

**Technische Universität München
Institut für Experimentelle Genetik
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit,
Neuherberg**



Regulation der Wirkung von Sonic Hedgehog durch Cholesterin

Daniela Laubner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. Jerzy Adamski
2. Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner
3. Hon.-Prof. Dr. Rudolf Balling,
Technische Universität Braunschweig

Die Dissertation wurde am 15.11.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 28.01.2002 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	9
Zusammenfassung	10
<i>Abstract</i>	11
Abkürzungsverzeichnis	12
1 Einleitung	15
1.1 Cholesterin	15
1.1.1 Cholesterin in der Embryonalentwicklung	16
1.1.2 Das Smith-Lemli-Opitz-Syndrom (SLOS)	18
1.1.3 CHILD-Syndrom	20
1.1.4 CDPX2	20
1.2 Sonic Hedgehog	22
1.3 Zielsetzung	28
2 Ergebnisse	29
2.1 Embryonale Expressionsstudie	29
2.1.1 Expression von Cholesterinbiosynthese-Genen	29
2.1.2 Expression von steroidogenen Enzymen	35
2.2 Phylogenetische Analyse von Steroidsignalwegen	38
2.2.1 Cytochrom P450-Familie	41
2.2.2 Hydroxysteroiddehydrogenase-Familie	45
2.2.3 Steroidrezeptor-Familie	50
2.2.4 Datierung einiger Duplikationsereignisse	52
2.3 Shh-Aktivitätsassay	56
2.3.1 Etablierung	56
2.3.2 Aktivierung mit rekombinant exprimiertem ShhN-Protein	58
2.3.3 Aktivierung und Reprimierung durch Co-Expression von ShhN und Ptch	60
2.4 Intrazelluläre Lokalisation von Patched und Sonic Hedgehog	62
2.4.1 Lokalisation von Ptch	62
2.4.2 Lokalisation von Ptch in Anwesenheit von Inhibitoren	64
2.4.3 Lokalisation von Shh	64
2.5 Interaktionsstudien	66
2.5.1 Homodimerisierung von Sonic Hedgehog	66

Inhaltsverzeichnis

2.5.2	Dimerisierungsrate von Sonic Hedgehog	67
2.5.3	Einfluss von Inhibitoren auf die Dimerisierung	68
2.5.4	Inhibitoren und die Bindung von Shh an Ptch	71
3	Diskussion	73
3.1	Cholesterinbiosynthese in der Embryonalentwicklung	73
3.1.1	Das ungewöhnliche Expressionsmuster	73
3.1.2	Variationen im Phänotyp der Mutanten	75
3.1.3	Mechanismus der Wirkung	76
3.2	Phylogenetische Analyse	79
3.2.1	Entstehung der Steroidsignale	82
3.2.2	Steroidhormone und die Entstehung der Wirbeltiere	84
3.3	Erkenntnisse aus dem Shh-Aktivitätsassay	84
3.4	Lokalisationsstudien	87
3.5	Interaktionsstudien	87
3.5.1	Die Homodimerisierung von ShhN	87
3.5.2	Die Interaktion von Shh mit Ptch	88
3.6	Wie passt alles zusammen? – Hypothesen	88
3.6.1	Das apoptotische Steroid könnte ein Oxysterol sein	90
3.6.2	Implikationen für die Signalübertragung	92
3.6.3	Wie wirkt Cyclopamin?	94
3.7	Ausblick	95
4	Material und Methoden	97
4.1	Molekularbiologische Methoden	97
4.1.1	Arbeiten mit Nukleinsäuren	97
4.1.2	Arbeiten mit Bakterien	99
4.2	Proteinchemie	100
4.2.1	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	100
4.2.2	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	101
4.2.3	Westernblotting	101
4.2.4	<i>Crosslinking</i>	101
4.2.5	Gelfiltration	101
4.2.6	Herstellung von Ptch-Liposomen	102
4.3	Arbeiten mit Säugetierzellen	102
4.3.1	Kultivierung	102
4.3.2	Transfektion von Säugetierzellen	103
4.3.3	Immunfärbung	103
4.3.4	Der Dual-Luciferase-Assay	103
4.4	Genexpressionsanalyse in Embryonen	104
4.4.1	<i>whole mount</i> mRNA- <i>in situ</i> Hybridisierung	104
4.4.2	Immunhistochemie auf Schnitten	105
4.5	Biophysikalische Methoden	106
4.5.1	Konfokalmikroskopie	106

4.5.2	Surface Plasmon Resonance (SPR)	106
4.6	Phylogenetische Analysen	107
4.6.1	Erstellung der Datensätze	107
4.6.2	<i>Alignment</i> der Sequenzen	108
4.6.3	Berechnung von Stammbäumen	108
4.7	Materialien	109
4.7.1	Verwendete Bakterienstämme	111
4.7.2	Verwendete Zelllinien	111
4.7.3	Enzyme und Antikörper	112
Literaturverzeichnis		113
Abbildungsverzeichnis		127
Tabellenverzeichnis		129
5	Anhang	131
5.1	Primer, Sonden und Konstrukte	131
5.2	Datensätze der phylogenetischen Analysen	134

Inhaltsverzeichnis

Für Mama †

Danksagung

Als erstes möchte ich ganz besonders meinem Betreuer Dr. PD Jerzy Adamski danken. Ohne seine großzügige Unterstützung und die wissenschaftliche Freiheit, die er mir ermöglichte, wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei meinen Arbeitskollegen Rebekka Mindnich, Thomas Ohnesorg, Florian Graedler, Ute Zeitz, Daniela Perovic, Dr. Gabi Möller, Dr. Antje Krazeisen, Dr. Andrea Völkl, Gabi Zieglmeier und Dr. Karl-Josef Gerber, die immer für wissenschaftliche und andere Diskussionen zu haben waren. Mein besonderer Dank gilt

- Zrinka Marjjanovic, die mich bei vielen Experimenten unterstützt hat und wesentlich zur Verbesserung meiner Englischkenntnisse beigetragen hat;
- Dr. Johannes Gloeckner, ohne dessen Hilfe ich oft am Computer verzweifelt wäre (und meine Arbeit kein Literaturverzeichnis hätte);
- Marion Schieweg, einer ausgezeichneten Technischen Assistentin, die mir sehr bei den *in situ*-Hybridisierungen geholfen hat.

Dr. Heidi Hahn möchte ich für die Bereitstellung der Ptch-k.o.-Zelllinie, ihre Diskussionsbereitschaft und ihr motivierendes Wesen danken.

Bei Dr. Gerhard Przemeck bedanke ich mich für seine freundliche Unterstützung am *in situ*-Roboter und beim Fotografieren der Embryonen. Dr. Hutzler danke ich für seine engagierte Hilfe am Konfokal-Mikroskop und Dr. Johannes Lengler für seine wertvollen Tipps zum Luciferase-Assay.

Ein Extra-Dankeschön gibt es für meine sehr kritischen Korrekturleser Dr. Rainer Breitling, Dr. Gabriele Möller und Dipl.-Inform. Thomas Höller, deren großes Engagement meine Arbeit entscheidend verbesserte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Manuela und Daniel Englberger, Elke Feistl und Gerhard Reißmüller, die mir in allen Lebenslagen mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Rainer Breitling für seine wertvolle Unterstützung in den letzten drei Jahren bedanken. Keiner versteht es so gut wie er, genau die Fragen zu stellen, die man nicht hören will. Ich wünsche allen, die etwas Besonderes erreichen wollen, einen Kollegen und Freund wie ihn.

Mein größter Dank gilt meiner ganzen Familie und Thomas für ihr Interesse an meiner Arbeit und die liebevolle Unterstützung, die besonders in den letzten Monaten so wichtig war.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Cholesterinbiosynthese für die Embryonalentwicklung und für den Sonic Hedgehog (Shh)-Signalweg untersucht. Es wurde gezeigt, dass die Gene zahlreicher Enzyme der Cholesterinbiosynthese einschließlich des *rate limiting*-Enzyms Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase (Hmgcr) während der Embryonalentwicklung in einem distinkten und einheitlichen Muster und entgegen allen Erwartungen nicht ubiquitär exprimiert werden. Die Cholesterinbiosynthese findet spezifisch in Neuralleistenderivaten sowie in Zielzellen des Shh-Signals statt und nicht in Organen, die im adulten Organismus Cholesterin synthetisieren (z. B. Leber, Darm). Es konnte eine starke Korrelation zwischen den identifizierten Geweben und solchen Geweben festgestellt werden, die in Cholesterinbiosynthese-Mutanten morphologisch beeinträchtigt sind.

Von den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse ausgehend wurde in einer umfassenden phylogenetischen Analyse ein mögliches morphogenetisches Potential von Cholesterinderivaten als Abkömmlingen des Retinsäurewegs untersucht. Das Resultat spricht für eine unabhängige Evolution von Retinsäure-, Steroid- und Oxysterol-Signalwegen, eine morphogenetische Kompetenz von Cholesterinderivaten liegt jedoch nahe.

Um herauszufinden, welche Rolle Cholesterin in den Shh-Zielzellen spielen könnte, wurde der Einfluß des Cholesterin-ähnlichen Shh-Inhibitors Cyclopamin sowie unphysiologischen Cholesterinvorläufern auf verschiedene Aspekte der Shh-Signaltransduktion untersucht: Die Substanzen hatten keinen Einfluss auf die intrazelluläre vesikuläre Verteilung von Patched, dem Rezeptor von Shh, und auch nicht auf die Bindung von Shh an Patched. Die möglichen Angriffspunkte von Cyclopamin auf den Shh-Signalweg wurden dadurch wesentlich eingeschränkt.

Außerdem wurde herausgefunden, dass ShhN ohne Cholesterinmodifikation homodimerisiert und dass diese Interaktion ebenfalls nicht von Cyclopamin oder Cholesterinvorläufern beeinflusst wird.

Für eine detaillierte Untersuchung des Einflusses von möglichen aktiven Cholesterinderivaten auf die Shh-Signaltransduktion wurde schließlich ein Shh-responsiver Luciferasereporter konstruiert und in verschiedenen Zelllinien charakterisiert. Es zeigte sich, dass in Bakterien exprimiertes und aufgereinigtes Shh-Protein (ohne seine native lipophile Modifikation) in keiner der getesteten Zelllinien den Signalweg aktiviert, wohingegen eine Co-Expression von Shh in den Reporterzellen eine starke Aktivierung des Signals bewirkte.

Abschließend wurde aus den erhaltenen Ergebnissen ein neues Modell entwickelt, das die Wirkung von Cholesterin auf den Shh-Signalweg beschreibt.

Abstract

This work investigates the role of cholesterol biosynthesis in embryonic development and the Sonic Hedgehog (Shh) signaling pathway. It was demonstrated that the genes of several cholesterologenic enzymes including the rate limiting enzyme hydroxymethylglutaryl-CoA reductase are expressed in a distinct and unique pattern. This was in striking contrast to the ubiquitous expression pattern expected for these genes. Fetal cholesterologenesis seems to take place in neural crest derivatives and in Shh target cells. Expression was neither found in organs mainly involved in adult cholesterol synthesis (liver and gut) nor was it restricted to strongly proliferating cells.

Based on these results a comprehensive phylogenetic analysis was performed to study a possible morphogenetic potential of cholesterol derivatives in analogy to retinoic acid signaling. The result suggests an independent evolution of retinoic acid, steroid, and oxysterol pathways.

To further characterize the role of cholesterol in Shh target cells the influence of cyclopamine and aberrant cholesterol precursors on several aspects of Shh signaling in the target cells was investigated: It was shown that the sterol-like compounds did neither affect the intracellular targeting of the Shh receptor Ptch nor the interaction of Shh with Ptch. The likely target site for cyclopamine action was thus considerably narrowed down.

It could be also shown that unmodified ShhN (without cholesterol moiety) is able to dimerize. This interaction is not influenced by cyclopamine nor by cholesterol precursors.

For further detailed investigations in cell culture a Shh responsive luciferase assay was established and characterized in several cell lines. It was found that Shh protein expressed and purified in bacteria (which lacks the native cholesterol modification) was not able to activate the signalling cascade while co-expression of Shh as well as Gli1 caused a strong activation.

Finally, the obtained results were integrated to establish a new model describing the action of cholesterol on Shh signalling.

Abkürzungsverzeichnis

aa = Aminosäurereste
Abb. = Abbildung
AER = apikale ektodermale Randleiste
AP = Alkalische Phosphatase
APS = Ammoniumperoxodisulfat
BLAST = *Basic local alignment search tool*
bp = Basenpaar
BSA = Rinderserumalbumin
°C = Grad Celsius
cDNA = komplementäre Desoxyribonukleinsäure, hergestellt durch reverse Transkription einer mRNA
CDPX2 = **X**-linked **C**hondrodysplasia **p**unctata (Δ 7,8-Sterolisomerase-Defizienz)
C. elegans = *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm)
CHILD = **c**ongenital **h**emidysplasia with **i**chthyosiform erythroderma and **l**imb **d**efects (3β -Hydroxysteroiddehydrogenase-Defizienz)
Da = Dalton
DEPC = Diethylpyrocarbonat
7DHC = 7-Dehydrocholesterin
Dhcr7 = murines 7-Dehydrocholesterinreduktase-Gen
DHCR7 = humanes 7-Dehydrocholesterinreduktase-Gen
Dig = Digoxigenin (Steroid aus *Digitalis purpurea*)
Disp = Dispatched
D. melanogaster = *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege)
DNA = Desoxyribonukleinsäure
dNTP = Desoxynukleosidtriphosphat
dpc = *dies post conceptionem* (Tage nach der Befruchtung)
DTT = Dithiothreitol
E = Tag der Embryonalentwicklung (Tage nach der Befruchtung)
Ebp = Emopamil-bindendes Protein (Δ 7,8-Sterolisomerase)
E. coli = *Escherichia coli*
EDTA = Ethylendiamintetraacetat
ER = Östradiolrezeptor
et al. = *et alii* (lat., und andere)
G. = Ganglion
GR = Glucocorticoidrezeptor
GST = Glutathion-S-Transferase
GT = Glutathion
Hh = Hedgehog
Hmg-CoA = 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A
Hmgcr = 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase-Gen der Maus
Hsd = Hydroxysteroiddehydrogenase

Abkürzungsverzeichnis

Hsd17b1 = 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1
Hsd17b7 = 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 7
IPTG = Isopropyl- β -D-thio-galaktosid
Ihh = Indian Hedgehog
LB = Luria Bertani
kb = Kilobasenpaare
mRNA = Boten-(*messenger*)Ribonukleinsäure
Mya = *million years ago*
NAD⁺ = Nikotinamidadenindinukleotid
Nsdhl = **NAD(P)H-steroid dehydrogenase-like**; 3 β -Hydroxysteroid-
dehydrogenase
OD = optische Dichte
p. a. = *pro analysis* (Analysereinheitsgrad)
PCR = Polymerasekettenreaktion
PBS = salziger Phosphatpuffer (**phosphate buffered saline**)
PFA = Paraformaldehyd
PR = Progesteronrezeptor
Ptch = Patched
RAR = **retinoic acid receptor**
RNA = Ribonukleinsäure
rpm = Umdrehungen pro Minute (*rotations per minute*)
RT = Raumtemperatur
RT-PCR = Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
RU = Relative Einheiten
RXR = **retinoid X receptor**
SCAD = *short chain*-Alkoholdehydrogenase
SDS = Natriumdodecylsulfat
Shh = Sonic Hedgehog
ShhC = C-terminale Domäne von Shh
ShhN = N-terminale Domäne von Shh
SLOS = **Smith-Lemli-Opitz-Syndrom** (7-Dehydrocholesterinreduktase-
Defizienz)
Smo = Smoothened
SPR = Oberflächen-Plasmonen-Resonanz
TAE = Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE = Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE = Tris-EDTA
TEMED = Tetramethylethylendiamin
Tris = Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
U = Unit (Einheit)
V = Volt
w/v = Gewicht pro Volumen
V = Volt
X-Gal = 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

1 Einleitung

Die Entwicklungsbiologie hat sich in den letzten Jahren zu einem der dynamischsten Forschungsgebiete der „Neuen Biologie“ entwickelt. Während frühere Generationen von Anatomen und Embryologen durch mangelnde Technik und restriktivere ethische Tabus in ihrer Arbeit noch stark eingeschränkt waren, bieten sich den modernen Wissenschaftlern mit dem inzwischen erworbenen Wissen, den sich rasant entwickelnden Technologien und dem neuzeitlichen Liberalismus (fast) unbegrenzte Möglichkeiten. Die Fragen, die gestellt werden, haben sich jedoch seit den ersten entwicklungsbiologischen Theorien des Aristoteles (384-322 v. u. Z.) kaum geändert: Wie entwickelt sich aus der undifferenzierten, befruchteten Eizelle der komplexe, vielzellige Organismus, der sich seinerseits wieder fortpflanzen kann? Und was passiert, wenn der diffizile Entwicklungsprozess gestört wird? Schon lange *vor* dem Aufkommen der Naturwissenschaften, die sich seit der Antike eingehend mit diesen Fragen beschäftigten, beobachteten die Menschen bereits ihre Umwelt und verarbeiteten ihre Beobachtungen zu bleibenden Mythen und Weltanschauungen. Und selbst diese vorwissenschaftlichen Beobachtungen finden manchmal eine ganz unerwartete Bestätigung in unserer modernen Forschung: Vor langer Zeit beschrieb Homer den einäugigen Zyklopen als schreckliches und geheimnisvolles Monster. Heute wissen wir, dass Kinder, die mit Zyklopie geboren werden, Opfer eines genetischen Defekt sind, der die normale Gehirn- und Gesichtsentwicklung beeinträchtigt. Wie dieser Signalweg richtig funktioniert, scheint heute aber viel mysteriöser zu sein, als Homers Götter und Helden. Es stellte sich heraus, dass ein altbekanntes Molekül - Cholesterin - in diesem Weg eine zentrale und völlig neuartige Rolle spielt. Die vorliegende Arbeit handelt von Cholesterin und seiner Wirkung auf den Sonic Hedgehog-Signalweg und trägt vielleicht einen kleinen Teil zu einer uralten Geschichte bei.

1.1 Cholesterin

Cholesterin, das einerseits als Hauptrisikofaktor für Arteriosklerose gilt, ist andererseits ein lebenswichtiges Molekül. Es ist mit 200 $\mu\text{g}/(\text{mg Protein})$ ein essentieller Bestandteil der meisten eukaryotischen Membranen. Abhängig vom Zelltyp können sich 65-90 % des (unveresterten) zellulären Cholesterins dort befinden (WOOLLETT, 2001). Die intrazelluläre Verteilung von Cholesterin

Eigenschaften

1 Einleitung

auf Membransubdomänen, Organellen und Einzelschichten der Doppelmembranen ist nicht zufällig sondern reguliert und hochdynamisch (MUKHERJEE et al., 1998; YEAGLE, 1985). Aufgrund seiner chemischen Struktur mit einer 3β -Hydroxylgruppe am einen und einer flexiblen Kohlenhydratkette am anderen Ende des Steroidgerüsts ist es in der Lage physikalische Eigenschaften von Membranen zu beeinflussen (YEAGLE, 1989). Es lagert sich zwischen die langkettigen Fettsäurereste der Membran so ein, dass die Hydroxylgruppe zum polaren Ende der Phospholipide zeigt und wahrscheinlich mit deren Carbonylsauerstoff interagiert. Dadurch verhindert es die Kristallisierung oder Phasenänderungen der Fettsäureketten und verringert die Fluidität der Membran, weil es die Bewegung der Fettsäurereste stark eingeschränkt (XIANG et al., 2000). Außerdem erhöht Cholesterin die Dicke von Lipiddoppelschichten und hat einen kondensierenden Effekt auf sie (YEAGLE, 1985). Cholesterin moduliert aber nicht nur die Eigenschaften von Zellmembranen, sondern es dient auch als Vorläufer für Steroidhormone und Gallensäuren.

1.1.1 Cholesterin in der Embryonalentwicklung

Cholesterin im Embryo

Im embryonalen Organismus scheint Cholesterin noch weitere wichtige Aufgaben zu übernehmen. Wie im nächsten Abschnitt noch detaillierter ausgeführt wird, wird Cholesterin kovalent an Mitglieder der Hedgehog-Proteinfamilie gebunden und distale Cholesterinbiosynthese-Inhibitoren können auf bisher ungeklärte Weise die Signaltransduktion der Hedgehog-Morphogene hemmen. In den letzten Jahren wurden außerdem bei menschlichen Patienten und Mausmutanten genetische Defekte in verschiedenen Cholesterinbiosynthese-Enzymen entdeckt, die zu unerwarteten multisystemischen Missbildungssyndromen führten. Die Pathogenese der Erkrankungen ist noch völlig unklar.

Fötaler Cholesterinmetabolismus

Die enorme Wachstumsrate, die ein Organismus während der Schwangerschaft zeigt, wird in keinem anderen Stadium des Lebens wieder erreicht. Um dieses Wachstum zu ermöglichen, muss u. a. der Bedarf an Cholesterin gedeckt werden. Cholesterin wird vor allem zum Aufbau der neuen Zellmembranen und auch als Ausgangssubstrat für Steroidhormone benötigt. Der Fötus kann das essentielle Cholesterin entweder von der Mutter erhalten (exogene Quelle) oder selbst *de novo* synthetisieren (endogene Quelle). Beide Quellen sind für die normale Entwicklung des Embryos unerlässlich. Das Versiegen einer Quelle kann von der anderen nicht vollständig kompensiert werden. Das zeigen sowohl die unten beschriebenen Phänotypen der Cholesterinbiosynthesemutanten Bare patches, Tattered und 7Dhcr-k. o. als auch die entsprechenden menschlichen Syndrome sowie Mausmodelle, bei denen der Transfer von maternalem Cholesterin zum Embryo gestört ist (Megalin- oder Apolipoprotein B-defiziente Mäuse) (WILLNOW et al., 1996; HERZ & FARESE, 1999; HANAKA et al., 2000).

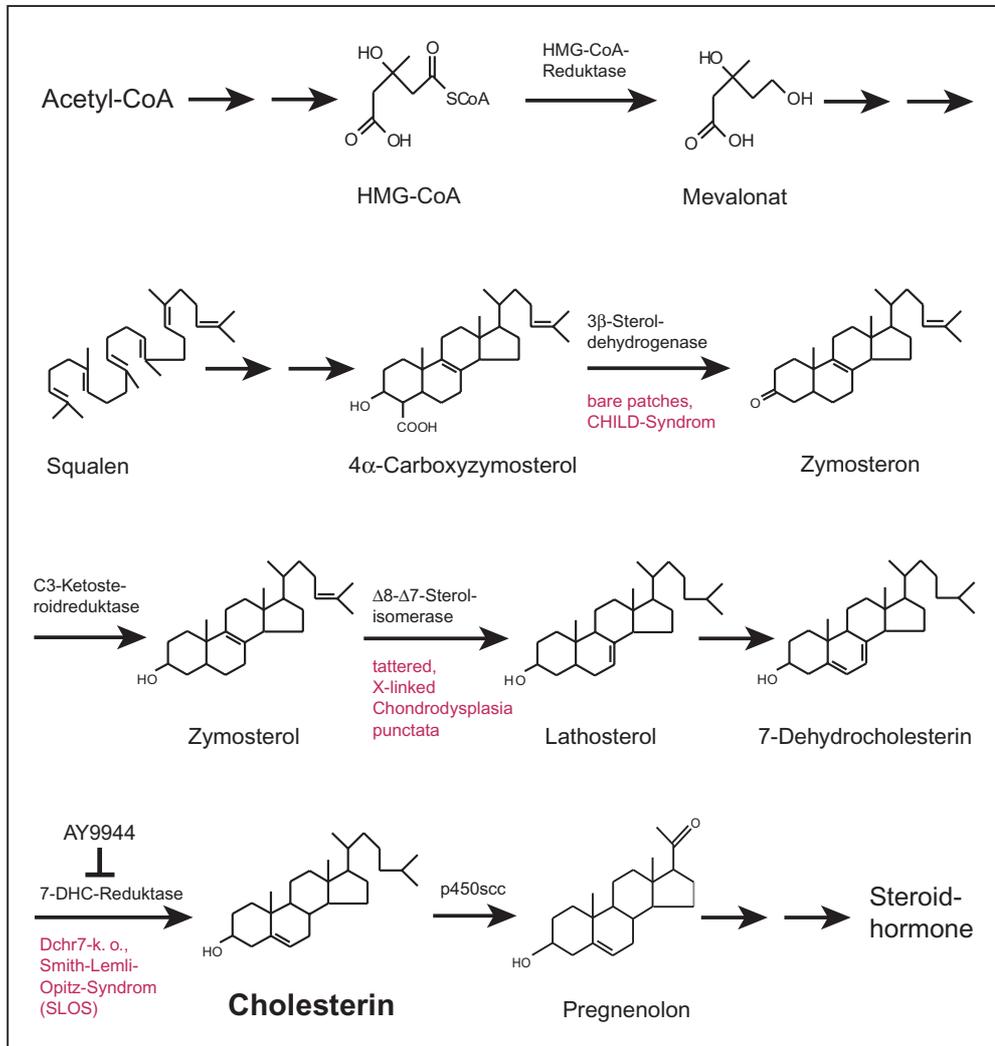


Abbildung 1.1: Vereinfachtes Schema der Cholesterinbiosynthese. Endogenes Cholesterin wird aus Acetyl-CoA synthetisiert. Die Schritte von Mevalonat bis Farnesyldiphosphat finden in den Peroxisomen statt. Die restliche Synthese bis zum Cholesterin wird in ER-Membranen vollzogen. Zur Hormonsynthese wird Cholesterin anschließend in die Mitochondrien transportiert. Die in den im Text beschriebenen Mutanten blockierten Schritte sind durch die Syndrombezeichnungen in rot markiert. Für eine detaillierte Darstellung der weiteren Umsetzung von Cholesterin zu Steroidhormonen siehe Abb. 2.11 auf Seite 39. P450scc = Cytochrom P450 *side-chain cleavage*; 7-DHC = 7-Dehydrocholesterin; Hmg-CoA = Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A; Dhcr7-k.o. = 7-Dehydrocholesterinreduktase-*knock out*-Maus

1 Einleitung

Die endogene Cholesterinbiosynthese

Der größte Teil des Cholesterinbedarfs kann durch die *de novo*-Synthese des Embryos gedeckt werden (BELKNAP & DIETSCHY, 1988; WOOLLETT, 1996; JUREVICS et al., 1997). Cholesterin soll vom Embryo in geringer Menge in allen Zellen produziert werden, vor allem aber in Gehirn, Leber und Nebennieren (CAVENDER et al., 1995). Die Gesamtsyntheserate nimmt im Verlauf der Schwangerschaft ab, im Gehirn steigt die Produktion jedoch an, um den besonders hohen Cholesterinbedarf während der Myelinisierung zu decken (TURLEY et al., 1996; TURLEY et al., 1998). Die Regulation der fötalen Cholesterinbiosynthese ist bislang uncharakterisiert. Im adulten Organismus wird die *de novo*-Synthese von *sterol regulatory element binding proteins* (SREBP's) reguliert (BROWN & GOLDSTEIN, 1997; BROWN & GOLDSTEIN, 1998). SREBP's sind membranständige Transkriptionsfaktoren, die als Vorläufer synthetisiert und haarnadelartig in die ER-Membran verankert werden. Wenn der Cholesteringehalt in der Zelle sinkt, wird das Vorläuferprotein nacheinander zweimal gespalten. Dieser Prozess wird durch *SREBP cleavage activating protein* (SCAP) reguliert (OSBORNE, 1997; OSBORNE & ROSENFELD, 1998). Der durch die Spaltungsreaktionen aktivierte Transkriptionsfaktor wird in den Zellkern transportiert und schaltet u. a. die Transkription der HMG-CoA-Reduktase und des LDL-Rezeptors ein. Es wird durch diesen Mechanismus also nicht nur die endogene Synthese hochreguliert, sondern auch die Aufnahme von exogenem Cholesterin gefördert. Der Gehalt an aktivem SREBP kann unter anderem von Cholesterin und Fettsäuren beeinflusst werden. SCAP besitzt eine *sterol-sensing*-Domäne (HUA et al., 1996; LANGE & STECK, 1998), mit Hilfe derer es offensichtlich auf den variierenden Cholesteringehalt in der ER-Membran reagieren kann (NOHTURFFT et al., 1998).

In Abb. 1.1 sind die wichtigsten Schritte der Synthese von Cholesterin aus Acetyl-Coenzym A nach dem Kandutsch-Russell-Weg dargestellt. Die in den wichtigsten (häufigsten) Syndromen blockierten Reaktionen bzw. mutierten Enzyme sind gekennzeichnet. Insgesamt sind zwei die proximale Cholesterinbiosynthese betreffende Defekte (*mevalonic aciduria* und Ausfall der Squalensynthese) und vier postsqualene Defekte (SLOS, Desmosterolosis, CHILD, CDPX2) bekannt. Im folgenden sind die bekanntesten Syndrome beschrieben.

1.1.2 Das Smith-Lemli-Opitz-Syndrom (SLOS)

Geschichte

Obwohl SLOS bereits 1964 zum ersten Mal beschrieben wurde (SMITH et al., 1964), wurde erst 1993 erkannt, dass es sich bei diesem autosomalrezessiven Missbildungssyndrom um einen metabolischen Defekt handelt, der die Cholesterinbiosynthese betrifft (TINT, 1993; IRONS et al., 1993). Fünf Jahre später wurde gezeigt, dass in SLOS-Patienten das 7-Dehydrocholesterinreduktase-Gen (DHCR7) mutiert ist (WASSIF et al., 1998). Die 7-Dehydrocholesterinreduktase katalysiert den letzten Schritt der Cholesterinsynthese (siehe 1.1). Die Häufigkeit von SLOS variiert stark zwischen verschiedenen Bevölkerungsgruppen. Bei Nordeuropäern tritt SLOS mit einer In-

zidenz von etwa 1 pro 10.000 Lebendgeburten auf, bei Briten mit etwa 1 pro 60.000 Lebendgeburten. Asiaten oder Afrikaner scheinen gar nicht betroffen zu sein (BATTAILLE et al., 2001; NOWACZYK et al., 2001). Das tatsächliche Auftreten von SLOS liegt wahrscheinlich noch deutlich höher, da schwere Fälle zu spontanem Abort führen und nicht statistisch erfasst werden.

SLOS-Patienten leiden an einer Vielzahl von körperlichen Beeinträchtigungen, die in ihrem Schweregrad variieren: Kleinwüchsigkeit, geistige Retardierung, Mikrozephalie, milde Formen von Holoprosenzephalie, Mikrognathia, postaxiale Polydaktylie an den Händen, Syndaktylie des zweiten und dritten Zehs, Gaumenspalte, Katarakt, Herz-, Lungen- und Nierendefekte, Myelinisierungsstörungen, Missbildungen des Gesichts, selten Chondrodysplasia punctata (CDP) u. a. (ANDERSSON et al., 1999; KELLEY & HENNEKAM, 2000; KRAKOWIAK et al., 2000; LANOUE et al., 1997; ATCHANEEYASAKUL et al., 1998; HERMAN, 2000; KELLEY, 2000). Einige Merkmale, z. B. die Gaumenspalte, die Missbildungen im Gesicht und an den Gliedmaßen aber besonders die (relativ seltene) Holoprosenzephalie, sind auch charakteristisch für Shh-Mutanten.

Humaner Phänotyp

Biochemisch wird SLOS durch einen niedrigen Cholesterinspiegel mit gleichzeitig stark erhöhten 7-Dehydrocholesterin-Werten (IRONS et al., 1993) definiert. Außerdem wurde von erhöhten Werten von sulfatierten Steroiden und einer hypersensitiven Antwort auf ACTH-Stimulierung berichtet (CHASALOW et al., 1985). Die Ursache der beschriebenen Defekte wird sehr kontrovers diskutiert. Verschiedene Gruppen untersuchten das Verhältnis von biochemischen Parametern und Schweregrad der Erkrankung. Einige beobachteten bei sehr niedrigen Plasmacholesterinwerten besonders schwere Symptome (CUNNIFF et al., 1997; TINT et al., 1995), wohingegen die Korrelation mit den 7DHC-Werten nur schwach war. Witsch-Baumgartner et al. berichteten von gegenteiligen Erkenntnissen (WITSCH-BAUMGARTNER et al., 2000).

Biochemie

Die Dhcr7-k.o.-Maus zeigte nur wenige Symptome, die auch bei humanen Patienten auftreten: Gaumenspalte, Kleinwüchsigkeit, Missbildungen des Gesichts. Es wurden keine offensichtlichen Defekte in Gehirn, Herz, Lunge, Nieren, Ganglien oder Gliedmaßen gefunden. Homozygote Mäuse starben während des ersten Lebensstages wahrscheinlich an der Unfähigkeit, Nahrung aufzunehmen (WASSIF et al., 2001). Die biochemischen Parameter entsprachen den humanen. Obwohl das Gehirn der Mutanen morphologisch unauffällig war, ließen verschiedene Symptome (eingeschränkte Beweglichkeit, unkoordiniertes Saugen und Schlucken) auf einen neurologischen Defekt schließen. Die funktionell intakten Neuronen zeigten eine signifikant verringerte Reaktion auf exogenes Glutamat.

Das Mausmodell

Ein SLOS-ähnlicher Phänotyp in Rattenembryonen wird auch durch die Verabreichung der Cholesterinbiosynthese-Inhibitoren AY9944 oder BM15.766 hervorgerufen (KOLF-CLAUW et al., 1997; GOFFLOT et al., 1999; LLIRBAT et al., 1997). Diese Substanzen hemmen die 7-Dehydrocholesterinreduktase (siehe Abb. 1.1). In Zellkultur wurde auch

Die Wirkung von AY9944

1 Einleitung

gezeigt, dass die Sonic Hedgehog-Signaltransduktion in Anwesenheit dieser Substanzen inhibiert wird (INCARDONA & ROELINK, 2000; COOPER et al., 1998). Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht bekannt.

1.1.3 CHILD-Syndrom

Der humane
Phänotyp

CHILD ist die Abkürzung für ein menschliches Missbildungssyndrom und steht für „congenital hemidysplasia with ichthyosiform erythroderma and limb defects“ (HAPPLE et al., 1980). Die Erkrankung wird durch Mutationen im *NAD(P)H-steroid dehydrogenase-like*-Gen (NSDHL) hervorgerufen, das auf dem X-Chromosom lokalisiert ist. CHILD ist letal für hemizygot männliche Patienten. NSDHL kodiert für eine 3β -Hydroxysteroiddehydrogenase (KÖNIG et al., 2000), die an der mehrere Schritte umfassenden Demethylierung¹ von 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol beteiligt ist (siehe Abb. 1.1). Bei heterozygoten Patientinnen ist das auffälligste Symptom ein unilateraler entzündlicher Nävus, der scharf entlang der Körperachse abgegrenzt ist. Daneben wurden kurze oder fehlende Gliedmaßen, Gehirndefekte, Dysplasie aller skelettalen Strukturen (z. B. CDP), geringes Größenwachstum, Herz-, Lungen- und Nierendefekte beobachtet (HERMAN, 2000; KELLEY, 2000).

Das Mausmodell

Mausmodelle für CHILD (*Bare patches* und *Striated*), die verschiedene mutierte Allele des *Nsdhl*-Gens tragen können, wurden künstlich durch Bestrahlung der Männchen erzeugt. *Nsdhl* ist auch bei Nagetieren X-chromosomal und für die Männchen letal. Abhängig vom genetischen Hintergrund des Mausstamms sterben die hemizygoten männlichen bzw. die homozygoten weiblichen Embryonen zwischen Tag 11,5 und Tag 16,5 der Schwangerschaft. Die X-Inaktivierung (Lyonisierung) bei heterozygoten Weibchen äußert sich nach der Geburt durch kahle Flecken im Fell, die den Blaschko-Linien folgen (LIU et al., 1999). Der Phänotyp der *Bare patches*-Mäuse entspricht, anders als bei den *Dchr7-k.o.*-Mäusen, im wesentlichen dem humanen Syndrom. Die Mutanten sind gekennzeichnet durch Kleinwüchsigkeit, Gaumenspalte, Hautveränderungen, Katarakt, Chondrodysplasia punctata, Camptodaktylie sowie (selten) weiße Flecken im Fell. *Striated*-Mäuse tragen ein *Nsdhl*-Allel, das zu einem Protein mit enzymatischer Restaktivität übersetzt wird. Der Phänotyp dieser Mutanten ist deshalb vergleichbar mit *Bare patches*-Mäusen, aber milder als bei diesen.

1.1.4 CDPX2

Der humane
Phänotyp

Das Conradi-Hünemann-Happle-Syndrom (CDPX2) wird durch Mutationen im Gen des *Emopamil*-bindendes-Proteins (Ebp) ausgelöst (DERRY et al., 1999). Das X-chromosomale *Ebp* kodiert für eine Sterol- $\Delta 7,8$ -isomerase, die

¹ Die Demethylierungsreaktion, an der das NSDHL-Protein beteiligt ist, wird von mindestens drei Enzymen durchgeführt, die aufeinanderfolgende Reaktionen katalysieren. Der zweite Schritt wird von NSDHL durchgeführt

Zymosterol in Cholesta-7,24-dienol umsetzt (siehe 1.1). Damit katalysiert es den Schritt fast unmittelbar nach NSDHL. CDPX2-Patienten (X-linked Chondrodysplasia punctata) unterscheiden sich nur durch subtile Merkmale von CHILD-Patienten. Die auffälligsten Symptome, wie Ichthyose, Gliedmaßenverkürzungen, stellenweise Alopecia und Chondrodysplasia punctata werden durch beide Enzym-Defekte hervorgerufen (BRAVERMAN et al., 1999). Während die Symptome bei CHILD strikt unilateral auftreten, sind bei CDPX2 häufiger beide Körperhälften betroffen. Außerdem tritt ein vollständiges Fehlen von Gliedmaßen bei CDPX2 nicht auf (KÖNIG et al., 2000). Vom SLOS-Phänotyp sind CHILD und CDPX2 jedoch deutlich abgrenzbar, da sie keine Holoprosenzephalie zeigen und bei SLOS keine Ichthyose-artigen Hautveränderungen beobachtet werden.

Wie für CHILD existieren künstlich erzeugte Mausmutanten für CDPX2 (*Tattered*), die im Phänotyp mit dem humanen Syndrom vergleichbar sind. Die am häufigsten auftretenden Symptome bei hemizygoten Männchen sind CDP, Rhizomelia, Katarakt, verringertes Größenwachstum, Mikrognathia, Gaumenspalte und Fehlen des Darms. Der Zeitpunkt des intrauterinen Todeseintritts hängt vom genetischen Hintergrund ab und liegt zwischen Tag 12,5 und Tag 18,5 der Schwangerschaft (DERRY et al., 1999).

In Tabelle 1.1 ist zusammengefasst, welche Symptome allen Mutanten-Phänotypen gemeinsam sind und welche als diagnostische Merkmale dienen können. Es zeigte sich, dass insbesondere die Unterscheidung von CHILD und CDPX2 sehr schwierig ist. Verschiedene Symptome (Gaumenspalte, Skelettdefekte, Gesichtsdeformationen) kommen auch bei Shh-Mutanten vor. Besonders charakteristisch ist die Holoprosenzephalie, die allerdings nur bei menschlichen SLOS-Patienten auftritt. Die Verbindung zwischen Shh-Signalweg und Cholesterin wird dadurch erneut unterstrichen.

Das Mausmodell

Ähnlichkeit mit Shh-Mutanten

Tabelle 1.1: Vergleich der beobachteten Phänotypen bei CHILD, CDPX2, SLOS bzw. den entsprechenden Mausmutanten

	7Dhcr-k. o. (SLOS)	Bare patches (CHILD)	Tattered (CDPX2)
gemeinsamer Phänotyp	Chondrodysplasia punctata, Gliedmaßendefekte, Gaumenspalte, Missbildungen im Gesicht, Herz-, Lungen- und Nierendefekte, sensimotorische Schwierigkeiten, Kleinwüchsigkeit		
diagnostische Merkmale	Gehirndefekte; Syndaktylie des 2. und 3. Zehs; erhöhter 7-Dehydrocholesterin-Wert bei niedrigem Cholesteringehalt	spezifische Form der Ichthyose; Gliedmaßen sind kurz und fehlen manchmal, Symptome sind strikt unilateral	spezifische Form der Ichthyose; Gliedmaßen sind kurz, aber fehlen nie; Akkumulierung von 8(9)-Cholestenol und 8-Dehydrocholesterin bei normalem Plasmacholesterinwert

1.2 Sonic Hedgehog

Mitglieder der Hedgehog-Proteinfamilie sind extrazelluläre Signalmoleküle, die in der Embryonalentwicklung vieler Organismen eine zentrale Rolle spielen. Das erste Mitglied dieser hochkonservierten Familie wurde 1980 in einem Mutantenscreen in *Drosophila melanogaster* entdeckt (NÜSSLEIN-VOLHARD & WIESCHAUS, 1980). In *Drosophila* ist das Hedgehog-Protein (Hh) ein Segmentpolaritätsgen, das in den posterior lokalisierten Zellen jedes Segments exprimiert wird und in benachbarten, aber auch weiter entfernten anterioren Zellen die Expression seiner Zielgene aktiviert. Darüber hinaus ist Hedgehog an der Gliedmaßen-, Flügel- und Kopfdifferenzierung der Fliegen beteiligt.

Hedgehog-Homologe in Säugetieren: *Shh*, *Ihh*, *Dhh*

In Säugetieren existieren drei Homologe des *Drosophila*-Proteins: Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) und Desert Hedgehog (Dhh). Die wichtigste Rolle spielt Shh, das bereits kurz nach Einsetzen der Gastrulation exprimiert wird. Zuerst beteiligt sich Shh an der Etablierung der Rechts-Links-Asymmetrie, später ist das Morphogen entscheidend an der Bildung von Gehirn, Gliedmaßen, sklerotomalen Strukturen, Haarfollikeln und epithelialen Organen beteiligt. Der Wirkungsbereich von Ihh befindet sich hauptsächlich in den Knochenanlagen, wo es während der Embryonalentwicklung und in den ersten Lebenstagen für die Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten zuständig ist (IWASAKI et al., 1997; CHUNG et al., 2001). Ihh-k.o.-Mäuse zeigen schwere Skelettmissbildungen, sind aber lebensfähig (KARP et al., 2000). Im adulten Organismus wird Ihh während der Regeneration von Knochenfrakturen exprimiert. Dhh wird in peripheren Nerven (PARMANTIER et al., 1999) und geschlechtsspezifisch in den Hoden exprimiert (BITGOOD et al., 1996). Dhh-k.o.-Männchen sind lebensfähig aber infertil. Die k.o.-Weibchen zeigen keine Auffälligkeiten (CLARK et al., 2000).

Shh-k.o.-Phänotyp

Shh-k.o.-Mäuse entwickeln anders als Ihh- und Dhh-Mutanten einen sehr schweren, manchmal letalen Phänotyp. Charakteristisch ist das Auftreten von Holoprosenzephalie, einem Gehirndefekt, bei dem sich der embryonale Vorderhirnventrikel nicht in die beiden Großhirnhemisphären teilt. Als Folge besitzen die Mutanten meist nur ein zentrales Auge (Cyclopie) und schwere Missbildungen des Gesichtsschädels (CHIANG et al., 1996). Die Gesichtsmissbildung wird durch Absterben der kranialen Neuralleiste zusätzlich verschlimmert (AHLGREN & BRONNER-FRASER, 1999). Weitere Symptome betreffen Sklerotom-Derivate und Gliedmaßen: die Wirbelsäule, die meisten Rippen sowie distale Gliedmaßenbereiche fehlen vollständig. Im Neuralrohr fehlen ventral-differenzierte Zellpopulationen. In praktisch allen Organen sind histologische Defekte zu beobachten.

Hedgehogproteine sind Morphogene

Die Mitglieder der Hedgehog-Proteinfamilie sind Morphogene (CHRISTIAN, 2000; GRITLI-LINDE et al., 2001). Sie werden in Organisationszentren, wie z. B. der ZPA (*zone of polarizing activity*) der Gliedmaßenknospen (JOHNSON et al., 1994; LOPEZ-MARTINEZ et al., 1995), der Neuralplatte im Neuralrohr (LITINGTUNG & CHIANG, 2000) oder in den Imaginalscheiben der Flü-

gel von *Drosophila* (STRIGINI & COHEN, 1997) gebildet und diffundieren von dort aus ins benachbarte Gewebe. Dabei bauen sie einen Konzentrationsgradienten im Gewebe auf. Innerhalb dieses Gradienten werden die Zielgene des Morphogens konzentrationsabhängig aktiviert oder reprimiert. Auf diese Weise wird ermöglicht, dass Zellen je nach Distanz zum Organisationszentrum mit der Expression unterschiedlicher Gene auf das Signal antworten, also verschiedene Schicksale annehmen können. Das Gewebe erhält ein Muster (*pattern*), nach dem es sich anschließend differenziert. Um diese Aufgabe als Morphogen erfüllen zu können, muss Shh in der Lage sein, über längere Distanzen zu wirken (*long range*-Wirkung) (BRISCOE et al., 2001).

Die Vorläufer aller Hedgehog-Proteine bestehen aus drei Teilen: einem Signalpeptid, einer hochkonservierten N-terminalen Domäne und einer weniger konservierten C-terminalen Domäne. Das Vorläuferprotein mit einer Größe von etwa 45 kDa wird in das Endoplasmatische Retikulum (ER) synthetisiert. Danach wird das Signalpeptid abgespalten. Die C-terminale Domäne besitzt proteolytische Aktivität und katalysiert eine Autoprozessierungsreaktion, bei der das Vorläuferprotein in die N-terminale Domäne (ShhN, ca. 20 kDa) und die C-terminale Domäne (ShhC, ca. 25 kDa) gespalten wird (BUMCROT et al., 1995), während gleichzeitig an den neuen C-Terminus der N-terminalen Domäne ein Cholesterinmolekül kovalent gebunden wird (PORTER et al., 1996). In Abb. 1.2 ist der Vorgang, der große Ähnlichkeit mit der Selbstspaltungsreaktion von Intein besitzt (HALL et al., 1997), schematisch wiedergegeben. Es wird vermutet, dass intermediär ein Thioester entsteht, der nukleophil vom Sauerstoff der 3β -Hydroxylgruppe des Cholesterins angegriffen werden kann. Die frei diffundierende C-terminale Domäne besitzt nach bisherigen Erkenntnissen keine weiteren Funktionen und wird abgebaut (PORTER et al., 1996). Neben der C-terminalen Cholesterin-Modifikation erhält die Mehrzahl der ShhN-Moleküle einen N-terminalen Palmitatrest (KOHTZ et al., 2001; TAYLOR et al., 2001) und wird außerdem glykosyliert. ShhN, das durch seine beiden lipophilen Modifikationen membranverankert ist, stellt das biologisch aktive Morphogen dar.

Über das *trans*-Golgi-Netzwerk wird ShhN an die Zelloberfläche transportiert und sezerniert. Der genaue Mechanismus des Sekretionsvorgangs ist noch nicht entschlüsselt. In *Drosophila* wurde ein Multitransmembran-Protein beschrieben, das an der Freisetzung von Hedgehog aus der signalisierenden Zelle beteiligt ist. Es wurde deshalb und aufgrund seiner signifikanten Ähnlichkeit zum Hh-Rezeptor Ptch „Dispatched“ (Disp) genannt (BURKE et al., 1999).² Disp reguliert ausschließlich die Sezernierung von Cholesterin-modifiziertem Hh. Es hat keine Wirkung auf unmodifizierte Hh-Proteine, das unreguliert sekretiert wird. Rekombinant exprimierte Hh-Konstrukte, die eine andere membranverankernde Modifikation als Cholesterin tragen, können von den transfi-

Die
Autoprozessierung

Sezernierung durch
Disp

² Wie eine Blast-Suche mit der *Drosophila*-Sequenz ergab, existieren auch in Maus und Mensch Homologe von Disp. Die Sequenzidentität auf Proteinebene beträgt etwa 40 %. (eigene unveröffentlichte Beobachtungen)

1 Einleitung

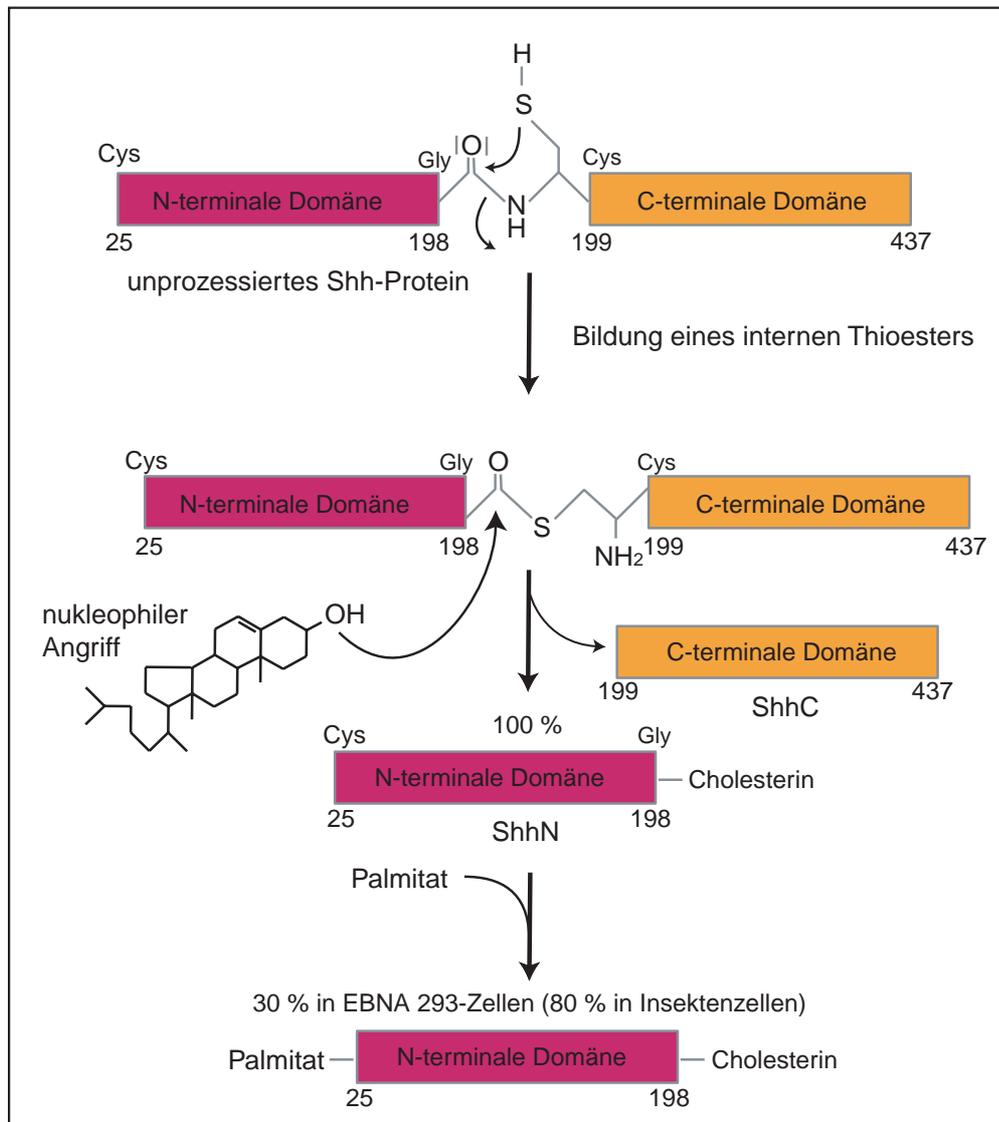


Abbildung 1.2: Autoprozessierungsreaktion von Shh. Das Vorläuferprotein (ca. 45 kDa) wird nach Abspaltung des Signalpeptids (aa 1-24) durch die C-terminale Domäne autokatalytisch gespalten. Gleichzeitig wird Cholesterin kovalent an die N-terminale Domäne gebunden. Die Reaktion verläuft über die Bildung eines internen Thioesters, der einen nukleophilen Angriff des Cholesterins erlaubt. Nach der nukleophilen Substitution durch Cholesterin zerfällt das Vorläuferprotein in die biologisch aktive N-terminale Domäne (ShhN) und in die C-terminale Domäne (ShhC), die vermutlich abgebaut wird (PORTER et al., 1996). Außerdem kann noch eine weitere lipophile Modifikation der N-terminalen Domäne (ShhN) durch Palmitat erfolgen (KOHTZ et al., 2001; TAYLOR et al., 2001). In Säugetierzellen werden etwa 30 % der ShhN-Proteine palmitoyliert, in Insektenzellen etwa 80 % (PEPINSKY et al., 1998). Die Nummerierung der Aminosäurereste bezieht sich auf das murine Shh-Protein.

zierten Zellen dagegen überhaupt nicht sezerniert werden (BURKE et al., 1999). Es ist noch nicht bekannt, wie ShhN, das mit zwei lipophilen Resten stabil in der Membran verankert ist, freigesetzt wird, um seine *long-range*-Wirkung zu erzielen, bei der es über eine Distanz von mehreren Zelldurchmessern hinweg diffundieren muss. Unmodifiziertes ShhN ist zwar in der Lage, *in vitro* an seinen Rezeptor zu binden und die Signalkaskade zu aktivieren, *in vivo* scheint aber nur das lipidmodifizierte Protein wirksam zu sein (LEWIS et al., 2001). Der Palmitat-Rest verstärkt die Signalintensität sogar bei bestimmten Zielzellen um etwa das 30fache (PEPINSKY et al., 1998; KOHTZ et al., 2001; TAYLOR et al., 2001; ZENG et al., 2001). Die Extrazellulärmatrix (ECM) spielt eine entscheidende Rolle in der Shh-Signalübertragung. Bei *Drosophila*-Mutanten mit gestörter ECM-Synthese ist auch das Hh-Signal beeinträchtigt (THE et al., 1999). Es wurde darüber hinaus gezeigt, dass Shh mit dem ECM-Protein Vitronektin interagiert und diese Interaktion einen synergistischen Effekt auf die Induktion von Motoneuronen hat (PONS & MARTI, 2000; PONS et al., 2001).

Der Shh-Rezeptorkomplex in den Zielzellen besteht aus zwei Multitransmembran-Proteinen: Patched (Ptch) und Smoothed (Smo). Smo wird in Abwesenheit von ShhN durch Ptch inhibiert (STONE et al., 1996; ALCEDO & NOLL, 1997; CHEN & STRUHL, 1996). Gelangt ShhN zur Zielzelle, wird es von Ptch gebunden, das daraufhin Smo aus der Inhibition entlässt (MURONE et al., 1999; CHEN & STRUHL, 1998). Während dieser Phase der Signaltransduktion wird ShhN zusammen mit dem Rezeptorkomplex endozytiert (INCARDONA et al., 2000). Smo aktiviert einen Multiprotein-Komplex, bestehend aus Fused, Costal-2 und dem Transkriptionsfaktor Gli1 (DELATTRE et al., 1999; PARK et al., 2000). Gli1 verlässt den Proteinkomplex, transloziert in den Nukleus und aktiviert oder reprimiert die Shh-Zielgene. Zu diesen zählt neben Mitgliedern der Wnt-, Bmp- und Pax-Familien auch der Shh-Rezeptor Ptch.

Shh-Signalweg und Cholesterinmetabolismus sind nicht nur dadurch miteinander verknüpft, dass das aktive Morphogen mit dem Sterol modifiziert ist. Es existieren drei weitere Verbindungspunkte:

1. Verschiedene Alkaloide aus *Veratrum californicum* (z. B. Cyclopamin, Jervin) können die Shh-Signaltransduktion effizient inhibieren. Die Wirkung dieser Substanzen wurde bereits in den 50er Jahren beobachtet. Trächtige Schafe, die die toxischen Pflanzen gefressen hatten, brachten zyklopische Lämmer zur Welt. Cyclopamin und Jervin sind Cholesterin strukturell sehr ähnlich. *Veratrum*-verwandte Pflanzen wachsen auch in den Bergen Griechenlands, und entsprechende Vergiftungsfälle bilden vermutlich den Hintergrund für den homerischen Mythos vom zyklopischen Schafhirten Polyphem.
2. Auch Inhibitoren der distalen Cholesterinbiosynthese (AY9944, BM15.766) sind in der Lage, das Shh-Signal in Zellkulturassays zu blockieren. In der Schwangerschaft an Ratten verabreichter Inhibitor

Die
Signaltransduktion

Shh und
Cholesterin

1 Einleitung

induziert Holoprosenzephalie und andere Shh-Mutanten-Symptome (KOLF-CLAUW et al., 1997; KOLF-CLAUW et al., 1998; GOFFLOT et al., 1999). Der Inhibitionsmechanismus ist aber möglicherweise anders als bei den Veratrum-Alkaloiden (COOPER et al., 1998).

3. Der Shh-Rezeptor Ptch besitzt eine *sterol-sensing*-Domäne (SSD), deren Funktion noch nicht ganz geklärt ist. Eine solche Domäne wurde zuerst in drei Proteinen des Cholesterinmetabolismus beschrieben: HMG-CoA-Reduktase, NPC1 und SCAP (LANGE & STECK, 1998). Punktmutationen in der SSD scheinen zum Verlust der Inhibition von Smo zu führen (MARTIN et al., 2001; STRUTT et al., 2001).

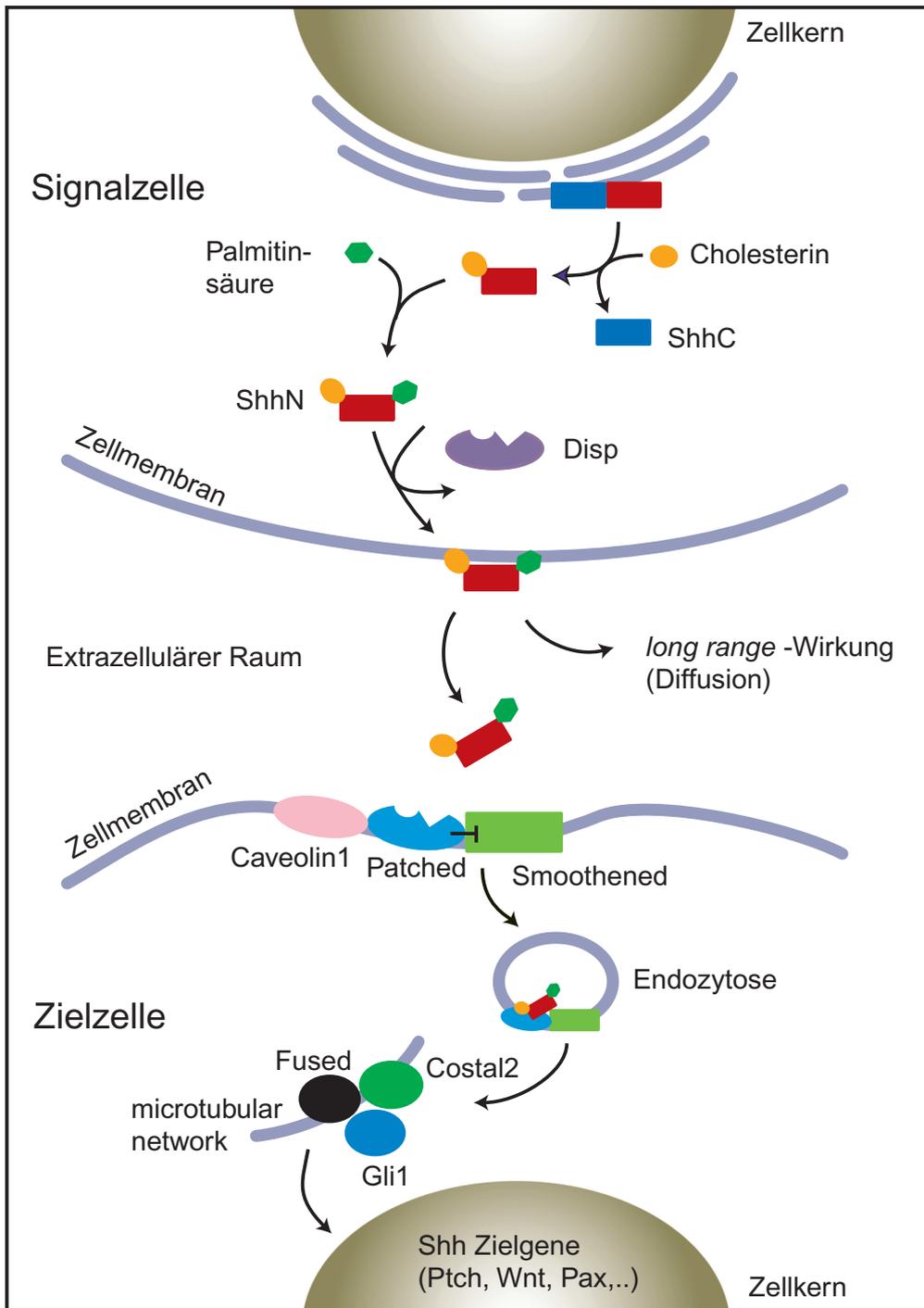


Abbildung 1.3: Schemazeichnung der Shh-Signaltransduktion. Genauere Beschreibung siehe Text. ShhC = C-terminale Domäne von Sonic Hedgehog; ShhN = prozessierter N-terminale Domäne von Sonic Hedgehog; Disp = Dispatched.

1.3 Zielsetzung

Genetische Erkrankungen wie CDPX2, SLOS oder CHILD weisen auf eine entscheidende Rolle der Cholesterinbiosynthese in der Embryonalentwicklung hin, die über die derzeit bekannten Funktionen von Cholesterin und Cholesterinabkömmlingen hinausgeht. In dieser Arbeit sollte begonnen werden, die Rolle der Cholesterinbiosynthese in der embryonalen Entwicklung insbesondere im Hinblick auf den Sonic Hedgehog-Signalweg zu charakterisieren.

Mittels mRNA *in situ*-Hybridisierung sollte zunächst das Expressionsmuster verschiedener Gene für Cholesterinbiosynthese-Enzyme während der embryonalen Entwicklung von Tag 9,0 bis 14,0 der Schwangerschaft untersucht werden. Es sollte festgestellt werden, ob die fötale Cholesterinbiosynthese ubiquitär stattfindet oder in einem distinkten Muster, das vielleicht mit den beobachteten Symptomen korreliert.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung ließen darauf schließen, dass Steroid-signale eine unerwartete Rolle in wirbeltierspezifischen Morphogeneseprozessen spielen könnten. Eine umfassende phylogenetische Analyse der Evolution von Steroidsignalen sollte die Verwandtschaftsverhältnisse zum Retinsäure-Signalweg klarstellen und die Hypothese testen, ob die evolutionäre Information, die in den Proteinsequenzen enthalten ist, für eine gemeinsame Entstehung von Steroidsignalen und Wirbeltierbauplan spricht.

Der Einfluß von Cyclopamin und Cholesterinvorläufern auf die Shh-Signaltransduktion sollte anschließend genauer untersucht werden. Dazu wurde ein Sonic Hedgehog-responsiver Aktivitätsassay etabliert und in drei Zelllinien charakterisiert. Außerdem sollte die intrazelluläre Lokalisation Patched bestimmt werden und untersucht werden, ob das Proteintargeting durch Sonic Hedgehog-Inhibitoren und/oder Cholesterinvorläufer fehlgesteuert wird. Aus der Kombination der Ergebnisse von *in situ*-Hybridisierungen und Zellkultur-experimenten sollte abschließend ein detailliertes Modell der Wirkungsweise von Cholesterin in der Embryonalentwicklung und der gegenseitigen Beeinflussung von Cholesterinmetabolismus und Sonic Hedgehog-Signal entwickelt werden.

2 Ergebnisse

2.1 Embryonale Expressionsstudie

2.1.1 Expression von Cholesterinbiosynthese-Genen

Die Lokalisation der fötalen Cholesterinbiosynthese wurde bisher noch nicht im Detail untersucht. Aufgrund des großen Bedarfs an Cholesterin im Embryo wurde jedoch eine ubiquitäre Synthese mit erhöhter Produktion in der fötalen Leber angenommen (WOOLLETT, 2001). Die scheinbar spezifische Verbindung der Cholesterinsynthese zum Shh-Signalweg und der unerwartete Phänotyp der Cholesterinbiosynthese-Mutanten lassen aber an dieser Annahme zweifeln. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Hypothese aufgestellt, dass die fötale Cholesterinbiosynthese nicht ubiquitär sondern in einem distinkten Muster stattfindet und mutantenspezifische (diagnostische) Merkmale der bekannten Phänotypen von Cholesterinbiosynthese-Mutanten auf einer differenzierten Expression des jeweiligen Gens beruhen. Es wurden RNA-Sonden für folgende Gene angefertigt: *Nsdhl*, *Ebp* und *Dhcr7*, deren Assoziation mit Missbildungssyndromen bereits charakterisiert ist; *Hmgcr*, das *rate limiting step*-Enzym der Isoprenoidsynthese, und *Hsd17b7* und *Idi1*, die bisher noch nicht mit Syndromen in Verbindung gebracht wurden. *Hsd17b7* katalysiert den Schritt zwischen *Nsdhl* und *Ebp*, *Idi1* isomerisiert im Isopentenylidiphosphat zu Dimethylallyldiphosphat und *vice versa* und liegt im Syntheseweg damit zwischen *Hmgcr* und *Nsdhl*.

Die Expression der Cholesterinbiosynthese-Gene wurde im Zeitraum von Embryonaltag (E) 8 bis 14 untersucht. In diesen Stadien erfolgt die Neurulation (E8,0 bis etwa E10,0), die Gliedmaßenbildung (E10,0 bis > E14,0) und es beginnt die Organogenese (ab E9,0) mit der Entwicklung des Herzens als erstem funktionellen Organ (KAUFMAN & BARD, 1999). Der Shh-Signalweg ist während dieser Zeit an der Morphogenese fast aller Organe (KIM & MELTON, 1998; LITINGTUNG et al., 1998; PEPICELLI et al., 1998; TREIER et al., 2001), des Gehirns (EKKER et al., 1995; ROESSLER et al., 1997), der Gliedmaßen (DAHMANE & RUIZ-I ALTABA, 1999) und epithelialer Anhangsorgane (z. B. Haare, Zähne) (CHIANG et al., 1999; DASSULE et al., 2000; CHUONG et al., 2000) beteiligt. Die Mausmutanten entwickeln in diesen Stadien ihren charakteristischen Phänotyp, der bei homozygoten/hemizygoten Mäusen letal ist (KELLEY & HENNEKAM, 2000; HERMAN, 2000).

2 Ergebnisse

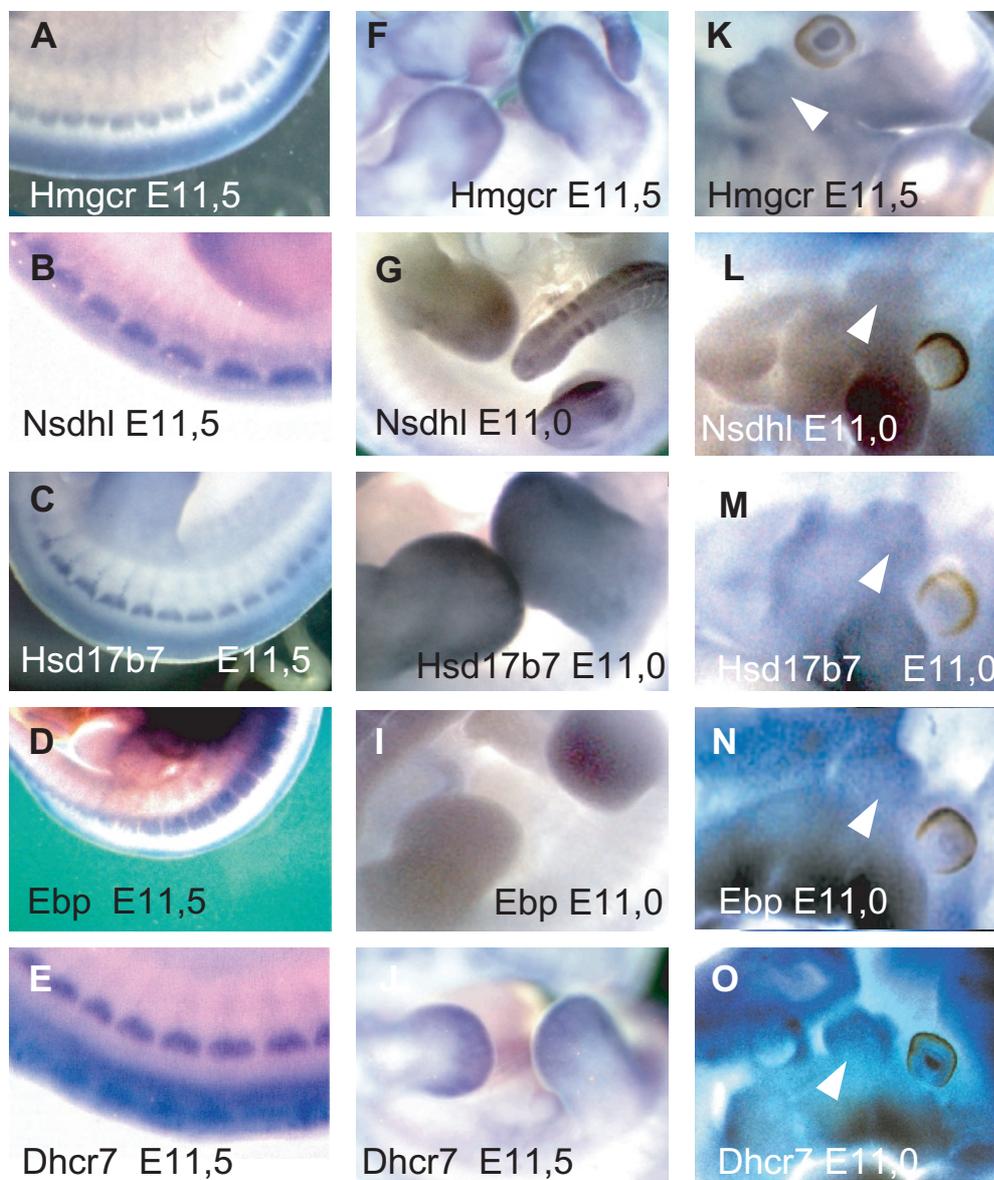


Abbildung 2.1: Expressionsmuster der Cholesterinbiosynthese-Gene um E11,5 der Embryonalentwicklung. **A-E** Intensive Signale für die untersuchten Enzyme werden in diesem Stadium in den Spinalganglien und im Neuralrohr beobachtet. **F-J** Expression in den Gliedmaßenknospen und auf einigen Abbildungen in der Schwanzspitze. **K-O** Expression im Trigemini-Ganglion (Pfeilspitze) sowie in den Kiemengebieten. Abkürzungen siehe S. 12.

2.1 Embryonale Expressionsstudie

Da es sich bei den untersuchten Enzymen um Proteine handelt, von denen angenommen wurde, sie würden ubiquitär exprimiert werden, war es besonders wichtig, unspezifische Färbung zu unterdrücken. Deshalb wurde die Heparin-Konzentration im Hybridisierungspuffer auf das 10fache erhöht und die Farbreaktion bei +4°C durchgeführt. Um möglichst spezifische Sonden für die einzelnen Gene herzustellen, wurden mittels BLAST-Suchen die unkonservierten Bereiche der cDNAs ermittelt und diese als SONDENSEQUENZ gewählt. Für jedes Gen wurden zunächst 2-3 verschiedene Sonden getestet und mit denen weitergearbeitet, die das intensivste Muster ergaben (Tab. 5.3, Seite 132).

Alle untersuchten Gene wurden in einem einheitlichen Muster exprimiert (Abb. 2.1). Lediglich *Idi1* unterschied sich an Tag 10 von den anderen Enzymen (Abb. 2.3). Ab E11,0 war das Muster jedoch für alle Enzyme identisch. *Hmgcr*, das für das Enzym des „committed step“ kodiert, und *Dhcr7*, das Gen für das letzte Enzym, zeigten konstant bei allen Versuchen die stärkste Expression. Die Hybridisierungen mit den entsprechenden *sense*-Sonden ergaben kein Signal (Abb. 2.2). Im folgenden sind meist die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierungen für *Hmgcr* oder *Dhcr7* exemplarisch angegeben.

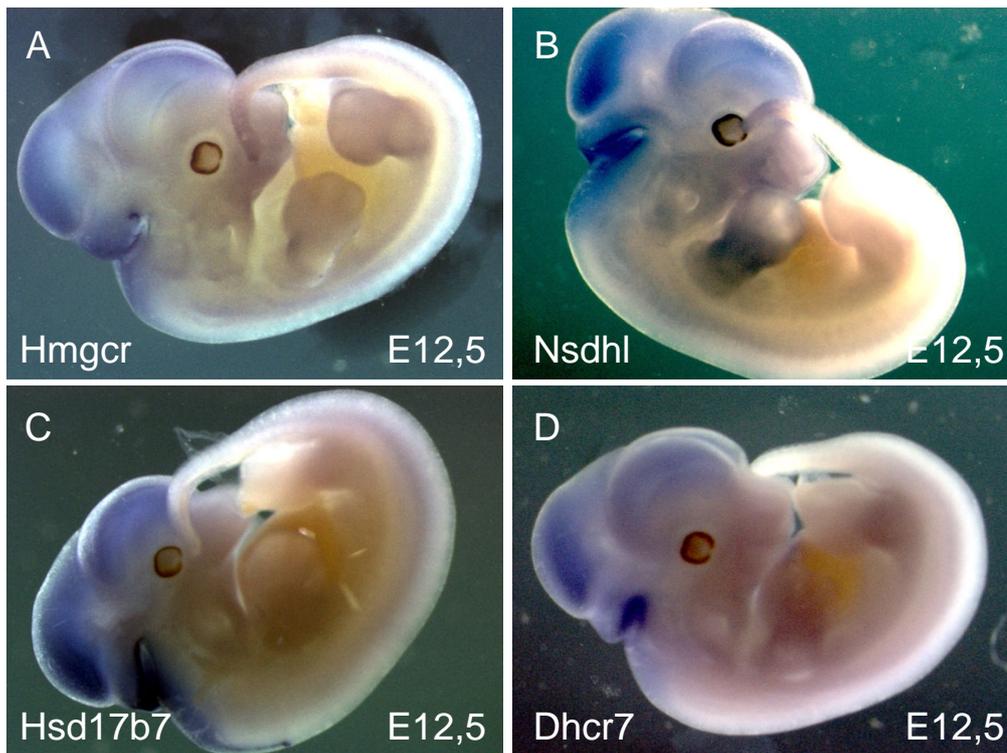


Abbildung 2.2: *in situ*-Hybridisierungen mit *sense*-Sonden ergeben kein spezifisches Signal. Exemplarisch sind E12,5-Embryonen nach der mRNA-*in situ*-Hybridisierung mit verschiedenen *sense*-Sonden gezeigt. Es ist lediglich eine sehr leichte Färbung im Gehirn zu erkennen. A *Hmgcr*; B *Nsdhl*; C *Hsd17b7*; D *Dhcr7*

An E8,5 der Schwangerschaft wurden hohe mRNA-Level für *Hmgcr* und *Dhcr7* in zwei scharfen Banden entlang der Mittellinie detektiert (Abb. 2.4).

2 Ergebnisse



Abbildung 2.3: Expression von *Idi1* an E10,0. *Idi1* zeigt als einziges der untersuchten Gene kurzzeitig (um E10,0) ein völlig anderes Expressionsmuster. Auffallend ist die scharf abgegrenzte Expressionsdomäne an der Vorder-Mittelhirn-Grenze. Sehr hohe mRNA-Level werden auch in Kiementaschen und Pronephros detektiert. An E10,0 wird keine Expression im Neuralrohr oder in den Spinalganglien beobachtet.

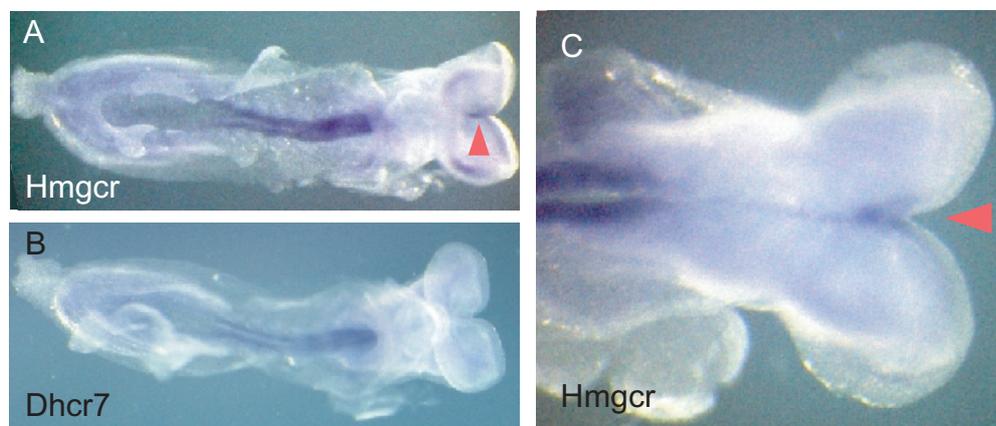


Abbildung 2.4: Expression von *Hmgcr* und *Dhcr7* an E8,5 der Schwangerschaft. **A,B** Hohe mRNA-Level von *Hmgcr* und *Dhcr7* werden im dorsalen Bereich des sich schließenden Neuralrohrs detektiert. Im *node* ist nur eine sehr schwache Expression zu beobachten. **C** *Hmgcr* wird außerdem im rostralen Ausläufer der Mittellinie im Bereich des zukünftigen Vorderhirns bis zum anterioren Teil des Hinterhirns exprimiert (Pfeilspitze). *Dhcr7* wurde in diesen Domänen nicht nachgewiesen.

Im Querschnitt wurden diese Bereiche als das dorsale Neuralrohr identifiziert, das als hochsensitiv gegenüber *Shh*-Stimulierung gilt. Laterales Plattenmesoderm, *Chorda dorsalis* und Neuralplatte zeigten keine Färbung. Im ebenfalls *Shh*-responsiven *node* waren beide Gene nur sehr schwach exprimiert. *Hmgcr* wurde außerdem im Bereich des zukünftigen Vorderhirns bis zum anterioren Hinterhirn in der Mittellinie exprimiert.

Ab E10,5 wurden hohe mRNA-Gehalte aller untersuchten Gene in verschiedenen Neuralleisten-Derivaten gefunden: Spinalganglien, kranialen Ganglien und Pharyngealbögen. Pharyngealbögen sind paarige ventrolaterale Auswüchse, die als rekapitulierte Anlagen der Kiemenbögen der ursprünglichen Vertebraten angesehen werden. Aus dem mandibularen Anteil des ersten Bogens (Mandibularbogen) bildet sich der Unterkiefer, aus dem maxillaren Anteil (Maxillarbogen) der Oberkiefer. Die Pharyngealbögen wiesen nicht von

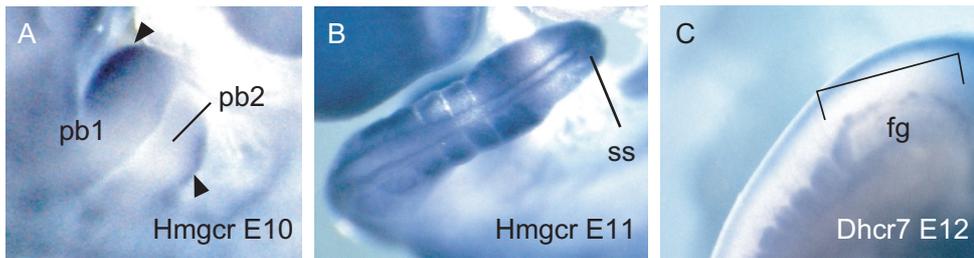


Abbildung 2.5: Details der Expression von Cholesterinsynthese-Genen. **A** Die Expression in den Pharyngealbögen (pb) beginnt etwa an E10,0 in pb1 anterior (Mandibularbogen) und in pb2 posterior. Diese anfänglichen Expressionsdomänen breiten sich bis E11,0 über die gesamten Pharyngealbögen aus. **B** Hohe mRNA-Level werden für alle untersuchten Gene in der Schwanzspitze von E9,5 bis E11,5 gefunden. **C** Von E11,0 bis E12,0 werden Hybridisierungssignale auch in den transienten Froriepschen Ganglien beobachtet. Diese Struktur wird etwa an E13,0 durch programmierten Zelltod aufgelöst. pb = Pharyngealbogen; fg = Froriepsche Ganglien; ss = Schwanzspitze

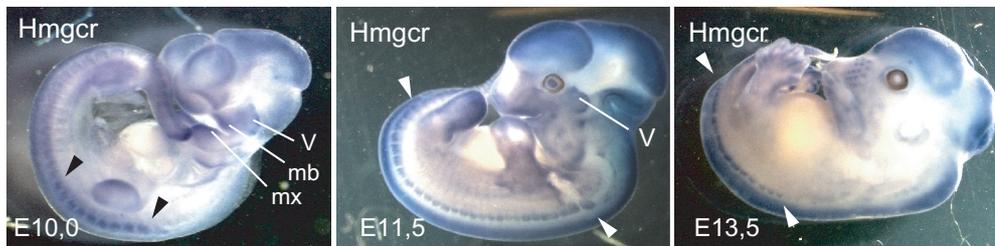


Abbildung 2.6: Dynamische Expression von Hmgcr in den Spinalganglien. Expression von Cholesterinbiosynthese-Enzymen ist von Tag 10 ab rostral beginnend in den neu gebildeten Spinalganglien zu beobachten. Von E11,0 bis etwa E12,5 sind alle Ganglien entlang der Körperachse gefärbt. Von da ab (>E13,0) verschwindet die Expression rostral beginnend. In diesen Abbildungen ist außerdem die konstante Expression im Gehirn ab E10,0 zu sehen sowie die Expressionsdomänen im Mandibular-, Maxillarbogen (E10,0) und im V. Hirnganglion (E10,0 und E11,5). mb = Mandibularbogen; mx = Maxillarbogen; V = V. Hirnganglion (*G. trigeminale*)

Beginn an eine komplette Färbung auf (Abb. 2.5 A und Abb. 2.6 E10,0). Vielmehr begannen sich die Expressionsdomänen der Cholesterinsynthese-Gene etwa an E10,0 im ersten Pharyngealbogen von anterior (maxillarer sowie mandibularer Anteil) und im zweiten Pharyngealbogen von posterior ausgehend auszudehnen. An E11,0 wurden die mRNAs der Enzyme in den kompletten Pharyngealbögen detektiert (Abb. 2.1 K-O), die ebenfalls Shh-Zielzellen enthalten (AHLGREN & BRONNER-FRASER, 1999).

Die Expression in den Spinalganglien wurde zuerst rostral in den neu gebildeten Ganglien (E10,0) detektiert. An E11,0 und E12,5 waren alle Spinalganglien sowie die transienten *Froriepschen* Ganglien gefärbt. Ab etwa E13,0 zog sich die Expression Richtung caudal zurück (Abb. 2.6).

Von den kranialen Ganglien konnten das Trigeminus- (Fünftes Kopfganglion, *G. trigeminale*) und das Vagus-Ganglion (Zehntes Kopfganglion) als Ex-

2 Ergebnisse

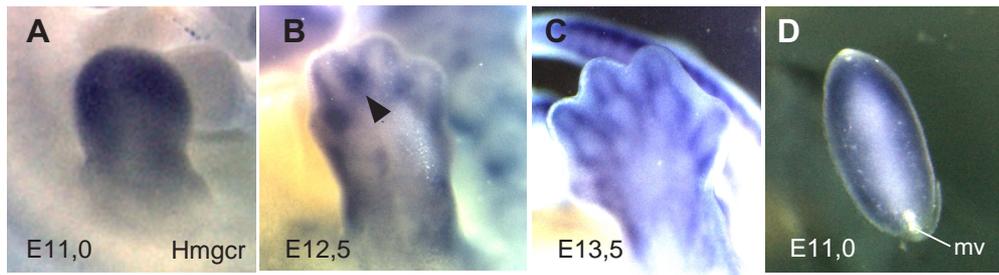


Abbildung 2.7: Expression von Hmgcr während der Gliedmaßenentwicklung. **A** Bis Tag 11 waren hohe mRNA-Level in der gesamten Gliedmaßenknospe detektierbar. **B** Danach beschränkte sich die Expression mehr und mehr auf die interdigitalen Bereiche (E12,0) und schließlich auf das die Vorknorpelkondensation angrenzende Gewebe (C). An E12,0 (**B**) wurde eine besonders intensive Färbung an den Verzweigungsstellen der Finger beobachtet (Pfeilspitze). Mit dem Fortschreiten der Fingerentwicklung war Hmgcr-mRNA auch in den Gelenken der Fingerknochen detektierbar. **D** Ein transversaler Schnitt durch eine Gliedmaßenknospe an E11,0 zeigt, dass sich die Expression auf die lateralen Bereiche beschränkt und zum Zentrum hin schwächer wird. Die zukünftigen Finger sind bereits als Aussparung des Expressionsterritoriums leicht angedeutet. mv = Marginalvene.

pressionsorte identifiziert werden. Die Expression blieb zumindest für das *G. trigeminale* über den untersuchten Zeitraum hinweg bestehen.

In den Gliedmaßenknospen der vorderen und hinteren Extremitäten wurde ebenfalls ein dynamisches Expressionsmuster der Cholesterinbiosynthese-Gene entdeckt (Abb. 2.7). Hohe mRNA-Level der Enzyme wurden detektiert sobald die Knospenansätze erkennbar waren (ab etwa E9,5). Ab E12,0 konzentrierte sich die Expression zunehmend auf die interdigitalen Bereiche, während sie sich bis dahin über die gesamten Gliedmaßen erstreckte. Ein transversaler Schnitt durch die Gliedmaßenknospe eines 11,5 Tage alten Embryos zeigte, dass sich die Färbung auf das marginale Gliedmaßenmesenchym beschränkte und zum Zentrum hin abnahm. Die zukünftigen Finger deuteten sich ab diesem Zeitpunkt bereits als Aussparung der Expressionsdomäne an und wurden zunehmend deutlicher abgegrenzt. Weder im AER (*apical ectodermal ridge*) noch in den Marginalvenen wurde eines der Enzyme detektiert. An E13,5 wurden hohe mRNA-Gehalte nur noch in dem Gewebe gefunden, das direkt die Finger umschloss, und an den Kontaktstellen der Fingerknochen (Abb. 2.7).

Eine ähnliche Dynamik des Expressionsmusters wurde im Neuralrohr beobachtet. Dort begann die Expression spätestens an Tag 8 im dorsalen, gerade geschlossenen Neuralrohr, um sich dann auf das gesamte Neuralrohr auszubreiten. Die Neuralplatte zeigte jedoch zu keinem Zeitpunkt eine Färbung. Ab etwa E11,5 wurden die Cholesterinsynthese-Enzyme nur noch in den ventrolateralen (motoneuralen) und dorsozentralen Bereichen detektiert (Abb. 2.8).

An E13,0 ließ sich die mRNA der Enzyme durch *whole mount in situ*-Hybridisierung noch im Neuralrohr, in den caudalen Spinalganglien, den interdigitalen Domänen sowie in den Follikeln der Schnurhaare nachweisen. In

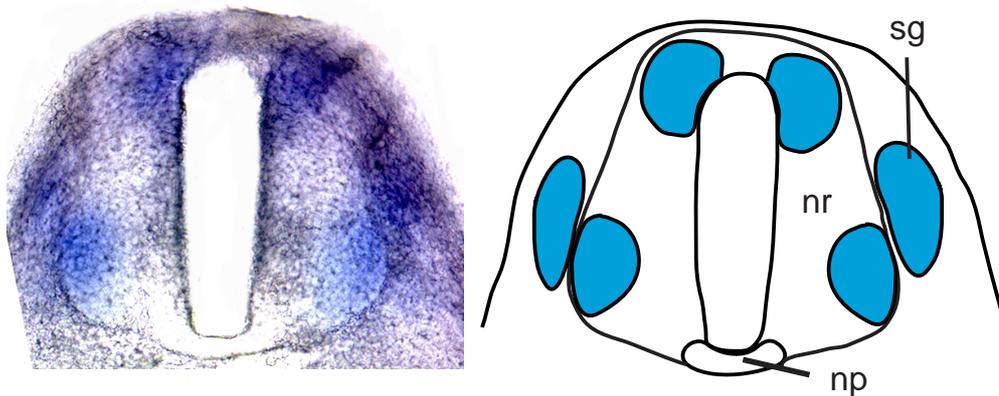


Abbildung 2.8: Expression von *Nsdhl* im Neuralrohr. An E11,5 der Embryonalentwicklung werden die Cholesterinbiosynthese-Gene in den Motoneuronen und im dorsozentralen Bereich des Neuralrohrs exprimiert. nr = Neuralrohr; sg = Spinalganglien; np = Neuralplatte

Abb. 2.9 A kann man erkennen, daß die Enzyme kreisförmig um das Follikelzentrum exprimiert wurden, in dem große Mengen *Shh* nachweisbar waren (Abb. 2.9 B). Der *Shh*-Rezeptor *Patched* wird in einem vergleichbaren Muster um Haarfollikel exprimiert (MILENKOVIC et al., 1999).

Von E10,0 bis E13,5 konnte eine starke Expression der Enzyme im gesamten Gehirn nachgewiesen werden (Abb. 2.6). Da häufig unspezifische Färbung durch Präzipitate des BM-Purple-Substrats in den Ventrikeln eine Expression nur vortäuscht, wurden die Hohlräume im Gehirn durch Subcutannadeln vor der Hybridisierung perforiert. Dadurch konnte die Substratpräzipitation reduziert und vorhandener Niederschlag ausgewaschen werden. Die Färbung im Gehirn blieb trotz dieser Maßnahme erhalten und konnte auch durch Schnitte bestätigt werden.

In keinem der untersuchten Stadien (<E14,5) konnten Cholesterinbiosynthese-Enzyme in der Leber gefunden werden. Deshalb wurden 13,0 und 14,0 Tage alte Embryonen für die Hybridisierung sagittal halbiert, um den Kontakt der Hybridisierungslösungen und Sonden mit der Leber zu garantieren. In diesen Fällen wurde an der Schnittstelle im Bereich der Leber punktförmig mRNA der Enzyme detektiert. Im selben Stadium wurde *Nsdhl* in den Nasenlöchern exprimiert (Abb. 2.9 C), während keines der anderen untersuchten Cholesterinbiosynthese-Enzyme dort gefunden wurde.

2.1.2 Expression von steroidogenen Enzymen

Um der Frage nachzugehen, ob das lokal gebildete Cholesterin weiter in Steroidhormone umgesetzt wird oder das Endprodukt der Synthese darstellt, wurden *whole mount* mRNA *in situ*-Hybridisierungen von Cholesterin-Monooxygenase (*P450_{scc}*) und 17β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1

2 Ergebnisse

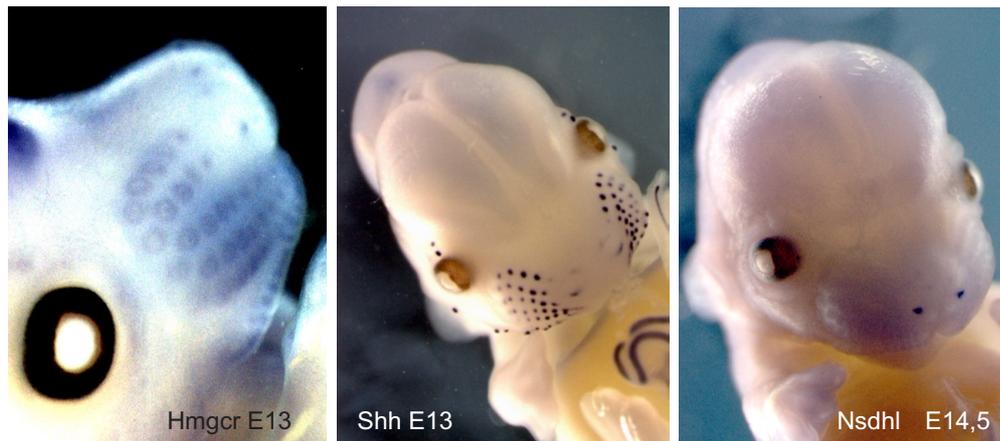


Abbildung 2.9: Expression im Gesicht. Hmgcr wurde um E13,0 kreisförmig um die Follikel der Schnurrhaare detektiert. Im Vergleich dazu war Shh-Expression im gleichen Stadium nur im Zentrum der Follikel lokalisiert. Nsdhl wurde als einziges der untersuchten Enzyme um E14,5 in den Nasenlöchern exprimiert.

(Hsd17b1) durchgeführt. P450scc katalysiert den ersten Schritt der Steroidogenese, der bei der Produktion jedes Steroidhormons stattfindet (siehe Abb. 2.11). Hsd17b1 ist an der Umsetzung von Östron zu Östradiol und somit an der Bildung der biologisch aktiven Östrogenform beteiligt.

Mittels mRNA *in situ*-Hybridisierung konnte für keines der beiden Enzyme ein den Cholesterinbiosynthese-Enzymen vergleichbares Expressionsmuster nachgewiesen werden. P450scc konnte an E10,0 und E11,5 im Vorder- und Hinterdarm detektiert werden, für Hsd17b1 war überhaupt keine Expression während der untersuchten Stadien nachweisbar (Abb. 2.10).

Fazit

Durch *whole mount* mRNA *in situ*-Hybridisierung wurde ein nicht-ubiquitäres und einheitliches Expressionsmuster für Hmgcr, Nsdhl, Hsd17b7, Ebp und Dhcr7 festgestellt. Die mRNA dieser Enzyme konnte in mehreren Shh-responsiven Geweben, Neuralleistenderivaten, dem ZNS und den Gliedmaßen nachgewiesen werden. In Abb. 3.1 auf S. 74 ist eine schematische Zusammenfassung der beobachteten Expression zu sehen. Die steroidogenen Enzyme Hsd17b1 und P450scc zeigten kein bzw. kein vergleichbares Expressionsmuster.

2.1 Embryonale Expressionsstudie

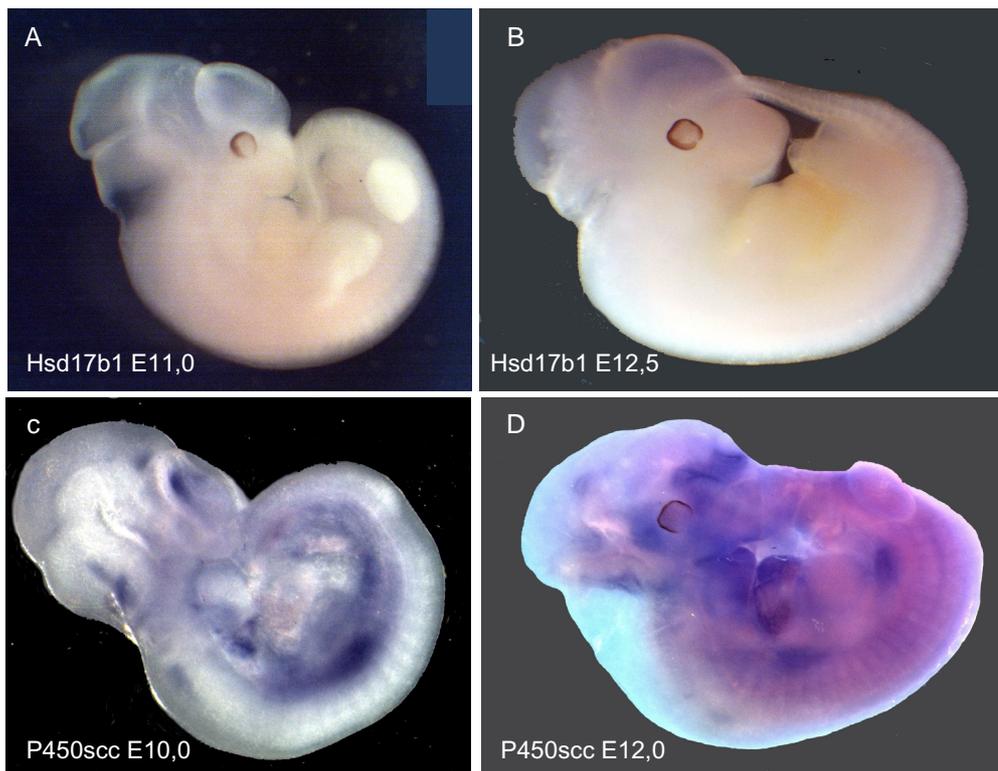


Abbildung 2.10: Expressionsmuster von HSD17b1 und P450scc. **A, B** Hsd17b1 zeigt keine Expression an E11,0 und E12,5 der Schwangerschaft. **C** P450scc wurde an Tag 10,0 im Darm und teilweise im Vorderhirnventrikel detektiert. **D** An E12,0 wird P450scc-mRNA in Vor- und Hinterdarm beobachtet. In Spinalganglien oder Gliedmaßenknospen ist keine Expression zu sehen.

2.2 Phylogenetische Analyse von Steroidsignalwegen

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse werfen interessante Fragen auf: Waren Cholesterinderivate ein entscheidender morphogenetischer Faktor bei der Entstehung von Vertebraten-spezifischen Merkmalen? Ist der Steroidsignalweg wirklich in einem Protovertebraten entstanden, wie Baker (BAKER, 2001) postuliert hat, oder handelt es sich bei ihm um ein altertümliches metabolisches Merkmal? Gibt es signifikante Hinweise, dass der Steroidsignalweg aus dem Retinsäure-Signalweg entstanden ist, der in einer Vielzahl von modernen Organismen eine wichtige morphogenetische Funktion besitzt? Als Hintergrund für die Bearbeitung dieser Fragestellungen wurde eine phylogenetische Analyse des Steroidhormonsignalwegs durchgeführt. In Abb. 2.11 ist die Steroidogenese als Schemazeichnung zu sehen. Die in die Analyse einbezogenen Enzyme sind nummeriert. Bei dieser Untersuchung sollten die evolutionären Vorläufer dieser Proteine festgestellt werden. Es sollte eingegrenzt werden, welche ursprüngliche Substrat-/Liganden-Spezifität diese besaßen und in welchen Organismen die Proteine vorkommen. Die Zusammenstellung der Datensätze sowie das nachfolgende Alignment sind die kritischsten Schritte bei der Berechnung einer aussagekräftigen phylogenetischen Analyse. Deshalb wurde versucht, die folgenden Kriterien bei der Auswahl der Proteinsequenzen zu erfüllen:

- Sequenzen mit offensichtlichen Sequenzierlücken und Sequenzfragmente wurden verworfen, weil sie von den verwendeten Algorithmen nicht korrekt behandelt werden. Sie können jederzeit nachträglich in die Analyse einbezogen werden, um Detailfragen zu klären, z. B. wenn für einen besonders interessanten Organismus nur eine Teilsequenz bekannt ist.
- Jeder Datensatz wurde mit mehreren Verfahren analysiert und deren Resultate verglichen, um festzustellen, welche Teile der Topologie Modellabhängig sind und welche zuverlässig die Struktur des Datensatzes wiedergeben.
- Es wurden, wenn möglich, enzymologisch oder genetisch charakterisierte Sequenzen gewählt, um Aussagen über die Funktion oder Substratspezifität der evolutionären Vorläufer zu ermöglichen.
- Für jede Enzymfamilie oder -gruppe wurde eine möglichst große Vielfalt von Organismen in die Analyse einbezogen. Neben den cholesterinauxotrophen Ecdysozoa wurde besonders auf Sequenzen aus Cephalochordaten (z. B. Amphioxus) und Agnatha (z. B. Petromyzonten) geachtet, die als Schwestergruppen der Vertebrata bzw. der Gnathostoma Aufschluss über das Übergangsfeld von Invertebraten zu Vertebraten versprechen.

Nach vorläufigen Analysen wurde die Redundanz der Datensätze so weit wie möglich, d. h. ohne nötige Informationen zu verlieren, reduziert, um Hand-

2.2 Phylogenetische Analyse von Steroidsignalwegen

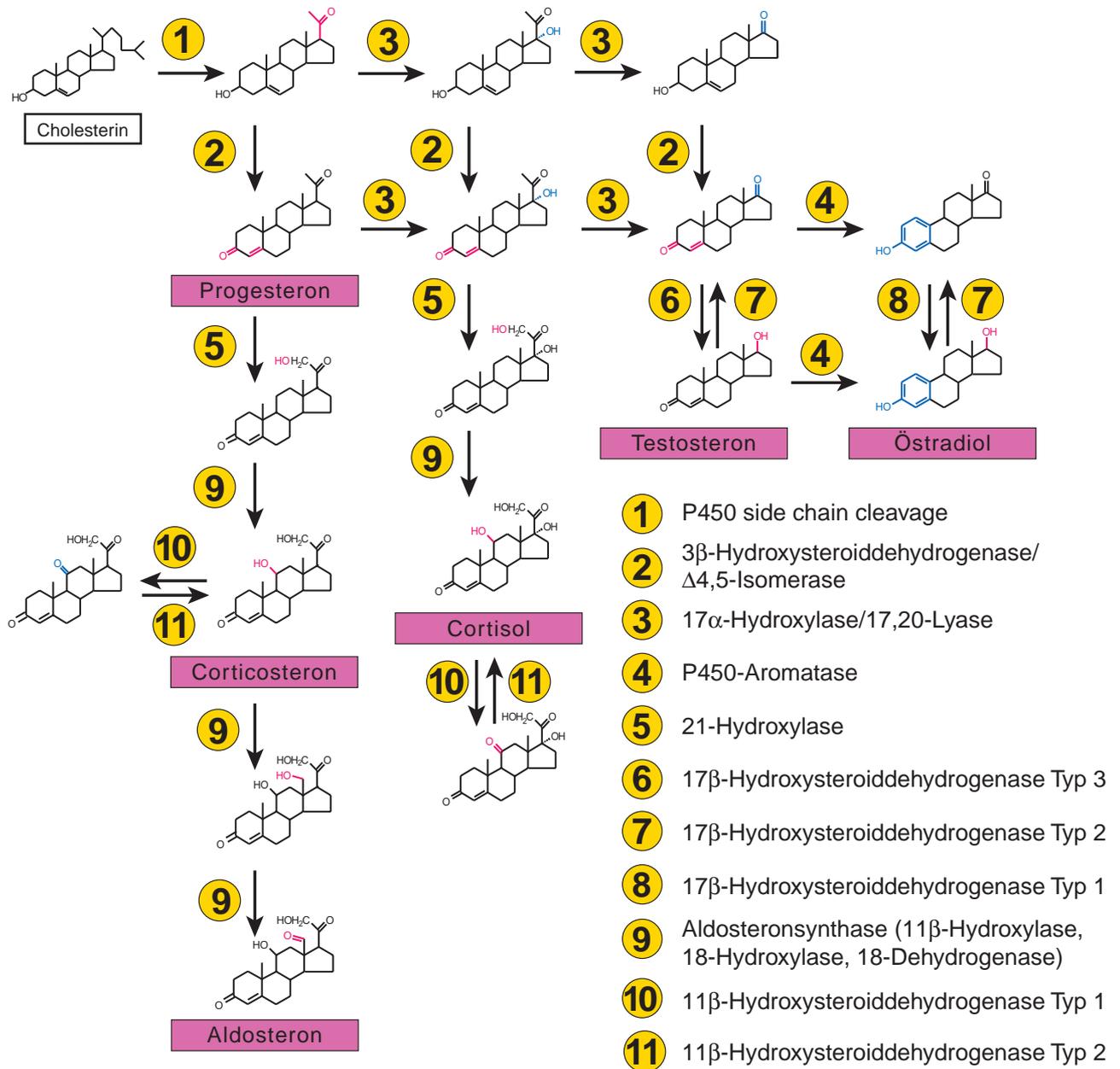


Abbildung 2.11: Überblick der Steroidhormon-Synthese ab Cholesterin. In den Molekülstrukturen ist jeweils die von der enzymatischen Umsetzung betroffene Atomgruppe rot (senkrecht) bzw. blau (waagrecht) hervorgehoben. Die Reaktionen der jeweiligen Enzyme sind durch die Nummern gekennzeichnet. Die meisten der Enzyme können verschiedene Substrate umsetzen, manche besitzen mehrere katalytische Funktionen, z. B. Aldosteronsynthese (9).

2 Ergebnisse

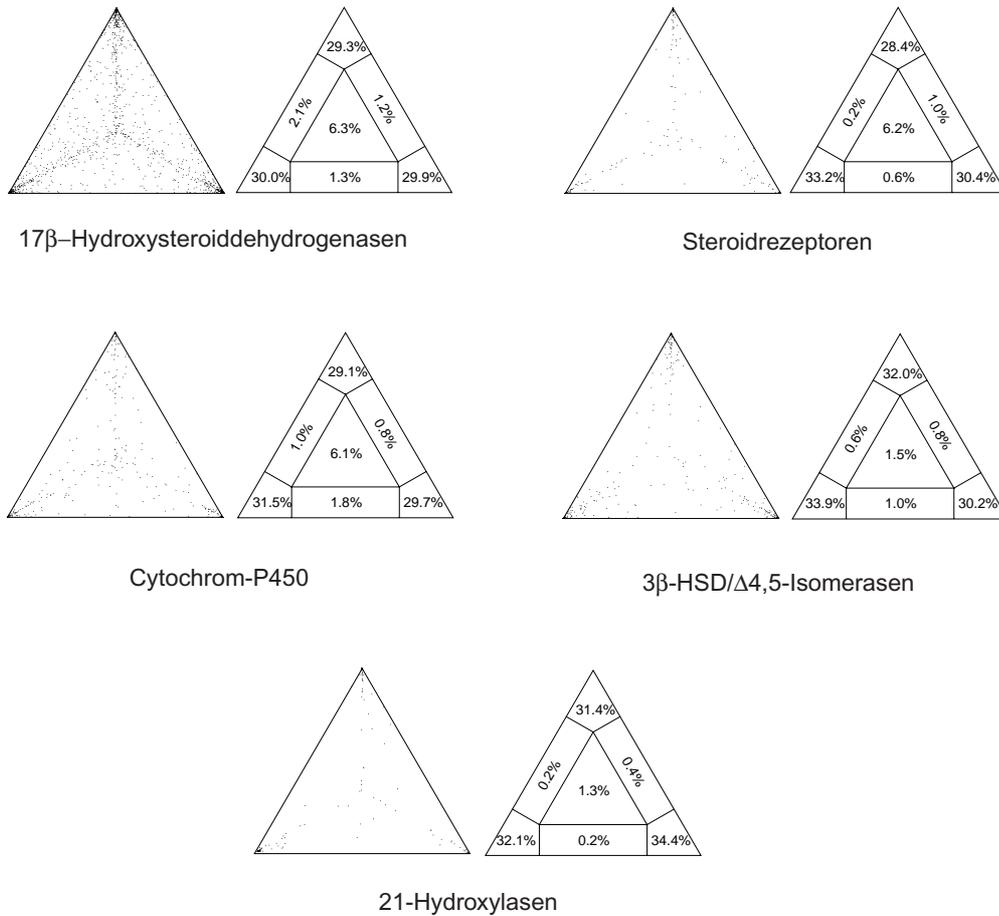


Abbildung 2.12: *Maximum-Likelihood-Mapping* zur Bestimmung der Qualität der phylogenetischen Information, die in den einzelnen Datensätzen enthalten ist. Die Punkte stellen Wahrscheinlichkeitsvektoren für verschiedene Topologien dar. Punkte in der Mitte des Dreiecks bedeuten unaufgelöste Topologien. Je mehr Punkte sich in den Ecken befinden, desto höher ist der phylogenetische Informationsgehalt eines *Alignments*. Alle verwendeten Datensätze sind hochinformativ (etwa 90% aufgelöste Topologien).

habbarkeit und Übersichtlichkeit der resultierenden Stammbäume zu verbessern. Die mit Hilfe der BLINK-Funktion auf der Entrez-Webseite zusammengetragenen Sequenzen, wurden mit dem Programm BIOEDIT bearbeitet und aliniert. Für jeden Datensatz wurde ein *Maximum-Likelihood-Mapping* durchgeführt, um den phylogenetischen Informationsgehalt zu bestimmen, d. h. es wurde überprüft, ob er sich für eine phylogenetische Rekonstruktion eignet (STRIMMER & VON HAESLER, 1997). Das Ergebnis war für alle Datensätze ausgezeichnet (Abb. 2.12). Der größte Teil der Wahrscheinlichkeitsvektoren (die als Punkte dargestellt sind) verteilte sich auf die Ecken des Dreiecks (in den meisten Fällen >90 %). Nur wenige der untersuchten Quartetts haben eine nicht-aufgelöste Topologie (Punkte in der Mitte der Diagramme). Die aus diesen Datensätzen errechneten Stammbäume sollten also hoch-aufgelöst sein, d.

h. eine nicht-informative sternförmige Topologie war nicht zu erwarten.

Die bearbeiteten Datensätze wurden mit vier methodisch unterschiedlichen Algorithmen analysiert: *Neighbour-Joining*, *Parsimony*, *Fitch* und *Maximum-Likelihood*-Stammbaumrekonstruktion. Im folgenden ist für jeden Datensatz ein exemplarischer Stammbaum gezeigt. Durch Analyse der *Bootstrap*-Unterstützung einzelner Verzweigungen und *majority rule*-Vergleiche wurde versucht, Widersprüche zwischen den Algorithmen aufzulösen und das wahrscheinlichste Verzweigungsmuster zu bestimmen. Kleinere Unsicherheiten bezüglich der Positionen einzelner Proteine innerhalb großer monophyletischer Gruppen, die die Gesamtaussage nicht berührten, wurden jedoch toleriert.

2.2.1 Cytochrom P450-Familie

P450*side-chain cleavage* ist das einzige bekannte Enzym, das Cholesterin zu Pregnenolon umsetzt, und damit den ersten Schritt der Steroidogenese katalysiert. Die Reaktion läuft unter Kontrolle des *steroidogenic acute regulatory*-Proteins (StAR) in den Mitochondrien ab, wobei der nötige Elektronentransfer zum Cytochrom von Adrenodoxin übernommen wird. Das entstehende Pregnenolon wird anschliessend zur weiteren Umsetzung ins ER transportiert. Die Transkription des P450*scc*-Gens wird wahrscheinlich durch mehrere Transkriptionsfaktoren reguliert. Z. B. wurde die Aktivierung durch *steroidogenic factor-1* (SF-1) in Nebenniere und Testis gezeigt (LUO et al., 2001). Die embryonale Expression von P450*scc* in Neuralleistenderivaten und in den Gliedmaßenknospen scheint dagegen SF-1-unabhängig zu sein (KEENEY et al., 1995). Weitere steroidogene Mitglieder der P450-Familie sind 21-Hydroxylasen, Aldosteronsynthasen (11 β -Hydroxylasen) und 17 α -Hydroxylasen/17,20-Lyasen. Jedes dieser Enzyme kann verschiedene Steroid-Substrate umsetzen und teilweise sogar verschiedene Reaktionen katalysieren.

Die Cytochrom P450-Familie wurde für die Analyse aufgrund ihrer Größe aufgeteilt in P450*scc*-Familie einerseits und 21-Hydroxylasen und 17 α -Hydroxylasen/17,20-Lyasen andererseits. Die beiden Gruppen wurden getrennt analysiert und in der Zusammenfassung (Abb. 2.19) wieder zusammengeführt. Es wurde keine einzige Sequenz aus einem frühen Vertebraten, wie z. B. *Petromyzon*, oder einem Vertebraten-Vorläufer gefunden. In Tab.5.6 (S. 135) sind die im Datensatz enthaltenen Proteine aufgeführt. Abb. 2.14 zeigt den *Most Parsimonous*-Stammbaum der P450*scc*-Familie. Es ergab sich eine Topologie mit vier monophyletischen Gruppen: P450*scc*, 11 β -Hydroxylasen, Vit-D3-Hydroxylasen, Cyp12-Hydroxylasen und Cytochrome P450 aus Pflanzen, die als *Outgroup* gewählt wurden. Das gezeigte Verwandtschaftsverhältnis wurde von allen verwendeten Algorithmen unterstützt.

Lediglich die Stellung des Cyp10-Proteins von *Lymnaea stagnalis* (ls-CYP10) war nicht eindeutig. Die Süßwasser-Schnecke *Lymnaea* ist als Mollusk eines der seltenen Beispiele für einen sterol-autotrophen Nicht-Ecdysozoa-Invertebraten in diesen Datensätzen. Das macht die genaue Analyse

2 Ergebnisse

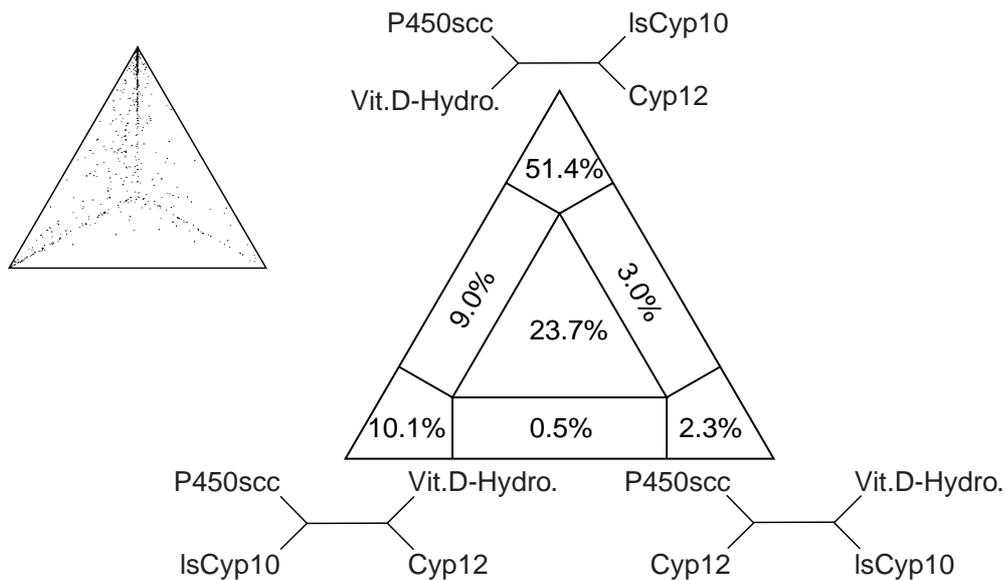


Abbildung 2.13: *Four-Cluster Maximum-Likelihood-Mapping* nach Strimmer und von Haeseler zur Ermittlung der Position des *Lymnaea*-Enzyms. An den Ecken sind die getesteten Topologien angegeben. Über 50 % der Wahrscheinlichkeitsvektoren befinden sich in der Ecke, die für eine Zugehörigkeit zur Cyp12-Gruppe steht.

der Position dieses Proteins sehr interessant. Der in Abb. 2.14 gezeigte *Parsimony*-Stammbaum ordnet die Cyp10-Hydroxylase den P450scc-Cytochromen und 11β -Hydroxylasen zu. Dagegen wurde mit dem *Fitch*-Algorithmus (nicht gezeigt) eine Zugehörigkeit zum Phylum der Cyp12-Cytochrome berechnet, während beim *Maximum-Likelihood* keine Ähnlichkeit zu irgendeiner der Gruppen erkannt wurde. Um die wahrscheinlichste Position des *Lymnaea*-Proteins zu ermitteln, wurde der Datensatz einem *Four-Cluster Maximum-Likelihood-Mapping* nach Strimmer und von Haeseler (1997) unterzogen, bei dem die P450scc/ 11β -Proteine als Gruppe a, die Vit. D-Hydroxylasen als Gruppe b, die *Drosophila*-Cyp12-Proteine als Gruppe c und schließlich Is-CYP10 als Gruppe d definiert wurde. Das Ergebnis ist als Grafik in Abb. 2.13 gezeigt. Jede Ecke des Dreiecks entspricht einer der drei möglichen Topologien. Es zeigt sich, dass in diesem Modell tatsächlich eine eindeutige Festlegung einer bevorzugten Topologie möglich ist: 51,4 % der Wahrscheinlichkeitsvektoren sprechen für eine Position des *Lymnaea*-Proteins in der Gruppe Cyp12. Eine Zugehörigkeit zu den Vit. D3-Hydroxylasen kann dagegen nahezu ausgeschlossen werden. Die Wahrscheinlichkeit dieser Konstellation beträgt nur 2,3 %. Auch eine Position in Gruppe a (P450scc und 11β -Hydroxylasen) ist in diesem Modell mit 10,1 % nur gering unterstützt.

Mit Ausnahme des Phylums Cyp12 (und der *outgroup*) bestehen alle Monophyla ausschließlich aus Vertebraten-Proteinen, die ein Steroid (entweder Cholesterin, Aldosteron oder Vitamin D3) als Substrat umsetzen. Der nächste Verwandte der steroidogenen P450scc-Proteine und 11β -Hydroxylasen sind

2.2 Phylogenetische Analyse von Steroidsignalwegen

die Vitamin-D-Hydroxylasen.

In Abb. 2.15 ist das Resultat der *Neighbour-Joining*-Analyse des restlichen Teils der P450-Familie, 21-Hydroxylasen und 17 α -Hydroxylasen/17,20-Lyase, zu sehen. Auch bei diesem Datensatz war eine gute Übereinstimmung aller vier verwendeten Algorithmen zu verzeichnen. Mit Cyp1-Cytochromen als *Outgroup* ergaben sich für die 21-Hydroxylasen und 17 α -Hydroxylasen/17,20-Lyase sterol-metabolisierende 16 α -Hydroxylasen als direkter Vorläufer. Während letztere bei den Metazoa weit verbreitet zu sein scheinen, fanden sich die steroidogenen 21-Hydroxylasen und 17 α -Hydroxylasen/17,20-Lyase nur in Vertebraten. Ein nahe verwandtes Retinol-/Retinsäure-Substrat umsetzendes Protein wurde auch in diesem Fall nicht identifiziert.

2 Ergebnisse

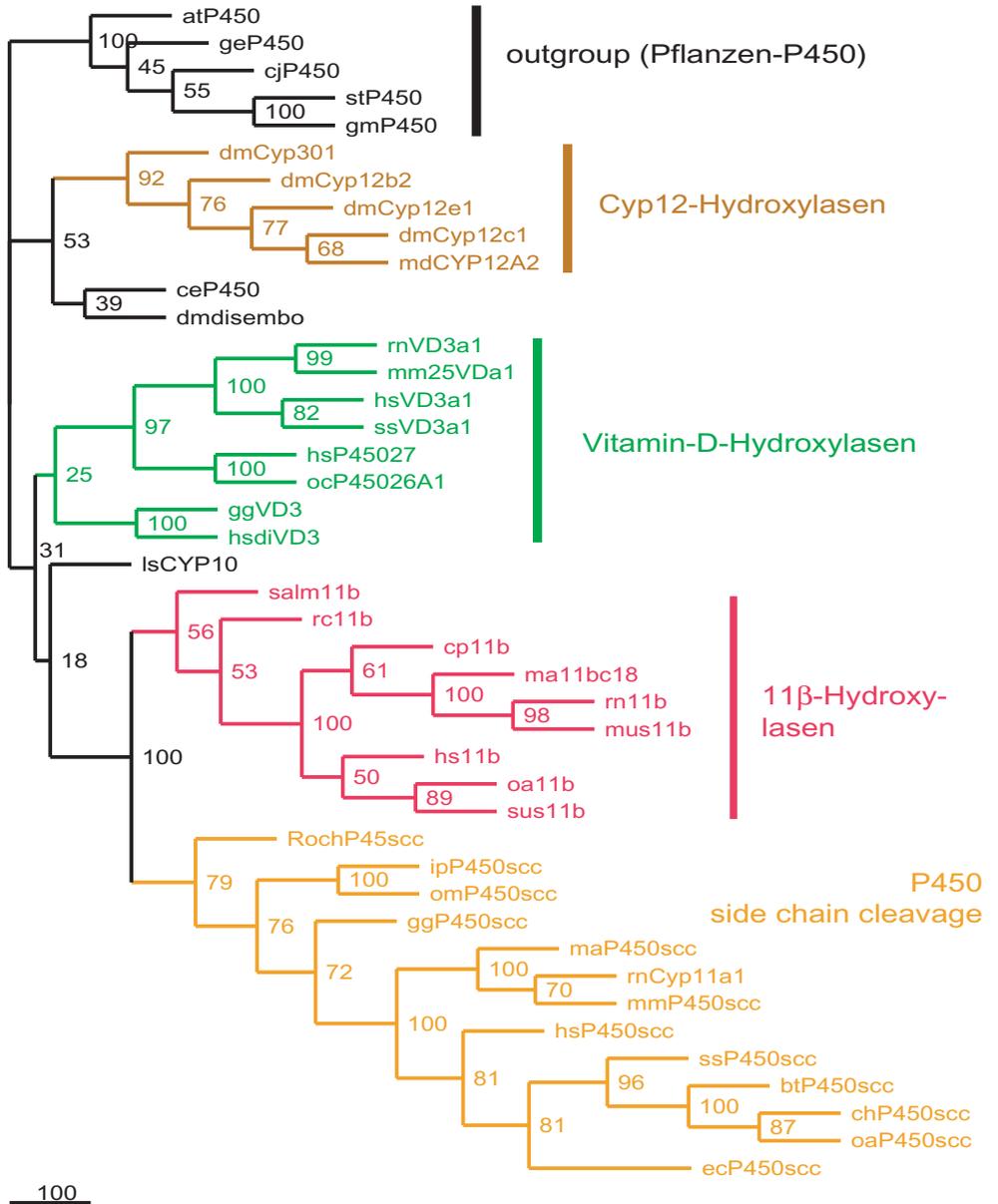
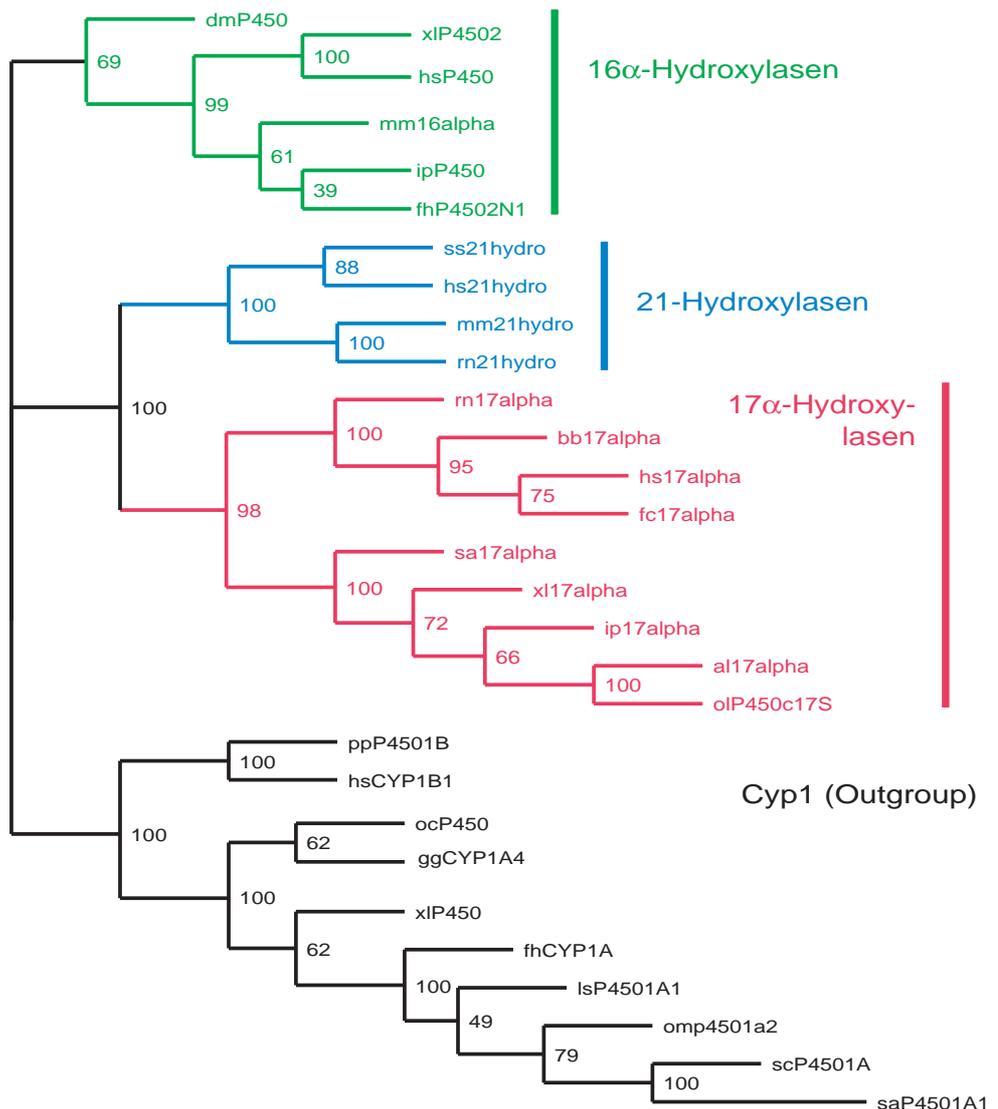


Abbildung 2.14: Stammbaumrekonstruktion für die P450scc-Familie berechnet mit dem *Parsimony*-Algorithmus. Die Zahlen an den Verzweigungen stellen die *Bootstrap*-Unterstützungen für 100 Pseudoreplikate dar. Werte über 50 kennzeichnen gut abgesicherte Dichotomien. Mit Pflanzen-Cytochromen als *Outgroup* ergaben sich vier monophyletischen Gruppen, die farblich hervorgehoben sind: P450-*side-chain cleavage*, 11β-Hydroxylasen, Vitamin-D-Hydroxylasen und Cyp12-Hydroxylasen. Das *Lymnaea*-Protein wird bei diesem Verfahren den 11β-Hydroxylasen und P450scc's zugeordnet. Die *Bootstrap*-Unterstützung beträgt allerdings nur 18 %. Siehe Text für eine detaillierte Beschreibung des Stammbaums. Die Abkürzungen sind in Tab. 5.6 beschrieben.

2.2 Phylogenetische Analyse von Steroidsignalwegen



_10

Abbildung 2.15: Stammbaum der 17α -Hydroxylase/17,20-Lyase-Familie berechnet mit dem *Neighbour-Joining*-Algorithmus. An den Verzweigungen ist die Bootstrap-Unterstützung für 100 Pseudoreplikate angegeben. Werte über 50 kennzeichnen gut abgesicherte Dichotomien. Der Datensatz zerfällt mit sehr hoher *Bootstrap*-Unterstützung in vier monophyletische Gruppen: 16α -Hydroxylasen, 21-Hydroxylasen, 17α -Hydroxylasen und Cyp1-Cytochrome (*Outgroup*).

2.2.2 Hydroxysteroiddehydrogenase-Familie

Die Hydroxysteroiddehydrogenasen (HSDs) gehören zur Familie der *short-chain* Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR oder SCAD), einer komplexen Enzymfamilie mit derzeit mehr als 1000 bekannten Mitgliedern. An der Steroidogenese in Säugetieren sind mehrere verschiedene HSDs beteiligt (siehe Abb.

2 Ergebnisse

2.11: Die 3β -HSD/ $\Delta 4,5$ -Isomerase setzt durch Oxidation der Hydroxylgruppe an Position C3 des Grundgerüsts 3-Hydroxysteroiden zu den entsprechenden Ketonen um. Die 11β -HSD Typ 1 und 2 katalysieren die Umsetzung von Cortisol zu Cortison und *vice versa*, wobei Typ 1 die Hydroxylgruppe an Position C11 oxidiert und Typ 2 an Position C11 reduziert. Und schließlich die 17β -HSDs, die den letzten Schritt in der Synthese von Testosteron (Typ 3) und Östradiol (Typ 1) durch Reduktion des Sauerstoffs an C17 katalysieren. 17β -HSD Typ 2 inaktiviert beide Hormone durch Oxidation an Position C17. 17β -HSDs regulieren den Level von aktiven, mitogenen Steroidhormonen und sind daher auch mit der Entstehung von hormonabhängigen Tumoren (z. B. Brustkrebs) in Zusammenhang gebracht worden.

HSDs sind in einer Vielzahl von Organismen vertreten, wo sie unterschiedliche Funktionen besitzen und teilweise in den einzelnen Organismen ganz spezifisch zur Anpassung an bestimmte Lebensräume dienen (ASHBURNER, 1998). Das gilt auch für die steroidogenen HSDs in Vertebraten, die Mineralhaushalt, Stoffwechsel und Fortpflanzungsbiologie regulieren. Es wird vermutet, dass sie aus Vorläufern mit anderen Substraten (z. B. Retinsäure) entstanden sind (BAKER, 1996). In der phylogenetischen Analyse der vorliegenden Arbeit wurde die Entstehungsgeschichte der steroidogenen HSDs rekonstruiert, um diese Vorläufer zu ermitteln und Rückschlüsse auf die Funktion der frühen HSDs zu ziehen.

Aufgrund ihrer Größe wurde die HSD-Familie in 17β - und 3β -HSDs aufgeteilt. Die in der Analyse verwendeten Proteine sind in Tab. 5.7 (17β -HSDs) auf Seite 136 in Tab. 5.5 (3β -HSDs) auf Seite 134 angegeben. Der Stammbaum der 17β -HSD-Gruppe (Abb. 2.16) zeigt im wesentlichen eine Einteilung der Sequenzen in vier monophyletische Gruppen. Die größte wird von *cis*-Retinol-/Hydroxybutyrat-Dehydrogenasen gebildet, die die 17β -HSDs vom Typ 6 und 9 als auch die 3α -HSD enthält. Keines dieser Enzyme spielt eine Rolle in der Steroidogenese. Typ 9 besitzt neben einer Retinoldehydrogenase- auch eine 3α -HSD-Aktivität, d. h. das Enzym kann *in vitro* sowohl Retinole als auch Sterole umsetzen. Die einzigen Proteine aus Amphioxus im gesamten SCAD-Datensatz bilden die Schwestergruppe dieser Säugetier-Aldehyddehydrogenasen und sind drei putative Retinoldehydrogenasen. Darüber hinaus sind *C. elegans*- und *Drosophila*-Proteine mit Hydroxybutyrat- oder Retinoldehydrogenase-Aktivität in der gleichen Gruppe enthalten.

Der Gruppe der eben beschriebenen Aldehyddehydrogenasen stehen die Typ 2 17β - und 11β -Hydroxysteroiddehydrogenasen (11β - und 17β HSD2) gegenüber, die Vertebraten-spezifisch zu sein scheinen. Beide Arten von Isoenzymen sind an der Inaktivierung von Steroidhormonen beteiligt (siehe Abb. 2.11). Den dritten Zweig bilden die 17β -Hydroxysteroiddehydrogenasen vom Typ 1 (17β HSD1), die Östron in aktives Östradiol umwandeln (siehe Abb. 2.11). Der nächste Verwandte der 17β HSD1-Gruppe sind *all-trans*-Retinoldehydrogenasen. In beiden Fällen konnte jedoch die Substratspezifi-

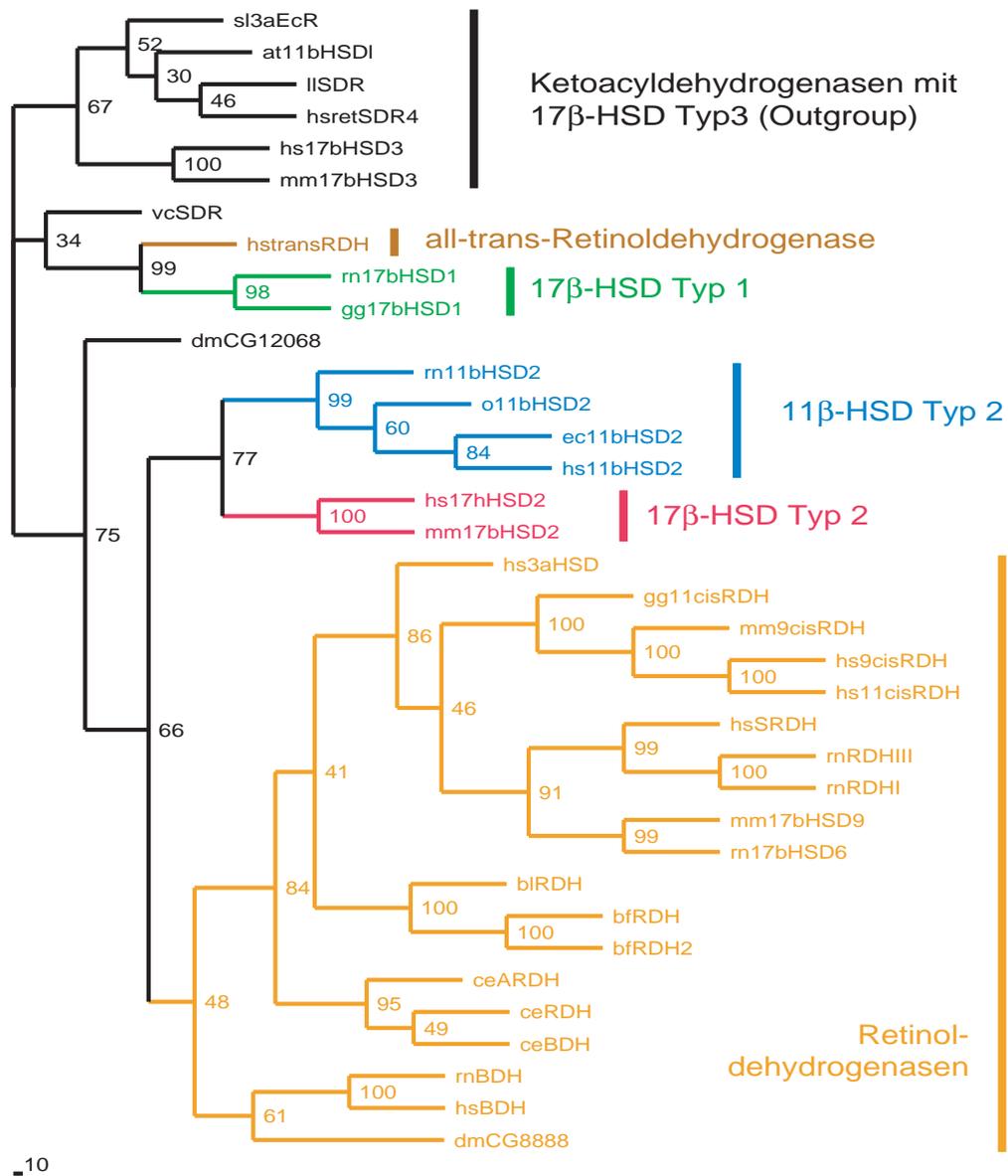
2.2 Phylogenetische Analyse von Steroidsignalwegen

tät des jüngsten gemeinsamen Vorläufers nicht bestimmt werden. Es kann also keine Aussage über das ursprüngliche Substrat gemacht werden. Im Gegensatz zu den Aldehyddehydrogenasen wurde auch für keines dieser Enzyme ein Ortholog aus *Drosophila*, *C. elegans* oder Amphioxus gefunden. Für 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 3, die in Säugetieren einen Zwischenschritt der Steroidsynthese katalysiert, wurden Ketoacyl-Dehydrogenasen aus verschiedenen Metazoa als nächste Verwandte identifiziert, aber auch hier fehlen Daten zur Bestimmung des ursprünglichen Substrats.

Auffallend bei der Hydroxysteroiddehydrogenase-Familie ist die geringe Sequenzähnlichkeit der 17 β -HSDs untereinander, vor allem zwischen den drei Gruppen Typ 6/9 (nicht-steroidogen), 1/2 (steroidogen) und 3 (steroidogen). Während z. B. die Proteinsequenz der 17 β -HSD Typ 1 zu über 48 % mit der der all-*trans*-Retinalreduktase des äußeren Photorezeptorsegments identisch ist, liegt die Ähnlichkeit zu den anderen 17 β -HSDs (Typ 3 oder 6) nur bei etwa 20 %. Das legt nahe, dass sich ihre 17 β -HSD-Aktivität aus verschiedenen Vorläufern entwickelt hat, also mehrmals konvergent entstanden ist.

Der Stammbaum der separat untersuchten 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenasen ist in Abb. 2.17 dargestellt. Unstimmigkeiten zwischen den verschiedenen Algorithmen ergaben sich hinsichtlich der Stellung des *C. elegans*- und des *Drosophila*-Proteins. Aufgrund der besseren *Bootstrap*-Unterstützung (>50 %) wurde das Szenario des *Neighbour-Joining*-Verfahrens favorisiert, auch wenn dieses Vorgehen mathematisch kaum zu begründen ist. Mit den Cholesterinbiosynthese-Enzymen Erg27 (Hefe) und 17 β -HSD Typ 7 als *Outgroup* fielen beide Ecdysozoa-Proteine in die Gruppe der Cholesterin-3 β -HSDs, die außerdem Sequenzen aus Säugetieren und Pflanzen enthält. Die Proteine aus Maus (mmNsdhl) und Mensch (hsNsdhl) katalysieren Zwischenschritte der Cholesterinbiosynthese und sind sehr gut charakterisiert. Mutationen, die zum Funktionsverlust dieser Enzyme führen, haben schwerwiegende Missbildungen der Föten zur Folge (siehe Kapitel 1.2.2). Dagegen sind beide Ecdysozoa sowie die *Arabidopsis*-Proteine uncharakterisiert. Da sowohl *C. elegans* als auch *Drosophila* Cholesterin nicht selbst synthetisieren können, ist die Funktion dieser Proteine besonders interessant. Der Rest der Sequenzen des Datensatzes teilt sich in Säugetier-spezifische C27-3 β -HSDs und 3 β -HSD/ Δ 4,5-Isomerasen. Letztere sind an der Synthese von Steroidhormonen durch die Umsetzung von Pregnenolon oder DHEA beteiligt und werden meist geschlechtsspezifisch in den Sexualorganen exprimiert. Von den wenig charakterisierten C27-3 β -HSDs ist nur bekannt, dass sie ausschließlich C27-Sterole umsetzen. Proteine, die Retinole/Retinsäure metabolisieren oder aus Amphioxus stammen, wurden in der näheren Verwandtschaft nicht gefunden.

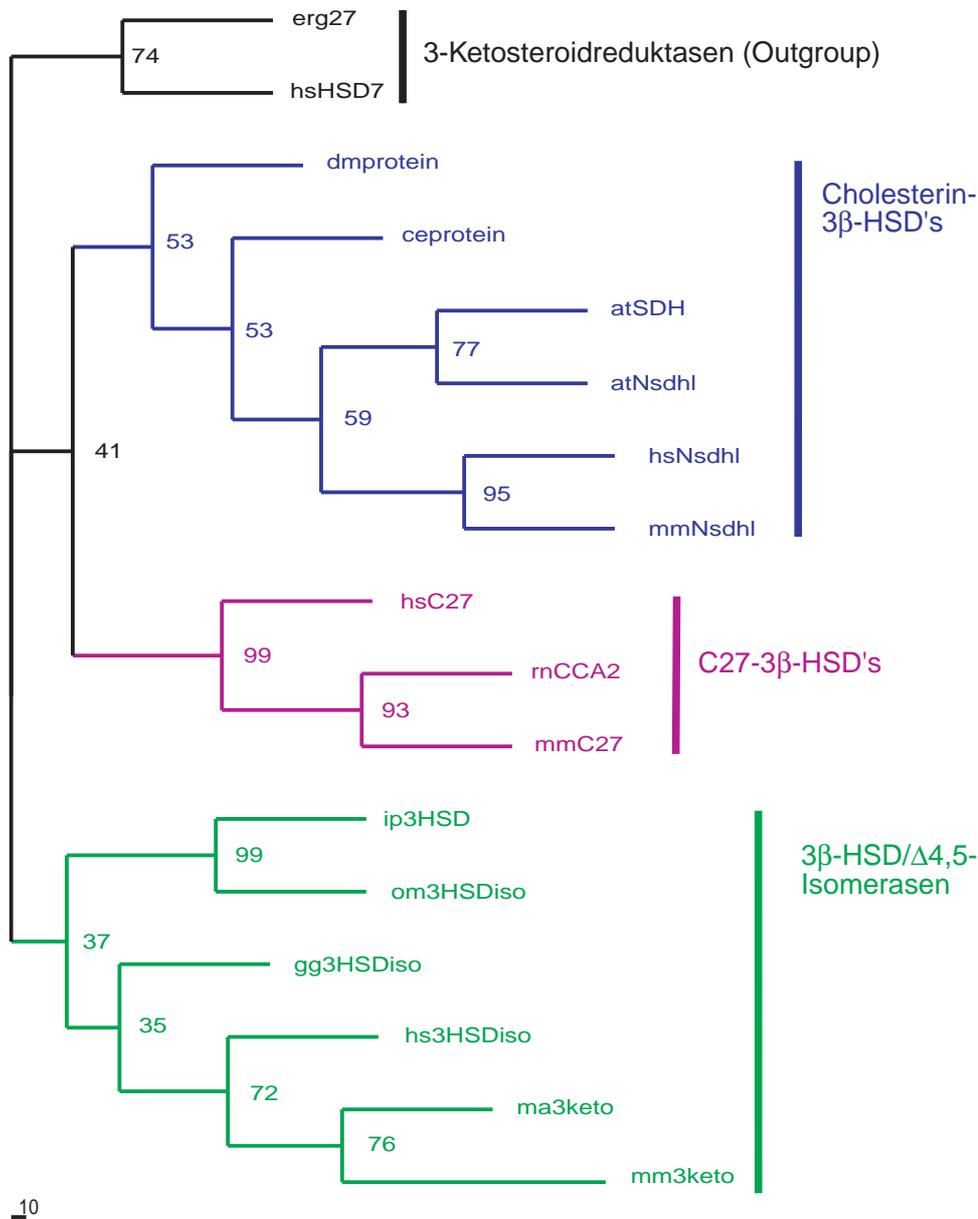
2 Ergebnisse



_10

Abbildung 2.16: Stammbaum der 17βHydroxysteroiddehydrogenase-Familie berechnet mit dem *Neighbour-Joining*-Algorithmus. Die Zahlen an den Verzweigungen stellen die *Bootstrap*-Unterstützung für 100 Pseudoreplikate dar. Werte über 50 kennzeichnen gut abgesicherte Dichotomien. Die Analyse ergab ein relativ komplexes Szenario mit den monophyletische Gruppen 17βHSD Typ1, 11βHSD Typ1, 17βHSD Typ2, all-*trans*-Retinaldehydrogenasen und Retinoldehydrogenasen. Bei drei Sequenzen aus Amphioxus (bfRDH, bfRDH2 und bIRDH) handelt es sich mit sehr großer Wahrscheinlichkeit um Retinoldehydrogenasen. Beschreibung im Text.

2.2 Phylogenetische Analyse von Steroidsignalwegen



_10

Abbildung 2.17: Staumbaum für die 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase-Familie. Berechnet mit dem *Parsimony*-Algorithmus. An den Verzweigungen ist die *Bootstrap*-Unterstützung für 100 Pseudoreplikate angegeben. Werte über 50 stehen für gut abgesicherte Dichotomien. Für den vergleichsweise kleine Datensatz wurden drei Monophyla berechnet: 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase/Δ4,5-Isomerasen, C27-3β-Hydroxysteroiddehydrogenasen und Cholesterin-3β-Hydroxysteroiddehydrogenasen. Die *Bootstrap*-Unterstützungen sind zwar relativ niedrig, die dargestellte Topologie wurde jedoch mit allen getesteten Verfahren erhalten. Die *Outgroup* besteht aus zwei Ketosteroidreduktasen, die an der Cholesterinbiosynthese beteiligt sind. Näheres zu diesem Stammbaum im Text.

2.2.3 Steroidrezeptor-Familie

Nukleäre Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Regulierung von Zellwachstum und -differenzierung. Sie bilden eine große Superfamilie, die Rezeptoren mit sehr unterschiedlichen Funktionen umfasst. Ihre klassischen Liganden sind Steroidhormone, Vitamin D, Ecdyson, Retinsäuren und Thyroidhormone. Das Spektrum physiologisch bedeutender Liganden wurde jedoch durch Entdeckungen in letzter Zeit um Substanzen wie Fettsäuren, Oxysterole oder Farnesolmetabolite erweitert. Gleichzeitig steigt die Zahl der Orphan-Rezeptoren, deren Ligand unbekannt ist. Es ist für viele dieser Rezeptoren noch nicht bekannt, ob sie überhaupt einen Liganden besitzen oder ob sie konstitutiv, also ohne Aktivierung durch einen Liganden ständig aktiv sind (PISSIOS et al., 2001). Kernrezeptoren binden – in der Regel als Homo- oder Heterodimere – direkt an die regulatorischen Regionen ihrer Zielgene, die oft als Palindrome angeordnet sind.

Während der embryonalen Morphogenese spielen insbesondere die Rezeptoren der Retinsäure als direkter Vermittler zwischen morphogenem Signalmolekül und Transkriptionsapparat eine wichtige Rolle. Es stellt sich die Frage, ob aufgrund der engen Verwandtschaft von Steroidhormon- und Retinsäure-Rezeptoren auch die evolutionären Vorläufer der Steroide einen morphogenen Charakter besessen haben könnten oder (unbekannte) Steroide/Sterole existieren, die dieses Potential heute noch besitzen (aus der großen Zahl der Orphanrezeptoren lässt sich u. U. auch auf viele „Orphan-Liganden“ schließen).

Die Analyse der nukleären Rezeptoren ergab das in Abb. 2.18 dargestellte Szenario. Die Familie ist gegliedert in Retinoid X-Rezeptoren (RXR), Östrogen-ähnliche Rezeptoren (ERR), Glucocorticoid-Rezeptoren (GR), Androgen- und Progesteron-Rezeptoren (AR und PR), Thyroid-Rezeptoren (TR), Retinsäure-Rezeptoren (RAR), Vitamin-D-Rezeptoren (VDR) und Ecdyson-Rezeptoren (EcR), die als *Outgroup* gewählt wurden. In den Gruppen GR, AR, PR und ER sind ausschließlich Vertebraten-Rezeptoren¹ vertreten, die von einem Steroid-Liganden aktiviert werden. Der nächste Verwandte dieses Phylums ist die ERR-Gruppe, die ein *Drosophila*-Protein enthält und deren Vertreter höchstwahrscheinlich konstitutiv, d. h. ohne Liganden aktiv sind (HONG et al., 1999). Der Vorläufer dieser beiden Gruppen ist die RXR-Familie, die Sequenzen aus Vertebraten und Ecdysozoa umfasst. Die Liganden dieses Zweiges sind sowohl Steroide (z. B. dmSVP1 und aaNuRe) als auch Retinsäure (z. B. ImRXR, apRXR). Einige der Rezeptoren sind Orphan-Rezeptoren. Mit einer Bootstrap-Unterstützung von 83 % sind von diesen Gruppen (ER, AR, PR, GR, ERR, RXR) Retinsäure-Rezeptoren (RAR) und Thyroid-Rezeptoren (TR) getrennt. Der nächste Verwandte zu Steroidhormon-Rezeptoren und Retinsäure-(X)-Rezeptoren ist der Vitamin-D-Rezeptor (VDR), der nur in vertebralen Organismen vorkommt und von Vit. D3 aktiviert wird. Die Ecdyson-

¹ Inzwischen wurden auch Östrogen-, Progesteron- und Corticosteroid-Rezeptoren aus dem frühen Vertebraten *Petromyzon marinus* (Meerneunauge) identifiziert (THORNTON, 2001)

2.2 Phylogenetische Analyse von Steroidsignalwegen

Rezeptoren der Insekten wurden als *Outgroup* gewählt. In Tabelle 5.8 (S. 137 sind die im Stammbaum enthaltenen Proteine sowie ihre Funktion bzw. ihr Ligand (wenn bekannt) angegeben.

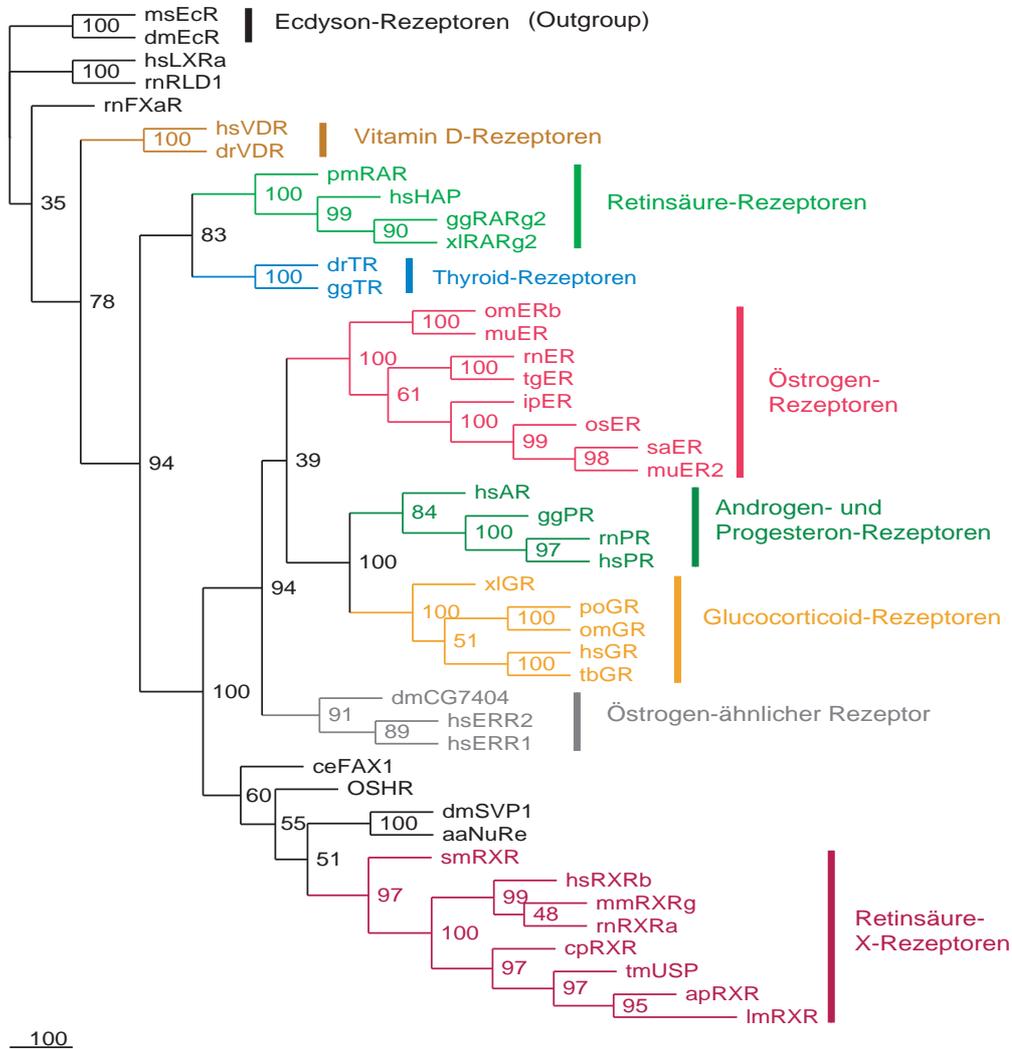


Abbildung 2.18: Neighbour-Joining-Stammbaum für nukleäre Rezeptoren mit *Bootstrap* Unterstützungen an den Dichotomien. Werte über 50 stehen für gut abgesicherte Verzweigungen. Die nächsten Verwandten zu den Steroidhormonrezeptoren ER, AR, GR und PR sind Östrogen-ähnliche Rezeptoren. Beiden zusammen stehen die Retinsäure-X-Rezeptoren gegenüber. Die Retinsäure-Rezeptoren bilden mit Thyroid-Rezeptoren eine Gruppe. Der Vorläufer von Retinsäure- und Hormonrezeptoren sind Vitamin-D-Rezeptoren. Als *Outgroup* dienen Ecdyson-Rezeptoren. Siehe detaillierte Beschreibung im Text.

2.2.4 Datierung einiger Duplikationsereignisse

Um eine Idee von der Rolle der Steroidhormone in der Wirbeltierevolution zu bekommen, muss man wissen, wann ungefähr die ersten „echten“ steroidogenen Enzyme bzw. Steroidhormon-Rezeptoren aufgetreten sind. Besonders interessant sind dabei Cytochrom P450_{scc} und 17 β -HSDs als erste bzw. letzte Enzyme im Syntheseweg sowie die Hormonrezeptoren als Signalvermittler. Rein theoretisch kann man das Alter von monophyletischen Proteinfamilien bestimmen, indem man die genetische Distanz d zweier orthologer Sequenzen (Gesamtzahl der aufgetretenen Mutationen) mit der Divergenzzeit t der beiden Spezies in Relation setzt. Mit anderen Worten: Man berechnet die Mutationsrate. Diese kann dann bei bekannter genetischer Distanz zweier beliebiger Sequenzen oder Monophyla zur Berechnung der Divergenzzeit dieser beiden Proteine bzw. Monophyla herangezogen werden. Genauere Analysen berücksichtigen außerdem die Möglichkeit von mehrfachen Mutationsereignissen und andere (teilweise sehr spezielle) Verfeinerungen des Evolutionsmodells. Für diese Rechnung muss man jedoch in jedem Fall von einer wichtigen Annahme ausgehen, nämlich von einer gleichmäßig tickenden molekularen Uhr, d. h. die Mutationsrate ist im betrachteten Zeitrahmen bei allen Proteinen gleich (oder variiert in vorhersagbarer Weise). Evolvieren Sequenzen (selektions-)neutral, erfolgen Veränderungen mit einer vorhersagbaren, gleichmäßigen Rate, die dem Zerfall von radioaktiven Elementen ähnelt (in kurzen Zeiträumen ist die Häufigkeit von Einzelereignissen nur ungenau vorhersehbar, über längere Zeiträume sind die Vorhersagen recht genau). Variiert jedoch der Selektionsdruck, kann die Uhr für verschiedene Proteine unterschiedlich schnell „ticken“. Divergenzzeitberechnungen sind dann nur eingeschränkt oder gar nicht möglich. Auch Unterschiede in der Generationsdauer oder in der Exposition gegenüber Mutagenen (Stoffwechselrate!) können die molekulare Uhr „aus dem Takt bringen“. In den Astlängen des *Neighbour-Joining*-Stammbaums spiegelt sich die Anzahl der eingetretenen Substitutionen (genetische Distanz) von Proteinen wieder. Alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Stammbaum-Algorithmen gehen von ultrametrischen Distanzen aus, d. h. sie setzen *a priori* eine einheitlich tickende molekulare Uhr voraus. In der ungewurzelten Darstellung der erhaltenen Dendrogramme befinden sich die Endpunkte auf einer Kreislinie. Alle Zweige dieser Stammbäume sind gleichlang und enthalten keine Distanzinformation mehr. Der *Neighbour-Joining*-Algorithmus ist dagegen ein *Cluster*-Verfahren, das keine ultrametrischen Distanzen benötigt und taxonspezifische Substitutionsraten toleriert.

Zur Eichung der molekularen Uhr für nukleäre Rezeptoren, P450-Cytochrome und 17 β -HSDs wurden die genetischen Distanzen von orthologen Proteinen mit dem bekannten Zeitpunkt der Trennung verschiedener Taxa in Relation gesetzt. Der Wert für die genetische Distanz wurde aus der Summe der *Neighbour-Joining*-Astlängen, die zwischen den Proteinen liegen, ermittelt. Die Zeitpunkte der Aufspaltung der betreffenden Taxa wurden gemäß

2.2 Phylogenetische Analyse von Steroidsignalwegen

Kumar et al. und Nikoh et al. angesetzt: Homo sapiens - Rodentia (Nagetiere): 70 Mio. Jahre; Homo sapiens - Galliforme (Hühnchen): 300 Mio. Jahre; Homo sapiens - Mesobatrachia (Xenopus): 360 Mio. Jahre; Homo sapiens - Teleosten (Zebrafisch): 450 Mio. Jahre; Homo sapiens - Ecdysozoa (Drosophila): 850 Mio. Jahre (KUMAR & HEDGES, 1998; NIKOH et al., 1997). In Abb. 2.20 sind die erhaltenen Eichkurven dargestellt. Für nukleäre Rezeptoren und 17β -HSDs wurde eine sehr gute lineare Korrelation von Divergenzzeit der Spezies und genetischer Distanz der orthologen Proteine erhalten, d. h. für die zur Bestimmung der Substitutionsrate verwendeten Sequenzpaare tickt eine fast gleichmäßige molekulare Uhr. Die P450-Familie scheint dagegen deutlich inhomogener zu sein. Die errechneten Werte streuen sehr weit. Auf die Bestimmung der Entstehungszeit von P450_{scc} anhand dieser Eichgeraden wurde deshalb verzichtet.

Betrachtet man die Astlängen im *Neighbour-Joining*-Stammbaum (ohne Angabe der *Bootstrap*-Unterstützung), fällt auf, dass das Phylum PR, GR und AR eine relativ höhere Substitutionsrate aufweist (durchschnittliche Astlänge bis zur Verzweigung: 1,15), als die ER-Sequenzen (durchschnittliche Astlänge bis zur Verzweigung: 0,65). Während also innerhalb der Gruppe PR/GR/AR eine einheitliche molekulare Uhr tickt, ist sie verglichen mit ER (und auch ERR) fast doppelt so schnell. Dieser Unterschied wurde in der Divergenzzeitberechnung durch Multiplikation der durchschnittlichen Astlänge des Phylums PR/AR/GR mit dem Faktor 0,56 berücksichtigt.

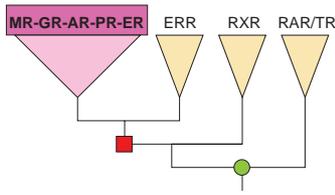
Folgende Aufspaltungszeitpunkte wurden ermittelt (siehe auch Abb. 2.20 und 3.3):

- Progesteron-Rezeptor (PR)/Androgen-Rezeptor (AR)– Glucocorticoid-Rezeptor (GR): 766 ± 52 Mio. Jahre
- Östrogen-Rezeptor (ER) – PR/GR/AR: 1230 ± 189 Mio. Jahre
- Östrogen-ähnlicher Rezeptor (ERR) – ER/PR/GR/AR: 1611 ± 135 Mio. Jahre
- RXR – ERR/ER/PR/GR/AR: 2056 ± 314 Mio. Jahre
- 17β -HSD1 – all-*trans*-RDH's: 773 ± 45 Mio. Jahre
- 17β -HSD2 – 11β -HSD2: 1061 ± 51 Mio. Jahre
- $17,11\beta$ -HSD2 - BDH/*cis*-RDH: 1239 ± 155 Mio. Jahre

Die berechneten Zeitpunkte liegen alle deutlich vor der Kambrium-Explosion (vor etwa 500 Mio. Jahren) bzw. gehen dieser direkt voraus (Diversifizierung der Steroidhormonrezeptoren und Entstehung von Steroid-aktivierenden Enzymen).

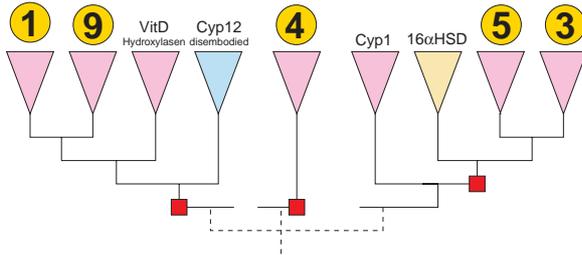
2 Ergebnisse

Kernrezeptor-Superfamilie



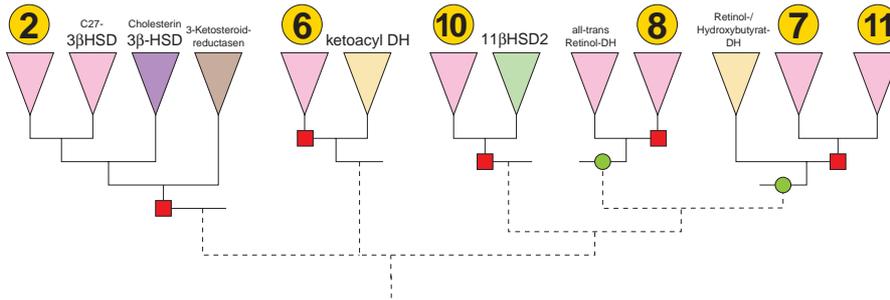
MR = Mineralocorticoid-Rezeptor
 GR = Glucocorticoid-Rezeptor
 AR = Androgen-Rezeptor
 PR = Progesteron-Rezeptor
 ER = Östrogen-Rezeptor
 ERR = Östrogen-related Rezeptor
 RXR = Retinoid X Rezeptor
 RAR = Retinsäure-Rezeptor
 TR = Thyroid-Rezeptor

Cytochrome P450-Superfamilie



● möglicher Retinsäure-Ligand
 ■ Auftreten des Steroid-Liganden
 ▽ Vertebrata
 ▽ Ecdysozoa
 ▽ Metazoa
 ▽ Pflanzen
 ▽ Eukaryonten
 ▽ Eukaryonten ohne Ecdysozoa

Short-Chain Dehydrogenase-Familie



- | | |
|---|---|
| ① P450 side chain cleavage | ⑦ 17β-Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2 |
| ② 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase/
Δ4,5-Isomerase | ⑧ 17β-Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1 |
| ③ 17α-Hydroxylase/17,20-Lyase | ⑨ Aldosteronsynthese (11β-Hydroxylase,
18-Hydroxylase, 18-Dehydrogenase) |
| ④ Aromatase | ⑩ 11β-Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1 |
| ⑤ 21-Hydroxylase | ⑪ 11β-Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2 |
| ⑥ 17β-Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 3 | |

Abbildung 2.19: Zusammenfassung der phylogenetischen Analyse der Komponenten des Steroidsignalwegs. Die Nummerierung entspricht Abb. 2.11 auf Seite 39. Alle steroidogenen Enzyme und Steroidhormon-Rezeptoren kommen ausschließlich in Vertebraten vor (rosa). In der Superfamilie der Kernrezeptoren ist eine nahe Verwandtschaft von Steroidhormonrezeptoren zu den Retinsäure-Rezeptoren offensichtlich. In der Cytochrom P450-Superfamilie kann überhaupt keine Verbindung zum Retinsäure-Signalweg hergestellt werden. Bei der komplexen *Short-Chain-Dehydrogenase-Familie* zeigen die jeweils letzten Enzyme im Hormon-Syntheseweg eine Ähnlichkeit zu Retinol-umsetzenden Enzymen. Eine Aussage über das Substrat des Vorläufers ist in beiden Fällen aber nicht möglich.

2.2 Phylogenetische Analyse von Steroidsignalwegen

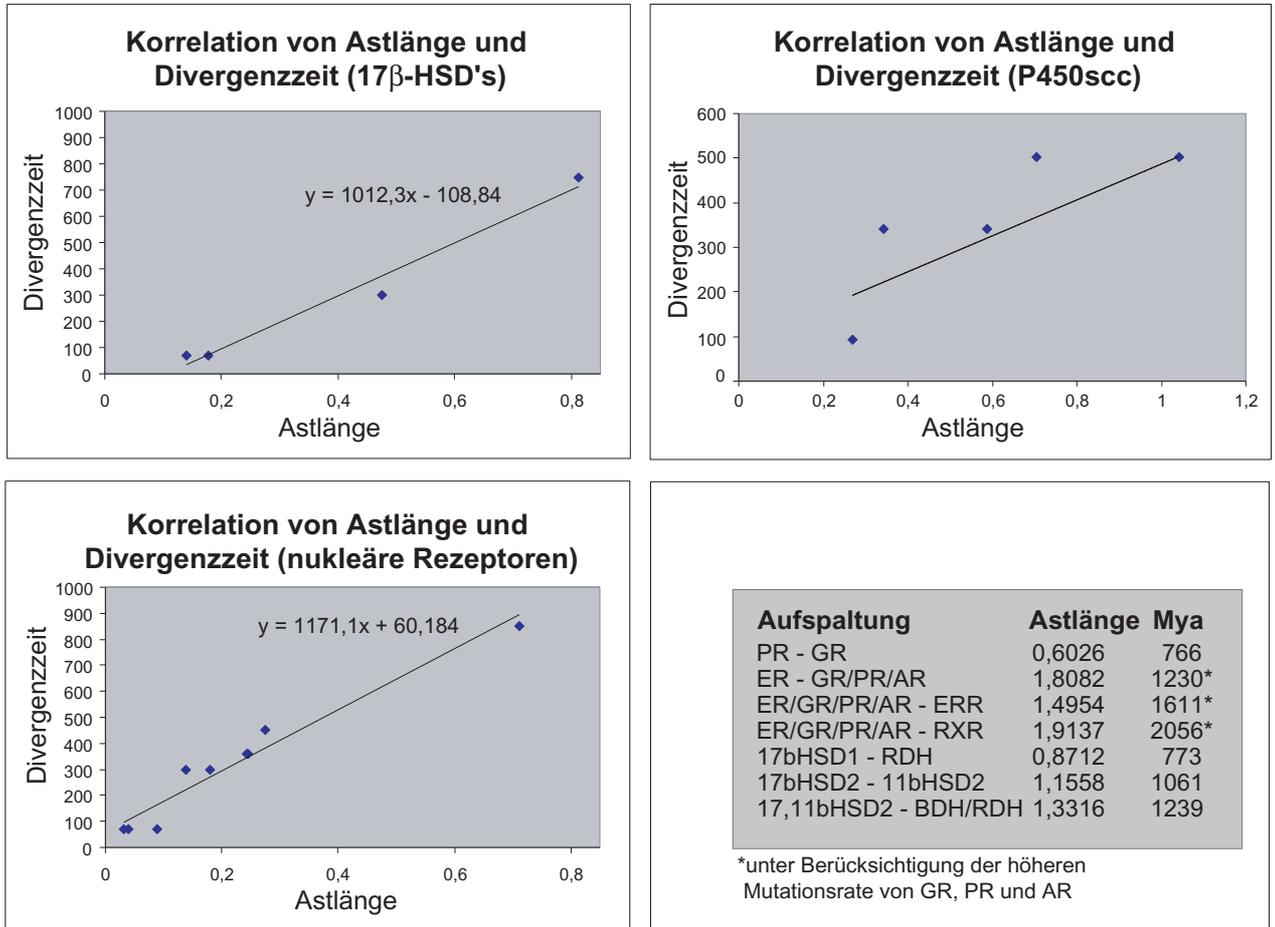


Abbildung 2.20: Die Astlängen von *Neighbour-Joining*-Stammbäumen korrelieren linear mit der Divergenzzeit. Mit Hilfe der Geradenfunktion können bei einheitlich tickenden molekularen Uhren Dichotomien näherungsweise datiert werden (genauere Beschreibung des Vorgehens im Text). Rechts unten sind einige, auf diese Weise berechnete Werte angegeben. Den Eichgeraden liegen folgende Divergenzzeiten zugrunde: Homo sapiens - Rodentia (Nagetiere): 70 Mio. Jahre; Homo sapiens - Galliforme (Hühnchen): 300 Mio. Jahre; Homo sapiens - Mesobatrachia (Xenopus): 360 Mio. Jahre; Homo sapiens - Teleosteen (Zebrafisch): 450 Mio. Jahre; Homo sapiens - Ecdysozoa (Drosophila): 850 Mio. Jahre. ER = Östrogen-Rezeptor, PR = Progesteron-Rezeptor, GR = Glucocorticoid-Rezeptor, AR = Androgen-Rezeptor, ERR = Östrogen-ähnlicher Rezeptor, RXR = Retinoid X-Rezeptor, 11bHSD2 = 11β-Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2, 17bHSD2 = 17β-Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2, 17bHSD1 = 17β-Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1, RDH/BDH = *cis*-Retinoldehydrogenasen und Hydroxybutyratdehydrogenasen, RDH = *all-trans*-Retinoldehydrogenasen

Fazit

Alle an der Steroidogenese beteiligten Mitglieder der P450_{scc}-Familie sind Vertebraten-spezifisch und besitzen Vorläufer, die Sterole umsetzen. Die P450-Hydroxylase der Cholesterin-autotrophen Süßwasserschnecke *Lymnaea* wurde der Ecdysozoa-spezifischen Cyp12-Gruppe zugeordnet.

In der HSD-Familie wurden für 17 β - und 11 β -HSDs Retinoldehydrogenasen als Schwestergruppen ermittelt. Eine Aussage über das ursprüngliche Substrat war jedoch aufgrund fehlender Daten über die Substratspezifität der direkten *Outgroup* nicht möglich. Sequenzen aus dem Cephalochordaten Amphioxus befinden sich in der Retinoldehydrogenase-Gruppe. Die 3 β -HSD/ Δ 4,5-Isomerasen dagegen gehen aus Cholesterin-umsetzenden 3 β -HSDs hervor. Ihre nächsten Verwandten sind C27-3 β -HSDs. Alle steroidogenen Mitglieder der Familie sind Vertebraten-spezifisch, soweit die vorhandenen Daten eine Aussage erlauben.

Bei den Kernrezeptoren war vermutlich Retinsäure der ursprüngliche Ligand. Die Vertebraten-spezifischen Hormonrezeptoren gingen aus einem RXR-artigen Vorläufer hervor. Als nächster Verwandter wurden ERR α und β sowie ein Drosophila-Rezeptor ermittelt, die wahrscheinlich konstitutiv aktiv sind.

Die Divergenzzeiten einiger Duplikationsereignisse in der Kernrezeptor- und 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase-Familie wurden berechnet: Das Auftreten von Steroidhormonrezeptoren und Steroid-aktivierenden Enzymen ist zeitlich unmittelbar vor der Kambrium-Explosion (vor etwa 500 Mio. Jahren) anzusiedeln.

2.3 Shh-Aktivitätsassay

2.3.1 Etablierung

Zur quantitativen Bestimmung des Shh-Signals in Zellkultur wurde von Sasaki et al. ein Shh-responsiver Gli1-Bindungsstellen-Reporter mit acht Kopien einer Gli1-Bindungsstelle (p8xGli-BS) vor einem Luciferase-Gen zur Verfügung gestellt. Dieser Reporter wurde in der Literatur bereits beschrieben (SASAKI et al., 1997) und lässt sich durch gleichzeitige Überexpression von Gli1 in C3HT1/2-Zellen, die den Shh-Signalweg besitzen, aktivieren. In der vorliegenden Arbeit konnte dieses Experiment jedoch nicht reproduziert werden. Kontrollzellen, die mit einem mutierten, nicht-aktivierenden Gli1 (Gli1-zfg) transfiziert wurden, zeigten die gleiche Luciferase-Aktivität. Aus diesem Grund wurden neue Reporterplasmide hergestellt, die drei, sechs bzw. elf Kopien der Gli1-Bindungsstellen enthielten. Der Klonierungsablauf ist in Abb. 2.21 genauer erläutert (siehe auch Kapitel 4.1).

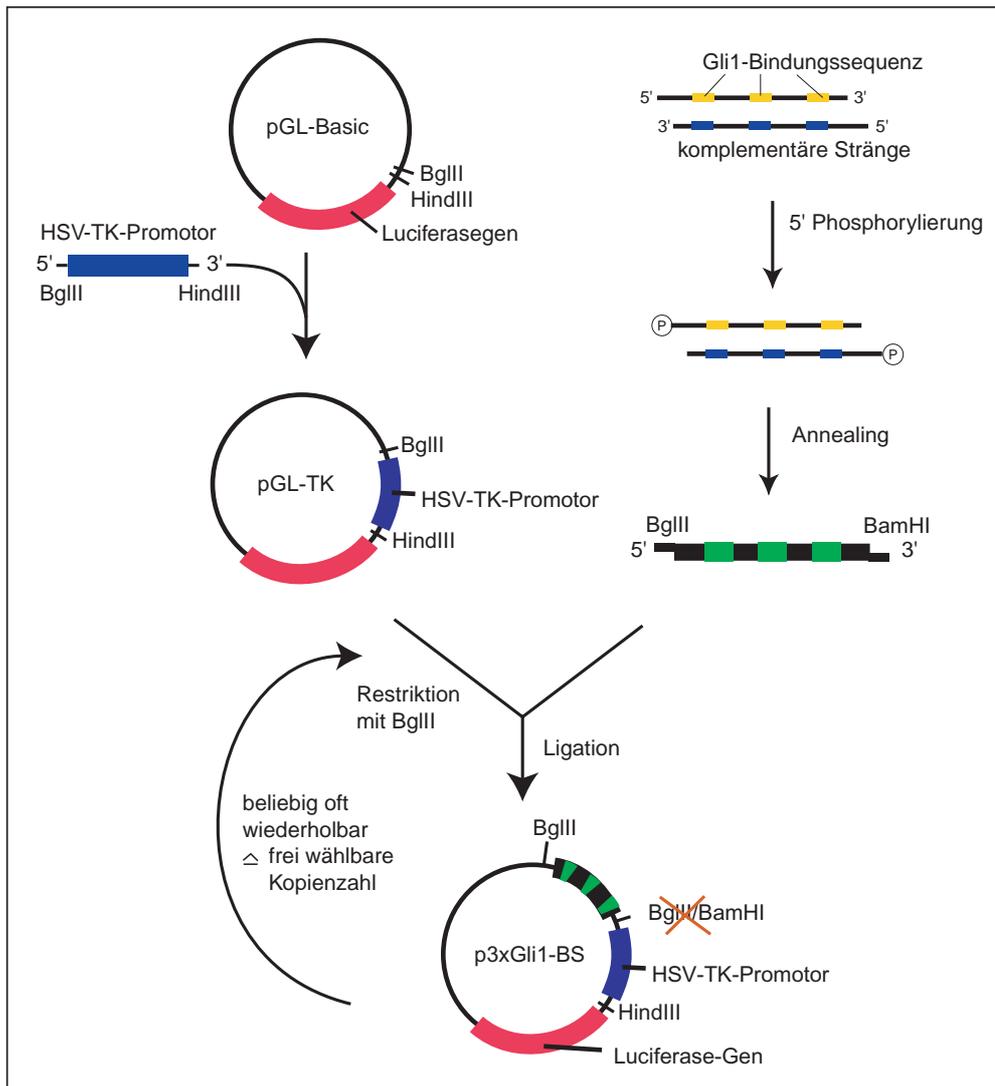


Abbildung 2.21: Schematischer Ablauf der Herstellung von Shh-responsiven Reporterplasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl von Gli1-Bindungsstellen. Als Ausgangsplasmid für die verschiedenen Gli1-BS-Reporter diente der Vektor pGL-Basic, der das Firefly-Luciferase-Gen jedoch keinerlei Promotor- oder *Enhancer*-Sequenzen enthält. 5' vor das Luciferase-Gen wurde der Minimalpromotor HSV-TK plaziert. Dazu wurde aus dem Plasmid pRL-TK die Promotersequenz mit den Restriktionsenzymen BglIII und HindIII herausgeschnitten und gerichtet in das pGL-Basic-Plasmid inkliniert, wodurch pGL-TK erhalten wurde. 5' vor den HSV-TK-Promotor wurden mehrere Kopien einer Gli1-Bindungsstelle kloniert. Dazu wurden komplementäre Oligonukleotide synthetisiert, die das Gli1-Bindungsstellen-Motif GAACACCCA dreimal in gleichmäßigen Abständen, am 5'-Ende eine halbe BglIII-Schnittstelle und am 3'-Ende eine halbe BamHI-Schnittstelle (für die komplementären Stränge *vice versa*) enthielten. Die komplementären Oligomere wurden hybridisiert und in pGL-TK inkliniert. Dort, wo eine BglIII-Hälfte mit einer BamHI-Hälfte zusammentraf, konnte zwar aufgrund des gleichen Überhangs ligiert werden, die Schnittstelle wurde dadurch allerdings eliminiert. Das erhaltene Ligationsprodukt enthält 3 Kopien der Gli1-Bindungsstelle und eine BglIII-Restriktionsstelle. Das Vorgehen kann dadurch beliebig oft wiederholt werden, um Reporterplasmide mit drei, sechs, neun oder mehr Kopien der Gli1-Bindungsstelle zu erzeugen.

2 Ergebnisse

In Abb. 2.22 ist gezeigt, dass in C3HT1/2-Zellen von diesen neuen Vektoren schon der Reporter mit nur sechs Gli1-Bindungsstellen (p6xGli1-BS) auf eine Aktivierung durch co-transfiziertes Gli1 deutlich sensitiver reagierte, als der in der Literatur beschriebene p8xGli1-BS-Reporter. Alle neu konstruierten Reporterstrukturen reagierten konzentrationsabhängig (Abb. 2.22) und abhängig von der Anzahl der Gli1-Bindungsstellen auf Aktivierung durch Gli1 (Abb. 2.23).

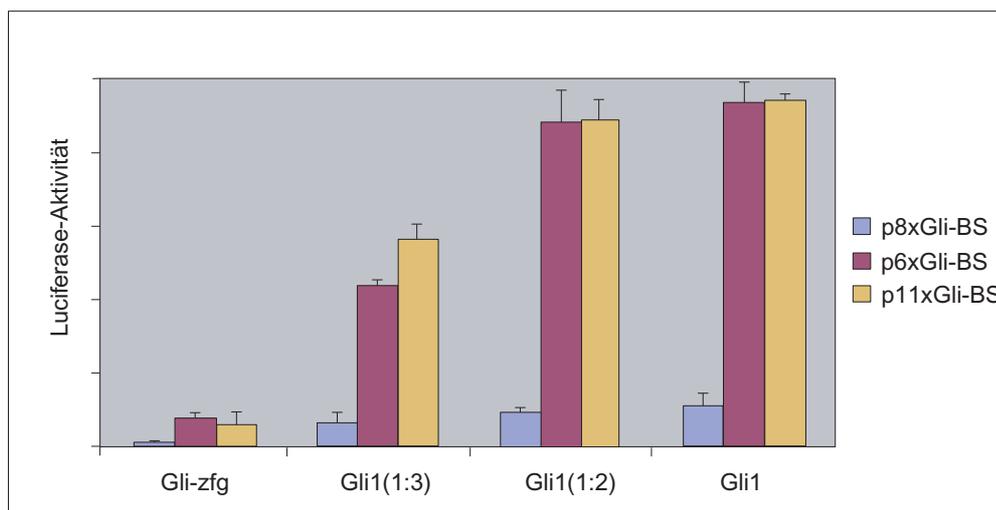


Abbildung 2.22: Konzentrationsabhängige Aktivierung der Gli1-BS-Reporter durch Gli1 in C3HT1/2-Zellen. Der in der Literatur beschriebene p8xGli1-BS zeigt im Vergleich zu den neu hergestellten Reportern p6xGli1-BS und p11xGli1-BS eine um den Faktor 10 geringere Sensitivität gegenüber Gli1.

Bei der Durchführung und Auswertung der Luciferasemessungen wurde festgestellt, dass nur solche Messwerte reproduzierbar waren, die deutlich größer als 10.000 Einheiten waren. D. h. bei zu geringer Transfektionseffizienz sind die Aktivitäten von Renilla- und Fireflyluciferase zu großen Schwankungen unterworfen, um statistisch signifikante Resultate zu ergeben. Es wurden deshalb nur die Experimente ausgewertet, deren Messwerte den kritischen Wert von 10.000 Einheiten überschritten. Die hier beschriebenen Experimente mit C3HT1/2-Zellen, Ptch-Wildtypzelllinie (p53+/+) und Ptch-k.o.-Zelllinie (p37-/-), die mittels der CaCl₂-Methode transfiziert wurden, lieferten Werte im Bereich von 50.000 - 5.000.000 und wurden dreimal reproduziert.

2.3.2 Aktivierung mit rekombinant exprimiertem ShhN-Protein

Als nächstes wurde versucht, die Reporter durch rekombinant in Bakterien exprimiertes und aufgereinigtes ShhN-Protein zu aktivieren. Dazu standen zwei ShhN-Varianten zur Verfügung: 1) ShhN_{comp}, das die komplette Sequenz enthält, aber unlöslich war und durch Detergenz aus dem bakteriellen Zellpellet

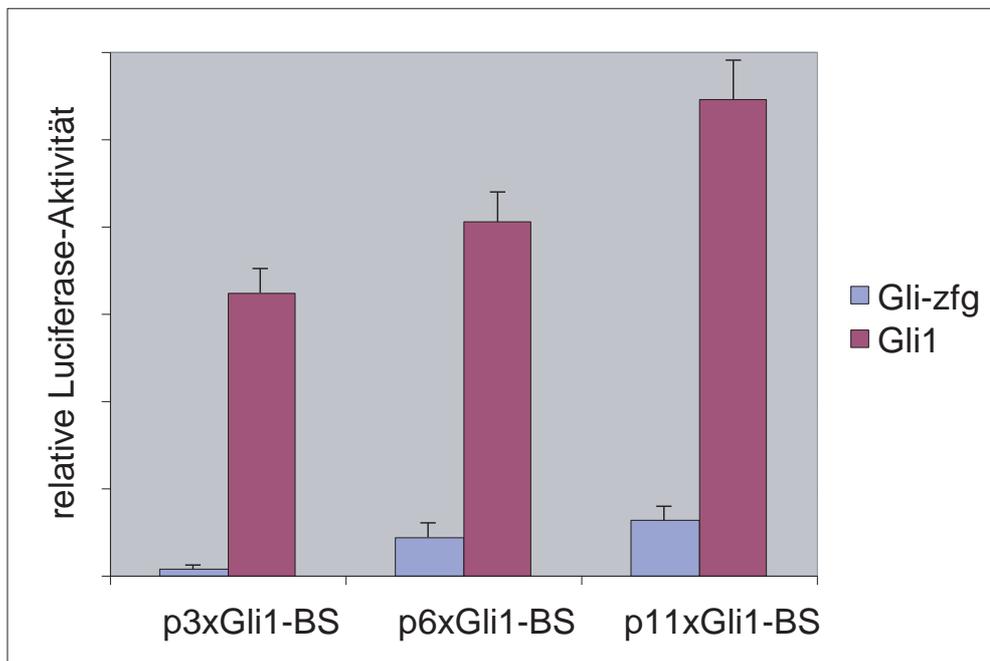


Abbildung 2.23: Spezifische Aktivierung der Gli1-BS-Reporter durch Gli1 in C3HT1/2-Zellen. Stimulierung mit mutiertem Gli1-zfg zeigt keine Aktivierung der Luciferase. Die Intensität der Luciferaseaktivierung nach Gli1-Stimulierung korreliert mit der Anzahl der Gli-Bindungsstellen im Reporterplasmid. Gli-zfg = Gli-Konstrukt, bei dem die Kodierungssequenz der Zinkfingerdomäne deletiert wurde.

extrahiert werden musste. 2) ShhN_k , bei dem auf die ersten 18 (hydrophoben) Aminosäuren verzichtet wurde, um eine bessere Löslichkeit zu erzielen. Keines der beiden *ShhN*-Proteine war in der Lage, den Gli1-BS-Reporter signifikant zu aktivieren. Ein Grund dafür könnte sein, dass die bakteriell exprimierten Proteine weder Disulfidbrücken ausbilden noch glykosyliert werden. Die Wichtigkeit beider Modifikationen - insbesondere für die Stabilität von *ShhN*, aber auch für die Aktivität - wurde im Verlauf der Doktorarbeit von anderen Gruppen entdeckt (SAEKI et al., 2000). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Fehlen der ersten 10 N-terminalen Aminosäuren von *ShhN* wahrscheinlich zur Bildung eines inhibitorisch wirkenden *ShhN*-Proteins führt, das zwar (irreversibel) an Ptch binden kann, jedoch die Signaltransduktion verhindert, wodurch Rezeptorstellen blockiert werden (WILLIAMS et al., 1999; KATSUURA et al., 1999). Im Falle von ShhN_k wäre ein solcher Effekt ebenfalls möglich, der zur mangelhaften Stabilität im Falle beider Proteine hinzukäme.

2.3.3 Aktivierung und Reprimierung durch Co-Expression von ShhN und Ptch

Die weitere Charakterisierung der Gli1-BS-Reporter erfolgte in der Wildtyp-Zelllinie p53^{+/+} sowie in der Ptch-k.o.-Zelllinie p37^{-/-}. In den k.o.-Zellen ist aufgrund des Mangels an Ptch eine konstitutiv aktive Signalkaskade zu erwarten, da Smo nicht durch Ptch inhibiert wird. Die Überexpression von Ptch in diesen Zellen sollte zu einer Reduzierung des Signals führen, d. h. die Signaltransduktion konnte untersucht werden, ohne auf rekombinant hergestelltes ShhN angewiesen zu sein. Außerdem sollte die Co-Expression von Shh im Gegensatz zur Wildtyp-Zelllinie nicht zu einer Aktivierung des Signals führen. Eine Co-Transfektion der k.o.-Zelllinie p37^{-/-} mit p11xGli1-BS und pCR3.1-Ptch ergab zwar eine schwache Signal-Reduktion im Vergleich zu Kontrollzellen, die nur mit Reporter und pCR3.1 transfiziert wurden, aber eine Co-Transfektion mit ShhN resultierte in einer Aktivierung der Luciferase, die in Ptch-k.o.-Zellen nicht auftreten dürfte (Abb. 2.24). In Ptch-Wildtyp-Zellen wurde im wesentlichen das gleiche Aktivierungs-/Inhibitionsmuster erhalten, das für diese Zelllinie jedoch plausibel ist. Um herauszufinden, in welchem Aktivierungsstatus sich der Shh-Signalweg in der Ptch-k.o.-Zelllinie befindet, wurde die Reporteraktivität ohne Co-Transfektion mit Ptch oder Stimulierung durch Gli1 in der k.o.-Zelllinie mit der Reporteraktivität in der Wildtyp-Zelllinie (p53^{+/+}) verglichen. Als interner Standard wurde pGL-TK mit p11xGli1-BS co-transfiziert. Dieses Plasmid ist bis auf das Fehlen der Gli1-Bindungsstellen identisch mit p11xGli1-BS. Auf diese Weise war es möglich, die Aktivitäten von natürlich vorkommendem Gli1-Protein in zwei unterschiedlichen Zelllinien miteinander zu vergleichen. In Abb. 2.25 sind die aus Konzentrationsreihen erhaltenen Werte dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und k.o.-Zelllinie gefunden werden, d. h. die Annahme, dass in dieser k.o.-Zelllinie ein konstitutiv aktiver Shh-Signalweg besteht, ist falsch.

Fazit

Es wurden verschiedene Gli1-BS-Reporter konstruiert und in Zellkultur charakterisiert. Die selbstkonstruierten Reporterplasmide p11xGli1-BS und p6xGli1-BS erwiesen sich als etwa 10fach sensitiver gegenüber Gli1-Stimulierung als ein p8xGli1-BS, der bereits in der Literatur beschrieben wurde. Sowohl in der Ptch-Wildtypzelllinie als auch in Ptch-k.o.-Zellen war der Luciferase-Reporter durch co-transfiziertes ShhN aktivierbar und durch Ptch inhibierbar. Ein Vergleich der Reporteraktivitäten in beiden Zelllinien ohne Aktivierung oder Inhibierung ergab keinen Unterschied in der Luciferase-Aktivität.

2.3 Shh-Aktivitätsassay

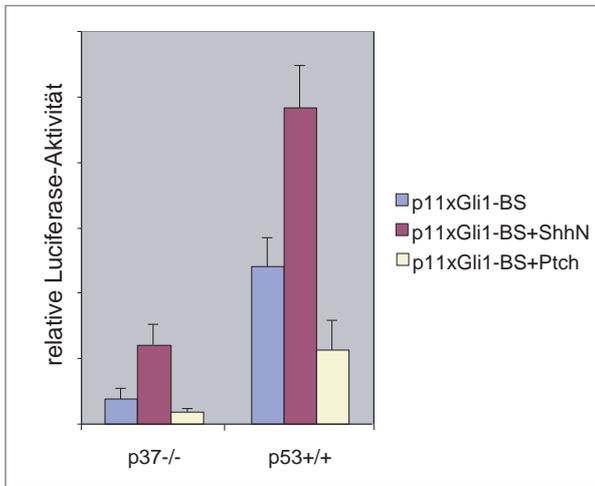


Abbildung 2.24: Aktivierung und Inhibierung des Gli1-Bindungsstellen-Reporters durch Überexpression von ShhN bzw. Ptch. Sowohl in der Wildtypzelllinie p53^{+/+} als auch in der Ptch-k.o.-Zelllinie p37^{-/-} wurde eine Aktivierung des Luciferasereporters durch Co-Transfektion mit pcDNA3-ShhN beobachtet. Überexprimiertes Ptch resultierte bei beiden Zelllinien in einer Reduktion der Luciferaseaktivität.

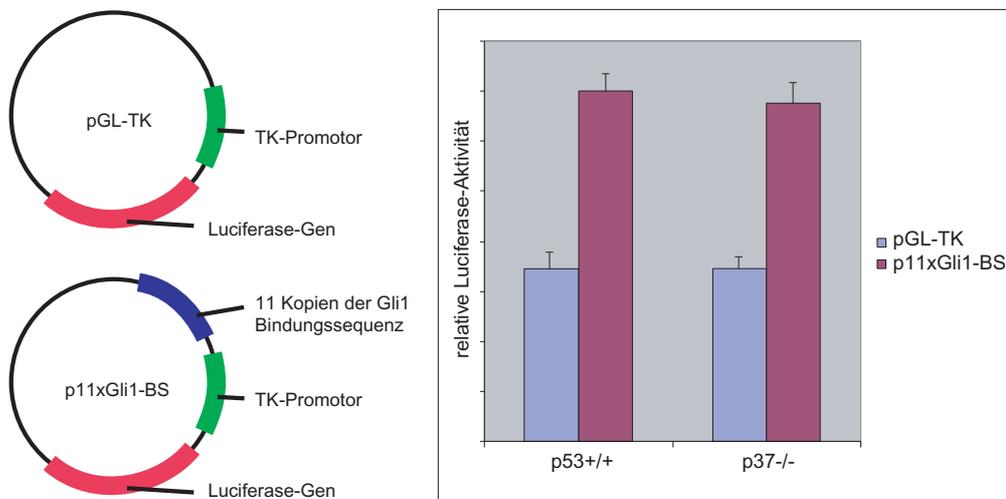


Abbildung 2.25: Vergleich der konstitutiven Gli1-Aktivität in Ptch-k.o.-Zelllinie (p37^{-/-}) und Ptch-Wildtypzelllinie (p53^{+/+}) anhand des Aktivitätsverhältnisses von pGL-TK zu p11xGli1-BS. Die beiden Plasmide sind bis auf die 11 Kopien der Gli1-Bindungssequenz identisch. Die mittleren Messwerte für pGL-TK in den beiden Zelllinien wurden als interner Standard betrachtet und gleichgesetzt. Das Verhältnis von p11xGli1-BS zu pGL-TK ist in den beiden Zelllinien fast identisch. In den untersuchten Ptch-k.o.-Zellen ist der Shh-Signalweg also nicht aktiver als in den entsprechenden Wildtypzellen.

2.4 Intrazelluläre Lokalisation von Patched und Sonic Hedgehog

In der Shh-Signaltransduktion erfolgt der erste Schritt in der Zielzelle über einen Rezeptorkomplex (siehe Abb. 1.3), der aus den beiden Multitransmembranproteinen Patched (Ptch) und Smoothened (Smo) besteht (CHEN & STRUHL, 1998). Smo wird solange von Ptch inhibiert, bis dieses ShhN gebunden hat. Danach ist Smo in der Lage, die Signalkaskade zu aktivieren (ALCEDO & NOLL, 1997). Es wurde bisher davon ausgegangen, dass der Rezeptorkomplex auf der Zelloberfläche lokalisiert ist, um das Signal von benachbarten Zellen empfangen zu können (INCARDONA et al., 2000). Da der Mechanismus der Signalübertragung von Shh-produzierender Zelle und Signalempfangender Zelle noch nicht völlig verstanden wird, wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl die Lokalisation von Shh als auch von Ptch näher untersucht. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die *sterol-sensing*-Domäne von Ptch ähnlich wie bei seinem Homologen NPC1 an der Regulation eines intrazellulären Vesikeltransports beteiligt ist, der möglicherweise den Angriffspunkt von Cyclopamin oder unphysiologischen Cholesterinvorläufern darstellt.

2.4.1 Lokalisation von Ptch

Die intrazelluläre Lokalisierung von Ptch wurde mit Hilfe eines GFP-Ptch-Fusionsproteins bestimmt. Abb. 2.26 A zeigt eine C3HT1/2-Zelle 24 h nach Transfektion mit pEGFP-Ptch (siehe Tab. 5.1; eigene Konstrukte) transfiziert worden war. C3HT1/2-Zellen sind Shh-Zielzellen und sollten deshalb in der Lage sein, überexprimiertes Ptch-Protein in richtiger Weise zu transportieren. Die detektierbare grüne Fluoreszenz war trotz Verwendung des starken CMV-Promotors und sehr guter Transfektionseffizienz (>90 % der Zellen im Sichtfeld waren transfiziert) vergleichsweise schwach. Sie konnte durch Optimierung der Anregungs- und Emissionsparameter des Konfokalmikroskops nicht wesentlich verbessert werden. Wahrscheinlich ist die Größe des transmembranen Rezeptors der limitierende Faktor für die Expression.

GFP-Ptch lag in vesikulären Strukturen im Zellinneren vor. In der Plasmamembran wurde keine Fluoreszenz detektiert. Bei starker Überexpression bildeten sich Aggresom-artige Strukturen am Zellkern, wie sie oft bei GFP-Fusionsproteinen beobachten werden (GARCIA-MATA et al., 1999). Die Position des GFP-Restes im Ptch-Protein (am N- oder C-Terminus) beeinflusste die Lokalisation des Fusionsproteins nicht. Lediglich die Bildung von Aggresomen schien mit C-terminalem GFP verzögert zu sein. Eine darüber hinausgehende Beeinflussung des Ptch-Targetings durch GFP ist nicht zu erwarten. Fusionen von GFP mit peroxisomalen oder nukleären Targetingsignalen führen zur Lokalisierung des normalerweise zytosolisch vorliegenden GFPs im korrekten Zellkompartiment (J. Gloeckner, Dissertationsschrift, München, 2001).

2.4 Intrazelluläre Lokalisation von Patched und Sonic Hedgehog

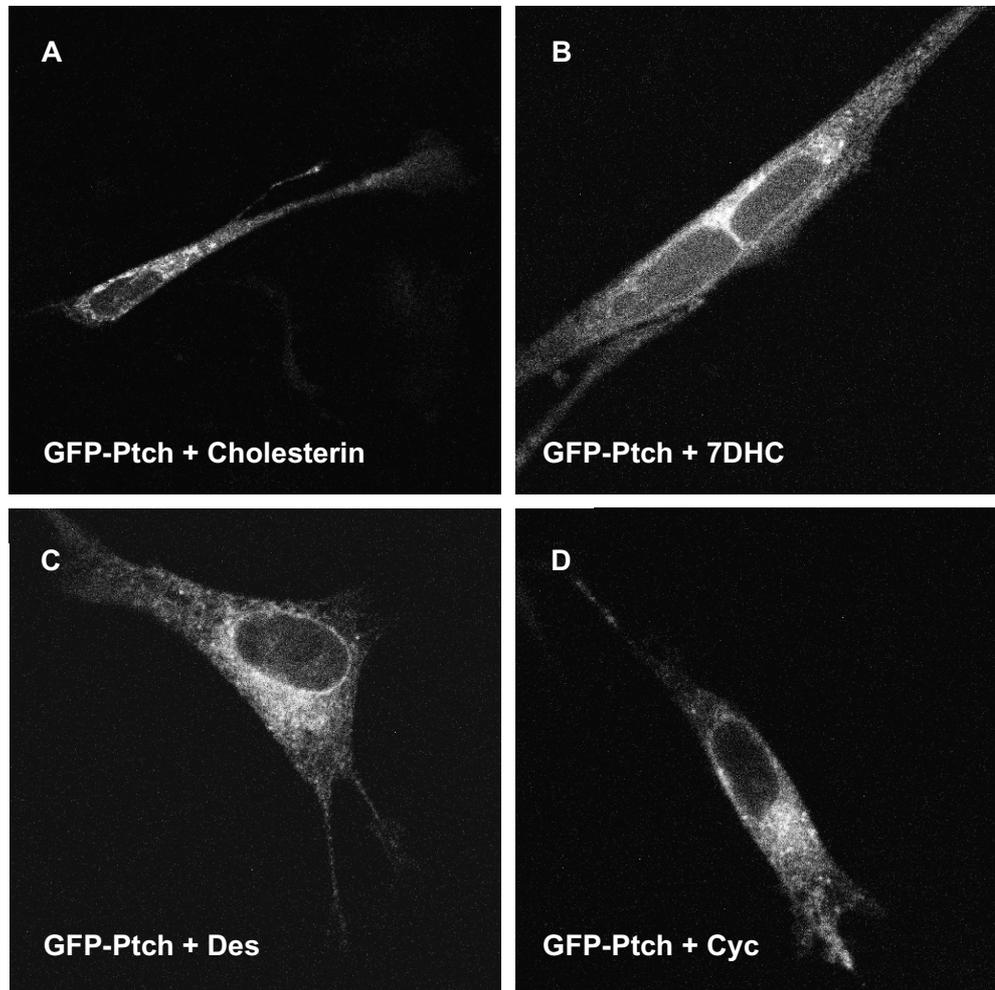


Abbildung 2.26: Expression von GFP-Ptch in C3HT1/2-Zellen nach etwa 45 h. A-D Alle transfizierten lebenden Zellen zeigten das Fusionsprotein GFP-Ptch in einem vesikulären Muster. Die Kultivierung der Zellen in Gegenwart von Cyclopamin (D) oder den Cholesterinvorläufern 7-Dehydrocholesterin (B) und Desmosterol (C) hatte über einen Zeitraum von 21 h keinen Einfluß auf die intrazelluläre Lokalisation von GFP-Ptch im Vergleich zu Kontrollzellen (A). GFP wurde bei 488 nm angeregt und die Emission bei 507 nm gemessen. Cyc = Cyclopamin, Des = Desmosterol, 7DHC = 7-Dehydrocholesterin.

2.4.2 Lokalisation von Ptch in Anwesenheit von Inhibitoren

Um den Einfluss von 7-Dehydrocholesterin (7DHC), Desmosterol (Des) und Cyclopamin (Cyc) auf das *Targeting* von Ptch zu untersuchen, wurden die transfizierten Zellen in Anwesenheit dieser Substanzen kultiviert. Die höchste getestete Konzentration im Medium betrug 500 μM . Das entsprach etwa dem 50fachen der Cyclopamin-Konzentration, die die Shh-Signaltransduktion in Neuralexplantaten komplett inhibiert (COOPER et al., 1998). Im Vergleich zu Kontrollzellen, denen die gleiche Menge Cholesterin ins Medium gegeben wurde, konnte jedoch keine Veränderung der Lokalisation festgestellt werden (Abb. 2.26 A-D). Die Expression des fluoreszierenden Proteins war im allgemeinen bereits nach 24 h detektierbar und wurde bis zu 50 h nach der Transfektion verfolgt.

2.4.3 Lokalisation von Shh

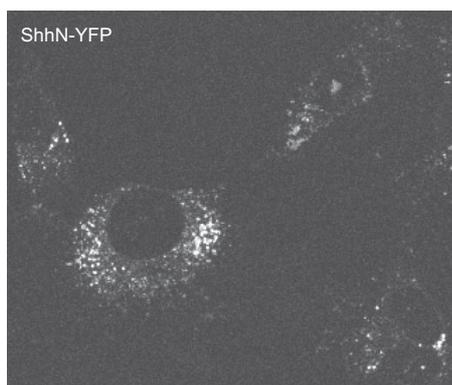


Abbildung 2.27: Expression von ShhN-YFP in HeLa-Zellen. Das Fusionsprotein ist in vesikulären Strukturen im Zellinneren lokalisiert. Auf der Zelloberfläche ist keine Fluoreszenz erkennbar. Die Anregung des gelb fluoreszierenden Proteins erfolgte bei 513 nm, die Emission wurde bei 527 nm gemessen.

Mit Hilfe der Fusion von ShhN und dem gelb fluoreszierenden YFP wurde die Lokalisation von ShhN bestimmt. Für diesen Versuch wurden HeLa-Zellen verwendet, die keine Shh-Zielzellen sind. Damit sollte eine intrazelluläre Interaktion mit Ptch, die das Targeting von ShhN-YFP verfälschen könnte, ausgeschlossen werden. Abb. 2.27 zeigt, dass ShhN-YFP ähnlich wie sein GFP-Ptch in vesikulären Strukturen in der Zelle vorlag. Wiederum war keine Fluoreszenz in der Plasmamembran zu erkennen.

Zur genaueren Untersuchung der Autoprozessierung und Sekretierung von Shh wurde ein Fusionsprotein (NYFPCCFP; Abb. 2.28) mit folgendem Aufbau hergestellt: ShhN-YFP-Spaltstelle-ShhC-CFP. Die beiden Fluoreszenzproteine YFP (*yellow fluorescence protein*) und CFP (*cyan fluorescence protein*) sind Varianten von GFP und können im Konfokal-Mikroskop getrennt angeregt und detektiert werden². Da gezeigt wurde, dass die ersten 10 N-terminalen Amino-

	Anregung	Emission
2 CFP	433 nm	475 nm
YFP	513 nm	527 nm

2.4 Intrazelluläre Lokalisation von Patched und Sonic Hedgehog

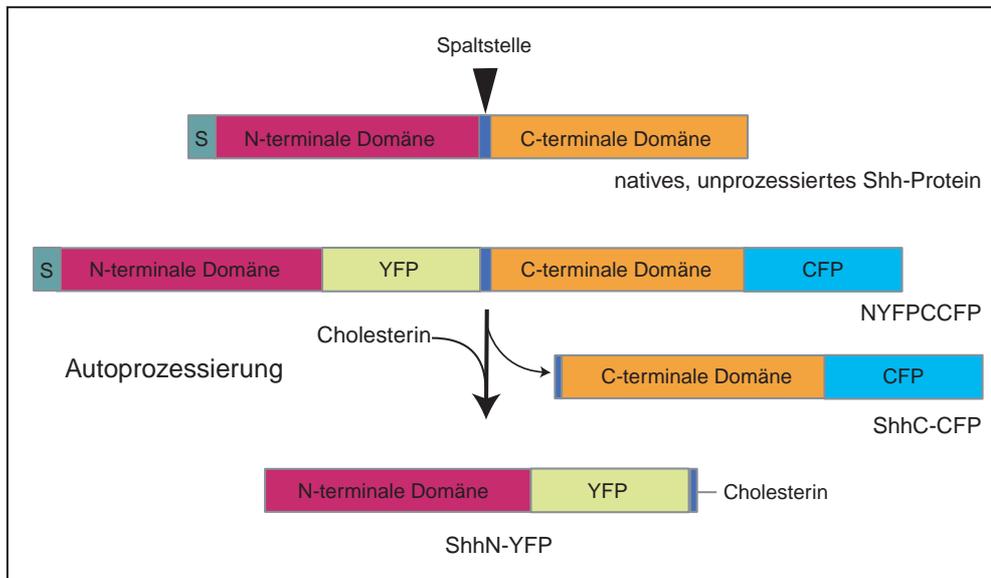


Abbildung 2.28: Schematische Darstellung von NYFPCCFP. Zwischen der N-terminalen Domäne und der Spaltstelle bei der Autoprozessierung wurde YFP kloniert. Der C-Terminus der C-terminalen Domäne trägt CFP. Während der autokatalytischen Spaltreaktion findet eine Konformationsänderung statt, durch die sich CFP in die Nähe von YFP bewegt. Ist die Nähe ausreichend (< 2 nm) findet ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer statt, mit dessen Hilfe der exakte Zeitpunkt und Ort der Reaktion in der lebenden Zelle ermittelt werden kann.

säuren von ShhN eine entscheidende Funktion bei der Signalübertragung spielen, wurde YFP C-terminal an ShhN kloniert, obwohl diese Position aufgrund der unmittelbaren Nähe zur Spaltsequenz aus sterischen Gründen vielleicht nicht optimal ist. Allerdings haben Experimente mit rekombinanten Intein gezeigt, dass ein *Spacer* von 10 Aminosäuren ausreicht, um heterologe Konstrukte korrekt zu prozessieren (CHONG et al., 1998; ZHANG & YANG, 2001). Das YFP im hier vorgestellten Konstrukt wurde so platziert, dass 13 Aminosäuren als *Spacer* zwischen YFP und der im Shh-Protein vorhandenen Spaltstelle lagen. Mit Hilfe dieses Konstrukts sollte der räumliche und zeitliche Ablauf der Prozessierung verfolgt werden. Bis zum Zeitpunkt der Selbstspaltung des Vorläuferproteins durch ShhC würden die Signale für YFP und CFP colokalisieren. Während der Spaltreaktion sollte evtl. ein Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET) von CFP auf YFP möglich sein, da die beiden Fluorophore durch die notwendige Konformationsänderung nahe zueinander gebracht werden (bei Anregung von CFP (433 nm) sollte dann die Emission von YFP bei 527 nm zu detektieren sein). Nach erfolgter Autoprozessierung sollte die (evtl. getrennte) Sekretion der beiden Domänen verfolgt werden.

Der Expressionsvektor für NYFPCCFP wurde in HeLa-Zellen exprimiert. Die Lokalisation innerhalb der Zelle (nicht gezeigt) war dieselbe wie bei ShhN-YFP (Abb. 2.27). Das detektierte Fusionsprotein zeigte jedoch keine Autoprozessierung. Es konnte auch 48 h nach der Transfektion kein zytosoli-

2 Ergebnisse

ches oder extrazelluläres sondern nur vesikuläres ShhC-CFP nachgewiesen werden, das mit ShhN-YFP co-lokalisierte. Ein möglicher Grund für die Inhibierung der Spaltreaktion ist die sterische Hinderung durch die beiden Fluoreszenzproteine. Eine völlige Denaturierung des resultierenden Proteins, das mit zwei großen zusätzlichen Domänen belastet wurde, ist aufgrund des spezifischen Expressionsmusters und des deutlichen Fluoreszenzsignals nicht anzunehmen. Eine Verschiebung des YFP-Teils in Richtung des N-Terminus würde die Spaltreaktion evtl. erleichtern. Eine andere Erklärung wäre, dass für die Prozessierung ein zusätzliches Signal nötig ist, das in HeLa-Zellen fehlt.

Fazit

Sowohl Shh als auch dessen Rezeptor Ptch waren als GFP-/YFP-Fusionsproteine in vesikulären Strukturen ausschließlich im Zellinneren nicht jedoch auf der Zelloberfläche detektierbar. Die Anwesenheit selbst hoher Konzentrationen von 7DHC, Desmosterol oder Cyclopamin hatte keinen Einfluss auf diese Verteilung. NYFPCCFP war in Säugetierzellen exprimierbar, zeigte jedoch keine Autoprozessierung.

2.5 Interaktionsstudien

Anhand der Kristallstruktur des N-Terminus von Shh (HALL et al., 1995) wurde neben einem Zinkproteasemotiv eine potentielle Dimerisierungsstelle im Protein beschrieben, für die eine Rolle in der Autoprozessierung des Vorläuferproteins diskutiert wurde. Eine Dimerisierung oder Multimerisierung des prozessierten, biologisch wirksamen N-Terminus (ShhN), die zur Regulation des Signals dienen könnte, wurde ebenfalls postuliert. In der vorliegenden Arbeit wurde deswegen die Homodimerisierung von ShhN überprüft und der Einfluss von Cyclopamin und unphysiologischen Cholesterinvorläufern (7-Dehydrocholesterin und Desmosterol) auf die Dimerisierung getestet. Dazu wurden drei methodisch unterschiedliche Ansätze gewählt: chemische Vernetzung (*Crosslinking*), Gelfiltration und Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Technik (*Surface-Plasmon-Resonance*; SPR)

2.5.1 Homodimerisierung von Sonic Hedgehog – *Crosslinking*

Bei diesem Verfahren werden rekombinant exprimierte und aufgereinigte Proteine durch Zugabe eines bivalenten Reagens' (z. B. Dimethylsuberimidat) zur Proteinlösung kovalent vernetzt, wenn die Proteine miteinander interagieren. Dieser Prozess ist irreversibel. Zur Evaluierung der Methode wurde Hämoglobin aus Retikulozytenlysat mit der gleichen Methode behandelt. Es konnten die Banden für Monomer, Dimer, Trimer und Tetramer nachgewiesen werden.

Abb. 2.29 zeigt das Coomassie-Gel (*crosslinking*) verschiedener rekombi-

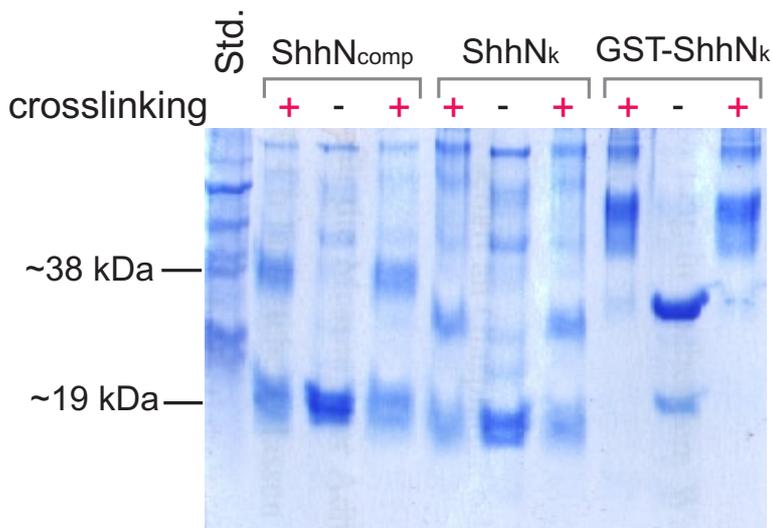


Abbildung 2.29: Nachweis der Dimerisierung von ShhN durch *crosslinking*. In den ersten drei Spalten wurde ShhN_{comp}, in den folgenden drei Spalten ShhN_k und in den letzten drei Spalten GST-ShhN aufgetragen. In den mit + gekennzeichneten Spalten wurde die chemische Vernetzung durchgeführt, die mit - markierten, jeweils mittleren Spalten zeigen die unbehandelte Proteinlösung. Für ShhN_{comp} und ShhN_k blieben Monomerbanden erhalten. Das GST-ShhN-Fusionsprotein interagiert aufgrund des GST-Restes vollständig und zeigte auch Multimerbanden. Std. = Proteinstandard

nant exprimierten und aufgereinigten ShhN-Varianten vor und nach der chemischen Vernetzung. Eine Dimerisierung konnte für alle getesteten Konstrukte nachgewiesen werden, nicht jedoch eine Multimerisierung. Bei His₆-ShhN_k, ShhN_{comp} und ShhN_k (durch Thrombinspaltung des GST-Fusionsproteins erhalten) blieben Monomer-Banden nachweisbar, die in der Intensität mit der Dimerbande vergleichbar war. Das GST-ShhN-Fusionsprotein zeigte dagegen eine vollständige Dimerisierung bzw. sogar Multimerisierung, die jedoch auf die GST-Domäne zurückzuführen war. GST allein dimerisierte unter den Assaybedingungen ebenfalls zu 100 % (Daten nicht gezeigt).

2.5.2 Bestimmung der Dimerisierungsrate von Sonic Hedgehog – Gelfiltration

Zur genaueren Bestimmung der Interaktionsrate wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt, die gleichzeitig die Ergebnisse des *crosslinking*-Versuchs bestätigen sollte. Abb. 2.30 zeigt die Chromatogramme für His₆-ShhN_k, ShhN_k und ShhN_{comp}. In allen Fällen konnte ein Dimer-Peak identifiziert werden. Die Chromatogramme der ShhN-Proteine, die durch Thrombinspaltung des GST-Fusionsproteins erhalten wurden, zeigten einige zusätzliche Peaks, die aus dem Thrombin-Elutionspuffer stammen und auch in Abwesenheit des untersuchten Proteins auftraten. Sie konnten durch zusätzliches Aufreinigen der Proteinlösungen reduziert werden, was jedoch wegen der mangel-

2 Ergebnisse

haften Proteinstabilität nur beschränkt durchgeführt wurde. Aus dem Verhältnis der integrierten Flächen von Monomer- zu Dimerpeak wurde die Dimerisierungsrate berechnet. Sie lag für alle ShhN-Varianten (mit Ausnahme des GST-Fusionsproteins) zwischen 19 und 24 %. Da sich die Stabilität der Proteine in Lösungen als sehr kritisch erwies und bereits über Nacht drastisch sank, ist anzunehmen, dass die tatsächliche Dimerisierungsrate etwas höher liegt.

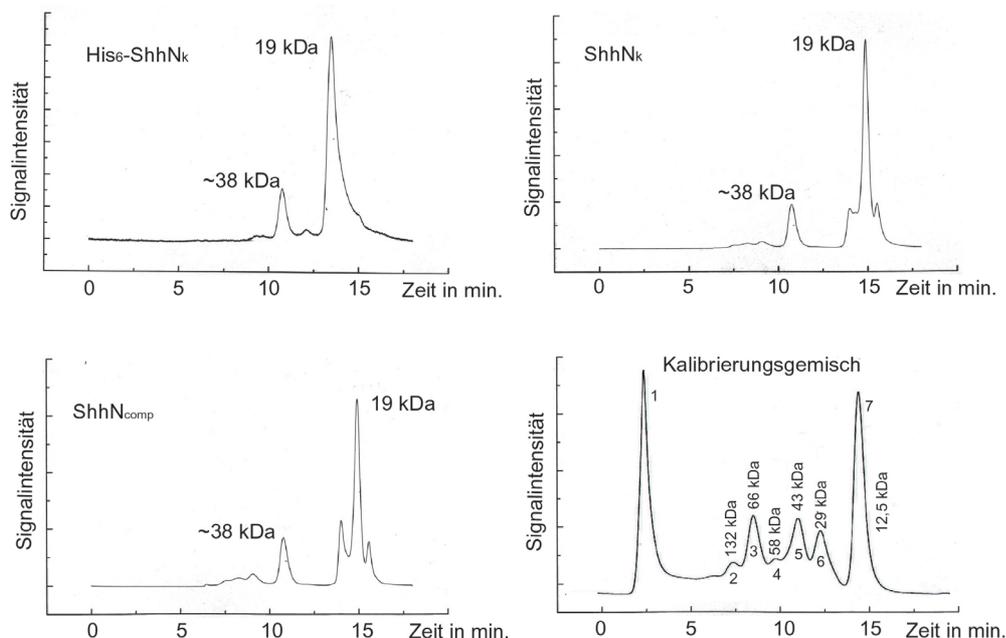


Abbildung 2.30: Gelfiltration von drei ShhN-Varianten. Der kleinere Peak entspricht einer Größe von etwa 38 kDa und stellt das ShhN-Homodimer dar. Die berechnete Dimerisierungsrate beträgt etwa 20-25 % und war für alle getesteten Konstrukte etwa gleich. Unten rechts ist das Chromatogramm des Kalibrierungsgemisches angegeben: (1) Blue Dextran, (2) BSA-Dimer (132 kDa), (3) BSA (66 kDa), (4) Carboanhydrase-Dimer (58 kDa), (5) Ovalbumin (43 kDa), (6) Carboanhydrase-Monomer (29 kDa), (7) Cytochrome c (12,5 kDa). Mobile Phase: PBS, pH 7,3; TSKgel G 3000 SW-Säule (Länge 60 cm, Durchmesser 7,5 mm, Partikelgröße 10 μ ; Flußrate: 1,2 ml/min; Maximaldruck 600 psi.)

2.5.3 Einfluss von Inhibitoren auf die Dimerisierung - *Surface Plasmon Resonance*

Mit Hilfe der *Surface-Plasmon-Resonance*-Technik wurde die Bindung von Shh an seinen Rezeptor Patched (Ptch) sowie die Homodimerisierung detaillierter untersucht. Es sollte insbesondere die Frage beantwortet werden, ob die Anwesenheit der Cholesterinvorläufer 7-Dehydrocholesterin (7DHC) und Desmosterol sowie des *Veratrum*-Alkaloids Cyclopamin einen Einfluss auf die Wechselwirkung von Shh mit sich selbst oder Ptch ausübt und auf diese Weise für die Störung der Signaltransduktion verantwortlich sein könnte. Für die

Experimente wurden His₆-ShhN_k, ShhN_k, ShhN_{comp} und GST-ShhN_k als Liganden auf der Chipoberfläche immobilisiert (siehe Belegung der Chips in Abb. 2.31). Da die Sensorgramme der SPR-Technik lediglich eine quantitative Aussage über die erfolgte Bindung (wieviel hat gebunden), jedoch keine Identifizierung der Bindungspartner zulassen, sind bei dieser Methode geeignet gewählte Referenz-Proteine, Positiv- und Negativ-Kontrollen von besonderer Wichtigkeit, um Bindungsartefakte zu erkennen. Da die *Masse* des gebundenen Analyten detektiert und verglichen wird (Nettobindungskurve = Signal der Probenoberfläche minus Signal der Referenzoberfläche), sollten als Negativkontrolle und Referenz Proteine gewählt werden, die etwa das gleiche Molekulargewicht haben wie der Ligand. Im vorliegenden Fall ist GST besonders geeignet, da es mit 26 kDa ein ähnliches Molekulargewicht wie ShhN (20 kDa) besitzt. Darüber hinaus wurde ShhN_k u. a. als GST-Fusionsprotein immobilisiert (Chip A). Es musste deshalb auch die Bindung von ShhN-Analyt an GST (statt ShhN_k) ausgeschlossen werden. GST eignete sich aufgrund seiner Dimerisierungseigenschaften auch als Positivkontrolle. Neben GST wurde die N-terminale Domäne der 17β-HSD4 (32 kDa) als unabhängige Referenz auf der Chipoberfläche fixiert.

Eine genaue Charakterisierung der ShhN-Dimerisierungsreaktion durch Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationskinetiken war nicht durchführbar. Es musste davon ausgegangen werden, dass ShhN unter Kopplungsbedingungen, die das Protein nicht denaturieren, mit großer Wahrscheinlichkeit teilweise als Dimer auf der Chipoberfläche immobilisiert wird. Dadurch sind ermittelte Bindungskinetiken nicht sinnvoll interpretierbar. Mit dem System konnte jedoch für alle getesteten ShhN-Varianten eine Homodimerisierung reproduzierbar gezeigt werden (Abb. 2.31 A und B).

Um zunächst die Spezifität der bei der ShhN-Dimerisierung erhaltenen Bindungskurve zu prüfen, wurden den auf Chip A (Belegung der Chipoberflächen: Abb. 2.31 A) immobilisierten ShhN-Konstrukten nacheinander hochkonzentrierte bakterielle Zell-Lysate, GST und 17β-HSD4 als Analyten zur Bindung angeboten. Keines der Kontrollproteine zeigte eine stärkere Bindung an die ShhN-Oberflächen als an die Referenzoberfläche (Daten nicht gezeigt). GST zeigte unter gleichen Versuchsbedingungen eine stärkere Interaktion mit der GST-Referenzoberfläche als mit den ShhN-Oberflächen (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der geringen Stabilität von ShhN (siehe Kapitel Gelfiltration) führten Experimente nur zu reproduzierbaren Ergebnissen, wenn ShhN als Analyt frisch isoliert wurde. Das auf der Chipoberfläche immobilisierte Shh-Protein wies eine deutlich höhere Stabilität auf. Der im Kühlschrank gelagerte Chip konnte bis zu drei Wochen bei gleichbleibender Qualität verwendet werden.

2 Ergebnisse

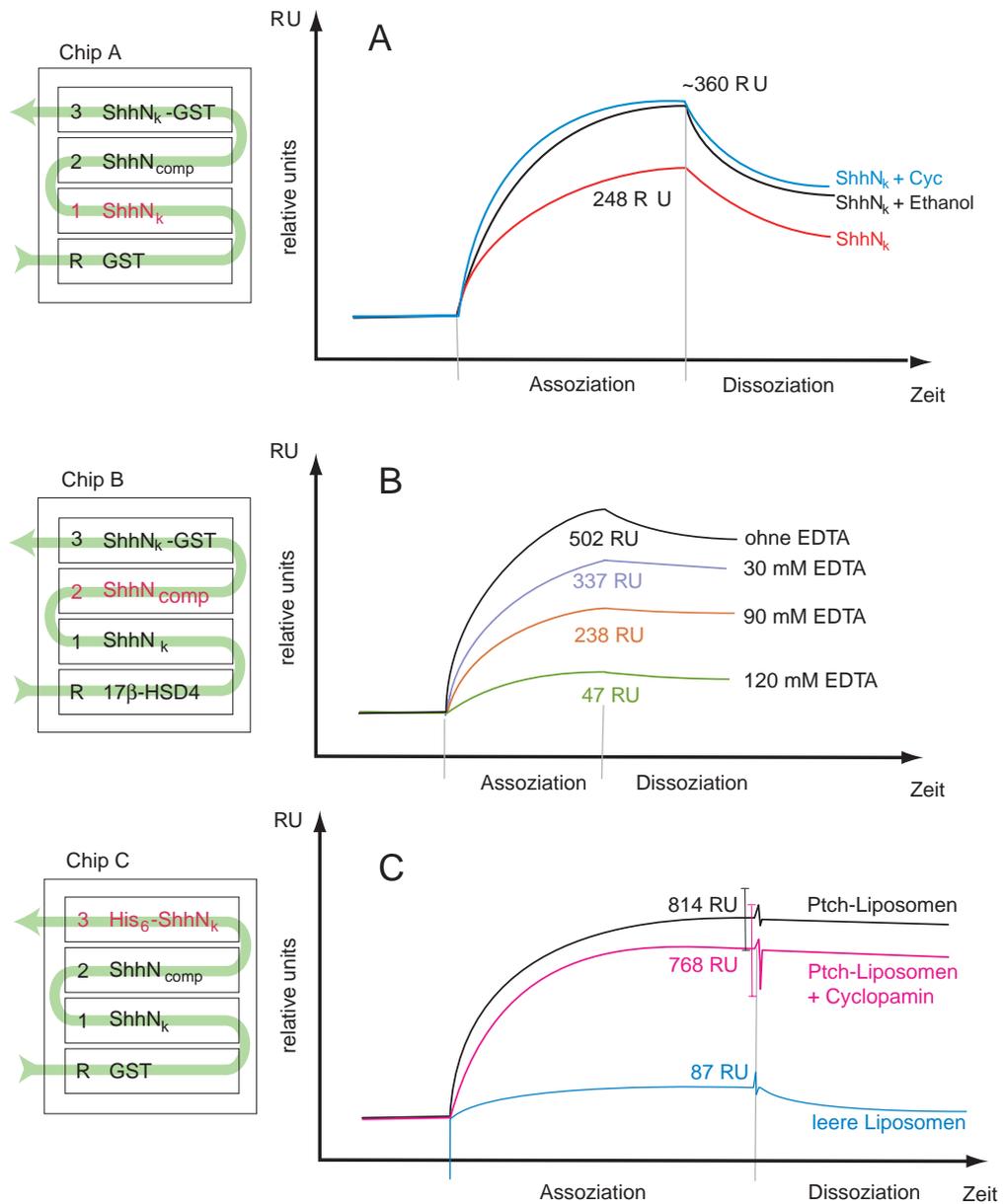


Abbildung 2.31: Analyse der Interaktionen von ShhN. Links ist die Belegung der 4 Oberflächen der jeweilig verwendeten Sensorchips gezeigt. In grün ist der Weg des Analyten über die Sensoroberflächen dargestellt. Rechts daneben sind die Bindungskurven der rot markierten Zellen (abzüglich der Referenzzelle R) exemplarisch gezeigt. **A** Dimerisierung von ShhN_k in Gegenwart von Inhibitoren. Die Nettobindungskurve eines Kontrollansatzes bestehend aus ShhN_k ohne Inhibitoren ist in rot gezeigt (248 RU). Eine deutlich stärkere Signal wird in Anwesenheit von in Ethanol gelösten Inhibitoren, aber auch mit Ethanol allein erhalten. Blau = 100 mM Cyclopamin; schwarz = gleiches Volumen Ethanol ohne Inhibitor. **B** Dimerisierung von ShhN_{comp} in Abhängigkeit vom Zn-Gehalt des Analyten. Mit steigender EDTA-Konzentration, d. h. sinkendem Zn-Gehalt, sinkt die Amplitude der Bindungskurve. **C** Bindung von $\text{His}_6\text{-ShhN}_k$ an Ptch-Liposomen. Eine Dissoziation tritt praktisch nicht auf, wie an der extrem flachen und kaum abfallenden Dissoziationslinie zu sehen ist. Die Anwesenheit von Cyclopamin beeinflusst die Bindungsstärke nicht signifikant. R = Referenzzelle; RU = *relative units*

7-DHC, Desmosterol oder Cyclopamin, die in Ethanol gelöst waren, beeinflussten die Homodimerisierungsrate der ShhN-Varianten nicht. Sichtbar war zwar eine erhöhte Bindung des Analyten, dieser Effekt wurde jedoch auch durch Einspritzen einer Kontrolllösung mit Cholesterin oder reinem Alkohol in gleicher Intensität beobachtet und stellt keine Wirkung der untersuchten Substanzen dar (Abb. 2.31 A). Dagegen konnte die Wechselwirkung von ShhN durch Entfernen des Zn^{2+} -Ions (Inkubation mit EDTA-Lösung) vollständig eliminiert werden (Abb. 2.31 B). Dadurch wurde die Spezifität der Bindung und die Wichtigkeit des Zn^{2+} -Ions für die Proteinstabilität demonstriert.

2.5.4 Einfluss von Inhibitoren auf die Bindung von Sonic Hedgehog an Patched - *Surface Plasmon Resonance*

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen ShhN und seinem Rezeptor Ptch wurden die verschiedenen ShhN-Varianten immobilisiert (siehe Abb. 2.31 C). Als Analyt wurde den ShhN-Proteinen das Multitransmembranprotein Ptch in Form von Liposomen angeboten. Parallel zu Herstellung der Ptch-Liposomen erfolgte als Kontrolle die Präparation von fluoreszierenden GFP-Ptch-Liposomen, deren Qualität mit dem Fluoreszenz-Mikroskop überprüft werden konnte. Die Normalisierung erfolgte wiederum entweder gegen GST oder gegen 17β Hsd4. Abb. 2.31 C zeigt in schwarz die Nettobindungskurven (Signal der Probenoberfläche minus Signal der Referenzoberfläche). Die Bindung der Ptch-Vesikel an die ShhN-Oberfläche war irreversibel und ließ sich mit keiner der herkömmlichen, proteinverträglichen Waschlösungen rückgängig machen, was die extrem hohe Affinität zeigt. „Leere“ Liposomen, die kein Ptch enthielten, zeigten eine signifikant schwächere Bindungskurve (blaue Kurve). Die Anwesenheit selbst sehr hoher Konzentrationen (bis zu 1 mM) von 7DHC, Desmosterol oder Cyclopamin hatte keinen signifikanten Einfluss auf diese Interaktion (Abb. 2.31 C, rote Bindungskurve). Da die Größe der Lipid-Vesikel von verschiedenen Chargen nicht einheitlich ist, variiert die absolute Signalstärke. Aus diesem Grund wurde in Abb. 2.31 C die Abweichung zum Mittelwert angegeben. Es ist deutlich, dass der Unterschied in der Bindungsstärke bei Kontrolle und Inhibitor nicht signifikant war.

Fazit

Die Dimerisierung von ShhN konnte mit drei unabhängigen Techniken nachgewiesen werden. Mittels Gelfiltration wurde eine Dimerisierungsrate von 19 - 24 % festgestellt. Die Anwesenheit von Cyclopamin oder der Cholesterinvorläufer 7-Dehydrocholesterin und Desmosterol beeinflusste die Dimerisierungsreaktion nicht (SPR).

Mittels SPR wurde eine hochaffine Bindung zwischen ShhN und Ptch-Liposomen festgestellt, die von den untersuchten Inhibitoren ebenfalls nicht verändert wurde.

2 Ergebnisse

3 Diskussion

3.1 Expression von Cholesterinbiosynthese-Enzymen in der Embryonalentwicklung

3.1.1 Das ungewöhnliche Expressionsmuster

Alle Zellen benötigen Cholesterin als essentiellen Membranbestandteil. Man ging deshalb davon aus, dass die embryonale Cholesterinbiosynthese ubiquitär stattfindet bzw. verstärkt an Orten mit erhöhter Proliferationsrate und in der Leber, die es wie im Erwachsenen dem Rest des Organismus zur Verfügung stellt (WOOLLETT, 2001). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Expressionsanalyse Cholesterin-synthetisierender Proteine ergab jedoch ein unerwartetes räumlich und zeitlich dynamisches Expressionsmuster für diese Gene. Hohe mRNA-Level wurden in verschiedenen Neuralleistenderivaten (Spinalganglien, kraniale Ganglien und Pharyngealbögen), um Haarfollikel, im Gehirn und den Gliedmaßen gefunden. Mit Ausnahme des Gehirns wurde bis jetzt keines dieser Gewebe als cholesterogen betrachtet. Die Leber, die als das Hauptorgan der adulten Cholesterinbiosynthese gilt, zeigte dagegen keine Expression im Embryo.

*Distinktes
Expressionsmuster*

Die beobachtete Expression beschränkte sich nicht auf mRNA-reiche stark proliferierende Gewebe, sondern dominiert in mehreren apoptotischen Zonen (interdigitale Bereiche, Froriepsche Ganglien, Spinalganglien). Das Expressionsmuster ist über mehrere Entwicklungstage (E 10,0 - E 13,0) hinweg gleichbleibend und in verschiedenen Fällen, wie z. B. im Neuralrohr, sind die Expressionsdomänen scharf abgegrenzte Bereiche in histologisch homogenen Geweben. Das spricht für eine hochspezifische Hybridisierung. Die Gene der Cholesterinbiosynthese-Enzyme können mit Sicherheit als eine neue „Synexpressionsgruppe“ im Sinne von Gawantka et al. und Niehrs et al. bezeichnet werden (GAWANTKA et al., 1998; NIEHRS & POLLET, 1999).

*Das Signal ist
spezifisch*

Die stärkste Expression der Cholesterinbiosynthese-Enzyme tritt in den Geweben auf, die in den Mausmutanten morphologisch oder histologisch beeinträchtigt sind (Abb. 3.1) (FARESE & HERZ, 1998; DERRY et al., 1999). So werden Gesichtsdeformationen (z. B. Agnathia oder Mikrognathia), die die Folge von defekten Neuralleisten-Zellen sind, sehr häufig beobachtet. Charak-

*Korrelation mit
Mutantenphänotyp*

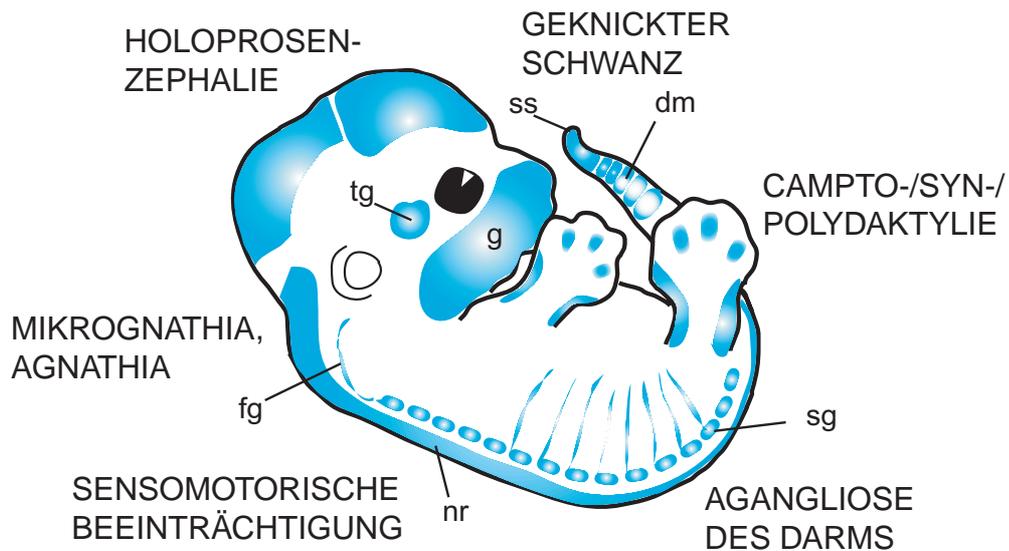


Abbildung 3.1: Schematische Zusammenfassung der Expression der Cholesterinbiosynthese-Enzyme. Die blauen Bereiche zeigen die Gewebe, in denen alle untersuchten Gene des Cholesterin-Biosynthese-Wegs übereinstimmend exprimiert werden. dm = Dermomyotom; fg = Frobiepsche Ganglien; g = Gesichtsmesenchym; nr = Neuralrohr; sg = Spinalganglien; ss = Schwanzspitze.

teristisch sind auch Gliedmaßenmissbildungen wie Syn- und Camptodaktylie, die durch eine nicht vollständige Trennung der Finger verursacht werden. Der Phänotyp im Gehirn ist nur bei menschlichen Patienten ausgeprägt und reicht von geistiger Retardierung bis zu Holoprosenzephalie bei humanen SLOS-Patienten (KELLEY & HENNEKAM, 2000). Bei 7Dhcr-k.o.-Mäusen wurde eine Fehlfunktion von glutamergen Neuronen festgestellt (WASSIF et al., 2001). Dass die Ursache für diese Missbildungen ausschließlich ein Mangel an Membran-Cholesterin ist, ist aus mehreren Gründen unwahrscheinlich. 1) Es handelt sich bei einigen der betroffenen Gewebe um apoptotische Zellen, die gar keine Membransynthese mehr benötigen; 2) Manche Expressionsteritorien liegen in histologisch homogenen Geweben, deren Zellen den gleichen Bedarf an Membrancholesterin haben sollten; 3) Der gemeinsame Mutanten-Phänotyp spricht für einen spezifischen morphogenetischen Defekt.

Mit der Ausnahme von *Idi1* an Tag 10 der Embryonalentwicklung werden alle untersuchten Gene einheitlich exprimiert. D. h. die ursprüngliche Annahme, die Mutanten-spezifischen, diagnostischen Symptome der Mutantenphänotypen beruhten auf einer differenzierten Expression, trifft nicht zu. *Idi1*, das nicht nur an der Cholesterinbiosynthese, sondern auch an der Bildung des direkten Vorläufers anderer Isoprenoide beteiligt ist, scheint an Tag 10 eine andere Funktion zu erfüllen, die mit einem erhöhten Bedarf an Isoprenoiden in den Geweben hoher *Idi1*-Expression zu tun haben könnte. Neuere Daten aus proteomanalytischen Untersuchungen weisen darauf hin, dass *Idi1* unter manchen Bedingungen als Schrittmacherenzym der Isoprenoid-Biosynthese arbei-

Einheitliche
Expression

3.1 Cholesterinbiosynthese in der Embryonalentwicklung

ten kann (STEINER et al., 2000; STEINER et al., 2001). Evtl. kontrolliert es dabei auch die Verteilung des Metabolitflusses zu den einzelnen Isoprenoid-abhängigen Folgereaktionen (Proteinglykosylierung, Proteinisoprenylierung, Hämbiosynthese). Offensichtlich wird die Transkription des *Idi1*-Gen in diesem Stadium anders reguliert als die der anderen untersuchten Gene. Das bedeutet aber nicht, dass am Tag 10 kein *Idi1* in Neuralleistenderivaten und Gliedmaßen exprimiert wird. Möglicherweise wird die Translation oder der RNA-Abbau anders reguliert und demzufolge könnte *Idi1*-Protein vorhanden sein, auch wenn keine mRNA mehr nachweisbar ist. Es könnte also trotzdem ein vollständiger Cholesterinbiosynthese-Weg in den entsprechenden Geweben existieren. Ab Tag 11 der Schwangerschaft zeigt *Idi1* das gleiche Expressionsmuster wie die anderen Cholesterinbiosynthese-Enzyme.

3.1.2 Variationen im Phänotyp der Mutanten

Eine Reihe von Symptomen treten bei allen Cholesterinbiosynthese-Mutanten gleichermaßen auf und könnten die Folge einer gestörten morphogenetischen Funktion eines Cholesterinderivats sein. Im Gegensatz dazu können die wenigsten diagnostischen Merkmale der einzelnen Syndrome, z. B. die Gehirndefekte bei SLOS oder die Ichthyose-Formen bei CHILD und CDPX2, durch spezifische Unterschiede in der Genexpression erklärt werden, da alle Enzyme einheitlich exprimiert werden. Die diagnostischen Defekte in Gehirn und Haut könnten vielleicht durch die Akkumulierung von spezifischen toxischen Metaboliten bewirkt werden.

*Toxische
Metabolite...*

Der gravierendste Phänotyp bei SLOS betrifft das Gehirn. Mikrozephalie, Holoprosenzephalie und am häufigsten geistige Retardierung sind charakteristisch für die menschliche Form des Syndroms. Sie treten weder in CHILD- oder CDPX2-Patienten noch im Mausmodell von SLOS auf. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten an, dass der Grund hierfür nicht in einer räumlich unterschiedlichen Expression von *DHCR7* liegt. Gaoua et al. entwickelten ein Ratten-Modell für SLOS, in dem durch AY9944-Verabreichung die *DHCR7*-Aktivität inhibiert wird (GAOUA et al., 2000). Ihre Resultate weisen darauf hin, dass die Ursache der Gehirn-Defekte der Cholesterinmangel ist und nicht die Akkumulierung toxischer Intermediate. Verschiedene Veröffentlichungen zeigen jedoch, dass AY9944 nicht spezifisch die 7-Dehydrocholesterinreduktase hemmt sondern z. B. auch die $\Delta 7$ - $\Delta 8$ -Isomerase und Sphingomyelinase-Aktivität (MOEBIUS et al., 1997; YOSHIDA et al., 1985). Außerdem bestehen so drastische phänotypische Unterschiede zwischen Nagetiermutanten und menschlichen Patienten, dass die Ratte als Modell für die Gehirndefekte von SLOS-Patienten ungeeignet ist (WASSIF et al., 2001). Ein Einfluss von unphysiologischen Cholesterinvorläufern auf die Pathologie der Gehirndefekte bei menschlichem SLOS ist daher nicht auszuschließen.

... auch bei SLOS

CHILD- und CDPX2-Patienten leiden unter Ichthyose, einer entzündlichen Hauterkrankung, die bei SLOS-Patienten nicht beobachtet wird. Auch diese

... und Ichthyose

3 Diskussion

Hauterkrankungen sind wahrscheinlich auf einen toxischen Effekt von unphysiologischen Sterolen zurückzuführen, die aufgrund der defekten enzymatischen Schritte akkumulieren. Da in CHILD und CDPX2 fast aufeinanderfolgende Schritte blockiert sind, handelt es sich bei den Vorläufern, die angehäuft werden, um strukturell sehr ähnliche Moleküle. Es wäre denkbar, dass sie die gleichen toxischen Effekte auslösen, während das bei SLOS-Patienten akkumulierende 7-Dehydrocholesterol (Vitamin D-Vorläufer) bzw. dessen Derivate diese Eigenschaft nicht mehr besitzen.

3.1.3 Funktion der Cholesterinbiosynthese in der Embryogenese

Morphogenes Steroid?

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten erlauben bereits einige Spekulationen bezüglich der Funktion der embryonalen Cholesterinbiosynthese. Das Expressionsmuster der untersuchten Gene lässt in den Mutanten eine lokale Produktion von Cholesterin genau in den Geweben vermuten, die morphologisch am stärksten betroffen sind. P450_{scc}-mRNA war in diesen Geweben nicht nachweisbar, aber Keeney et al. detektierten mit anti-P450_{scc}-Antikörpern große Mengen des Proteins in Spinalganglien, kranialen Ganglien und Gliedmaßen (KEENEY et al., 1995). Auch P450_{c17}, das 17 α -Hydroxylase/17,20-Lyase-Aktivität besitzt und unter anderem das Produkt der P450_{scc}-Reaktion weiter umsetzt (vgl. Kap. 2, Abb. 2.11), wurde in diversen Neuralleistenderivaten nachgewiesen (COMPAGNONE et al., 1995). Es ist deshalb durchaus möglich, dass das Endprodukt des embryonalen Synthesewegs nicht Cholesterin sondern ein Steroidhormon ist. Die phylogenetische Analyse der Steroidrezeptorfamilie und der steroidogenen Enzymfamilien (siehe Kapitel 2.2), auf die später noch genauer eingegangen wird, zeigt eine enge Verwandtschaft zwischen Retinsäure- und Steroid-Signalweg. Eine der Retinsäure analoge, morphogene Wirkung eines bisher nicht identifizierten Steroids während der embryonalen Morphogenese ist durchaus denkbar. Das Insekten-Steroid Ecdyson spielt z. B. eine wichtige Rolle in der Insektenmorphogenese (D'AVINO & THUMMEL, 2000; GATES & THUMMEL, 2000). Es wird in den Prothoraxdrüsen produziert, mit der Hämolymphe gleichmäßig durch den Larvenkörper verteilt und aktiviert dort Zielzellen mit den passenden Rezeptoren (endokriner Mechanismus) (WARREN & GILBERT, 1996). In der Maus würde das Hormon dagegen lokal produziert werden und ausschließlich auf unmittelbare Nachbarzellen wirken (parakriner Mechanismus).

kein Östrogen oder Progesteron

Obwohl Östrogenrezeptor α (ER α) und der Progesteronrezeptor (PR) im fötalen peripheren Nervensystem nachgewiesen wurden (THI et al., 1998), ist das postulierte morphogenetische Steroidhormon mit großer Wahrscheinlichkeit nicht Östrogen oder Progesteron, da diese in großen Mengen in der Plazenta und später in den fötalen Nieren gebildet und von dort aus durch das Kreislaufsystem im ganzen Embryo verteilt werden (POLLACK et al., 1997; MILLER, 1998). Eine lokale Produktion dieser Hormone zum Zweck der Morpho-

3.1 Cholesterinbiosynthese in der Embryonalentwicklung

genese wäre nicht effektiv. Darüber hinaus zeigen die Phänotypen der ER α -, ER β - sowie der entsprechenden Doppel-k.o.-Mäuse keinerlei Ähnlichkeit mit dem der Cholesterinbiosynthese-Mutanten (COUSE & KORACH, 1999; KORACH, 1994; MALAYER & GORSKI, 1993). Das gleiche gilt für die PR-k.o.-Maus (CONNELLY et al., 2001).

Cholesterin und programmierter Zelltod

Die unerwartete Expression der Cholesterinbiosynthese-Enzyme in apoptotischen Geweben erlaubt aber noch eine weiterführende Interpretation der embryonalen Cholesterinwirkung. Unerwartet war dieses Expressionsmuster vor allem, weil es der Theorie der erhöhten Cholesterinproduktion aufgrund des Bedarfs in neugebildeten Membranen widersprach. In den interdigitalen Domänen der Gliedmaßen ähnelte das beobachtete Muster stark der Expression der apoptotischen Signale p53 und Bax. Und auch an anderen Orten (Froiepische Ganglien, Spinalganglien, Gliedmaßenknospen¹) handelt es sich um Zellpopulationen die zumindest teilweise durch programmierten Zelltod degenerieren.

Apoptose

Damit aus einer Eizelle ein lebensfähiger und um ein Vielfaches größerer Säugetierorganismus entstehen kann, ist nicht nur Zellproliferation, -wanderung und -differenzierung nötig. Mit dem enormen Aufbau ist auch ein erstaunliches Maß an Zellzerstörung verbunden. Es wurde erkannt, dass diese scheinbare Verschwendung von kostbarem Zellmaterial ein genauso konstruktiver und notwendiger Prozess in der Entstehung eines komplexen Organismus ist, wie die Replikation oder Differenzierung von Zellen. Man unterscheidet deshalb das unregulierte Absterben von Zellen (Nekrose) z. B. nach Läsionen von dem „programmierten Zelltod“ (Apoptose), der eine essentielle Rolle in der Embryogenese sowie in adultem Gewebe spielt. Der Vorgang der Apoptose kann als inszenierter Zellkollaps beschrieben werden. Einem festgelegten Protokoll folgend werden stufenweise Membranen und Proteine abgebaut, das Chromatin kondensiert, und die DNA wird verdaut. Entstehende Abbauprodukte werden von benachbarten Zellen aufgenommen und wiederverwertet. Im Gegensatz zur Nekrose, bei der das Gewebe anschwillt, kommt es bei der Apoptose zu einer Zellschrumpfung.

*programmierter
Zelltod vs. Nekrose*

Ein grundlegender *modus operandi* in der Entwicklung aller Metazoa ist die Überproduktion von Zellen in bestimmten Entwicklungsstadien, der eine apoptotische Phase in späteren Stadien folgt. Dadurch wird die für die optimale Organfunktion notwendige relative Anzahl der verschiedenen Zelltypen erreicht (JACOBSON et al., 1997). Dieses Vorgehen ermöglicht eine große Flexibilität in der Entwicklung, weil vorläufige Strukturen an mehrere Funktionen

*Apoptose während
der Embryogenese*

¹ 60th International Meeting of the Society of Developmental Biology: In Vorträgen von Cliff Tabin, Harvard University, und Gail Martin, UCSF, zum aktuellen Modell der Gliedmaßenentwicklung wurde der Apoptose eine entscheidende Rolle bei der Determinierung der verschiedenen Gliedmaßenknochen zugeschrieben.

3 Diskussion

in verschiedenen Entwicklungsstadien oder Geschlechtern angepasst werden können. So entwickeln sich z. B. aus dem Müllerschen Gang in weiblichen Föten der Uterus und die Eileiter, in männlichen Föten aber wird er nicht gebraucht und abgebaut. Auf der anderen Seite wird in weiblichen Organismen der Wolffsche Gang „gelöscht“, aus dem in XY-Föten die männlichen Reproduktionsorgane entstehen.

Ancestrale Strukturen degenerieren

Alle hochentwickelten Organismen durchlaufen in der Entwicklung Stadien mit ancestralen Strukturen, die sie im Erwachsenenstadium nicht mehr brauchen (evolutionäre Rudimente). Im Laufe der Embryogenese werden diese häufig durch apoptotische Prozesse entfernt. Beispielsweise bilden sich aus dem Pronephros in Fischen und Amphibien funktionelle Nieren, während er in Säugetieren inaktiv bleibt und degeneriert (SAXEN et al., 1986). In ähnlicher Weise werden in der Metamorphose von Insekten und Amphibien Zellen abgebaut, die im adulten Organismus nicht länger vonnöten sind, wie z. B. Muskelzellen und Neuronen, die für die Bewegung der Larve notwendig waren.

Apoptose als Kon- trollmechanismus

Durch die Entwicklung der Apoptose war auch ein Kontrollmechanismus möglich, der einige genetische oder stochastische Fehler in der Entwicklung kompensiert. So kann übermäßige Proliferation bestimmter Zellen, hervorgerufen z. B. durch eine Überdosis an Morphogenen, durch Einschalten der Selbstzerstörung ausgeglichen werden. Auch wandernde Zellen (vgl. Neuralleiste), die von ihrem vorgeschriebenen Pfad abkommen, zerstören sich (normalerweise) selbst, sobald sie einen nötigen trophischen Faktor nicht mehr empfangen (BRONNER-FRASER, 1993).

Regulation der Apoptose

Während sich die Entwicklung/Morphogenese bei *C. elegans* und *Drosophila* auf das frühe Leben beschränkt und mit Geburt oder Metamorphose endet, bleiben die Prozesse der Morphogenese und Regeneration in Wirbeltieren in vielen Geweben über die gesamte Lebensspanne hinweg erhalten. Die kritische Rolle der Apoptose im Entwicklungsprozess ist deshalb während des gesamten Lebens offensichtlich. Die Apoptose-Maschinerien von Invertebraten und Vertebraten sind im wesentlichen homolog, bei letzteren jedoch um einiges ausgeklügelter, um die höheren Anforderungen an die Kontrolle der Apoptose in den hochentwickelten Wirbeltiergeweben zu erfüllen. Wie in Invertebraten, werden apoptotische Prozesse in der Wirbeltierentwicklung durch transkriptionelle Mechanismen reguliert. So sind beispielsweise Steroidhormon-Rezeptoren kritische Regulatoren der Apoptose in vielen Säugetiergeweben wie Brustdrüse, Prostata, Ovar und Testis (KIESS & GALLAHER, 1998). Auch das klassische Beispiel für Apoptose, der interdigitale Zelltod, wird durch die Transkription der Zielgene des BMP-Signalwegs induziert (MERINO et al., 1999). Daneben besitzen Säugetiere noch zwei nicht-transkriptionelle Regulationswege, für die in Fliege oder Wurm bisher keine entsprechenden Analoga entdeckt wurden: sog. „DEATH-Rezeptoren“ sowie pro-apoptotische Einflüsse, die direkt auf Mitochondrien einwirken und die Freisetzung von verschiedenen pro-apoptotischen Peptiden zur Folge haben (RAVI et al., 2001).

Im Menschen sind u. a. Oxysterole als Apoptose-Induktoren bekannt (THOMPSON & AYALA-TORRES, 1999). So sind sie z. B. bei Atherosklerose dafür verantwortlich, dass sowohl Monozyten als auch Makrophagen, die das gefährliche Lipidmaterial von den Gefäßwänden abbauen könnten, durch Induktion der Apoptose ausgeschaltet werden (AUPEIX et al., 1995; AUPEIX et al., 1996; BROWN & JESSUP, 1999). Obwohl spezifische Rezeptoren (z. B. LXR α) existieren (ALBERTI et al., 2000), sind bisher lediglich toxische Wirkungen von Oxysterolen bekannt (die meist auf Apoptose beruhen) (BAKOS et al., 1993; AYALA-TORRES et al., 1999; EDWARDS & ERICSSON, 1998; NISHIO & WATANABE, 1996; O'CALLAGHAN et al., 2001). Die Induktion embryonaler Apoptose durch lokal produzierte Oxysterole wäre das erste physiologische Beispiel für eine spezifische Funktion dieser Metabolite und ihrer Rezeptoren.

Oxysterole

Cholesterinbiosynthese in Shh-Zielzellen

In mehreren Fällen wurden die Cholesterinbiosynthese-Enzyme spezifisch in *Sonic Hedgehog*-Zielzellen exprimiert, was die bereits diskutierte Verbindung von Shh-Signalweg und Cholesterin unterstreicht. Für die kranialen Neuralleistenzellen ist Shh beispielsweise ein wichtiger trophischer und/oder mitogener Faktor. In Abwesenheit von Shh degenerieren diese Zellen und schwere Gesichtsmisbildungen sind die Folge, ein Effekt, der auch von Cyclopamin verursacht wird (COVENTRY et al., 1998). Im ventralen Neuralrohr wurden die untersuchten Gene sowohl räumlich als auch zeitlich dort exprimiert, wo Shh Motoneuronen induziert² (ROELINK et al., 1995). Im Stadium der Neurulation befand sich eine sehr auffallende Expressionsdomäne entlang der Shh-exprimierenden Mittellinie und an Tag 13,0 wurden die Gene der Enzyme kreisförmig um die Follikel der Schnurrhaare detektiert. Da Shh an der Morphogenese fast aller embryonaler Strukturen beteiligt ist, liegt der Einwand nahe, dass die beobachtete Korrelation nicht signifikant ist, da es schwer ist, eine nicht-responsive Zellpopulation zu finden. Die Tatsache allerdings, dass die Cholesterinbiosynthese an so auffällig abgegrenzten Orten wie um die Haarfollikel oder in den Kiemenbögen stattfindet, ist ein deutliches Indiz für die Signifikanz der Co-Expression.

Signifikante
Co-Expression

3.2 Erkenntnisse aus der phylogenetischen Analyse von Steroidsignalwegen

Durch die umfassende phylogenetische Analyse sollte die Hypothese herausgefordert werden, ob Cholesterinderivate, wie z. B. Steroidhormone, ein entscheidender morphogenetischer Faktor der Wirbeltierevolution waren und

Unterstützung
durch Expressions-
analysen

² Die Induktion der Motoneuronen wird als *in vitro*-Assay zur Untersuchung von Inhibitoren des Shh-Signalwegs verwendet

3 Diskussion

aus dem Retinsäure-Signalweg entstanden sind. Diese Hypothese gründete sich zunächst auf den Phänotypen von Cholesterinbiosynthese-Mutanten, die durch Missbildungssyndrome charakterisiert sind, und zusätzlich auf Veröffentlichungen von Baker, Laudet und Mitarbeitern, die die nahe Verwandtschaft von steroidogenen Enzymen bzw. Steroidhormonrezeptoren zu Komponenten des morphogenetischen Retinsäurewegs feststellten (ESCRIVA et al., 1997; ESCRIVA et al., 1998; ESCRIVA et al., 2000; BAKER, 1998; BAKER, 2001). Außerdem sprachen die Ergebnisse der Expressionsanalysen von Cholesterinbiosynthese-Genen, die im vorangehenden Abschnitt diskutiert wurden, zugunsten der Hypothese: Die Steroidogenese findet in allen untersuchten Neuralleistenderivaten und im dorsalen Neuralrohr, dem „Geburtsort“ der Neuralleiste, statt.

Evolution der Wirbeltiermorphologie – die Neuralleiste

Die Entstehung der Neuralleiste stellt das entscheidende Ereignis dar, welches zur Entwicklung der Wirbeltiere führte (siehe auch Abb. 3.2). Wirbeltiere evolvierten wahrscheinlich aus einem Protochordaten-Vorläufer, der in Morphologie und Ökologie dem rezenten Cephalochordaten Amphioxus (Lanzettfischchen) ähnelte. Der Übergang von Protochordaten zu Vertebraten beinhaltete fundamentale morphologische Veränderungen (SHIMELD & HOLLAND, 2000), die insbesondere die Kopfregion der Vertebraten betrafen (GANS & NORTH CUTT, 1983). Wirbeltiere besitzen im Vergleich zu anderen Chordaten ein komplexes Gehirn, eine Reihe von sensorischen Organen außerhalb des Gehirns und einen segmentierten Pharynx (Rachenraum), der von Muskeln und skelettalen Elementen unterstützt wird. Der Schlüssel zur Entstehung dieser Merkmale war das Auftreten der Neuralleiste (GANS & NORTH CUTT, 1983; NORTH CUTT, 1996; NORTH CUTT & GANS, 1983). Die Neuralleiste ist eine Population von Zellen, die während der Neurulation im dorsalen Neuralrohr entsteht. Durch eine epithelial-mesenchymale Transition werden die Neuralleistenzellen mobil und verlassen ihren „Geburtsort“ (BAKER & BRONNER-FRASER, 1997). Sie wandern auf festgelegten Routen, die bezüglich der Wirbeltierspezies aber auch des Entwicklungsstadiums und dem Entstehungsort entlang der Körperachse variieren (BASCH et al., 2000), durch den Körper. Am Zielort ihrer Wanderung tragen sie zu den Strukturen bei, die als evolutionäre Vertebraten-spezifische Elemente gelten: z. B. Cranium, Kieferknochen, Ganglien. Diese morphologischen Neuheiten ermöglichten nicht nur den Übergang zu aktiverem Jagdverhalten, sondern förderte auch die Bildung eines komplexen Gehirns, das durch den Schädel geschützt wurde.

Der entscheidende Auslöser ist unbekannt

Nachdem die ersten molekularen Faktoren identifiziert wurden, die kritisch für die Bildung der Neuralleiste sind, wurde klar, dass der „genetische Rahmen“ für die Entstehung der Neuralleiste in Vertebraten bereits in der frühen Chordatenevolution existierte. Die am eingehendsten untersuchten Mitspieler sind Bmp4 und 7, die das Signal für die entscheidende epithelial-mesenchymale Umwandlung geben, und Mitglieder der Msx-, Slug/Snail-, Pax3/7- und Dlx-Familien. Alle diese Proteine sind auch in Amphioxus und/oder Tunikaten bekannt und zeigen bereits ein ähnliches Expressionsmuster. Trotzdem haben die-

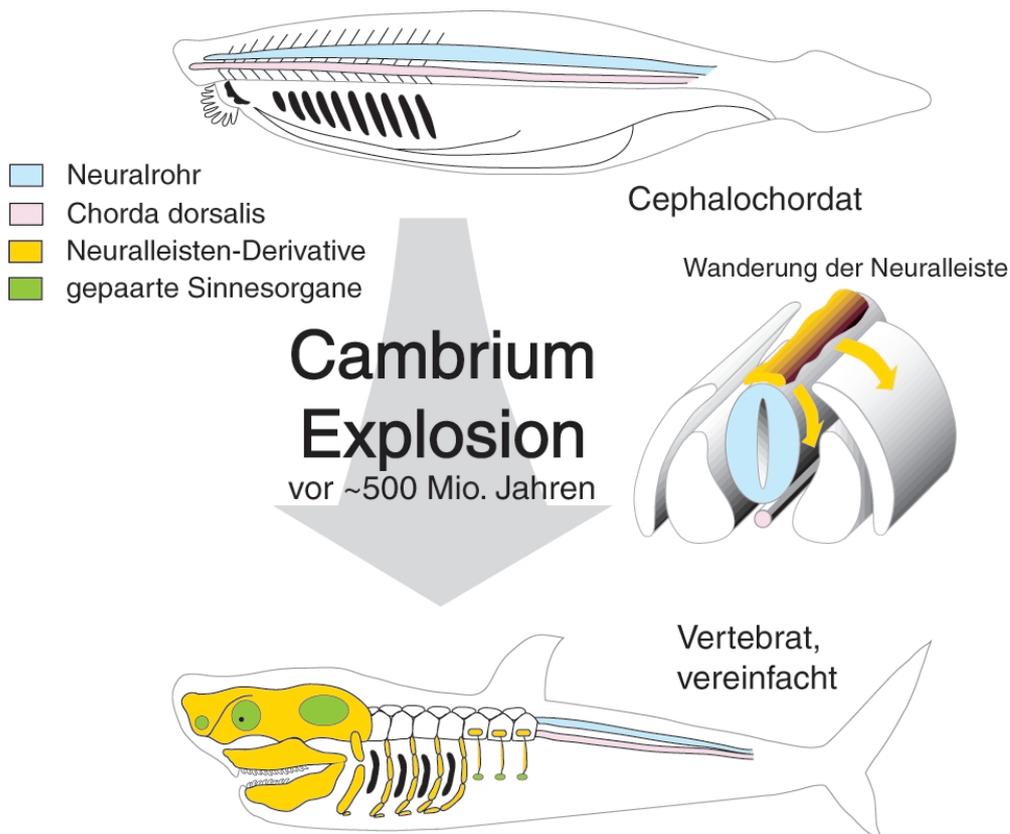


Abbildung 3.2: Ereignisse im Kambrium oder früher führten zur Entwicklung von Vertebraten-spezifischen Merkmalen. Entscheidend ist der Kopf mit skelettalen und muskulösen Elementen sowie die paarigen Sinnesorgane entlang der Körperachse. Beide Strukturen sind Neuralleisten-Derivate (NORTHCUTT & GANS, 1983).

se Organismen keine Neuralleiste. Der entscheidende Auslöser, der zur Entstehung der Neuralleiste führten, ist also bis jetzt unbekannt.

Es ist unwahrscheinlich, dass Neuralleistenzellen nach einem einzelnen evolutionären Schritt entstanden sind und eine homogene Zellpopulation darstellen. Zum einen haben die Zellen der Neuralleiste bezüglich ihres Ursprungsortes entlang der Körperachse unterschiedliche Potentiale: Man kann eine kraniale (Kopf-), eine torakolumbale (Rumpf-) und eine sakrale (Becken-) Neuralleiste unterscheiden. Zum anderen haben selbst Neuralleistenzellen von ein und demselben Entstehungsort je nachdem, wann sie auf die Wanderung gehen, unterschiedliche Eigenschaften während der Entwicklung und vielleicht unterschiedliche evolutionäre Ursprünge. So existiert z. B. eine Zebrafisch-Mutante (*narrow-minded*), bei der spezifisch nur die frühen Zellpopulationen, die zu den Spinalganglien beitragen, inhibiert sind. Später wandernde Neuralleistenzellen verhalten sich normal (ARTINGER et al., 1999). Darüber hinaus sind in diesen Mutanten die Rohon-Beard-Zellen beeinträchtigt, die an der Aufnahme mechanosensorischer Reize beteiligt sind und nicht zu den klassischen Neuralleistenzellen zählen. Diese Zellpopulation befindet sich im dor-

Mehrere evolutionäre Schritte führten zur Neuralleiste

3 Diskussion

salen Neuralrohr, und sie existiert auch in Amphioxus. Das weist auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung von Rohon-Beard- und Neuralleistenzellen hin.

Analyse aller Komponenten

Anders als bei Baker oder Laudet (BAKER, 1998; LAUDET, 1997), die jeweils nur einen kleinen Ausschnitt aus den Steroidsignalwegen analysierten (17β HSDs bzw. nukleäre Rezeptoren), wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal sowohl der gesamte Syntheseweg als auch die Steroid-Rezeptoren im Hinblick auf die oben genannte Hypothese untersucht. Da schon der erste durch P450scc katalysierte Schritt nach Cholesterin ein Steroid (Pregnenolon) produziert und bei jeder weiteren Umsetzung biologisch aktive Hormone entstehen können, ist es unzureichend – wie Baker es tut – nur die letzten Schritte der Steroidhormonsynthese zu betrachten. Cholesterin ist in allen Organismen, einschließlich der Ecdysozoa, die cholesterinauxotroph sind, der Ausgangspunkt für die Steroidogenese. Es ist daher viel wahrscheinlicher, dass die ursprünglichsten steroidogenen Enzyme die ersten Schritte nach Cholesterin katalysierten und sich erst später Enzyme für die nachfolgenden Reaktionen, z. B. für die Östradiol- oder Testosteronproduktion, entwickelten.

3.2.1 Entstanden Steroidhormon-Signale aus dem Retinsäure-Signalweg?

P450-Superfamilie

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Analyse ergab, dass unter den steroidogenen Enzymen sowohl sämtliche Mitglieder der P450-Superfamilie (P450scc, 17α -Hydroxylase/ $17,20$ -Lyase, Aromatase, 21 -Hydroxylase, Aldosteronsynthase) als auch 3β -Hydroxysteroiddehydrogenase/ $\Delta 4,5$ -Isomerase, 17β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 3 und 11β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1 mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit nicht aus Retinsäure/Retinol-umsetzenden Enzymen entstanden sind. Für keines dieser Enzyme konnte ein Vorläufer ermittelt werden, der Retinoide umsetzt.

unabhängige 17β HSD-Evolution

Ein etwas komplexeres Bild wurde für 17β -Hydroxysteroiddehydrogenasen Typ 1 und 2 und die 11β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2 erhalten. Diese besitzen als Schwestergruppe Retinoldehydrogenasen. Leider konnte in keinem dieser Fälle trotz enorm gewachsenen Sequenzdatenbanken die Substratspezifität des gemeinsamen Vorläufers ermittelt werden. Es ist also nicht bekannt, ob das ursprüngliche Substrat ein Retinol oder ein Steroid war. Baker postulierte trotzdem eine Retinoldehydrogenase als gemeinsamen Vorläufer, wofür es jedoch auch jetzt noch keine plausiblen Hinweise gibt. Es spricht vielmehr dagegen, dass z. B. 17β -HSD Typ 9, eine Retinoldehydrogenase, *in vitro* auch Steroide umsetzen kann. Auch andere Daten deuten eher auf eine parallele Evolution beider Enzymsubfamilien hin (DALFÒ et al., 2001). Die zur Zeit verfügbaren Sequenzinformationen lassen also nur auf eine (nahe) Verwandtschaft beider Enzymsubfamilien schließen, auf keinen Fall aber kann man davon sprechen, dass 17β -Hydroxysteroiddehydrogenasen aus Retinolde-

hydrogenasen entstanden seien.

Auch bei den Steroidhormon-Rezeptoren ist eine enge Verwandtschaft zum Retinsäure-Signalweg deutlich. Die Schwestergruppe der Vertebraten-spezifischen Steroidrezeptoren wird von Östrogen-ähnlichen Rezeptoren gebildet. Der gemeinsame Vorläufer ist die RXR-Subfamilie und schließlich das RAR/TR-Phylum. Auf den ersten Blick sieht es also so aus, als wäre der Vorläufer ein Retinsäure-Rezeptor. Aber ähnlich wie bei den 17β -HSDs, ist die Situation relativ komplex. Ein wichtiger Punkt ist, dass Orphanrezeptoren über alle Subfamilien verteilt sind, so dass das Fehlen eines bekannten Liganden gewissermaßen eine Plesiomorphie³ der nukleären Rezeptoren darstellt. Die Fähigkeit, Liganden zu binden, korreliert also nicht mit der Position im Stammbaum und ist wahrscheinlich unabhängig von ihrem evolutionären Ursprung erworben worden. Mit anderen Worten, der ursprüngliche Rezeptor könnte ein Orphanrezeptor gewesen sein, der durch Duplikationen und Divergenz unabhängig die Fähigkeit zur Bindung von verschiedenen Liganden entwickelt hat (siehe auch LAUDET, 1997). Der zweite wichtige Punkt in diesem Zusammenhang ist, dass es sich bei dem Liganden nicht um ein Protein handelt, das durch Mutationsereignisse subtile Veränderungen erfahren kann, so dass es zur Co-Evolution von Rezeptor und Ligand unter Entwicklung von spezifischen Funktionen kommen könnte. Es ist deshalb schwer vorstellbar, wie ein Rezeptor mit definiertem Liganden die Fähigkeit erlangen könnte, einen strukturell deutlich unterschiedlichen zu binden. Eine solche Entwicklung wäre höchstens innerhalb einer Gruppe (z. B. Steroidhormon-Rezeptoren) denkbar, wo die Liganden sich sehr stark ähneln. Laudet schlägt zusätzlich die Möglichkeit eines „Domain-Swapping“ als wichtigen Evolutionsmechanismus vor (LAUDET, 1997). Diese Hypothese wurde auch von eigenen, nicht gezeigten Daten unterstützt. Aber ob jemals ein Übergang von einem Retinsäure-spezifischen zu einem Steroid-spezifischen Rezeptor stattgefunden hat, ist sehr fragwürdig.

Die Ergebnisse für steroidogene Enzyme und nukleäre Rezeptoren zusammengekommen sprechen gegen die Theorie, Steroidsignale hätten sich aus dem Retinsäure-Signalweg entwickelt. Vielmehr ist eine parallele und unabhängige Evolution beider Systeme anzunehmen. Eine endgültige Widerlegung der Hypothese erfordert jedoch zuerst die Beantwortung der Frage, ob Cephalochordaten oder auch Tunikaten Orthologe von steroidogenen Enzymen oder Hormonrezeptoren enthalten und wie diese aussehen. Dazu ist die Analyse der kompletten Genome dieser Organismen erforderlich. Es wurden bisher trotz umfangreicher Bemühungen (LAUDET, 1997; ESCRIVA et al., 2000) keine entsprechenden Gene gefunden, aber diese negativen Ergebnisse haben natürlich keinen beweisenden Wert.

Wenn sich auch keine zeitliche Aufeinanderfolge der Entstehung von Retinsäure und Steroidsignalen nachweisen ließ, zeigt sich bei den hier präsentierten Daten dennoch eine enge molekulare Verwandtschaft von Steroidsignalen

Liganden unabhängig erworben

Steroidsignale sind nicht aus Retinsäuresignalen entstanden...

... könnten aber morphogenetisch wirken

³ = ursprüngliches Merkmal des gemeinsamen Vorläufers. Nicht für die Rekonstruktion von Verwandtschaftsbeziehungen geeignet.

und Retinsäuresignalweg insbesondere auf der Ebene der Rezeptoren, d. h. ein morphogenetisches Potential eines Cholesterinderivats (z. B. eines Steroids oder Oxysterols) ist denkbar.

3.2.2 Spielen Steroidhormone eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des Wirbeltierbauplans?

Steroide könnten zur Entwicklung beigetragen haben

Sämtliche Komponenten des Steroidhormon-Signalwegs sind spezifisch für Vertebraten. Wie in Abschnitt 2.2.4 gezeigt, gehen die Duplikationsereignisse, die zur Entwicklung der steroidogenen Enzyme und Hormonrezeptoren führten, der Kambrium-Explosion vor 500 – 600 Mio. Jahren deutlich voraus. Wie in Abb. 3.3 graphisch dargestellt, sind insbesondere die Hormonrezeptoren AR/PR, GR sowie 17β -HSD1 unmittelbar vor der Kambrium-Explosion etwa zeitgleich (ungefähr vor 770 Mio. Jahren innerhalb von etwa 10 Mio. Jahren) entstanden. Das passt zu neueren Ergebnissen, die von einer genetischen Diversifizierung ausgehen, die deutlich vor der paläontologisch dokumentierten Explosion im Kambrium stattgefunden haben muss (FORTEY, 2001; MORRIS, 2000; CONWAY MORRIS, 2000; BROMHAM et al., 1998). Viel früher (vermutlich kurz nach der Trennung der Tiere von den Pflanzen (FENG et al., 1997) vor etwa 1,2 Milliarden Jahren) fand die Abspaltung des Östrogenrezeptors statt. Wiederum innerhalb von nur etwa 10 Mio. Jahren tritt der Vorläufer der 11β - und 17β -HSDs vom Typ 2 auf.

Die Substitutionsrate von PR, AR und GR

Wie in Abschnitt 2.2.4 bereits diskutiert wurde, ist die Substitutionsrate der Gruppe PR, AR und GR fast doppelt so hoch, wie die des paralogen Östrogenrezeptors oder der ERR-Gruppe. Man könnte das so deuten, dass diese Rezeptorgruppe, die unmittelbar vor dem Kambrium entstanden ist, durch einen raschen Divergenzprozess eine völlig neue Funktion erworben hat. Evtl. waren einzelne Mitglieder dieser Rezeptorgruppe auch über längere Zeiträume redundant, so dass sie ohne hindernden Selektionsdruck rasch divergieren konnten. Sprunghafte Änderungen in der Substitutionsrate wurden bereits für Wachstumshormone von Säugetieren beschrieben (WALLIS, 1997; WALLIS, 2001), über deren Ursache konnte jedoch nur spekuliert werden.

3.3 Erkenntnisse aus dem Shh-Aktivitätsassay

p11xGli1-BS vs. p8xGli1-BS

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, einen funktionellen Shh-Aktivitätsassay zur weiteren Charakterisierung der Funktion von Cholesterin im Shh-Signalweg zu etablieren. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein zur Verfügung gestelltes, bereits in der Literatur beschriebenes Luciferase-Reporterplasmid getestet, das 8 Kopien der Gli1-Bindungssequenz (p8xGli1-BS) enthält, und

3.3 Erkenntnisse aus dem Shh-Aktivitätsassay

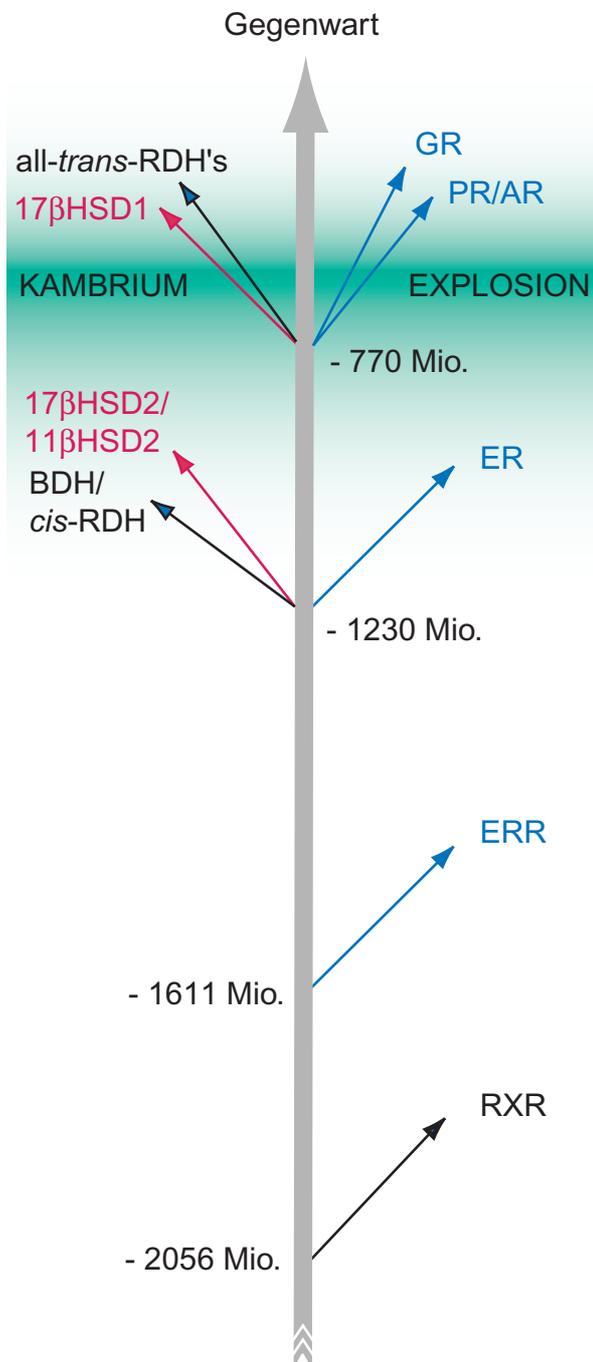


Abbildung 3.3: Graphische Darstellung der Entstehungszeiten verschiedener steroidogener Enzyme (**links, rot**) und Kernrezeptoren (**rechts**). Die Kambrium-Explosion, während der der Bauplan der Vertebraten schlagartig entstanden sein soll, wird etwa 500 - 600 Mio. Jahren in die Vergangenheit datiert. Die Entstehung der steroidaktivierenden 17β- und 11βHSD1 und die Diversifizierung der Steroidrezeptoren (blau) gehen diesem Ereignis voraus bzw. überlappen teilweise. Nähere Diskussion siehe im Text. AR = Androgen-Rezeptor; BDH = Butyratdehydrogenasen; ER = Östrogen-Rezeptor; ERR = Östrogen-ähnlicher Rezeptor; GR = Glucocorticoid-Rezeptor; PR = Progesteron-Rezeptor; RDH = Retinoldehydrogenasen; RXR = Retinoid X-Rezeptor.

3 Diskussion

daher Shh-responsiv sein sollte. Darüber hinaus wurden im Verlauf der Doktorarbeit neue Reporter mit 3, 6 und 11 Gli1-Bindungsstellen kloniert und mit dem p8xGli1-BS-Reporter verglichen. Obwohl der p8xGli1-BS-Reporter bereits in Veröffentlichungen beschrieben wurde, zeigen die in Kapitel 2 dargestellten Ergebnisse, dass er nur mangelhaft auf Gli1-Stimulierung reagierte. Eine vollständige Sequenzierung des Plasmids lieferte keine Hinweise auf die Ursache für die mangelnde Responsivität. Mit den selbst hergestellten Reportern wurden sehr gute Resultate erhalten. Die besten Ergebnisse wurden mit p11xGli1-BS erzielt. Dieser Reporter zeigte eine 10fach höhere Sensitivität in den Experimenten als p8xGli1-BS. Die beiden Plasmide unterscheiden sich lediglich durch die Sequenzen zwischen den Gli1-Bindungsstellen, der Anzahl der Bindungsstellen sowie dem Abstand zum Transkriptionsstart. Das könnte zur Ausbildung unterschiedlicher Sekundärstrukturen führen könnte, die im Falle des p8xGli1-BS-Reporters transkriptionshemmend wirken könnten.

Funktion für Ptch2?

Mit dem p11xGli1-BS-Reporter wurden eine Wildtyp- und eine Ptch-k.o.-Zelllinie charakterisiert. Während für die Wildtypzellen plausible Ergebnisse erhalten wurden (Stimulation mit ShhN, Repression durch Ptch), verhielt sich die K.o.-Zelllinie entgegen den Erwartungen, zeigte nämlich genau das gleiche Verhalten wie der Wildtyp. Gemäß der zur Zeit verbreiteten Vorstellung der Signaltransduktion (siehe Abb. 1.3) sollte in diesen Zellen konstitutiv aktives Gli1 vorliegen, da Smo nicht von Ptch inhibiert wird. Außerdem dürfte die Zelle nicht auf ShhN reagieren, da dessen Rezeptor nicht existiert. Beide Annahmen wurden in der untersuchten K.o.-Zelllinie nicht bestätigt. Mit dem derzeit geltenden Modell der Shh-Signaltransduktion sind die erhaltenen Ergebnisse also nicht vereinbar. Das Vorliegen von funktionellem Patched-Protein in der k.o.-Zelllinie wurde mehrfach und eindeutig ausgeschlossen (Dr. Heidi Hahn, Inst. für Pathologie, GSF). Die erhaltenen Ergebnisse wären allerdings erklärbar, falls Ptch2 in diesen Zellen translatiert würde. Ptch2 besitzt eine hohe Sequenzhomologie zu Ptch, ist in der Lage Shh, Dhh und Ihh zu binden und wird in frühen Embryonalstadien teilweise überlappend mit diesem exprimiert (MOTOYAMA et al., 1998; CARPENTER et al., 1998). Die Anwesenheit von Ptch2-Transkripten wurde nicht untersucht. Da die untersuchte Ptch-k.o.-Zelllinie aus embryonalem Gewebe gewonnen wurde, ist eine Expression von Ptch2 in diesen Zellen denkbar. Die genaue Funktion dieses Proteins, ist allerdings noch nicht bekannt. So wurden beispielsweise Ptch2-Transkripte identifiziert, bei denen genau die Bereiche deletiert sind, die für die Shh-Bindungsstelle kodieren (ZAPHIROPOULOS et al., 1999). Außerdem wurde eine Co-Expression von Ptch2 und Shh in einigen Geweben (z. B. Nasendrüsen oder Augenlidern) festgestellt (MOTOYAMA et al., 1998). Trotz der hohen Sequenzhomologie der beiden Ptch-Proteine (52 % auf Proteinebene) ist also eine unterschiedliche Funktion im Signalweg zu vermuten.

Anhand der in diesem Zusammenhang durchgeführten Experimente ist eine genauere Diagnose des Problems nicht möglich. Aus den oben diskutierten Gründen wurden keine Experimente mit der Ptch-k.o.-Zelllinie durchgeführt,

da in dem System zu viele unbekannte Faktoren die Interpretation der Messwerte im Moment unmöglich machen. Die hergestellten Reporter sind aber funktionsfähig und können für weitere Fragestellungen verwendet werden (siehe unten, Abschnitt „Ausblick“).

3.4 Lokalisationsstudien

In Kapitel 2.4 wurde gezeigt, dass sowohl Shh als auch sein Rezeptor Patched in vesikulären Strukturen im Zellinnern und überraschenderweise nicht (bzw. in nicht-detektierbaren Mengen) in der Zellmembran lokalisiert sind. Diese Beobachtung wurde von anderen Gruppen bestätigt (H. Roelink, persönliche Mitteilung). Damit die Signalübertragung stattfinden kann, muss also mindestens eines der beiden Proteine aus dem intrazellulären *Pool* heraus transportiert werden, um in Kontakt miteinander treten zu können. Ein einfaches, unreguliertes Targeting mittels eines Signalpeptids scheint nicht stattzufinden, wie die Experimente von Burke et al. zur Sekretion von Shh durch Disp andeuten (BURKE et al., 1999). Eine andere Art von Transport bzw. Targeting scheint hier beteiligt zu sein, die vermutlich im Zusammenhang mit Vesikeltransport-Vorgängen steht: (1) die durch Disp regulierte Sekretion von Shh findet in Vesikeln statt (siehe Kap. 2.4.3 und (BURKE et al., 1999)); (2) der Transport des Ptch/Smo-Komplexes von intrazellulären Kompartimenten zur Zelloberfläche müsste in Vesikeln erfolgen; (3) für die Signaltransduktion scheint die Endozytose des ShhN/Ptch/Smo-Rezeptorkomplexes in die Zielzelle erforderlich zu sein (INCARDONA et al., 2000); (4) kürzlich wurde das Vesikeltransport-Protein Rab23 als negativer Regulator des Shh-Signalwegs identifiziert (EGGENSCHWILER et al., 2001); (5) das Ptch/Disp-Homologe NPC1 ist ein wichtiger Regulator von Vesikeltransport-Vorgängen. NPC1 ist wie Ptch und Disp ein Multitransmembran-Protein, das eine *Sterol sensing*-Domäne besitzt (IOANNOU, 2000). Im Gegensatz zu Ptch/Disp ist jedoch die Verbindung von NPC1 zum Cholesterinmetabolismus offensichtlich. NPC1 ist am vesikulären Transport von Cholesterin und damit an dessen Homöostase beteiligt (siehe Tabelle 3.1). Funktionsunfähiges NPC1-Protein führt zur Akkumulation von unverestertem Cholesterin in endo- und lysosomalen Zellkompartimenten (BLANCHETTE-MACKIE et al., 1988; LANGE & STECK, 1998; IOANNOU, 2000).

Vesikeltransport

3.5 Interaktionsstudien

3.5.1 Die Homodimerisierung von ShhN

In der vorliegenden Arbeit wurde mit drei unabhängigen Verfahren gezeigt, dass der unmodifizierte N-Terminus von Shh homodimerisiert. Zeng et al. berichten, dass Cholesterin-modifiziertes ShhN sogar Hexamere bildet und

*ShhN
homodimerisiert*

3 Diskussion

möglicherweise in Form dieser Mizellen durch freie Diffusion die *long range*-Wirkung erzielt (ZENG et al., 2001). Man könnte daraus folgern, dass der fehlende Cholesterin-Rest dafür verantwortlich ist, dass unmodifiziertes ShhN nur dimerisiert und nicht multimerisiert. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass in transgenen Mäusen, die ausschließlich unmodifiziertes ShhN produzieren können, der Wirkradius von Shh auf etwa ein Drittel des Cholesterin-modifizierten ShhN-Proteins reduziert wird (LEWIS et al., 2001).

Regulatorische
Wirkung der
Dimerisierung?

Die Dimerisierung von unmodifiziertem ShhN könnte regulatorischen Charakter besitzen. Es ist z. B. vorstellbar, dass dimerisiertes ShhN für den Abbau markiert ist, während das Hexamer eine stabile Form darstellt, die vor dem Abbau schützt. Unmodifiziertes ShhN-Protein stört das fein abgestimmte morphogenetische Programm, zum einen, weil seine Sezernierung nicht durch Disp reguliert werden kann (BURKE et al., 1999), zum anderen, weil es nicht in der Lage ist, den Wirkradius des Cholesterin-modifizierten Proteins zu erreichen, so dass bereits heterozygote Mausmutanten einen schweren Phänotyp aufweisen (LEWIS et al., 2001). Beide Erscheinungen führen zu einer Veränderung des Shh-Gradienten im Zielgewebe. Da die Wirkung von Shh konzentrationsabhängig ist, kann die Aktivierung (oder Inhibierung) von Zielgenen nicht mehr korrekt erfolgen. Das Resultat ist eine Missbildung oder der Verlust der betroffenen Struktur (LEWIS et al., 2001). Da ShhN-Protein in extrem geringen Konzentrationen wirkt, ist der Abbau von unmodifiziertem Protein von großer Wichtigkeit.

3.5.2 Die Interaktion von Shh mit Ptch

Bindung trotz
Cyclopamin

Mittels SPR-Technik konnte außerdem gezeigt werden, dass ShhN *in vitro* von Ptch gebunden wird und dass weder Cyclopamin noch unphysiologische Cholesterinvorläufer diese Bindung beeinflussen konnten. Damit ist zwar nicht geklärt, ob Cyclopamin an die *Sterol sensing*-Domäne von Ptch bindet oder nicht, man kann jedoch ausschließen, dass die Wirkung des Inhibitors darin besteht, die Bindung von ShhN an seinen Rezeptor zu unterbinden. Eine Interaktion des Pflanzenalkaloids mit der SSD könnte auch zur Folge haben, dass Smo nicht durch Ptch aktiviert wird, also das „Signal“ nicht übermittelt wird.

3.6 Wie passt alles zusammen? – Hypothesen

Welche Funktion
hat Cholesterin?

Cholesterin ist ein notwendiger Membranbestandteil aller Zellen, der z. B. die Fluidität und Stabilität der Zellmembranen reguliert und ubiquitär bzw. in der Leber synthetisiert und verteilt wird. Diese Aufgabe übernimmt das Sterol auch im adulten Organismus. Ein Mangel an Membran-Cholesterin, kann bei SLOS-Patienten bzw. beim 7Dhcr-k.o. wahrscheinlich teilweise durch den Vorläufer

3.6 Wie passt alles zusammen? – Hypothesen

7-Dehydrocholesterin ausgeglichen werden und äußert sich in der Embryonalentwicklung vor allem in Form des verminderten Größenwachstums (auch bei den anderen Cholesterinbiosynthese-Defekten). Wenn man davon ausgeht, dass hohe mRNA-Level von Cholesterinbiosynthese-Enzymen und Cholesterinsynthese tatsächlich korrelieren, dann scheint es im wesentlichen zwei Domänen mit extrem hoher lokaler Cholesterinbiosynthese zu geben: Apoptotische Gewebe und Shh-Zielgewebe. Diese überlappen teilweise (z. B. craniale Neuralleiste, Motoneuronen). Wenn man außerdem einige Veröffentlichungen der letzten Monate im Lichte der hier vorgestellten Ergebnisse betrachtet, dann kann man auf zwei grundsätzlich neue Funktionen für Cholesterin während der Embryonalentwicklung schließen, die möglicherweise miteinander verknüpft sind:

1. Cholesterin könnte der Vorläufer eines apoptotischen und/oder anti-apoptotischen Steroids sein. Aufgrund der Anwesenheit von P450_{sc} und 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase in den gleichen Geweben (COMPAGNONE et al., 1995; KEENEY et al., 1995) kann von einer weiteren Umsetzung des lokal gebildeten Cholesterins ausgegangen werden. Die Unterbrechung der lokalen Cholesterinsynthese in verschiedenen Mausmutanten kann offensichtlich nicht durch maternales Cholesterin ausgeglichen werden und wirkt sich unter Umständen in einer Fehlregulation des programmierten Zelltods in verschiedenen Geweben aus. Da es sich bei den betroffenen Geweben sehr häufig um Neuralleisten-Derivate handelt kommt es u. a. zu Agangliosis, Gaumenspalte und Missbildungen wie Mikrognathia. Daneben wird in den entsprechenden Mutanten häufig Syn- oder Camptodaktylie beobachtet. Aufgrund des Phänotyps muss man davon ausgehen, dass sowohl pro- als auch kontra-apoptotische Signale produziert werden⁴. Diese Vermutung steht im Einklang mit neuesten Daten, die Steroid-induzierte oder -inhibierte Apoptose in adulten Geweben und Zelllinien beschreiben (THUMMEL, 2001; BAKOS et al., 1993; ARES et al., 2000; LEE & BAEHRECKE, 2001; LEE & TREISMAN, 2001).
2. Die zweite spezifische Funktion erfüllt Cholesterin in Shh-Zielzellen. Auch dort weist eine hohe Expression der Cholesterinbiosynthese-Enzyme auf eine erhöhte lokale Produktion von Cholesterin im Vergleich zu anderem Gewebe hin. 7-Dehydrocholesterin, der bei SLOS akkumulierende Cholesterin-Vorläufer, ist zwar in der Lage, dieses in der Autoprozessierungsreaktion von Shh zu ersetzen (INCARDONA et al., 1998), in den Zielzellen scheint jedoch Cholesterin benötigt zu werden. Dort liegt Ptch in sog. Caveolae vor und kann mit Caveolin-1, dem Haupt-

Apoptose-Signal

*Regulator des
Shh-Signalwegs*

⁴ Die hier beschriebene spezifische Cholesterinsynthese in Shh-Zielgewebe bedeutet nicht, dass die Mutanten-Phänotypen ausschließlich auf einen Mangel an Cholesterin zurückzuführen sind. Vielmehr ist auch eine lokale Akkumulation von toxischen Syntheseintermediaten möglich, die in Analogie zu Cyclopamin die Signalweiterleitung beeinträchtigen.

3 Diskussion

protein dieser Strukturen co-immunpräzipitiert werden (KARPEN et al., 2001). Caveolae sind sehr cholesterinreiche Membrandomänen, die unter anderem eine Rolle in der Signaltransduktion verschiedener Signalwege (ROY et al., 1999; SCHLEGEL et al., 1998) spielen, sowie am Cholesterintransport (IKONEN & PARTON, 2000; FIELDING & FIELDING, 2001) und an vesikulären Endo- und Exozytose-Wegen (SCHEIFFELE et al., 1998) beteiligt sind. Cholesterinmangel führt zur Zerstörung der Caveolae (FIELDING & FIELDING, 2001). Eine spezifische Funktion von Caveolin-1 in der Shh-Signaltransduktion scheint jedoch nicht vorzuliegen: Caveolin-1-k.o.-Mäuse zeigten nicht die geringsten Shh-spezifischen Symptome (DRAB et al., 2001). Mit anderen Worten, die Unterbrechung der Shh-Signaltransduktion durch Cholesterinmangel beruht nicht auf einer unspezifischen Zerstörung der Caveolae. Aufgrund der auffallenden Homologie von Ptch mit NPC1 liegt nicht nur nahe, dass der Shh-Rezeptor eine ähnliche Funktion im Vesikeltransport übernimmt, sondern auch, dass der Shh-Rezeptor mittels der SSD den Cholesterin- oder Sterolgehalt der Vesikel „spüren“ kann und als Signal für das korrekte Vesikel-*trafficking* nutzt.

Tabelle 3.1: Humane Proteine mit *Sterol-sensing*-Domäne

Protein	Homologie*	Funktion
Patched (Ptch)	100 %	Rezeptor von Sonic Hedgehog
Patched-2 (Ptch2)	52 %	Rezeptor von Sonic Hedgehog
Dispatched (Disp)	26 %	Regulation der Sekretion von Sonic Hedgehog
Niemann-Pick-Disease C1 (NPC1)	21 %	vesikulärer Transport von Cholesterin von späten Endosomen zu Lysosomen
Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Reduktase	—**	limitierendes Enzym der Cholesterinbiosynthese
SREBP cleavage-activating protein (SCAP)	—**	aktiviert SREBP durch Sterol-induzierte Spaltung

*Identität mit Patched

**Die Homologie beschränkt sich lediglich auf die SSD's. Darüber hinaus war keine Ähnlichkeit zwischen Ptch und diesen Proteinen feststellbar.

3.6.1 Das apoptotische Steroid könnte ein Oxysterol sein

Wirkungsvielfalt von Oxysterolen

Während zunächst nahe lag, dass das morphogenetisch wirksame Cholesterinderivat ein Steroidhormon sein könnte, weist die Expression in den apoptotischen Zentren darauf hin, dass die aktive Substanz möglicherweise auch ein Oxysterol sein könnte. Oxysterole sind natürlich vorkommende hydroxylierte Cholesterin-Derivate, die ein bemerkenswertes Profil biologischer Aktivität aufweisen. Sie sind unter anderem in der Lage auf verschiedene Weise den Lipid-Metabolismus zu beeinflussen (JANOWSKI et al., 1996; LU et al., 2001;

3.6 Wie passt alles zusammen? – Hypothesen

SCHROEPFER, 2000), die Aggregation von Blutplättchen zu verstärken (SHIMADA et al., 1984) und sind potente Apoptose-Induktoren, z. B. in Krebszellen und Monozyten (AUPEIX et al., 1995; BAKOS et al., 1993; AYALA-TORRES et al., 1999; PANINI & SINENSKY, 2001). Besondere Beachtung fand bisher die zytotoxische Wirkung vieler Vertreter dieser Stoffklasse (SEVANIAN et al., 1991; CHISHOLM et al., 1994). Gegenwärtig sind zwar mehrere spezifische Effekte von Oxysterolen bekannt, aber eine klare physiologische Bedeutung (insbesondere ihrer apoptotischen Wirkung) konnte ihnen noch nicht zugewiesen werden. Oxysterole können ihre Wirkung über transkriptionelle oder posttranslationale Mechanismen ausüben. Sie werden z. B. von zytosolischen *Oxysterol-binding proteins* (OSBP's) gebunden (RIDGWAY et al., 1998; LAGACE et al., 1999) und sind Liganden des Transkriptionsfaktors LXR (PEET et al., 1998), der u. a. an der Cholesterin-Homöostase in der Leber maßgeblich beteiligt ist (ALBERTI et al., 2000). Oxysterole hätten das Potential, als Apoptose-Signal in der Embryonalentwicklung zu wirken. Im adulten Organismus würde dann z. B. die Oxysterol-induzierte Apoptose in Monozyten und Makrophagen, die bei der Atherosklerose den Abbau des Lipidmaterials verhindert (PANINI & SINENSKY, 2001), durch das unphysiologisch ausgelöste „embryonale Programm“ verursacht.

Ein Oxysterol ist außerdem ein attraktiver Kandidat als morphogenetisches Sterol, weil es auch als wirksames Cholesterinderivat im Shh-Signalweg in Frage käme. In verschiedenen Experimenten wurde gezeigt, dass Oxysterole die Signaltransduktionen beeinflussen. Z. B. potenzieren verschiedene Oxysterole das Signal des *epidermal growth*-Faktors (EGF) (ASTRUC & LAHOUA, 1994). Die von EGF aktivierte Phospholipase C γ befindet sich wie ShhN und Ptch in Cavaolae (JANG et al., 2001). Neueste Daten beschreiben außerdem zwei Mitglieder der humanen *Oxysterol-binding protein*-Familie, die den Vesikeltransport regulieren (XU et al., 2001). Es wäre also möglich, dass es ein bisher nicht identifiziertes hydroxyliertes Cholesterinderivat gibt, das sowohl apoptotisch wirkt als auch eine Rolle im Shh-Signalweg spielt. Neueste Daten implizieren in der Tat, dass die morphogenetische Wirkung von Shh in einigen Geweben, z. B. im Neuralrohr (CHARRIER et al., 2001; OPPENHEIM et al., 1999) oder in den Gliedmaßenknospen (SANZ-EZQUERRO & TICKLE, 2000), auf Apoptose beruhen könnte. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits vor einigen Jahren für die Wirkung von Shh auf kraniale Neuralleistenzellen berichtet (DUNN et al., 1995), in denen Shh ein anti-apoptotisches Signal zu sein scheint. Auch in Zebrafischmutanten, bei denen die Shh-Signaltransduktion unterbrochen ist, wurde erhöhte Apoptose festgestellt (CHEN et al., 2001).

*Oxysterole im
Shh-Signalweg?*

3.6.2 Implikationen für die Signalübertragung

Signalübertragung

Das überraschende Resultat meiner Lokalisationsstudien ist, dass praktisch kein Ptch-Protein an der Zelloberfläche vorliegt. Es ist schwer vorstellbar, was dazu führen könnte, dass der Ptch/Smo-Komplex dazu veranlasst wird, an die Zelloberfläche zu wandern. Ein von Karpen et al. angedeuteter ständiger Austausch des Proteinkomplexes zwischen intrazellulären Orten und der Zellmembran (KARPEN et al., 2000) konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Eine bisher wenig beachtete Alternative wäre die, dass nicht der Rezeptorkomplex an die Zelloberfläche kommt, sondern ShhN ins Zellinnere. Folgendes Modell (Abb. 3.4) ist denkbar: Das Shh-Vorläuferprotein wird ins endoplasmatische Retikulum (ER) synthetisiert und dort prozessiert. Vesikulär wird es über den *trans*-Golgi-Apparat weitertransportiert. Hier findet für etwa 30 % der ShhN-Proteine die zweite Modifizierung mit dem Palmitat-Rest statt (PEPINSKY et al., 1998). Die ShhN-Vesikel erreichen die Zellmembran und verschmelzen mit ihr. Anstatt mitsamt der hydrophoben Anker aus der Membran herausgelöst zu werden, schnüren sich die Shh-Proteine wiederum Vesikel ab, die den von (ZENG et al., 2001) beschriebenen Hexameren entsprechen könnten. Die entstandenen ShhN-Vesikel haben jedoch einen lipidhaltigen hydrophoben Kern und präsentieren ShhN nach außen. In dieser Form können sie ihre Zielzellen auch über größere Distanzen erreichen (*long range*-Wirkung), und extrazelluläre Interaktionen mit anderen Proteinen eingehen, z. B. mit dem Extrazellulärmatrixprotein Vitronektin (PONS et al., 2001; PONS & MARTI, 2000), oder auch mit Oberflächenrezeptoren, die zur Endozytose in die Zielzelle dienen könnten. Der Eintritt in die benachbarten oder auch weiter entfernten Zellen erfolgt wie bei einer Endozytose, so dass Shh im Zellinneren von einer Membran umgeben ist. In dieser Form kann in Shh-Zielzellen eine (spezifische?) Verschmelzung mit Ptch-Vesikeln und damit die Signalweiterleitung stattfinden. Ist die Nachbarzelle keine Shh-Zielzelle, werden die Shh-Vesikel transzytiert.

Keine Ptch-Shh-Co-Lokalisation in der Zellmembran

Im Einklang mit diesem Modell steht, dass zwar die Endozytose von Shh nachgewiesen wurde (INCARDONA et al., 2000), aber die Co-Lokalisation mit Ptch erst im Zellinnern aber niemals an der Zelloberfläche beobachtet wurde. Hingegen waren relativ große Shh-positive Partikel dort deutlich sichtbar (INCARDONA et al., 2000). Neben der Folgerung der Autoren, es handle sich um eine Rezeptor-vermittelte Endozytose, ist deshalb eine Interaktion von Shh und Ptch, die nicht auf der Zelloberfläche sondern erst innerhalb der Zelle stattfindet, möglich.

3.6 Wie passt alles zusammen? – Hypothesen

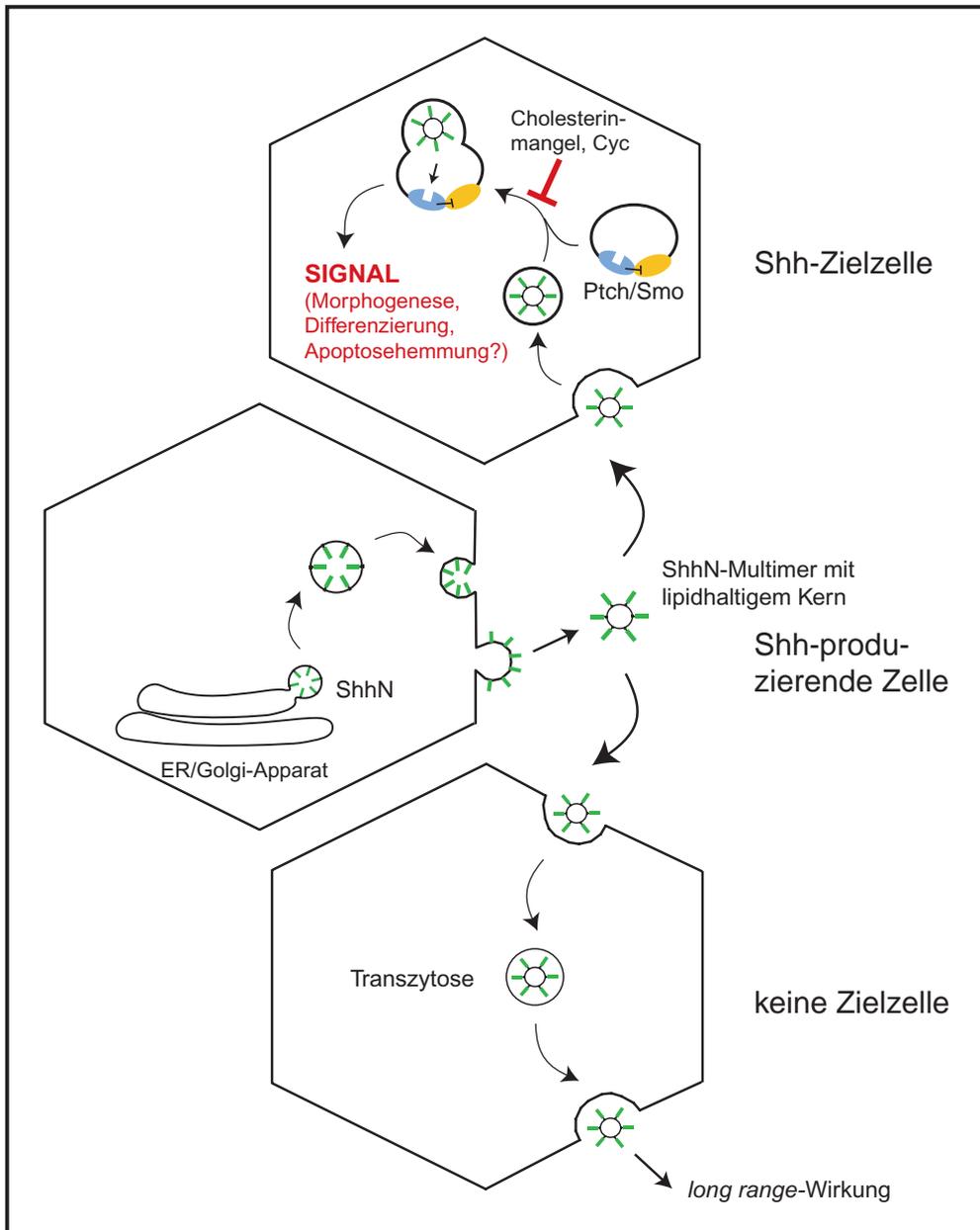


Abbildung 3.4: Modell der Übertragung des Sonic Hedgehog-Signals von der produzierenden Zelle zur Empfängerzelle. Shh wird in das Endoplasmatische Retikulum synthetisiert und prozessiert. Der Transport zur Zelloberfläche erfolgt vesikulär über den trans-Golgi-Apparat. In diesem Kompartiment erfolgt die zweite Modifizierung mit Palmitat. Das Shh-Vesikel fusioniert mit der Zellmembran der Senderzelle und stülpt sich nach außen, um abzuknospen. Es entstehen Vesikel, die Shh-Protein nach außen präsentieren und endozytotisch in die benachbarten Zellen aufgenommen werden. Sind diese Zellen keine Shh-Zielzelle, wird das Shh-Vesikel wieder sekretiert/exozytiert. Befindet sich der Ptch/Smo-Rezeptorkomplex in einer Zelle, wird ShhN gebunden, verbleibt in der Zelle und die Signalkaskade wird aktiviert. ShhN = prozessierte N-terminale Domäne; Ptch/Smo = Shh-Rezeptorkomplex, bestehend aus Patched und Smoothened

3 Diskussion

Eine weiterer Aspekt spricht für das hier vorgestellte Modell: Alle Internalisierungsexperimente und Aktivitätsassays wurden entweder in Explant-Experimenten oder in Zellkultur mit Shh-exprimierenden Zellen (bzw. deren Medium) durchgeführt und nicht mit aufgereinigtem Shh-Protein, das methodenbedingt nicht in Vesikeln also nicht „multimer“ vorliegt. Gereinigtes, z. B. bakteriell exprimiertes ShhN-Protein wurde meist nur zu Co-Immunpräzipitationsexperimenten oder ähnlichem genutzt. In den Luciferasereporter-Experimenten (Kap. 2.3) wurde durch gereinigtes ShhN-Protein keine Aktivierung des Reporters erzielt, während Co-Transfektion mit pcDNA3-ShhN oder Gli1 zu einem starken Signal führte (Abb. 2.25).

3.6.3 Wie wirkt Cyclopamin?

Eingrenzung der Angriffspunkte

Schon vor Beginn meiner Arbeiten war vermutet worden, dass der Wirkung von *Veratrum*-Alkaloiden ein grundsätzlich anderer Mechanismus zugrunde liegt, als der von distalen Cholesterinbiosynthese-Inhibitoren. Aufgrund von Betrachtungen von Dosis-Wirkungskurven wurde für Cyclopamin ein direkter, „molekularer“ Eingriff in die Shh-Signaltransduktion angenommen, während für die Cholesterinbiosyntheseinhibitoren eine indirekte, womöglich durch akkumulierende Cholesterinvorläufer hervorgerufene Interferenz für wahrscheinlicher gehalten wurde. Die in den Kapiteln 2.4 und 2.5 dargestellten Ergebnisse grenzen den möglichen Angriffsbereich von Cyclopamin ein. Das Alkaloid beeinflusste das Targeting von Shh und Ptch nicht, d. h. zumindest im inaktiven Zustand (ohne Shh-Aktivierung) hatte es keine Wirkung auf die Lokalisation von Patched. Allerdings beschreiben diese Ergebnisse nur einen statischen Zustand, können also einen Einfluss auf das Vesikel-Trafficking nach Aktivierung durch ShhN nicht ausschließen. Wie weiterhin demonstriert wurde, fand in Anwesenheit des *Veratrum*-Alkaloids auch die Bindung von Shh an seinen Rezeptor Ptch mit gleicher Stärke statt. Ebenso war die Autoprozessierung von Shh durch Cyclopamin nicht beeinträchtigt (BEACHY et al., 1997). Taipale et al. lieferten vor kurzem erste Hinweise, dass die Wirkung von Cyclopamin auf einer Inhibition von Smo beruht (TAIPALE et al., 2000). Sie konnten in einer Ptch-k.o.-Zelllinie die konstitutive Aktivierung von Gli1 durch Cyclopamin abschalten und zeigen, dass Smo das Target war. Diese Entdeckung war jedoch in der vorliegenden Arbeit und auch von anderen Gruppen (Henk Roelink, persönliche Mitteilung) nicht reproduzierbar. Eine Bindung von Cyclopamin an die SSD von Ptch kann deshalb nicht ausgeschlossen werden.

Hypothese

Als möglicher Wirkmechanismus des Alkaloids bietet sich im Hinblick auf die oben diskutierten Punkte folgender an: Cyclopamin wird aufgrund seiner cholesterinähnlichen Struktur von Ptch (irreversibel?) gebunden, das daraufhin nicht mehr in der Lage ist, einen geordneten Vesikeltransport (in Analogie zu NPC1) durchzuführen. Da Cyclopamin zwar an die SSD binden kann, aber Cholesterin bzw. das aktive Sterol nicht vollständig substituiert, kommt es zur Blockade der Signalweiterleitung.

3.7 Ausblick

Im vorangegangenen Abschnitt wurde bereits ein Modell entwickelt, das die neuen Erkenntnisse zu verbinden versucht. Als nächstes muss die Validierung und Konkretisierung dieses Modells durch gezielte Experimente erfolgen. Dazu können zunächst die Mausmutanten *bare patches* und *tattered* dienen. Folgende Fragestellungen könnten zum besseren Verständnis der Cholesterinwirkung beitragen:

Die nächsten ...

1. Ist bei den Mausmutanten in den betroffenen Geweben im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen eine verstärkte oder reduzierte Apoptose festzustellen? (TUNEL-Assay auf embryonalen Gewebeschnitten oder *whole mount*)
2. Wie sieht das aktive Cholesterinderivat aus? (Identifizierung anhand eines Vergleichs der Sterolprofile geeigneter Zelllinien)
3. Welchen Einfluss hat das Cholesterinderivat auf die Shh-Signaltransduktion? (Aktivitätsmessungen mittels Luciferase-Assay)

Das in Kap 2.4.3 beschriebene Fluoreszenz-Konstrukt NYFPCCFP kann u. a. zur Untersuchung der genauen Wirkung von Cyclopamin dienen. Wenn Cyclopamin an Ptch angreifen würde, so wie es hier postuliert wird, dann könnte es aufgrund der charakteristischen Homologie von Disp und Ptch auch auf Disp wirken. Dieser Effekt wäre *in vivo* in den bisher durchgeführten Experimenten nicht sichtbar. Mit NYFPCCFP ist es möglich, den gesamten Shh-Signalweg von der Autoprozessierung über die Sekretierung bis hin zur Internalisierung und dem weiteren Transport in lebenden Zellen zu verfolgen. Man kann also alle Punkte, an denen Inhibitoren den Transport von ShhN-YFP blockieren oder fehlleiten, visuell erfassen. Da beim Shh-Signalweg vesikulären Transportmechanismen eine entscheidende Rolle zuzukommen scheint, ist diese Art des Experimentdesigns erfolgsversprechend.

*... und
übernächsten
Schritte*

Das oben vorgestellte Modell der Shh-Signalübertragung könnte zunächst durch den Nachweis von Lipidmaterial in extrazellulär diffundierendem Shh überprüft werden. Dazu bietet sich die von Greco et al. (2001) für die Charakterisierung von wingless-Argosomen verwendete Technik an. Mit Hilfe der hier beschriebenen fluoreszenzmarkierten Shh-Konstrukte könnte außerdem die im Modell postulierte *long-range*-Transzytose untersucht werden.

*Überprüfung des
Modells*

Die Rolle der Cholesterinbiosynthese in der embryonalen Entwicklung übersteigt mit Sicherheit die eines einfachen Membranbestandteils und ist weit davon entfernt, in ihrer ganzen Komplexität verstanden zu sein. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse legen nahe, die bestehende Vorstellung der Funktion von Cholesterin in der Embryogenese grundlegend zu überarbeiten. Sie suggerieren eine unvermutete morphogenetische/apoptotische Kompetenz

*Notwendigkeit
einer neuen
Betrachtung*

3 *Diskussion*

eines lokal synthetisierten Cholesterinderivats, die sich bereits in den Phänotypen der Mausmutanten andeutete, und eine bisher wenig beachtete Rolle der Apoptose im Sonic Hedgehog-Signalweg.

4 Material und Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

Präparation von Plasmid-DNA

Bakterienkulturen wurden bei 37°C in Selektivmedium über Nacht inkubiert. Für Präparationen in kleinem Maßstab (bis 30 µg Plasmid) wurde 8 ml der Bakterienkultur eingesetzt und daraus die Plasmid-DNA mit dem NucleoSpin Plasmid-Kit (Macherey-Nagel; #740 588.50) isoliert. Für größere Mengen (bis 150 µg Plasmid) wurde ein Kulturvolumen von 50 ml verwendet und mit dem Nucleobond AX100-Kit (Macherey-Nagel; #740 573) gearbeitet. Die Plasmidkonzentration wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde die DNA-Lösung mit Wasser geeignet verdünnt und ihre Extinktion bei 260 nm mit einem Spektralphotometer (Beckman DU 530) gemessen. Durch Multiplikation der gemessenen optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}) mit 50 sowie dem Verdünnungsfaktor erhält man die Konzentration der Plasmidlösung in µg/ml.

Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Abtrennung und Extraktion von DNA-Fragmenten, die weiterverarbeitet werden sollten, erfolgte über ein TAE-Agarosegel. Die gewünschte, durch Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht sichtbar gemachte DNA-Bande wurde mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben extrahiert.

Präparation von RNA aus tierischem Gewebe

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (QIAGEN, #74104). Gehirn, Ovar und Placenta von schwangeren Tieren, sowie Leber wurde aus C3HT1/2 Mäusen entnommen und bei -80°C gelagert. Alle benutzten Geräte wurden durch Ausglühen oder Reinigung mit RNaseZAP (Invitrogen) RNase-frei gemacht. Zum Aufschließen des Gewebes wurde 30 bis 35 µg gefrorenes Material in flüssigem Stickstoff mit einem Pistill fein zerrieben, dann auf Raumtemperatur erwärmt und mit 600 µl RLT-Puffer (Lysispuffer) aus dem Kit resuspendiert. Das erhaltene Lysat wurde anschließend mit Hilfe von QIAshredder-Säulen (QIAGEN, #74904) homogenisiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers.

Herstellung von cDNA

Die isolierte Gesamt-RNA konnte mit dem Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Dafür wurde der cDNA Synthesis Kit von Stratagene (#200401-5) verwendet, in dem Oligo-d(T)-Primer und die Reverse Transkriptase enthalten waren. Das erhaltene Reaktionsprodukt wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. 5 - 50 ng wurden als Template für anschließende PCR-Reaktionen eingesetzt.

PCR-Reaktion

Die Amplifizierung von spezifischen DNA-Fragmenten aus cDNA oder Plasmid-DNA erfolgte mittels PCR. Das doppelsträngige DNA-Template (2 - 20 ng pro 20 µl-Ansatz) wurde denaturiert und an die entstehenden Einzelstränge hybridisieren zwei Oligonukleotide (Primer), die die zu amplifizierende Sequenz flankieren. Ausgehend von diesen

4 Material und Methoden

Primern synthetisiert die thermostabile Taq-Polymerase den zum Template komplementären DNA-Strang. Durch wiederholtes Denaturieren, Hybridisieren der Primer und Synthetisieren akkumuliert das gewünschte, durch die Primer definierte DNA-Fragment. Die PCR-Reaktion wurde in einem Robocycler (Stratagene) oder einem PE9600-Gerät (Perkin Elmer) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden für weitere Schritte mittels des QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN) gereinigt (bei TA-Klonierung nicht erforderlich). Ein typisches PCR-Programm war z. B.

Schritt 1:

5 min Denaturierung bei 94°C;

Schritt 2:

45 s Denaturierung bei 94°C,

45 s Hybridisierung der Primer bei der Primer-spezifischen Annealingtemperatur,

x min Elongation bei 72°C

Schritt 2 wird zwischen 25 und 35 mal wiederholt; bei TA-Klonierungen erfolgt zur Erzeugung der benötigten A-Überhänge nach Schritt 2 noch ein weitere Elongation von 10 min bei 72 °C. Die Elongationszeit x in Schritt 2 ergibt sich aus der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments: pro 1 kb wird 1 min kalkuliert. Ein typischer Reaktionsansatz (20 µl) enthält:

2 – 20 ng DNA-Template

0,2 mM von jedem dNTP

1,2 mM MgCl₂

20 mM Tris-HCl (pH 8,4)

50 mM KCl

0,25 µM von jedem Primer

1 – 2 U Taq-Polymerase

Restriktionsverdau

1 µg zu verdauende DNA wurde mit 1 – 2 Einheiten des Restriktionsenzym und zugehörigem Reaktionspuffer (MBI Fermentas) versetzt und 1 – 5 h bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von DNA-Laufpuffer wurde die Reaktion gestoppt und mittels Gelelektrophorese im Agarosegel analysiert oder es wurde eine Aufreinigung mit Hilfe des PCR-Purification-Kits angeschlossen.

Ligation

Für die Ligation von Vektor und Insert wurden die DNA-Fragmente in einem molaren

Verhältnis von etwa 1:3 (Vektor:Insert) gemischt und über Nacht bei 14°C in 10 µl Gesamtvolumen mit T4-Ligase (MBI Fermentas; #EL0011) ligiert. Sollten Fragmente gleicher molekularer Größe verbunden werden, lag das Verhältnis bei 1:1. Wurde ein mit Taq-Polymerase synthetisiertes PCR-Produkt in pCRII-Vektoren aus dem TA-Cloning Kit (Invitrogen) ligiert, wurden 1 – 4 µl des PCR-Ansatzes eingesetzt.

Phosphorylierung von DNA-Strängen

Die Enden von synthetisch hergestellten Oligo-Nukleotiden waren nicht phosphoryliert. Zur Ligation solcher DNA-Stränge, mussten sie mindestens an einem Ende eine Phosphatgruppe erhalten. Die DNA-Einzelstränge wurden durch T4 Polynucleotide Kinase (MBI Fermentas; #EK0031) in Anwesenheit von ATP und PNK-Puffer A (vom Hersteller mitgeliefert) am 5'-Ende phosphoryliert.

Digoxigenin-markierte RNA-Sonden

Die Plasmide, die Sontemplates als Insert enthielten, wurde mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert und mittels des QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN; #28104) gereinigt. Die Elution von der QIAquick-Säule erfolgte mit RNase-freiem Wasser. Anschließend wurde die RNA-Sonde mit einer viralen RNA-Polymerase (T7- (MBI Fermentas; #EP0111), T3- (MBI Fermentas; #EP0101) oder SP6-Polymerase (MBI Fermentas; #EP0131)) in Anwesenheit von DIG RNA Labelling Mix (enthält Digoxigenin-markiertes UTP; Boehringer-Mannheim, #1 277 073) und RNase-Inhibitor 2 h lang synthetisiert. Das linearisierte DNA-Template wurde danach durch 10 U RNase-freie DNase I (15 min bei 37°C) abgebaut. Die RNA-Synthese wurde durch Gelelektrophorese im Agarosegel überprüft. Die RNA-Sonde wurde schließlich mit dem RNeasy Mini-Kit (QIAGEN, #74104) nach dem RNA Cleanup-Protokoll aufgereinigt und in Aliquots bei -80°C maximal 8 Wochen gelagert. Vor dem Einsatz zur Hybridisierung wurden die Sonden 3 min bei 80°C denaturiert.

Radioaktiv markierte DNA-Sonden

DNA-Fragmente, die als Template für Sonden zum Durchsuchen von cDNA-Bibliotheken dienen sollten, wurden durch PCR amplifiziert und über QIAquick-Säulen (QIAquick PCR Purification Kit; # 28104; QIAGEN) aufgereinigt. Die Markierung der DNA-Sonden mit ^{32}P -dCTP erfolgte unter Verwendung des Prime-It RmT-Kits von Stratagene (#300392). Die weiteren Syntheseschritte erfolgten nach Herstellerangaben. Nicht eingebautes ^{32}P -dCTP wurde mit Hilfe von Microspin S-300 HR-Säulen (#27-5130; Amersham Pharmacia) abgetrennt.

Klonierung des Gli-Bindungsstellen-Reporters (Gli-BSR)

Als Ausgangsplasmid für die verschiedenen Gli1-BS-Reporter diente der Vektor pGL-Basic, der das Firefly-Luciferase-Gen jedoch keinerlei Promotor- oder Enhancer-Sequenzen enthält. 5' vor das Luciferase-Gen sollte der Minimalpromotor HSV-TK plaziert werden. Dazu wurde aus dem Plasmid pRL-TK die Promotersequenz mit den Restriktionsenzymen BglIII und HindIII herausgeschnitten und gerichtet in das pGK-Basic-Plasmid inkloniert. 2 μg pGL-Basic wurden mit BglIII und HindIII 3 h lang bei 37 °C vollständig verdaut und anschließend mittels des PCR-Purifications-Kits gereinigt. Etwa 500 ng dieses Vektors wurden mit 1,5 μg des ausgeschnittenen Promotors bei 14°C über Nacht ligiert und 2 μl des Ligationsansatzes in TOP10 One Shot-Zellen (#44-0301; Invitrogen) transformiert. Aus fünf erhaltenen Klonen wurde das Plasmid isoliert, und anhand eines Kontrollverdaus mit BglIII und HindIII wurde die Anwesenheit der Promotorsequenz überprüft. Einer der bei diesem Test positiven Klone (pGL-HSV-TK) wurde sequenziert und für die weiteren Schritte verwendet.

5' vor den Promotor sollten mehrere Kopien einer Gli-Bindungsstelle kloniert werden. Es wurden komplementäre Oligonukleotide synthetisiert, die das Gli-Bindungsstellen-Motif GAACACCCA dreimal in gleichmäßigen Abständen, 5' eine halbe BglIII-Schnittstelle und 3' eine hal-

be BamHI-Schnittstelle (für die komplementären Stränge vice versa) enthielten (siehe Abb. 2.21). Die lyophilisierten Oligos wurden zu einer Endkonzentration von etwa 10 mg/ml mit Wasser aufgelöst. Die Hybridisierung der komplementären Stränge (jeweils etwa 2 μg) wurde ohne weitere Aufreinigung in Anwesenheit von 5 mM Natriumacetatpuffer durchgeführt. Der Hybridisierungsansatz wurde zunächst 3 min lang auf 95°C im Heizblock erhitzt, um Sekundärstrukturen aufzuschmelzen. Dann wurde langsam (durch Ausschalten des Heizblock) auf 70°C abgekühlt. Die erhaltenen Doppelstränge mit einer halben BglIII-Schnittstelle 5' und einer halben BamHI-Schnittstelle 3' wurden mit T4-Polynukleotid-Kinase phosphoryliert. Das oben beschriebene pGL-HSV-TK-Plasmid wurde mit BglIII geschnitten, dephosphoryliert und mit dem doppelsträngigen phosphorylierten Gli-Bindungsstellenfragment ligiert. Dort, wo eine BglIII-Hälfte mit einer BamHI-Hälfte zusammentrifft konnte zwar aufgrund des gleichen Überhanges ligiert werden, die Schnittstelle ist allerdings danach zerstört. Das erhaltene Ligationsprodukt enthält also 3 Kopien der Gli-Bindungsstelle und eine BglIII-Restriktionsstelle. Das Vorgehen kann dadurch beliebig oft wiederholt werden, um Reporterplasmide mit drei, sechs, neun oder mehr Kopien der Gli-Bindungsstelle zu erzeugen.

4.1.2 Arbeiten mit Bakterien

Lagerung von Bakterienstämmen

Bakterienstämme, die längere Zeit aufbewahrt werden sollten, wurden über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator herangezogen. Bei einer OD_{600} von etwa 1 wurden 0,5 ml der Bakteriensuspension mit 0,5 ml 80 - 100 % autoklaviertem Glycerin gemischt und in Cryo-Röhrchen (#375418; Nunc) bei -80°C eingefroren. Aus diesen Glycerinstocks wurden bei Bedarf mittels einer heissen Drahtöse Bakterien entnommen und in LB-Medium überimpft. Die Glycerinkultur wurde dabei nicht vollständig aufgetaut und anschließend sofort wieder eingefroren.

Herstellung hitzekompetenter Bakterien (RbCl-Methode)

2,5 ml Übernachtskultur werden zu 250 ml LB-Medium mit 20 mM MgSO_4 gegeben und bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,4 – 0,6 inkubiert. Die Zellsuspension wird bei 4°C abzentrifugiert, das Pellet mit 100 ml kalter TFB1-Lösung resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert und wieder abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 10 ml kalter TFB2-Lösung resuspendiert und 15 – 60 min auf Eis inkubiert. Danach werden die Zellen in 100 μl -Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Transformation von Bakterien

Hitzeschock-Verfahren Kommerziell erhältliche oder selbst hergestellte hitzekompetente Bakterienzellen (50 μl Aliquots) wurden auf Eis aufgetaut und etwa 5 - 10 ng Plasmid-DNA oder 1 – 10 μl Ligationsansatz daraufpipettiert. Durch Antippen mit dem Finger wurde vorsichtig gemischt und anschließend 10 – 30 min auf Eis inkubiert. Abhängig vom Bakterienstamm wurden die Zellen dann 30 s (TOP One Shot) oder 45 s (JM107, DH5 α) lang in ein 42°C warmes Wasserbad getaucht und danach sofort für 2 min auf Eis gekühlt. Danach wurde 200 – 500 μl SOC-Medium zupipettiert und 30 min (bei Ampicillin-resistenten Bakterien) oder 60 min (bei Kanamycin-resistenten Bakterien) bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. 30 – 100 μl dieses Transformationsansatzes wurden auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Elektrotransformation Durch Elektrotransformation kann eine deutlich höhere Transformationseffizienz insbesondere für sehr große Plasmide oder DNA-Fragmente erzielt werden. Das Verfahren wurde deshalb bei besonders schwierigen Ligationen mit großen Inserts angewendet. Kommerziell erhältliche elektrokompetente Zellen (TOP Oneshot electrocompetent) wurden auf Eis aufgetaut und mit 0,5 – 1 μl Ligationsansatz versetzt und in eine kalte Elektrotransformationsskivette pipettiert. Die Transformation erfolgte in einem GenePulser von BioRad bei 400 Ω , 2,5 kV und 25 μF . Die Zellen wurden

nach dem Puls sofort in 1 ml LB- oder SOC-Medium aufgenommen, 30 – 60 min bei 37°C inkubiert und ausplattiert.

4.2 Proteinchemie

4.2.1 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Übernachtskulturen der mit dem Expressionsplasmid transformierten Bakterien wurden 1:10 mit LB-Medium verdünnt und weitere 2 h bis zu einer OD_{600} von etwa 0,5 wachsen gelassen. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 2,5 mM IPTG. Nach etwa 2 - 4 h langer Inkubation mit IPTG bei 37°C wurden die Bakterien bei 4°C abzentrifugiert und das Pellet in PBS (1/10 des Kulturvolumens) resuspendiert. GST-Fusionsprotein-exprimierende Bakterien wurden mit Lysozym (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 30 min lang bei 37°C inkubiert, um die Zellwände der Bakterien aufzuschließen. Bei His₆-markierten Proteinen wurde dieser Schritt weggelassen, da er die Proteinausbeute erheblich verschlechterte. Stattdessen wurde hier nur durch entsprechend längeres Frieren und Tauen lysiert. Die Zellsuspensionen wurden in flüssigem Stickstoff etwa 1 min gefroren und anschließend in lauwarmem Wasser wieder vollständig aufgetaut. Diese Prozedur wurde so lange wiederholt, bis eine deutlich erhöhte Viskosität der Zellsuspension einen ausreichenden Aufschluss anzeigte. Als nächstes wurde die enthaltene DNA durch 5 U/50 ml Kulturvolumen Endonuklease (Benzonase von Sigma) in Anwesenheit von 2 mM MgCl_2 zerstört (15 min bei 37°C). Danach wurde 20 min zentrifugiert und alle löslichen Proteine befangen sich im Überstand. Je 1,5 ml dieses Überstands wurde zur Extraktion der löslichen rekombinanten GST-Fusionsproteine bzw. His₆-markierten Proteine mit 100 μl Glutathionsepharose bzw. Ni-NTA Agarose versetzt und zum Binden etwa 2 h bei 4°C leicht geschüttelt. Ungebundene Proteine wurden nach kurzem Zentrifugieren mit dem Überstand und durch 3-maliges

Waschen mit PBS entfernt. Die gebundenen GST-Fusionsproteine wurden entweder vollständig mit GSH-haltigem Puffer eluiert oder mit Thrombin vom GST abgespalten. Die His₆-Proteine wurden mit 250 mM Imidazol in PBS eluiert. Alle unlöslichen Proteine mussten erst durch Resuspendieren mit 0,1 %iger Maltosid-Lösung aus dem Zellpellet extrahiert werden, bevor sie wie die löslichen Proteine an die Matrix gebunden werden konnten.

4.2.2 Polyacrylamidgелеlektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen in Polyacrylamidgelen wurde modifiziert nach Laemmli durchgeführt. Die Proben wurden 1:1 mit 2x Laemmli-Puffer versetzt und 5 min bei 95°C aufgekocht. Die Elektrophorese wurde mit einem Glycinlaufpuffer unter einer Spannung von 90 V durchgeführt. Nach etwa 1 – 1,5 h lief die Laufmittelfront aus dem Gel und die Elektrophorese wurde beendet. Die Proteinbanden wurden durch etwa 10 min Kochen mit Coomassie-Färbelösung und anschließendes Entfärben in 7 % Essigsäure sichtbar gemacht.

4.2.3 Westernblotting

Das Blotten: Proteine, die durch PAGE aufgetrennt wurden, können auf Nitrocellulose-Membranen übertragen und mit proteinspezifischen Antikörpern detektiert werden. Die auf Größe des Proteingels zugeschnittene Membran (Fluorotransfer Membrane, 0,2 µm von Biosupport Membranes, Pall) wurde zunächst mit Methanol benetzt und anschließend in Blot-Puffer gegeben. Das zuvor wie oben beschrieben angefertigte Proteingel wird ebenfalls in Blot-Puffer überführt und 15 - 30 min äquilibriert. Inzwischen wurden Filterpapiere entsprechend zugeschnitten und mit Blot-Puffer getränkt. Nach Ablauf der Äquilibrierungszeit wurden von unten nach oben Filterpapier, Membran, Proteingel, Filterpapier in dieser Reihenfolge zwischen die Elektroden des Blot-Gerätes (Bio-rad Trans-Blot SD) geschichtet. Die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf die

Nitrocellulose-Membran erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 15 V (etwa 200 – 250 A). Nach etwa 1/2 h kann der Blotting-Vorgang beendet werden.

Nach dem Blotten: Das Proteingel wurde mit Coomassie-Färbelösung wie oben beschrieben gefärbt, um die Übertragungseffizienz abzuschätzen. Die Membran wurde in 5 % Magermilchpulversuspension etwa 30 min geschwenkt, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren. Danach wurde mit PBS gewaschen und in einer Verdünnung des ersten Antikörpers in PBS mindestens 1 h lang (oder über Nacht) unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach kurzem Waschen mit PBS wurde mit zweitem Antikörper 1 – 2 h inkubiert und schließlich dreimal mit PBS gewaschen. **Die Färbereaktion:** Nacheinander werden 25 ml Färbepuffer, 1 g Diaminobenzidin, 100 µl Cobaltchlorid-Lösung und zum Starten der Reaktion 10 µl H₂O₂ auf die Membran pipettiert. Meist war nach etwa 10 min eine ausreichende Färbung erreicht, und die Reaktion wurde durch Waschen mit Wasser gestoppt. Danach wurde die Membran getrocknet.

4.2.4 Crosslinking

Die Interaktion zwischen zwei Proteinen kann in vitro durch chemisches Vernetzen der interagierenden Moleküle „fixiert“ und mittels SDS-PAGE analysiert werden. Dazu wurde die Proteinlösung, die die Interaktionskandidaten enthält, 1 h mit 10 mM Dimethylsuberimidat und 0,2 M Triethanolamin bei Raumtemperatur inkubiert. Die Vernetzungsreaktion wird durch Zugabe von Laemmli-Puffer gestoppt und das Reaktionsgemisch durch PAGE aufgetrennt. Nach Färbung der Proteine (wie oben beschrieben) kann man eine Interaktion anhand der Bandengrößen erkennen.

4.2.5 Gelfiltration

Die Größe von Proteinen oder Proteinkomplexen kann neben PAGE auch durch Größenausschluss-Chromatographie bestimmt werden. Im Gegensatz zur SDS-Gelelektrophorese findet die Auftrennung im nativen Zustand der Proteine statt. Dadurch können auch Interaktionen bzw. Komplexe von Proteinen detektiert und quantifiziert

4 Material und Methoden

werden, die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt werden würden. Verschiedene Shh-Konstrukte wurden wie oben beschrieben rekombinant exprimiert und aufgereinigt. Sowohl bei den GST-Fusionsproteinen als auch bei den His₆-markierten Proteinen wurde zur Abtrennung von GSH bzw. Imidazol eine Aufkonzentrierung und Umpufferung in PBS mittels Centricon 10-Konzentratoren (Amicon, #4205) durchgeführt. Die Gelfiltration erfolgte am BioCad Sprint (Perseptive Biosystems, Inc.) unter Verwendung einer TSKgel G 3000 SW-Säule (Länge 60 cm, Durchmesser 7,5 mm, Partikelgröße 10 µm; #05103; Tosohaas), vor die eine TSKgel SW-Vorsäule (Länge 7,5 cm, Durchmesser 7,5 mm, Partikelgröße 10 µm; #05371; Tosohaas) geschaltet war, mit einer maximalen Flussrate von 1,2 ml/min und einem Maximaldruck von 600 psi. Als Trennungspuffer (mobile Phase) wurde PBS mit verschiedenen pH-Werten anhand von Größenstandards (12,4 kDa bis 132 kDa) getestet und pH 7,3 gewählt.

Standard	M _w
Cytochrom c	12,5 kDa
Lysozym	14,2 kDa
Carboanhydrase	29 kDa
Ovalbumin	43 kDa
BSA	66 kDa
BSA-Dimer	132 kDa

Die Ermittlung der Proteingröße wurde anhand der Eichgeraden durchgeführt, die aus den Größenstandards berechnet wurde.

4.2.6 Herstellung von Ptch-Liposomen

Zur Analyse der Interaktion zwischen Shh und seinem Rezeptor Ptc mittels SPR war es nötig, das Multitransmembranprotein Ptch in Form von Liposomen „mobil“ zu machen. Ptch wurde dazu in den eukaryotischen Expressionsvektor pCR3.1 kloniert und in C3HT1/2-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden etwa 36 h nach der Transfektion aus einer 140 ml-Zellkulturflasche durch Trypsin/EDTA abgelöst und 5 min bei 1600 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml 0,1 % Maltosid in PBS durch Vortexen resuspendiert. In ein Probengläschen wurden 20 µl Phosphatidyl-L-serin (1 mg/ml in Ethanol)

pipettiert. Nachdem das Lösungsmittel verdunstet war, wurde das Zell-Lysat dazupipettiert und durch mehrfaches Auf- und Abziehen in einer Pasteurpipette gemischt. Danach wurde 3 min auf Eis mit Ultraschall (Bandelin Sonoplus, 70 % Energie) behandelt und über Nacht gegen 50 mM Tris/HCl, 0,5 mM CaCl₂, 0,1 M NaCl, pH 7,3 dialysiert, um Detergenz zu entfernen. Die Liposomen-Präparate wurden bei 4°C maximal eine Woche gelagert.

4.3 Arbeiten mit Säugetierzellen

4.3.1 Kultivierung

Auftauen von Zellen: Zum Auftauen einer neuen Charge Säugetierzellen wurde das Kryogefäß aus flüssigem Stickstoff entnommen und in einem 37°C -Wasserbad schnell aufgetaut, dann in ein 15 ml-Falconröhrchen mit 5 ml Medium überführt und 5 min bei 1600 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet mit 3 ml vorgewärmten Mediums resuspendiert und in eine 140 ml-Zellkulturflasche mit vorgewärmtem Medium pipettiert. Die Prozedur wurde zügig durchgeführt, da das im Einfriermedium enthaltene DMSO nach dem Auftauen schädlich für die Zellen ist. Adhärente Zelllinien wachsen zelltypabhängig in etwa 2 - 3 Tagen zur Konfluenz und müssen dann gesplittet werden.

Splitten von konfluenten Zellen: Nach dem Absaugen des Mediums wurden mit 7 - 10 ml PBS gewaschen. Die Ablösung der Zellen von der Zellkulturflasche erfolgte etwa 3 min nach Zugabe von 3 - 5 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C. Die abgelösten Zellen wurden mit der Trypsin/EDTA-Lösung resuspendiert und auf 2 - 3 neue Zellkulturflaschen mit vorgewärmtem Medium verteilt.

Einfrieren von Zellen: Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen einer 25 ml-Zellkulturflasche zunächst mit PBS gewaschen und dann mit 2 - 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, in 5 ml PBS überführt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 0,5 ml Medium mit 7 % DMSO zügig resuspendiert und in ein 1 ml Cryoröhrchen (#375418;

NUNC) pipettiert und in einer speziellen Gefrierbox (Nunc) über Nacht langsam in -80°C eingefroren. Bis zu einem Zeitraum von 3 – 4 Monaten wurden die Zellen bei -80°C gelagert, sollte eine längerfristige Lagerung erfolgen, wurden die Zellen in Stickstofftanks überführt.

4.3.2 Transfektion von Säugetierzellen

FuGENE6-Transfektionsreagens:

C3HT1/2- oder CHO-215-Zellen wurden in 6well-Zellkulturgefäßen bis zu einer Konfluenz von etwa 50 – 80 % vermehrt. In einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden zu 97 μl serumfreiem Medium 3 μl FuGENE6 (Roche; # 1 815 091) pipettiert, ohne die Gefäßwände zu berühren. Durch Antippen wurde vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Mischung wurde tropfenweise in ein zweites Reaktionsgefäß gegeben, das zwischen 1 und 3 μg der DNA enthielt, die transfiziert werden sollte. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Mischung tropfenweise in das Medium der Zellen gegeben. Bei Cotransfektionen wurde das FuGENE6-Volumen entsprechend erhöht. Das ideale Verhältnis von Transfektionsreagenz und DNA-Menge wurde je nach Zelllinie und zu transfizierende DNA durch Vorversuche ermittelt, lag aber meist bei 1:2 DNA:FuGENE6. Das Protein konnte etwa 24 h später detektiert werden.

Calciumphosphat-Präzipitation: Für einige Zelllinien konnte keine ausreichende Effizienz durch FuGENE6 erzielt werden. Diese Zelllinien (p53+/+, p37-/-) wurden mittels Calciumphosphat-Präzipitation transfiziert. Pro 6well wurden 125 μl CaCl_2/TE (pH 8.0), 3 μg zu transfizierende DNA und 5 μg Träger-DNA (Lachsperma) gemischt und tropfenweise unter Vortexen 125 μl 2xHeBS (pH 7,1) zugegeben. Zum Präzipitieren der Calciumphosphatkristalle wurde das Gemisch 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen und schließlich tropfenweise in das Medium der Zellen verteilt. Nach 12 - 16 h wurde das Medium gegen frisches ausgetauscht.

4.3.3 Immunfärbung

Die Zellen wurden in Chamber Slides (Nunc) bis zu einer Konfluenz von etwa 80 - 100 % wachsen gelassen. Höhere Zelldichten (Überkonfluenz) schädigen die Zellen und führen zu geringeren Teilungsraten und schlechterer Transfektionseffizienz. Nachdem das Medium abgesaugt worden war, wurden die Zellen 10 min lang bei -20°C in eiskaltem Methanol/Aceton (1:1) fixiert und an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Zellen mit PBST 15 min bei Raumtemperatur permeabilisiert und dann zweimal mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindung von Antikörpern zu unterdrücken wurde 30 min lang bei Raumtemperatur mit 3 % BSA/PBS blockiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Das primäre Antikörperserum wurde in unterschiedlichen Verdünnungsstufen (unverdünnt bis 1:5000 in BSA/PBS) ca. 1 h bei RT angeboten und dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurde mit sekundären Antikörper (1:800 in BSA/PBS, Cy3-gekoppelt) 1 h inkubiert und wieder dreimal mit PBS gewaschen. Mit DAPI-Lösung wurden die Kerne gefärbt (2 min), und nach dreimaligem Waschen wurde das Präparat für die weitere Aufbewahrung mit Vektashield eingedeckt und mit Nagellack versiegelt.

4.3.4 Der Dual-Luciferase-Assay

Mit Hilfe des Dual-Luciferase Reporter Assay Systems (Promega, #E1910) sollte die Aktivierung des oben beschriebenen Reporterplasmids Gli1-BSR durch Sonic Hedgehog quantifiziert werden. Das System zeichnet sich dadurch aus, dass zwei individuelle Reporter (Firefly-Luciferase und Renilla-Luciferase) innerhalb eines Experiments simultan exprimiert und gemessen werden können. Die Luciferasen von Firefly (*Photinus pyralis*) und Renilla (*Renilla reniformis*) sind durch konvergente Evolution entstanden und haben unterschiedliche Enzymstrukturen und Substratspezifitäten. Dadurch wird eine Separation beider Lumineszenz-Reaktionen innerhalb eines Systems möglich. In der vorliegenden Arbeit stand einer der Luciferase-Reporter (Firefly) unter der Kontrolle des Gli1-responsiven Promotors (Gli1-BS) und

4 Material und Methoden

diente zur quantitativen Bestimmung der Shh-Signalintensität. Der andere Reporter (Renilla) wurde über einen HSV-TK-Promotor konstitutiv exprimiert und diente als interne Transfektionskontrolle (pRL-TK).

Transfektion der Zellen

C3HT1/2-Zellen wurden wie oben beschrieben mit folgenden Plasmiden transfiziert (pro 6well): **Kontrolle** (keine Aktivierung des Reporterplasmids): 0,5 µg Reporterplasmid, 0,3 µg Renilla-Luciferase, 0,2 µg pcDNA3. **Aktivierung durch Gli1**: 0,01 - 0,05 µg FLAG-Gli1, 0,5 µg Reporterplasmid, 0,3 µg Renilla-Luciferase, 0,19 - 0,15 µg pcDNA3. **Aktivierung durch Gli1-zfg**: 0,01 - 0,05 µg FLAG-Gli1-zfg, 0,5 µg Reporterplasmid, 0,3 µg Renilla-Luciferase, 0,19 - 0,15 µg pcDNA3. **Aktivierung durch pcDNA3-ShhN**: 0,2 µg pcDNA3-ShhN, 0,5 µg Reporterplasmid, 0,3 µg Renilla-Luciferase.

Messung der Lumineszenz

Etwa 24 h nach der Transfektion werden die Zellen durch Zugabe von Passive Lysis Buffer (PLB) und mehrmaliges Einfrieren (-80°C) und Auftauen aufgeschlossen und in 20 µl-Aliquots zur Messung eingesetzt (die vom Hersteller vorgeschlagene alleinige Behandlung mit PLB war bei den verwendeten Zellen nicht ausreichend). Alle benötigten Puffer (Luciferase Assay Buffer II und Stop & Glo Buffer) und Substrat-Lösungen (Luciferase Assay Substrate und Stop & Glo Substrate) wurden nach Herstellerangaben hergestellt und gelagert. Die Messung erfolgte am AutoLumat LB 953 (EG&G Berthold).

4.4 Genexpressionsanalyse in Embryonen

Präparation der Mäusembryonen

Trächtige Mäuseweibchen (C3HT1/2) wurden durch Genickbruch getötet. Die Uteri her-

auspräpariert und in eisgekühltes PBS überführt. Durch Entfernen der Uteruswand und der embryonalen Hüllen (Chorion, Dottersack, und Amnion) wurden die Embryonen nacheinander freigelegt, sofort in eisgekühltes 4 % PFA/PBS überführt und über Nacht bei 4°C fixiert. Nach der Fixierung wurden die Embryonen durch eine aufsteigende Methanol/DEPC-PBS-Reihe (25, 50, 75, 100 % Methanol) entwässert und in 100 % Methanol bei -20°C gelagert. Eine Lagerzeit bis sechs Monate führt zu keiner wesentlichen Verschlechterung der Hybridisierungssignale.

4.4.1 whole mount mRNA-in situ Hybridisierung

Die manuelle Durchführung der Hybridisierung beruhte auf Protokollen von (ROSEN & BEDDINGTON, 1994) und (SPORLE & SCHUGHART, 1997) und erfolgte in 6well-Platten (Nunc oder Falcon) mit 100 µ-Zellsieben (Becton Dickinson Labware) bei mäßigem Schütteln. Teilweise wurden die Inkubationen mit Hilfe des *insitupro*-Roboters durchgeführt. Die Vorbereitung der Embryonen sowie die verwendeten Lösungen entsprechen denen im manuellen Protokoll. Das Programm für die Steuerung des Roboters wurde mit Hersteller-Software geschrieben und ist im Anhang beigefügt.

Vorbereitung der Embryonen: Die fixierten und in 100 %igem Methanol gelagerten Embryonen wurden auf Eis in einer absteigenden Methanolreihe (75, 50, 25, 0 % Methanol/DEPC-PBS, jeweils 10 min) rehydriert. Die Hirnventrikel wurden mit Subcutannadeln aufgestochen um Substrat-Präzipitate zu verhindern. Die Embryonen wurden dann in 6 %igem Wasserstoffperoxid/PBT für eine Stunde gebleicht und anschließend dreimal mit PBT (15 min) gewaschen. Bei Embryonen, die älter als 10,0 dpc waren, wurde eine Proteinase K-Behandlung durchgeführt. Die Dauer dieser Behandlung richtete sich nach dem Entwicklungsstadium und musste jeweils optimiert werden (1 - 15 min bei einer Konzentration von 5 µg Proteinase K/ml Proteinase K-Puffer). Der Verdau wurde mit frisch hergestelltem PBT/Glycin abgestoppt (zweimal 5 min)

4.4 Genexpressionsanalyse in Embryonen

und anschließend wurde zweimal 5 min mit PBT gewaschen. Die Embryonen wurden mit RIPA-Puffer dreimal für 5 min permeabilisiert und wieder dreimal 5 min mit PBT gewaschen. Danach wurde mit 4 % PFA/0,2 % Glutaraldehyd in PBT bei 4°C 20 min lang nachfixiert.

Hybridisierung: Die Embryonen wurden in 1:1 hybe-Puffer/PBT und anschließend unverdünntem hybe-Puffer jeweils 10 min äquilibriert. Bevor die denaturierte Digoxigenin-markierte RNA-Sonde zum hybe-Puffer gegeben wurde, erfolgte eine 3 stündige Vorinkubation der Embryonen bei 65°C in einer feuchten Kammer ohne Sonde. Danach wurde über Nacht bei gleicher Temperatur in hybe-Puffer mit 100 µg/ml tRNA und Sonde (0,25 - 1 µg/ml) hybridisiert. Um ungebundene Sonde zu entfernen, wurde am nächsten Morgen zwei- bis dreimal für 30 min bei 65 - 68°C mit hybe-Puffer und 5 min bei Raumtemperatur mit 1:1 hybe-Puffer/RNase-Puffer gewaschen und dreimal 30 min bei 37°C mit 100 µg/ml RNase in RNase-Puffer inkubiert. Anschließend wurde im Schüttelwasserbad bei 65-68°C mit SSC/FA/Tween 20-Puffer 5 Stunden lang gewaschen (etwa 10x Pufferwechsel). Danach wurden die Embryonen auf Raumtemperatur abgekühlt und 10 min lang in einer Lösung aus gleichen Teilen SSC/FA/Tween 20 und 1xTBST äquilibriert.

Antikörperinkubation: Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Embryonen 10 min mit MABT gewaschen und dann mit 10 % Blockierungslösung in MABT inkubiert. Gleichzeitig wurde der Dig-Antikörper 1:5000 mit 1 % Blockierungslösung in MABT verdünnt und bei 4°C aufbewahrt. Nach etwa 1 Stunde wurden die Embryonen mit Antikörper-Lösung über Nacht inkubiert. Zur Entfernung von unspezifisch gebundenem und ungebundenem Antikörper wurde in 1xTBST 24 Stunden lang bei Raumtemperatur unter Schütteln und regelmäßigem Wechsel der Waschlösung gewaschen. Anschließend wird noch 2 - 3 Tage mit täglichem Pufferwechsel gewaschen.

Färbereaktion: An die Dig-Antikörper ist Alkalische Phosphatase gekoppelt, die die Präzipitierung eines farbigen Substrats katalysiert und auf diese Weise die Dig-markierte RNA-Sonden sichtbar machen kann. Zu-

nächst wurden die Embryonen dreimal 20 min mit Alkalischem Phosphatase-Puffer gewaschen. Für die Färbung wurde BM Purple AB Substrat-Lösung mit 0,5 % Tween 20 und 2 mM Levamisol versetzt und 3 min bei 2400 rpm zentrifugiert. Levamisol inhibiert endogene alkalische Phosphatasen in Leber, Niere, Plazenta, Knochen und Darm von Säugetieren und unterdrückt dadurch unerwünschte Hintergrundfärbung. Die Färbereaktion erfolgte bei 4°C im Dunkeln und dauerte zwischen 4 h und 2 Tagen. Bei ausreichend intensiver Färbung wurden die Embryonen zweimal 30 min mit AP-Puffer im Dunkeln gewaschen und die Reaktion danach mit 4 % PFA/PBS gestoppt. Die Färbung bleibt in 4 % PFA/PBS über Jahre stabil.

Dokumentation: Die gefärbten Embryonen wurden in Petrischalen mit 1 % igem Agarosegel gelegt und mit PBS bedeckt. Mittels kleiner Gruben, die ins Agarosegel gegraben wurden, konnten die Embryonen beliebig und stabil zum Fotografieren positioniert werden. Die Aufnahmen wurden mit gemacht und die Bildbearbeitung (Korrektur der Farbbalance, Farbsättigung und Farblevel) mit Adobe Photoshop 5.0 durchgeführt.

4.4.2 Immunhistochemie auf Schnitten

Anfertigung von Paraffinschnitten Für die Einbettung in Paraffin wurden die Embryonen nach der Fixierung in 4 % PFA/PBS nacheinander folgenden Waschschritten unterzogen: 1 h in PBS, 1 h in 0,9 % NaCl, 2 h in 50 % Isopropanol/DEPC-H₂O, 3 h in 75 % Isopropanol/DEPC-H₂O, 6 h in 90 % Isopropanol/DEPC-H₂O, 2 x 4 h in 100 % Isopropanol, 12 h in Isopropanol/Paraffin (1:1) bei 60 °C und schließlich 8 h in Paraffin bei 65 °C und geöffnetem Gefäß. Nach vollständigem Abdampfen des Isopropanols wurden die Embryonen durch Temperatursenkung im aushärtenden Paraffin auf Plastikhalterungen in gewünschter Ausrichtung fixiert. In diesem Zustand sind die Embryonen über mehrere Monate lagerfähig. Die Präparate wurden am Mikrotom (Jung RM 2055) in 5 - 10 µm dünne Scheiben geschnitten und auf SuperFrost Plus-Objektträger (Menzel-Gläser) 1 - 3 Tage bei 50 - 60°C getrocknet. **Permeabili-**

4 Material und Methoden

sierung der Gewebeschnitte: Zunächst wurden die Schnitte mit Xylol 20 min entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (2x 100 % Ethanol, 2x 96 % Ethanol, 70 % Ethanol, destilliertes Wasser) rehydriert. In einem Schnellkochtopf wurde Citratpuffer zum Kochen gebracht und die Objektträger in einer hitzebeständigen Schaukel in den Citratpuffer getaucht. Nach dem Schließen des Deckels wurde erhitzt bis am Druckanzeiger der 2. Ring sichtbar wurde und ab diesem Zeitpunkt 4 min gekocht. Danach wurde der Druck abgebaut und die Schnitte mit kaltem Leitungswasser gespült. **Antikörperreaktion:** Die Objekte wurden drei mal mit TBS-Puffer gewaschen und dann in einer feuchte Kammer mit 4 % Magermilch/TBS 30 min inkubiert. Nach dem Blockierung erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (in 2 % Magermilch/TBS) über Nacht. Am nächsten Morgen wurde dreimal mit TBS und einmal mit 4 % Magermilch/TBS gespült bevor der zweite Antikörper (1:50 in TBS) auf die Objekte pipettiert wurde. Nach 1 h Inkubationszeit wurde dreimal mit TBS gewaschen. **Farbreaktion:** Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte durch Umsetzung von Diaminobenzidin (DAB) mittels der gekoppelten Peroxidase. Die Reaktion wurde nach 8 - 10 min unter fließendem Wasser gestoppt. Anschließend wurde mit Hämotoxinlin gegengefärbt und mit einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert. Die Präparate wurden mit Eukitt eingedeckelt.

4.5 Biophysikalische Methoden

4.5.1 Konfokalmikroskopie

Im Gegensatz zur Licht- oder Fluoreszenzmikroskopie wird bei der Konfokal-Technik nicht das gesamte Objekt belichtet, sondern nur die Fokusebene. Informationen, die bei herkömmlichen Verfahren ober- oder unterhalb der Fokusebene entstehen und dadurch die Auflösung beträchtlich limitieren, werden vermieden. Eine schichtweise Analyse von lebenden Zellen ermöglicht bei Bedarf eine dreidimensionale Rekonstruktion des Ob-

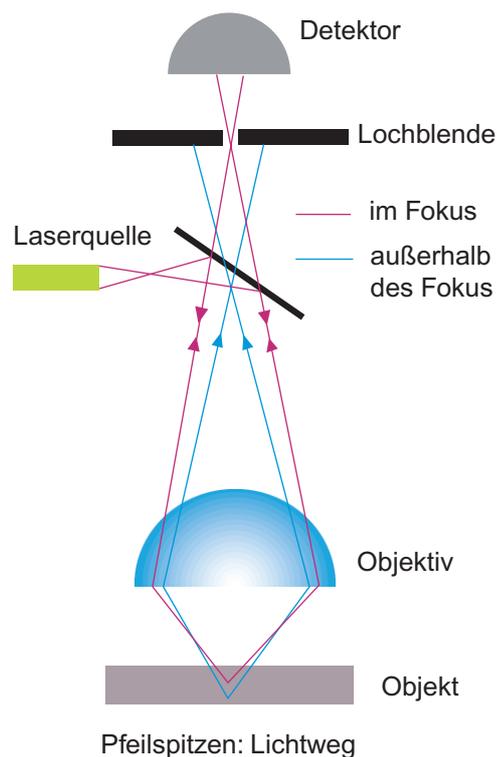


Abbildung 4.1: Strahlengang eines Konfokalmikroskops

jekts.

4.5.2 Surface Plasmon Resonance (SPR)

Prinzip der Verfahrens

Mittels SPR-Technologie ist die Messung Analyt-Liganden-Interaktionen sowie deren kinetische Charakterisierung in Echtzeit möglich. Das Verfahren beruht auf dem physikalischen Phänomen der Oberflächenplasmon-Resonanz (SPR) zur präzisen Messung des Brechungsindex eines Mediums, das unmittelbar an die Sensoroberfläche (meist ein Goldfilm) angrenzt. Auf der Sensoroberfläche sind Liganden (z. B. Proteine) immobilisiert. Wenn diesen Liganden in der darüberliegenden Lösung Analyten (Proteine, DNA, RNA) angeboten werden, kommt es bei einer Interaktion zwischen Ligand und Analyt zu einer Akkumulierung von Molekülen an der Sensoroberfläche, die sich in einer Änderung (in den meisten Fällen einer Erhöhung) des Bre-

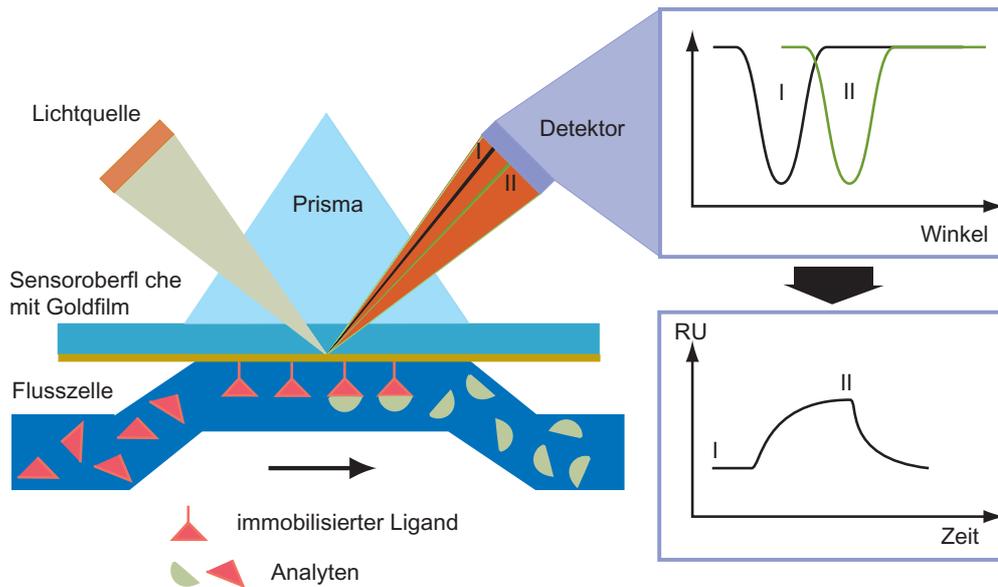


Abbildung 4.2: Prinzip der *surface plasmon resonance*-Technik

chungsindex in der Nähe der Oberfläche auswirkt. Wird der Analyt wieder aus der Lösung entfernt, dissoziiert bei reversiblen Interaktionen der Analyt vom Ligand und der Brechungsindex sinkt wieder. Die Änderung des Brechungsindex verschiebt die Resonanzfrequenz der durch Lichteinstrahlung anregbaren Oberflächenplasmonen (Oberflächenplasmonen). Diese Änderung der Resonanzeigenschaften wird als Signal detektiert. Der Zeitverlauf des Signals wird zur Bestimmung der Bindungskinetiken herangezogen.

Durchführung

Zur Untersuchung der Dimerisierungseigenschaften von Sonic Hedgehog wurden als Liganden und Analyten verschiedene rekombinant exprimierte und aufgereinigte Shh-Konstrukte verwendet. Sämtliche Proteinlösungen wurden mit einem $0,45 \mu\text{m}$ -Filter filtriert, um kleinste Partikel zu entfernen. ShhN_k , ShhN_k -GST, His_6 - ShhN_k und ShhN_{comp} -GST wurden in je einer Fließzelle auf CM5-Sensor-Chips (#BR-1000-14) mit Hilfe des *Amine Coupling-Kits* (#BR-1000-54) nach Herstellerangaben immobilisiert. Als Referenz (Kontrolle) wurden entweder GST oder 17β -HSD4 verwendet, die in etwa das gleiche Molekulargewicht wie ShhN haben. Die Proteine wurden zur Immo-

bilisierung in 1/50 in pH 5,5 Acetat-Puffer verdünnt. Die Applikation der Analyten erfolgte verdünnt in HSB-P-Puffer (#BR-1003-68). Da die Dissoziation der interagierenden Proteine im vorliegenden Fall von alleine nicht vollständig war, musste die Sensoroberfläche zwischen den Einspritzungen mit einem optimierten Waschpuffer gereinigt werden. Auf den gleichen Chips wurde auch die Interaktion von Shh-Konstrukten mit Ptch-Liposomen untersucht. Die Liposomen-Suspension wurde vor der Applikation durch Filtration mit einem $0,2 \mu\text{m}$ -Filter von ungewünschten großen Mikrosomen befreit. Die Interaktion zwischen ShhN und den Ptch-Liposomen war so groß, dass mit Proteinverträglichen Detergenzlösungen keine Reinigung der Chipoberfläche möglich war.

4.6 Phylogenetische Analysen

4.6.1 Erstellung der Datensätze

Die Datensätze für die jeweiligen phylogenetischen Programme wurden mit Hilfe der *GenBank*-Datenbank

4 Material und Methoden

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) zusammengestellt. Ausgehend von einer humanen Proteinsequenz der betreffenden Familie wurden durch die Suchfunktion *BLink* alle bekannten nächsten Verwandten ermittelt. Manuell wurden Qualität, Vollständigkeit und Charakterisierung jeder identifizierten Proteinsequenz geprüft. In den Datensatz wurden Sequenzen aus möglichst vielen verschiedenen Organismen aufgenommen, die vollständig, möglichst gut charakterisiert und nicht redundant waren. Die Größe der Datensätze betrug zwischen 15 und 45 Proteinsequenzen.

4.6.2 Alignment der Sequenzen

Die Berechnung des *Alignments* der Proteinsequenzen eines Datensatzes erfolgte mit dem Windows-Editor *BioEdit*, der eine automatisierte *ClustalW*-Analyse ermöglicht. Die Proteine werden erst paarweise verglichen und dann zu *Clustern* zusammengefasst und so aliniert. Lücken im resultierenden *Alignment* wurden mit der Funktion „*strip columns containing gaps*“ entfernt.

4.6.3 Berechnung von Stammbäumen

Parsimony-Algorithmus

Der *Parsimony*-Algorithmus errechnet den Stammbaum, der bei vorgegebenem Evolutionsmodell für die beobachtete Merkmalsverteilung (Aminosäuresequenz) die wenigsten Evolutionsschritte benötigt. Dabei wird vorausgesetzt, dass Merkmalsänderungen reversibel sind, d. h. Aminosäuren oder Nukleotide wieder „zurückmutieren“ können. Das *Parsimony*-Programm ist Teil des *Phylip*-Programmpakets (*PHYLP*-*PHYLogeny Inference Package*, <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>)

Fitch-Algorithmus

Das Fitch-Verfahren (oder Fitch-Margoliash-Verfahren) berechnet Stammbäume auf der Basis von Distanzmatrizen (= tatsächliche

Distanz der Proteinsequenzen). Der Algorithmus sucht nach dem Verzweigungsmuster, für das die Summe der quadrierten Differenzen zwischen den tatsächlichen Distanzen (Distanzmatrix) und den Distanzen im Baum minimal ist. Man geht dabei von der Annahme aus, dass jede Transformation (Mutation) gleichwertig ist, d. h. jede Merkmalstransformation ist erlaubt. Auch der Fitch-Margoliash-Algorithmus ist im *PHYLP*-Paket enthalten.

Neighbour-Joining-Algorithmus

Auch der Neighbour-Joining-Algorithmus basiert auf Distanzmatrizen. Bei diesem Verfahren wird schrittweise nach dem Baum gesucht, für den die totalen Astlängen minimal werden (Prinzip der minimalen Evolution). Nacheinander werden immer die jeweils ähnlichsten Sequenzen zusammengefasst. Nach einem vorgegebenen Evolutionsmodell wird für n Sequenzen zuerst eine $n \times n$ -Matrix der paarweisen Ähnlichkeiten erstellt. Danach werden wiederum die ähnlichsten Sequenzen zusammengefasst, eine neue $(n-1) \times (n-1)$ -Matrix berechnet, die für die zusammengefassten Sequenzen gemittelte Abstände enthält, und das Verfahren solange wiederholt, bis der komplette Stammbaum rekonstruiert ist. Der Neighbour-Joining-Algorithmus ist ebenfalls im *PHYLP*-Paket implementiert.

Maximum-Likelihood-Verfahren

Der Algorithmus zur Rekonstruktion von Maximum-Likelihood-Stammbäumen beruht auf dem statistischen Vergleich von alternativen Stammbäumen. Es soll diejenige Lösung gefunden werden, die unter einem vorgegebenen Evolutionsmodell mit der größten Wahrscheinlichkeit zur beobachteten Verteilung von Merkmalen (in diesem Fall Aminosäuresequenzen) geführt hätte. Ein ähnliches Prinzip liegt dem Maximum-Likelihood-Mapping zugrunde, bei dem der phylogenetische Informationsgehalt eines Alignments berechnet und grafisch dargestellt wird. Beide Algorithmen sind im Programmpaket *Tree-Puzzle 4.0.2* enthalten: <http://www.tree-puzzle.de/>.

4.7 Materialien

Lösungen und Medien

Allgemeine Stammlösungen

- DNA-Ladepuffer für Agarosegele
 - 30 % Glycerol
 - 0,2 % Bromphenolblau
 - 0,2 % Xylencyanol
 - in Tris/HCl (pH 7,5)
- Ethidiumbromid-Stammlösung
 - 10 mg/ml in H₂O
 - Lagerung bei 4°C. Für den Gebrauch 1:10 verdünnen
- Formamid (denionisiert) Lagerung bei -20°C
- IPTG (Isopropylthio-β-D-Galactosidase)
 - 2 g/10 ml in H₂O lösen, sterilfiltrieren, aliquotieren, Lagerung bei -20°C
- PBS (Phosphate-Buffered Saline)
 - 8 g NaCl
 - 1,44 g Na₂HPO₄
 - 0,24 g NaH₂PO₄
 - ad 1 l H₂O, pH-Wert 7,3
- 10 % SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, w/v) in H₂O
- 20x TAE (Tris-Acetat-Puffer)
 - 0,8 M Tris
 - 0,2 M Natrium-Acetat
 - 0,02 M EDTA, pH 7,8 mit Eisessig
- TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer)
 - 10 mM Tris/HCl (pH 7,0)
 - 1 mM EDTA (aus 0,5 M EDTA, pH 8,0)
- 10x TBE (Tris-Borat-Puffer)
 - 0,9 M Tris
 - 0,9 M Borsäure
 - 20 mM EDTA (aus 0,5 M EDTA, pH 8,0)
- X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-Galactose)
 - 20 mg/ml in Dimethylformamid, Lagerung im Dunkeln bei -20°C

Nährmedien für Bakterien

- LB-Medium:
 - 1 % Bacto-Tryptone
 - 0,5 % Bacto-Hefeextract
 - 1 % NaCl
 - Mit NaOH auf pH 7,0 titrieren; autoklavieren; zum Selektionieren 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin zusetzen
- LB-Agar:
 - LB-Medium
 - 7,5 g/l Agarose
 - 10 mM MgSO₄
 - Autoklavieren; für eine Antibiotika-Selektion 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin zusetzen; für die blau/weiß-Selektion von Bakterienkolonien 40 µl X-Gal- und 4 µl IPTG-Stammlösung auf die LB-Agarplatten (φ 7,5 cm) ausplattieren
- SOC-Medium:
 - 2 % Bacto-Tryptone
 - 0,5 % Bacto-Hefeextract
 - 10 mM NaCl
 - 2,5 mM KCl
 - 10 mM MgSO₄
 - mit NaOH auf pH 7,0 titrieren; autoklavieren
 - 20 mM Glucose (aus sterilfiltrierter 1 M Glucoselösung)

Kulturmedien für Säugetierzellen

- McCoy's 5A Medium modified (Sigma#M-8403) für CHO-215-Zellen
- BME Eagle with Glutamax-I (Gibco#51010-023) für C3HT1/2-Zellen
- Einfriermedium
 - 7 % DMSO in serumhaltigem Kulturmedium

Lösungen für die Proteinchemie

- GSH-Elutionspuffer:
- Imidazol-Elutionspuffer: 250 mM Imidazol in PBS
- Thrombin-Elutionspuffer:

4 Material und Methoden

- Laemmli-Puffer:
 - 50 % Glycerin
 - 4 % SDS
 - 0,2 M Tris-HCl
 - 0,1 % G250, pH 6,8
- Sammelgelpuffer für SDS-PAGE:
 - 1 M Tris-HCl pH 8,8
- Trenngelpuffer für SDS-PAGE:
 - 1 M Tris-HCl pH 6,8
- Elektrodenpuffer:
 - 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS
- Entfärbelösung:
 - 7 % Essigsäure in H₂O
- Blot-Puffer:
 - 48 mM Tris
 - 33 mM Glycin
 - 1,3 mM 10 % SDS
 - 20 % Methanol
- Färbe-Puffer für Westernblot:
 - 0,225 g NaH₂PO₄
 - 1,59 g Na₂HPO₄
 - 11 g NaCl
 - 8,5 g Imidazol
 - 625 µl Tween20
 - ad 250 ml Wasser
- Coomassie-Färbelösung:
 - 500 mg CBB G250
 - 200 ml MeOH
 - 5 ml Essigsäure
 - 295 ml H₂O

Lösungen für SPR

- Immobilisierungspuffer:
 - 10 mM Natriumacetat pH 5,5
- HBS-P-Puffer:
 - 0,01 M HEPES pH 7,4
 - 0,15 M NaCl
 - 0,005 % Polysorbat 20 (v/v)
- Waschpuffer:
 - 10 mM NaOH
 - 1 M NaCl

Lösungen für mRNA-*in situ* Hybridisierung

- Alkalischer Phosphatase-Puffer:
 - 100 mM NaCl
 - 50 mM MgCl₂
 - 0,1 % Tween20
 - 100 mM Tris/HCl (pH 9,5)
- Blockierungslösung:
 - 10 % (w/v) Blockierungsreagenz (Boehringer Mannheim) in MAB-Puffer lösen, autoklavieren und aliquotiert bei -20°C aufbewahren
- BM purple Färbelösung:
 - BM purple AP Substrat (Boehringer Mannheim; #1442074)
 - 2 mM Levamisol (Sigma #L-9756)
 - 0,5 - 1 % Tween20
 - zentrifugieren; Überstand verwenden
- Heparin:
 - 100 mg/ml Heparin in 4x DEPC-SSC
- MAB-Puffer:
 - 0,1 M Maleinsäure
 - 0,15 M NaCl
 - mit NaOH-Plättchen auf pH 7,5 einstellen, autoklavieren
- MABT-Puffer MAB-Puffer
 - 0,1 % Tween20
- PBS-DEPC:
 - 0,5 ml DEPC (gekühlt; Biomol#54647) in 1 l PBS geben, schütteln, über Nacht offen stehen lassen und dreimal autoklavieren
- PBT:
 - PBS
 - 0,1 % Tween20
- PBT/Glycin:
 - PBT
 - 2 mg/ml Glycin
- 4 % PFA in PBS (4 % PFA/PBS):
 - 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS
 - mit ein paar Tropfen NaOH alkalisieren und bei 50°C unter Rühren lösen/depolymerisieren; abkühlen lassen und mit HCl auf pH 6,5-7,0 einstellen
- Proteinase K-Puffer:
 - 20 mM Tris/HCl (pH 7,0)
 - 1 mM EDTA

- RNase-Lösung:
0,5 M NaCl
10 mM Tris/HCl (pH 7,5)
0,1 % Tween20
- RIPA:
0,05 % SDS
0,15 M NaCl
1 % NP40 (Nonidet P40)
0,5 % Deoxycholat
1 mM EDTA
50 mM Tris/HCl (pH 8,0)
- SSC/FA/T:
2xSSC
50 % Formamid
0,1 % Tween20
- 10xTBST:
1,4 M NaCl
30 mM KCl
250 mM Tris/HCl (pH 7,5)
1 % Tween
- Tris/Glycin-Puffer:
0,1 M Tris
0,1 M Glycin
in DEPC-Wasser lösen
- tRNA:
10 mg/ml in DEPC-Wasser lösen, 2x phenolisieren und bei -20°C aliquotiert aufbewahren
- hybe-Puffer:
50 % deionisiertes Formamid
5xSSC
0,1 % Tween20
50 µg/ml Heparin
100 µg/ml tRNA
mit 1 M Zitronensäure auf pH 6.0 einstellen

Lösungen für *whole mount* Immunhistochemie

- PBSMT:
2 % Milchpulver
0,1 % Triton-X100 in PBS
- PBST:
0,2 % Serumalbumin
0,1 % Triton-X100 in PBS
- PBST/DAB:
30 µg/ml Diaminobenzidin

Lösungen für Immunhistochemie auf Schnitten

- Citratpuffer:
Stammlösung A:
0,1 M Zitronensäure
Stammlösung B:
0,1 M Natriumcitrat-Dihydrat
Arbeitslösung: 27 ml Stammlösung A + 123 ml Stammlösung B mit dest. Wasser auf 1,5 l auffüllen, 1,5 ml Tween20 dazugeben und pH-Wert auf 6,0 einstellen
- TBS-Puffer:
Stammlösung 1: 250 g/l NaCl
Stammlösung 2: 181,71 g Tris in 2,4 l dest. Wasser lösen, pH mit HCl auf 7,6 einstellen und mit dest. Wasser auf 3 l auffüllen
Arbeitslösung: 300 ml Stammlösung 1 + 300 ml Stammlösung 2 mit dest. Wasser auf 3 l auffüllen

4.7.1 Verwendete Bakterienstämme

Zur Amplifikation von Plasmiden und zur Expression von rekombinanten Proteinen wurden folgende Wirtsstämme verwendet:

JM 107 (Stratagene): mcrA-, Δ (lac-proAB), thi-1, gyrA96, endA1, hsdR17, relA1, supE44, F'⁺[traD36 pro AB,lacI^qZ Δ M15]

Top10F OneShotTM (Invitrogen): F(lacI^q), mcrA, D(mrr-hsdRMS-mcrCB), ϕ 80lacZ Δ M15, Δ lacX74, deoR, recA1, araD139, D(ara-leu7697), galU, galK, rpsL(Str^r), endA1, nupG

4.7.2 Verwendete Zelllinien

HeLa: Epithelzellen; hergestellt aus humanem Cervix-Karzinom

C3HT1/2: Mäusefibroblasten (Mausstamm: C3H); hergestellt aus embryonalem Gewebe.

p37-/-: Patched-k.o.-Zelllinie; hergestellt aus Ptch-k.o.-Embryonen (E9,0).

p53+/-: murine Zelllinie; hergestellt aus embryonalem Gewebe (E 9,0).

4.7.3 Enzyme und Antikörper

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (Roche; #713023)

Antikörper gegen Digoxigenin, gekoppelt an alkalische Phosphatase, Fab-Fragmente (Roche; #1093274)

DNaseI, RNase-frei (Roche; #776785)

Lysozym (Sigma; #L7651)

Proteinase K, lyophilisiert (Roche; #1000144)

Restriktionsenzyme (MBI Fermentas)

RNase A (Sigma; #R4875)

RNase-Inhibitor (MBI Fermentas; #EO0311)

SP6 RNA-Polymerase (MBI Fermentas; #EP0131)(MBI Fermentas; #EP0101)(MBI Fermentas; #EP0111)

Taq-Polymerase (MBI Fermentas; #EP0404)

T4 Ligase (MBI Fermentas; #EL0011)

T4 Polynucleotide Kinase (MBI Fermentas; #EK0031)

T3 RNA-Polymerase (MBI Fermentas; EP0101)

T7 RNA-Polymerase (MBI Fermentas; EP0111)

Plasmide

pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (Invitrogen; #4820-01)

pCRII-TOPO Dual Promoter (Invitrogen; #K4600-40)

pCR3.1 (Invitrogen; #K4900-1)

pECFP-N1 (Clontech; #6900-1)

pEGFP-C1 (Clontech; #6084-1)

pEYFP-N1 (Clontech; #6006-1)

pGEX 2TΔBamHI (besitzt gegenüber dem Ausgangsplasmid pGEX 2T von Pharmacia mehrere zusätzliche Restriktionsschnittstellen)

pGL3-Basic (Promega; #E1751)

pRL-TK (Promega; #E2241)

Zur Verfügung gestellte Plasmide und Zelllinien

mPtch-cDNA wurde freundlicherweise von PhD. Matthew P. Scott (Department of Developmental Biology, Howard Hughes Medical Institute, Beckman Center B300, Stanford Universität, School of Medicine, Stanford, CA 94305-5329, USA) zur Verfügung gestellt.

FLAG-Gli1 und FLAG-Gli1-zfd wurde freundlicherweise von PhD. Alexandra L. Joyner (Howard Hughes Medical Institute and Developmental Genetics Program, Skirball Institute of Biomolecular Medicine, Department of Cell Biology and Physiology and Neuroscience, New York University Medical School, New York, NY 10016, USA) erhalten.

Die RNA-Sonde für Shh wurde vom Institut für Experimentelle Genetik, GSF, hergestellt.

pGEX-ShhN_k, pGEX-ShhN_{comp} und pQE-ShhN_k wurden von Rainer Breitling im Rahmen seiner Diplomarbeit hergestellt (unveröffentlicht, 1998, GSF, Neuherberg) und mir freundlicherweise überlassen.

Die Ptch-k.o.- (p37^{-/-}) und entsprechende Ptch-Wildtyp-(p53^{+/+}) Zelllinien wurden von Dr. Heidi Hahn (Institut für Pathologie, GSF) hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Literaturverzeichnis

- Ahlgren, S. C. & Bronner-Fraser, M. (1999). Inhibition of sonic hedgehog signaling in vivo results in craniofacial neural crest cell death. *Curr Biol*, 9(22):1304–14.
- Alberti, S., Steffensen, K. R. & Gustafsson, J. A. (2000). Structural characterisation of the mouse nuclear oxysterol receptor genes LXRalpha and LXRbeta. *Gene*, 243(1-2):93–103.
- Alcedo, J. & Noll, M. (1997). Hedgehog and its patched-smoothened receptor complex: a novel signalling mechanism at the cell surface. *Biol Chem*, 378(7):583–90.
- Andersson, H. C., Frentz, J., Martinez, J. E., Tuck-Muller, C. M. & Bellizaire, J. (1999). Adrenal insufficiency in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet*, 82(5):382–4.
- Ares, M. P., Porn-Ares, M. I., Moses, S., Thyberg, J., Juntti-Berggren, L., Berggren, P., Hultgardh-Nilsson, A., Kallin, B. & Nilsson, J. (2000). 7beta-hydroxycholesterol induces Ca(2+) oscillations, MAP kinase activation and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 153(1):23–35.
- Artinger, K. B., Chitnis, A. B., Mercola, M. & Driever, W. (1999). Zebrafish narrowminded suggests a genetic link between formation of neural crest and primary sensory neurons. *Development*, 126(18):3969–79.
- Ashburner, M. (1998). Speculations on the subject of alcohol dehydrogenase and its properties in *Drosophila* and other flies. *Bioessays*, 20(11):949–54.
- Astruc, M. E. & Lahoua, Z. (1994). Potentiation by cholesterol and vitamin D3 oxygenated derivatives of arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis induced by the epidermal growth factor in NRK 49F cells: the role of protein kinase C. *Cell Signal*, 6(7):763–75.
- Atchaneeyasakul, L. O., Linck, L. M., Connor, W. E., Weleber, R. G. & Steiner, R. D. (1998). Eye findings in 8 children and a spontaneously aborted fetus with RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet*, 80(5):501–5.
- Aupeix, K., Toti, F., Satta, N., Bischoff, P. & Freyssinet, J. M. (1996). Oxysterols induce membrane procoagulant activity in monocytic THP-1 cells. *Biochem J*, 314(Pt 3):1027–33.
- Aupeix, K., Weltin, D., Mejia, J. E., Christ, M., Marchal, J., Freyssinet, J. M. & Bischoff, P. (1995). Oxysterol-induced apoptosis in human monocytic cell lines. *Immunobiology*, 194(4-5):415–28.
- Ayala-Torres, S., Zhou, F. & Thompson, E. B. (1999). Apoptosis induced by oxysterol in CEM cells is associated with negative regulation of c-myc. *Exp Cell Res*, 246(1):193–202.
- Baker, C. V. & Bronner-Fraser, M. (1997). The origins of the neural crest. Part I: embryonic induction. *Mech Dev*, 69(1-2):3–11.
- Baker, M. E. (1996). Unusual evolution of 11beta- and 17beta-hydroxysteroid and retinol dehydrogenases. *Bioessays*, 18(1):63–70.
- Baker, M. E. (1998). Evolution of mammalian 11beta- and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases-type 2 and retinol dehydrogenases from ancestors in *Caenorhabditis elegans* and evidence for horizontal transfer of a eukaryote dehydrogenase to *E. coli*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 66(5-6):355–63.

- Baker, M. E. (2001). Evolution of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases and their role in androgen, estrogen and retinoid action. *Mol Cell Endocrinol*, 171(1-2):211–5.
- Bakos, J. T., Johnson, B. H. & Thompson, E. B. (1993). Oxysterol-induced cell death in human leukemic T-cells correlates with oxysterol binding protein occupancy and is independent of glucocorticoid-induced apoptosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 46(4):415–26.
- Basch, M. L., Selleck, M. A. & Bronner-Fraser, M. (2000). Timing and competence of neural crest formation. *Dev Neurosci*, 22(3):217–27.
- Battaile, K. P., Battaile, B. C., Merkens, L. S., Maslen, C. L. & Steiner, R. D. (2001). Carrier frequency of the common mutation IVS8-1G>C in DHCR7 and estimate of the expected incidence of Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Mol Genet Metab*, 72(1):67–71.
- Beachy, P. A., Cooper, M. K., Young, K. E., von Kessler, D. P., Park, W. J., Hall, T. M., Leahy, D. J. & Porter, J. A. (1997). Multiple roles of cholesterol in hedgehog protein biogenesis and signaling. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 62:191–204.
- Belknap, W. M. & Dietschy, J. M. (1988). Sterol synthesis and low density lipoprotein clearance in vivo in the pregnant rat, placenta, and fetus. Sources for tissue cholesterol during fetal development. *J Clin Invest*, 82(6):2077–85.
- Bitgood, M. J., Shen, L. & McMahon, A. P. (1996). Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol*, 6(3):298–304.
- Blanchette-Mackie, E. J., Dwyer, N. K., Amende, L. M., Kruth, H. S., Butler, J. D., Sokol, J., Comly, M. E., Vanier, M. T., August, J. T., Brady, R. O. & et al. (1988). Type-C Niemann-Pick disease: low density lipoprotein uptake is associated with premature cholesterol accumulation in the Golgi complex and excessive cholesterol storage in lysosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(21):8022–6.
- Braverman, N., Lin, P., Moebius, F. F., Obie, C., Moser, A., Glossmann, H., Wilcox, W. R., Rimoin, D. L., Smith, M., Kratz, L., Kelley, R. I. & Valle, D. (1999). Mutations in the gene encoding 3 β -hydroxysteroid- Δ 8, Δ 7-isomerase cause X-linked dominant Conradi-Hunermann syndrome. *Nat Genet*, 22(3):291–4.
- Briscoe, J., Chen, Y., Jessell, T. M. & Struhl, G. (2001). A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Mol Cell*, 7(6):1279–91.
- Bromham, L., Rambaut, A., Fortey, R., Cooper, A. & Penny, D. (1998). Testing the Cambrian explosion hypothesis by using a molecular dating technique. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(21):12386–9.
- Bronner-Fraser, M. (1993). Mechanisms of neural crest cell migration. *Bioessays*, 15(4):221–30.
- Brown, A. J. & Jessup, W. (1999). Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 142(1):1–28.
- Brown, M. S. & Goldstein, J. L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, 89(3):331–40.
- Brown, M. S. & Goldstein, J. L. (1998). Sterol regulatory element binding proteins (SREBPs): controllers of lipid synthesis and cellular uptake. *Nutr Rev*, 56(2 Pt 2):S1–3; discussion S54–75.
- Bumcrot, D. A., Takada, R. & McMahon, A. P. (1995). Proteolytic processing yields two secreted forms of sonic hedgehog. *Mol Cell Biol*, 15(4):2294–303.
- Burke, R., Nellen, D., Bellotto, M., Hafen, E., Senti, K. A., Dickson, B. J. & Basler, K. (1999). Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell*, 99(7):803–15.

- Carpenter, D., Stone, D. M., Brush, J., Ryan, A., Armanini, M., Frantz, G., Rosenthal, A. & de Sauvage, F. J. (1998). Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(23):13630–4.
- Cavender, C. P., Turley, S. D. & Dietschy, J. M. (1995). Sterol metabolism in fetal, newborn, and suckled lambs and their response to cholesterol after weaning. *Am J Physiol*, 269(2 Pt 1):E331–40.
- Charrier, J. B., Lapointe, F., Douarin, N. M. & Teillet, M. A. (2001). Anti-apoptotic role of Sonic hedgehog protein at the early stages of nervous system organogenesis. *Development*, 128(20):4011–20.
- Chasalow, F. I., Blethen, S.L. & Taysi, K. (1985). Possible abnormalities of steroid secretion in children with Smith-Lemli-Opitz syndrome and their parents. *Steroids*, 46(4-5):827–43.
- Chen, J. K., Capdevila, J. & Harris, R. C. (2001). Cytochrome p450 epoxygenase metabolism of arachidonic acid inhibits apoptosis. *Mol Cell Biol*, 21(18):6322–31.
- Chen, Y. & Struhl, G. (1996). Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell*, 87(3):553–63.
- Chen, Y. & Struhl, G. (1998). In vivo evidence that Patched and Smoothed constitute distinct binding and transducing components of a Hedgehog receptor complex. *Development*, 125(24):4943–8.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H. & Beachy, P. A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature*, 383(6599):407–13.
- Chiang, C., Swan, R. Z., Grachtchouk, M., Bolinger, M., Litingtung, Y., Robertson, E. K., Cooper, M. K., Gaffield, W., Westphal, H., Beachy, P. A. & Dlugosz, A. A. (1999). Essential role for Sonic hedgehog during hair follicle morphogenesis. *Dev Biol*, 205(1):1–9.
- Chisholm, G. M., Ma, G., Irwin, K. C., Martin, L. L., Gunderson, K. G., Lindeberg, L. F., Morel, D. W. & Dicorleto, P. E. (1994). 7 β -Hydroperoxycholest-5-en-3 β ol, a component of human atherosclerotic lesions, is the primary cytotoxin of oxidized human low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:11452–11456.
- Chong, S., Montello, G. E., Zhang, A., Cantor, E. J., Liao, W., Xu, M. Q. & Benner, J. (1998). Utilizing the C-terminal cleavage activity of a protein splicing element to purify recombinant proteins in a single chromatographic step. *Nucleic Acids Res*, 26(22):5109–15.
- Christian, J. L. (2000). BMP, Wnt and Hedgehog signals: how far can they go? *Curr Opin Cell Biol*, 12(2):244–9.
- Chung, U. I., Schipani, E., McMahon, A. P. & Kronenberg, H. M. (2001). Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. *J Clin Invest*, 107(3):295–304.
- Chuong, C. M., Patel, N., Lin, J., Jung, H. S. & Widelitz, R. B. (2000). Sonic hedgehog signaling pathway in vertebrate epithelial appendage morphogenesis: perspectives in development and evolution. *Cell Mol Life Sci*, 57(12):1672–81.
- Clark, A. M., Garland, K. K. & Russell, L. D. (2000). Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biol Reprod*, 63(6):1825–38.
- Compagnone, N. A., Bulfone, A., Rubenstein, J. L. & Mellon, S. H. (1995). Expression of the steroidogenic enzyme P450scc in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis. *Endocrinology*, 136(6):2689–96.
- Conneely, O. M., Mulac-Jericevic, B., Lydon, J. P. & De Mayo, F. J. (2001). Reproductive functions of the progesterone receptor isoforms: lessons from knockout mice. *Mol Cell Endocrinol*, 179(1-2):97–103.

- Conway Morris, S. (2000). The Cambrian „explosion“: slow-fuse or megatonnage? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(9):4426–9.
- Cooper, M. K., Porter, J. A., Young, K. E. & Beachy, P. A. (1998). Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science*, 280(5369):1603–7.
- Couse, J. F. & Korach, K. S. (1999). Reproductive phenotypes in the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Ann Endocrinol (Paris)*, 60(2):143–8.
- Coventry, S., Kapur, R. P. & Siebert, J. R. (1998). Cyclopamine-induced holoprosencephaly and associated craniofacial malformations in the golden hamster: anatomic and molecular events. *Pediatr Dev Pathol*, 1(1):29–41.
- Cunniff, C., Kratz, L. E., Moser, A., Natowicz, M. R. & Kelley, R. I. (1997). Clinical and biochemical spectrum of patients with RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome and abnormal cholesterol metabolism. *Am J Med Genet*, 68(3):263–9.
- Dahmane, N. & Ruiz-i Altaba, A. (1999). Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development*, 126(14):3089–100.
- Dalfò, D., Canestro, C., Albalat, R. & González-Duarte, R. (2001). Characterization of a microsomal retinol dehydrogenase gene from amphioxus: retinoid metabolism before vertebrates. *Chem Biol Inter*, 130-132:359–370.
- Dassule, H. R., Lewis, P., Bei, M., Maas, R. & McMahon, A. P. (2000). Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development*, 127(22):4775–85.
- D’Avino, P. P. & Thummel, C. S. (2000). The ecdysone regulatory pathway controls wing morphogenesis and integrin expression during *Drosophila* metamorphosis. *Dev Biol*, 220(2):211–24.
- Delattre, M., Briand, S., Paces-Fessy, M. & Blanchet-Tournier, M. F. (1999). The Suppressor of fused gene, involved in Hedgehog signal transduction in *Drosophila*, is conserved in mammals. *Dev Genes Evol*, 209(5):294–300.
- Derry, J. M., Gormally, E., Means, G. D., Zhao, W., Meindl, A., Kelley, R. I., Boyd, Y. & Herman, G. E. (1999). Mutations in a delta 8-delta 7 sterol isomerase in the tattered mouse and X-linked dominant chondrodysplasia punctata. *Nat Genet*, 22(3):286–90.
- Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F. C., Schedl, A., Haller, H. & Kurzchalia, T. V. (2001). Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science*, 293(5539):2449–52.
- Dunn, M. K., Mercola, M. & Moore, D. D. (1995). Cyclopamine, a steroidal alkaloid, disrupts development of cranial neural crest cells in *Xenopus*. *Dev Dyn*, 202(3):255–70.
- Edwards, P. A. & Ericsson, J. (1998). Signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway: mechanisms of action and possible roles in human disease. *Curr Opin Lipidol*, 9(5):433–40.
- Eggenchwiler, J. T., Espinoza, E. & Anderson, K. V. (2001). Rab23 is an essential negative regulator of the mouse Sonic hedgehog signalling pathway. *Nature*, 412(6843):194–8.
- Ekker, S. C., Ungar, A. R., Greenstein, P., von Kessler, D. P., Porter, J. A., Moon, R. T. & Beachy, P. A. (1995). Patterning activities of vertebrate hedgehog proteins in the developing eye and brain. *Curr Biol*, 5(8):944–55.
- Escriva, H., Delaunay, F. & Laudet, V. (2000). Ligand binding and nuclear receptor evolution. *Bioessays*, 22(8):717–27.
- Escriva, H., Langlois, M. C., Mendonca, R. L., Pierce, R. & Laudet, V. (1998). Evolution and diversification of the nuclear receptor superfamily. *Ann N Y Acad Sci*, 839:143–6.
- Escriva, H., Safi, R., Hanni, C., Langlois, M. C., Saumitou-Laprade, P., Stehelin,

- D., Capron, A., Pierce, R. & Laudet, V. (1997). Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(13):6803–8.
- Farese, R. V. & Herz, J. (1998). Cholesterol metabolism and embryogenesis. *Trends Genet*, 14(3):115–20.
- Feng, D. F., Cho, G. & Doolittle, R. F. (1997). Determining divergence times with a protein clock: update and reevaluation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(24):13028–33.
- Fielding, C. J. & Fielding, P. E. (2001). Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol. *Adv Drug Deliv Rev*, 49(3):251–64.
- Fortey, R. (2001). Evolution. The Cambrian explosion exploded? *Science*, 293(5529):438–9.
- Gans, C. & Northcutt, R. G. (1983). Neural crest and the origin of vertebrates: a new head. *Science*, 220:268–274.
- Gaoua, W., Wolf, C., Chevy, F., Ilien, F. & Roux, C. (2000). Cholesterol deficit but not accumulation of aberrant sterols is the major cause of the teratogenic activity in the Smith-Lemli-Opitz syndrome animal model. *J Lipid Res*, 41(4):637–46.
- Garcia-Mata, R., Bebok, Z., Sorscher, E. J. & Sztul, E. S. (1999). Characterization and dynamics of aggregates formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol*, 146(6):1239–54.
- Gates, J. & Thummel, C. S. (2000). An enhancer trap screen for ecdysone-inducible genes required for *Drosophila* adult leg morphogenesis. *Genetics*, 156(4):1765–76.
- Gawantka, V., Pollet, N., Delius, H., Vingron, M., Pfister, R., Nitsch, R., Blumenstock, C. & Niehrs, C. (1998). Gene expression screening in *Xenopus* identifies molecular pathways, predicts gene function and provides a global view of embryonic patterning. *Mech Dev*, 77(2):95–141.
- Gofflot, F., Kolf-Clauw, M., Clotman, F., Roux, C. & Picard, J. J. (1999). Absence of ventral cell populations in the developing brain in a rat model of the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet*, 87(3):207–16.
- Gritli-Linde, A., Lewis, P., McMahon, A. P. & Linde, A. (2001). The whereabouts of a morphogen: direct evidence for short- and graded long-range activity of hedgehog signaling peptides. *Dev Biol*, 236(2):364–86.
- Hall, T. M., Porter, J. A., Beachy, P. A. & Leahy, D. J. (1995). A potential catalytic site revealed by the 1.7-Å crystal structure of the amino-terminal signaling domain of Sonic hedgehog. *Nature*, 378(6553):212–6.
- Hall, T. M., Porter, J. A., Young, K. E., Koonin, E. V., Beachy, P. A. & Leahy, D. J. (1997). Crystal structure of a Hedgehog autoprocessing domain: homology between Hedgehog and self-splicing proteins. *Cell*, 91(1):85–97.
- Hanaka, S., Abe, T., Itakura, H. & Matsumoto, A. (2000). Gene expression related to cholesterol metabolism in mouse brain during development. *Brain Dev*, 22(5):321–6.
- Happle, R., Koch, H. & Lenz, W. (1980). The CHILD syndrome. Congenital hemidysplasia with ichthyosiform erythroderma and limb defects. *Eur J Pediatr*, 134(1):27–33.
- Herman, G. E. (2000). X-Linked dominant disorders of cholesterol biosynthesis in man and mouse. *Biochim Biophys Acta*, 1529(1-3):357–73.
- Herz, J. & Farese, R. V. (1999). The LDL receptor gene family, apolipoprotein B and cholesterol in embryonic development. *J Nutr*, 129(2S Suppl):473S–475S.
- Hong, H., Yang, L. & Stallcup, M. R. (1999). Hormone-independent transcriptional activation and coactivator binding by novel orphan nuclear receptor ERR3. *J Biol Chem*, 274(32):22618–26.

- Hua, X., Nohturfft, A., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. (1996). Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein. *Cell*, 87(3):415–26.
- Ikonen, E. & Parton, R. G. (2000). Caveolins and cellular cholesterol balance. *Traffic*, 1(3):212–7.
- Incardona, J. P., Gaffield, W., Kapur, R. P. & Roelink, H. (1998). The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development*, 125(18):3553–62.
- Incardona, J. P., Lee, J. H., Robertson, C. P., Enga, K., Kapur, R. P. & Roelink, H. (2000). Receptor-mediated endocytosis of soluble and membrane-tethered Sonic hedgehog by Patched-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(22):12044–9.
- Incardona, J. P. & Roelink, H. (2000). The role of cholesterol in Shh signaling and teratogen-induced holoprosencephaly. *Cell Mol Life Sci*, 57(12):1709–19.
- Ioannou, Y. A. (2000). The structure and function of the Niemann-Pick C1 protein. *Mol Genet Metab*, 71(1-2):175–81.
- Irons, M., Elias, E. R., Salen, G., Tint, G. S. & Batta, A. K. (1993). Defective cholesterol biosynthesis in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Lancet*, 341:1414.
- Iwasaki, M., Le, A. X. & Helms, J. A. (1997). Expression of indian hedgehog, bone morphogenetic protein 6 and gli during skeletal morphogenesis. *Mech Dev*, 69(1-2):197–202.
- Jacobson, M. D., Weil, M. & Raff, M. C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88(3):347–54.
- Jang, I. H., Kim, J. H., Lee, B. D., Bae, S. S., Park, M. H., Suh, P. G. & Ryu, S. H. (2001). Localization of phospholipase C-gamma1 signaling in caveolae: importance in EGF-induced phosphoinositide hydrolysis but not in tyrosine phosphorylation. *FEBS Lett*, 491(1-2):4–8.
- Janowski, B. A., Willy, P. J., Devi, T. R., Falck, J. R. & Mangelsdorf, D. J. (1996). An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature*, 383(6602):728–31.
- Johnson, R. L., Riddle, R. D., Laufer, E. & Tabin, C. (1994). Sonic hedgehog: a key mediator of anterior-posterior patterning of the limb and dorso-ventral patterning of axial embryonic structures. *Biochem Soc Trans*, 22(3):569–74.
- Jurevics, H. A., Kidwai, F. Z. & Morell, P. (1997). Sources of cholesterol during development of the rat fetus and fetal organs. *J Lipid Res*, 38(4):723–33.
- Karp, S. J., Schipani, E., St-Jacques, B., Hunzelman, J., Kronenberg, H. & McMahon, A. P. (2000). Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent pathways. *Development*, 127(3):543–8.
- Karpen, H. J., Bukowski, J., Daehne, J. & Gailani, M. R. (2000). Mutations in the tumor suppressor gene Patched alter normal protein trafficking. *Keystone*.
- Karpen, H. E. and Bukowski, J. T., Hughes, T., Gratton, J. P., Sessa, W. C. & Gailani, M. R. (2001). The sonic hedgehog receptor patched associates with caveolin-1 in cholesterol-rich microdomains of the plasma membrane. *J Biol Chem*, 276(22):19503–11.
- Katsuura, M., Hosono-Sakuma, Y., Wagatsuma, M., Yanagisawa, S., Okazaki, M. & Kimura, M. (1999). The NH2-terminal region of the active domain of sonic hedgehog is necessary for its signal transduction. *FEBS Lett*, 447(2-3):325–8.
- Kaufman, M. H. & Bard, J. B. L. (1999). *The anatomical basis of mouse development*. ISBN: 0124020607. Academic Press, 1. Ausg.
- Keeney, D. S., Ikeda, Y., Waterman, M. R. & Parker, K. L. (1995). Cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 gene expression in the primitive gut of

- the mouse embryo does not require steroidogenic factor 1. *Mol Endocrinol*, 9(8):1091–8.
- Kelley, R. I. (2000). Inborn errors of cholesterol biosynthesis. *Adv Pediatr*, 47:1–53.
- Kelley, R. I. & Hennekam, R. C. (2000). The Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Med Genet*, 37(5):321–35.
- Kiess, W. & Gallaher, B. (1998). Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol*, 138(5):482–91.
- Kim, S. K. & Melton, D. A. (1998). Pancreas development is promoted by cyclopamine, a hedgehog signaling inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(22):13036–41.
- Kohtz, J. D., Lee, H. Y., Gaiano, N., Segal, J., Ng, E., Larson, T., Baker, D. P., Garber, E. A., Williams, K. P. & Fishell, G. (2001). N-terminal fatty-acylation of sonic hedgehog enhances the induction of rodent ventral forebrain neurons. *Development*, 128(12):2351–63.
- Kolf-Clauw, M., Chevy, F. & Ponsart, C. (1998). Abnormal cholesterol biosynthesis as in Smith-Lemli-Opitz syndrome disrupts normal skeletal development in the rat. *J Lab Clin Med*, 131(3):222–7.
- Kolf-Clauw, M., Chevy, F., Siliart, B., Wolf, C., Mulliez, N. & Roux, C. (1997). Cholesterol biosynthesis inhibited by BM15.766 induces holoprosencephaly in the rat. *Teratology*, 56(3):188–200.
- König, A., Happel, R., Bornholdt, D., Engel, H. & Grzeschik, K. H. (2000). Mutations in the NSDHL gene, encoding a 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, cause CHILD syndrome. *Am J Med Genet*, 90(4):339–46.
- Korach, K. S. (1994). Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science*, 266(5190):1524–7.
- Krakowiak, P. A., Nwokoro, N. A., Wasif, C. A., Battaile, K. P., Nowaczyk, M. J., Connor, W. E., Maslen, C., Steiner, R. D. & Porter, F. D. (2000). Mutation analysis and description of sixteen RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome patients: polymerase chain reaction-based assays to simplify genotyping. *Am J Med Genet*, 94(3):214–27.
- Kumar, S. & Hedges, S. B. (1998). A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature*, 392(6679):917–20.
- Lagace, T. A., Byers, D. M., Cook, H. W. & Ridgway, N. D. (1999). Chinese hamster ovary cells overexpressing the oxysterol binding protein (OSBP) display enhanced synthesis of sphingomyelin in response to 25-hydroxycholesterol. *J Lipid Res*, 40(1):109–16.
- Lange, Y. & Steck, T. L. (1998). Four cholesterol-sensing proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 8(4):435–9.
- Lanoue, L., Dehart, D. B., Hinsdale, M. E., Maeda, N., Tint, G. S. & Sulik, K. K. (1997). Limb, genital, CNS, and facial malformations result from gene/environment-induced cholesterol deficiency: further evidence for a link to sonic hedgehog. *Am J Med Genet*, 73(1):24–31.
- Laudet, V. (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *Mol Endo*, 19:207–226.
- Lee, C. Y. & Baehrecke, E. H. (2001). Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. *Development*, 128(8):1443–55.
- Lee, J. D. & Treisman, J. E. (2001). Sightless has homology to transmembrane acyltransferases and is required to generate active Hedgehog protein. *Curr Biol*, 11(14):1147–52.
- Lewis, P. M., Dunn, M. P., McMahon, J. A., Logan, M., Martin, J. F., St-Jacques, B. & 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(5):599–612.
- Litingtung, Y. & Chiang, C. (2000). Control of Shh activity and signaling in the neural tube. *Dev Dyn*, 219(2):143–54.

- Litingtung, Y., Lei, L., Westphal, H. & Chiang, C. (1998). Sonic hedgehog is essential to foregut development. *Nat Genet*, 20(1):58–61.
- Liu, X. Y., Dangel, A. W., Kelley, R. I., Zhao, W., Denny, P., Botcherby, M., Cattanaach, B., Peters, J., Hunsicker, P. R., Mallon, A. M., Strivens, M. A., Bate, R., Miller, W., Rhodes, M., Brown, S. D. & Herman, G. E. (1999). The gene mutated in bare patches and striated mice encodes a novel 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Nat Genet*, 22(2):182–7.
- Llirbat, B., Wolf, C., Chevy, F., Citadelle, D., Bereziat, G. & Roux, C. (1997). Normal and inhibited cholesterol synthesis in the cultured rat embryo. *J Lipid Res*, 38(1):22–34.
- Lopez-Martinez, A., Chang, D. T., Chiang, C., Porter, J. A., Ros, M. A., Simandl, B. K., Beachy, P. A. & Fallon, J. F. (1995). Limb-patterning activity and restricted posterior localization of the amino-terminal product of Sonic hedgehog cleavage. *Curr Biol*, 5(7):791–6.
- Lu, T. T., Repa, J. J. & Mangelsdorf, D. J. (2001). Orphan nuclear receptors as eLiXiRs and FiXeRs of sterol metabolism. *J Biol Chem*.
- Luo, L., Chen, H. & Zirkin, B. R. (2001). Leydig cell aging: steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and cholesterol side-chain cleavage enzyme. *J Androl*, 22(1):149–56.
- Malayer, J. R. & Gorski, J. (1993). An integrated model of estrogen receptor action. *Domest Anim Endocrinol*, 10(3):159–77.
- Martin, V., Carrillo, G., Torroja, C. & Guerrero, I. (2001). The sterol-sensing domain of Patched protein seems to control Smoothed activity through Patched vesicular trafficking. *Curr Biol*, 11(8):601–7.
- Merino, R., Ganán, Y., Macías, D., Rodríguez-León, J. & Hurlé, J. M. (1999). Bone morphogenetic proteins regulate interdigital cell death in the avian embryo. *Ann N Y Acad Sci*, 887:120–32.
- Milenkovic, L., Goodrich, L. V., Higgins, K. M. & Scott, M. P. (1999). Mouse patched1 controls body size determination and limb patterning. *Development*, 126(20):4431–40.
- Miller, W. L. (1998). Steroid hormone biosynthesis and actions in the materno-feto-placental unit. *Clin Perinatol*, 25(4):799–817, v.
- Moebius, F. F., Reiter, R. J., Hanner, M. & Glossmann, H. (1997). High affinity of sigma 1-binding sites for sterol isomerization inhibitors: evidence for a pharmacological relationship with the yeast sterol C8-C7 isomerase. *Br J Pharmacol*, 121(1):1–6.
- Morris, S. C. (2000). Nipping the Cambrian explosion in the bud? *Bioessays*, 22(12):1053–6.
- Motoyama, J., Heng, H., Crackower, M. A., Takabatake, T., Takeshima, K., Tsui, L. C. & Hui, C. (1998). Overlapping and non-overlapping Ptch2 expression with Shh during mouse embryogenesis. *Mech Dev*, 78(1-2):81–4.
- Mukherjee, S., Zha, X., Tabas, I. & Maxfield, F. R. (1998). Cholesterol distribution in living cells: fluorescence imaging using dehydroergosterol as a fluorescent cholesterol analog. *Biophys J*, 75(4):1915–25.
- Murone, M., Rosenthal, A. & de Sauvage, F. J. (1999). Sonic hedgehog signaling by the patched-smoothed receptor complex. *Curr Biol*, 9(2):76–84.
- Niehrs, C. & Pollet, N. (1999). Synexpression groups in eukaryotes. *Nature*, 402(6761):483–7.
- Nikoh, N., Iwabe, N., Kuma, K., Ohno, M., Sugiyama, T., Watanabe, Y., Yasui, K., Shi-cui, Z., Hori, K., Shimura, Y. & Miyata, T. (1997). An estimate of divergence time of Parazoa and Eumetazoa and that of Cephalochordata and Vertebrata by aldolase and triose phosphate isomerase clocks. *J Mol Evol*, 45(1):97–106.
- Nishio, E. & Watanabe, Y. (1996). Oxysterols induced apoptosis in cultured smooth

- muscle cells through CPP32 protease activation and bcl-2 protein downregulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 226(3):928–34.
- Nohturfft, A., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. (1998). Topology of SREBP cleavage-activating protein, a polytopic membrane protein with a sterol-sensing domain. *J Biol Chem*, 273(27):17243–50.
- Northcutt, R. G. (1996). The Agnathan ark: the origin of craniate brains. *Brain Behav Evol*, 48(5):237–47.
- Northcutt, R. G. & Gans, C. (1983). The genesis of neural crest and epidermal placodes: a reinterpretation of vertebrate origins. *Q Rev Biol*, 58(1):1–28.
- Nowaczyk, M. J., Nakamura, L. M., Eng, B., Porter, F. D. & Waye, J. S. (2001). Frequency and ethnic distribution of the common DHCR7 mutation in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet*, 102(4):383–6.
- Nüsslein-Volhard, C & Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, 287:795–801.
- O'Callaghan, Y. C., Woods, J. A. & O'Brien, N. M. (2001). Comparative study of the cytotoxicity and apoptosis-inducing potential of commonly occurring oxysterols. *Cell Biol Toxicol*, 17(2):127–37.
- Oppenheim, R. W., Homma, S., Marti, E., Prevette, D., Wang, S., Yaginuma, H. & McMahon, A. P. (1999). Modulation of early but not later stages of programmed cell death in embryonic avian spinal cord by sonic hedgehog. *Mol Cell Neurosci*, 13(5):348–61.
- Osborne, T. F. (1997). Cholesterol homeostasis: clipping out a slippery regulator. *Curr Biol*, 7(3):R172–4.
- Osborne, T. F. & Rosenfeld, J. M. (1998). Related membrane domains in proteins of sterol sensing and cell signaling provide a glimpse of treasures still buried within the dynamic realm of intracellular metabolic regulation. *Curr Opin Lipidol*, 9(2):137–40.
- Panini, S. R. & Sinensky, M. S. (2001). Mechanisms of oxysterol-induced apoptosis. *Curr Opin Lipidol*, 12(5):529–33.
- Park, H. L., Bai, C., Platt, K. A., Matisse, M. P., Beeghly, A., Hui, C. C., Nakashima, M. & Joyner, A. L. (2000). Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development*, 127(8):1593–605.
- Parmantier, E., Lynn, B., Lawson, D., Turmaine, M., Namini, S. S., Chakrabarti, L., McMahon, A. P., Jessen, K. R. & Mirsky, R. (1999). Schwann cell-derived Desert hedgehog controls the development of peripheral nerve sheaths. *Neuron*, 23(4):713–24.
- Peet, D. J., Janowski, B. A. & Mangelsdorf, D. J. (1998). The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr Opin Genet Dev*, 8(5):571–5.
- Pepicelli, C. V., Lewis, P. M. & McMahon, A. P. (1998). Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Curr Biol*, 8(19):1083–6.
- Pepinsky, R. B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D. P., Williams, K. P., Bixler, S. A., Ambrose, C. M., Garber, E. A., Miatkowski, K., Taylor, F. R., Wang, E. A. & Galdes, A. (1998). Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J Biol Chem*, 273(22):14037–45.
- Pissios, P., Tzamelis, I. & Moore, D. D. (2001). New insights into receptor ligand binding domains from a novel assembly assay. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 76(1-5):3–7.
- Pollack, S. E., Furth, E. E., Kallen, C. B., Arakane, F., Kiriakidou, M., Kozarsky, K. F. & Strauss, J. F., 3rd (1997). Localization of the steroidogenic acute regulatory protein in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, 82(12):4243–51.
- Pons, S. & Marti, E. (2000). Sonic hedgehog synergizes with the extracellular matrix protein vitronectin to induce spinal motor neuron differentiation. *Development*, 127(2):333–42.

- Pons, S., Trejo, J. L., Martinez-Morales, J. R. & Marti, E. (2001). Vitronectin regulates Sonic hedgehog activity during cerebellum development through CREB phosphorylation. *Development*, 128(9):1481–92.
- Porter, J. A., Young, K. E. & Beachy, P. A. (1996). Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science*, 274(5285):255–9.
- Ravi, R., Bedi, G. C., Engstrom, L. W., Zeng, Q., Mookerjee, B., Gelinas, C., Fuchs, E. J. & Bedi, A. (2001). Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB. *Nat Cell Biol*, 3(4):409–16.
- Ridgway, N. D., Lagace, T. A., Cook, H. W. & Byers, D. M. (1998). Differential effects of sphingomyelin hydrolysis and cholesterol transport on oxysterol-binding protein phosphorylation and Golgi localization. *J Biol Chem*, 273(47):31621–8.
- Roelink, H., Porter, J. A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D. T., Beachy, P. A. & Jessell, T. M. (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell*, 81(3):445–55.
- Roessler, E., Belloni, E., Gaudenz, K., Vargas, F., Scherer, S. W., Tsui, L. C. & Muenke, M. (1997). Mutations in the C-terminal domain of Sonic Hedgehog cause holoprosencephaly. *Hum Mol Genet*, 6(11):1847–53.
- Rosen, B. & Beddington, R. (1994). Detection of mRNA in whole mounts of mouse embryos using digoxigenin riboprobes. *Methods Mol Biol*, 28:201–8.
- Roy, S., Luetterforst, R., Harding, A., Apolloni, A., Etheridge, M., Stang, E., Rolls, B., Hancock, J. F. & Parton, R. G. (1999). Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting. *Nat Cell Biol*, 1(2):98–105.
- Saeki, K., Katsuura, M., Yanagisawa, S., Suzuki, R., Okazaki, M. & Kimura, M. (2000). Inactivation of N-terminal signaling domain of Sonic hedgehog by forming a disulfide bond. *Biochim Biophys Acta*, 1476(2):219–29.
- Sanz-Ezquerro, J. J. & 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(22):4811–23.
- Sasaki, H., Hui, C., Nakafuku, M. & Kondoh, H. (1997). A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development*, 124(7):1313–22.
- Saxen, L., Sariola, H. & Lehtonen, E. (1986). Sequential cell and tissue interactions governing organogenesis of the kidney. *Anat Embryol (Berl)*, 175(1):1–6.
- Scheiffele, P., Verkade, P., Fra, A. M., Virta, H., Simons, K. & Ikonen, E. (1998). Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells. *J Cell Biol*, 140(4):795–806.
- Schlegel, A., Volonte, D., Engelman, J. A., Galbiati, F., Mehta, P., Zhang, X. L., Scherer, P. E. & Lisanti, M. P. (1998). Crowded little caves: structure and function of caveolae. *Cell Signal*, 10(7):457–63.
- Schroepfer, G. J., Jr. (2000). Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev*, 80(1):361–554.
- Sevanian, A., Berliner, J. & Peterson, H. (1991). Uptake, metabolism, and cytotoxicity of isomeric cholesterol-5,6-epoxides in rabbit aortic endothelium cells. *J Lipid Res*, 32:147–155.
- Shimada, H., Imada, T., Kikuchi, T., Inada, Y., Morisaki, M., Ikekawa, N. & Saito, Y. (1984). Rapid modulation of platelet aggregation in plasma by oxygenated sterols. *J Appl Biochem*, 6(3):151–5.
- Shimeld, S. M. & Holland, W. H. (2000). Vertebrate innovations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(9):4449–52.

- Smith, D. W., Lemli, L. & Opitz, J. A. (1964). A newly recognized syndrome of multiple congenital anomalies. *J Pediatr*, 64:210–217.
- Sporle, R. & Schughart, K. (1997). System to identify individual somites and their derivatives in the developing mouse embryo. *Dev Dyn*, 210(3):216–26.
- Steiner, S., Gatlin, C. L., Lennon, J. J., McGrath, A. M., Aponte, A. M., Makusky, A. J., Rohrs, M. C. & Anderson, N. L. (2000). Proteomics to display lovastatin-induced protein and pathway regulation in rat liver. *Electrophoresis*, 21(11):2129–37.
- Steiner, S., Gatlin, C. L., Lennon, J. J., McGrath, A. M., Seonarain, M. D., Makusky, A. J., Aponte, A. M., Esquer-Blasco, R. & Anderson, N. L. (2001). Cholesterol biosynthesis regulation and protein changes in rat liver following treatment with fluvastatin. *Toxicol Lett*, 120(1-3):369–77.
- Stone, D. M., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T. A., Gu, Q., Johnson, R. L., Scott, M. P., Pennica, D., Goddard, A., Phillips, H., Noll, M., Hooper, J. E., de Sauvage, F. & Rosenthal, A. (1996). The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature*, 384(6605):129–34.
- Strigini, M. & Cohen, S. M. (1997). A Hedgehog activity gradient contributes to AP axial patterning of the Drosophila wing. *Development*, 124(22):4697–705.
- Strimmer, K. & von Haeseler, A. (1997). Likelihood-mapping: a simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(13):6815–9.
- Strutt, H., Thomas, C., Nakano, Y., Stark, D., Neave, B., Taylor, A. M. & Ingham, P. W. (2001). Mutations in the sterol-sensing domain of Patched suggest a role for vesicular trafficking in Smoothed regulation. *Curr Biol*, 11(8):608–13.
- Taipale, J., Chen, J. K., Cooper, M. K., Wang, B., Mann, R. K., Milenkovic, L., Scott, M. P. & Beachy, P. A. (2000). Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature*, 406(6799):1005–9.
- Taylor, F. R., Wen, D., Garber, E. A., Carmililo, A. N., Baker, D. P., Arduini, R. M., Williams, K. P., Weinreb, P. H., Rayhorn, P., Hronowski, X., Whitty, A., Day, E. S., Boriack-Sjodin, A., Shapiro, R. I., Galdes, A. & Pepinsky, R. B. (2001). Enhanced potency of human Sonic hedgehog by hydrophobic modification. *Biochemistry*, 40(14):4359–71.
- The, I., Bellaiche, Y. & Perrimon, N. (1999). Hedgehog movement is regulated through tout velu-dependent synthesis of a heparan sulfate proteoglycan. *Mol Cell*, 4(4):633–9.
- Thi, A. D., Jung-Testas, I. & Baulieu, E. E. (1998). Neuronal signals are required for estrogen-mediated induction of progesterone receptor in cultured rat Schwann cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 67(3):201–11.
- Thompson, E. B. & Ayala-Torres, S. (1999). Oxysterols and apoptosis: evidence for gene regulation outside the cholesterol pathway. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 34(1):25–32.
- Thornton, J. W. (2001). Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(10):5671–5676.
- Thummel, C. S. (2001). Steroid-triggered death by autophagy. *Bioessays*, 23(8):677–82.
- Tint, G. S. (1993). Cholesterol defect in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet*, 47(4):573–4.
- Tint, G. S., Salen, G., Batta, A. K., Shefer, S., Irons, M., Elias, E. R., Abuelo, D. N., Johnson, V. P., Lambert, M., Lutz, R. & et al. (1995). Correlation of severity and outcome with plasma sterol levels in variants of the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Pediatr*, 127(1):82–7.
- Treier, M., O'Connell, S., Gleiberman, A., Price, J., Szeto, D. P., Burgess, R.,

- Chuang, P. T., McMahon, A. P. & Rosenfeld, M. G. (2001). Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. *Development*, 128(3):377–86.
- Turley, S. D., Burns, D. K. & Dietschy, J. M. (1998). Preferential utilization of newly synthesized cholesterol for brain growth in neonatal lambs. *Am J Physiol*, 274(6 Pt 1):E1099–105.
- Turley, S. D., Burns, D. K., Rosenfeld, C. R. & Dietschy, J. M. (1996). Brain does not utilize low density lipoprotein-cholesterol during fetal and neonatal development in the sheep. *J Lipid Res*, 37(9):1953–61.
- Wallis, M. (1997). Function switching as a basis for bursts of rapid change during the evolution of pituitary growth hormone. *J Mol Evol*, 44(5):348–50.
- Wallis, M. (2001). Episodic evolution of protein hormones in mammals. *J Mol Evol*, 53(1):10–18.
- Warren, J. T. & Gilbert, L. I. (1996). Metabolism in vitro of cholesterol and 25-hydroxycholesterol by the larval prothoracic glands of *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol*, 26(8-9):917–29.
- Wassif, C. A., Maslen, C., Kachilele-Linjewile, S., Lin, D., Linck, L. M., Connor, W. E., Steiner, R. D. & Porter, F. D. (1998). Mutations in the human sterol delta7-reductase gene at 11q12-13 cause Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Hum Genet*, 63(1):55–62.
- Wassif, C. A., Zhu, P., Kratz, L., Krakowiak, P. A., Battaile, K. P., Weight, F. F., Grinberg, A., Steiner, R. D., Nwokoro, N. A., Kelley, R. I., Stewart, R. R. & Porter, F. D. (2001). Biochemical, phenotypic and neurophysiological characterization of a genetic mouse model of RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Hum Mol Genet*, 10(6):555–64.
- Williams, K. P., Rayhorn, P., Chi-Rosso, G., Garber, E. A., Strauch, K. L., Horan, G. S., Reilly, J. O., Baker, D. P., Taylor, F. R., Koteliensky, V. & Pepinsky, R. B. (1999). Functional antagonists of sonic hedgehog reveal the importance of the N terminus for activity. *J Cell Sci*, 112(Pt 23):4405–14.
- Willnow, T. E., Hilpert, J., Armstrong, S. A., Rohlmann, A., Hammer, R. E., Burns, D. K. & Herz, J. (1996). Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(16):8460–4.
- Witsch-Baumgartner, M., Fitzky, B. U., Ogorlkova, M., Kraft, H. G., Moebius, F. F., Glossmann, H., Seedorf, U., Gillessen-Kaesbach, G., Hoffmann, G. F., Clayton, P., Kelley, R. I. & Utermann, G. (2000). Mutational spectrum in the Delta7-sterol reductase gene and genotype-phenotype correlation in 84 patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Hum Genet*, 66(2):402–12.
- Woollett, L. A. (1996). Origin of cholesterol in the fetal golden Syrian hamster: contribution of de novo sterol synthesis and maternal-derived lipoprotein cholesterol. *J Lipid Res*, 37(6):1246–57.
- Woollett, L. A. (2001). Fetal lipid metabolism. *Front Biosci*, 6:D536–45.
- Xiang, T. X., Chen, J. & Anderson, B. D. (2000). A quantitative model for the dependence of solute permeability on peptide and cholesterol content in biomembranes. *J Membr Biol*, 177(2):137–48.
- Xu, Y., Liu, Y., Ridgway, N. D. & McMaster, C. R. (2001). Novel members of the human oxysterol-binding protein family bind phospholipids and regulate vesicle transport. *J Biol Chem*, 276(21):18407–14.
- Yeagle, P. L. (1985). Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta*, 822(3-4):267–87.
- Yeagle, P. L. (1989). Lipid regulation of cell membrane structure and function. *FASEB J*, 3(7):1833–42.
- Yoshida, Y., Arimoto, K., Sato, M., Sakuragawa, N., Arima, M. & Satoyoshi, E. (1985). Reduction of acid sphingomyelinase activity in human fibroblasts induced by AY-9944 and other cationic amphiphilic drugs. *J Biochem (Tokyo)*, 98(6):1669–79.

- Zaphiropoulos, P. G., Uden, A. B., Rahnama, F., Hollingsworth, R. E. & Toftgard, R. (1999). PTCH2, a novel human patched gene, undergoing alternative splicing and up-regulated in basal cell carcinomas. *Cancer Res*, 59(4):787–92.
- Zeng, X., Goetz, J. A., Suber, L. M., Scott, W. J., Jr., Schreiner, C. M. & Robbins, D. J. (2001). A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. *Nature*, 411(6838):716–20.
- Zhang, X. M. & Yang, X. J. (2001). Regulation of retinal ganglion cell production by Sonic hedgehog. *Development*, 128(6):943–57.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schema der Cholesterin-Biosynthese	17
1.2	Shh-Autoprozessierungsreaktion	24
1.3	Shh-Signaltransduktion	27
2.1	Expression von Cholesterinbiosynthese-Enzymen an Tag 11	30
2.2	Sense-Sonden	31
2.3	Expression von <i>Idi1</i>	32
2.4	Expression an Tag 8	32
2.5	Details der Expressionsdomänen	33
2.6	Hmgcr-Expression in den Spinalganglien	33
2.7	Hmgcr-Expression während der Gliedmaßenentwicklung	34
2.8	Expressionsdomänen im Neuralrohr	35
2.9	Hmgcr-Expression in der Gesichtsregion um Tag 13,5	36
2.10	Expression von <i>P450scc</i> und <i>Hsd17b1</i>	37
2.11	Steroidhormon-Synthese	39
2.12	Maximum-Likelihood-Mapping	40
2.13	Ermittlung der Stellung des <i>Lymnaea</i> -Enzyms	42
2.14	<i>Parsimony</i> - <i>P450scc</i> -Familie	44
2.15	<i>Neighbour-Joining</i> – 17α -Hydroxylase/ $17,20$ -Lyase-Familie	45
2.16	<i>Neighbour-Joining</i> – 17β Hydroxysteroiddehydrogenase-Familie	48
2.17	<i>Parsimony</i> – 3β -Hydroxysteroiddehydrogenase-Familie	49
2.18	<i>Neighbour-Joining</i> – Nukleäre Rezeptoren	51
2.19	Zusammenfassender Stammbaum	54
2.20	Berechnung der Divergenzzeiten einiger Phyla	55
2.21	Klonierungsstrategie für den Luciferase-Reporter	57
2.22	Konzentrationsabhängige Aktivierung der Luciferase-Reporter	58
2.23	Spezifische Aktivierung der Luciferasereporter durch <i>Gli1</i>	59
2.24	Aktivierung/Inhibierung von $p11xGli1$ -BS durch <i>ShhN</i> / <i>Ptch</i>	61
2.25	Vergleich der <i>Gli1</i> -Aktivitäten von <i>wt</i> - und <i>k.o.</i> -Zellen	61
2.26	Intrazelluläre Lokalisation von <i>Ptch</i> -GFP	63
2.27	Intrazelluläre Lokalisation von <i>ShhN</i> -YFP	64
2.28	Fluoreszenzkonstrukt	65
2.29	Homodimerisierung von <i>ShhN</i> – <i>crosslinking</i>	67
2.30	Bestimmung der Dimerisierungsrate von <i>ShhN</i> – Gelfiltration	68
2.31	Dimerisierung in Gegenwart von Inhibitoren – SPR	70
3.1	Zusammenfassung der Expressionsdomänen	74
3.2	Kambrium-Explosion und Entstehung der Vertebraten	81
3.3	Auftreten von Hormonen in der Evolution	85
3.4	Modell der <i>Shh</i> -Signaltransduktion	93
4.1	Konfokalmikroskop	106
4.2	SPR - Prinzip	107

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1.1	Phänotypischer Vergleich der Cholesterinbiosynthese-Mutanten	21
3.1	Proteine mit <i>Sterol-sensing</i> Domänen	90
5.1	Eigene Konstrukte	131
5.2	Oligonukleotide	132
5.3	RNA-Sonden	132
5.4	PCR- und Sequenzierprimer	133
5.5	In der Analyse der 3β -Hydroxysteroiddehydrogenase-Familie verwendete Proteine	134
5.6	In der Analyse der P450 _{scc} -Familie verwendete Proteine	135
5.7	In der Analyse der 17β -HSDs verwendete Proteine	136
5.8	In der Analyse der Familie der Kernrezeptoren verwendete Proteine	137

Tabellenverzeichnis

5 Anhang

5.1 Primer, Sonden und Konstrukte

Tabelle 5.1: Im Rahmen der Doktorarbeit konstruierte Plasmide

Name	Plasmid	Primer-Nr.	Schnittstellen
mPtcFL	pCR3.1	23666;23316	—
GFP-mPtc	pEGFP	20263;20264	HindIII;SacII
ShhN-YFP	pEYFP	30717;32212	EcoRI;SalI
ShhC-CFP+ATP	pECFP	32211;30720	EcoRI;SalI
ShhFL	pcDNA3	28925;30720	HindIII;SalI
ShhN	pcDNA3	28925;28926	HindIII;BamHI
mPtc-GFP	pcDNA3.1	23666;23316	—
NYFPCCFP	pEYFP; pECFP	30715;30716	NheI;SacI
pGL-TK	pGL3-basic	—	BglII;HindIII
3xGliBS	pGL3-TK	—	BamHI;BglII
6xGliBS	pGL3-TK	—	BamHI;BglII
11xGliBS	pGL3-TK	—	BamHI;BglII

5 Anhang

Tabelle 5.2: Oligonukleotide

Name	Nummer	Sequenz 5'-3'
p3xGli1-BSfor	23306	GAT CCT CGA CAA GCA GGG AAC ACC CAA GTA GAA GCT CTC GAC AAG CAG GGA ACA CCC AAG TAG AAG CTC TCG ACA AGC AGG GAA CAC CCA AGT AGA AGC TCA
p3xGli1-BSrev	23308	GAT CTG AGC TTC TAC TTG GGT GTT CCC TGC TTG TCG AGA GCT TCT ACT TGG GTG TTC CCT GCT TGT CGA GAG CTT CTA CTT GGG TGT TCC CTG CTT GTC GAG G
3xmGli-BSfor	23307	GAT CCT CGA CAA GCA GGG AAG TGG GAA GTA GAA GCT CTC GAC AAG CAG GGA AGT GGG AAG TAG AAG CTC TCG ACA AGC AGG GAA GTG GGA AGT AGA AGC
3xmGli-BSrev	23309	GAT CTG AGC TTC TAC TTC CCA CTT CCC TGC TTG TCG AGA GCT TCT ACT TCC CAC TTC CCT GCT TGT CGA GAG CTT CTA CTT CCC ACT TCC CTG CTT GTC GAG G

Tabelle 5.3: RNA-Sonden

Name	Gen	Position	Primer-Nr.	Plasmid	orientiert
DHCR2	Dhcr7	1-790 bp	30349/30350	pCR II	-
bpa(8-1)	Nsdhl	590-1190 bp	30353/30354	pCR II	-
Td	Ebp	1-490 bp	30359/30560	pCR II	-
HSD(18)	17betaHsd7	1-500	30362/30363	pCR II	-
HSD(19)	17betaHsd7	200-800	30364/30365	pCR II	+
HSD(21)	17betaHsd7	500-1200	30366/30367	pCR II	-
HMGCoA	Hmgcr	590-1045	31937/31938	pCR II	+
IPP	IdiI	EST 3'	31941/31942	pCR II	-
HSD1	Hsd17b1	250-950	32665/32666	pCR II	+
P450sccI	P450scc	1170-1750 bp	32660/32661	pCR II	+
P450sccII	P450scc	1000-1750 bp	32662/32661	pCR II	+
P450sccIII	P450scc	300-950 bp	32663/32664	pCR II	-
Shh	mShh	120-550 bp	—	pBSII-SK	+
Ihh	mIhh	330-655 bp	—	pBluescript-SK	+

5.1 Primer, Sonden und Konstrukte

Tabelle 5.4: PCR- und Sequenzierprimer

Name	interne Nummer	Länge	Sequenz 5'-3'	T _m °C
ID11for	31941	21	GAA GTA CAG CTC TCC GCA CAG	51,7
ID11rev	31942	24	GCA ATA GCT TTT AAT CTC GTT GGG	55,4
P450scc 1170for	32660	18	CCA CCC CAT CTC CGT GAC	52,9
P450scc 1750rev	32661	28	CCT CAG TCT TCA AGT GTT TAT TAA CTC C	55,1
p450scc 1000for	32662	19	GAC CTC CAT GAC CCT GCA G	52,4
P450scc 300for	32663	23	GGA GTC AGT TTA CAT CGT GGA CC	54,1
P450scc 950 rev	32664	16	GGG CAG CTT GTT GCC C	51,8
HSD1 0for	32665	27	GCT TGC TCT GAA CTT TAG TAC TAT TCC	53,0
HSD1 500rev	32666	18	GCG CAA ACT TGC TGG CAC	55,1
HSD1 500for	32667	18	TGT GCC AGC AAG TTT GCG	53,9
HSD1 1100rev	32668	24	GAG ATG CTG GCT TAG ATC TTT TGC	55,5
HSD1 250for	32669	16	TGC TGC CCA GGC ATG C	54,4
HSD1 950rev	32670	17	TGG AGG CCG TGT CCG AG	54,9
HMG-CoA (590-1045)for	31937	24	CTT GTC AGA AGT CAC ATG GTT CAC	52,9
HMG-CoA (590-1045)rev	31938	27	CTG TCA GCT ACA GTG TCA TTT AAA ACC	54,7
HMG-CoA (0-298)for	31939	22	GAG AAA GCA CTG CTG AAG CTT C	52,8
HMG-CoA (0.298)rev	31940	23	CAT GCG ATG TAG ATA GCA GTG AC	51,8
7-DHCR 0-790for	30349	17	AGC GTG GAT CAG CCG CC	56,7
7-DHCR 0-790rev	30350	23	GGA CAG GTT AAT GAG GGT CCA GG	57,5
bpa 590-1190for	30353	26	CCG GAG TTC AGA AAC TCA TTT TAA CC	57,6
bpa 590-1190rev	30354	20	GGA ATG TTC CAG CCA ATG CC	56,5
Td 0-490for	30359	21	GGA TTA GGG AGC CTG CAG GTC	56,5
Td 0-490rev	30360	27	GAC GAA GCT GTC ACT AAG GAT ATA TCG	55,9
HSD7 0-500for	30362	25	GGA TCA AGG TTC AGG CTA AGA GAA C	55,7
HSD7 0-500rev	30363	24	GCC AAA GAG ATT GGT TTC AAA CAC	55,8
HSD7 200-800for	30364	18	CCC TGC TGG CCT CTC ACC	55,2
HSD7 200-800rev	30365	24	GTA GGA GCA ACG TCC AGA TAA AGG	55,2
HSD7 500-1200for	30366	23	GAT TCG GGA ACT GGA ACC ACT TC	57,6
HSD7 500-1200rev	30367	25	CTG TGA AAG GTA GGA GGA GAG ATC G	56,5
ShhC+Teil von ShhN EcoRI for	32211	26	TTT TGA ATT CGT GGC GGC CAA ATC CG	69,9
ShhN-letzte20bp-SalI rev	32212	33	AAA AGT CGA CGG AGT TCT CTG CTT TCA CAG AAC	66,9
ShhC-SalI-rev	30720	31	TTT TTG TCG ACG CTG GAC TTG ACC GCC ATT C	72,7
ShhC-EcoRI-ATG-for	30718	31	AAA AGA ATT CAT GGT GCT GGC GGC TGA CGA C	72,1
ShhN-EcoRI-for	30717	28	AAA AGA ATT CAT GCT GCT GCT GCT GGC C	68,3
Shh-NheI-for	30715	28	AAA AGC TAG CAT GCT GCT GCT GCT GGC C	70,0
ShhN+YFP-SacI-rev	30716	31	TTT TTG AGC TCA AGA GTC GCG GCC GCT TTA C	71,4
pEXP-for	30807	22	GGT TTA GTG AAC CGT CAG ATC C	51,9
N-Terminus for	31599	18	CAC TGC ACC TGG AGC AGG	52,0
C-Terminus rev	31600	17	CGT CGC GGT CCA GGA AG	54,6
HindIII-mShhfor	28925	29	AAA AAA AGC TTA TGC TGC TGC TGC TGG CC	68,0
ShhN-BamH1rev	28926	30	TTT TTG GAT CCT CAG CTG GAC TTG ACC GCC	70,6
HindIII-Ptc-for	20263	30	TTT TAA GCT TCG ATG GCC TCG GCT GGT AAC	68,4
SacII-Ptc-rev	20264	26	AAA ACC GCG GTC ACT TGG AGC TGC TC	67,7
Ptc488	20218	21	AAC ACC TGG ACT CAG CAC TCC	53,0
Ptc1005	20219	22	TGC CAC TGG AAA ACT TGT CAG C	56,6
Ptc1504	20220	17	TTC CTC CTG CCC ATG C	53,8
Ptc1969	20221	21	CAC ACG CAC GTG TAC TAC ACC	52,3
Ptc2511	20222	21	GCT TCA AGG ACT TCA GGA TGC	53,0
Ptc3003	20223	24	CCT GTT CTG GGA GCA ATA CAT CAG	56,5
Ptc3499	20224	20	TGT CCT GAG GTG TCT CCA GC	52,2

5.2 Datensätze der phylogenetischen Analysen

Tabelle 5.5: In der Analyse der 3β -Hydroxysteroiddehydrogenase-Familie verwendete Proteine

3β-Hydroxysteroiddehydrogenasen				
Abkürzung	Protein	Organismus	GI-Nummer	Anmerkungen
atNsdhl	NAD-abhängige Steroldehydrogenase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3075392	uncharakterisiert
atSDH	putative Steroldehydrogenase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	15027969	uncharakterisiert
ceprotein	hypothetisches Protein	<i>C. elegans</i>	14665871	uncharakterisiert
dmprotein	hypothetisches Protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	7294013	uncharakterisiert
erg27	Short-chain Dehydrogenase	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	3738145	Ergosterol-Synthese
gg3HSDiso	3β -Hydroxysteroiddehydrogenase/ Δ 4,5-Isomerase	<i>Gallus gallus</i>	1019356	Pregnenolon, 17α -Hydroxypregnenolon
hs3HSDiso	3β -Hydroxysteroiddehydrogenase/ Δ 4,5-Isomerase	<i>Homo sapiens</i>	65960	Pregnenolon, DHEA
hsC27	3β -hydroxy- Δ 5-Oxidoreduktase	<i>Homo sapiens</i>	13436260	spezifisch für C27-Steroide
hsNsdhl	Nad-abhängige Steroldehydrogenase	<i>Homo sapiens</i>	4457237	Cholesterinbiosynthese, mutiert im CHILD-Syndrome
hsHSD7	17β -Hydroxysteroiddehydrogenase	<i>Homo sapiens</i>	8134404	Cholesterinbiosynthese
ip3HSD	3β -Hydroxysteroiddehydrogenase	<i>Ictularus punctatus</i>	3135615	Testis
ma3keto	3-Ketosteroidreduktase	<i>Mesocricetus auratus</i>	2394380	Niere und männliche Leber
mm3keto	3-Ketosteroidreduktase	<i>Mus musculus</i>	840650	inaktiviert DHT
mmC27	3β -Hydroxy- Δ 5-oxidoreduktase	<i>Mus musculus</i>	11545401	spezifisch für C27-Steroide
mmNsdhl	NAD-abhängige Steroldehydrogenase	<i>Mus musculus</i>	8473695	Cholesterinbiosynthese, „bare patches“-Maus
om3HSDiso	3β -Hydroxysteroiddehydrogenase/ Δ 4,5-Isomerase	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	619362	aus Eierstöcken
rnCCA2	CCA2 Protein	<i>Rattus norvegicus</i>	2563999	akkumuliert bei Wachstumsstillstand

5.2 Datensätze der phylogenetischen Analysen

Tabelle 5.6: In der Analyse der P450scc-Familie verwendete Proteine

P450scc-Familie				
Abkürzung	Protein	Organismus	GI-Nummer	Anmerkungen
atP450	putatives P450-Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	15231538	uncharakterisiert
btP450scc	Cholesterin-Monooxygenase	<i>Bos taurus</i>	224684	Substrat: Cholesterin
ceP450	hypothetisches Protein	<i>C. elegans</i>	9803043	uncharakterisiert
chP450scc	Cholesterin-Monooxygenase	<i>Capra hircus</i>	168804	Substrat: Cholesterin
cp11b	11 β -Hydroxylase	<i>Cavia porcellus</i>	9857716	Aldosteronsynthese
dmCyp301	hypothetisches Protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	7303435	uncharakterisiert
dmCyp12b2	hypothetisches Protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	7302560	uncharakterisiert
dmCyp12e1	hypothetisches Protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	7299339	uncharakterisiert
dmCyp12c1	hypothetisches Protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	10733357	uncharakterisiert
dmdisembo	P450-artiges Protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	7330256	Ecdysonbiosynthese, exprimiert im CNS
ecP450scc	Cholesterin-Monooxygenase	<i>Equus caballus</i>	2921282	Substrat: Cholesterin
ggP450scc	Cholesterin-Monooxygenase	<i>Gallus gallus</i>	7430691	Substrat: Cholesterin
ggVD3	25-Hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase	<i>Gallus gallus</i>	2981301	Substrat: 25-Hydroxyvitamin D3
gmP450	putatives P450-Protein	<i>Glycine max</i>	3334667	Elicitin-induzierbar, Glyceollinbiosynthese
hs11b	11 β -Hydroxylase	<i>Homo sapiens</i>	30184	Cortisol-Synthese
hsP45027	Sterol 27-hydroxylase	<i>Homo sapiens</i>	181292	verschiedene Oxidationsreaktionen in Gallensäure-Synthese
hsP450scc	Cytochrome P450 side chain cleavage	<i>Homo sapiens</i>	11432471	Substrat: Cholesterin
hsVD3a1	1,25-Dihydroxyvitamin D3-24-hydroxylase	<i>Homo sapiens</i>	306704	Substrat: 1,25-Dihydroxyvitamin D3
ipP450scc	Cholesterin-Monooxygenase	<i>Ictularus punctatus</i>	3135621	Substrat: Cholesterin
lsCYP10	P450 10 Monooxygenase	<i>Lymnaea stagnalis</i>	1352181	exprimiert im gonadotropen Hormone produzierenden Dorsalkörper
ma11bc18	11 β -Monooxygenase	<i>Mesocricetus auratus</i>	688037	Aldosteronsynthese
maP450scc	Cholesterin-Monooxygenase	<i>Mesocricetus auratus</i>	11991654	Substrat: Cholesterin
mdCyp12A2	P450-Protein	<i>Musca domestica</i>	2618772	Substrate: Insektizide, Xenobiotika; keine Ecdysteroid-induzierbar durch Vit D3
mm25VDa1	25-Hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase	<i>Mus musculus</i>	1088464	Substrat: Cholesterin
mmP450scc	Cholesterin-Monooxygenase	<i>Mus musculus</i>	6110613	Substrat: Cholesterin
mus11b	11 β -Hydroxylase	<i>Mus</i>	7106287	Aldosteronsynthese
oa11b	11 β -Monooxygenase	<i>Ovis aries</i>	2286105	Glucocorticoid-Synthese
oaP450scc	Cholesterin-Monooxygenase	<i>Ovis aries</i>	1688045	Substrat: Cholesterin
ocP45026A1	Sterol-26-hydroxylase	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	164965	Gallensäure-Synthese
omP450scc	Cholesterin-Monooxygenase	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	298658	Substrat: Cholesterin
rc11b	11 β -Monooxygenase	<i>Rana catesbeiana</i>	902934	Gluc- und Mineralocorticoidsynthese
rn11b	11 β -Monooxygenase	<i>Rattus norvegicus</i>	303794	Cortisol-Synthese, mitochondrial
rnCyp11a1	Cholesterin-Desmolase	<i>Rattus norvegicus</i>	117262	Substrat: Cholesterin
rnVD3a1	Vitamin D3-25-Hydroxylase	<i>Rattus norvegicus</i>	298965	Substrat: 25-Dihydroxyvitamin D3
RochP45scc	Cholesterin-Monooxygenase	<i>Dasyatis americana</i>	1488233	Substrat: Cholesterin
salm11b	11 β -Monooxygenase	<i>Salmo salar</i>	5085886	Cortisol-Synthese, mitochondrial
stP450	P450-Protein	<i>Solanum tuberosum</i>	12331298	induziert nach Phytophthora-Infektion
ssP450scc	Cholesterin-Monooxygenase	<i>Sus scrofa</i>	2025	Substrat: Cholesterin
ssVD3a1	25-Hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase	<i>Sus scrofa</i>	8896018	Substrat: 25-Hydroxyvitamin D3
sus11b	11 β -Hydroxylase	<i>Sus sp.</i>	992584	Cortisol-Synthese, mitochondrial

Tabelle 5.7: In der Analyse der 17 β -HSDs verwendete Proteine

17 β -Hydroxysteroiddehydrogenasen				
Abkürzung	Protein	Organismus	GI-Nummer	Anmerkungen
bfRDH	Retinoldehydrogenase 1	<i>Branchiostoma floridae</i>	12006414	uncharakterisiert
bfRDH2	Retinoldehydrogenase 2	<i>Branchiostoma floridae</i>	12006416	uncharakterisiert
blRDH	Retinoldehydrogenase	<i>Branchiostoma lanceolatum</i>	12006418	uncharakterisiert
ceARDH	Ähnlichkeit mit Alkohol/Ribitol-DH	<i>C. elegans</i>	2384782	uncharakterisiert
cdBDH	Ähnlichkeit mit Δ - β -Hydroxybutyratdehydrogenase	<i>C. elegans</i>	746445	uncharakterisiert
ceRDH	Ähnlichkeit mit Retinoldehydrogenase	<i>C. elegans</i>	7449076	uncharakterisiert
dmCG12068	Genprodukt	<i>Drosophila melanogaster</i>	7301828	uncharakterisiert
dmCG8888	Genprodukt	<i>Drosophila melanogaster</i>	7303531	uncharakterisiert
ec11bHSD2	11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2	<i>Equus caballus</i>	4868161	setzt Cortison zu Cortison um
gg11cisRDH	11- <i>cis</i> -Retinoldehydrogenase	<i>Gallus gallus</i>	9837274	assoziiert mit Fundus albipunctatus
gg17bHSD1	17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1	<i>Gallus gallus</i>	1944049	eierstockspezifisch
hs11bHSD2	11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1	<i>Homo sapiens</i>	565082	setzt Cortison zu Cortisol um
hs11cisRDH	11- <i>cis</i> -Retinoldehydrogenase	<i>Homo sapiens</i>	2492753	assoziiert mit Nachtblindheit
hs17bHSD2	17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2	<i>Homo sapiens</i>	306462	inaktiviert Östradiol durch Reduktion
hs17bHSD3	17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 3	<i>Homo sapiens</i>	1169300	männlicher Pseudohermaphroditismus
hs3aHSD	3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase	<i>Homo sapiens</i>	13649974	setzt Hydroxysteroid um, keine Aktivität gegenüber Retinolen
hs9cisRDH	9- <i>cis</i> -Retinoldehydrogenase	<i>Homo sapiens</i>	1916935	retinolspezifisch
hsBDH	3 β -Hydroxybutyrat dehydrogenase	<i>Homo sapiens</i>	12230983	benötigt Phosphatidylcholin als allosterischen Aktivator
hstransRDH	all- <i>trans</i> -Retinoldehydrogenase	<i>Homo sapiens</i>	14756557	äußeres Segment des Photorezeptors
hsretHSD4	NAD-abhängige Retinoldehydrogenase 4	<i>Homo sapiens</i>	14760946	uncharakterisiert
hsSRDH	Sterol-/Retinoldehydrogenase	<i>Homo sapiens</i>	3372592	oxidiert all- <i>trans</i> -Retinole und 3 α -Hydroxysteroid
llSDR	Dehydrogenase vom Typ <i>short-chain</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	12722917	uncharakterisiert
mm17bHSD2	17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2	<i>Mus musculus</i>	2507561	oxidiert Testosteron und Östradiol
mm17bHSD3	17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 3	<i>Mus musculus</i>	2492740	assoziiert mit Pseudohermaphroditismus
mm17bHSD9	17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 9	<i>Mus musculus</i>	7305165	uncharakterisiert
mm9cisRDH	9- <i>cis</i> -Retinoldehydrogenase	<i>Mus musculus</i>	3298570	exprimiert im CNS, Somiten, sensorischen Organen und Myotom
o11bHSD2	11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2	<i>Ovis</i>	1911705	ausschließlich in Nieren und Nebennieren
rn17bHSD1	17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1	<i>Rattus norvegicus</i>	561533	setzt Östron zu Östradiol um
rn11bHSD2	11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2	<i>Rattus norvegicus</i>	755574	inaktiviert Östradiol
rnRDHI	Retinoldehydrogenase Typ 1	<i>Rattus norvegicus</i>	841197	leberspezifisch
rnRDHIII	Retinoldehydrogenase Typ 3	<i>Rattus norvegicus</i>	1209509	leberspezifisch
rn17bHSD6	17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 6	<i>Rattus norvegicus</i>	2661213	setzt 3 α -adiol in Androsteron um
rnBDH	Butanoldehydrogenase	<i>Rattus norvegicus</i>	203921	uncharakterisiert
sl3aEcR	3-Dehydroecdyson-3 β -reduktase	<i>Spodoptera littoralis</i>	4753912	Transport in der Hämolymphe
vcSDR	<i>short-chain</i> -Dehydrogenase/Reductase	<i>Vibrio cholerae</i>	15601856	uncharakterisiert

5.2 Datensätze der phylogenetischen Analysen

Tabelle 5.8: In der Analyse der Familie der Kernrezeptoren verwendete Proteine

Steroidhormon-Rezeptoren				
Abkürzung	Protein	Organismus	GI-Nummer	Anmerkungen
aaNuRe	nukleärer Hormonrezeptor	<i>Aedes aegypti</i>	12484038	Substrat: Steroid
apRXR	<i>ultraspiracle</i> -Protein	<i>Apis mellifera</i>	8118613	RXR
cpRXR	Retinoid X-Rezeptor-Homolog	<i>Celuca pugilator</i>	13699898	Gliedmaßenregenerierung; Liganden-Bindungsdomäne ist vertebratenähnlicher uncharakterisiert
dmCG7404	putatives Protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	7295148	
dm EcR	Ecdyson-Rezeptor	<i>Drosophila melanogaster</i>	84940	Substrat: Steroid
dmSVP1	<i>seven up</i> -Protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	103410	Substrat: Steroid; exprimiert in Photorezeptor-Vorläuferzellen
drVDR	Vitamin-D-Rezeptor	<i>Danio rerio</i>	6649215	uncharakterisiert
drTR	Thyroid-Rezeptor	<i>Danio rerio</i>	1314773	exprimiert in früher Embryogenese
ggRAR2	Retinsäure-Rezeptor	<i>Gallus gallus</i>	623767	Isoform 2
ggTR	Thyroid-Rezeptor	<i>Gallus gallus</i>	212802	–
ggPR	Progesteron-Rezeptor	<i>Gallus gallus</i>	63745	–
hsAR	Androgen-Rezeptor	<i>Homo sapiens</i>	178872	assoziiert mit testikulärer Feminisierung
hsERR1	Östrogen-ähnlicher Rezeptor1	<i>Homo sapiens</i>	6166152	Orphan-Rezeptor
hsERR2	Östrogen-ähnlicher Rezeptor2	<i>Homo sapiens</i>	36611	Orphan-Rezeptor
hsGR	Glucocorticoid-Rezeptor	<i>Homo sapiens</i>	31680	Regulation des Mineralhaushalts
hsHAP	HAP-Protein	<i>Homo sapiens</i>	32026	überexprimiert in Hepatoma-Zellen
hsLXRa	nukleärer Orphan-Rezeptor	<i>Homo sapiens</i>	726513	Oxysterole (z. B. 27-Hydroxycholesterol); Interaktion mit RXR
hsPR	Progesteron-Rezeptor	<i>Homo sapiens</i>	4102793	exprimiert im PNS
hsRXRb	Retinoid X-Rezeptor beta	<i>Homo sapiens</i>	542994	heterodimerisiert mit RAR oder TR
hsVDR	Vitamin-D3-Rezeptor	<i>Homo sapiens</i>	37654	Substrat: 1,25-Dihydroxyvitamin D3
ipER	Östrogen-Rezeptor	<i>Ictalurus punctatus</i>	10945423	lange und kurze Variante bekannt
lmRXR	Retinoid X-Rezeptor	<i>Locusta migratoria</i>	6007621	
mmRXRg	Retinoid X-Rezeptor gamma	<i>Mus musculus</i>	200882	heterodimerisiert mit RAR oder TR
msEcR	Ecdyson-Rezeptor Homolog	<i>Manduca sexta</i>	642054	Flügelentwicklung
muER	Östrogen-Rezeptor alpha	<i>Micropogonias undulatus</i>	10312212	einzigster Vertebrat mit drei ER's
muER2	Östrogen-Rezeptor beta	<i>Micropogonias undulatus</i>	10312208	einzigster Vertebrat mit drei ER's
omERb	Östrogen-Rezeptor beta	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	9968616	uncharakterisiert
omGR	Glucocorticoid-Rezeptor	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	995677	DNA-Bindungsdomäne anders als bei Säugtier-GR's
osER	Östrogen-Rezeptor	<i>Oryzias sp.</i>	3097501	uncharakterisiert
pmRAR	Retinsäure-Rezeptor-Homolog	<i>Polyandrocampa misakiensis</i>	3046863	induzierbar durch Retinsäure
mER	Östrogen-Rezeptor	<i>Rattus norvegicus</i>	56121	exprimiert im Hippocampus
mFXaR	Farnesoid X aktivierter Rezeptor	<i>Rattus norvegicus</i>	868032	Ligand: Farnesol; heterodimerisiert mit RXR
mPR	Progesteron-Rezeptor	<i>Rattus norvegicus</i>	463283	Gen-Regulation durch Gonadotropin und cAMP
mRLD1	Orphan-Rezeptor	<i>Rattus norvegicus</i>	555752	Orphan-Rezeptor; heterodimerisiert mit RXRT
mRXRa	Retinoid X-Rezeptor alpha	<i>Rattus norvegicus</i>	206819	vermittelt die DNA-Bindung von PPAR*
saER	Östrogen-Rezeptor	<i>Sparus aurata</i>	5596999	ERalpha-ähnlich
smRXR	Retinoid X-Rezeptor	<i>Schistosoma mansoni</i>	4322668	kontrolliert Weibchen-spezifische Genexpression
tbGR	Glucocorticoid-Rezeptor	<i>Tupaia belangeri</i>	1644384	uncharakterisiert
tgER	Östrogen-Rezeptor	<i>Taeniopygia guttata</i>	1449146	Östrogen wirkt maskulinisierend in Zebrafinken
tmUSP	<i>ultraspiracle</i> -Protein	<i>Tenebrio molitor</i>	6983809	20-Hydroxyecdysol induziert Phosphorylierung des Proteins
xlGR	Glucocorticoid-Rezeptor	<i>Xenopus laevis</i>	444043	Expression in früher Embryogenese

*Peroxisome-proliferator-activated receptor