in den dritten Interdigitalraum (rote Pfeilspitze) zeigt. In der rot umrandeten Fläche 4 ist keine Reduktion des PZT im Vergleich zur Kontrollfläche 3 zu erkennen. **D**) Die Tabelle zeigt das Ergebnis der Quantifizierung des Ausmaßes des PZT in den in **C** markierten Flächen 1-4. Die RAE (Relative Apoptose Einheiten) wurden wie folgt kalkuliert : Die Färbung in den markierten Flächen 1-4 in **C** wurde mit NIH Image 1.62 quantifiziert. Die auf die gleiche Grundfläche bezogenen Meßwerte wurden für die beiden Kontrollflächen (1 und 3) jeweils gleich 100 gesetzt. Relativ hierzu wurde der Wert für die jeweils zugehörige experimentelle Fläche (2 bzw. 4) bestimmt. Während dies eine Reduktion des PZT für Fläche 2 im Vergleich zu Fläche 1 ergibt, ist eine leichte Erhöhung der Apoptose in Fläche 4 im Vergleich zu Fläche 3 nachzuweisen.

3.19.6 *Dkk-1* ist ausreichend für die Induktion von PZT in Gliedmaßenknospenexplantaten

Eine weitere Möglichkeit, *Dkk-1* in Gliedmaßenknospen zur Überexpression zu bringen, bestand in der bereits unter 3.18.6 verwendeten Explantat-Elektroporation. Hierzu wurden HH21-23 Flügelknospen mit pCS2+*Xdkk-1* bzw. als Negativkontrolle pCS2+ elektroporiert. Nach achtstündiger *in vitro* Kultivierung wurde das Ausmaß der Apoptose durch Nile Blue Färbung analysiert. Flügelknospen, die mit pCS2+*Xdkk-1* elektroporiert wurden, zeigten in diesem Experiment eine deutliche Erhöhung der Zahl apoptotischer Zellen (n=8/12) im Vergleich zu den Kontrollen (n=12, Abb. 3.51). In diesem System ist *Dkk-1*-Überexpression also ausreichend, um Apoptose in der Gliedmaßenknospe zu induzieren.

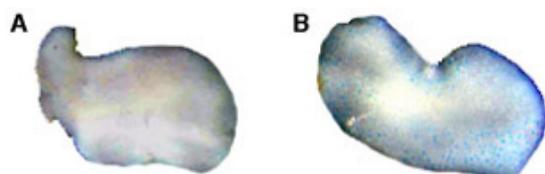


Abbildung 3.51 : Apoptose-Induktion durch *Dkk-1* in Gliedmaßenknospenexplantaten. Anterior ist oben, distal rechts. **A**) Kontrollflügelknospe elektroporiert mit pCS2+. **B**) Deutlicher Anstieg der Anzahl Nile Blue positiver Zellen in einer Flügelknospe, die mit pCS2+*Xdkk-1* elektroporiert wurde.

4. Diskussion

Eine Herausforderung des Studiums der Entwicklung der Vertebratenextremität ist es, zu verstehen, wie die Moleküle der Signalzentren kooperieren, um die korrekte Musterbildung und Differenzierung dieser Struktur zu gewährleisten. Die Charakterisierung existierender Mausmutanten bietet die Möglichkeit, diese regulatorischen Interaktionen detailliert zu analysieren. Durch die Korrelation von morphologischen und molekularen Veränderungen können potentielle Wirkungsmechanismen der relevanten Gene bzw. ihrer Produkte und damit ihre Bedeutung für die komplexen molekularen Netzwerke, die das Muster der Extremität determinieren, erfaßt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde aus diesem Grund die Gliedmaßenentwicklung in Embryonen der *Ft* Mausmutante untersucht.

4.1 Gestörte Balance zwischen Proliferation und Apoptose in *Ft/Ft*

Gliedmaßenknospen

4.1.1 Gesteigerte Proliferation durch *dHAND*, *Shh* und *Wnt-5a*

In den *Ft/Ft*-Embryonen, die maximal bis zum Tag E15,5 überleben, konnten schwerwiegende Störungen der Gliedmaßenentwicklung definiert werden. Auffällig ist zunächst eine ektopische Gewebewucherung im distalen Teil des Autopods, die sich über die gesamte A/P-Achse mit Ausnahme des posterioren Zehenelements erstreckt. Ein ähnlicher Phänotyp wurde in transgenen Mäusen beobachtet, die *Wnt-1* ektopisch in den Gliedmaßenknospen exprimierten (Zakany und Duboule, 1993). Diese Mäuse zeigten ebenfalls den Verlust distaler Phalangen und eine ektopische Ansammlung proliferierender Zellen im distalen Autopod. Die Autoren schlugen die massive Steigerung der Proliferation mesodermaler Zellen und die damit einhergehende Unfähigkeit dieser Zellen, zu kondensieren, als Ursache für diesen, auf den ersten Blick paradoxen Phänotyp der vergrößerten Gliedmaßenknospen mit paralleler Verstümmelung der Skelettelemente, vor (Zakany und Duboule, 1993). Gesteigerte Proliferation der mesodermalen Zellen des Autopods könnte also auch die Ursache der Veränderungen in *Ft/Ft* Extremitäten sein. Im Einklang mit dieser Interpretation sind die Expressionsdomänen sowohl von *dHAND*, als auch von *Shh* von frühen Stadien der Entwicklung an stark nach anterior/distal expandiert. Für *dHAND* wurde postuliert, daß es sich hierbei um einen Transkriptionsfaktor handelt, der mesodermale Zellen vor PZT schützt (Thomas et al., 1998; Srivastava, 1999; s. 1.4.5). PZT findet während der Normalentwicklung auch im distalen Mesoderm der Gliedmaßenknospe statt (Mori et al., 1995; Nakamura et al., 2000), einem Bereich, dem klassischerweise eine erhöhte Proliferationsrate der Zellen zugeschrieben wurde (Lewis, 1975; Summerbell und Lewis, 1975; Wolpert et al., 1975; Meinhardt, 1983b; Niswander et al., 1994b). Ein Resultat

der *dHAND*-Überexpression im distalen Autopod der *Ft/Ft* Knospe könnte somit eine reduzierte Kompetenz der mesodermalen Zellen sein, auf PZT-induzierende Signale entsprechend zu antworten und stattdessen weiterhin zu proliferieren. *Shh* ist ein stark proliferationsförderndes Signal in verschiedenen Geweben (Duprez et al., 1998; Pepicelli et al., 1998; Ahlgren und Bronner-Fraser, 1999; Wallace, 1999; Wechsler-Reya und Scott, 1999; Britto et al., 2000; Bhardwaj et al., 2001; Krüger et al., 2001; Treier et al., 2001). Das Zusammenspiel gesteigerter Proliferationsraten durch erhöhte *Shh*-Expression und reduziertem PZT durch die überlebensfördernde Wirkung der ektopischen *dHAND*-Expression könnte somit die Ursache des massiven Gewebeauswuchses im distalen *Ft/Ft* Autopod sein. Im posterioren Teil der Gliedmaßenknospe ist auch unter physiologischen Umständen die höchste Konzentration von *Shh*, so daß sich die erhöhte Expression in den Mutanten nicht zwangsläufig mit erhöhter Proliferation auf diesen Bereich auswirken muß. Dazu kommt, daß *Shh* in diesem Teil der Extremität sogar entgegengesetzt wirken kann, indem es PZT positiv beeinflusst (Sanz-Ezquerro und Tickle, 2000). Dies mag erklären, warum das posteriore Fingerelement nie von der ektopischen Gewebewucherung betroffen ist. Auffälligerweise kommt es im Bereich der Wucherung nicht zur Ausbildung geregelter Kondensationen. Die Alcian Blue-positiven Knorpel-elemente, die wahrscheinlich die Metacarpalen bzw. die Metatarsalen darstellen, enden an der Grenze des ektopischen Gewebes, so daß den rudimentären Zehenansätzen der *Ft/Ft* Extremitäten Phalangen gänzlich fehlen. In diesem Bereich sind also sowohl die Musterbildung als auch die Skelettdifferenzierung schwerwiegend beeinträchtigt. Dies zeigt auch die Tatsache, daß die in den Hintergliedmaßen vorhandenen ektopischen *Sox-9*-exprimierenden Aggregate in diesem Bereich nicht in reifen Knorpel differenzieren, was andeutet, daß ein später Schritt in dem mehrstufigen Prozeß der Knorpeldifferenzierung gestört ist. Daß dieser Differenzierungsdefekt spezifisch für den distalen Autopod und nicht von genereller Natur in *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen ist, zeigt die Tatsache, daß die proximalen Autopod-Elemente in Alcian Blue-positiven Knorpel differenzieren. Auch die initialen Prozesse der Kondensation mesodermaler Gliedmaßenknospenzellen scheint nicht beeinträchtigt zu sein, wie durch die nur unwesentlich veränderte Expression von *Sox-9* in frühen Stadien der Extremitätenentwicklung gezeigt werden konnte. Die distalen Verstümmelungen der Skelettelemente ähneln denen, die in *Wnt-5a*^{-/-}-Mäusen beobachtet worden sind (Yamaguchi et al., 1999). Die Autoren dieser Studie postulierten, daß dieser Phänotyp durch die reduzierte Proliferation der mesodermalen Vorläuferzellen hervorgerufen wurde. Ein Verlust der *Wnt-5a*-Transkription kann aber nicht die Ursache für die Deletionen distaler Fingerelemente in *Ft/Ft* Extremitäten sein, da *Wnt-5a* hier stark exprimiert ist. Im Vergleich zum Wildtyp ist die *Wnt-5a*-Transkription sogar gesteigert, was mit der postulierten gesteigerten Proliferation

in genau diesem Bereich vereinbar ist. Bemerkenswerterweise ist der posteriore Teil des *Ft/Ft* Autopods, der nicht von der Gewebewucherung betroffen ist, frei von *Wnt-5a*-Transkripten. Dies deutet an, daß *Wnt-5a* durch seine proliferationsfördernde Wirkung an der Entstehung dieser Wucherung und damit den distalen Verstümmelungen beteiligt sein kann. Diese Interpretation ist auch konsistent mit der Beobachtung, daß die Überexpression von *Wnt-5a* in der Gliedmaßenknospe des Huhns zur Reduktion von Knochenelementen führt (Kawakami et al., 1999; Hartmann und Tabin, 2000). Die genannten Befunde stärken die Interpretation, daß eine gesteigerte Proliferation der mesodermalen Zellen in frühen Stadien der Gliedmaßenentwicklung die Basis für die distalen Verstümmelungen in *Ft/Ft* Extremitäten legt.

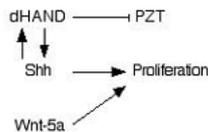
4.1.2 Erhöhte Apoptose durch *Bmp-4* und *Dkk-1*

Dieser mutmaßlichen Steigerung der Proliferation des distalen Mesoderms in der frühen Phase der *Ft/Ft* Gliedmaßenentwicklung wird dann später (ab ca. Tag E12,5-13,0) durch vermehrte Apoptose entgegengewirkt, wie die TUNEL-Analysen zeigen. Der weitaus größte Teil der mesodermalen Zellen innerhalb der Gewebewucherung zeigten zu diesem Zeitpunkt massiven PZT. Hierfür ist potentiell die genetische Interaktion zwischen *Irx-1* und *Bmp-4* und die dramatische Hochregulation von *Dkk-1* von entscheidender Bedeutung. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist offenbar die im Frosch beschriebene gegenseitige Repression der Genexpression zwischen *Bmp-4* und *Irx-1* (Gomez-Skarmeta et al., 2001) während der Entwicklung der Gliedmaßen der Maus konserviert. Übereinstimmend mit dieser Annahme ist die Hochregulation von *Bmp-4* im anterior/distalen Teil der Extremität zu beobachten, wo zwei der drei durch die *Ft*-Mutation deletierten *Irx*-Gene (*Irx-3* und *-5*) stark exprimiert sind (Houweling et al., 2001). Der Verlust der *Irx-3*- und *-5*-Expression wird also von einer ektopischen *Bmp-4*-Aktivierung gefolgt. Andersherum ist es als wahrscheinlich anzusehen, daß diese erhöhte *Bmp-4*-Transkription der Auslöser für die Verringerung der *Irx-1*-Expression im distalen Mesenchym der *Ft/+*-Gliedmaßenknospe ist. Daß dies wohl nicht auf direkte regulatorische Interaktionen zwischen den *Irx*-Mitgliedern der beiden Komplexe zurückzuführen ist, sondern über *Bmp-4* vermittelt wird, kann aus der transienten Verminderung der *Irx-1*-Expression besonders im anterioren Teil, wo der Überlapp zur ektopischen *Bmp-4*-Domäne besteht, geschlossen werden. Wäre die Verringerung der *Irx-1*-Expression eine direkte Konsequenz des *Irx-3*-, *-5*- und *-6*-Verlustes, sollte die Expression permanent erniedrigt sein. Die gesteigerte Aktivität von *Bmp-4* wiederum führt zur Induktion der *Dkk-1*-Expression und ist damit ein positives Signal für PZT (s. unten). Im Frosch ist darüberhinaus gezeigt worden, daß die Transkription von *Xiro1* von Wnt/ β -Catenin-Signalen abhängt (Gomez-Skarmeta et al., 2001). Wenn man postuliert, daß auch diese Interaktion

zwischen Frosch und Mausgliedmaßenknospe konserviert ist, müßte die gesteigerte Expression des für einen potenten Wnt-Antagonisten kodierenden *Dkk-1* wiederum negativ auf die *Irx-1*-Transkription wirken. Hiermit würde ein sich selbst erhaltender und sogar verstärkender PZT-induzierender Regelkreis etabliert werden, da die durch *Dkk-1* zusätzlich reduzierte *Irx-1*-Expression wiederum eine weitere Steigerung der *Bmp-4*-Aktivität nach sich ziehen würde, die in der Konsequenz die *Dkk-1*-Expression verstärkt (Abb. 4.1). Mit diesem Effekt steht möglicherweise auch der Verlust der *Fgf-8*-Transkripte in der distalen AER im Zusammenhang. Im Huhn konnte gezeigt werden, daß *Wnt-3a* die Induktion von *Fgf-8* in der AER durch das mesodermale *Fgf-10* vermittelt (Kawakami et al., 2001). D.h., die Überexpression von *Dkk-1*, das in *Xenopus* *Wnt-3a*-Funktion inhibieren kann (Kazanskaya et al., 2000), sollte zu einer Verringerung der *Fgf-8*-Transkription führen. Dies ist kürzlich durch die Überexpression von *cDkk-1* mit Hilfe eines adenoviralen Vektors in der Gliedmaßenknospe des Hühnerembryos nachgewiesen worden (Mukhopadhyay et al., 2001). Die Region der ektopischen *Dkk-1*-Expression im distalen Mesoderm der *Ft*-Gliedmaßenknospe entspricht interessanterweise sehr genau der, in der der *Fgf-8*-Verlust in der AER zu beobachten ist, was einen Hinweis darauf liefert, daß die gleichen regulatorischen Interaktionen zwischen *Dkk-1*, *Wnt/β-Catenin*-Signalen und *Fgfs* in Mausextremitäten realisiert sind. Verstärkend auf diesen Effekt wirkt außerdem die gesteigerte Expression von *Bmp-4*. Es gibt eine Reihe von Studien, die gezeigt haben, daß die *Bmp*- und *Fgf*-Signalwege während der Entwicklung der Vertebratenextremität antagonistisch zueinander wirken (Buckland et al., 1997; Macias et al., 1997; Zou et al., 1997; Zuniga et al., 1999). In Übereinstimmung hiermit ist sowohl in hetero- als auch in homozygoten *Ft*-Embryonen die ektopische *Bmp*-Aktivierung von einer Verringerung der *Fgf*-Aktivität begleitet (diese Arbeit und Heymer und Rütter, 1999). Zusätzlich zum oben beschriebenen Regelkreis, der PZT-fördernd im distalen *Ft/Ft* Autopod wirkt, wird außerdem die stark proliferationsfördernde Wirkung der *Fgfs* (Martin, 1998) reduziert, was dazu führt, daß die initiale Erhöhung der Proliferation in diesem Bereich ab ungefähr E12,5 von massiv gesteigerter Apoptose abgelöst wird. Die ektopische Gewebewucherung, sowie die hierdurch verursachte distale Verstümmelung der Kondensationen ist somit wahrscheinlich auf eine gestörte Balance zwischen einem früh wirkenden proliferationsfördernden und einem später dominierenden PZT-induzierenden Regelkreis zurückzuführen (Abb. 4.1). Hiermit läßt sich auch die Tatsache vereinbaren, daß die ektopische Expression von *dHAND* die erste molekulare Veränderung ist, die in *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen beobachtet werden konnte. Erst später kommt es zur ektopischen Aktivierung von *Bmp-4* und *Dkk-1* und der Reduktion der *Fgf-8*- und *Fgf-10*-Expression. In den Vordergliedmaßenknospen heterozygoter *Ft*-Embryonen kommt es nicht zu der initialen Steigerung der Proliferation, da hier *Shh* normal exprimiert ist

und auch für *dHAND* keine Veränderung des Expressionsmusters gefunden werden konnte (Heymer und Rütter, 1999 und Daten nicht gezeigt). Auch die später gesteigerte Apoptose ist nicht vergleichbar mit der in *Ft/Ft* Extremitäten, da sie in *Ft/+* Knospen nur transient und ab Tag E13,5 nicht mehr detektierbar ist. Hier dominiert zu diesem Zeitpunkt die massive *Sox-9*-Expression, die kausal mit der knöchernen Fusion in Zusammenhang zu bringen ist.

A : erhöhte Proliferation



B : erhöhter PZT

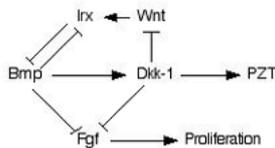


Abbildung 4.1 : Schematische Darstellung der in *Ft/Ft* deregulierten proliferations- bzw. PZT-fördernden Regelkreise. **A)** *dHAND*, das Zellen vor PZT schützt, ist ab Tag E10,5 ektopisch in *Ft/Ft* Vordergliedmaßenknospen exprimiert. Ab Tag E11,5 gilt dies auch für *Shh*, das ein stark proliferationsförderndes Signal ist. Beide Gene regulieren die Expression des jeweils anderen positiv. Der insgesamt proliferationsfördernde Regelkreis wird durch die massive *Wnt-5a*-Expression in *Ft/Ft* Extremitäten verstärkt. Dieser Regelkreis dominiert bis ca. Tag E12,0 den in **B** dargestellten Kreislauf. **B)** Sich selbst verstärkender Regelkreis, der zur Induktion von PZT in der *Ft/Ft* Gliedmaßenknospe führt. Durch den Verlust von *Irx-3*, *-5* und *-6* wird die *Bmp-4*-Expression dereprimiert, was wiederum zu einer Inhibition

der *Irx-1*-Expression führt. *Bmp-4* aktiviert *Dkk-1*, das Apoptose induziert. Durch die *Dkk-1*-vermittelte Blockade von *Wnt/β-Catenin*-Signalen wird die *Irx-1*-Expression weiter verringert, was diesen Kreislauf verstärkt. Außerdem reprimieren sowohl *Bmp-4* als auch *Dkk-1* die Expression von *Fgf-8* in der AER, worauf auch die Expression von *Fgf-10* im Mesoderm abnimmt. Die Inhibition dieser proliferationsfördernden Signale wirkt synergistisch mit der erhöhten PZT-Induktion.

4.2 D/V-Musterbildung in *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen

Einen ungewöhnlichen Phänotyp stellt die D/V-Duplikation der proximalen Autopod-Elemente dar, die in dieser Form in bisher keiner Mausmutante beschrieben worden ist. Dieses Merkmal tritt in 80% der Vordergliedmaßen auf und betrifft in einem Großteil dieser Extremitäten alle vorhandenen Autopod-Kondensationen. Seltener ist die Duplikation nur einzelner Zehenansätze zu beobachten. Diese Veränderungen deuten zunächst auf einen Defekt der D/V-Musterbildung, da auch in den Extremitäten von *En-1^{-/-}*-Mäusen ein ektopischer ventraler Zeh beobachtet worden ist (Loomis et al., 1996). Allerdings ist hier nie eine großflächigere Duplikation, wie sie in *Ft/Ft* Vordergliedmaßen auftritt, beschrieben worden. *En-1* reprimiert während der Entwicklung die Expression von *Lmx-1b* (Davis und Joyner, 1988; Davis et al., 1991; Gardner und Barald, 1992; Loomis et al., 1996; Logan et al., 1997). In den Vordergliedmaßenknospen der *Ft/Ft*-Embryonen ist *Lmx-1b* aber nur am anterioren Rand der Extremität ektopisch ventral exprimiert, so daß dies nicht die Ursache für die auch weiter posterior stattfindende D/V-Duplikation der Kondensationen sein kann. Diese veränderte Expression reflektiert eher eine anomale Struktur der AER zu diesem Zeitpunkt

(s. unten). Das grundsätzliche Muster entlang der D/V-Achse scheint also in *Ft/Ft* Extremitäten nicht schwerwiegend gestört zu sein. So treten z.B. auch keine ektopischen Sehnen dorsal der Kondensationen auf, wie es in *Wnt-7a^{-/-}*-Mäusen zu beobachten ist (Parr und McMahon, 1995). Allerdings ist auch die Differenzierung der ventralen Sehnen in *Ft/Ft* Vordergliedmaßen schwerwiegend betroffen, so daß die D/V-Polaritäten der duplizierten Kondensationen nicht zu bestimmen sind. Nur im anterioren Teil der Knospe konnte die Expression von *Sek-1*, das die differenzierenden Sehnen markiert, detektiert werden. D.h. auch, daß der Verlust der ventralen Sehnen kein Zeichen für eine mögliche Dorsalisierung des *Ft/Ft* Autopods ist, da nur im Bereich der ektopischen ventralen *Lmx-1b*-Expression *Sek-1*-Expression nachzuweisen war. Der Verlust der Sehnen der weiter posterioren Kondensationen hat also eine andere Ursache, deren Natur allerdings unklar ist, da die molekularen Mechanismen der Sehnendifferenzierung nicht bekannt sind. Die Ursache für die D/V-Duplikation der Metacarpalen könnte in der Aufspaltung der *Fgf-8*-Expressionsdomäne liegen, die damit eine schwerwiegende Störung der AER-Struktur impliziert. Die Störung der AER wird auch durch die veränderte *Lmx-1b*-Expression in diesem Bereich unterstützt, die andeutet, daß es hier nicht zur Aufrechterhaltung der Grenze zwischen dorsalen und ventralen Kompartimenten kommt. Dies bestätigt die Daten von Kimmel et al. (2000), die gezeigt haben, daß die Unversehrtheit der AER in der Maus für den Fortbestand der Territorialgrenzen zwischen dorsalem und ventralem Teil der Extremität notwendig ist. Für *Fgf-4* ist gezeigt worden, daß es während der Entwicklung der Mausextremität positiv auf die Verzweigung von Knorpel-elementen wirkt (Ngo-Muller und Muneoka, 2000). Die Aufspaltung der *Fgf-8*-Expression in eine dorsal und eine ventral versetzte Domäne könnte somit bei der bestehenden funktionellen Redundanz der *Fgf*-Familienmitglieder (s. 1.4.2 und 1.4.4) die D/V-Aufspaltung der Metacarpalen bewirken. Interessanterweise haben auch die starken ektopischen Expressionsdomänen von *Bmp-4* im distalen Mesoderm der *Ft/Ft* Vordergliedmaßenknospe unterschiedliche Abstände von der AER, was zu diesem Phänomen beitragen könnte. Darüberhinaus zeigt der Großteil der untersuchten Embryonen eine Verschiebung der normalerweise direkt an die AER grenzenden ventralen Expressionsdomäne von *Shh* nach proximal. Hierdurch entsteht eine Lücke nicht-*Shh*-exprimierender Zellen zwischen AER und ZPA, so daß auch der dorsale und ventrale Teil der *Shh*-Expressionsdomäne unterschiedliche Entfernungen von der AER haben. Da die Kombination von *Shh* und *Bmp* ein positives Signal für die Knochenbildung in der Extremitätenknospe ist (Yang et al., 1997; s. 1.4.4), liegt es nahe, zu postulieren, daß dieser Anteil der Embryonen genau jenen repräsentiert, der später die großflächige D/V-Duplikation der Kondensationen ausbildet. Diese genannten molekularen Veränderungen treten nicht in den Hintergliedmaßenknospen auf, die auch die D/V-Duplikation der Metatarsalen nicht zeigen.

Dies verstärkt die Annahme, daß diese molekularen Veränderungen kausal mit der Ausprägung dieses Merkmals im vorderen Extremitätenpaar zusammenhängen.

Auch die Differenzierung der Gelenke ist in *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen schwer beeinträchtigt, wie die veränderte Expression von *Gdf-5* belegt. Nur das Gelenk distal der Metacarpalen/Metatarsalen wird offensichtlich spezifiziert. Da distal hiervon die erwähnten Verstümmelungen der Kondensationen auftreten, fehlen zwangsläufig auch die interphalangealen Gelenke. Beachtenswert ist die starke ektopische Expression von *Gdf-5* zwischen den Kondensationen. Die durch *Gdf-5*-Expression vermittelte Gelenkidentität an diesen Stellen könnte verhindern, daß die verstümmelten Kondensationen fusionieren.

4.3 Besonderheiten der *Ft/Ft* Hinterextremitäten

Spezifisch für die hinteren Extremitäten ist der Verlust anteriorer Skelettelemente des Zeugo- und des Autopods. Hierbei kommt es immer zum Verlust der Tibia und des anterioren Zehs, gelegentlich fehlt darüberhinaus die zweite Kondensation. Die Tatsache, daß die *Pax-9*-Expression schon in frühen Stadien der Gliedmaßenentwicklung selektiv in den Hinterextremitäten fehlt, zeigt, daß diese Deletion anteriorer Mesoderms schon früh in der Entwicklung stattfindet. Alternativ könnte dies auch bedeuten, daß dieses anteriore Gewebe von Beginn der Gliedmaßenentwicklung an überhaupt nicht spezifiziert wird. Ein ähnlicher, für die hinteren Extremitäten spezifischer, Phänotyp wurde in der *Dh*-Mausmutante beschrieben. Auch hier fehlen die Tibia, sowie die ersten beiden Zehen vollständig (Lettice et al., 1999). Darüberhinaus fehlt die Expression von *Msx-1* und *Alx-4* im anterioren Mesoderm früher *Dh/Dh* Extremitäten, so daß die Autoren dieser Studie postulierten, daß *Dh* durch die Regulation der Breite des Gliedmaßenfeldes eine wichtige Funktion für die Induktion des hinteren Extremitätenpaares hat (Lettice et al., 1999). Dies mag aufgrund des vergleichbaren Phänotyps auch für *Ft* gelten. *Dh* und *Ft* sind aber nicht allelisch, da die *Dh*-Mutation auf Chromosom 1 in der Nähe des *En-1*-Lokus kartiert worden ist (Higgins et al., 1992). Das bedeutet auch, daß diese Mutation nicht den durch die *Ft*-Mutation nicht-deletierten *Irx*-Genkomplex betrifft, da dieser auf Chromosom 13 liegt (Peters et al., 2000). Die distalen Verstümmelungen der Kondensationen wurden in *Dh/Dh*-Embryonen allerdings nicht beobachtet. Alle phalangealen Elemente der Zehen waren hier ausgebildet (Lettice et al., 1999). Auch unterscheiden sich die molekularen Veränderungen die in *Ft/Ft* und *Dh/Dh* Hintergliedmaßenknospen gefunden worden sind. So war z.B. *Bmp-4*, das in *Ft/Ft* Extremitäten massiv überexprimiert ist, in *Dh/Dh* Gliedmaßen normal aktiviert. Durch die o.g. Ähnlichkeiten der Phänotypen besteht aber die Möglichkeit, daß *Ft* und *Dh* in einem gemeinsamen Signalweg operieren, der das Ausmaß der A/P-Achse des hinteren

Extremitätenpaares und damit die Anzahl der sich entwickelnden Kondensationen determiniert.

4.4 Der *Shh/Fgf*-Regelkreis in *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen

Da die Anzahl der Kondensationen in *Ft/Ft* Vordergliedmaßenknospen in der A/P-Achse fünf übersteigen kann, wurde die Expression von *Shh*, das maßgeblich die Anzahl und Identität der Skelettelemente des Autopods determiniert (s. 1.4.4), untersucht. Der beobachtete Phänotyp korreliert mit der distal expandierten Expressionsdomäne von *Shh*, die bis über zwei Drittel des Autopods nach anterior reichen kann. Vergleichbares gilt für *dHAND*, dessen Überexpression am anterioren Rand von Hühnerextremitäten zu Polydaktylie führt (Fernandez-Teran et al., 2000). Daß das *Shh*-Signal im entsprechenden Bereich des Mesoderms zu einer Aktivierung des *Shh*-Signalwegs führt, wird durch die entsprechend veränderte Expression von *Ptc-1* verdeutlicht. Mit diesen molekularen Veränderungen lassen sich zusätzliche Skelettelemente in der A/P-Achse erklären. Interessanterweise ist am anterioren Rand der Vordergliedmaßenknospen keine ektopische *Shh*-Expression nachzuweisen, trotzdem sind hier aber Gene, die positiv von *Shh* reguliert werden, wie z.B. *Fgf-4* und *-8*, *Gremlin*, *Tbx-2* und *dHAND* überexprimiert. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, daß eine so geringe Expression von *Shh* in diesem Bereich vorliegt, daß sie unterhalb des Detektionsniveaus der „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung liegt, aber ausreicht, die Transkription der genannten Gene zu induzieren. Alternativ könnte hier ein anderes Mitglied der *Hh*-Familie ektopisch aktiviert sein, wie es z.B. in der *Dbf*-Mutante der Fall ist. Hier ist *Ihh*, das normalerweise während der Musterbildungsphase nicht in der Extremität exprimiert ist, im anterioren Mesoderm stark ektopisch aktiviert, was zu der massiven Polydaktylie der Mäuse führt (Yang et al., 1998). Diese Möglichkeit kann für die *Ft/Ft* Extremitäten nicht ausgeschlossen werden, ist aber eher unwahrscheinlich, da die Exposition von Zellen zu einem beliebigen Hh-Liganden immer mit der massiven Hochregulation der *Ptc-1*-Expression im entsprechenden Bereich einhergeht (Perrimon, 1995; Goodrich et al., 1996), wie dies auch in der *Dbf*-Mutante der Fall ist (Yang et al., 1998). *Ptc-1* ist aber nur im Bereich der expandierten *Shh*-Expressionsdomäne in *Ft/Ft* Extremitäten fehlexprimiert, nicht jedoch am anterioren Rand.

Eine andere Möglichkeit, die ektopische anteriore Aktivierung der genannten Gene in *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen zu erklären, stellt die anterior expandierte und gesteigerte Expression von *Gremlin* dar. Wie unter 1.4.4 dargelegt, vermittelt *Gremlin* die Etablierung des *Shh/Fgf*-Regelkreises. Die durch die gesteigerte *Gremlin*-Expression reduzierte Bmp-Aktivität könnte also am anterioren Rand die ektopische Expression des normalerweise nur in den posterioren zwei Dritteln der AER aktiven *Fgf-4* erlauben. Das gleiche gilt für *Fgf-8*, dessen Expression

ebenfalls in diesem Bereich länger fortbesteht. Dies wiederum könnte die Aktivierung von *Tbx-2* und den 5'*HoxD*-Genen erlauben, ohne daß *Shh* ektopisch exprimiert ist. In der Tat ist für die Aktivierung dieser *HoxD*-Gene die Expression von *Shh* nicht notwendig, wie die Analyse der *limbless* Mutante des Huhns zeigt. Diese weist trotz nicht nachweisbarer *Shh*-Expression die posteriore Lokalisation von *HoxD-11*- und *HoxD-13*-Transkripten auf (Grieshammer et al., 1996; Noramly et al., 1996; Ros et al., 1996). Das gleiche könnte für das normalerweise in seiner Expression auf das posteriore Mesoderm beschränkte *Tbx-2* (Gibson-Brown et al., 1998) gelten. Auch die ektopische Aktivierung von *Fgf-4* in der anterioren AER, sowie die anteriore Expansion der *HoxD-12*- und *HoxD-13*-Expressionsdomänen ohne veränderte *Shh*-Expression in transgenen Mäusen, die konstitutiv das *BmpR-Ib*-Gen überexprimieren, wurde durch die anteriore ektopische Aktivität von *Gremlin* erklärt (Zhang et al., 2000). Der genannte Mechanismus könnte somit die initialen, *Shh*-unabhängigen Ereignisse der ZPA-Etablierung und A/P-Asymmetrie (s. 1.4.4 und 1.4.5) rekapitulieren. Dann kommt es allerdings in den Vordergliedmaßenknospen von *Ft/Ft*-Embryonen nicht zur Induktion der *Shh*-Expression im Mesoderm, die nötig für die Aufrechterhaltung dieses Regelkreises ist. Dies würde erklären, warum es trotz aktiver *Shh*-Zielgene im anterioren Mesoderm nicht zur Ausbildung einer präaxialen Polydaktylie kommt. Zusätzlich kann dies durch die offensichtlich bestehende Verkürzung der AER bedingt sein, da die Anzahl der Zehenanlagen mit der Länge der AER korreliert (Milaire und Goffard, 1995; Tanaka et al., 2000).

Der Grund für die nicht erfolgende Induktion der *Shh*-Expression im anterioren Mesoderm der *Ft/Ft* Vordergliedmaßenknospe könnte in einer Störung der Kommunikation zwischen dem Ektoderm und dem Mesoderm liegen, so daß die Zellen des Mesoderms nicht auf die erhöhte Expression von *Fgf-4* und *-8* reagieren können. Die epithelial-mesenchymalen Interaktionen scheinen aber grundsätzlich in *Ft/Ft* Gliedmaßenknospen nicht gestört zu sein, da die Reaktionen auf alle anderen molekularen Veränderungen normal sind. So ist z.B. das Absinken der *Fgf-8*-Expression in der distalen AER von der Runterregulation des *Fgf-8*-Zielgens *Fgf-10* im Mesoderm begleitet und die anteriore Hochregulation von *Gremlin* korreliert mit der ektopischen Aktivierung von *Fgfs* in der AER. Es ist also als wahrscheinlich anzusehen, daß die Gene, die das Programm zur Repression der *Shh*-Expression im anterioren Mesoderm konstituieren, in *Ft/Ft* Vorderextremitäten die Aktivierung von *Shh* verhindern. Dies ist konsistent mit der unveränderten Expression von *Pax-9* im anterioren Mesoderm der *Ft/Ft* Vordergliedmaßenknospe, dessen Verlust in *Pax-9^{-/-}*-Tieren zu präaxialer Polydaktylie führt (Peters et al., 1998). Auch die Expression des in *Xt^l*-Mäusen mutierten *Gli3*, das anterior die *Shh*-Aktivierung verhindert (Büscher et al., 1997), ist normal in *Ft/Ft* Extremitäten (Daten nicht gezeigt). Diese Annahme mag auch die ektopische Aktivierung von *Shh* am anterioren

Rand der Hintergliedmaßenknospe erklären, wo *Pax-9*-Transkription fehlt und hierdurch minimale ektopische Shh-Aktivität zugelassen werden könnte. Diese Shh-Konzentration ist aber offensichtlich nicht ausreichend, hier auch ektopische Zehenanlagen zu induzieren. Dazu kommt, daß die ektopische Gewebewucherung, wie oben dargelegt, in diesem Bereich ohnehin jegliche Skelettdifferenzierung verhindert.

4.5 Expressionsmuster von *Dkk-1*

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, spielt das für einen Wnt-Antagonisten kodierende *Dkk-1* offensichtlich eine wichtige Rolle in der Bmp-vermittelten Induktion des PZT während der Entwicklung der Vertebratenextremität (s. unten) und leistet hierdurch einen entscheidenden Beitrag zur Entstehung des Gliedmaßenphänotyps homozygoter *Ft*-Embryonen. Zunächst wurde eine detaillierte Expressionsstudie von *Dkk-1* durchgeführt, die ein sehr dynamisches Muster der *Dkk-1*-Transkription während der Gliedmaßenentwicklung der Maus und des Huhns zeigte. Dieses Muster war in beiden Spezies sehr ähnlich, was auch durch die unabhängigen Studien von Monaghan et al. (1999) und Mukhopadhyay et al. (2001) bestätigt wurde. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß die Bereiche der *Dkk-1*-Transkription mit denen des PZT kolokalisieren. Auch dies gilt sowohl für die Gliedmaßenentwicklung der Maus als auch des Huhns, wo in den frühen Stadien der Entwicklung *Dkk-1*-Transkripte auf die ANZ, die PNZ und die AER begrenzt sind. Später ist das Gen stark im interdigitalen Mesenchym, wo zu diesem Zeitpunkt massiv Apoptose stattfindet, zusammen mit den pro-apoptotischen Genen *Msx-2* und *p53* exprimiert. Darüberhinaus ist *Dkk-1* während der gesamten Entwicklung der Extremitäten mit Mitgliedern der *Bmp*-Familie koexprimiert. In der Maus ist dies für *Bmp-4* besonders auffällig. Im Huhn ist *Bmp-4* stark im anterioren Mesoderm der Knospe, aber nicht im posterioren Teil exprimiert, so daß hier die Expressionsmuster von *Bmp-4* und *Dkk-1* in frühen Stadien divergieren. Funktionell redundante *Bmp*-Gene, wie *Bmp-2* und *-7* sind hier allerdings in einem der *Dkk-1*-mRNA-Verteilung deckungsgleichen Muster exprimiert (s. Abb. 8 in Montero et al., 2001), wie auch kürzlich von Mukhopadhyay et al. (2001) gezeigt worden ist. Diese Kolokalisation von *Dkk-1*- und *Bmp*-Transkripten gilt auch für die fehlgesteuerte Entwicklung der Gliedmaßen in unterschiedlichen Mausmutanten. Während der Entwicklung der *Ft*-Gliedmaßenknospen kommt es sowohl in den hetero- als auch den homozygoten Embryonen zu einer massiven Erhöhung der Bmp-Aktivität in bestimmten Bereichen der Extremität. Hier ist auch immer eine ektopische Aktivierung der *Dkk-1*-Transkription zu detektieren. Dabei ist auffällig, daß diese Orte jenen mit gesteigertem PZT entsprechen. In den Extremitäten der *Ft/+*-Embryonen korreliert die Dynamik der *Dkk-1*-Expression exakt mit dem Wechsel zwischen erhöhter Apoptose und gesteigerter

Knochenbildung. Auch die polydaktylen *Xt^l/Xt^l*-Embryonen zeigen eine anteriore Hochregulation der *Dkk-1*-Expression. In dieser Region ist die *Bmp-4*-Transkription durch die ektopische *Shh*-Expression hochreguliert (Büscher et al., 1997). Auch während der gestörten Gliedmaßenentwicklung in dieser Mutante sind die Orte ektopischer *Dkk-1*-Expression mit erhöhter Apoptose assoziiert. Dies läßt sich auf zweierlei Weise mit dem polydaktylen Phänotyp vereinbaren. Zum einen könnte es sein, daß die *Dkk-1*-Expression in diesem Bereich, kurz bevor es zur Differenzierung von Knorpelstrukturen kommt, verloren geht und die initial gesteigerte Apoptose einer vermehrten Knochenbildung weicht. Dies wäre ähnlich zu der Situation in den Vordergliedmaßenknospen der *Ft/+*-Mäuse, in denen der im Wildtyp zu beobachtende Ausschluß der *Dkk-1*-Transkription von Regionen der Knochendifferenzierung aufrechterhalten bleibt. Alternativ könnte der erhöhte PZT in *Xt^l/Xt^l* Extremitäten fortbestehen, was sich auf die Länge, nicht aber die Anzahl ektopischer Finger auswirken könnte. In der Tat sind die ektopischen anterioren Fingeranlagen in *Xt^l/Xt^l*-Embryonen wesentlich kürzer als die der polydaktylen *Hx/+*-Embryonen (Daten nicht gezeigt), die keine gesteigerte, eher sogar eine reduzierte Apoptose im anterioren Mesoderm zeigen.

4.6 Regulation von *Dkk-1* durch Komponenten des A/P-Musterbildungssystems

In der frühen Gliedmaßenknospe des Huhns überlappt die *Shh*-Expression in der ZPA zunächst mit dem distalen Teil der PNZ, bevor diese beiden Regionen voneinander separierbar sind (Sanz-Ezquerro und Tickle, 2000). Diese Dynamik ist auffällig ähnlich für den Vergleich der *Shh*- und *Dkk-1*-Expressionsdomänen. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, überlappen diese Domänen in den Hinterextremitäten von E10,5 Mausembryonen, während sie zu diesem Zeitpunkt in den Vordergliedmaßenknospen getrennt sind. Für *Shh* ist in der oben zitierten Studie gezeigt worden, daß es PZT in den unterschiedlichen Regionen der Gliedmaßenknospe differentiell reguliert. Während es die Apoptose in der PNZ positiv beeinflusst, führt ektopische Shh-Aktivität in allen anderen Bereichen der Knospe zu reduziertem Zelltod. Auch die Implantation von Shh-getränkten Mikrokugeln in das anteriore Mesoderm früher Hühnergliedmaßenknospen führte in der vorliegenden Arbeit zu einer massiven Vergrößerung der so behandelten Extremitäten, was mit reduziertem PZT erklärbar ist. Die *Dkk-1*-Expression war allerdings unter diesen Bedingungen unverändert. Shh ist also zum einen nicht ausreichend, *Dkk-1*-Transkription zu aktivieren. Zum anderen zeigt dies, daß der Mechanismus, durch den Shh PZT in der ANZ moduliert, unabhängig von *Dkk-1* ist, da andernfalls eine veränderte *Dkk-1*-Expression in der ANZ zu beobachten sein sollte. *Shh* ist auch nicht notwendig für die Induktion der *Dkk-1*-Expression, wie durch die Analyse der *Shh^{-/-}*-Embryonen gezeigt werden konnte. Für die

Aufrechterhaltung der *Dkk-1*-Transkription hingegen wird es benötigt, vermutlich durch seinen positiven Effekt auf die *Bmp-4*-Aktivität, die den Fortbestand der *Dkk-1*-Transkription sicherstellt. Somit ist auch die ektopische Aktivierung von *Dkk-1* im distalen Mesoderm der *Ft/Ft* Vordergliedmaßenknospe nicht durch die expandierte *Shh*-Expression verursacht. Für die Aufrechterhaltung der massiven ektopischen *Dkk-1*-Transkription kann sie allerdings von Bedeutung sein. Auch die Hochregulation der *Dkk-1*-Expression in *Xt^l/Xt^l* Extremitäten ist unabhängig von *Shh*, da sie schon vor dessen ektopischer Aktivierung beobachtet werden kann. Dies impliziert, daß *Dkk-1* ein Zielgen des in *Xt^l*-Mäusen mutierten *Gli3* ist. *Gli3* würde also während der normalen Entwicklung inhibitorisch auf die *Dkk-1*-Expression wirken.

4.7 *Dkk-1* induziert PZT

Ein weiteres auffälliges Merkmal der Expression von *Dkk-1* ist, daß dessen Aktivierung immer der erhöhten Apoptose vorausgeht. Dies gilt wiederum für die normale als auch die deregulierte Entwicklung der Extremitäten in den genannten Mausmutanten. Auch bei der Apoptose-Induktion durch die Implantation von rhBMP-4-Kugeln in das Mesoderm von Hühnergliedmaßenknospen geht eine massiv gesteigerte *Dkk-1*-Expression dem PZT voraus. Diese Befunde stimmen mit der Beobachtung überein, daß *Dkk-1* ausreicht, um PZT in der Vertebratenextremität zu induzieren. Dies konnte sowohl durch die Implantation von RCASBP(A)/*Xdkk-1*-infizierten CEF in die Flügelknospe als auch durch die Elektroporation eines *Dkk-1*-Expressionsplasmids in Extremitätenexplantate gezeigt werden. Auch die Implantation von in *Xdkk-1*-konditioniertem Medium getränkten Mikrokugeln in das interdigitale Mesenchym von embryonalen Entenbeinknospen deutet auf solch eine Funktion hin. In diesem Experiment hatte das Kontrollmedium, das von RCASBP(A)/*AP*-infizierten CEF konditioniert wurde, einen negativen Einfluß auf PZT, d.h. das Ausmaß der Apoptose war in der Umgebung der Kontrollkugeln reduziert. War auch *Xdkk-1* im Zellkulturüberstand vorhanden, wurde dieser Effekt aufgehoben oder leicht ins Gegenteil, einer erhöhten Apoptose, umgekehrt. Dies bedeutet, daß *Dkk-1* die PZT-hemmende Aktivität im Kontrollmedium neutralisiert oder ihr entgegenwirkt, indem es direkt Apoptose induziert. Eine wichtige Rolle von *Dkk-1* für den physiologischen Zelltod während der Gliedmaßenentwicklung läßt sich auch aus dem Phänotyp der *Dkk-1^{-/-}*-Mäuse ableiten. In den Extremitäten dieser Mäuse kommt es zu einer prä- und/oder postaxialen Polydaktylie und zusätzlich zu Syndaktylie (Mukhopadhyay et al., 2001). Nicht nur die Gewebesyndaktylie, die ein deutliches Zeichen für reduzierte Apoptose ist, sondern auch das variable Auftreten ektopischer anteriorer oder posteriorer Fingeranlagen läßt sich hierdurch erklären. Da die zusätzlichen Knochenelemente scheinbar zufällig prä- und/oder postaxial auftreten, spricht dies gegen einen Musterbildungsdefekt und eher dafür, daß durch die reduzierte Apoptose in

der ANZ und PNZ die Eliminierung mesodermaler Zellen ausbleibt, die somit in Knochen differenzieren. Dies ist auch die Ursache für die entsprechenden Veränderungen des Skeletts von *Bmp-4*- und *Bmp-7*-mutanten Mäusen (Lou et al., 1995; Hofmann et al., 1996; Dunn et al., 1997; Katagiri et al., 1998). Die distalen Verkürzungen von Hühnerextremitäten nach Überexpression von *Dkk-1* mit Hilfe eines adenoviralen Vektors (Mukhopadhyay et al., 2001) könnten auf gesteigerte Apoptose zurückzuführen sein, obwohl hier alternative Erklärungen möglich wären, da dies nicht analysiert worden ist. Dieser Phänotyp zeigt aber die Ähnlichkeit zur Situation im distalen Mesoderm von *Ft/Ft* Extremitäten, wo *Dkk-1* massiv überexprimiert ist, was mit gesteigertem PZT und distalen Verstümmelungen des Autopod-Skeletts einhergeht. *Dkk-1* ist allerdings unter anderen experimentellen Bedingungen nicht ausreichend, Apoptose zu induzieren. So hatte die transiente Transfektion von NIH/3T3-Zellen mit einem *Dkk-1*-Expressionsplasmid keinen Effekt auf das Wachstum der Zellen oder das Ausmaß der Apoptose in diesen Kulturen. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Wang et al. (2000) überein. Die Autoren dieser Studie beobachteten keinen Unterschied der Wachstumsraten, der Apoptose und der Anzahl im Zellzyklus arretierter Zellen in verschiedenen Zelllinien nach Überexpression von *Dkk-1*, solange die entsprechenden Zellen nicht durch *Wnt* transformiert waren. Auch die Infektion von CEF mit RCASBP(A)/*Xdkk-1* hatte keine Steigerung der Apoptose in den CEF-Kulturen zur Folge. Die zum Test eines potentiellen Effekts von *Dkk-1* auf die Knorpeldifferenzierung etablierten Hochdichtekulturen mesodermaler Gliedmaßenknospenzellen, mit denen auch eine PZT-fördernde Wirkung grundsätzlich nachweisbar wäre, zeigten keinen Effekt des *Xdkk-1*-Proteins auf die Knorpeldifferenzierung *in vitro*. Da das verwendete konditionierte Medium zehnfach geringer konzentriert war, als das für die Implantation der Mikrokugeln in Entenbeine genutzte, könnte eine zu geringe Konzentration des *Xdkk-1*-Proteins die Ursache dafür sein, daß in diesem System kein Effekt detektiert werden konnte. Insgesamt ließ sich die PZT-fördernde Wirkung, die *Dkk-1* in mehreren *in vivo* Experimenten hatte, nicht *in vitro* rekapitulieren, was andeutet, daß die *Dkk-1*-Funktion vom physiologischen Kontext abhängt. In der Zellkultur fehlen also möglicherweise Faktoren, die für eine effiziente Apoptose-Induktion durch *Dkk-1*, wie sie in der sich entwickelnden Vertebratenextremität gezeigt werden konnte, nötig sind. In diesem Zusammenhang ist für zukünftige Analysen die Frage interessant, ob *Dkk-1* als sezerniertes Protein zell-autonom oder nicht-zell-autonom Apoptose induziert. Diese Frage ist *in vivo* im Huhn- oder Mausembryo schwer zu adressieren, weshalb ein *in vitro* System hierfür von Vorteil wäre. Wie oben dargelegt, verliert *Dkk-1* allerdings unter allen getesteten *in vitro* Bedingungen diese Fähigkeit. Diese limitierte Fähigkeit von *Dkk-1* zur Apoptose-Induktion mag auch die Komplexität des molekularen Netzwerks, das den PZT reguliert (Übersichten bei Hengartner, 2000; Rich et al., 2000; Yuan und Yankner, 2000), reflektieren. Es erscheint

unwahrscheinlich, daß die Überexpression nur einer Komponente dieses Netzwerks zwangsläufig den vollen Umfang des PZT rekapitulieren kann. Eine alternative Erklärung für diese limitierte Fähigkeit der Apoptose-Induktion wäre, daß *Dkk-1* kein instruktives Signal ist, dessen Aktivität Zellen zum PZT determiniert, sondern eher ein permissives Signal, das den Zellen, an die es bindet, die Kompetenz verschafft, auf ein instruktives PZT-Signal, wie z.B. *Bmp* zu reagieren. Für Wnt-Proteine, deren Aktivität *Dkk-1* hemmt, wird eine solche Rolle als permissive Signale diskutiert (Christian und Moon, 1993; Holland und Graham, 1995; Glinka et al., 1996; Arias et al., 1999; Arias, 2000). In einem solchen Szenario wäre also die nicht ausreichende Verfügbarkeit eines instruktiven PZT-fördernden Signals die Ursache für das Unvermögen von *Dkk-1*, in Zellkultur Apoptose zu induzieren.

4.8 Bmp/Wnt/Fgf-Interaktionen – die Rolle von *Dkk-1*

Die auffällige Koexpression von *Dkk-1* mit *Bmp*-Familienmitgliedern, die ansonsten während der Entwicklung der Vertebratenextremität nur für die *Bmp*-Zielgene *Msx-1* und *-2* (Hill et al., 1989; Coelho et al., 1991; Davidson und Hill, 1991) und *Bambi* (Grotewold et al., 2001) gezeigt worden ist, implizierte eine potentielle Regulation von *Dkk-1* durch *Bmp*. In der Tat führte die Applikation von rhBMP-4 in das undifferenzierte Mesenchym von HH20-23 Flügelknospen zu einer raschen Induktion der *Dkk-1*-Transkription. Daß dieser Effekt nicht spezifisch für rhBMP-4 ist, zeigt die Tatsache, daß auch die Applikation von BMP-2 zu erhöhter *Dkk-1*-Expression führt (Mukhopadhyay et al., 2001). Somit stellt dies eher eine generelle Fähigkeit funktionell redundanter *Bmps* dar. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, führte die massive Überexpression von *Dkk-1* zu einer Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, was die drastische Reduktion der *Lef-1*-Expression belegt. 20 Stunden nach Implantation der rhBMP-4-Kugel war in der entsprechenden Region die massive Induktion von Apoptose zu beobachten (s. auch Macias et al., 1997; Zou et al., 1997; Pizette und Niswander, 1999), was zum kompletten Verlust des Radius führte. Diese Beziehung zwischen hoher *Bmp*-Aktivität und hierauf folgender Induktion der *Dkk-1*-Expression und Apoptose ist nicht spezifisch für die ANZ, sondern auch in anderen Bereichen der Extremität gegeben, wie die ektopische Aktivierung von *Bmp-4* und *Dkk-1* im distalen Mesoderm in den Gliedmaßenknospen hetero- und homozygoter *Ft*-Embryonen zeigt. Weiterhin impliziert die ektopische *Dkk-1*-Expression in den Regionen ektopischen Zelltods in verschiedenen Mausmutanten (s. oben) eine wichtige endogene Funktion von *Dkk-1* in der Modulation von PZT-induzierenden *Bmp*-Signalen.

Dkk-1-Transkription wird darüberhinaus positiv durch *Fgf* reguliert. Auch diese Wirkung ist ortsunabhängig, wie durch die am anterioren und posterioren Rand der Extremitäten durchgeführten Kugelimplantationen gezeigt werden konnte. Im Gegensatz zu *Bmp* und in

Übereinstimmung mit früheren Studien (Riley et al., 1993; Akita et al., 1996; Nikbakht und McLachlan, 1999; Montero et al., 2001) führte die Applikation von Fgf-8 ins anteriore Mesoderm von HH20-23 Flügelknospen nicht zur Induktion von Apoptose bis zu 20 Stunden nach der Manipulation, sondern im Gegenteil zu einem signifikanten mesodermalen Auswuchs in der entsprechenden Region. Obwohl *Dkk-1* ausreicht, in der Gliedmaßenknospe Apoptose zu induzieren (s. oben), wurde durch die Fgf-induzierte *cDkk-1*-Aktivitätssteigerung das Ausmaß des PZT nicht positiv beeinflusst. Auch die *cLef-1*-Transkription war nicht reduziert, sondern im Gegenteil sogar deutlich hochreguliert nach dieser Behandlung, was sich durch den Befund erklären läßt, daß Fgf-10 während der Gliedmaßenentwicklung des Huhns oberhalb von Wnt/ β -Catenin-Signalen wirkt, deren Aktivität es positiv beeinflusst (Kawakami et al., 2001). In den ES-Zell/NIH3T3-Kokultivierungsexperimenten konnte gezeigt werden, daß *Dkk-1* auch von *Wnt-1*, *-3a* und *-4* induziert wird. Während *Wnt-1* und *-3a* den β -Catenin-Weg aktivieren, ist dies für *Wnt-4* unter den gleichen experimentellen Bedingungen nicht der Fall (Shimizu et al., 1997). In der Gliedmaßenknospe des Huhns wurden hingegen Hinweise für eine Stabilisierung von β -Catenin durch *Wnt-4* präsentiert (Hartmann und Tabin, 2000). D.h., auch *Dkk-1* wird vergleichbar mit Antagonisten anderer Signalwege während der Gliedmaßenentwicklung von den Signalen transkriptionell induziert, deren Aktivität es inhibieren kann. Da Fgf-10 insbesondere *Wnt-3a*-Expression in der Gliedmaßenknospe des Huhns induziert, besteht die Möglichkeit, daß die Aktivierung von *Dkk-1* durch Fgf durch Wnt, im speziellen *Wnt-3a*, vermittelt wird. Dies, wie auch die zu den *Dkk-1*-Expressionsdomänen benachbarte Aktivität von *Wnt-3a*, macht *Wnt-3a* zu einem guten Kandidatenprotein, dessen Aktivität *Dkk-1* während der Extremitätenentwicklung des Huhns inhibiert. In der Gliedmaßenknospe der Maus ist *Wnt-3a* nicht exprimiert (Takada et al., 1994), sein funktionelles Homolog, das hier vermutlich auch den (oder einen) Gegenspieler zu *Dkk-1* darstellt, ist bis heute nicht identifiziert. Sowohl Fgfs, als auch Wnts, die den β -Catenin-Weg aktivieren, sind starke proliferationsfördernde Signale (Übersichten bei Martin, 1998; Dierick und Bejsovec, 1999; Morin, 1999; Smalley und Dale, 1999; Barker et al., 2000; Boilly et al., 2000; Itoh, 2001). Die synergistische Wirkung dieser Signalwege dominiert also in dem genannten Szenario die Aktivität von *Dkk-1*, so daß es zur einer Netto-Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Wegs und nicht zu gesteigerter Apoptose kommt. Der genaue Vergleich der apoptotischen Region mit dem Bereich der Hochregulation der *Dkk-1*-Expression nach Fgf-8-Applikation zeigte auch klar, daß diese Regionen nicht überlappen. Demnach handelt es sich bei der apoptotischen Region in diesen Gliedmaßenknospen um die durch den Fgf-induzierten mesodermalen Auswuchs nach distal verschobene endogene ANZ. Entgegen aller bisher publizierten Daten, die zeigten, daß Fgfs proliferationsfördernde und anti-apoptotische Signale für mesodermale Zellen sind, wurde kürzlich zum ersten Mal eine

positive Wirkung von Fgfs auf den PZT in der Gliedmaßenknospe postuliert (Montero et al., 2001). In dieser Studie wurde gezeigt, daß Mikrokugeln, die in Fgf getränkt und in einer vergleichbaren Art und Weise wie in der vorliegenden Arbeit in die Gliedmaßenknospen von Hühnerembryonen implantiert wurden, in den ersten 12 Stunden nach der Manipulation, konsistent mit den hier gezeigten Daten, physiologischen Zelltod inhibierten. Nach 24 Stunden und später wurde dieser Effekt allerdings gefolgt von einem Anstieg des PZT. Darüberhinaus wurden Hinweise präsentiert, daß Bmps in der Abwesenheit von Fgf-Signalen nicht in der Lage sind, Apoptose zu induzieren. Es wurde vorgeschlagen, daß der physiologische Beitrag der Fgfs zur Apoptose-Induktion in ihrer Notwendigkeit für die Expression von Genen aus der PZT-Kaskade, wie z.B. des Bmp-Zielgens *Msx-2*, liegt (Montero et al., 2001). D.h., für den PZT würde die parallele Aktivität der Bmp- und Fgf-Signalwege benötigt. Dieser Regulationsmechanismus könnte auch für *Dkk-1* gelten. Die Tatsache, daß die *Dkk-1*-Expression im Mesoderm sehr schnell nach der Entfernung der AER verlorenght, impliziert eine Notwendigkeit von Fgf-Signalen für die *Dkk-1*-Aktivierung. Diese Hypothese wird dadurch untermauert, daß sich die Bmp-induzierte ektoische Expressionsdomäne von *Dkk-1* immer zwischen der Bmp-Kugel und der AER befindet. *Dkk-1* ist aber niemals auf der der AER gegenüberliegenden Seite der Kugel induziert. Dies suggeriert, daß neben dem Bmp-Signal auch eine hohe Fgf-Konzentration für die *Dkk-1*-Expression notwendig ist. Die größere Distanz von einer Fgf-Quelle würde also erklären, warum eine rhBMP-4-Kugel, die in das zentrale Mesoderm einer Flügelknospe von HH26/27 Hühnerembryonen implantiert wurde, nicht zur ektoischen Transkription von *Dkk-1* führte. Dies wiederum führt zu der Hypothese, daß die Inhibition von Wnt/ β -Catenin-Signalen (durch *Dkk-1*) und die parallele Aktivität von Fgfs notwendig für die Bmp-induzierte Apoptose sind (Abb. 4.2). Im Umkehrschluß müßte die parallele Aktivität von Bmp und Wnt/ β -Catenin-Signalen zu einer komplett anderen Reaktion einer Zelle auf ein Bmp-Signal führen. Tatsächlich ist die Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ein positives Signal für die Chondrogenese, wie durch die Überexpression von *Wnt-4* und β -Catenin in der Hühnergliedmaßenknospe gezeigt werden konnte (Hartmann und Tabin, 2000). Desweiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß das für einen sehr potenten Wnt/ β -Catenin-Antagonisten kodierende *Dkk-1* nicht von einem Bmp-Signal, das zu vermehrter Knochenbildung führt, transkriptionell induziert wird. Unter diesen Umständen ist auch der Wnt/ β -Catenin-Signalweg offenbar unverändert aktiv, wie durch die nicht geänderte *Lef-1*-Expression nachgewiesen werden konnte. Alles in allem verdeutlicht dies, daß die koordinierte Regulation der Bmp-, Fgf- und Wnt/ β -Catenin-Signalwege entscheidend für das genetische Programm ist, das in einer mesodermalen Zelle der Gliedmaßenknospe aktiviert wird und entweder zu Apoptose oder zur Knochendifferenzierung führt (Abb. 4.2).

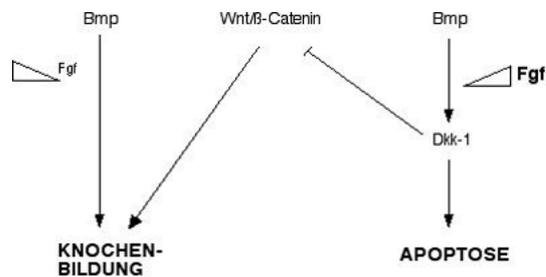


Abbildung 4.2 : Modell zur Erklärung der dualen Bmp-Funktion in mesodermalen Zellen der Gliedmaßenknospe. Ein Bmp-Signal, das die Expression von *Dkk-1* induziert und damit zur Inhibition von Wnt/β-Catenin-Signalen führt, löst in den mesodermalen Zellen der Gliedmaßenknospe Apoptose aus. Hierzu ist auch eine hohe Konzentration an Fgf-Proteinen notwendig. Hingegen führt die parallele Aktivität der Bmp- und Wnt/β-Catenin-Signalwege bei gleichzeitig geringer Fgf-Aktivität zur Knocheninduktion in den mesodermalen Zellen.

Hingegen führt die parallele Aktivität der Bmp- und Wnt/β-Catenin-Signalwege bei gleichzeitig geringer Fgf-Aktivität zur Knocheninduktion in den mesodermalen Zellen.

4.9 Vermittlung des Bmp-Signals – die entscheidende Rolle von c-Jun

Wie bereits dargelegt, kann ein Bmp-Signal über mindestens zwei unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden, den Bmp/Smad- oder den Bmp/Jnk-Signalweg, vermittelt werden, um ein spezifisches genetisches Programm zu aktivieren. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten stellen eine erste Evidenz für eine fundamentale Rolle der c-Jun-vermittelten Aktivierung eines Wnt/β-Catenin-Inhibitors für die Bmp-induzierte Apoptose dar. Die Tatsache, daß sowohl die physiologische Expression als auch die Induktion der *Dkk-1*-Transkription durch rhBMP-4 in *c-Jun*^{-/-}-MEF drastisch reduziert ist, belegt die Notwendigkeit dieses Gens für den vollen Umfang der *Dkk-1*-Expression. Darüberhinaus betont die Beobachtung, daß die Induktion von *Dkk-1* durch rhBMP-4 in *c-Jun*^{-/-}-Zellen auf 22% des Wildtyp-Niveaus reduziert ist die außerordentlich wichtige Rolle von *c-Jun* für diesen Prozeß. Die verbleibende Aktivierung könnte durch Mitglieder der Smad-Familie oder andere, ebenfalls von Jnk-1 phosphorylierte, Ap-1-Mitglieder vermittelt werden. Die komplette Abwesenheit von *Dkk-1*-Transkripten in *Jnk-1*^{-/-}-MEF impliziert, daß Smads für die Aktivierung von *Dkk-1* keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen. Der Hauptteil der *Dkk-1*-Induktion wird offensichtlich über den Bmp/Jnk-Signalweg vermittelt, was bisher von keinem anderen Gen gezeigt worden ist (Massagué et al., 2000). Hieraus könnte man eine weitere Hypothese ableiten, die die differentielle Aktivität von Bmp-4 in den mesodermalen Zellen der Gliedmaßenknospe (Apoptose- versus Knocheninduktion) durch Einbeziehung der intrazellulären Signalwege erklärt. Demnach würde eine Zelle mit PZT auf ein Bmp-Signal reagieren, wenn die Aktivität des Bmp/Jnk-, die des Bmp/Smad-Signalwegs dominiert, wie im Falle der Aktivierung von *Dkk-1* (Abb. 4.3). Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß die Expression von *Bmp-4*, *Dkk-1* und *c-Jun* nicht nur in den späten Phasen der Gliedmaßenentwicklung, sondern auch in anderen embryonalen Strukturen, in denen Apoptose eine entscheidende Rolle für die Morphogenese spielt, wie z.B. der Ohrenanlage

und den Kiemenbögen, überlappen (Wilkinson et al., 1989; Sanz et al., 1999 und Daten nicht gezeigt). Dies impliziert, daß die postulierte Kaskade Bmp-induzierter Apoptose (Abb. 4.3) nicht auf die Gliedmaßenknospe beschränkt ist, sondern von genereller Bedeutung während der Embryonalentwicklung sein könnte. Andersherum würde für die knocheninduzierende Wirkung eine über die Bmp/Jnk- dominierende Bmp/Smad-Kaskade postuliert werden (Abb. 4.3). Die Verbindung zwischen dem Bmp-Rezeptor und Jnk könnte durch die zyttoplasmatische Kinase TAK-1 gewährleistet werden, da für TAK-1 gezeigt worden ist, daß es essentiell für die Bmp-2-induzierte Apoptose ist und auch Bmp-4 diese Kinase direkt aktivieren kann (Yamaguchi et al., 1995; Kimura et al., 2000). Es gibt eine Reihe von Analysen, die eine Rolle von TAK-1 im PZT zeigen. So führte z.B. die Überexpression von *TAK-1* im visuellen System von *Drosophila* zu ektoptischer Apoptose, die von JNK vermittelt wurde (Takatsu et al., 2000). Gesteigerte Apoptose konnte auch in transgenen Fröschen und Mäusen gezeigt werden, die *TAK-1* überexprimierten (Shibuya et al., 1998; Zhang et al., 2000). TAK-1 kann Jnk aktivieren (Wang et al., 1997), welches wiederum c-Jun aktiviert. Die Transkription von *c-Jun* wird dann autoregulatorisch durch das c-Jun-Protein vermittelt (Angel et al., 1988). Diese Kaskade könnte somit die Verbindung zwischen dem Bmp-Liganden und der Induktion von *c-Jun*, die in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, darstellen. *c-Jun* ist unter verschiedenen experimentellen Bedingungen ausreichend, PZT zu induzieren (diese Arbeit, Bossy-Wetzel et al., 1997; Leppa und Bohmann, 1999). *c-Jun* ist, wie durch die Explantatelektroporation gezeigt werden konnte, auch ausreichend, *Dkk-1*-Transkription zu induzieren. Dessen Produkt führt zu einer Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, wie durch die verminderte *Lef-1*-Expression gezeigt werden konnte. Übereinstimmend mit diesem Modell der Bmp-induzierten Apoptose (Abb. 4.3), konnte gezeigt werden, daß der TAK-1-MAPK-Signalweg den Wnt/ β -Catenin-Signalweg antagonisiert (Ishitani et al., 1999). Interessanterweise führt auch gesteigerte Jnk-Aktivität zu einer Destabilisierung von β -Catenin und gesteigerter Apoptose in diversen Zelllinien (Neo et al., 2000). Die Hypothese, daß Bmp/Jnk-Signale wichtig für die Regulation des PZT während der Entwicklung der Vertebratenextremität sind, wird gestützt von einer Studie, die zeigte, daß die Störung positioneller Informationen, die durch dpp- und wg-Gradienten vermittelt werden, während der Flügelentwicklung von *Drosophila* zu einer Aktivierung des DJNK-Signalwegs und zur Induktion von Apoptose führt (Adachi-Yamada et al., 1999). Die Autoren schlugen vor, daß dieser Signalweg allerdings während der Normalentwicklung latent ist und nur durch anomale dpp-Signalaktivitäten ausgelöst wird, um die normale Entwicklung aufrechtzuerhalten. Ob *c-Jun* für den physiologischen Zelltod während der Entwicklung der Vertebratenextremität notwendig ist, ist nicht zu entscheiden, da *c-Jun*^{-/-}-Embryonen spätestens am Tag E13,5, also wenn der massive PZT im interdigitalen Mesenchym beginnt, sterben (Hilberg et al., 1993).

In einer jüngeren Studie wurde allerdings genetische Evidenz präsentiert, daß *c-Jun* N-terminale Phosphorylierung für die Regulation der Apoptose während der Entwicklung nicht essentiell ist, da keine Störungen des PZT in Mäusen beobachtet werden konnten, die ein *c-Jun*-Allel besaßen, welches nicht an den Serinresten 63 und 73 phosphoryliert werden konnte (Behrens et al., 1999). D.h., auch für den Bmp/Jnk-Signalweg während der Entwicklung der Vertebratenextremität kann nicht ausgeschlossen werden, daß diese Kaskade nur als Antwort auf gestörte Aktivitäten von Signalwegen induziert wird.

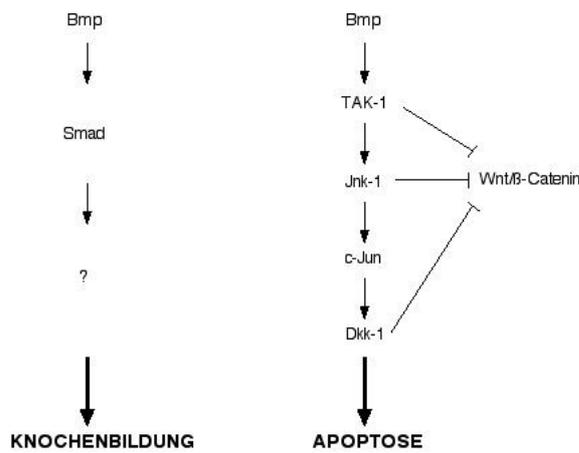


Abbildung 4.3 : Modell zur Erklärung der dualen Bmp-Funktion in mesodermalen Zellen unter Einbeziehung der intrazellulären Signalkaskaden.

Nach diesem Modell führt ein Bmp-Signal zu Apoptose, wenn der Bmp/Jnk-Signalweg dominiert. Von den einzelnen Komponenten des Bmp/Jnk-Signalwegs ist gezeigt worden, daß sie Wnt/β-Catenin-Signale inhibieren können, was konsistent mit dem Modell in Abb. 4.2 ist. Auf der anderen Seite würde Bmp zur Knochenbildung führen, wenn der Bmp/Smad-Signalweg dominiert. Da Smads alleine nur eine geringe Affinität zu DNA haben (s. 1.2), sind hierfür weitere Transkriptionsfaktoren (?) notwendig.

Die gezeigten Daten können aber nicht auflösen, ob die Regulation von *Dkk-1* durch *c-Jun* direkt oder indirekt erfolgt. Mit dem Programm „MatInspector V2.2“, mit dem nach potentiellen Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktoren in einer DNA-Sequenz auf der Grundlage der „Transfac 4.0“ Datenbank (<http://transfac.gbf.de>) gesucht werden kann, konnten in einer Sequenz genomischer DNA des menschlichen *DKK-1*-Gens, die 2 kb stromaufwärts vom Translationsstart kartiert, mehrere potentielle Bindungsstellen für *c-Jun* bzw. Ap-1-Komplexe gefunden werden (Daten nicht gezeigt). In biochemischen Bindungsstudien könnte analysiert werden, ob *c-Jun* tatsächlich diesen DNA-Abschnitt binden kann, was ein Hinweis auf eine direkte regulatorische Interaktion zwischen *c-Jun* und dem *DKK-1*-Promoter wäre. Allerdings wären aus diesem Experiment keine Rückschlüsse auf die biologische Relevanz einer solchen Interaktion möglich. Hierzu müßten diese potentiellen Bindungsstellen mutiert, und *in vivo* getestet werden, ob bestimmte Aspekte der *Dkk-1*-Aktivierung nicht mehr realisiert werden. Um zu analysieren, ob für die *Dkk-1*-Induktion durch rhBMP-4 die Proteinbiosynthese notwendig ist, könnte das hierzu genutzte Zellkulturexperiment in der Gegenwart eines Proteinsynthese-Inhibitors wie z.B.

Cycloheximid durchgeführt werden. Schon die Addition von Cycloheximid zu kultivierten MEF führte aber zur Induktion der *Dkk-1*-Transkription (Daten nicht gezeigt), was zeigt, daß offensichtlich der bestehende Proteinvorrat einer Zelle ausreicht, um auf dieses Streßsignal mit der Induktion der *Dkk-1*-Expression zu antworten.

4.10 Regulation von *Dkk-1* durch Streßsignale

c-Jun wird sehr schnell als Antwort einer Zelle auf verschiedene Apoptose-auslösende Streßsignale aktiviert (Übersichten bei Wilhelm et al., 1995; Basu und Kolesnick, 1998; Karin, 1998; Chen und Tan, 2000). So ist die *c-Jun*-Induktion z.B. das Hauptcharakteristikum der Reaktion von Säugetierzellen auf UV-Bestrahlung, und Zellen, denen *c-Jun*-Funktion fehlt, sind weniger sensitiv gegenüber UV-induzierter Apoptose (Shaulian et al., 2000). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß auch in Hühnerembryonen *c-Jun*-Induktion innerhalb einer Stunde nach UV-Bestrahlung nachzuweisen ist. Dieser Mechanismus scheint also zwischen Säugetieren und niederen Vertebraten konserviert zu sein. Die UV-Exposition führt zu einer Akkumulation des p53-Proteins, das als Antwort auf diesen Stimulus entweder die Aktivierung eines Zellzyklus-Arretierungsprogramms zur Reparatur der DNA-Schäden oder die Induktion von Apoptose auslöst (Übersichten bei Vogelstein et al., 2000; Vousden, 2000). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß es die konstitutive Expression von *c-Jun* ist, die dazu führt, daß das p53-abhängige Programm zur Apoptose-Induktion als Antwort auf UV-Bestrahlung ausgelöst wird (Shaulian et al., 2000). In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse von Wang et al. (2000) von großer Bedeutung, die *Dkk-1* als Zielgen von *p53* identifiziert haben, da *Dkk-1* in einer *p53*-abhängigen Weise durch DNA-Schädigungen in kultivierten Zellen induziert wird. Diese Ergebnisse zusammen mit den in der vorliegenden Arbeit präsentierten Resultaten, mit denen gezeigt werden konnte, daß *Dkk-1* ein *c-Jun*-Zielgen ist und außerdem durch UV-Strahlung induziert wird, was wiederum zu einer Reduktion der *Lef-1*-Expression führte, implizieren, daß die *Dkk-1*-vermittelte Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Wegs ein wichtiger Bestandteil der p53-abhängigen pro-apoptotischen Kaskade ist. In zwei Publikationen wurde ein alternativer Weg beschrieben, der Schädigungen der DNA mit der Degradation von β -Catenin verbindet. Es konnte gezeigt werden, daß das p53-induzierbare Siah-1 die Destabilisierung von β -Catenin in einer β -TrCP-unabhängigen Weise vermittelt (Liu et al., 2001; Matsuzawa und Reed, 2001). Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, daß die Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs eine generelle Voraussetzung für die Induktion von Apoptose sein könnte, da verschiedene unabhängige Wege existieren, die die Degradation von β -Catenin sicherstellen.

Obwohl p53 die *Dkk-1*-Expression induzieren kann, gibt es mehrere Hinweise darauf, daß es hierfür nicht benötigt wird. Zum einen induziert Staurosporin, von dem gezeigt worden ist,

daß es Apoptose unabhängig von p53 induziert (Rocha et al., 2000), sehr rasch *Dkk-1*-Expression. D.h. in diesem Prozeß ist die Aktivierung von *Dkk-1* unabhängig von p53. Darüberhinaus ist BMP-4 ein starker Induktor der *Dkk-1*-Transkription. Auch die Apoptose-induzierende Wirkung von Mitgliedern der Tgf β -Familie verläuft offensichtlich ohne die Aktivierung von p53 (Selvakumaran et al., 1994; Yamamoto et al., 1996; Francis et al., 2000). Außerdem ist *Dkk-1* normal in den Gliedmaßenknospen von *p53*^{-/-}-Embryonen exprimiert, was bedeutet, daß es auch für die endogene Expression entbehrlich ist.

Auf der anderen Seite ist die UV-induzierte Steigerung der *Dkk-1*-Expression offensichtlich unabhängig vom Bmp-Signalweg, da keine transkriptionelle Induktion von *Bmp-4* nach UV-Bestrahlung detektiert werden konnte. Dies zeigt, daß *Dkk-1* von unterschiedlichen p53-abhängigen und p53-unabhängigen apoptotischen Stimuli induziert werden kann.

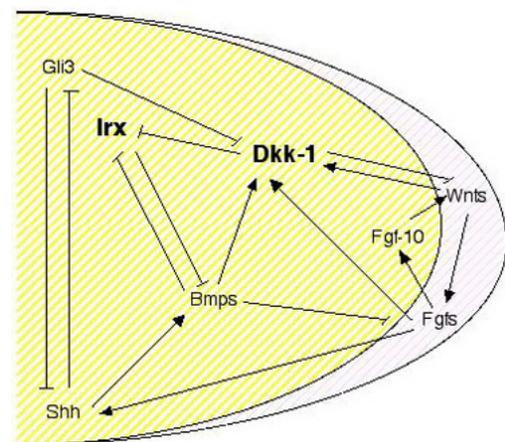
Im Gegensatz zu *p53* ist die Funktion von *c-Jun* von entscheidender Bedeutung für die Aktivierung von *Dkk-1*, wie durch die drastisch reduzierte Expression in *c-Jun*^{-/-}-MEF gezeigt werden konnte. Darüberhinaus ist c-Jun entscheidend für die *Dkk-1*-Induktion durch BMP-4. Auch die durch Staurosporin, H₂O₂ oder UV-Licht induzierte Apoptose beinhalten eine Jnk-vermittelte Aktivierung der Ap-1-Aktivität und Induktion der *c-Jun*-Transkription (Buschmann et al., 2000; Chae et al., 2000; Shaulian et al., 2000 und vorliegende Arbeit). Daraus läßt sich ableiten, daß unterschiedliche apoptotische Stimuli in der Aktivierung von c-Jun konvergieren, die zu gesteigerter Transkription von *Dkk-1* führt. Dies macht c-Jun zu einem der wichtigsten oder dem wichtigsten Transkriptionsfaktor für die *Dkk-1*-Aktivierung während apoptotischer Signale. Für eine wichtige Funktion von Cyclin G, einem weiteren potentiellen gemeinsamen Signalmediator der unterschiedlichen Stimuli, konnte keine Evidenz gefunden werden.

4.11 Integration von *Ft* und *Dkk-1* in das molekulare Netzwerk der Gliedmaßenentwicklung

Der komplexe Phänotyp der Extremitäten homozygoter *Ft*-Embryonen und die Tatsache, daß von sehr frühen Stadien der Gliedmaßenentwicklung an veränderte Expressionsmuster mehrerer Mitglieder der für die Entwicklung essentiellen Bmp-, Shh-, Wnt- und Fgf-Signalwege nachgewiesen werden konnten, zeigt, daß die Gene am *Ft*-Lokus verschiedene Aspekte der Extremitätenentwicklung in entscheidendem Maße beeinflussen. Der Phänotyp der homozygoten Embryonen ist darüberhinaus nicht eine einfache Steigerung des Phänotyps der *Ft*/+ Embryonen, sondern qualitativ sehr unterschiedlich. Dies wird z.B. daran deutlich, daß während der Entwicklung der Extremitäten in den *Ft*/+ Embryonen keine Veränderungen der Expression verschiedener Musterbildungsgene, wie z.B. *Shh* in den frühen Stadien der Entwicklung detektiert werden konnten (Heymer und Rüther, 1999). Mit dem heutigen

Wissenstand wäre es ein Fehler, die *Ft*-Mutation mit dem Verlust der Funktion von *Irx-3*, *-5* und *-6* gleichzusetzen, da noch drei andere Gene durch diese Mutation deletiert worden sind (T. Peters, K. Ausmeier, R. Dildrop und U. Rüter, Manuskript zur Publikation eingereicht). Der Funktionsverlust eines dieser Gene führte allerdings zu keinerlei Phänotyp in den entsprechenden Mäusen (R. Lesche und U. Rüter, unpublizierte Beobachtung) und von den beiden anderen konnte kein spezifisches Muster der Expression während der Entwicklung der Gliedmaßen gezeigt werden (Peters et al., 1999; T. Peters und U. Rüter, unpublizierte Beobachtung). Dieses macht sie nicht zu primären Kandidaten, die in *Ft*-mutanten Mäusen gefundenen phänotypischen Veränderungen zu verursachen. Trotzdem kann eine Beteiligung dieser Gene an den Phänotypen der Gliedmaßen nicht ausgeschlossen werden. Die *Irx*-Gene sind sowohl von ihrer Expression während der Normalentwicklung als auch durch die in dieser und anderen Arbeiten dargelegten Interaktionen mit den Bmp- und Wnt-Signalwegen die besten Kandidaten, ursächlich für die beobachteten Phänotypen der Gliedmaßen verantwortlich zu sein. Aus diesem Grunde wurde in Abb. 4.4 „*Irx*“ anstelle von „*Ft*“ in das molekulare Netzwerk integriert. Schließlich hat die Analyse des *Dkk-1*-Gens verschiedene neue molekulare Interaktionen der essentiellen Signalwege während der Gliedmaßenentwicklung offenbart (Abb. 4.4). Darüberhinaus konnte über die in dieser Arbeit etablierte pro-apoptotische Funktion von *Dkk-1* ein wesentlicher Bestandteil identifiziert werden, dessen Deregulation offensichtlich einen wichtigen Beitrag zur Entstehung des bisher einmaligen Gliedmaßenphänotyps der *Ft/Ft*-Embryonen leistet.

Abbildung 4.4 : *Dkk-1* und *Irx* im molekularen Netzwerk der Gliedmaßenentwicklung. Das Schema einer frühen Extremitätenknospe (der gelb unterlegte Bereich repräsentiert die mesodermalen Zellen, der rot unterlegte die AER) faßt die in der vorliegenden Arbeit etablierten Wechselwirkungen von *Dkk-1* und *Irx* mit essentiellen Komponenten der Gliedmaßenentwicklung zusammen und integriert sie in das komplexe Signalnetzwerk. Die potentielle Inhibition von *Irx* durch *Dkk-1* wurde aus den Ergebnissen von Gomez-Skarmeta et al. (2001) abgeleitet.



5. Zusammenfassung

Eine Herausforderung des Studiums der Entwicklung der Vertebratenextremität ist es, zu verstehen, wie die Moleküle der Signalzentren, sowie die Mediatoren ihrer Aktivität und ihre molekularen Gegenspieler in den physiologischen Kontext integriert werden, um die korrekte Musterbildung und Differenzierung zu gewährleisten. Die Charakterisierung existierender Mausmutanten bietet die Möglichkeit, diese regulatorischen Interaktionen detailliert zu analysieren. Durch die Korrelation von morphologischen und molekularen Veränderungen können potentielle Wirkungsmechanismen der relevanten Gene bzw. ihrer Produkte und damit ihre Bedeutung für die komplexen molekularen Netzwerke, die das Muster der Extremität determinieren, erfaßt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde aus diesem Grund die Gliedmaßenentwicklung in Embryonen der *Fused toes (Ft)* Mausmutante untersucht. In *Ft/Ft* Extremitäten konnten schwerwiegende Fehlentwicklungen beobachtet werden, wie z.B. extreme distale Verstümmelungen der Skelettelemente des Autopods und eine, in dieser Weise in keiner anderen Mausmutante beschriebene, dorso-ventrale Duplikation der Metacarpalen. Dieser Phänotyp wird offensichtlich durch eine deregulierte Aktivität der Bmp-, Shh-, Fgf- und Wnt-Signalwege verursacht, die zu einer Störung der Balance zwischen Proliferation und Apoptose mesodermaler Zellen in *Ft/Ft* Extremitäten führt. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß das für einen potenten Wnt-Antagonisten kodierende *Dkk-1* maßgeblich zu den genannten Störungen beiträgt. Durch eine Kombination von embryologischen Techniken und Genexpressionsstudien in Hühner- und Mausembryonen, sowie ergänzende *in vitro* Analysen, konnte eine komplexe Regulation der *Dkk-1*-Expression, die auf die Regionen des programmierten Zelltods (PZT) beschränkt ist, durch die essentiellen Signalwege der Gliedmaßenentwicklung gezeigt werden. Ferner zeigte sich, daß *Dkk-1* neben Apoptose-induzierenden (nicht aber Knochen-induzierenden) Bmp-Signalen auch von anderen, sowohl p53-abhängigen als auch p53-unabhängigen, PZT-auslösenden Stimuli induziert wird. Es wurden verschiedene Evidenzen erarbeitet, die c-Jun als einen wichtigen Mediator dieser pro-apoptotischen Signale für die *Dkk-1*-Induktion implizieren. Außerdem konnte zum ersten Mal direkt eine pro-apoptotische Funktion von *Dkk-1* nachgewiesen werden. Aus den präsentierten Daten leitet sich eine entscheidende Rolle für die *Dkk-1*-vermittelte Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in der Apoptose während der Embryonalentwicklung als auch für adaptive apoptotische Antworten ab. Außerdem ergibt sich aus den Daten ein neues Modell zur dualen Funktion von Bmp (Apoptose- versus Knocheninduktion) in der Regulation des Schicksals mesodermaler Gliedmaßenknospenzellen. Durch die Integration von *Ft* und *Dkk-1* in das genetische Netzwerk der

Gliedmaßenentwicklung konnten neue Einblicke in die Wechselwirkungen der für die Extremitätenentwicklung essentiellen Signalwege etabliert werden.

Literatur

- Adachi-Yamada, T., Fujimura-Kamada, K., Nishida, Y. und Matsumoto, K. (1999) : Distortion of proximodistal information causes JNK-dependent apoptosis in *Drosophila* wing. *Nature*, **400**, 166-169.
- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W. et al. (2000) : The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, **287**, 2185-2195.
- Ahlgren, S.C. und Bronner-Fraser, M. (1999) : Inhibition of Sonic hedgehog signaling *in vivo* results in craniofacial neural crest death. *Curr. Biol.*, **9**, 1304-1314.
- Ahrens, P.B., Solorsh, M. und Reiter, R.S. (1977) : Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. *Dev. Biol.*, **60**, 69-82.
- Akita, K. (1996) : The effects of the ectoderm on the dorsoventral pattern of epidermis, muscles and joints in the developing chick leg : a new model. *Anat. Embryol.*, **193**, 377-386.
- Altabef, M., Logan, C., Tickle, C. und Lumsden, A. (2000) : *Engrailed-1* misexpression in chick embryos prevents apical ridge formation but preserves segregation of dorsal and ventral ectodermal compartments. *Dev. Biol.*, **222**, 307-316.
- Angel, P., Hattori, K., Smeal, T. und Karin, M. (1988) : The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP1. *Cell*, **55**, 875-885.
- Arias, A.M. (2000) : The informational content of gradients of Wnt proteins. www.stke.org/cgi/content/full/OC_sigtrans;2000/43/pe1
- Arias, A.M., Brown, A.M. und Brennan, K. (1999) : Wnt signalling: pathway or network ? *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **9**, 447-454.
- Arnold, S.J., Stappert, J., Bauer, A., Kispert, A., Herrmann, B.G. und Kemler, R. (2000) : *Brachyury* is a target gene of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Mech. Dev.*, **91**, 249-258.
- Ault KT, Durmowicz, G., Galione, A., Harger, P.L. und Busa, W.B. (1996) : Modulation of *Xenopus* embryo mesoderm-specific gene expression and dorsoanterior patterning by receptors that activate the phosphatidylinositol cycle signal transduction pathway. *Development*, **122**, 2033-2041.
- Bafico, A., Gazit, A., Pramila, T., Finch, P.W., Yaniv, A. und Aaronson, S.A. (1999) : Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling. *J. Biol. Chem.*, **274**, 16180-16187.
- Bafico, A., Liu, G., Yaniv, A., Gazit, A. und Aaronson, S.A. (2001) : Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat. Cell Biol.*, **3**, 683-686.
- Barker, N., Morin, P.J. und Clevers, H. (2000) : The Yin-Yang of TCF/ β -catenin signaling. *Adv. Cancer Res.*, **77**, 1-24.
- Basu, S. und Kolesnick, R. (1998) : Stress signals for apoptosis: ceramide and c-Jun kinase. *Oncogene*, **17**, 3277-3285.
- Baur, S.T., Mai, J.J. und Dymecki, S.M. (2000) : Combinatorial signaling through BMP receptor IB and GDF5: shaping of the distal mouse limb and the genetics of distal limb diversity. *Development*, **127**, 605-619.
- Bedell, M.A., Jenkins, N.A. und Copeland, N.G. (1997) : Mouse models of human disease. Part I : Techniques and resources for genetic analysis in mice. *Genes Dev.*, **11**, 1-10.
- Behrens, A., Sibilica, M. und Wagner, E.F. (1999) : Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat. Genet.*, **21**, 326-329.
- Behrens, J. (2000) : Cross-regulation of the Wnt signalling pathway: a role of MAP kinases. *J. Cell. Sci.*, **113**, 911-919.

-
- Bejsovec, A. (2000) : Wnt signaling: An embarrassment of receptors. *Curr. Biol.*, **10**, R919-R922.
- Bhardwaj, G., Murdoch, B., Wu, D., Baker, D.P., Williams, K.P., Chadwick, K., Ling, L.E., Karanu, F.N. und Bhatia, M. (2001) : Sonic hedgehog induces proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat. Immunol.*, **2**, 172-180.
- Bi, W., Deng, J.M., Zhang, Z., Behringer, R.R. und de Crombrughe, B. (1999) : *Sox9* is required for cartilage formation. *Nat. Genet.*, **22**, 85-89.
- Birnboim, H. C. (1983) : A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.*, **100**, 243-255.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979) : A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids. Res.*, **7**, 1513-1522.
- Boilly, B., Vercoutter-Edouart, A.S., Hondermarck, H., Nurcombe, V. und Le Bourhis, X. (2000) : FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **11**, 295-302.
- Bossy-Wetzell, E., Bakiri, L. und Yaniv, M. (1997) : Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. *EMBO J.*, **16**, 1695-1709.
- Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D.I. und Mlodzik, M. (1998) : Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signalling. *Cell*, **94**, 109-118.
- Britto, J.M., Tannahill, D. und Keynes, R.J. (2000) : Life, death and Sonic hedgehog. *Bioessays*, **22**, 499-502.
- Brunet, L.J., McMahon, J.A., McMahon, A.P. und Harland, R.M. (1998) : Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science*, **280**, 1455-1457.
- Buckland, R.A., Collinson, J.M., Graham, E., Davidson, D.R. und Hill, R.E. (1998) Antagonistic effects of FGF4 on BMP induction of apoptosis and chondrogenesis in the chick limb bud. *Mech. Dev.*, **71**, 143-150.
- Bumcrot, D.A., Takada, R. und McMahon, A.P. (1995) : Proteolytic processing yields two secreted forms of Sonic hedgehog. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 2294-2303.
- Büscher, D., Bosse, B., Heymer, J. und Rütter, U. (1997) : Evidence for genetic control of *Sonic hedgehog* by *Gli3* in mouse limb development. *Mech. Dev.*, **62**, 175-182.
- Büscher, D., Grotewold, L. und Rütter, U. (1998) : The *Xt^l* allele generates a *Gli3* fusion transcript. *Mamm. Genome*, **9**, 676-678.
- Büscher, D. und Rütter, U. (1998) : Expression profile of *Gli* family members and *Shh* in normal and mutant mouse limb development. *Dev. Dyn.*, **211**, 88-96.
- Buschmann, T., Yin, Z., Bhoumik, A. und Ronai, Z. (2000) : Amino-terminal-derived JNK fragment alters expression and activity of c-Jun, ATF2, and p53 and increases H₂O₂-induced cell death. *J. Biol. Chem.*, **275**, 16590-16596.
- Capdevilla, J., Tsukui, T., Rodriguez-Esteban, C., Zappavigna, V. und Izpisua Belmonte, J.C. (1999) : Control of vertebrate limb outgrowth by the proximal factor *Meis2* and distal antagonism of BMPs by Gremlin. *Mol. Cell*, **4**, 839-849.
- Capecchi, M.R. (1989a) : Altering the genome by homologous recombination. *Science*, **244**, 1288-1292.
- Capecchi, M.R. (1989b) : The new mouse genetics : altering the genome by gene targeting. *Trends Gen.*, **5**, 70-76.
- Chae, H.J., Kang, J.S., Byun, J.O., Han, K.S., Kim, D.U., Oh, S.M., Kim, H.M., Chae, S.W. und Kim, H.R. (2000) : Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. *Pharmacol. Res.*, **42**, 373-381.
- Chan, D.C., Wynshaw-Boris, A. und Leder, P. (1995) : Formin isoforms are differentially expressed in the mouse embryo and are required for normal expression of *fgf-4* and *shh* in the limb bud. *Development*,
-

-
- 121**, 3151-3162.
- Chang, D.T., Lopez, A., von Kessler, D.P., Chiang, C., Simandi, B.K., Zhao, R., Seldin, M.F., Fallon, J.F. und Beachy, P.A. (1994) : Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine *hedgehog* gene. *Development*, **120**, 3339-3353.
- Charite, J., de Graaff, W., Shen, S. und Deschamps, J. (1994) : Ectopic expression of Hoxb-8 causes duplication of the ZPA in the forelimb and homeotic transformation of axial structures. *Cell*, **78**, 589-601.
- Charite, J., McFadden, D.G. und Olson, E.N. (2000) : The bHLH transcription factor dHAND controls *Sonic hedgehog* expression and establishment of the zone of polarizing activity during limb development. *Development*, **127**, 2461-2470.
- Chen, H., Lun, Y., Ovchinnikov, D., Kokubo, H., Oberg, K.C., Pepicelli, C.V., Gan, L., Lee, B. und Johnson, R.L. (1998) : Limb and kidney defects in *Lmx1b* mutant mice suggests an involvement of *LMX1B* in human nail patella syndrome. *Nat. Genet.*, **19**, 51-55.
- Chen, Y.R. und Tan, T.H. (2000) : The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling (review). *Int. J. Oncol.*, **16**, 651-662.
- Chevallier, A., Kieny, M. und Mauger, A. (1977) : Limb-somite relationship : origin of the limb musculature. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **41**, 245-258.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Harris, M.P., Simandl, B.K., Li, Y., Beachy, P.A. und Fallon, J.F. (2001) : Manifestation of the limb prepatter: limb development in the absence of *Sonic hedgehog* function. *Dev. Biol.*, **236**, 421-435.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H. und Beachy, P.A. (1996) : Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking *Sonic hedgehog* gene function. *Nature*, **383**, 407-413.
- Christ, B., Jacob, H.J. und Jacob, M. (1977) : Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos. *Anat. Embryol.*, **150**, 171-186.
- Cho, K.W. und Blitz, I.L. (1998) : BMPs, Smads and metalloproteinases: extracellular and intracellular modes of negative regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **8**, 443-449.
- Clark, R.M., Marker, P.C. und Kingsley, D.M. (2000) : A novel candidate gene for mouse and human reaxial polydactyly with altered expression in limbs of *Hemimelic extra-toes* mutant mice. *Genomics*, **67**, 19-27.
- Coelho, C.N., Sumoy, L., Rodgers, B.J., Davidson, D.R., Hill, R.E., Upholt, W.B. und Kosher, R.A. (1991) : Expression of the chicken homeobox-containing gene *GHox-8* during embryonic chick limb development. *Mech. Dev.*, **34**, 143-154.
- Cohn, M.J. (2000) : Giving limbs a hand. *Nature*, **406**, 953-954.
- Cohn, M.J., Izpisua Belmonte, J.C., Abud, H., Heath, J.K. und Tickle, C. (1995) : Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell*, **80**, 739-746.
- Colvin, J.S., Feldman, B., Nadeau, J.H., Goldfarb, M. und Ornitz, D.M. (1999) : Genomic organization and embryonic expression of the mouse *fibroblast growth factor 9* gene. *Dev. Dyn.*, **216**, 72-88.
- Colvin, J.S., Green, R.P., Schmahl, J., Capel, B. und Ornitz, D.M. (2001a) : Male-to-Female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell*, **104**, 875-889.
- Colvin, J.S., White, A.C., Pratt, S.J. und Ornitz, D.M. (2001b) : Lung hypoplasia and neonatal death in *Fgf9*-null mice identify this gene as an essential regulator of lung mesenchyme. *Development*, **128**, 2095-2106.
- Conlon, R.A. und Rossant, J. (1992) : Exogenous retinoic acid rapidly induces anterior ectopic expression of murine *Hox-2* genes *in vivo*. *Development*, **116**, 357-368.
- Conlon, R.A., Reaume, A.G. und Rossant, J. (1995) : *Notch1* is required for the coordinate segmentation of somites. *Development*, **121**, 1533-1545.
-

-
- Crossley, P.H. und Martin, G.R. (1995) : The mouse *Fgf-8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development*, **121**, 439-451.
- Crossley, P.H., Minowada, G., MacArthur, C.A. und Martin, G.R. (1996) : Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell*, **84**, 127-136.
- Davidson, D.R. und Hill, R.E. (1991) : *Msh*-like genes: a family of homeobox genes with wide-ranging expression during vertebrate development. *Sem. in Dev. Biol.*, **2**, 405-412.
- Davis, C.A., Holmyard, D.P., Millen, K.J. und Joyner, A.L. (1991) : Examining pattern formation in mouse, chicken and frog embryos with an En-specific antiserum. *Development*, **111**, 287-298.
- Davis, C.A. und Joyner, A.L. (1988) : Expression pattern of the homeobox-containing genes *En-1* and *En-2* and the proto-oncogene *int-1* diverge during mouse development. *Genes. Dev.*, **2**, 1736-1744.
- Davis, R.J. (2000) : Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, **103**, 239-252.
- Dealy, C.N., Roth, A., Ferrari, D., Brown, A.M. und Kosher, R.A. (1993) : *Wnt-5a* and *Wnt-7a* are expressed in the developing chick limb bud in a manner suggesting roles in the pattern formation along the proximodistal and dorsoventral axes. *Mech. Dev.*, **43**, 175-186.
- Dearmorff, M.A., Tan, C., Conrad, L.J. und Klein, P.S. (1998) : Frizzled-8 is expressed in the Spemann organizer and plays a role in early morphogenesis. *Development*, **125**, 2687-2700.
- De Robertis, E.M., Larrain, J., Oelgeschläger, M. und Wessely, O. (2000) : The establishment of Spemann's organizer and patterning of the vertebrate embryo. *Nat. Rev. Genet.*, **1**, 171-181.
- Derynck, R., Zhang, Y. und Feng, X.H. (1998) : Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell*, **95**, 737-740.
- Dickie, M.M. (1968) : *Mouse News Lett.*, **38**, 24.
- Dierick, H. und Bejsovec, A. (1999) : Cellular mechanisms of wingless/Wnt signal transduction. *Curr. Top. Dev. Biol.*, **43**, 153-190.
- Dono, R. und Zeller, R. (1994) : Cell-type-specific nuclear translocation of fibroblast growthfactor-2 isoforms during chicken kidney and limb morphogenesis. *Dev. Biol.*, **163**, 316-330.
- Doolittle, D.P., Davisson, M.T., Guidi, J.M. und Green, M.C. (1996) : Catalog of mutant genes and polymorphic loci. In : *Genetic variants and strains of the laboratory mouse*. 3rd ed. Hrsg. Lyon, M.F., Rastan, S. und Brown, S.D.M., 17-854. *Oxford University Press*, Oxford, UK.
- Drossopoulou, G., Lewis, K.E., Sanz-Ezquerro, J.J., Nikbakht, N., McMahon, A.P., Hofmann, C. und Tickle, C. (2000) : A model for anteroposterior patterning of the vertebrate limb based on sequential long- and short-range Shh signalling and Bmp signalling. *Development*, **127**, 1337-1348.
- Du, S.J., Purcell, S.M., Christian, J.L., McGrew, L.L. und Moon, R.T. (1995) : Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 2625-2634.
- Duboule, D. (1994a) : Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet.*, **10**, 358-364.
- Duboule, D. (1994b) : How to make a limb ? *Science*, **266**, 575-576.
- Duboule, D. (1995) : Vertebrate *Hox* genes and proliferation : an alternative pathway to homeosis ? *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **5**, 525-528.
- Dudley, A.T. und Tabin, C.J. (2000) : Constructive antagonism in limb development. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **10**, 387-392.
- Dunn, N.R., Winnier, G.E., Hargett, L.K., Schrick, J.J., Fogo, A.B. und Hogan, B.L.M. (1997) : Haploinsufficient phenotypes in *Bmp4* heterozygous null mice and modification by mutations in *Gli3*
-

-
- and *Alx4*. *Dev. Biol.*, **188**, 235-247.
- Duprez, D., Fournier-Thibault, C. und Le Douarin, N. (1998) : Sonic hedgehog induces proliferation of committed skeletal muscle cells in the chick limb. *Development*, **125**, 495-505.
- Duprez, D.M., Kostakopoulou, K., Francis-West, P.H. und Tickle, C. (1996) : Activation of *Fgf-4* and *HoxD* gene expression by BMP-2 expressing cells in the developing chick limb. *Development*, **122**, 1821-1828.
- Echelard, Y., Epstein, D.J., St-Jaques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J.A. und McMahon, A.P. (1993) : Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*, **75**, 1417-1430.
- Erlebacher, Q., Filvaroff, E.H., Gitelman, S.E. und Derynck, R. (1995) : Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell*, **80**, 371-378.
- Fernandez-Teran, M., Piedra, M.E., Kathiriyai, I.S., Srivastava, D., Rodriguez-Rey, J.C. und Ros, M.A. (2000) : Role of dHAND in the anterior-posterior polarization of the limb bud : implications for the Sonic hedgehog pathway. *Development*, **127**, 2133-2142.
- Finch, P.W., He, X., Kelley, M.J., Uren, A., Schaudies, R.P., Popescu, N.C., Rudikoff, S., Aaronson, S.A., Varmus, H.E. und Rubin, J.S. (1997) : Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**, 6770-6775.
- Francis, J.M., Heyworth, C.M., Spooncer, E., Pierce, A., Dexter, T.M. und Whetton, A.D. (2000) : Transforming growth factor-beta 1 induces apoptosis independently of p53 and selectively reduces expression of Bcl-2 in multipotent hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.*, **275**, 39137-39145.
- Galceran, J., Farinas, I., Depew, M.J., Clevers, H. und Grosschedl, R. (1999) : *Wnt3a*^{-/-}-like phenotype and limb deficiency in *Lef1*^{-/-}*Tcf1*^{-/-} mice. *Genes Dev.*, **13**, 709-717.
- Ganan, Y., Macias, D., Basco, R.D., Merino, R. und Hurle, J.M. (1998) : Morphological diversity of the avian foot is related with the pattern of *msx* gene expression in the developing autopod. *Dev. Biol.*, **196**, 33-41.
- Ganan, Y., Macias, D., Duterque-Coquillaud, M., Ros, M.A. und Hurle, J.M. (1996) : Role of TGFβs and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development*, **122**, 2349-2357.
- Garcia-Martinez, V., Macias, D., Ganan, Y., Garcia-Lobo, J.M., Francia, M.V., Fernandez-Teran, M.A. und Hurle, J.M. (1993) : Internucleosomal DNA fragmentation and programmed cell death (apoptosis) in the interdigital tissue of the embryonic chick leg bud. *J. Cell. Sci.*, **106**, 201-202.
- Gardner, C.A. und Barald, K.F. (1992) : Expression patterns of engrailed-like proteins in the chick embryo. *Dev. Dyn.*, **193**, 370-388.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. und Ben-Sasson, S.A. (1992) : Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, **119**, 493-501.
- Geduspan, J.S. und MacCabe, J.A. (1987) : The ectodermal control of mesodermal patterns of differentiation in the developing chick wing. *Dev. Biol.*, **124**, 398-408.
- Geduspan, J.S. und MacCabe, J.A. (1989) : Transfer of dorsoventral information from mesoderm to ectoderm at the onset of limb development. *Anat. Rec.*, **244**, 79-87.
- Germain, S., Howell, M., Esslemont, G.M. und Hill, C.S. (2000) : Homeodomain and winged-helix transcription factors recruit activated Smads to distinct promoter elements via a common Smad interaction motif. *Genes Dev.*, **14**, 435-451.
- Gibson-Brown, J.J., Agulnik, S.I., Silver, L.M., Niswander, L. und Papaioannou, V. (1998) : Involvement of T-box genes *Tbx2-Tbx5* in vertebrate limb specification and development. *Development*, **125**, 2499-
-

- 2509.
- Glinka, A., Delius, H., Blumenstock, C. und Niehrs, C. (1996) : Combinatorial signalling by Xwnt-11 and Xnr3 in the organizer epithelium. *Mech. Dev.*, **60**, 221-231.
- Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A.P., Blumenstock, C. und Niehrs, C. (1998) : Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature*, **391**, 357-362.
- Gomez-Skarmeta, J.L., de la Calle-Mustienes, E. und Modolell, J. (2001) : The Wnt-activated *Xiro1* gene encodes a repressor that is essential for neural development and downregulates *Bmp4*. *Development*, **128**, 551-560.
- Goodrich, L.V., Johnson, R.L., Milenkovich, L., McMahon, J.A. und Scott, M.P. (1996) : Conservation of the hedgehog/patched signalling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes. Dev.*, **10**, 301-312.
- Greenhouse, J.J., Petropoulos, C.J., Crittenden, L.B. und Hughes, S.H. (1988) : Helper-independent retrovirus vectors with Rous-associated virus type O long terminal repeats. *J. Virol.*, **62**, 4809-4812.
- Grieshammer, U., Minowada, G., Pisenti, J.M., Abbott, U.K. und Martin, G.R. (1996) : The chick limbless mutation causes abnormalities in limb bud dorso-ventral patterning : implications for the mechanism of apical ridge formation. *Development*, **122**, 3851-3861.
- Grotewold, L., Plum, M., Dildrop, R., Peters, T. und Rüther, U. (2001) : *Bambi* is coexpressed with *Bmp-4* during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.*, **100**, 327-330.
- Grotewold, L., Theil, T. und Rüther, U. (1999) : Expression pattern of *Dkk-1* during mouse limb development. *Mech. Dev.*, **89**, 151-153.
- Hall, B.K. und Miyake, T. (2000) : All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *BioEssays*, **22**, 138-147.
- Hamburger, V. und Hamilton, H.L. (1951) : A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J.Morphol.*, **88**, 49-92.
- Hamilton, F.S., Wheeler, G.N. und Hoppler, S. (2001) : Difference in XTcf-3 dependency accounts for change in response to β -catenin-mediated Wnt signalling in *Xenopus* blastula. *Development*, **128**, 2063-2073.
- Hammerschmidt, M., Brook, A. und McMahon, A.P. (1997) : The world according to hedgehog. *Trends Genet.*, **13**, 14-21.
- Hanafusa, H., Ninomiya-Tsuji, J., Masuyama, N., Nishita, M., Fujisawa, J., Shibuya, H., Matsumoto, K. und Nishida, E. (1999) : Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J. Biol., Chem.*, **274**, 27161-27167.
- Haramis, A.G., Brown, J.M. und Zeller, R. (1995) : The limb deformity mutation disrupts the SHH/FGF-4 feedback loop and regulation of 5'HoxD genes during limb pattern formation. *Development*, **121**, 4237-4245.
- Hartmann, C. und Tabin, C.J. (2000) : Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb. *Development*, **127**, 3141-3159.
- Hashimoto, H., Itoh, M., Yamanaka, Y., Yamashita, S., Shimizu, T., Solnica-Krezel, L., Hibi, M. und Hirano, T. (2000) : Zebrafish *Dkk1* functions in forebrain specification and axial mesendoderm formation. *Dev. Biol.*, **217**, 138-152.
- He, X., Saint-Jeannet, J.P., Wang, Y., Nathans, J., Dawid, I. und Varmus, H. (1997) : A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A. *Science*, **275**, 1652-1654.
- Heikinheimo, M., Lawshe, A., Shackelford, G.M., Wilson, D.B. und MacArthur, C.A. (1994) : *Fgf-8* expression in the post-gastrulation mouse suggests roles in the development of the face, limbs and central nervous system. *Mech. Dev.*, **48**, 129-138.

- Heisenberg, C.P., Tada, M., Rauch, G.J., Saude, L., Concha, M.L., Geisler, R., Stemple, D.L., Smith, J.C. und Wilson, S.W. (2000) : Silberblick/Wnt-11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature*, **40**, 76-81.
- Helms, J.A., Kim, C.H., Eichele, G. und Thaller, C. (1996) : Retinoic acid signaling is required during early chick limb development. *Development*, **122**, 1385-1394.
- Hengartner, M.O. (2000) : The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **407**, 770-776.
- Heymer, J. und Rüther, U. (1999) : Syndactyly of *Ft/+* mice correlates with an imbalance in *Bmp4* and *Fgf8* expression. *Mech. Dev.*, **88**, 173-181.
- Heymer, J., Kuehn, M. und Rüther, U. (1997) : The expression pattern of *nodal* and *lefty* in the mouse mutant *Ft* suggests a function in the establishment of handedness. *Mech. Dev.*, **66**, 5-11.
- Higgins, M., Hill, R.E. und West, J.D. (1992) : Dominant hemimelia and En-1 on mouse chromosome 1 are not allelic. *Genet. Res.*, **60**, 53-60.
- Hilberg, F., Aguzzi, A., Howells, N. und Wagner, E.F. (1993) : c-Jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature*, **365**, 179-181.
- Hill, R.E., Jones, P.F., Rees, A.R., Sime, C.M., Justice, M.J., Copeland, M.G., Jenkins, N.A., Graham, E. und Davidson, D.R. (1989) : A new family of mouse homeo box-containing genes: molecular structure, chromosomal location, and developmental expression of *Hox-7.1*. *Genes Dev.*, **3**, 26-37.
- Hofmann, C., Luo, G., Balling, R. und Karsenty, G. (1996) : Analysis of limb patterning in BMP-7-deficient mice. *Dev. Genet.*, **19**, 43-50.
- Hogan, B.L.M. (1996) : Bone morphogenetic proteins: Multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.*, **10**, 1580-1594.
- Holland, P.W. und Graham, A. (1995) : Evolution of regional identity in the vertebrate nervous system. *Perspec. Dev. Neurobiol.*, **3**, 17-27.
- Hollyday, M., McMahon, J.A. und McMahon, A.P. (1995) : *Wnt* expression patterns in chick embryo nervous system. *Mech. Dev.*, **52**, 9-25.
- Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S. und Monk, M. (1987) : HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature*, **326**, 292-295.
- Hornbruch, A. und Wolpert, L. (1991) : The spatial and temporal distribution of polarizing activity in the flank of the pre-limb-bud stages in the chick embryo. *Development*, **111**, 725-731.
- Houweling, A.C., Dildrop, R., Peters, T., Mummehoff, J., Moorman, A.F., Rüther, U. und Christoffels, V.M. (2001) : Gene and cluster-specific expression of the *Iroquois* family members during mouse development. *Mech. Dev.*, **107**, 169-174.
- Hsu, D.R., Economides, A.N., Wang, X., Eimon, P.M. und Harland, R.M. (1998) : The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol. Cell*, **1**, 673-683.
- Hughes, S.H. und Kosick, E. (1984) : Mutagenesis of the region between *env* and *src* of the SR-A strain of Rous sarcoma virus for the purpose of constructing helper-independent vectors. *Virology*, **136**, 89-99.
- Hui, C.C. und Joyner, A.L. (1993) : A mouse model of Greig cephalopolysyndactyly syndrome : the extra-toes^J mutation contains an intragenic deletion of the *Gli3* gene. *Nat. Genet.*, **3**, 241-246.
- Hurle, J.M., Ros, M.A., Climent, V. und Garcia-Martinez, V. (1996) : Morphology and significance of programmed cell death in the developing limb bud of the vertebrate embryo. *Microsc.Res.Tech.*, **34**, 236-246.
- Ingham, P.W. (1998) : Transducing Hedgehog: the story so far. *EMBO J.*, **17**, 3505- 3511.
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H. (1990) : High efficiency transformation of *Escherichia coli* with
-

-
- plasmids. *Gene*, **96**, 23-28.
- Ip, Y.T. und Davis, J.R. (1998) : Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) – from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**, 205-219.
- Isaac, A., Cohn, M.J., Ashby, P., Ataliotis, P., Spicer, D.B., Cooke, J. und Tickle, C. (2000) : FGF and genes encoding transcription factors in early limb specification. *Mech. Dev.*, **93**, 41-48.
- Ishitani, T., Ninomiya-Tusji, J., Nagai, S., Nishita, M., Meneghini, M., Barker, N., Waterman, M., Bowerman, B., Clevers, H., Shibuya, H. und Matsumoto, K. (1999) : The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between β -catenin and transcription factor TCF. *Nature*, **399**, 798-802.
- Itoh, K., Jacob, J.Y. und Sokol, S. (1998) : A role for *Xenopus* Frizzled 8 in dorsal development. *Mech. Dev.*, **74**, 145-157.
- Jainchill, J.L., Aaronson, S.A. und Todaro, G.J. (1969) : Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J. Virol.*, **4**, 549-553.
- Janssen, Y.M., Matalon, S. und Mossmann, B.T. (1997) : Differential induction of c-fos, c-jun, and apoptosis in lung epithelial cells exposed to ROS or RNS. *Am. J. Physiol.*, **273**, L789-796.
- Jena, N., Martin-Seisdedos, C., McCue, P. und Croce, C.M. (1997) : BMP7 null mutation in mice: developmental defects in skeleton, kidney and eye. *Exp. Cell Res.*, **230**, 28-37.
- Johnson, D.R. (1967) : *Extra-toes* : a new mutant gene causing multiple abnormalities in the mouse. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **17**, 543-581.
- Johnson, R.L. und Tabin, C.J. (1995) : The long and short of hedgehog signaling. *Cell*, **81**, 313-316.
- Johnson, R.L. und Tabin, C.J. (1997) : Molecular models for vertebrate limb development. *Cell*, **90**, 979-990.
- Karin, M. (1998) : Mitogen-activated protein kinase cascades as regulators of stress response. *Ann. NY Acad. Sci.*, **851**, 139-146.
- Katagiri, T., Boorla, S., Frendo, J.S., Hogan, B.L.M. und Karsenty, G. (1998) : Skeletal abnormalities in doubly heterozygous *Bmp4* and *Bmp7* mice. *Dev. Genet.*, **22**, 340-348.
- Kawakami, Y., Capdevilla, J., Büscher, D., Itoh, T., Rodríguez Esteban, C. und Izpisúa Belmonte, J.C. (2001) : WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell*, **104**, 891-900.
- Kawakami, Y., Wada, N., Nishimatsu, S.I., Ishikawa, T., Noji, S. und Nohno, T. (1999) : Involvement of *Wnt-5a* in chondrogenic pattern formation in the chick limb bud. *Develop. Growth Differ.*, **41**, 29-40.
- Kazanskaya, O., Glinka, A. und Niehrs, C. (2000) : The role of *Xenopus dickkopf1* in prechordal plate specification and neural patterning. *Development*, **127**, 4981-4992.
- Kengaku, M., Capdevilla, J., Rodriguez Esteban, C., De La Pena, J., Johnson, R.L., Izpisua Belmonte, J.C. und Tabin, C.J. (1998) : Distinct WNT pathways regulating AER formation and dorsoventral polarity in the chick limb bud. *Science*, **280**, 1274-1277.
- Kimmel, R.A., Turnbull, D.H., Blanquet, V., Wurst, W., Loomis, C.A. und Joyner, A.L. (2000) : Two lineage boundaries coordinate apical ectodermal ridge formation. *Genes Dev.*, **14**, 1377-1389.
- Kimura, N., Matsuo, R., Shibuya, H., Nakashima, K. und Taga, T. (2000) : BMP-2 induced apoptosis is mediated by activation of the TAK1-p38 kinase pathway that is negatively regulated by Smad6. *J. Biol. Chem.*, **275**, 17647-17652.
- Kingsley, D.M. (1994) : The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.*, **8**, 133-146.
- Kraus, P., Fraidenaich, D. und Loomis, C.A. (2001) : Some distal limb structures develop in mice lacking Sonic hedgehog signaling. *Mech. Dev.*, **100**, 45-58.
- Krauss, S., Concordet, J.P. und Ingham, P.W. (1993) : A functionally conserved homolog of the *Drosophila*
-

-
- segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell*, **75**, 1431-1444.
- Krüger, M., Mennerich, D., Fees, S., Schäfer, R., Mundlos, S. und Braun, T. (2001) : Sonic hedgehog is a survival factor for hypaxial muscles during mouse development. *Development*, **128**, 743-752.
- Krumlauf, R. (1994) : *Hox* genes in vertebrate development. *Cell*, **78**, 191-201.
- Krupnik, V.E., Sharp, J.D., Jiang, C., Robison, K., Chickering, T.W., Amaravadi, L., Brown, D.E., Guyot, D., Mays, G., Leiby, K., Chang, B., Duong, T., Goodearl, A.D., Gearing, D.P., Sokol, S.Y. und McCarthy, S.A. (1999) : Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene*, **238**, 301-313.
- Kuhlman, J. und Niswander, L. (1997) : Limb deformity proteins : role in mesodermal induction of the apical ectodermal ridge. *Development*, **124**, 133-139.
- Kühl, M., Geis, K., Sheldahl, L.C., Pukrop, T., Moon, R.T. und Wedlich, D. (2001) : Antagonistic regulation of convergent extension movements in *Xenopus* by Wnt/ β -catenin and Wnt/ Ca^{2+} signaling. *Mech. Dev.*, **106**, 61-76.
- Kühl, M., Sheldahl, L.C., Malbon, C.C. und Moon, R.T. (2000a) : Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J. Biol. Chem.*, **275**, 12701-12711.
- Kühl, M., Sheldahl, L.C., Park, M., Miller, J.R. und Moon, R.T. (2000b) : The Wnt/ Ca^{2+} pathway – a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet.*, **16**, 279-283.
- Kühn, R., Rajewsky, K. und Müller, W. (1991) : Generation and analysis of Interleukin-4 deficient mice. *Science*, **254**, 707-710.
- Labbe, E., Letamendia, A. und Attisano, L. (2000) : Association of smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor-beta and wnt pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8358-8363.
- Lamph, W.W., Wamsley, P., Sassone-Corsi, P. und Verma, I.M. (1988) : Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. *Nature*, **334**, 629-631.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K. et al. (2001) : Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**, 860 – 921.
erratum : *Nature*, **411**, 720.
correction : *Nature* **412**, 565 – 566.
- Laufer, E., Dahn, R., Orozco, O.E., Yeo, C.Y., Pisenti, J., Henrique, D., Abbott, U.K., Fallon, J.F. und Tabin, C.J. (1997) : Expression of *Radical fringe* in limb-bud ectoderm regulates apical ectodermal ridge formation. *Nature*, **386**, 366-373.
- Laufer, E., Nelson, C.E., Johnson, R.L., Morgan, B.A. und Tabin, C.J. (1994) : *Sonic hedgehog* and *Fgf-4* act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell*, **79**, 993-1003.
- Lee, J.J., Ekker, S.C., von Kessler, D.P., Porter, J.A., Sun, B.I. und Beachy, P.A. (1994) : Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science*, **266**, 1528-1537.
- Leppa, S. und Bohmann, D. (1999) : Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis. *Oncogene*, **18**, 6158-6162.
- Lettice, L., Hecksher-Sorensen, J. und Hill, R.E. (1999) : The *dominant hemimelia* mutation uncouples epithelial-mesenchymal interactions and disrupts anterior mesenchyme formation in mouse hindlimbs. *Development*, **126**, 4729-4736.
-

-
- Lewandowski, M., Sun, X. und Martin, G.R. (2000) : Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nat. Genet.*, **26**, 460-463.
- Lewis, J.H. (1975) : Fate maps and the pattern of cell division: a calculation for the chick wing-bud. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **33**, 419-434.
- Lewis, P.M., Dunn, M.P., McMahon, J.A., Logan, M., Martin, J.F., St-Jaques, B. und McMahon, A.P. (2001) : Cholesterol modification of Sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell*, **105**, 599-612.
- Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S.H., Piccolo, S. und DeRobertis, E.M. (1997) : Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell*, **88**, 747-756.
- Li., L., Yuan, H., Xie, W., Mao, J., Caruso, A.M., McMahon, A.P., Sussman, D.J. und Wu, D. (1999) : Dishevelled proteins lead to two signalling pathways. Regulation of LEF-1 and c-jun N-terminal kinase in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, **274**, 129-134.
- Liberati, N.T., Datto, M.B., Frederick, J.P., Shen, X., Wong, C., Rougier-Chapman, E.M. und Wang, X.F. (1999): Smads bind directly to the Jun family of AP-1 transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4844-4849.
- Lickert, H., Domon, C., Huls, G., Wehrle, C., Duluc, I., Clevers, H., Meyer, B.I., Freund, J.N. und Kemler, R. (2000) : Wnt/ β -catenin signaling regulates the expression of the homeobox gene *Cdx1* in embryonic intestine. *Development*, **127**, 3805-3813.
- Lipton, B.H. und Jacobson, A.G. (1974) : Experimental analysis of the mechanisms of somite morphogenesis. *Dev. Biol.*, **38**, 91-103.
- Liu, J., Stevens, J., Rote, C.A., Yost, H.J., Hu, Y., Neufeld, K.L., White, R.L. und Matsunami, N. (2001) : Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Mol. Cell*, **5**, 927-936.
- Logan, C., Hornbruch, A., Campbell, I. und Lumsden, A. (1997) : The role of *Engrailed* in establishing the dorsoventral axis of the chick limb. *Development*, **124**, 2317-2324.
- Loomis, C.A., Harris, E., Michaud, J., Wurst, W., Hanks, M. und Joyner, A.L. (1996) : The mouse *Engrailed-1* gene and ventral limb patterning. *Nature*, **382**, 360-363.
- Loomis, C.A., Kimmel, R.A., Tong, C.X., Michaud, J. und Joyner, A.L. (1998) : Analysis of the genetic pathway leading to formation of ectopic apical ectodermal ridges in mouse *Engrailed-1* mutant limbs. *Development*, **125**, 1137-1148.
- Lopez-Martinez, A., Chang, D.T., Chiang, C., Porter, J.A., Ros, M.A., Simandl, B.K., Beachy, P.A. und Fallon, J.F. (1995) : Limb-patterning activity and restricted posterior localization of the amino-terminal product of Sonic hedgehog cleavage. *Curr. Biol.*, **5**, 791-796.
- Lu, H.C., Revelli, J.P., Goering, L., Thaller, C. und Eichele, G. (1997) : Retinoid signaling is required for the establishment of a ZPA and for the expression of *HoxB-8*, a mediator of ZPA formation. *Development*, **124**, 1643-1651.
- Luo, G., Hofmann, C., Bronckers, A.L., Sohocki, M., Bradley, A. und Karsenty, G. (1995) : BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev.*, **9**, 2808-2820.
- MacCabe, J.A., Errick, J. und Saunders, J.W., Jr. (1974) : Ectodermal control of the dorsoventral axis in the leg bud of the chick embryo. *Dev. Biol.*, **39**, 69-82.
- Macias, D., Ganan, Y., Rodriguez-Leon, J., Merino, R. und Hurler, J.M. (1999) : Regulation by members of the transforming growth factor beta superfamily of the digital and interdigital fates of the autopodial limb mesoderm. *Cell Tissue Res.*, **296**, 95-102.
-

-
- Macias, D., Ganan, Y., Sampath, T.K., Peidra, M.E., Ros, M.A. und Hurlle, J.M. (1997) : Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development*, **124**, 1109-1117.
- Mao, B., Wu, W., Li, Y., Hoppe, D., Stannek, P., Glinka, A. und Niehrs, C. (2001) : LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature*, **411**, 321-325.
- Mao, J., Wang, J., Liu, B., Pan, W., Farr, G.H., III., Flynn, C., Yuan, H., Takada, S., Kimelman, D., Li, L. und Wu, D. (2001) : Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol. Cell*, **7**, 801-809.
- Marazzi, G., Wang, Y. und Sassoon, D. (1997) : Msx2 is a transcriptional regulator in the BMP4-mediated programmed cell death pathway. *Dev. Biol.*, **186**, 127-138.
- Marigo, V., Davey, R.A., Zuo, Y., Cunningham, J.M. und Tabin, C.J. (1996a) : Biochemical evidence that patched is the hedgehog receptor. *Nature*, **384**, 176-179.
- Marigo, V., Johnson, R.L., Vortkamp, A. und Tabin, C.J. (1996b) : Sonic hedgehog differentially regulates expression of *GLI* and *GLI3* during limb development. *Dev. Biol.*, **180**, 273-283.
- Marti, E., Takada, R., Bumcrot, D.A., Sasaki, H. und McMahon, A.P. (1995) : Distribution of Sonic hedgehog peptides in the developing chick and mouse embryo. *Development*, **121**, 2537-2547.
- Martin, G.R. (1995) : Why thumbs are up. *Nature*, **374**, 410-411.
- Martin, G.R. (1998) : The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes Dev.*, **12**, 1571-1586.
- Mason, I.J. (1994) : The ins and outs of fibroblast growth factors. *Cell*, **78**, 547-552.
- Massagué, J. (1998) : TGF- β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 753-791.
- Massagué, J. und Chen, Y.G. (2000) : Controlling TGF- β signaling. *Genes Dev.*, **14**, 627-644.
- Massagué, J. und Wotton, D. (2000) : Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *EMBO J.*, **19**, 1745-1759.
- Massagué, J., Blain, S.W. und Lo, R.S. (2000) : TGF β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*, **103**, 295-309.
- Masuya, H., Sagai, T., Moriwaki, K. und Shiroishi, T. (1997) : Multigenic control of the localization of the zone of polarizing activity in limb morphogenesis in the mouse. *Dev. Biol.*, **182**, 42-51.
- Masuya, H., Sagai, T., Wakana, S., Moriwaki, K. und Shiroishi, T. (1995) : A duplicated zone of polarizing activity in polydactylous mouse mutants. *Genes Dev.*, **9**, 1645-1653.
- Matsuzawa, S.I. und Reed, J.C. (2001) : Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol. Cell*, **5**, 915-926.
- McGinnis, W. und Krumlauf, R. (1992) : Homeobox genes and axial patterning. *Cell*, **68**, 283-302.
- McMahon, A.P. (2000) : More surprises in the Hedgehog signaling pathway. *Cell*, **100**, 185-188.
- Meier, S. (1979) : Development of the chick mesoblast: formation of the embryonic axis and the establishment of the metamer pattern. *Dev. Biol.*, **73**, 25-45.
- Meinhardt, H. (1983a) : Cell determination boundaries as organizing regions for secondary embryonic fields. *Dev. Biol.*, **96**, 375-385.
- Meinhardt, H. (1983b) : A bootstrap model for the proximodistal pattern formation in vertebrate limbs. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **76**, 139-146.
- Mercader, N., Leonardo, E., Azpiazu, N., Serrano, A., Morata, G., Martinez, A.C. und Torres, M. (1999) : Conserved regulation of proximodistal limb axis development by Meis1/Hth. *Nature*, **402**, 425-429.
- Merino, R., Ganan, Y., Macias, D., Economides, A.N., Sampath, K.T. und Hurlle, J.M. (1998) : Morphogenesis of digits in the avian limb is controlled by FGFs, TGF β s, and Noggin through BMP signaling. *Dev.*
-

- Biol.*, **200**, 35-45.
- Merino, R., Rodriguez-Leon, J., Macias, D., Ganan, Y., Economides, A.N. und Hurle, J.M. (1999) : The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development*, **126**, 5515-5522.
- Milaire, J. und Goffard, J.C. (1995) : Histological analysis of limb defects induced in developing limb buds of NMRI mouse embryos after oral administration of 3-3-dimethyl-1-phenyltriazene (DMPT) to their mother on day 10 of gestation. *Eur. J. Morphol.*, **33**, 491-508.
- Miller, J.R., Hocking, A.M., Brown, J.D. und Moon, R.T. (1999) : Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/ β -catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene*, **18**, 7860-7872.
- Min, H., Danilenko, D.M., Scully, S.A., Bolon, B., Ring, B.D., Tarpley, J.E., DeRose, M. und Simonet, W.S. (1998) : *Fgf-10* is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to *Drosophila branchless*. *Genes Dev.*, **12**, 3156-3161.
- Monaghan, A.P., Kioschis, P., Wu, W., Zuniga, A., Bock, D., Poustka, A., Delius, H. und Niehrs, C. (1999) : *Dickkopf* genes are co-ordinately expressed in mesodermal lineages. *Mech. Dev.*, **87**, 45-56.
- Moon, A.M. und Capecchi, M.R. (2000) : *Fgf8* is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nat. Genet.*, **26**, 455-459.
- Moon, A.M., Boulet, A.M. und Capecchi, M.R. (2000) : Normal limb development in conditional mutants of *Fgf4*. *Development*, **127**, 989-996.
- Moon, R.T., Campbell, R.M., Christian, J.L., McGrew, L.L., Shih, J. und Fraser, S. (1993) : Xwnt-5A: a maternal Wnt that affects morphogenetic movements after overexpression in embryos of *Xenopus laevis*. *Development*, **119**, 97-111.
- Montero, J.A., Ganan, Y., Macias, D., Rodriguez-Leon, J., Sanz-Ezquerro, J.J., Merino, R., Chimal-Monroy, J., Nieto, M.A. und Hurle, J.M. (2001) : Role of FGFs in the control of programmed cell death during limb development. *Development*, **128**, 2075-2084.
- Morgan, B.A. und Fekete, D.M. (1996) : Manipulating gene expression with replication-competent retroviruses. In : *Methods in Cell Biology*, **51**, 185-218. *Academic Press*.
- Mori, C., Nakamura, N., Kimura, S., Irie, H., Takigawa, T. und Shiota, K. (1995) : Programmed cell death in the interdigital tissue of the fetal mouse limb is apoptosis with DNA fragmentation. *Anat. Rec.*, **242**, 103-110.
- Morin, P.J. (1999) : beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays*, **21**, 1021-1030.
- Mukhopadhyay, M., Shtrom, S., Rodriguez-Esteban, C., Chen, L., Tsukui, T., Gomer, L., Dorward, D.W., Glinka, A., Grinberg, A., Huang, S.P., Niehrs, C., Izpisua Belmonte, J.C. und Westphal, H. (2001) : *Dickkopf1* is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Develop. Cell*, **1**, 423-434.
- Nakamura, N., Fujioka, M. und Mori, C. (2000) : Alteration of programmed cell death and gene expression by 5-Bromodeoxyuridine during limb development in mice. *Toxic. Appl. Pharmacol.*, **167**, 100-106.
- Neo, S.Y., Zhang, Y., Yaw, L.P., Li, P. und Lin, S.C. (2000) : Axin-induced apoptosis depends on the extent of its JNK activation and its ability to down-regulate beta-catenin levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **272**, 144-150.
- Ngo-Muller, V. und Muneoka, K. (2000) : Influence of FGF4 on digit morphogenesis during limb development in the mouse. *Dev. Biol.*, **219**, 224-236.
- Nishita, M., Hashimoto, M.K., Ogata, S., Laurent, M.N., Ueno, N., Shibuya, H. und Cho, K.W. (2000) : Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature*, **403**, 781-785.

-
- Niswander, L., Jeffrey, S., Martin, G.R. und Tickle, C. (1994a) : A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb. *Nature*, **371**, 609-612.
- Niswander, L., Tickle, C., Vogel, A., Booth, I und Martin, G.R. (1993) : FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell*, **75**, 579-587.
- Niswander, L., Tickle, C., Vogel, A., Martin, G. (1994b) : Function of FGF-4 in limb development. *Mol. Reprod. Dev.*, **39**, 83-88.
- Noramly, S., Pisenti, J., Abbott, U.K. und Morgan, B. (1996) : Gene expression in the *limbless* mutant: polarized gene expression in the absence of Shh and an AER. *Dev. Biol.*, **179**, 339-346.
- Nusse, R. (2001) : Making head or tail of Dickkopf. *Nature*, **411**, 255-256.
- Nüsslein-Volhard, C. und Wieschaus, E. (1980) : Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, **287**, 795-801.
- Ohuchi, H., Nakagawa, T., Yamamoto, A., Araga, A., Ohata, T., Ishimaru, Y., Yoshioka, H., Kuwana, T., Nohno, T., Yamasaki, M., Itoh, N. und Noji, S. (1997a) : The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development*, **124**, 2235-2244.
- Ohuchi, H., Nakagawa, T., Yamauchi, M., Ohata, T., Yoshioka, H., Kuwana, T., Mima, T., Mikawa, T., Nohno, T. und Noji, S. (1995) : An additional limb can be induced from the flank of the chick embryo by FGF4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **209**, 809-816.
- Ohuchi, H., Shibusawa, M., Nakagawa, T., Ohata, T., Yoshioka, H., Hirai, Y., Nohno, T., Noji, S. und Kondo, N. (1997b) : A chick *wingless* mutation causes abnormality in maintenance of *Fgf8* expression in the wing apical ridge, resulting in loss of the dorsoventral boundary. *Mech. Dev.*, **62**, 3-13.
- Okamoto, K. und Prives, C. (1999) : A role of cyclin G in the process of apoptosis. *Oncogene*, **18**, 4606-4615.
- Onichtchouk, D., Chen, Y.G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massagué, J. und Niehrs, C. (1999) : Silencing of TGF- β signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature*, **401**, 480-485.
- Ornitz, D.M. und Itoh, N. (2001) : Fibroblast growth factors. *Genome Biol.*, **2**, Reviews 3005.
- Oster, G.F., Shubin, N., Murray, J.D. und Alberch, P. (1988) : Evolution and morphogenetic rules: the shape of the vertebrate limb in ontogeny and phylogeny. *Evolution*, **42**, 862-884.
- Packard, D.S., Jr. und Meier, S. (1983) : An experimental study of somitomic organization of the avian vegetal plate. *Dev. Biol.*, **97**, 191-202.
- Pagan, S.M., Ros, M.A., Tabin, C.J. und Fallon, J.F. (1996) : Surgical removal of limb bud Sonic hedgehog results in posterior skeletal defects. *Dev. Biol.*, **180**, 35-40.
- Parr, B.A. und McMahon, A.P. (1995) : Dorsalizing signal *Wnt-7a* required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature*, **374**, 350-353.
- Parr, B.A., Shea, M.J., Vassileva, G. und McMahon, A.P. (1993) : Mouse *Wnt* genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and limb buds. *Development*, **119**, 247-261.
- Patel, K., Nittenberg, R., D'souza, D., Irving, C. Burt, D., Wilkinson, D.G. und Tickle, C. (1996) : Expression and regulation of *Cek-8*, a cell to cell signalling receptor in developing chick limb buds. *Development*, **122**, 1147-1155.
- Pautou, M.P. (1977) : Etablissement de l'axe dorso-ventral dans le pied de l'embryon de poulet. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **42**, 177-194.
- Pepicelli, C.V., Lewis, P.M. und McMahon, A.P. (1998) : Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Curr. Biol.*, **8**, 1083-1086.
- Pepinsky, R.B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D.P., Williams, K.P., Bixler, S.A., Ambrose, C.S., Garber, E.A., Miatkowski, K. et al. (1998) : Identification of a palmitic acid-modified form of human
-

-
- Sonic hedgehog. *J. Biol. Chem.*, **273**, 14037-14045.
- Perrimon, N. (1995) : Hedgehog and beyond. *Cell*, **80**, 517-520.
- Pessah, M., Prunier, C., Marais, J., Ferrand, N., Mazars, A., Lallemand, F., Gauthier, J.M. und Atfi, A. (2001) : c-Jun interacts with the corepressor TG-interacting factor (TGIF) to suppress Smad2 transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, 6198-6203.
- Peters, H., Neubüser, A., Kratochwil, K. und Balling, R. (1998) : Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev.*, **12**, 2735-2747.
- Peters, T., Ausmeier, K. und Rütter, U. (1999) : Cloning of *Fatso (Fto)*, a novel gene deleted by the *Fused toes (Ft)* mouse mutation. *Mamm. Genome*, **10**, 983-986.
- Peters, T., Dildrop, R., Ausmeier, K. und Rütter, U. (2000) : Organization of mouse *Iroquois* homeobox genes in two clusters suggests a conserved regulation and function in vertebrate development. *Genome Res.*, **10**, 1453-1462.
- Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B. und DeRobertis, E.M. (1996) : Dorsoventral patterning in *Xenopus* : Inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell*, **86**, 589-598.
- Pinson, K.I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B.J. und Skarnes, W.C. (2000) : An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature*, **407**, 535-538.
- Pizette, S. und Niswander, L. (1999) : BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge. *Development*, **126**, 883-894.
- Pizette, S. und Niswander, L. (2000) : BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes. *Dev. Biol.*, **219**, 237-249.
- Polakis, P. (2000) : Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.*, **14**, 1837-1851.
- Porter, J.A., von Kessler, D.P., Ekker, S.C., Young, K.E., Chen, C.H., Ma, Y., Woods, A.S., Cotter, R.J., Koonin, E.V. und Beachy, P.A. (1995) : The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. *Nature*, **374**, 363-366.
- Porter, J.A., Ekker, S.C., Park, W.J., von Kessler, D.P., Young, K.E., Chen, C.H., Ma, Y., Woods, A.S., Cotter, R.J., Koonin, E.V. und Beachy, P.A. (1996a) : Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell*, **86**, 21-34.
- Porter, J.A., Young, K.E. und Beachy, P.A. (1996b) : Cholesterol modification of Hedgehog signaling proteins in animal development. *Science*, **274**, 255-259.
- Pulverer, B.J., Kyriakis, J.M., Avruch, J., Nikolakaki, E. und Woodgett, J.R. (1991) : Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature*, **353**, 670-674.
- Qu, S., Niswander, K.D., van der Meer, R., Keeney, D., Magnuson, M.A. und Wisdom, R. (1997) : Polydactyly and ectopic ZPA formation in *Alx-4* mutant mice. *Development*, **124**, 3999-4008.
- Rattner, A., Hsieh, J.C., Smallwood, P.M., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. und Nathans, J. (1997) : A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**, 2859-2863.
- Ray, R.P. und Wharton, K.A. (2001) : Twisted perspective. New insights into extracellular modulation of BMP signaling during development. *Cell*, **104**, 801-804.
- Rich, T., Allen, R.L. und Wyllie, A.H. (2000) : Defying death after DNA damage. *Nature*, **407**, 777-783.
- Richter-Landsberg, C. und Vollgraf, U. (1998) : Mode of cell injury and death after hydrogen peroxide exposure in cultured oligodendroglia cells. *Exp. Cell. Res.*, **244**, 218-229.
- Riddle, R.D., Ensini, M., Nelson, C., Tsuchida, T., Jessel, T.M. und Tabin, C.J. (1995) : Induction of the LIM homeobox gene *Lmx1* by *Wnt7a* establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell*, **83**, 631-640.
-

-
- Riddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E. und Tabin, C.J. (1993) : Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*, **75**, 1401-1416.
- Rocha, S., Soengas, M.S., Lowe, S.W., Glanzmann, C., Fabbro, D., Winterhalter, K., Bodis, S. und Pruschy, M. (2000) : Protein kinase C inhibitor and irradiation-induced apoptosis : relevance of the cytochrome c-mediated caspase-9 death pathway. *Cell Growth Differ.*, **11**, 491-499.
- Rodriguez-Esteban, C., Schwabe, J.W.R., De La Pena, J., Foys, B., Eshelman, B. und Izpisua Belmonte, J.C. (1997) : *Radical fringe* positions the apical ectodermal ridge at the dorsoventral boundary of the vertebrate limb. *Nature*, **386**, 360-366.
- Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Korzh, V., Norlin, S., Ruiz i Altaba, A., Tanabe, Y., Placzek, M., Edlund, T., Jessel, T.M. et al. (1994) : Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell*, **76**, 761-775.
- Ros, M.A., Lopez-Martinez, A., Simandl, B.K., Rodriguez-Esteban, C., Izpisua Belmonte, J.C., Dahn, R. und Fallon, J.F. (1996) : The limb field mesoderm determines initial limb bud anterior-posterior asymmetry and budding independent of *Sonic hedgehog* or apical ectodermal gene expressions. *Development*, **122**, 2319-2330.
- Rosenblatt, L., Kreutziger, G. und Taylor, L. (1959) : Eudiplopodia. *Poultry Sci.*, **38**, 1242.
- Rowe, D.A. und Fallon, J.F. (1982) : The proximodistal determination of skeletal parts in the developing chick leg. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **68**, 1-7.
- Rudnicki, J.A. und Brown, A.M.C. (1997) : Inhibition of chondrogenesis by *Wnt* gene expression *in vivo* and *in vitro*. *Dev. Biol.*, **185**, 104-118.
- Ruiz i Altaba, A. (1998) : Combinatorial *Gli* gene function in floor plate and neuronal inductions by Sonic hedgehog. *Development*, **125**, 2203-2212.
- Ryder, K. und Nathans, D. (1988) : Induction of protooncogene *c-jun* by serum growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 8464-8467.
- Sano, Y., Harada, J., Tahiro, S., Gotoh-Mandeville, R., Maekawa, T. und Ishii, S. (1999) : ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-beta signaling. *J. Biol. Chem.*, **274**, 8949-8957.
- Sanz, C., León, Y., Cañon, S., Alvarez, L., Giraldez, F. und Varela-Nieto, I. (1999) : Pattern of expression of the Jun family of transcription factors during the early development of the inner ear : implications in apoptosis. *J. Cell Sci.*, **112**, 3967-3974.
- Sanz-Ezquerro, J.J. und Tickle, C. (2000) : Autoregulation of *Shh* expression and Shh induction of cell death suggest a mechanism for modulating polarising activity during chick limb development. *Development*, **127**, 4811-4823.
- Saunders, J.W., Jr. (1948) : The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *J. Exp. Zool.*, **108**, 363-403.
- Saunders, J.W., Jr. und Fallon, J.F. (1966) : Cell death in morphogenesis. In : *Major problems in developmental biology*, M. Locke, Hrsg. (New York : Academic Press), 289-314.
- Saunders, J.W., Jr. und Gasseling, M.T. (1968) : Ectoderm-mesenchymal interactions in the origins of wing symmetry. In : *Epithelial-mesenchymal interactions*, R. Fleischmajer und R.E. Billingham, Hrsg. (Baltimore : Williams und Wilkins), 78-97.
- Savage, M.P., Hart, C.E., Riley, B.B., Sasse, J., Olwin, B.B. und Fallon, J.F. (1993) : Distribution of FGF-2 suggests it has a role in chick limb bud outgrowth. *Dev. Dyn.*, **198**, 159-170.
- Schwabe, J.W.R., Rodriguez-Esteban, C. und Izpisua Belmonte, J.C. (1998) : Limbs are moving: where are they going ? *Trends Genet.*, **14**, 229-235.
-

-
- Schweitzer, R. und Shilo, B.-Z. (1997) : A thousand and one roles for the *Drosophila* EGF receptors. *Trends Genet.*, **13**, 191-196.
- Searls, R.L. und Janners, M.Y. (1971) : The initiation of limb bud outgrowth in the embryonic chick. *Dev. Biol.*, **24**, 198-213.
- Sekine, K., Ohuchi, H., Fujiwara, M., Yamasaki, M., Yoshizawa, T., Sato, T., Yagishita, N., Matsui, D., Koga, Y., Itoh, N. und Kato, S. (1999) : *Fgf10* is essential for limb and lung formation. *Nat. Genet.*, **21**, 138-141.
- Selvakumaran, M., Lin, H.K., Miyashita, T., Wang, H.G., Krajewski, S, Reed, J.C., Hoffman, B. und Liebermann, D. (1994) : Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene*, **6**, 1791-1798.
- Semenov, M.V., Tamai, K., Brott, B., Kühl, M., Sokol, S. und He, X. (2001) : Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr. Biol.*, **11**, 951-961.
- Shaulian, E., Schreiber, M., Piu, F., Beeche, M., Wagner, E.F. und Karin, M. (2000) : The mammalian UV response : c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell*, **103**, 897-907.
- Sheldahl, L.C., Park, M., Malbon, C.C. und Moon, R.T. (1999) : Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr. Biol.*, **9**, 695-698.
- Shi, Y., Wang, Y.F., Jayaraman, L., Yang, H., Massague, J. und Pavletich, N.P. (1998) : Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell*, **94**, 585-594.
- Shibuya, H., Iwata, H., Masuyama, N., Gotoh, Y., Yamaguchi, K., Irie, K., Matsumoto, K., Nishida, E. und Ueno, N. (1998) : Role of TAK1 and TAB1 in BMP signaling in early *Xenopus* development. *EMBO J.*, **17**, 1019-1028.
- Shimizu, H., Julius, M.A., Giarre, M., Zheng, Z., Brown, A.M. und Kitajewski, J. (1997) : Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin. *Cell Growth Differ.*, **8**, 1349-1358.
- Shinya, M., Eschbach, C., Clark, M., Lehrach, H. und Furutani-Seiki, M. (2000) : Zebrafish Dkk1, induced by the pre-MBT Wnt signaling, is secreted from the prechordal plate and patterns the anterior neural plate. *Mech. Dev.*, **98**, 3-17.
- Shubin, N.H. und Alberch, P. (1986) : A morphogenetic approach to the origin and basic organization of the tetrapod limb. *Evolutionary Biol.*, **20**, 319-387.
- Slusarski, D.C., Corces, V.G. und Moon, R.T. (1997b) : Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature*, **390**, 410-413.
- Slusarski, D.C., Yang-Snyder, J., Busa, W.B. und Moon, R.T. (1997a) : Modulation of embryonic intracellular Ca²⁺ signaling by Wnt-5A. *Dev. Biol.*, **182**, 114-120.
- Smalley, M.J. und Dale, T.C. (1999) : Wnt signalling in mammalian development and cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, **18**, 215-230.
- Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D.A., Birrer, M. und Karin, M. (1991) : Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature*, **354**, 494-496.
- Smith, W.C. (1999) : TGFβ inhibitors – new and unexpected requirements in vertebrate development. *Trends Genet.*, **15**, 3-5.
- Solloway, M.J., Dudley, A.T., Bikoff, E.K., Lyons, K.M., Hogan, B.L.M. und Robertson, E.J. (1998) : Mice lacking Bmp6 function. *Dev. Genet.*, **22**, 321-339.
- Srivastava, D. (1999) : HAND proteins: molecular mediators of cardiac development and congenital heart disease. *Trends Cardiovasc. Med.*, **9**, 11-18.
- Stern, C.D. (1994) : The avian embryo: a powerful model system for studying neural induction. *FASEB J.*, **8**, 687-691.
-

- Stone, D.M., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T.A., Gu, Q., Johnson, R.L., Scott, M.P., Pennica, D., Goddard, A., Phillips, H. et al. (1996) : The tumor-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature*, **384**, 129-134.
- Storm, E.E., Huynh, T.V., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kingsley, D.M. und Lee, S.J. (1994) : Limb alterations in *brachypodism* mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily. *Nature*, **368**, 639-643.
- Stratford, T., Horton, C. und Maden, M. (1996) : Retinoic acid is required for the initiation of outgrowth in the chick limb bud. *Curr. Biol.*, **6**, 1124-1133.
- Strigini, M. und Cohen, S.M. (1999) : Formation of morphogen gradients in the *Drosophila* wing. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, **10**, 335-344.
- Summerbell, D. (1974) : A quantitative analysis of the effect of excision of the AER from the chick limb-bud. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **32**, 651-660.
- Summerbell, D. und Lewis, J.H. (1975) : Time, place and positional value in the chick limb-bud. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **33**, 621-643.
- Summerbell, D., Lewis, J.H. und Wolpert, L. (1973) : Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature*, **244**, 492-496.
- Sun, X., Lewandowski, M., Meyers, E.N., Liu, Y.H., Maxson, R.E., Jr. und Martin, G.R. (2000) : Conditional inactivation of *Fgf4* reveals complexity of signalling during limb bud development. *Nat. Genet.*, **25**, 83-86.
- Tabin, C.J. (1998) : A developmental model for thalidomide defects. *Nature*, **396**, 322-323.
- Tada, M. und Smith, J.C. (2000) : Xwnt-11 is a target of *Xenopus* Brachyury: regulation of gastrulation movements via dishevelled, but not through the canonical Wnt pathway. *Development*, **127**, 2227-2238.
- Takada, S., Stark, K.L., Shea, M.J., McMahon, J.A. und McMahon, A.P. (1994) : Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo. *Genes Dev.*, **8**, 174-189.
- Takatsu, Y., Nakamura, M., Stapleton, M., Danos, M.C., Matsumoto, K., O'Connor, M.B., Shibuya, H. und Ueno, N. (2000) : TAK1 participates in c-jun N-terminal kinase signaling during *Drosophila* development. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 3015-3026.
- Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J.P. und He, X. (2000) : LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*, **407**, 530-535.
- Tanaka, M., Cohn, M.J., Ashby, P., Davey, M., Martin, P. und Tickle, C. (2000) : Distribution of polarizing activity and potential for limb formation in mouse and chick embryos and possible relationships to polydactyly. *Development*, **127**, 4011-4021.
- Tanaka, M., Tamura, K., Noji, S., Nohno, T. und Ide, H. (1997) : Induction of additional limb at the dorso-ventral boundary of a chick embryo. *Dev. Biol.*, **182**, 191-203.
- Thomas, T., Kurihara, H., Yamagishi, H., Kurihara, Y., Yazaki, Y., Olson, E.N. und Srivastava, D. (1998) : A signaling cascade involving endothelin-1, dHAND and Msx1 regulates development of neural-crest-derived arch mesenchyme. *Development*, **125**, 3005-3014.
- Tickle, C. (1995) : Vertebrate limb development. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **5**, 478-484.
- Tickle, C., Summerbell, D. und Wolpert, L. (1975) : Positional signaling and specification of digits in chick limb morphogenesis. *Nature*, **254**, 199-202.
- Todt, W.L. und Fallon, J.F. (1984) : Development of the apical ectodermal ridge in the chick wing bud. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **80**, 21-41.
- Torres, M.A., Yang-Snyder, J.A., Purcell, S.M., DeMarais, A.A., McGrew, L.L. und Moon, R.T. (1996) :

-
- Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J. Cell. Biol.*, **133**, 1123-1137.
- Treier, M., O'Connel, S., Gleiberman, A., Price, J., Szeto, D.P., Burgess, R., Chuang, P.T., McMahon, A.P. und Rosenfeld, M.G. (2001) : Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. *Development*, **128**, 377-386.
- van der Hoeven, F., Schimmang, T., Volkmann, A., Mattei, M.G., Kyewski, B. und Rütther, U. (1994) : Programmed cell death is affected in the novel mouse mutant *Fused toes (Ft)*. *Development*, **120**, 2601-2607.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O. et al. (2001) : The Sequence of the Human Genome. *Science*, **291**, 1304-1351.
- Vogel, A. und Tickle, C. (1993) : FGF-4 maintains polarizing activity of posterior limb bud cells *in vivo* and *in vitro*. *Development*, **119**, 199-206.
- Vogel, A., Rodriguez, C. und Izpisua Belmonte, J.C. (1996) : Involvement of FGF-8 in initiation, outgrowth and patterning of the vertebrate limb. *Development*, **122**, 1737-1750.
- Vogel, A., Rodriguez, C., Warnken, W. und Izpisua Belmonte, J.C. (1995) : Dorsal cell fate specified by chick *Lmx1* during vertebrate limb development. *Nature*, **378**, 716-720.
- Vogelstein, B., Lane, D. und Levine, A.J. (2000) : Surfing the p53 network. *Nature*, **408**, 307-310.
- Vogt, T.F. und Duboule, D. (1999) : Antagonists go out on a limb. *Cell*, **99**, 563-566.
- Volkmann, A., Döffinger, R., Rütther, U. und Kyewski, B.A. (1996) : Insertional mutagenesis affecting programmed cell death leads to thymic hyperplasia and altered thymopoiesis. *J. Immunol.*, **156**, 136-145.
- von Bubnoff, A. und Cho, K.W.Y. (2001) : Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network ? *Dev. Biol.*, **239**, 1-14.
- Vousden, K.H. (2000) : p53: Death star. *Cell*, **103**, 691-694.
- Wallace, V.A. (1999) : Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr. Biol.*, **9**, 445-448.
- Wallingford, J.B., Rowning, B.A., Vogeli, K.M., Rothbacher, U., Fraser, S.E. und Harland, R.M. (2000) : Dishevelled controls cell polarity during *Xenopus* gastrulation. *Nature*, **405**, 81-85.
- Wang, B., Fallon, J.F. und Beachy, P.A. (2001) : Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell*, **100**, 423-434.
- Wang, J., Shou, J. und Chen, X. (2000) : Dickkopf-1, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, is induced by p53. *Oncogene*, **19**, 1843-1848.
- Wang, S., Krinks, M., Lin, K., Luyten, F.P. und Moos, M., Jr. (1997) : Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. *Cell*, **88**, 757-766.
- Wang, W., Zhou, G., Hu, M.C.T., Yao, Z. und Tan, T.H. (1997) : Activation of the hematopoietic progenitor kinase-1 (HPK1)-dependent, stress-activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway by transforming growth factor β (TGF- β)-activated kinase (TAK1), a kinase mediator of TGF β signal transduction. *J. Biol. Chem.*, **272**, 22771-22775.
- Wechsler-Reya, R.J. und Scott, M.P. (1999) : Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron*, **22**, 103-114.
- Wehrli, M., Dougan, S.T., Caldwell, K., O'Keefe, L., Schwartz, S., Vaizel-Ohayon, D., Schejter, E., Tomlinson, A. und DiNardo, S. (2000) : *arrow* encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature*, **407**, 527-530.
- Wilhelm, D., van Dam, H., Herr, I., Baumann, B., Herrlich, P. und Angel, P. (1995) : Both ATF-2 and c-Jun are
-

-
- phosphorylated by stress-activated kinases in response to UV irradiation. *Immunobiology*, **193**, 143-148.
- Wilkinson, D.G., Bhatt, S., Ryseck, R.P. und Bravo, R. (1989) : Tissue-specific expression of c-jun and junB during organogenesis in the mouse. *Development*, **106**, 465-471.
- Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P.A. und Hogan, B.L.M. (1995) : Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev.*, **9**, 2105-2116.
- Wodarz, A. und Nusse, R. (1998) : Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **14**, 59-88.
- Wolpert, L. (1969) : Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J. Theor. Biol.*, **25**, 1-47.
- Wolpert, L. (1971) : Positional information and pattern formation. *Curr. Top. Dev. Biol.*, **6**, 183-224.
- Wolpert, L., Lewis, J. und Summerbell, D. (1975) : Morphogenesis of the vertebrate limb. *Ciba Found Symp.*, **0**, 95-130.
- Wong, C., Rougier-Chapman, E.M., Frederick, J.P., Datto, M.P., Liberati, N.T., Li, J.M. und Wang, X.F. (1999): Smad3-Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional activation of the c-Jun promoter by transforming growth factor-beta. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 1821-1830.
- Wong, G.T., Gavin, B.J. und McMahon, A.P. (1994) : Differential transformation of mammary epithelial cells by *Wnt* genes. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 6278-6286.
- Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitscock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M. und Wang, E.A. (1988) : Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, **242**, 1528-1534.
- Wu, J. und Cohen, S.M. (1999) : Proximodistal axis formation in the *Drosophila* leg : subdivision into proximal and distal domains by Homothorax and distal-less. *Development*, **126**, 109-117.
- Wu, W., Glinka, A., Delius, H. und Niehrs, C. (2000) : Mutual antagonism between dickkopf1 and dickkopf2 regulates Wnt/ β -catenin signalling. *Curr. Biol.*, **10**, 1611-1614.
- Xu, J., Liu, Z. und Ornitz, D.M. (2000) : Temporal and spatial gradients of *Fgf8* and *Fgf17* regulate proliferation and differentiation of midline cerebellar structures. *Development*, **127**, 1833-1843.
- Yamaguchi, T.P., Bradley, A., McMahon, A.P. und Jones, S. (1999) : A *Wnt5a* pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development*, **126**, 1211-1223.
- Yamamoto, M., Maehara, Y., Sakaguchi, Y., Kusumoto, T., Ichiyoshi, Y. und Sugimachi, K. (1996) : Transforming growth factor-beta 1 induces apoptosis in gastric cancer cells through a p53-independent pathway. *Cancer*, **77(8 Suppl)**, 1628-1633.
- Yang, Y., Drossopoulou, G., Chuang, P.T., Duprez, D., Marti, E., Bumcrot, D., Vargesson, N., Clarke, J., Niswander, L., McMahon, A.P. und Tickle, C. (1997) : Relationship between dose, distance and time in Sonic hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. *Development*, **125**, 4393-4404.
- Yang, Y., Guillot, P., Boyd, Y., Lyon, M.F. und McMahon, A.P. (1998) : Evidence that preaxial polydactyly in the *Doublefoot* mutant is due to ectopic Indian Hedgehog signaling. *Development*, **125**, 3123-3132.
- Yang-Snyder, J., Miller, J.R., Brown, J.D., Lai, C.J. und Moon, R.T. (1996) : A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway. *Curr. Biol.*, **6**, 1302-1306.
- Yokouchi, Y., Sakiyama, J.I., Kameda, T., Iba, H., Suzuki, A., Ueno, N. und Kuroiwa, A. (1996) : BMP-2/-4 mediate programmed cell death in chicken limb buds. *Development*, **122**, 3725-3734.
- Yonei, S., Tamura, K., Ohsugi, K und Ide, H. (1995) : MRC-5 cells induce the AER prior to the duplicated pattern formation in chick limb bud. *Dev. Biol.*, **170**, 542-552.
-

- Yuan, J. und Yankner, B.A. (2000) : Apoptosis in the nervous system. *Nature*, **407**, 802-809.
- Zakany, J. und Duboule, D. (1993) : Correlation of expression of Wnt-1 in developing limbs with abnormalities in growth and skeletal patterning. *Nature*, **362**, 546-549.
- Zakany, J. und Duboule, D. (1999) : *Hox* genes in digit development and evolution. *Cell Tissue Res.*, **296**, 19-25.
- Zakeri, Z., Quaglino, D. und Ahuja, H.S. (1994) : Apoptotic cell death in the mouse limb and its suppression in the *Hammertoe* mutant. *Dev. Biol.*, **165**, 294-297.
- Zeng, X., Goetz, J.A., Suber, L.M., Scott, W.J., Jr., Schreiner, C.M. und Robbins, D.J. (2001) : A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. *Nature*, **411**, 716-720.
- Zhang, D., Gaussin, V., Taffet, G.E., Belaguli, N.S., Yamada, M., Schwartz, R.J., Michael, L.H., Overbeek, P.A. und Schneider, M.D. (2000) : TAK1 is activated in the myocardium after pressure overload and is sufficient to provoke heart failure in transgenic mice. *Nat.Med.*, **5**, 556-563.
- Zhang, H. und Bradley, A. (1996) : Mice deficient for *Bmp2* are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development*, **122**, 2977-2986.
- Zhang, Y., Feng, X.H. und Derynck, R. (1998) : Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature*, **394**, 909-913.
- Zhang, Z., Yu, X., Zhang, Y., Geronimo, B., Lovlie, A., Fromm, S.H. und Chen, Y. (2000) : Targeted misexpression of constitutively active BMP receptor-IB causes bifurcation, duplication, and posterior transformation of digit in mouse limb. *Dev. Biol.*, **220**, 154-167.
- Zimmermann, L.B., De Jesus-Escobar, J.M. und Harland, R.M. (1996) : The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell*, **86**, 599-606.
- Zorn, A.M. (2001) : Wnt signalling: Antagonistic Dickkopfs. *Curr. Biol.*, **11**, R592-R595.
- Zou, H. und Niswander, L. (1996) : Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science*, **272**, 738-741.
- Zou, H., Choe, K.M., Lu, Y., Massague, J. und Niswander, L. (1997) : BMP signaling and vertebrate limb development. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **LXII**, 269-272.
- Zou, H., Wieser, R., Massague, J. und Niswander, L. (1997) : Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev.*, **11**, 2191-2203.
- Zuniga, A., Haramis, A.P.G., McMahon, A.P. und Zeller, R. (1999) : Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. *Nature*, **401**, 598-602.
- Zülch, A., Becker, M. und Gruss, P. (2001) : Expression pattern of *Irx1* and *Irx2* during mouse digit development. *Mech. Dev.*, **106**, 159-162.