

Aus der Abteilung für Lebensmitteltoxikologie der Tierärztlichen
Hochschule Hannover und dem Max-Planck-Institut für experimentelle
Endokrinologie in Hannover

Isolierung und Charakterisierung
von mRamp,
einem neuen Retinoid-induzierten
Homolog in der Maus

Dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover
Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. Nat.)

Genehmigte Dissertation von

Diplom Biochemiker Markus Hüchel
geboren am 11.10.1971 in Hannover

2003

Tag der Promotion 30.10.2003

Referent: Prof. Dr. W.H. Müller
Abteilung für Physiologische Chemie
Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent: Prof. Dr. H. Nau
Zentrumsabteilung für Lebensmittel-Toxikologie
Tierärztliche Hochschule Hannover

Diese Arbeit wurde von Januar 1999 bis Juni 2003 am Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie und der Tierärztlichen Hochschule Hannover unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Nau und Prof. Dr. G. Eichele angefertigt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben:

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. H. Nau für die Bereitstellung des interessanten Themas danken und Prof. Dr. G. Eichele für Ermöglichung am Max-Planck-Institut meine Arbeit durchführen zu können.

Prof. Dr. W.H. Müller möchte ich für die freundliche Übernahme der Begutachtung und der Vertretung meiner Arbeit vor dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover danken.

Bei Prof. Dr. M.M. Elmazar und Prof. Dr. D.M. Kochhar möchte ich mich für die Hilfe und Einweisung bei den Arbeiten mit den Mäusen bedanken.

Insbesondere möchte ich mich auch bei meinem Labortischnachbarn Carsten Möller bedanken, der einen großen Anteil am angenehmen Arbeitsklima hatte und stets mit guten Anregungen und Diskussionen während der Anfertigung dieser Arbeit geholfen hat.

Kornelia Maslo, Heike Krause und Christine Zwingermann möchte ich für ihre technische Unterstützung danken.

Besonderen Dank gilt auch Henrik Oster und Axel Visel für das intensive schnelle Korrekturlesen.

Dank gilt auch den vielen Mitarbeitern, die nicht nur im Institut für ein angenehmes Arbeitsklima sorgten, auch beim Dienstags-Fußball, beim Badminton und bei anderen abendlichen Aktivitäten:

Axel Visel, Frank Sacher, Henrik Oster, Tarik Hessabi, Sönke Friedrichsen, Alexander Proschka, Andrew Titmus, Aravind Sekhar, Marei Warnecke, Judith Oldenkamp und Jens Mittag.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Mutter und Katrin für die Unterstützung während meiner Doktorarbeit danken.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	5
1.1	Retinoide	5
1.1.1	Vitamin A-Metabolismus: Die Biosynthese von Retinsäure	6
1.1.2	All- <i>trans</i> -Retinsäure-Metabolismus	7
1.1.3	Retinoide in der Embryonalentwicklung	8
1.1.4	Retinoid-bindende-Proteine	9
1.1.5	Retinoidrezeptoren.....	10
1.1.6	Retinoidrezeptoren in der Embryonalentwicklung	11
1.2	Teratologie, Überschuß von Retinsäure	12
1.2.1	Untersuchungen zu Retinoid-Rezeptoren in der Teratogenese über Maus <i>knock out</i> - Mutanten.....	12
1.2.1.1	<i>Knock out</i> -Mäuse einzelner Subtypen.....	12
1.2.1.2	Mehrfach-Mutanten	14
1.2.2	Teratogene Effekte selektiver synthetischer Retinoid-Liganden	15
1.2.2.1	Verabreichung einzelner RAR- und RXR-Agonisten.....	16
1.2.2.2	Kombination selektiver RAR- und RXR-Liganden: Synergistische teratogene Effekte 16	
1.3	Retinsäure in der Gliedmaßenentwicklung.....	19
1.4	Zielsetzung	21
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	Tierexperimentelle Methoden	22
2.2	cDNA-Subtraktion	22
2.2.1	cDNA-Synthese	22
2.2.2	<i>RsaI</i> -Verdau.....	24
2.2.3	Adapter-Ligation	24
2.2.4	Erste Hybridisierung.....	25
2.2.5	Zweite Hybridisierung.....	25
2.2.6	PCR-Amplifikation.....	26
2.3	Phenol-Isoamylalkohol-Chloroform-Extraktion (PIC-Extraktion).....	27

2.4	DNA-Fällung.....	28
2.5	3' und 5' RACE-PCR.....	28
2.6	Isolierung von Poly(A)⁺ RNA aus Gewebe.....	29
2.7	Northern Blot-Analyse.....	29
2.7.1	Gelelektrophorese.....	30
2.7.2	Blotting.....	30
2.7.3	Sondensynthese und Hybridisierung.....	31
2.7.4	Detektion.....	31
2.8	<i>In situ</i>-Hybridisierung.....	32
2.8.1	Whole mount <i>in situ</i> -Hybridisierung (WMISH).....	32
2.8.1.1	Maus.....	32
2.8.1.1.1	<i>In vitro</i> -Transkription:.....	32
2.8.1.1.2	Gewinnung der Embryonen aus Mäusen.....	33
2.8.1.1.3	Prähybridisierung.....	33
2.8.1.1.4	Hybridisierung.....	34
2.8.1.1.5	Posthybridisierung.....	34
2.8.1.1.6	Detektion.....	36
2.8.1.2	Huhn.....	37
2.8.1.2.1	<i>In vitro</i> -Transkription:.....	37
2.8.1.2.2	Fixierung der Hühnerembryonen.....	37
2.8.1.2.3	Prähybridisierung.....	37
2.8.1.2.4	Hybridisierung.....	38
2.8.1.2.5	Posthybridisierung.....	38
2.8.1.2.6	Färbereaktion.....	39
2.8.2	Digoxigenin markierte <i>in situ</i> -Hybridisierung mit einem Roboter.....	40
2.8.2.1	Gewinnung der Gewebeschnitten von Mausembryonen des Stadiums E8.5-E11.5 (Paraffin-Schnitte).....	40
2.8.2.2	Gewinnung der Mausembryonen (E14.5, E15.5) sowie adulter und postnataler Tag 7 (P7) Gehirne für Kryoschnitte.....	40
2.8.2.3	Herstellung der Kryoschnitte.....	41
2.8.2.4	Prähybridisierung und Hybridisierung.....	41
2.8.2.5	Posthybridisierung und Detektion.....	42
2.9	Immunhistochemie (IHC).....	44
2.10	Protein Kinase C Behandlung.....	45

2.11	Überexpressionsexperimente im Huhn mit einem replikationskompetenten Retrovirus	45
3	ERGEBNISSE	46
3.1	Subtraktionsanalyse der Genexpression in Maus-embryo-Vordergliedmaßen nach Am580 Behandlung	46
3.2	Klonierung der mRNA in voller mit Länge mit 3' und 5' RACE-PCR.....	47
3.3	Northern Blot-Analyse.....	52
3.4	mRamp Expression in adulten Geweben	53
3.5	mRAMP Expression in der Embryogenese vom Embryonaltag 4.5 bis 18.5 (E4.5-18.5).	54
3.6	mRamp <i>in situ</i> -Hybridisierungsanalyse im Mausembryo (E9.5 –E15.5).....	55
3.6.1	mRamp-Transkriptverteilung am Embryonaltag 9.5 (E9.5)	55
3.6.2	mRamp-Transkriptverteilung am Embryonaltag 10.5 (E10.5)	56
3.6.3	mRNA-Verteilungsmuster von mRamp an Embryonaltagen 11.5 und 12.5 (E11.5 und E12.5)	57
3.6.4	mRamp-Expression am Embryonaltag 14.5 (E14.5)	58
3.6.5	mRamp Expression im Kopf am Embryonaltag 15.5 (E15.5)	59
3.6.6	mRamp-Transkript- und Ki67-Proteinverteilung im Gehirn am postnatalen Tag 7 (P7) ..	59
3.7	Klonierung des Ramp Homologes im Huhn	62
3.7.1	cRamp-Expression im Huhn, Hamburger-Hamilton-Stadium 22 (HH22).....	64
3.7.2	cRamp Expression in mit PKC-Inhibitor behandelten Gliedmaßenknospen	65
3.7.3	mRamp Überexpression in der Hühnergliedmaßenknospe.....	66
4	DISKUSSION	68
4.1	Expression und mögliche Funktion von mRamp.....	69
4.2	Betrachtung potentieller Zusammenhänge von mRamp und RAR α durch Expressionsvergleich	71
4.2.1	Während der Entwicklung	71
4.2.2	In adultem Thymus und Hoden	71
4.3	Analyse der Motive in der Proteinsequenz	72

4.4	PKC - ein potentielles regulatorisches Element der Ramp-Expression.....	75
4.5	Teratologische Betrachtung.....	76
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	79
6	ABSTRACT	80
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	81
8	LITERATURVERZEICHNIS	83

1 Einleitung

1.1 Retinoide

Die Retinoide umfassen eine Familie von kleinen lipophilen Molekülen, die sich vom Vitamin A (Retinol) ableiten. Abbildung 1.1 zeigt die chemische Struktur der bisher bekannten wichtigsten natürlichen Retinoide. Vitamin A wird über die Nahrung in der Form von Retinylester oder Carotenoiden aufgenommen und entweder in der Leber als Ester gespeichert oder in den Zielgeweben weiter metabolisiert (Blomhoff et al., 1992). Im Auge wird Retinol durch Oxidation und Isomerisierung zu 11-cis-Retinaldehyd umgewandelt, welches in den Sehzyklus involviert ist (Palczewski & Saari, 1997). In den meisten anderen Geweben wird Retinol zu all-trans-Retinsäure metabolisiert (Abb.1.2), die Wachstum und Differenzierung im adulten Organismus aufrecht erhält.

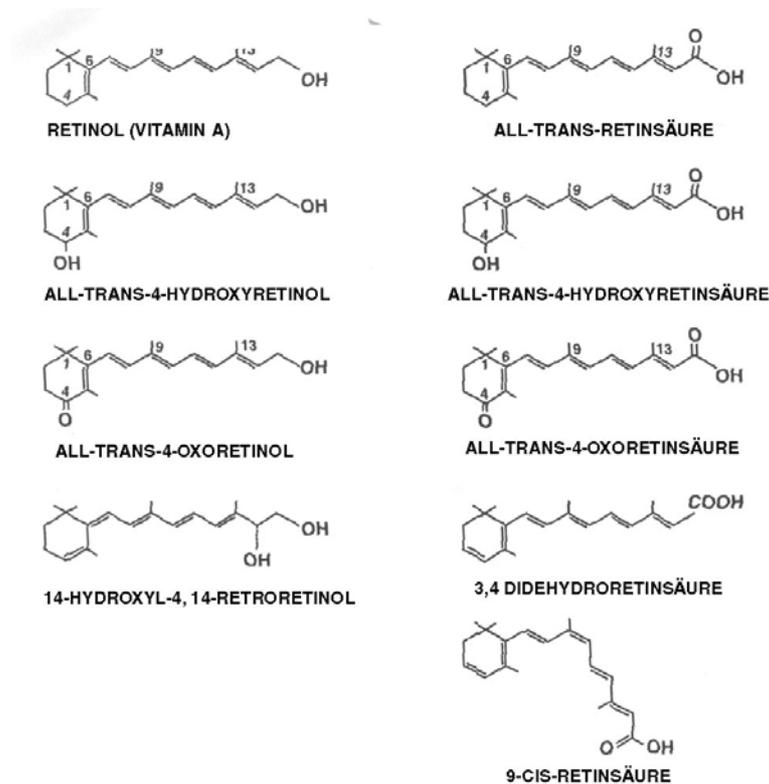


Abb. 1.1 Struktur der am weitesten verbreiteten natürlichen Retinoide

1.1.1 Vitamin A-Metabolismus: Die Biosynthese von Retinsäure

Die aktive Form des Vitamin A in vielen biologischen Systemen ist Retinsäure. Da Retinsäure in der Nahrung jedoch gar nicht oder nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommt, ist ihre Synthese aus Retinol eine wichtige Reaktion zur Bereitstellung des aktiven Metaboliten. Sie erfolgt in zwei Schritten: Einem reversiblen von Retinol zu Retinaldehyd und einem irreversiblen von Retinaldehyd zu Retinsäure (Abb.1.2).

Katalysiert wird die Oxidation von Retinol zum Retinaldehyd durch Alkohol-Dehydrogenasen aus zwei verschiedenen Familien.

Die eine Familie umfaßt die zinkabhängigen cytosolischen Dehydrogenasen mittelkettiger Alkohole (Boleda et al., 1993; Duester, 1996; Napoli, 1996). Diese besteht aus mindestens 4 Mitgliedern (Adh1, -2, -3, -4), von denen Adh1 und Adh4 freies Retinol zu Retinaldehyd oxidieren. Beide werden während der Embryonalentwicklung exprimiert. Adh1 ist jedoch nur in einigen Geweben (z. B. in der sich entwickelnden Niere), in denen Retinsäure synthetisiert wird, exprimiert (Rossant et al., 1991; Vonesch et al., 1994). Adh4 dagegen ist in verschiedenen Regionen embryonaler Retinsäuresynthese aktiv, wie z. B. im frühen ZNS, im Gewebe um das sich entwickelnde Auge und im otogenen Vesikel (Ang et al., 1996; Haselbeck & Duester, 1998). Dabei beschränkt sich die Expression auf die Phase vor Embryonaltag 10.5 (Ang et al., 1996). Danach tritt im gesamten Embryo keine Adh4-Expression mehr auf. Das heißt, andere Enzyme müssen von diesem Stadium an die Aufgabe von Adh4 übernehmen. Null-Mutanten sowohl von Adh1 als auch Adh4 entwickeln sich normal. Dies weist auf eine Redundanz bei den Retinol-Dehydrogenasen hin.

Die zweite Familie von Enzymen, die Retinol zu Retinaldehyd oxidiert, sind die mikrosomalen Dehydrogenasen kurzkettiger Alkohole (*short chain alcohol dehydrogenase*, SCAD), (Duester, 1996; Napoli, 1996). Sie sind membrangebunden und metabolisieren bevorzugt an CRBPI (*cytosolic retinol binding protein I*) gebundenes Retinol, im Gegensatz zu den cytosolischen Enzymen, die nur freies Retinol als Substrat verwenden können.

An der irreversiblen NAD^+ -abhängigen Oxidation von Retinaldehyd zu Retinsäure im Embryo sind hauptsächlich cytosolische Retinaldehyd-Dehydrogenasen beteiligt. Obwohl im Embryo auch Retinaldehyd-Oxidase existieren (Manthey et al., 1990;

Roberts et al., 1992), die Retinsäure synthetisieren können (Chen et al., 1995), wurde gezeigt, daß Retinaldehyd-Dehydrogenasen vorherrschend und nahezu für die gesamte Retinsäuresynthese im Embryo verantwortlich sind (McCaffery & Drager, 1994; Moss et al., 1998; Niederreither et al., 1997).

1.1.2 All-*trans*-Retinsäure-Metabolismus

All-*trans*-Retinsäure wird zu stärker polaren Verbindungen metabolisiert, wie z. B. 4-hydroxy-all-*trans*-Retinsäure, 18-hydroxy-all-*trans*-Retinsäure, 4-oxo-all-*trans*-Retinsäure, 5,6-epoxy-all-*trans*-Retinsäure und all-*trans*-Retinol- β -Glukoronid (Dunagin et al., 1966; Frolik et al., 1979; Roberts et al., 1980; Roberts et al., 1979). Dabei spielen verschiedene Cytochrom-P450-Enzyme eine wichtige Rolle. Das Cyp26A1 (P450RAI-1) und das Cyp26B1 (P450RAI-2), die im reproduktiven Gewebe exprimiert werden, sind davon am intensivsten untersucht. Beide Enzyme metabolisieren all-*trans*-Retinsäure zu 4-OH-all-*trans*-Retinsäure, 4-oxo-all-*trans*-Retinsäure und 18-OH-all-*trans*-Retinsäure (Ray et al., 1997; White et al., 1997; White et al., 2000). Die Oxidation der all-*trans*-Retinsäure dient dabei vermutlich der Inaktivierung. Es konnte nachgewiesen werden, daß die oxidativen Derivate in der Mausentwicklung nicht mehr am Retinsäure-Signaltransduktionsweg beteiligt sind (Niederreither et al., 2002a). All-*trans*-Retinsäure reguliert die Cyp26A1-Transkription, so daß über einen Rückkopplungsmechanismus die eigene Oxidation kontrolliert wird (Loudig et al., 2000; Ray et al., 1997). In der Embryonalentwicklung der Maus sind Cyp26-Transkripte um sich entwickelnde Knorpel, in unterschiedlichen Regionen des Kopfes, im Pharynx, in der neuralen Retina und in verschiedenen Bereichen des Schwanzes zu beobachten (de Roos et al., 1999), Regionen in denen Retinsäure-Überschuß zu Mißbildungen führt (Nau et al., 1998).

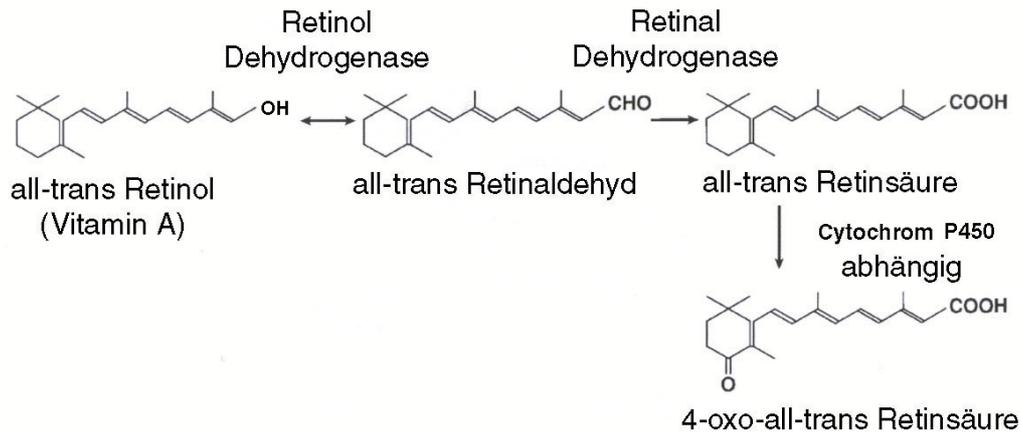


Abb. 1.2 Verwandlung von Retinol (Vitamin A) zu Retinsäure und dessen oxidativen Produkten

1.1.3 Retinoide in der Embryonalentwicklung

Bei der Fortpflanzung und in zahlreichen Stadien der Embryonalentwicklung spielen Vitamin A und dessen Metabolite eine entscheidende Rolle. Sie kontrollieren Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Morphogenese und Apoptose (Clagett-Dame & DeLuca, 2002; De Luca, 1991; Maden, 1994). Sowohl Vitamin A-Überschuß (Coberly et al., 1996; Nau, 1993) als auch -Mangel (Thompson et al., 1969; Wilson et al., 1953) führen zu Mißbildungen während der Embryogenese. Vitamin A-Defizienz führt zu Mißbildungen an Herz, Auge, respiratorischem und zirkulatorischem System, sowie am Urogenitaltrakt (Zile, 1998). Die teratogenen Effekte bei Vitamin A-Überschuß unterscheiden sich von denen bei -Defizienz, obgleich es einige Übereinstimmungen gibt. Vitamin A-Überschuß ist gekennzeichnet durch ZNS-Defekte (z.B. Spina bifida, Exenzephalie), Schädel und Gesichtsfehlbildungen, Herz- und Thymusmißbildungen, sowie Gliedmaßen-Defekte (Brookes, 1989; Kochhar et al., 1998; Nau et al., 1998; Shenefelt, 1972). Die Funktionen des Vitamin A in der Embryonalentwicklung scheint bei den meisten Vertebraten durch all-*trans*-Retinsäure, der carboxylierten Form des Vitamin A, ausgeübt zu werden. Es kann jedoch nicht alle Funktionen des Vitamin A aufrechterhalten. Embryonen Vitamin A-defizienter Ratten können zwar mit

Verabreichung von Retinsäure „gerettet“ werden, die Nachkommen sind aber blind und steril.

1.1.4 Retinoid-bindende-Proteine

Retinoid-bindende-Proteine werden in zwei Gruppen unterteilt: CRBP (*cytosolic retinol binding proteins*) und CRABP (*cytosolic retinoic acid binding proteins*) (Donovan et al., 1995; Lohnes et al., 1992), mit jeweils zwei bekannten Subtypen (CRBP I und II, CRABP I und II). Die Funktion dieser Moleküle ist noch nicht vollständig verstanden, besonders im Bezug auf ihre Beteiligung an der Embryonalentwicklung und der Teratogenität von Retinoiden. Wahrscheinlich haben sie eine Aufgabe in der Regulation des Retinoid-Metabolismus. Im sich entwickelnden Embryo sind sie weit exprimiert (Dencker et al., 1990; Dolle et al., 1989; Perez-Castro et al., 1989; Ruberte et al., 1993; Scott et al., 1994). CRBPs binden bevorzugt Retinol und agieren als „Shuttle“ zwischen subzellulären Kompartimenten und metabolisierenden Enzymen. Sie fördern dessen Umwandlung in aktive Metaboliten, z. B. *all-trans*-Retinsäure. Die CRABPs zeigen dagegen eine erhöhte Affinität zu *all-trans*-Retinsäure. Es wird vermutet, daß sie an der Retinsäure-Homöostase innerhalb der Zelle beteiligt sind und das Auftreten hoher Konzentrationen freier Retinsäure verhindern. Gleichzeitig beschleunigen sie den Abbau der Retinsäure zu polareren Verbindungen. In der Embryonalentwicklung sind sie jedoch nicht essentiell, da sowohl fehlendes CRBP I als auch CRABP I und II nur geringe Effekte auf die Embryogenese zeigen (Lampron et al., 1995). Vermutlich werden ihre Funktionen von anderen Rezeptoren übernommen.

1.1.5 Retinoidrezeptoren

Es gibt zwei Familien von nukleären Retinoidrezeptoren, RAR und RXR, die zur Steroid/Thyroid-Hormon-Superfamilie gehören und beide in drei auf verschiedenen Genen liegende Subtypen α , β , γ und noch durch weitere Spleißvarianten in Isoformen unterschieden werden. Über diese Rezeptorproteine, an die Retinsäure bindet, wird die Transkription von *downstream* Ziel-Genen aktiviert oder reprimiert. Sowohl all-*trans*- als auch 9-*cis*-Retinsäure binden an das RAR-Protein, wenngleich nur all-*trans*-Retinsäure *in vivo* in ausreichender Menge als Aktivator nachgewiesen werden konnte. An den RXR-Rezeptor bindet nur 9-*cis*-Retinsäure, nicht jedoch all-*trans*-Retinsäure (De Luca, 1991). Das RAR-Protein heterodimerisiert mit RXR und interagiert als Komplex mit sogenannten *retinoic-acid-response-elements* (RARE), spezifischen DNA-Sequenzen in der Promoter-Region der Zielgene. Für die Regulation der Transkription ist ein gebundener Ligand an das RAR-Protein obligat, während die physiologische Bedeutung des RXR-Liganden für die Vitamin-A Signaltransduktion hingegen noch zu klären ist (Clagett-Dame & DeLuca, 2002). RXR-Rezeptoren dienen in diesen Komplexen vermutlich als „stiller Partner“ ohne Ligandenbindung.

RXR-Proteine können zusätzlich mit sich selbst Homodimerkomplexe (Mangelsdorf & Evans, 1995) oder, neben RAR, auch mit anderen Rezeptoren, wie z. B. dem *thyroid-hormone-receptor* (TR), *1,25-dihydroxy-vitamin D₃ receptor* (VDR) (Yu et al., 1991), *peroxisomal proliferator activated receptor* (PPAR) (Kliwer et al., 1992b), NGFI-B, NURR1 (Perlmann & Jansson, 1995) und *Coup-TF* (Kliwer et al., 1992a), Heterodimere bilden.

1.1.6 Retinoidrezeptoren in der Embryonalentwicklung

Die Expression der Retinoidrezeptoren während der Embryogenese ist räumlich und zeitlich unterschiedlich. Während $RAR\alpha$ ubiquitär exprimiert wird, zeigen $RAR\beta$ und $RAR\gamma$ eine zeitlich und lokal begrenzte Expression. Dabei schließen sich die Expression von $RAR\beta$ und $RAR\gamma$ oft gegenseitig aus. Dies läßt eine unterschiedliche Funktion der beiden Rezeptoren vermuten. $RAR\beta$ ist im Leber- und Lungengewebe, sowie im Urogenital-Trakt exprimiert. Während der Gliedmaßenentwicklung ist $RAR\beta$ im mesenchymalen Gewebe zwischen den Fingern exprimiert und nicht an der Knorpelkondensation beteiligt. $RAR\gamma$ dagegen ist in den Fingern hoch exprimiert, aber nicht im Zwischenfingerbereich. Die Expressionsverteilung zeigt, daß sowohl $RAR\beta$ als auch $RAR\gamma$, allerdings in unterschiedlicher Weise, an der Ausbildung der Gliedmaßen beteiligt sind. Weiterhin wirken beide Rezeptoren zu verschiedenen Zeitpunkten bei der Neuralrohrentwicklung. Die Expression des $RAR\gamma$ ist nur in der offenen Neuralfalte zu beobachten, aber nicht mehr im geschlossenen Neuralrohr, in dem jedoch $RAR\beta$ -Transkripte vorhanden sind.

Bei den RXR-Rezeptoren ist der β -Subtyp weit verbreitet, während $RXR\alpha$ und $RXR\gamma$ eine stärker eingeschränkte Expression zeigen (Dolle et al., 1994; Mangelsdorf et al., 1992).

1.2 Teratologie, Überschuß von Retinsäure

Retinsäure-Überschuß und -Defizienz führen zu einer abnormalen Entwicklung (Maden, 1994; Nau et al., 1998). Daraus läßt sich schließen, daß der Embryo präzise regulierte Retinoide benötigt. Obwohl das Spektrum der Fehlbildungen in beiden Fällen überlappt, gibt es selektive Antworten auf Defizienz bzw. Überschuß. Somit ist wahrscheinlich kein einzelner Mechanismus für die Aktion der Retinoide verantwortlich, sondern jedes Gewebe hat während der Entwicklung seinen einzigartigen Prozeß.

Die Art der Mißbildungen hängt vom embryonalen Stadium ab, in dem Retinsäure verabreicht wurde. Frühe Retinsäureexposition (Embryonaltag 8-10) führt zu Gesichtschädel- und ZNS-Defekten. Später (E10-14) sind Gliedmaßenmißbildungen und urogenitale Defekte zu beobachten (Kistler, 1981). Außerdem ist die Ausprägung der teratogenen Effekte dosisabhängig (Agnish & Kochhar, 1992; Seegmiller et al., 1997). Höhere Dosen führen zu häufigeren und schwereren Fehlbildungen, sowie einer erhöhten embryonalen Letalität (Kochhar, 1967).

1.2.1 Untersuchungen zu Retinoid-Rezeptoren in der Teratogenese über Maus *knock out*-Mutanten

1.2.1.1 *Knock out*-Mäuse einzelner Subtypen

Ein Ansatz, um Aussagen über die Funktionalität einzelner Retinoidrezeptoren zu erhalten, ist die Generierung und Untersuchung von Maus-Null-Mutanten. Durch auftretende Redundanz ist es jedoch häufig schwierig, präzise Ergebnisse zur Funktionalität der einzelnen Retinoidrezeptoren zu erhalten. Homozygot defiziente Mäuse für $RAR\alpha_1$, $RAR\beta_2$ und $RAR\gamma_2$ zeigen keine abnormalen Phänotypen (Kastner et al., 1995). Mäuse, denen alle $RAR\beta$ Isoformen fehlen, zeigen meistens eine normale Entwicklung und lassen keine veränderte Retinoidempfindlichkeit erkennen (Luo et al., 1995). Nur in einem von 11 Fällen tritt ein Defekt in der Entwicklung der Cranialganglien (Fusion vom Ganglion IX und X) auf. Die Ausschaltung aller $RAR\alpha$ -

Isotypen führt zu früher postnataler Letalität und zur Degeneration der Hoden (Lufkin et al., 1993). Bei der Betrachtung der teratogenen Wirkung von Retinsäure-Überschuß zeigen sowohl RAR α - als auch RAR β -Null-Mutanten keine Veränderung gegenüber dem Wildtyp (Morriss-Kay & Sokolova, 1996).

Mäuse, denen alle RAR γ Isoformen fehlen, zeigen eine erhöhte Letalität, geringeres Größenwachstum, männliche Sterilität, sowie Knorpelmißbildungen und weisen homöotische Transformationen des Axialskeletts auf (Lohnes et al., 1993; Lohnes et al., 1995). Die teratogenen Effekte bei Retinsäure-Überschuß sind bei RAR γ -*knock outs* die gleichen wie beim Wildtyp, mit der Ausnahme, daß keine lumbosacralen Verkürzungen und anteriore und posteriore Neuralrohrdefekte auftreten (Iulianella & Lohnes, 1997). Dies läßt vermuten, daß RAR γ nicht notwendig für die Induktion vieler Entwicklungseffekte ist, abgesehen von der Ausbildung der lumbosacralen Verkürzungen und Neuralrohrdefekte.

Bei den RXR-Rezeptoren sind aufgrund der Interaktion mit einigen Steroid/Thyroid-Hormon-Rezeptoren, auch bei einzelnen RXR-*knock out*-Mutanten, ernste Effekte während der Embryogenese zu erwarten. Homozygote RXR α Mutanten sterben während der Gestation zwischen Tag 13.5 und 16.5 durch eine Fehlentwicklung des Herzens (Sucov et al., 1994). Die Gliedmaßenentwicklung bei Mäusen mit einer Mutation im RXR α -Gen ist normal, allerdings sind sie gegenüber all-*trans*-Retinsäure-induzierten Gliedmaßenmißbildungen resistent (Sucov et al., 1995). Bei den RXR β - *knock out*-Mäusen ist eine morphologisch normale Entwicklung zu beobachten. Jedoch sind die Männchen steril (Kastner et al., 1996).

Kein Phänotyp dieser einzelnen *knock outs* spiegelt die Erwartungen wider, die sich aus dem Expressionsmuster der einzelnen Retinoidrezeptor-Subtypen ergeben. Die Ergebnisse weisen bei der Embryogenese auf ein redundantes System hin, da bei der Abwesenheit eines Rezeptors die meisten oder alle Funktionen von einem anderen übernommen werden. So können offensichtlich RAR γ -induzierte Gliedmaßendefekte durch andere RARs ersetzt werden, nicht jedoch Retinsäure-induzierte Neuralrohrdefekte.

knock out	Letalität	Sterilität (männlich)	Mißbildungen	Retinoidempfindlichkeit
RARα	postnatal letal	-	Degeneration der Hoden	unverändert
RARβ	keine	-	sehr selten	unverändert
RARγ	erhöhte Letalität	steril	Knorpelmißbildung homöotische Transformationen des Axialskeletts	leicht verändert, keine lumbosacralen Verkürzungen oder Neuralrohrdefekte
RXRα	letal zwischen E13.5 u.E16.5	-	Herzfehlbildung	resistent gegen retinoid-induzierte Gliedmaßendefekte
RXRβ	keine	steril	keine	-

Tab. 1.1 Übersichtstabelle der *knock out*-Mäuse einzelner Retinoid-Rezeptorsubtypen

Die Tabelle stellt die wichtigsten Phänotypen der einzelnen *knock out*-Mutanten dar. Die Spalte Retinoidempfindlichkeit zeigt die Wirkung von Retinsäure-Überschuß im Vergleich zum Wildtyp.

1.2.1.2 Mehrfach-Mutanten

Für weitere Untersuchungen wurden auch verschiedene Mutanten miteinander gekreuzt. Alle RAR-Doppel oder -Mehrfach-Mutanten sterben entweder im Uterus oder kurz nach der Geburt und weisen multiple Mißbildungen auf, die ähnlich denen der Vitamin A-Defizienz sind (Kastner et al., 1994; Lohnes et al., 1995; Lohnes et al., 1994; Luo et al., 1996; Mendelsohn et al., 1994).

Doppel- oder Dreifach-Mutanten der RXR-Rezeptoren lassen Defekte aus der Inaktivierung von RAR/RXR Heterodimeren erwarten. RXR $\beta^{-/-}$ /RXR $\gamma^{-/-}$ und RXR $\alpha^{+/-}$ RXR $\beta^{-/-}$ RAR $\gamma^{-/-}$ -Mutanten weisen, außer eines verringerten Größenwachstums und einer männlichen Sterilität, keinen abnormalen Phänotyp auf. Diese rühren aus dem Verlust der Funktion des RXR β her (Kastner et al., 1996; Krezel et al., 1996).

Kombinierte Mutanten eines RAR Subtyps mit dem RXR α -Subtyp zeigen bei den Fehlbildungen Synergie-Effekte (Kastner et al., 1997), jedoch nicht mit RXR β oder RXR γ .

Hieraus und aus den oben genannten Studien ergibt sich, daß der RXR α Rezeptor der entscheidende Partner für RAR-Proteine bei der Signaltransduktion über RAR/RXR Heterodimere ist. Dabei spielt offensichtlich RXR α auch eine besondere Rolle in der

Ausbildung teratogener Effekte, wie die Resistenz gegen Gliedmaßendefekte bei *RXR α -knock out*-Mäusen zeigt.

1.2.2 Teratogene Effekte selektiver synthetischer Retinoid-Liganden

Aus der Redundanz ergibt sich, daß die Ergebnisse zur Funktionalität der einzelnen Rezeptoren über *knock out*-Studien nur unzureichend sind. Deshalb sind andere Methoden wie die Verabreichung spezifischer Liganden während der Embryonalentwicklung zur Gewinnung weiterer Erkenntnisse notwendig. Da *all-trans*-Retinsäure, der natürliche Ligand, an alle drei RAR-Subtypen bindet, sind synthetische Liganden, die selektiv für einen Subtypen sind, für verschiedene Studien verwendet worden (Abb 1.4): Am580 (RAR α selektiv) (Hashimoto & Shudo, 1991), CD2019 (RAR β selektiv) und CD437 (RAR γ) selektiv (Bernard et al., 1992).

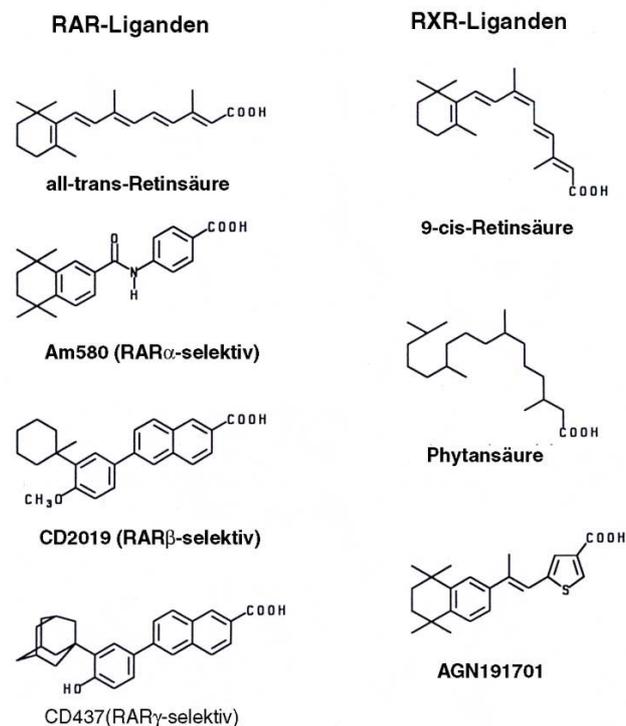


Abb 1.3 Synthetische und natürliche Liganden des RAR- und RXR-Rezeptors

1.2.2.1 Verabreichung einzelner RAR- und RXR-Agonisten

Von den drei selektiven Liganden verursacht Am580 (RAR α selektiv) die stärksten und variierendsten teratogenen Effekte entsprechend der ubiquitären Expression des α -Rezeptors in der Embryonalentwicklung. Mißbildungen des Auges, Ohrs, Kiefers, Gaumens, sowie Spina bifida, Schwanz- und verschiedene Gliedmaßendefekte treten hierbei auf (Elmazar et al., 1996). Fehlbildungen des Urinar-Systems werden durch den RAR β -Agonisten CD2019 hervorgerufen. Der RAR γ -Ligand CD437 induziert Verknöcherungsdefizienz, es treten Defekte der Sternebrae, der Wirbelkörper, der Gliedmaßen und Exenzephalie auf.

Die Verabreichung RXR-selektiver Liganden verursacht bei weitem keine so hohe Teratogenität wie die der RAR-selektiven (Elmazar et al., 1997; Jiang et al., 1995; Kochhar et al., 1996). Erst bei einer sehr hohen Dosis sind Mißbildungen zu beobachten. Vermutlich führen die RXR-Liganden zur bevorzugten Bildung von RXR-Homodimeren, welche in der Embryonalentwicklung nur eine untergeordnete Rolle spielen (Zhang et al., 1992).

1.2.2.2 Kombination selektiver RAR- und RXR-Liganden: Synergistische teratogene Effekte

Eine Gabe der selektiven RAR-Liganden Am580 (RAR α -Agonist) oder CD 437 (RAR γ -Agonist) führt, wie vorher beschrieben, allein verabreicht zu Entwicklungsdefekten, der selektive RXR-Ligand (AGN191701) dagegen zeigt überhaupt keine Mißbildungen. Wird ein RAR-Agonist, d. h. entweder Am580 oder CD 437, mit dem RXR-Agonisten AGN191701 zusammen verabreicht, sind jedoch erheblich intensivere teratogene Effekte zu beobachten (Nau & Elmazar, 1999) als die einzelnen RAR-Agonisten verursachen (Abb 1.4). Dabei wird die Art der Mißbildungen jeweils vom selektiven RAR-Liganden bestimmt. In der Kombination mit dem RAR α -Liganden treten starke synergistische Effekte unter anderem bei der Mißbildung des Urogenitaltraktes, des Gesichtsschädels, der Gliedmaßen und bei Spina bifida auf (Elmazar et al., 1997). Bei Exenzephalie und der Gaumenspalte sind

allerdings keine synergistischen Effekte zu sehen. Die Häufigkeit der Gaumenspalte weist sogar eine deutliche Reduzierung auf .

Die synergistischen Effekte des RXR-Agonisten mit dem RAR γ -Agonisten sind noch größer, da die Anzahl der Mißbildungen mit dem RXR-Agonisten zusammen, im Vergleich zum RAR γ -Agonisten allein viel stärker potenziert werden. Die Gesamthäufigkeit der einzelnen Mißbildungen im Vergleich zum RAR α -Agonisten ist jedoch geringer.

Im Gegensatz zum RAR α -Liganden ist erhöhte Teratogenität bei allen auftretenden Mißbildungen vorhanden, d. h. neben vermehrten Gliedmaßendefekten und Spina bifida, ist auch ein erhöhter Prozentsatz von Gaumenspalten und Exenzephalie zu beobachten (Elmazar et al., 2001).

Diese Experimente zeigen, daß RAR/RXR-Heterodimere, die sowohl einen gebundenen RXR-Liganden als auch RAR-Liganden besitzen, an der Ausbildung teratogener Effekte, wie Spina bifida, Gliedmaßenmißbildungen u.s.w., beteiligt sind.

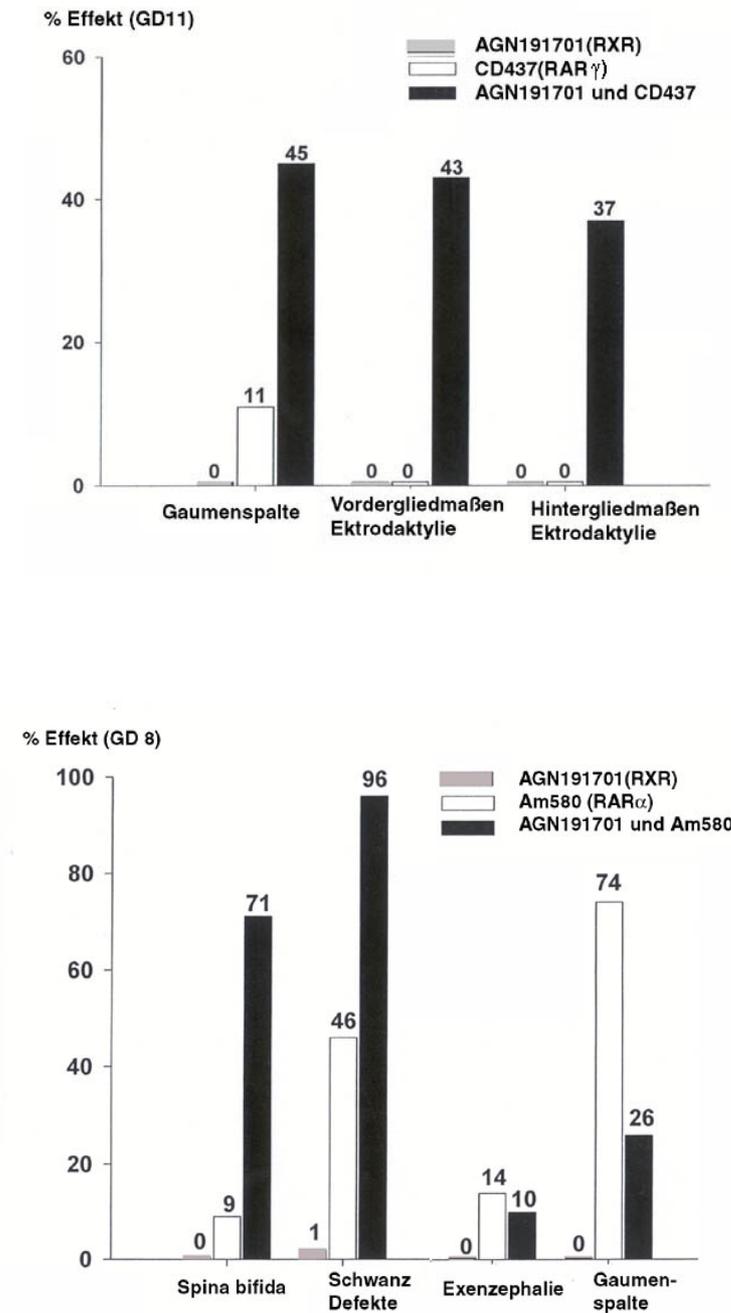


Abb 1.4. Teratogene Effekte selektiver RAR- und RXR-Agonisten am Tag 8 (GD8) und Tag 11 (GD11) *post coitum* alleine bzw. in Kombination verabreicht
 Daten von (Elmazar et al., 2001).

1.3 Retinsäure in der Gliedmaßenentwicklung

Gliedmaßenknospen der Vertebraten sind embryonale Strukturen, die während der Entwicklung lateral in der Region der Vordergliedmaßen bzw. Hintergliedmaßen entstehen und einen distalen Auswuchs bilden. Es sind mindestens drei Signalzentren in der Gliedmaßenknospe definiert worden: 1. Die Zone polarisierender Aktivität (ZPA), eine Gruppe mesenchymaler Zellen im posterioren Bereich der Gliedmaßenknospe, die im wesentlichen das Muster entlang der antero-posterioren (AP) Achse definiert. 2. Die apikale ektodermale Leiste (AER), die die unterliegenden mesenchymalen Zellen in der „Progress-Zone“ in undifferenziertem Zustand hält und den distalen Auswuchs steuert und 3. das distale Nicht-AER-Ektoderm, das entscheidend für die dorso-ventrale (DV) Asymmetrie ist. Beim Wachstum der Gliedmaßen differenzieren Zellen in Muskel-, Knorpel- und Knochenzellen. Im Huhn ist die morphologische Entwicklung der Gliedmaßen besonders intensiv untersucht worden (Hofmann & Eichele, 1994).

Es wurde gezeigt, daß Huhngliedmaßenknospen endogen *all-trans*-Retinsäure und 3,4-didehydro-*all-trans*-Retinsäure enthalten (Thaller & Eichele, 1987, 1990). Diese bilden in der Gliedmaßenknospe einen antero-posterioren Konzentrationsgradienten mit einer höheren posterioren Konzentration aus (Thaller & Eichele, 1987) und sind an der Ausbildung der antero-posterioren Achse beteiligt. Transplantationen der ZPA, sowie auch die lokale Administration von *all-trans*-Retinsäure in den anterioren Bereich, führen entlang der antero-posterioren Achse zu einer spiegelbildlichen Duplikation der Finger (Tickle et al., 1982; Wedden et al., 1990). Dabei vermittelt *Sonic hedgehog* (SHH) die polarisierende Aktivität der ZPA (Chang et al., 1994; Riddle et al., 1993). SHH wiederum wird durch Retinsäure induziert und ist für die Ausbildung der ZPA notwendig (Helms et al., 1994; Lu et al., 1997). Somit dient Retinsäure vermutlich als Morphogen und ist an der AP-Polarität beteiligt.

In der Gliedmaßenknospe der Maus hingegen sind sowohl die *all-trans*-Retinsäure-Konzentration als auch der Konzentrationsgradient geringer als im Huhn (Scott et al., 1994). Weiterhin konnte auch keine 3,4-didehydro-*all-trans*-Retinsäure nachgewiesen werden, die vermutlich nur im Huhn eine Bedeutung hat. Jedoch konnte auch hier gezeigt werden, daß *all-trans*-Retinsäure für die Ausbildung der AP-Achse und das Gliedmaßenwachstum benötigt wird (Niederreither et al., 2002b).

Wie zuvor beschrieben bewirken Vitamin A- sowie Retinsäure- bzw. Am580-Überschuß Gliedmaßendefekte. Dabei treten Ektrodaktylie sowie Verformungen und Verkürzungen von Humerus, Radius und Ulna bei der Vordergliedmaßenknospe bzw. Femur, Fibula und Tibia bei der Hintergliedmaßenknospe auf. In vielen Fällen fehlt in der Hintergliedmaßenknospe die Fibula (Elmazar et al., 2001; Kochhar et al., 1996). Der Signaltransduktionsweg der Retinsäure in der Gliedmaßenentwicklung ist jedoch noch unbekannt: Somit sind auch die Mechanismen, die zu den Mißbildungen führen, noch nicht geklärt.

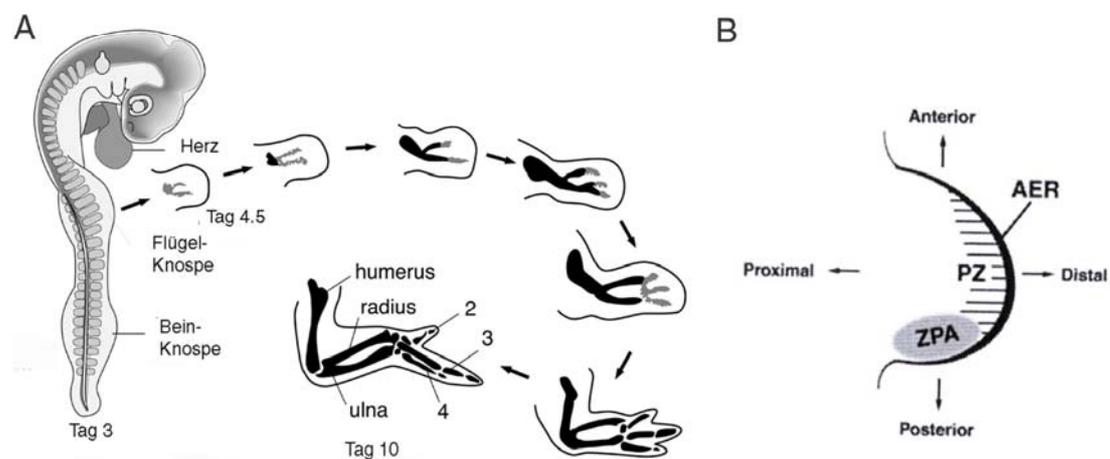


Abb 1.5 Gliedmaßenentwicklung

- (A) Flügelentwicklung beim Huhn beginnend mit der Ausbildung von Gliedmaßenknospen am Tag 3
- (B) Dorsale Betrachtung der Basisstrukturen der Gliedmaßenknospe bei den Vertebraten. Die apikale ektodermale Leiste (AER) dirigiert den distalen Auswuchs; die Zone polarisierender Aktivität (ZPA) ist an der Ausbildung der AP-Achse beteiligt. In der „Progress Zone“ (PZ) befinden sich undifferenzierte mesenchymale Zellen.

1.4 Zielsetzung

Es ist bekannt, daß Retinsäure, welche sich von Vitamin A ableitet, für die normale Entwicklung von Vertebraten essentiell ist (Clagett-Dame & DeLuca, 2002). Veränderungen des Retinsäurehaushalts während der Embryogenese, hervorgerufen durch Vitamin A-Überschuß oder -Mangel bzw. durch Verabreichung von Retinsäure oder von Rezeptor-spezifischen synthetischen Retinoiden, verursachen teratogene Effekte (Nau & Elmazar, 1999). Obwohl die Effekte von Vitamin A- bzw. Retinsäure-Überschuß gut beschrieben sind und viele Untersuchungen zur Rolle von Retinsäure in der Embryonalentwicklung durchgeführt wurden (Ross et al., 2000), sind viele Zielgene der Retinsäure noch unbekannt und die molekularen Wirkungsmechanismen noch nicht aufgeklärt.

Frühere Studien zeigten, daß Retinsäure auch bei der Gliedmaßenentwicklung eine wichtige Funktion hat (siehe Einleitung). So führte die Verabreichung des synthetischen Retinoids Am580, welches spezifisch an den α -Rezeptor bindet, unter anderem zu starken Mißbildungen der Gliedmaßen (Kochhar et al., 1996). Die Zielgene und molekularen Wirkungsmechanismen sind auch hier noch ungeklärt.

Ziel dieser Arbeit war es, neue Gene zu isolieren und zu charakterisieren, die eine Rolle in der Gliedmaßenentwicklung spielen und die spezifisch über den Retinsäure-Rezeptor α (RAR α) induziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Tierexperimentelle Methoden

Für alle Maus-Experimente wurden NMRI-Mäuse verwendet. Sie haben einen Albino-Phänotyp mit unpigmentiertem Fell und Auge. Ihre Verpaarungs- und Aufzuchteigenschaften sind überdurchschnittlich. Die Haltung und Arbeit mit den Tieren erfolgte nach den Vorschriften des Bundestierschutzgesetzes (BGB1 S1105, ber. S181, Abschnitt 2 (§2+3), 5 (§7-9) und 8 (§119)). Für die Hühnerembryo-Experimente wurden White Leghorn Eier verwendet, die von Lohmann bezogen wurden. Ihre Inkubation erfolgte bei 38°C und 80% Luftfeuchtigkeit. Das Entwicklungsstadium wurde nach Hamburger und Hamilton (HH) bestimmt (Hamburger & Hamilton, 1951).

2.2 cDNA-Subtraktion

2.2.1 cDNA-Synthese

Für die Isolierung neuer unbekannter Zielgene der Retinsäure wurde eine cDNA-Subtraktion durchgeführt. Trächtigen Mäusen wurde dafür 11.0 Tage p.c. Am580 (5mg/kg Körpergewicht) in 25% Cremophor oral verabreicht. 6 Stunden später wurden die Embryonen entnommen und deren Vordergliedmaßenknospen gesammelt. Nach Isolierung der mRNA (siehe 2.4) wurde mit Hilfe des SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech) die cDNA synthetisiert. Diese wurde mit der cDNA von Vordergliedmaßenknospen unbehandelter Embryonen (E11.25), die nur das Vehikel 25% Cremophor verabreicht bekamen, in der cDNA Subtraktion mit dem PCR Select cDNA-Subtraction Kit (Clontech) eingesetzt. Dabei wurden alle verwendeten Lösungen aus dem Kit verwendet und nach dem Protokoll ab 2.2.2 verfahren (siehe Abb. 2.1).

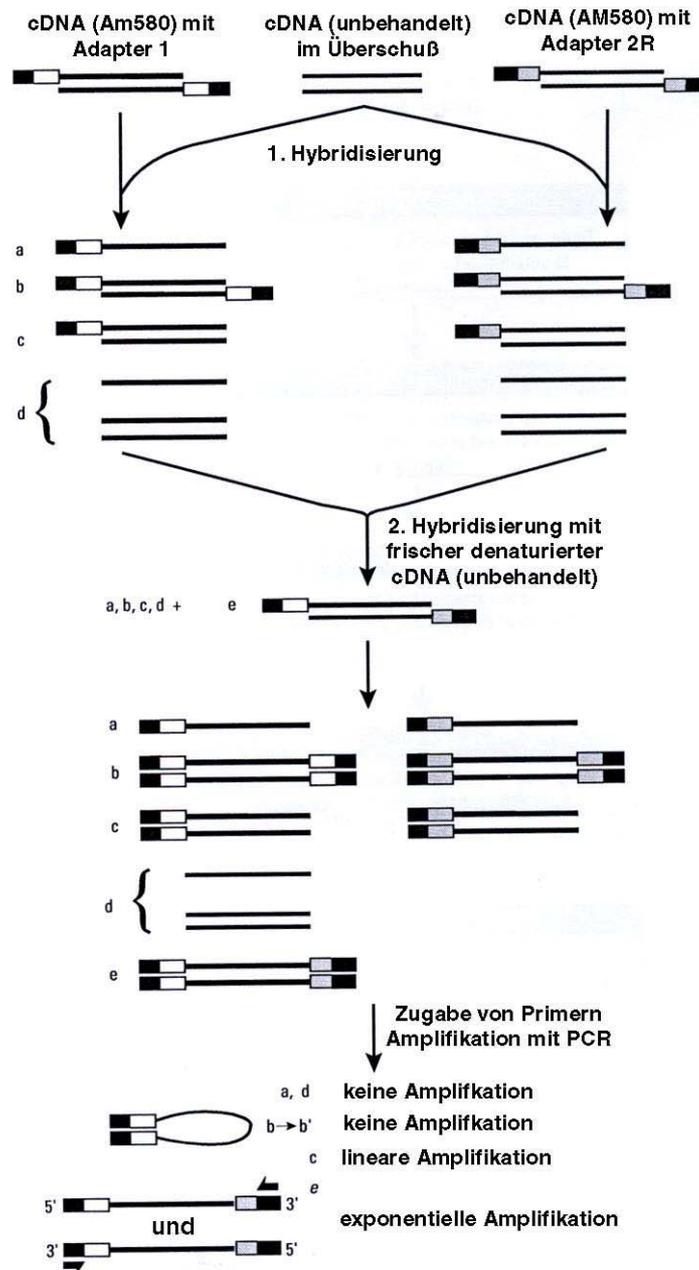


Abb. 2.1 Schematische Darstellung des Ablaufes der cDNA-Subtraktion mit Amplifikation der differenziell exprimierten cDNA

In der ersten Hybridisierung wurde behandelte cDNA mit unbehandelter cDNA im Überschuß versetzt und denaturiert, so daß in der Hybridisierung Moleküle a,b,c und d entstehen (siehe oben). In 2. Hybridisierung werden die beiden Proben aus der ersten Hybridisierung ohne sie zu denaturieren miteinander vermischt und mit frisch denaturierter unbehandelter cDNA versetzt. Dabei es entstehen Typ e Hybride, differenziell exprimierte Gene, die nun mit spezifischen Primern für die Adapter in einer PCR-Reaktion amplifiziert werden können.

2.2.2 *RsaI*-Verdau

Der Verdau erfolgte jeweils für die Am580 behandelte und unbehandelte synthetisierte cDNA:

Zuerst erfolgte ein *RsaI*-Verdau für die Herstellung von blunt-end cDNA-Fragmenten welche für die spätere Adapter-Ligation und die optimale Subtraktion notwendig waren. Dafür wurden 43,5 µl der ds cDNA mit 5 µl 10fach Reaktionspuffer und 1,5 µl *RsaI* versetzt und für 1,5 Std. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 2,5 µl 20x EDTA/ Glykogenmix gestoppt, gefolgt von einer PIC-Extraktion und DNA-Fällung (siehe 2.3 und 2.4). Die gefällte und luftgetrocknete cDNA wurde in 5,5 µl bidest. Wasser gelöst und bis zur Verwendung für die Adapter-Ligation bei -20°C gelagert.

2.2.3 Adapter-Ligation

Diese Reaktion erfolgte nur für die Am580 behandelte cDNA:

Um nach den Hybridisierungsreaktionen differentiell exprimierte cDNA amplifizieren zu können wurden Adapter an die cDNA-Fragmente ligiert die ein „Annealing“ von PCR-Primern ermöglichten. An Adapter 1 können der Primer 1 und der nested Primer 1 binden, an den Adapter 2R binden Primer 1 und nested Primer 2R.

1µl der *RsaI*-verdauten cDNA wurden mit 5 µl sterilem H₂O verdünnt. Jeweils 2 µl davon wurden in 2 verschiedenen Reaktionsansätzen verwendet. Reaktionsansatz 1 beinhaltete zusätzlich 3 µl steriles Wasser, 2 µl Ligationspuffer, 1µl T4 DNA-Ligase (400 U/µl) und 2 µl Adapter 1 (10µM). Reaktionsansatz 2 beinhaltete anstelle des Adapters 1 2µl Adapter 2R (10µM). Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C und wurde mit Zugabe von 1 µl EDTA/Glycogen-Lösung und Inkubation für 5 min bei 72°C gestoppt. Anschließend wurden die Proben direkt für die erste Hybridisierung verwendet oder bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

2.2.4 Erste Hybridisierung

Für die erste Hybridisierung wurden folgende 2 Reaktionen angesetzt:

1. Reaktionsansatz

- 1,5 µl *RsaI*-verdaute cDNA (unbehandelt)
- 1,5 µl Adapter 1 ligierte cDNA (Am580 behandelt)
- 1,0 µl Hybridisierungspuffer

2. Reaktionsansatz

- 1,5 µl *RsaI*-verdaute cDNA (unbehandelt)
- 1,5 µl Adapter 2R ligierte cDNA (Am580 behandelt)
- 1,0 µl Hybridisierungspuffer

Beide Reaktionsansätze wurden in einem Thermocycler (Perkin Elmer TC2400) für 1,5 min auf 98°C erhitzt. Danach erfolgte für 8 Std. bei 68°C die Hybridisierung. Anschließend wurde sofort mit der zweiten Hybridisierung fortgefahren.

2.2.5 Zweite Hybridisierung

Für die zweite Hybridisierung wurden in einem Reaktionsgefäß 1 µl *RsaI*-verdaute cDNA (unbehandelt), 1 µl Hybridisierungspuffer sowie 2 µl steriles H₂O gegeben und für 1,5 min bei 98°C in einem Thermocycler erhitzt. Die Reaktionsansätze 1 und 2 aus der ersten Hybridisierung wurden in eine Pipettenspitze mit einer kleinen Menge Luft dazwischen nacheinander aufgenommen und zusammen in das Reaktionsgefäß für die zweite Hybridisierung gegeben und gut durchmischt. Danach wurde der Ansatz über Nacht bei 68°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 200 µl Verdünnungspuffer versetzt, für 7 min auf 68°C erhitzt und bei -20°C bis zur Verwendung für die PCR-Amplifikation aufbewahrt.

2.2.6 PCR-Amplifikation

Die Amplifikation der differenziell exprimierten cDNA erfolgte in 2 PCR-Reaktionen.

Für die erste PCR wurde folgende Reaktion angesetzt:

1,0 µl verdünnte cDNA aus der 2. Hybridisierungsreaktion
19,5 µl steriles H₂O
2,5 µl 10x PCR-Reaktionspuffer
0,5 µl dNTP Mix (10mM)
1,0 µl PCR-Primer 1 (10µM)
0,5 µl 50x Advantage2 cDNA Polymerase Mix

Nach einer Inkubation von 5 min bei 75°C und 35 s bei 94°C wurden 27 Zyklen im Thermocycler (Perkin Elmer Thermocycler TC2400) wie folgt durchlaufen:

Denaturierung	10 sec	94°C
Annealing	30 sec	66°C
Synthese	1,5 min	72°C

Für die 2. PCR-Reaktion, die zur Reduzierung des Hintergrundes und der weiteren Anreicherung der differenziell exprimierten cDNA durchgeführt wurde, wurde folgende Reaktion angesetzt:

1,0 µl verdünntes primäres PCR Produkt (1:10)
18,5 µl steriles H₂O
2,5 µl 10x PCR-Reaktionspuffer
0,5 µl dNTP Mix (10mM)
1,0 µl Nested PCR-Primer 1 (10µM)
1,0 µl Nested PCR-Primer 2R (10µM)
0,5 µl 50x Advantage2 cDNA Polymerase Mix

Der Ansatz wurde im Thermocycler inkubiert:

Es wurden 10-12 Zyklen wie folgt durchlaufen:

Denaturierung	10 sec	94°C
Annealing	30 sec	68°C
Synthese	1,5 min	72°C

Jeweils 8 µl der 1. und 2. PCR-Reaktion wurden zur Untersuchung auf Produkt einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen. Anschließend wurde PCR-Produkt direkt in ein T/A-Klonierungsvektor unter Verwendung des TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers inseriert.

2.3 Phenol-Isoamylalkohol-Chloroform-Extraktion (PIC-Extraktion)

Die PIC-Extraktion wurde durchgeführt, um Proteinverunreinigungen von der DNA-Präparation abzutrennen.

Dabei wurde die DNA-Lösung mit gleicher Menge PIC-Lösung (Phenol/Chloroform/Isoamylalkoholgemisch (25:24:1)) versetzt, geschüttelt und kurz zentrifugiert. Die wässrige Schicht wurde abgenommen. Anschließend wurde die Probe erneut mit 50 µl Wasser versetzt, geschüttelt und wieder kurz zentrifugiert. Die wässrige Schicht wurde abgenommen und mit der ersten vereinigt. Zur Entfernung von Phenolresten wurde ein gleiches Volumen eines Chloroform/Isoamylalkoholgemisches (24:1) dazu gegeben. Nach Schütteln und kurzem Zentrifugieren wurde wiederum die wässrige Phase abgenommen und anschließend eine DNA-Fällung durchgeführt.

2.4 DNA-Fällung

Zur Fällung der DNA wurde die Probe mit einem Zehntel Volumen Natriumacetat (3 M, pH 6,0) und dem dreifachen Volumen absoluten Ethanol versetzt und danach 30 min bei -80°C gefällt. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm (Tischzentrifuge) wurde der Überstand verworfen, das Sediment mit 70 %igem Ethanol gewaschen, um überschüssiges Salz zu entfernen und erneut zentrifugiert. Abschließend wurde das Sediment luftgetrocknet und in einem angemessenen Volumen bidest. Wasser aufgenommen.

2.5 3' und 5' RACE-PCR

Um das 3' und das 5' Ende eines Transkriptfragmentes zu erhalten und somit die vollständige Sequenz der mRNA eines Genes, wurde eine 3' und 5' RACE-PCR durchgeführt. Die Synthese erfolgte mit dem SMART RACE cDNA-Amplification Kit (Clontech) nach den Angaben des Herstellers.

2.6 Isolierung von Poly(A)⁺ RNA aus Gewebe

Lösungen

Lysis-Binde-Puffer:	0,1 M Tris, pH,7,5; 500 mM LiCl; 10 mM EDTA; 1% SDS
Wasch-Puffer 1:	20 mM Tris, pH 7,5; 1 M LiCl; 2 mM EDTA; 1% SDS
Wasch-Puffer 2:	20 mM Tris, pH 7,5; 1 M LiCl; 2 mM EDTA
Wasch-Puffer 3:	10 mM Tris, pH 7,5; 150 mM LiCl; 1 mM EDTA

Frisches oder gefrorenes Gewebe (ca. 100 mg) wurden in einem Glashomogenisator mit 4 ml Lysis-Binde-Puffer und 40 µl DTT (30 mg/ml) homogenisiert, in 2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und auf Eis gekühlt. Durch 7-9maliges Aufziehen des Homogenates durch eine Kanüle (Durchmesser 0,9 mm) wurde die DNA geschert. Nach 2 min Zentrifugation (Tischzentrifuge, 13k rpm) wurde der Überstand zu je 1 ml auf vier 1,5 ml Reaktionsgefäße mit je 2,5 mg Dyna-beads Oligo (dt)₂₅ (Deutsche Dynal) in 400 µl Lysis-Binde-Puffer verteilt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgten nacheinander 4 Waschschrirte (je 400 µl) mit 2x Waschpuffer 1, 1x Waschpuffer 2 und 1x Waschpuffer 3. Dabei erfolgten alle Trennungen der Dyna-beads von den Lösungen mit Hilfe eines Magnetständers. Die mRNA wurde mit 55 µl DEPC-H₂O (pro Reaktionsgefäß) 3 min bei 65°C eluiert und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vereinigt. Nach einer Phenol-Isoamylalkohol-Chloroform Extraktion und anschließender Ethanol-fällung mit Natriumacetat (3 M, pH 4,8) wurde die mRNA in 200µl DEPC-H₂O aufgenommen und bei -80°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

2.7 Northern Blot-Analyse

mRNA Moleküle wurden über Gelelektrophorese nach Ihrer Größe aufgetrennt. Dafür wurde ein formaldehydhaltiges Agarosegel verwendet (Goldberg, 1980; Lehrach et al., 1977; Seed, 1982). Zur Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden wurde die RNA vom Gel auf eine Nylonmembran transferiert.

2.7.1 Gelelektrophorese

Lösungen

10x Gel-Ladepuffer:	50% Glycerol; 10 mM EDTA; 0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylene Cyanol FF
Probenpuffer:	1x MOPS; 50% Formamid; 7,5% Formaldehyd; Ethidiumbromid (10 µg/ml)
Elektrophorese-Puffer:	0,2 M MOPS, pH 7,0; 20 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA, pH 8,0

2-10 µg mRNA wurden in 19 µl Probenpuffer aufgenommen, 60 min bei 55°C denaturiert und 10 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die Probe mit 2 µl Gel-Ladepuffer versetzt und auf einem denaturierenden Agarose/Formaldehydgel (1,5% Agarose, 2,2 M Formaldehyd, 1x MOPS, pH 7,0) elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt (2-5 V/cm).

2.7.2 Blotting

Lösungen

Transferpuffer:	1,5 M NaCl; 150 mM Natriumcitrat, pH 7,0
-----------------	--

Nach der Elektrophorese wurde das Gel 15 min in destilliertem Wasser und 2x 15 min in 10x SSC Transferpuffer gewaschen. Über Nacht wurde die RNA über Kapillartransfer auf eine Nylonmembran (Hyperbond XL, Amersham) transferiert und anschließend mit UV-Bestrahlung (1.200 µJ/cm, Stratalinker, Stratagene) kovalent an die Membran gebunden.

2.7.3 Sondensynthese und Hybridisierung

Lösungen

Hybridisierungspuffer: UltraHyb (Ambion)
Waschpuffer (20x SSPE): 1,5 M NaCl; 100 mM NaH₂PO₄;
10 mM EDTA, pH 7,4

Die zur Detektion verwendeten α -³²P-dCTP radioaktiv markierten Sonden wurden mit Hilfe des Rediprime labelling kits (Amersham) nach den Angaben des Herstellers synthetisiert. Durch Molekularsiebsaulchen (ProbeQuant™ G50 Microcolumns, Amersham) wurden nicht inkorporierte Nukleotide abgetrennt.

Der RNA-Blot wurde mit 10-15 ml Hybridisierungspuffer 1 Stunde bei 42°C in einem Rotationsinkubator (GFL) prahybridisiert und anschließend mit 1-2 Millionen cpm/ml radioaktiver Sonde versetzt. Nach der Hybridisierung über Nacht wurde der Blot folgenden Waschschritten unterzogen:

1. 5 min mit 2x SSPE/0,3% SDS bei 42°C
2. 30 min mit 2x SSPE/0,3% SDS bei 42°C
3. 30 min mit 1x SSPE/0,3% SDS bei 42°C
4. 30 min mit 0,2x SSPE/0,1% SDS bei 59°C

2.7.4 Detektion

Die Visualisierung der Signale erfolgte über Autoradiografie. Dafür wurde ein Autoradiografie-Film (Hyperfilm MP, Amersham) je nach Signalstarke Minuten bis zu einer Woche exponiert und mit dem Entwicklungsgerat Biomax-MS (Kodak) entwickelt.

2.8 *In situ*-Hybridisierung

Das Prinzip der *in situ*-Hybridisierung ist die Detektion von Transkripten mittels komplementären markierten *antisense*-RNA-Sonden, die mit der mRNA stabile Hybride bilden und somit eine spätere Analyse ermöglichen.

Die Synthese der *antisense*-RNA-Sonden erfolgte mit Hilfe der *in vitro* Transkription. Zur Kontrolle, das heißt Bestimmung der Hintergrundsignale für unspezifische Bindung, wurden sogenannte *sense*-RNA-Sonden synthetisiert, die identisch zur mRNA waren und somit keine Hybridisierung zeigen sollten.

Zur Hybridisierung wurden die RNA-Sonden zu vorbehandelten Embryonen bzw. auf Gewebeschnitte gegeben. Nach der Hybridisierung wurden die Embryonen bzw. Gewebeschnitte zur Entfernung unspezifisch gebundener RNA-Sonden in Lösungen mit abfallender Ionenstärke und steigender Temperatur gewaschen. Die Detektion des Hybridisierungssignals erfolgte durch eine gekoppelte Farbreaktion mit sichtbarem Farbniederschlag.

2.8.1 Whole mount *in situ*-Hybridisierung (WMISH)

2.8.1.1 Maus

2.8.1.1.1 *In vitro*-Transkription:

Herstellung der RNA-Sonde mit Digoxigenin-UTP

Für die Synthese Digoxigenin-markierter Sonden wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

1,5 µl linearisierte Matrizen-DNA (1 µg/µl)

8 µl NTP-Mix, DIG-UTP (2,5 mM) (Roche)

2 µl 10x Transkriptionspuffer

2 µl DTT (0,1 M)

6 µl H₂O

0,5 µl RNasin (40 U/µl Promega)

Dazu wurde 1 μ l Polymerase (T7- bzw. T3- oder SP6-RNA-Polymerase (50 U/ μ l; NEB) gegeben. Der Reaktionsansatz wurde 2,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 2 μ l DNase (10 U/ μ l, Roche) für 20 min bei 37°C wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurde die RNA ethanolisch gefällt (mit 100 μ l TE-Puffer pH8, 12 μ l 3 M Natriumacetat pH 4,8 und 300 μ l Ethanol; 20 min Tischzentrifuge 13k rpm), das Präzipitat mit 70 % Ethanol gewaschen und in 23 μ l RNase freien H₂O aufgenommen. Für die Überprüfung des Erfolges der *in vitro*-Transkription wurde ein 1 μ l großes Aliquot einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen.

2.8.1.1.2 Gewinnung der Embryonen aus Mäusen

Trächtige Mäuse wurden durch Genickbruch getötet. Die Embryonen wurden entnommen und in PBS-Lösung präpariert (Entfernung der Membranen), danach direkt in 4% Paraformaldehyd in PBS (PFA)-Lösung überführt und zur Fixierung über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen in 90% Methanol bei -20°C aufbewahrt.

2.8.1.1.3 Prähybridisierung

Die Durchführung aller Arbeitsschritte erfolgte unter ständiger Bewegung auf einem Schwingschüttler.

Lösungen

Glycin-Lösung: 2 mg Glycin in 1ml PBT
PBT: 0,1% Tween 20 in PBS
Prähybridisierungs-Lösung: 50% Formamid; 5x SSC, pH 4,5; 1% SDS;
50 μ g/ml Hefe tRNA; 50 μ g/ml Heparin

Die Embryonen wurden sukzessiv jeweils 5-10 min mit 75%, 50%, 25% Methanol/PBT Lösung und 2x 10 min PBT-Lösung rehydriert und anschließend mit

6% Wasserstoffperoxid in PBT für 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) gebleicht. Nach 3maligem Waschen (5 min) bei RT in PBT-Lösung erfolgte eine Proteinase K-Behandlung (10 µg/ml in PBT) zur Permeabilisierung der Membran (für 8.5 p.c. Embryonen ca. 4 min und für 11.5 p.c. Embryonen 8-10 min Inkubation). Danach wurden die Embryonen 2 mal 10 min bei RT in Glycinlösung inkubiert, 3 mal 5 min bei RT mit PBT gewaschen und in 4% PFA/0,2% Glutaraldehyd in PBT für 20 min fixiert. Es folgten 3 Waschschrte für 5 min mit PBT bei RT, anschließend die Zugabe von 1 ml Prähybridisierungs-Lösung. Diese wurde nach 5 min durch 2 ml neue Prähybridisierungs-Lösung ersetzt, in der die Embryonen bei 70°C für 1-2 Stunden inkubiert wurden.

2.8.1.1.4 Hybridisierung

Nach Entfernen der Prähybridisierungs-Lösung wurden 1-2 ml Hybridisierungslösung (Prähyb-Lösung mit der RNA-Sonde; 0,1 µg/ml) zugegeben, so daß die Embryonen bedeckt waren. Die Hybridisierung fand in einem Wasserschüttelbad bei 70°C über Nacht statt.

2.8.1.1.5 Posthybridisierung

Die Detektion der mit Digoxigenin markierten RNA-Sonden erfolgte mit dem DIG Nucleic Acid Detection Kit (Roche) über eine alkalische Phosphatase-katalysierte Farbreaktion.

Lösungen

MAB (pH 7; frisch ansetzen): 100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; 2 mM Levamisol
0,1% Tween 20

Blockierungs-Lösung: 2% blocking reagent (Roche) in MAB

Antikörper-Lösung:

In einem 50 ml Reaktionsgefäß wurden 1 mg Embryopuder (freundlicherweise von Frank Sacher zur Verfügung gestellt) mit 0,5 ml Blockierungs-Lösung versetzt, geschüttelt und für 30 min bei 70°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Eis wurden 5 µl Schafserum (Gibco) und 0,4 µl Anti-Dig alkalische Phosphatase (Roche) hinzugefügt und für 1 Stunde rotiert. Bei 5000 rpm (Beckmann GS 15R, Rotor C0650) und 4°C wurde das Embryopuder abzentrifugiert und der Überstand in 1,5 ml Blockierungslösung/1% Schafserum überführt.

TNT:	10 mM Tris, pH 7,5; 0,5 M NaCl; 0,1% Tween 20
RNase-Lösung:	100 µg/ml RNase A (Sigma) in TNT Puffer
Lösung I:	50% Formamid; 5x SSC, pH 4,5; 1% SDS
Lösung II:	50% Formamid; 2x SCC, pH 4,5; 0,2% SDS

Durch Behandlung mit RNase und Waschen der Embryonen in Puffern mit abfallender Salzkonzentration wurde einzelsträngige RNA abgebaut und unspezifisch gebundene RNA abgetrennt.

Die Hybridisierungslösung wurde entfernt und die Embryonen 3x 30 min in vorgewärmter Lösung I bei 70°C inkubiert. Nach 3x 5 min Waschen mit TNT-Lösung bei RT erfolgte 2x 30 min eine Behandlung mit RNase A-Lösung bei 37°C. Anschließend wurden die Embryonen erst 5 min mit Lösung II/TNT (1:1) bei RT gewaschen, dann 3x 30 min mit Lösung II bei 65°C und 3x 5 min mit MAB-Lösung. Nach Vorblockierung der Embryonen in 10% Schafserum in Blockierungs-Lösung wurde die Blockierungs-Lösung durch 1-2 ml Antikörper-Lösung ersetzt und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Embryonen erst 3x 10 min bei RT mit MAB-Lösung gewaschen, dann erfolgte ein stündliches Wechseln der MAB-Lösung über den ganzen Tag und ein weiterer Waschschrift mit MAB-Lösung bei 4°C über Nacht.

2.8.1.1.6 Detektion

Lösungen

NTMT:	100 mM Tris, pH 9,5; 50 mM MgCl ₂ ; 100 mM NaCl; 01% Tween 20; 2 mM Levamisol
PBT 4.5:	PBS mit 0,1% Tween 20, pH 4,5

Die Detektion der mit Digoxigenin markierten RNA-Sonden erfolgte über eine Enzym-katalysierte Farbreaktion unter Verwendung alkalischer Phosphatase.

Die posthybridisierten Embryonen wurden nach dem letzten MAB-Waschritt 3x 10 min mit NTMT-Lösung bei RT gewaschen und anschließend mit dem Substrat BM Purple (Roche)/2 mM Levamisol als Substrat inkubiert. Die Farbreaktion wurde nach Erreichen der gewünschten Signalstärke (in der Regel nach einigen Stunden) mit 3maligem Waschen in PBT 4.5-Lösung gestoppt. Die Lagerung erfolgte nach 1stündiger Fixierung in 4% PFA/0,1% Glutaraldehyd-Lösung in 90%igem Methanol bei -20°C.

2.8.1.2 Huhn

2.8.1.2.1 *In vitro*-Transkription:

Die Synthese der RNA-Sonden erfolgte wie unter 2.6.1.1.1 beschrieben.

2.8.1.2.2 Fixierung der Hühnerembryonen

Lösungen

MEMFA: 0,1 M MOPS, pH 7,2; 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄;
 3,7% Formaldehyd

Frisch entnommene Hühnerembryonen wurden in MEMFA-Lösung überführt und über Nacht bei 4°C fixiert. Anschließend wurden sie 2 min in 0,9% NaCl-Lösung gewaschen und in 90% Methanol bei –20°C bis zur Verwendung gelagert.

2.8.1.2.3 Prähybridisierung

Lösungen

PBT: 0,1% Tween 20 in PBS
Proteinase K-Lsg.: 5 µg Proteinase K in 1 ml PBS
Hybridisierungslsg.: 50% Formamid; 5x SSC; 1 mg/ml Heparin;
 1x Dehardt's Lösung (Eppendorf); 0,1% Tween-20;
 0,1% CHAPS; 5 mM EDTA

Die Embryonen wurden jeweils 10 min sukzessiv in 75%-, 50%-MeOH, 25% MeOH/PBT und 2 mal PBT rehydriert. Danach erfolgte eine Proteinase K-Behandlung (20 min für Embryonen des Stadiums HH22) und drei Waschschrte à 2 min mit 0,1 M TEA-Puffer bei RT. Nachdem der 0,1 M TEA-Puffer gegen 5 ml 0,1

M TEA-Puffer mit 15 µl Essigsäureanhydrid ausgetauscht worden war, erfolgte nach 5 min Inkubation auf einem Schwingschüttler zuerst die Zugabe weiterer 15 µl Essigsäureanhydrid für 5 min und dann die Zugabe von 50 µl 10% Tween20, 500 µl 1 M TEA und 15 µl Essigsäureanhydrid für 5min. Anschließend wurde die Lösung durch 500 µl 1 M TEA-Lösung ersetzt, und es folgten 3 Waschschrte à 2 min mit PBT-Lösung bei RT. Nach 30 min Postfixierung in 4% PFA-Lösung bei RT wurden die Embryonen 2 mal kurz in PBT-Lösung, einmal 5 min in 100 mM Glycin-Lösung und 3 mal in PBT bei RT gewaschen. Nach Entfernen der PBT-Lösung wurden 1-2 ml Hybridisierungslösung (ohne Sonde) zugegeben und, bis die Embryonen in die Hybridisierungslösung eingesunken waren, gewartet (10-30 min). Danach wurde die obere Schicht (Rest-PBT-Lösung) entfernt, und es erfolgte nach 10 min auf einem Schüttelschwenker ein Austausch der Hybridisierungslösung und eine Inkubation für 4 Stunden bei 65°C in einem Wasserbadschüttler.

2.8.1.2.4 Hybridisierung

Die Hybridisierung wurde in 1,5 ml Hybridisierungslösung mit RNA-Sonde (10µg/ml) über Nacht bei 65°C im Schüttel-Wasserbad durchgeführt.

2.8.1.2.5 Posthybridisierung

Lösungen

FSC:	50% Formamid; 2x SSC; 0,1% CHAPS; 50 mM Glycin (pH 7,2)
PBT.3:	0,3% Triton-X 100 in PBS
BR/PBT.3:	2% w/v Blocking Reagenz (Roche) in PBT.3
Antikörperlsg.:	Anti-Dig-AP Konjugat (Roche) in BR/PBT.3 (1:2000)
PBT.5:	0,5% Titon-X 100 in PBS

Zur Entfernung unspezifisch gebundener RNA wurden die Embryonen 5 mal in FSC-Lösung gewaschen: Zuerst kurz bei RT, dann 10 min bei RT auf einem Schüttler,

danach 20 min, 2 Std. und 4 Std. bei 65°C in einem Schüttelwasserbad. Anschließend folgten 2 Waschschrte in PBT.3 bei RT auf einem Schüttler und eine Vorblockierung in BR/PBT.3-Lösung für eine Stunde bei RT. Nachdem die Embryonen über Nacht in Antikörperlösung bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert wurden, erfolgten zur Entfernung ungebundenen Antikörpers 3 Waschschrte für jeweils 20 min in PBT.5.

2.8.1.2.6 Färbereaktion

Lösungen

CT. 3: 100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 150 mM NaCl; 25 mM MgCl₂;
 0,3% Triton-X 100

Färbelösung: 14 µl BCIP und 18 µl NBT in 1 ml PVA/CT (10% PVA;
 100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 150 mM NaCl; 25 mM MgCl₂

Die Embryonen wurden 2 mal 15 min mit CT-Lösung behandelt. Anschließend wurden die Embryonen in der Färbelösung unter Lichtausschluß inkubiert bis eine ausreichende Färbung eingetreten war. Gestoppt wurde die Färbereaktion durch 2maliges kurzes Waschen in TE-Puffer. Nach einer Nachfixierung in MEMFA (30 min bei RT) und einem 2minütigen Waschschrte in 0,9% NaCl-Lösung wurden die Embryonen in 90% Methanol überführt und bei -20°C aufbewahrt.

2.8.2 Digoxigenin markierte *in situ*-Hybridisierung mit einem Roboter

Die *in situ*-Hybridisierungen wurden mit Digoxigenin markierten *antisense*-Sonden auf einem Roboter durchgeführt.

Die *in vitro*-Transkription zur Darstellung der Sonden erfolgte wie unter 2.6.1.1.1 beschrieben.

2.8.2.1 Gewinnung der Gewebeschnitten von Mausembryonen des Stadiums E8.5-E11.5 (Paraffin-Schnitte)

Frisch entnommene Embryonen wurden in 4% PFA für 2 Stunden fixiert. Anschließend wurden sie jeweils 5 min bei RT in einer ansteigenden Ethanolreihe (70%, 80%, 90%, 96%, 100%) entwässert und nach 5 min in Benzol/Ethanol (1:1) erst in Benzol und dann in Paraffin (61°C) überführt. Nach zweimaligem Wechseln des Paraffins (je 5 min), wurde die Embryonen einzeln in Einbettungsformen gegossen. Am nächsten Tag wurden die Embryonen mit dem Mikrotom (Leica) in einer Dicke von 10 µm geschnitten, auf Objektträger aufgenommen und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Vor der *in situ*-Hybridisierung erfolgte eine Deparaffinierung.

2.8.2.2 Gewinnung der Mausembryonen (E14.5, E15.5) sowie adulter und postnataler Tag 7 (P7) Gehirne für Kryoschnitte.

7 Tage alte bzw. adulte Mäuse wurden durch Dekapitation getötet. Das anschließend entnommene Gehirn wurde in Einbettmedium für Gefrierschnitte (OCT (Sakura Finetec)) eingelegt, in mit Trockeneis abgekühltem 2-Methylbutan eingefroren und bei -80°C gelagert.

Entnommene Embryonen des Stadiums E14.5 und E15.5 wurden nach gleicher Methode eingebettet.

2.8.2.3 Herstellung der Kryoschnitte

Für die spätere *in situ*-Hybridisierung wurden von den adulten und P7-Gehirnen sowie den Embryonen (E14.5 und E15.5) mit dem Kryostat CM3050 (Leica) 20 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt (bei -14°C bis -16°C) und auf die Objektträger Superfrost^{*}/Plus (Menzelgläser) aufgenommen. Nach 5 min Trocknung wurden die Gehirnschnitte bis zur Prähybridisierung bei -80°C gelagert.

2.8.2.4 Prähybridisierung und Hybridisierung

Lösungen

PBT:	0.05% Tween-20 in PBS
Prot.K-Lösung:	0,05% Tween-20, 50mM Tris, 5mM EDTA, pH 8.0, Prot.K-Konzentration war vom Gewebe abhängig, z.B. 3 µg/ml bei Embryonen
Hybridisierungspuffer:	Ultrahyb (Ambion)

Die Gewebeschnitte wurden entweder rehydriert (Paraffinschnitte) oder aufgetaut (Kryoschnitte) und nach 20 min in 4% PFA und 1minütigem Waschen in 0,9% NaCl-Lösung, zweimal 5 min bei RT in 0,25% Essigsäureanhydrid/0,1 M Triethanolamin acetyliert.

Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten im Roboter (Tecan) in einer Durchflußkammer mit einem Inkubationsvolumen von 300 µl. Die Gewebeschnitte wurden 6 mal für 5 min mit 0,6% H₂O₂ in Methanol behandelt und danach 6 mal mit PBT gewaschen. Anschließend erfolgte erst eine Behandlung mit 0,05% Tween-20/0,2 M Salzsäure, dann ein Waschschriff mit PBT und ein Proteinase K-Verdau (7 min, Prot.K-Lösung). Nach 6 maligem Waschen in PBT erfolgte für 10 min eine Fixierung in 4% PFA gefolgt von 6 Waschschriffen in PBT. Danach wurden die Gewebeschnitte 30 min bei 65°C in Hybridisierungspuffer vorinkubiert. Die Hybridisierung wurde bei 60°C über Nacht in Hybridisierungslösung mit einer RNA-Sondenkonzentration von 100 ng/ml durchgeführt.

2.8.2.5 Posthybridisierung und Detektion

Lösungen

NTE-Lösung:	250 µl; 0,05%; Tween-20; 5 mM EDTA; 10 mM Tris; 500 mM NaCl, pH 7,6
TNT-Puffer:	0,05% Tween-20; 100 mM Tris; 150 mM NaCl, pH 7,6
TNB Blocking-Puffer:	0,05% Tween-20; 100 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,5% Blocking-Reagenz (PerkinElmer Lifesciences) (pH 7,6) filtriert
Maleat Wasch-Puffer:	100mM Maleat; 150mM NaCl; 0,05% Tween-20, pH 7,5
Neutravidin-AP-Konjugat: (Pierce)	1:600 Verdünnung in 1% Blocking- Reagenz (Roche) in Maleat Wasch-Puffer (MWB)
Färbelösung:	BCIP (1:250); NBT (1:200) (Roche, Schweiz); 0.6 µg/ml Levamisol in TMN

Über Waschschrte mit Salzlösungen, die steigende Stringenz aufwiesen, wurden sukzessive unspezifisch hybridisierte RNA-Sonden entfernt und somit Hintergrundsignale minimiert. Es erfolgten fünf Waschschrte bei 65°C mit SSC-Puffern (5x, 1x, 0,5x, 0,2x) in 50% Formamid und einer NTE-Lösung. Für die weiteren Arbeitsschrte wurde ein reduziertes Volumen von 250 µl verwendet. Nach 2 mal 5 min Inkubation bei RT in 20 mM Iodoacetamin in NTE wurden die Schnitte 3 mal in NTE-Puffer gewaschen und zweimal 30 min mit Hitze-inaktiviertem Schafserum in TNT-Puffer behandelt. Auf 8 Waschschrte in NTE-Puffer folgten 2 Inkubationsschrte für 30 min in TNB Blocking-Puffer sowie zwei 45minütige Inkubationsschrte mit Anti-Dig-POD (Roche; verdünnt in TNB Blocking-Puffer (1:500)) und 8 Waschschrte in TNT-Lösung. Nach 2 mal 30 min Behandlung bei RT mit Tyramid-Biotin (T/B wurde für die Tyramid Signal Amplifikation (PerkinElmer Lifesciences) in NEN Amplifikations-Verdünnungs-Puffer verdünnt) wurden die Schnitte 8 mal in Maleat Wasch-Puffer (MWB) gewaschen und zweimal 30 min in Neutravidin-AP-Konjugat inkubiert. Mit MWB wurde in 8 Waschschrten ungebundener Antikörper entfernt und anschließend die Schnitte zweimal mit TNT-

Puffer äquilibriert. Die Signalvisualisierung erfolgte über 3 mal 20 min Behandlung mit Färbelösung bei RT. Danach wurden die Gewebeschnitte 4 mal in 0.05% Tween-20/H₂O gewaschen, 2 mal in TNT-Lösung inkubiert und in 4 % PFA/0.5% Glutaraldehyd in PBT für 20 min postfixiert. Die Objekträger wurden abschließend nach jeweils 4 Waschstritten in PBS und Wasser über Nacht getrocknet und mit Eindeckmedium Hydro-Matrix (Micro-Tech-Lab; auf Wasserbasis) eingedeckelt und unter dem Lichtmikroskop analysiert.

2.9 Immunhistochemie (IHC)

Um proliferierende Zellen zu zeigen wurde mit einem Proliferationsmarker (Maus-anti-Mensch-Ki67, auch gegen Maus reaktiv) eine immunhistochemische Markierung durchgeführt.

Entweder Aceton fixierte (20 min bei -20°C) oder nach der Posthybridisierung luftgetrocknete Gewebeschnitte wurden nach folgendem Protokoll behandelt:

Nach 3 x 2minütigem Waschen mit PBS erfolgte eine 10 min Blockierung der endogenen Peroxidase mit 0,3% H_2O_2 in PBS mit 3 anschließenden Waschschritten mit PBS à 2 min. Danach erfolgte eine Überschichtung der Gewebeschnitte mit der primären Antikörperlösung (Maus-anti-Mensch-Ki67-Antikörper (BD Bioscience) in Antibody-Diluent für IHC (BD Bioscience) 1:10 verdünnt) und eine 30minütige Inkubation in einer feuchten Kammer bei RT. Anschließend wurde 3 x 2 min mit PBS gewaschen, verdünnter biotinmarkierter Sekundärantikörper (Polyklonaler anti-Maus IgG (BD Bioscience) 1:50 in Antibody Diluent for IHC) auf die Gewebeschnitte gegeben und 30 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Es folgten 3 Waschschrritte à 2 min mit PBS, die Zugabe der verdünnten Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (Amersham, 1:300) für 30 min bei RT in der feuchten Kammer und erneut 3 x 2 min Waschen mit PBS. Nach Überschichtung mit frisch hergestellter DAB-Lösung (40 μl DAB in 1 ml DAB-Puffer; (DAB Substrat-Kit; BD Bioscience)) für 5-15 min, bis sich gewünschte Farbtintensität ausgebildet hat, wurden die Gewebeschnitte abschließend 3 mal kurz in Wasser gewaschen und jeweils 1 min mit 30 %, 70% und 100% Ethanol dehydriert und getrocknet.

2.10 Protein Kinase C Behandlung

AG1-X2 Ionen Austauscher-Kügelchen mit einem Durchmesser von 250 μm (BioRad) wurden über Nacht im 20 μl 6.5 MM Chelerythrin-Chlorid (BIOMOL) getränkt.

Hühnerembryonen des Stadiums HH 14 wurden mit Neutral-Rot leicht angefärbt und mit einer Stahlnadel im lateralen Mesoderm auf der Somiten Ebene 15 und 20 eingeschnitten. Anschließend wurden die getränkten Kügelchen in die Einschnitte implantiert. 48 Stunden später wurden die Embryonen entnommen und in einer *in situ*-Hybridisierung untersucht.

2.11 Überexpressionsexperimente im Huhn mit einem replikationskompetenten Retrovirus

Die Herstellung des Viruskonstruktes und die Durchführung der Überexpressionsexperimente erfolgte nach Angaben der Literatur (Logan & Tabin, 1998). Dabei wurde das 2193 bp lange mRamp Konstrukt (der *open reading frame*), über den pSLAX13-Vektor als Shuttle in den retroviralen RCASBP Vektor kloniert. Über die Transfektion des RCASBP-Vektorkonstruktes in die primäre Huhn-Fibroblasten-Zelllinie DF-1 wurde viraler Überstand gewonnen, der für die Infektionsexperimente verwendet wurde.

In Embryonen des Stadium HH 7-9 wurden im lateralen Mesoderm im späteren Bereich der Vordergliedmaßenknospe Viruslösung mit einer Injektionsnadel (aus einer Glaskapillare gezogen) injiziert. Nach 48 Stunden wurden einige Embryonen zur Überprüfung des Infektionserfolges entnommen und in einer *in situ*-Hybridisierung auf mRamp-Transkripte untersucht. Die restlichen Embryonen wurden bis zu fünf Tage nach der Infektion im Inkubator belassen und auf morphologische Veränderungen der Gliedmaßenknospe untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Subtraktionsanalyse der Genexpression in Maus-embryo-Vordergliedmaßen nach Am580 Behandlung

Zur Identifizierung unbekannter retinsäureinduzierter Gene, deren Aktivierung spezifisch an den RAR α -Rezeptor gekoppelt ist, wurde eine cDNA Subtraktions-Analyse durchgeführt. Die kritische Phase, in der Retinsäure-Überschuß Defekte bei der Gliedmaßenentwicklung und somit entscheidende Veränderungen in der Expression verschiedener Gene hervorruft, liegt zwischen Tag 10.5 und 11.5 (E 10.5.-11.5) *post coitum* (Kochhar, 1985). Trächtigen Mäusen wurde am Gestations-Tag 11.0 das synthetische Retinoid Am580, welches spezifisch an den RAR α -Rezeptor bindet, oral verabreicht. Die mRNA von Vordergliedmaßenknospen aus behandelten (Am580, 5mg/kg, 6 h) und unbehandelten Mäuseembryonen wurde an E 11.25 isoliert und für die cDNA-Synthese verwendet. Nach der cDNA-Subtraktion wurden 4x 96 Kolonien in einer Dot Blot-Analyse untersucht. Ein Kandidat zeigte einen signifikant erhöhten mRNA-Wert in Am580-behandelten Vordergliedmaßen (Abb. 3.1).

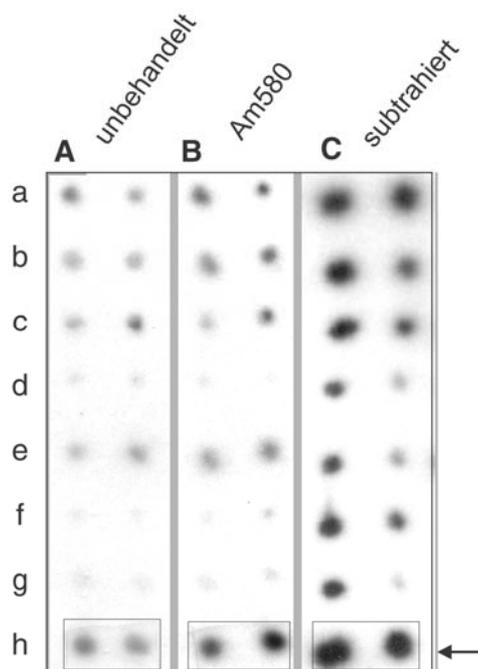


Abb. 3.1 cDNA-Subtraktions-Ergebnis

cDNA-Dot Blots hybridisiert mit ^{32}P -markierten cDNA-Proben synthetisiert aus: E 11.25 unbehandelter Vordergliedmaßen-mRNA (A), Am580 (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 6h) E 11.25 behandelte Vordergliedmaßen-mRNA (B) und subtrahierter cDNA (C). Jeder aus der Subtraktion erhaltene cDNA-Klon wurde doppelt auf die Membran aufgetragen (horizontal). (h) mRamp.

3.2 Klonierung der mRNA in voller Länge mit 3' und 5' RACE-PCR

Die Subtraktion ergab bedingt durch den *RsaI*-Verdau der cDNA vor der Hybridisierungsreaktion nur ein 1 kb großes cDNA-Fragment für den selektierten Kandidaten. Für weitere Untersuchungen erfolgte eine Klonierung der vollen Länge der cDNA über 3' und 5' RACE-PCR mit Erststrang-cDNA aus 2 μg poly (A)⁺ RNA, isoliert aus Gliedmaßenknospen. Dies ergab ein Transkript von 4,2 kb (4219 bp) mit Startcodon ATG an Position 128 und Stopcodon TAG an Position 2320 und damit einen *open reading frame* (ORF) von 730 Aminosäuren (As) (79,2 kDa) (Abb. 3.2 A). Datenbankanalysen (Celera) zeigten, daß es sich um ein noch unbekanntes Gen bei der Maus handelte, das auf Chromosom 1, Region H6 lokalisiert ist. Das humane Homolog, Ramp (*retinoic acid regulated nuclear matrix protein; hRamp*), welches zum hier gefundenen murinen Ramp (mRamp) eine Homologie von 93% aufweist, wurde im Verlauf dieser Arbeit von einer anderen Gruppe isoliert und beschrieben (Cheung et al., 2001). Auch ein entfernt verwandtes Gen in *D. melanogaster*, *l(2)dtl* (*lethal (2) denticleless heat shock gene*) ist bekannt (Kurzik-Dumke et al., 1996). Zum *l(2)dtl*, welches eine Länge von 769 As besitzt, beträgt die Homologie 58% im Bereich der Aminosäuren 30-389. Die restliche Aminosäuresequenz enthält keine weiteren Ähnlichkeiten. Abbildung 3.3 zeigt einen Sequenzvergleich der verschiedenen Spezies.

Eine statistische Sequenzanalyse zeigte, daß mRamp mit 22,1% einen hohen Serin /Threonin Anteil besitzt (Tab. 3.1). Weitere Untersuchungen der Proteinsequenz über Datenbanken (NCBI-, BCM-, EBI- und PSORT-Server) ergaben, daß WD40-Domänen im Sequenzbereich 130-169 und 350-389 vorhanden sind sowie 2 WD-Wiederholungen an den Abschnitten 113 und 221, die an Protein-Protein Interaktionen beteiligt sein können. Hydrophobe Sequenzbereiche, die auf eine

Transmembranregion hinweisen, enthält das Protein nicht (Abb. 3.2 B). Jedoch besitzt es ein putatives nukleäres Lokalisationssignal in der Region von 197-203. Die Aminosäuren 25-29 bilden ein LXXLL-Motiv, welches für Interaktionen mit Kernrezeptoren benötigt wird; im Bereich 576-597 befindet sich eine Leucin-Zipper-Domäne. Des weiteren gibt es 5 potenzielle Asn-Glykosilierungs-, 3 cAMP-Phosphorylierungs-, 25 PKC-Phosphorylierungs- und 11 CK2-Phosphorylierungsstellen (Tab. 3.2).

A

```

1   MLFNSVLRQPQLGVLNRNGWSSHYPLQSLISGYQCNCNDEHASYGETGVPVPPFGCTFCTA 60
61   PSMEHILAVANEEGFVRLYNTESQTSKKTCFKEWMAHWNAVFDLAWVPGELKLVTAAGDQ 120
121  TAKFWDVRAGELMGTCCKGHQCSLKSVAFPKFQKAVSTGGRDGNIMIWDTRCNKKDGFYR 180
181  QVNQISGAHNTADKQTPSKPKKKQNSKGLAPAVDSQQSVTVVLFQDENTLVSAGAVDGI 240
241  KVVDLRKNYTAYRQEPIASKSFLYPGTSTRKLGYSSLVLDSTGSTLFANCTDDNIYMFNM 300
301  TGLKTSPVAVFNGHQNSTFYVKSSLSPDDQFLISGSSDEAAYIWKVSMPWHPPTVLLGHS 360
361  QEVTSVCWCPSDFTKIATCSDDNTLKIWRLNRLNGLEEKPGDKHSIVGWTSQKKKEVKACPV 420
421  TVPSSQSTPAKAPRAKSSPSISSPSSAACTPSCAGDLPLPSSTPTFSVKTTTPATTRSSVS 480
481  RRGSISSVSPKPLSSFKMSLRNWVTRTPSSSPVTPPASETKISSPRKALIPVSQKSSQA 540
541  DACSESRNRVRRRLDSSCLESVKQKCVKSCNCVTELDGQAESLRRLDLCLSGTQEVLSQD 600
601  SEGPTKSSKTEGAGTSISEPPSPVSPYASEGCGPLPLRPCGEGSEMVGKENSSPENKN 660
661  WLLAIAAKRKAENSSPRSPSSQTPSSRRQSGKTSPGPVVTITPSSMRKICTYFRRTQDD 720
721  FCSPEHSTEL 730

```

B

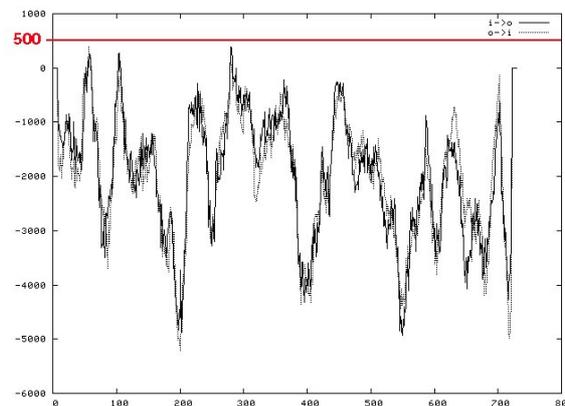


Abb. 3.2 mRamp-Proteinsequenz

- (A) Aminosäuresequenz des mRamp, abgeleitet aus der vollen Länge von der mRNA. Die zwei WD40-Domänen sind unterstrichen. Das LXXLL Motiv ist grün, das nukleäre Lokalisationssignal gelb und das Leucin-Zipper-Motiv schwarz unterlegt.
- (B) Hydrophobizitäts-Plot (ISREC-Server). Werte unter +500 weisen nicht auf mögliche Transmembranregionen hin.

Aminosäure	Anzahl	prozentual	Aminosäure	Anzahl	prozentual
Ala	45	6.2%	Met	11	1.5%
Cys	26	3.6%	Asn	28	3.8%
Asp	30	4.1%	Pro	57	7.8%
Glu	33	4.5%	Gln	30	4.1%
Phe	23	3.2%	Arg	32	4.4%
Gly	44	6.0%	Ser	106	14.5%
His	11	1.5%	Thr	55	7.5%
Ile	21	2.9%	Val	47	6.4%
Lys	53	7.3%	Trp	14	1.9%
Leu	50	6.8%	Tyr	14	1.9%

Tab. 3.1 Statistische Proteinsequenzanalyse

Anteile einzelner Aminosäuren in der mRamp-Proteinsequenz. Angaben der Aminosäuren in Spalte 1 erfolgte im 3-Buchstaben-Code. Spalte 2 gibt die absolute Anzahl wider, Spalte 3 den prozentualen Anteil der Aminosäuren im mRamp-Protein.

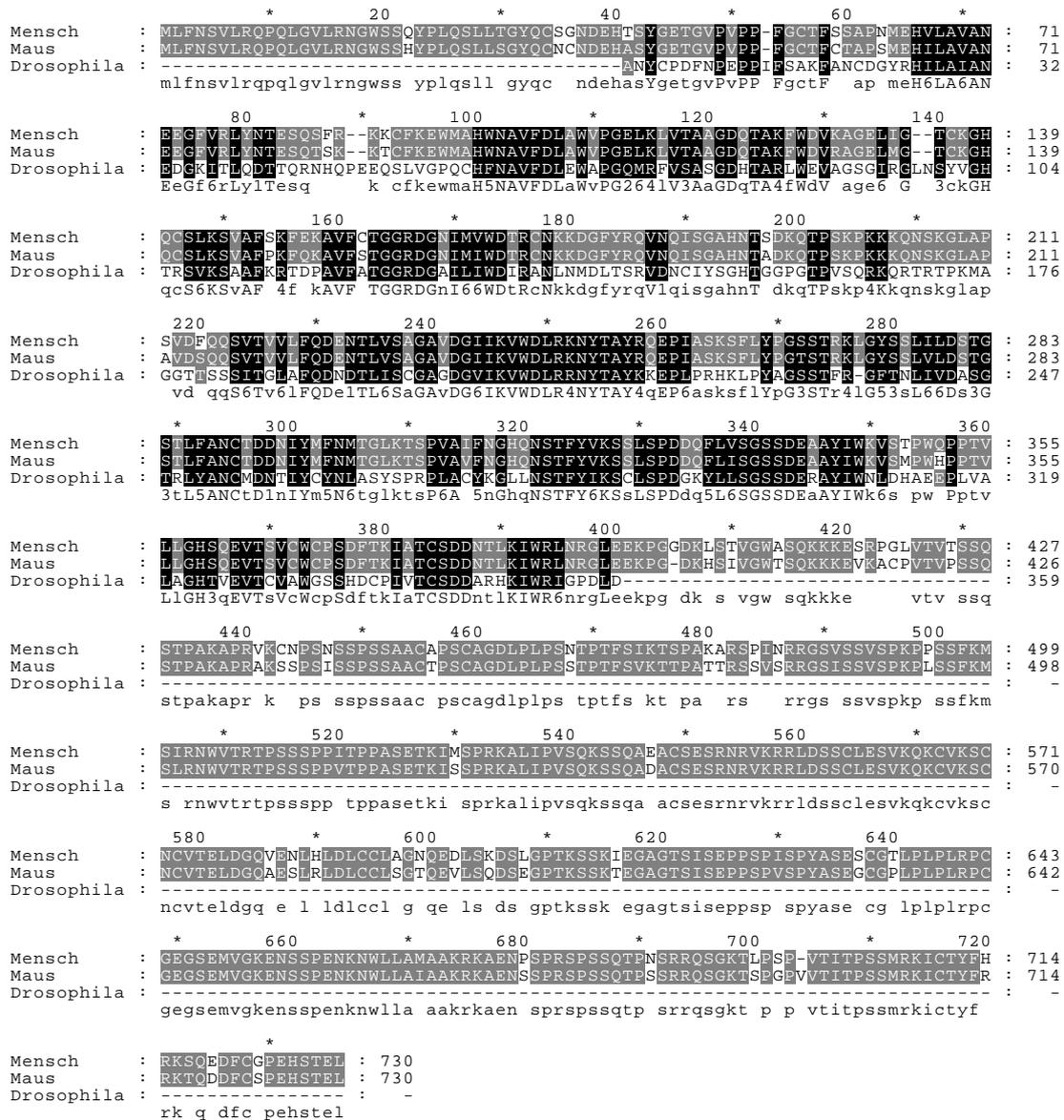


Abb. 3.3 Proteinsequenzvergleich vom hRamp, mRamp und I(2)dtl von *D. melanogaster*
Homologievergleich von Maus- und Mensch-Ramp über die gesamte Länge des Proteins (je 730 As). Das Protein I(2)dtl von *D. melanogaster* zeigt nur im ersten Bereich (As 30-388) eine Homologie. Die restliche Sequenz des 769 As langen I(2)dtl zeigte keine weitere Übereinstimmungen und wurde nicht in die Abbildung integriert. Schwarz unterlegte Buchstaben zeigen konservierte Aminosäuren über alle drei Spezies, grau unterlegte über zwei.

PKC-Phosphorylierungsstellen (25):				
85: TSK	268: STR	474: TTR	525: SPR	675: SPR
86: SKK	269: TRK	480: SRR	534: SQK	685: SSR
121: TAK	384: TLK	489: SPK	561: SVK	686: SRR
135: TCK	409: SQK	495: SFK	582: SLR	690: SGK
142: SLK	467: SVK	499: SLR	607: SSK	705: SMR
CK2- Phosphorylierungsstellen (11):				
42: SYGE	378: TCSD	574: TELD	654: SSPE	
326: SPDD	538: SQAD	608: SKTE	717: TQDD	
336: SSDE	557: SCLE	616: SISE		
Asn-Glykolysierungsstellen (4):				
248: NYTA				
289: NCTD				
299: NMTG				
316: NSTF				
cAMP-Phosphorylierungsstellen (3):				
481: RRGs				
687: RRQS				
714: RRKT				
WD-Wiederholungen (2):				
113: LVTAAGDQTAKFWDV				
231: VSAGAVDGIKVVWL				

Tab. 3.2 Vorhergesagte Motive in der mRamp-Proteinsequenz

Vorhergesagte PKC-Phosphorylierungs-, CK2-Phosphorylierungs-, Asn-Glykosylierungs-, cAMP-Phosphorylierungsstellen, sowie WD-Wiederholungen (EBI-SERVER). In Klammern die Anzahl je Motiv im gesamten Protein. Die Zahlen geben die Lage der Motive in der Proteinsequenz an. Die angegebenen Aminosäuren zeigen den Bereich des Motives. Angaben der Aminosäuren erfolgten nach dem Ein-Buchstaben Code.

3.3 Northern Blot-Analyse

Um zu verifizieren, daß der über die Dot Blot-Analyse erhaltene Kandidat mRamp tatsächlich durch Am580 induziert wird, wurde in einer Northern Blot-Analyse die Aufregulation des mRamp 6 Stunden nach der Agonisten-Verabreichung (Am580) untersucht. Als Positiv-Kontrolle diente RAR β_2 , welches durch Retinsäure (bzw. Am580) induziert wird und 6 Stunden nach der Behandlung einen rund 12fach erhöhten mRNA-Level in der Gliedmaßenknospe aufweist (Harnish et al., 1992). Eine Hybridisierung mit einer Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-Sonde wurde zur Kontrolle der gleichmäßigen mRNA-Beladung verwendet. In Abb 3.4 ist eine deutliche Aufregulierung des mRamp durch die Am580-Behandlung zu erkennen. Entsprechend der bestimmten cDNA-Länge befand sich die Bande bei einer Größe von 4,2 Kb.

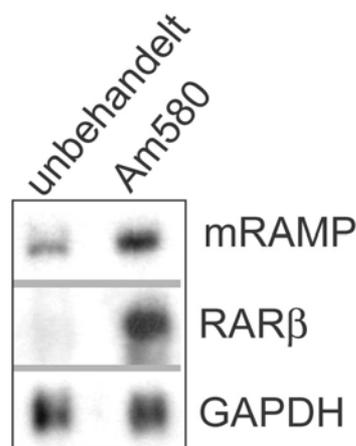


Abb. 3.4 Induktion von mRamp durch Am580 in der Gliedmaßenknospe
Vergleich der mRamp-Expression zwischen normalen und mit Am580 (5mg/kg, 6h) behandelten Vordergliedmaßenknospen. Die Northern Blot-Analyse zeigt eine Induktion der mRamp Expression durch Am580 nach 6 Stunden. Es wurden je 2 μg poly(A)⁺ mRNA, isoliert aus E11.25 Vordergliedmaßenknospen, verwendet. Kontrollen sind RAR β_2 (Am580-induziert) und GAPDH (mRNA-Ladungskontrolle).

3.4 mRamp Expression in adulten Geweben

Um einen Überblick über die mRamp-Expression in der adulten Maus zu erhalten, wurden mit Hilfe der Northern Blot-Analyse verschiedene adulte Gewebe auf mRamp-Transkripte hin untersucht (Abb. 3.5). Besonders hohe Expression ist in Geweben mit hoher Zellteilungsrate, wie Thymus, Milz und Hoden zu beobachten. Auch die Schilddrüse zeigt noch eine relativ starke Expression. Gewebe mit geringem mRamp-mRNA-Signal sind Dickdarm, Prostata, Speicheldrüse und Lunge. In den anderen untersuchten Geweben, wie Magen, Herz, Gehirn, Uterus, Leber und Skelettmuskel, konnte mRamp nicht mehr nachgewiesen werden. Im adulten Gehirn konnte auch in einer *in situ*-Hybridisierung mit Gewebeschnitten keine Expression beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Alle Gewebe, die eine Expression aufwiesen, zeigten im Northern Blot nur eine Bande. Im Gegensatz zum humanen Ramp, bei dem zwei Transkripte unterschiedlicher Größe beobachtet wurden, ist hier nur eine Variante zu erkennen. Für die Herstellung der Sonde wurde dabei der gesamte Bereich des ORF als Matritze verwendet.

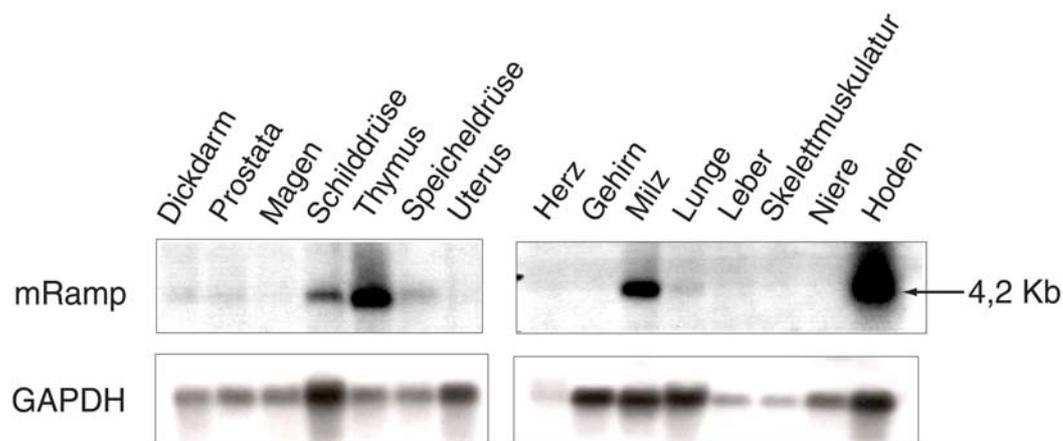


Abb. 3.5 mRamp Expression in verschiedenen adulten Geweben

Gezeigt ist die Expression von mRamp in verschiedenen adulten Geweben in einer Northern Blot-Analyse (Northern Blot, CLONTECH). Zur Analyse wurden von jedem Gewebe 2 μg poly(A)⁺ mRNA verwendet. Zur Kontrolle der mRNA-Beladung erfolgte anschließend eine erneute Hybridisierung mit GAPDH.

3.5 mRAMP Expression in der Embryogenese vom Embryonaltag 4.5 bis 18.5 (E4.5-18.5)

mRamp ist während der Embryonalentwicklung durchgehend von E4.5 bis E18.5 exprimiert, allerdings unterschiedlich intensiv (Abb. 3.6). Die Expression ist anfangs gering, geht von E4.5 bis E8.5 weiter zurück und weist ein absolutes Minimum am Embryonaltag 8.5 auf. Anschließend steigt sie wieder bis zu einem Maximum an E11.5-E13.5 und ist bis zu E18.5 mit abfallender Intensität deutlich nachweisbar.

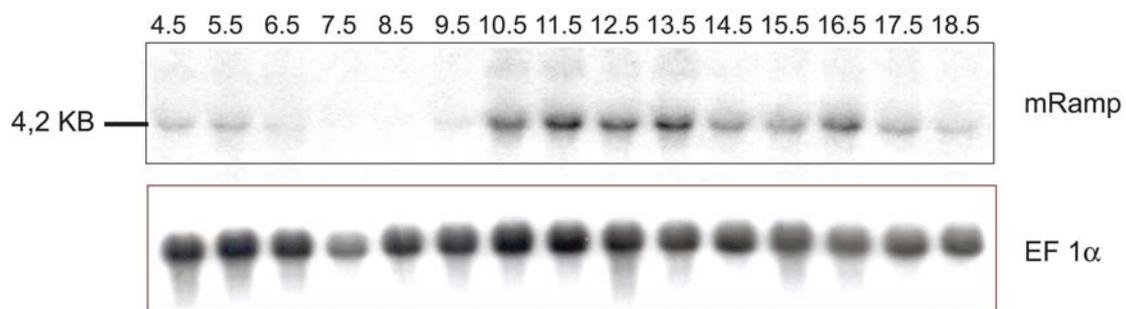


Abb. 3.6 mRamp Expression während der Embryonalentwicklung

Northern Blot Analyse von mRamp während der Maus-Entwicklung vom Stadium E4.5 bis E18.5 (Northern Blot, SEEGENE). Jede Bahn enthält 20 µg total-RNA. Als RNA-Ladungskontrolle wurde eine Hybridisierung mit dem Elongationsfaktor EF1 α durchgeführt.

3.6 mRamp *in situ*-Hybridisierungsanalyse im Mausembryo (E9.5 –E15.5)

Um einen Überblick über die Lokalisation der mRamp-Expression während der Embryogenese zu gewinnen, wurde eine *in situ*-Hybridisierungsanalyse durchgeführt. Die Untersuchung erfolgte mit ganzen Embryonen bzw. sagittalen oder transversalen Gewebeschnitten der Embryonalstadien E9.5, E10.5, E11.5, E12.5, E14.5 und E15.5 unter Verwendung Digoxigenin-markierter *antisense*-RNA-Sonden.

3.6.1 mRamp-Transkriptverteilung am Embryonaltag 9.5 (E9.5)

In Abbildung 3.7 ist die mRNA-Verteilung von mRamp in einer whole mount *in situ*-Hybridisierung (WMISH) mit Embryonen an E9.5 dargestellt. Die mRamp-Transkripte sind ubiquitär im Embryo verteilt. Eine besonders hohe Expression ist deutlich im ersten Branchialbogen, in der Gliedmaßenknospe, sowie im vorderen Gesichtsbereich und im Gehirn (Prosencephalon, Mesencephalon und im otogenen Vesikel) zu erkennen. *In situ*-Hybridisierungen mit *sense*-Sonden zeigten keine Signale (nicht gezeigt).

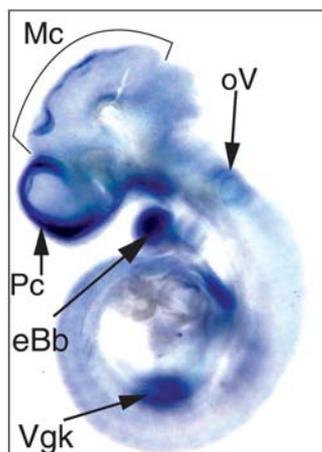


Abb. 3.7 mRamp-Expression an E9.5

Whole mount-*in situ*-Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten *antisense*-Sonden gegen mRamp am Embryonaltag 9.5. Dargestellt ist in einer Durchlichtmikroskopie die mRamp-Expression im Embryo. eBb, erster Branchialbogen; Mc, Mesencephalon; Pc, Prosencephalon; oV, otogene Vesikel; Vgk, Vordergliedmaßenknospe.

3.6.2 mRamp-Transkriptverteilung am Embryonaltag 10.5 (E10.5)

Die whole mount-*in situ*-Hybridisierung zeigt eine mRamp-Transkriptverteilung an E10.5 (Abb. 3.8 A) ähnlich der bei E9.5. Besonders hohe mRNA-Spiegel sind wieder in der Gliedmaßenknospe, im ersten Branchialbogen und im vorderen Gesichtsbereich sowie auch im Bereich des sich entwickelnden Gehirns zu beobachten. Deutlicher sind lokal höhere Expressionen in den Gewebeschnitten zu erkennen (Abb.3.8 B und C). Neben den ubiquitär auftretenden *in situ*-Signalen zeigen im Gehirnbereich der mesencephale, telencephale und otogene Vesikel sowie der vierte Ventrikel eine besonders starke mRamp Expression. Im Neuralrohr, dem ersten Branchialbogen und der Gliedmaßenknospe sind ebenfalls erhöhte mRamp-Transkriptspiegel zu erkennen.

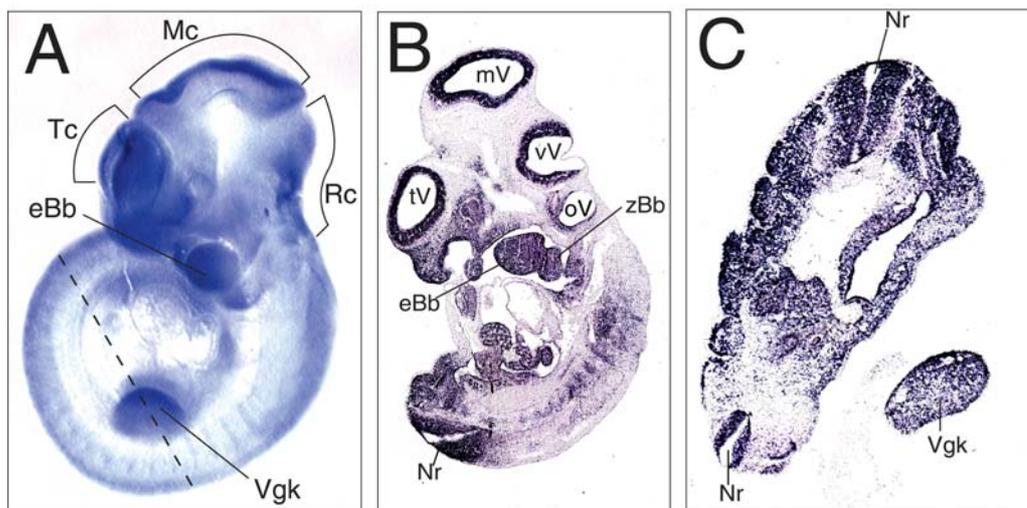


Abb.3.8 Expressionsmuster von mRamp an E10.5

Dargestellt ist die mRamp-Transkriptverteilung nach einer *in situ*-Hybridisierung mit *antisense*-Sonden gegen mRamp an E10.5. (A) Whole mount *in situ*-Hybridisierung. Die gestrichelte Linie zeigt die transversale Schnittebene in Teilabbildung C. (B) Sagittaler und (C) transversaler Gewebeschnitt. eBb, erster Branchialbogen; Mc, Mesencephalon; mV, mesencephales Vesikel; Nr, Neuralrohr; oV, otogenes Vesikel; Tc, Telencephalon; tv, telencephales Vesikel; Rc, Rhombencephalon; Vgk, Vordergliedmaßenknospe; vV, vierter Ventrikel; zBb, zweiter Branchialbogen.

3.6.3 mRNA-Verteilungsmuster von mRamp an Embryonaltagen 11.5 und 12.5 (E11.5 und E12.5)

An Tag 11.5 und 12.5 der Embryonalentwicklung ist weiterhin in der whole-mount *in situ*-Hybridisierung eine deutliche mRamp Expression im Gehirn (Telencephalon, Mesencephalon und Rhombencephalon) sowie im Schwanz zwischen den entstehenden Wirbeln zu erkennen (Abb. 3.9A und B). Auch in den Gliedmaßen sind mRamp-Transkripte vorhanden, die jedoch lokal auf den Zwischenfingerbereich begrenzt sind. In den Gewebeschnitten sind, neben der im ganzen Embryo verteilten mRamp-*in situ*-Hybridisierungssignale, besonders hohe Transkriptspiegel im Neuralrohr zu erkennen.

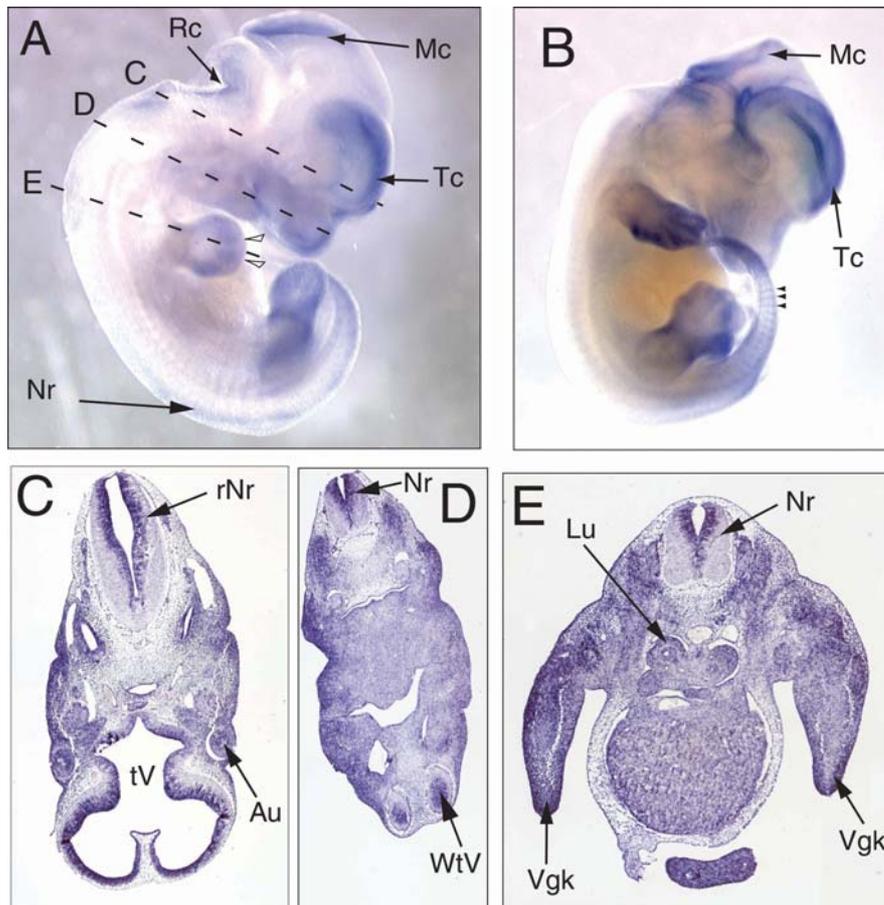


Abb 3.9 Bestimmung der Transkriptverteilung von mRamp im Embryo am Embryonaltag 11.5 und 12.5 (E11.5 und E12.5)

Darstellung der mRamp-Expression in einer whole-mount *in situ*-Hybridisierung an E11.5 (A) und an E12.5 (B) und auf transversalen Gewebeschnitten an E11.5 (C-E). (A) Starke Signale sind im

Rombencephalon, Mesencephalon und Telencephalon und im Schwanzbereich zu erkennen. In den Gliedmaßen ist im Zwischenfingerbereich eine erhöhte Expression zu beobachten (Pfeilköpfe). (B) Im Schwanz ist eine begrenzte Expression zwischen den sich entwickelnden Wirbelkörpern zu sehen (Pfeilköpfe). (C-E) Transversale Gewebeschnitte mit hohem mRamp-Spiegel im Neuralrohr und im angrenzenden Gewebe an den telencephalen Vesikeln. Au, Auge; Lu, Lunge; Nr, Neuralrohr; rNr Neuralrohr im Bereich des Rombencephalon; Vgk, Vordergliedmaßenknospe; WtV Wand des telencephalen Vesikels.

3.6.4 mRamp-Expression am Embryonaltag 14.5 (E14.5)

Die mRamp Expression ist auch am Embryonaltag 14.5 weit im Embryo verteilt (Abb.3.10). Eine besonders hohe Expression ist im späteren Cerebral-Cortex und im Thymus vorhanden. Im proximalen Bereich des Schwanzes ist zwischen dem sich entwickelnden Wirbelkörper und der Bandscheibe eine deutlich begrenzte Expression zu erkennen. In der Gliedmaßenknospe sind Transkripte besonders im Fingerspitzenbereich und im angrenzenden Bereich der späteren Gliedmaßenknochen zu beobachten. Weiterhin weisen die Leber und der Gesichtsbereich verstärkt lokal begrenzte Signale auf.

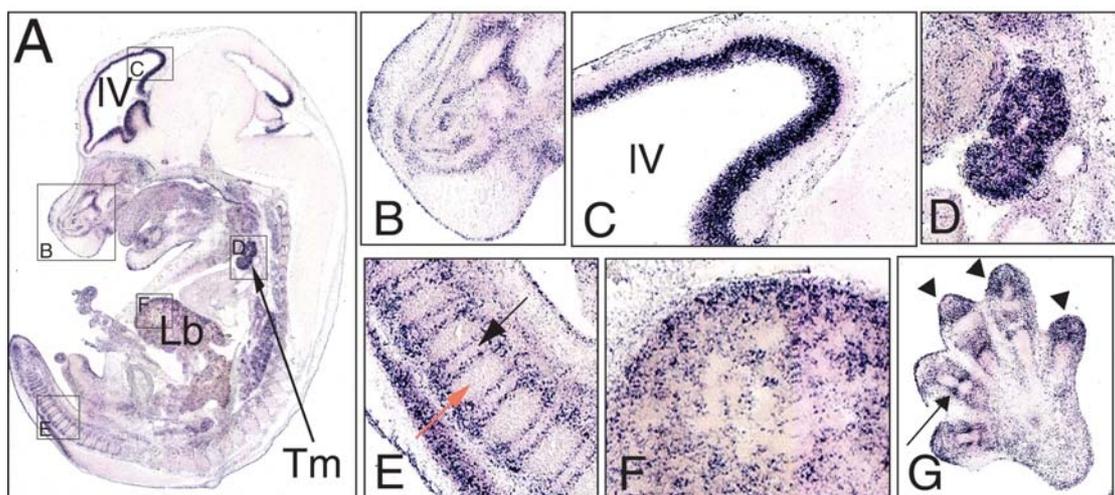


Abb 3.10 Expressionsprofil von mRamp an E14.5

Dargestellt ist eine *in situ*-Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten *antisense*-Sonden ein medialer Sagittalschnitt durch das Embryo (A) mit Ausschnittsvergrößerungen (B-F). (B) Vorderer Gesichtsbereich. (C) Lateraler Ventrikel mit starker Expression in der ventrikulären Zone. (D) Thymus. (E) Im

proximalen Bereich des Schwanzes sind deutlich erhöhte Transkriptspiegel zwischen der späteren Bandscheibe (schwarzer Pfeil) und dem Wirbelkörper (roter Pfeil) zu erkennen. (F) Transkriptverteilung in der Leber. (G) Die Vordergliedmaßenknospe mit lokal intensiverem Hybridisierungssignal in den Fingerspitzen (Pfeilköpfe) und im Bereich angrenzend an die sich entwickelnden Fingerknochen (Pfeil).

3.6.5 mRamp Expression im Kopf am Embryonaltag 15.5 (E15.5)

In Abb. 3.11 ist die mRamp Transkriptverteilung im Kopf an E15.5 dargestellt. Im Bereich der ventrikulären Zone und der Retina ist hohe Expression zu beobachten.

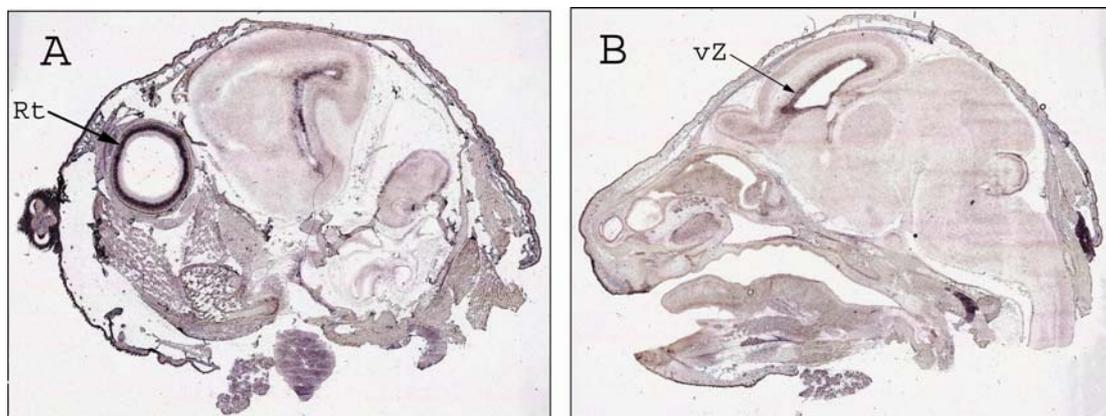


Abb 3.11 mRNA-Verteilung von mRamp im Kopf E15.5

Gezeigt ist eine *in situ*-Hybridisierung (A) Sagittalschnitt durch den lateralen Kopfbereich; (B) medialer Sagittalschnitt des Kopfes.

3.6.6 mRamp-Transkript- und Ki67-Proteinverteilung im Gehirn am postnatalen Tag 7 (P7)

Im Gehirn sind am postnatalen Tag 7 besonders in der äußeren Körnerschicht (EGL, *external granular layer*) des Cerebellums starke Hybridisierungssignale von mRamp zu erkennen, außerdem vereinzelte Signale in der weißen Substanz. Im Hippocampus, in der subventrikulären Zone und im *rostral migratory stream* sowie im *Bulbus olfactorius* und Neuroepithel der Basalkerne sind vermehrt mRamp-Transkripte zu beobachten (Abb. 3.12 A,C,E,G,I).

In einer immunhistochemischen Färbung mit einem Antikörper gegen Ki67, einen Zell-Proliferationsmarker, ist ein identisches Verteilungsmuster wie bei der mRamp-

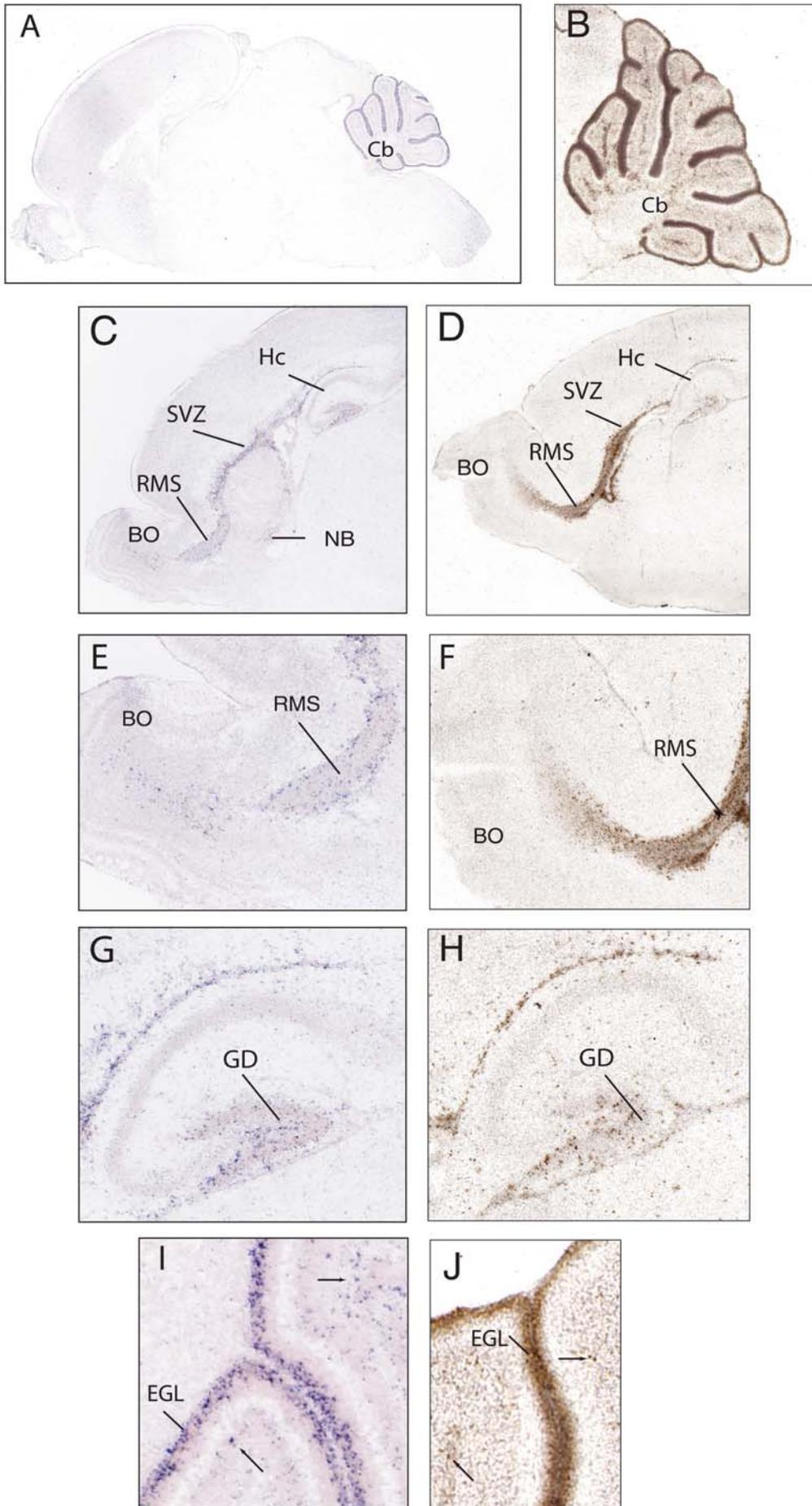


Abb. 3.12 Vergleich der Verteilung von mRamp-Transkripten mit der Verteilung von Ki67 im Maus-Gehirn am Tag 7 nach der Geburt (P7)

(A,C,E,G,I) In einer *in situ*-Hybridisierung ist die Expression von mRamp in Sagittalschnitten dargestellt. (B,D,F,H,J) Immunhistochemische peroxidasegekoppelte Färbung von Ki67.

(A,B) Medialer Sagittalschnitt durch das Gehirn bzw. Cerebellum. (C,D) Linke Hälfte eines Gehirn-Sagittalschnittes mit Hippocampus, subventrikulärer Zone, *rostral migratory stream*. Das Neuroepithel der Basalkerne ist durch leicht unterschiedliche Schnittebenen nur in C zu erkennen. (D,E) Ausschnittsvergrößerung aus C und D mit *Bulbus olfactorius* und *rostral migratory stream*. (G,H) Ausschnittsvergrößerung aus C und D mit Hippocampus und Gyrus Dentatus. (I,J) Ausschnittsvergrößerung aus dem Cerebellum. Im äußeren EGL sind starke und in der weißen Substanz vereinzelte Signale (Pfeile) zu erkennen. BO, *Bulbus olfactorius*; Cb, Cerebellum; EGL, *external granular layer* (äußere Körnerschicht); GD, Gyrus dentatus; Hc, Hippocampus; NB, Neuroepithel der Basalkerne; RMS, *rostral migratory stream*; SVZ, subventrikuläre Zone.

Transkriptverteilung zu erkennen (Abb. 3.12 B,D,F,H,J). Auffällig ist nur, daß im EGL nicht alle proliferierenden Zellen mRamp exprimieren. In Abbildung 3.12 D ist das Neuroepithel der Basalkerne nicht enthalten. Jedoch wurde in anderen Gewebeschnitten auch dort eine Färbung beobachtet (nicht gezeigt).

3.7 Klonierung des Ramp Homologes im Huhn

Am Hühnerembryo können *in ovo* während der Embryogenese direkte und lokale Manipulationen (z.B. virale Infektion oder Implementierung substanz-absondernder Kügelchen) durchgeführt werden, ohne daß das Embryo an der weiteren Entwicklung gehindert wird. Dies ermöglicht Studien, die mit dem Maus-Modell schwer oder gar nicht durchzuführen sind. Aus diesem Grund wurde für weitere funktionelle Untersuchungen das bis dahin noch unbekannte Ramp-Homolog im Huhn kloniert. Über Datenbankanalysen konnten zwei EST-Klone von *Gallus gallus* (Genbank gi 25372466 und 25398796), die Homologien zur murinen Ramp Sequenz aufweisen (200 bp und 100 bp lang), gefunden werden. Diese wurden zur Generierung von Primern für die 3' und 5' RACE PCR verwendet. Die erhaltene volle Länge der mRNA des Huhn-Homologes (im folgenden cRamp genannt) beträgt 3,4 kb und enthält einen *open reading frame* von 720 Aminosäuren. Ein Vergleich zum mRamp zeigt eine Proteinhomologie von 71% (Abb. 3.13). Auffällig ist, daß bis zur Aminosäure 390 eine höhere Homologie zu erkennen ist als im C-terminalen Sequenzbereich.

```

Maus : MLFNSVLRQPQLGLVLRNGWSSHYPLQSLLSGYQCNNDHASYGETGVPVPPFGCTFCTAPSMEHILAVANEEGFVRL : 78
Huhn : MLCRALLLRAAGHRQ----SSPLPLQHLLDGYRCSREDDHLSYGETGMPVPPFGCSFSAAPNFHVLAVANEEGFVRL : 74
      ML 6L          SS PLQ LL GY C D H SYGE G6PVPPFGC3F AP EH6LAVANEEGFVRL

      80          *          100          *          120          *          140          *
Maus : YNTESTTSKKTCTFKEWMAHNAVFDLAWVPGELKLVTAAGDQTAKFWDVVRAGELMGTCKGHQCSLKSVAFPKFKQAVF : 156
Huhn : YDTEAQNNTTLLISKEWQAHNAVFDLAWVPGELRIVTASGDQTAKVWDVRAGELLGICKGHQCSLKSVAFSRFEKAVF : 152
      YITE Q 3 K KEW AH NAVFDLAWVPE 46VTA GDQTAK WDVVRAGEL6G CKGHQCSLKSVAF 4F2KAVF

      160          *          180          *          200          *          220          *
Maus : STGGRDGNIMIWDTRCNKKDGFYRQVNIISGAHNTADKQTPSKPKKQNSKGLAPAVDSQQSVTVVLFQDENTLVSA : 233
Huhn : CTGGRDGNIMVWDTRCNKKDGFYRQVNIISGAHNVVDRQTPSKLRKRNQNRGLAPLVDLQQSVTVVLLQDEHTFISA : 230
      TGGRDGNIM6WDTRCNKKDGFYRQVNIISGAHN D4QTPSK 4KK QN 4GLAP VD QQSVTVVLL QDE T 6SA

      240          *          260          *          280          *          300          *
Maus : GAVDGIKIVWDLRKNYTAAYRQEPFIAKSKFLYPGTSTRKLGYSLVLDSTGSLFANCTDDNIYMFNMTGLKTSFPAVAVF : 311
Huhn : GAVNGVIKIVWDLRKNYAAAYRQEPVPSKSFYPGTSTRKLGYSLVLDSTGANLAFANCTDDSIYMFNMTSLKTFPVAVAVF : 308
      GAVIGVIKIVWDLRKNY AYRQ P6 SKSF YPGTSTRKLGYSLVLDSTG LFNANCTDD IYMFNMT LKT PVAVAVF

      320          *          340          *          360          *          380          *
Maus : NGHQNSTFYVKSSSLPDDQFLISGSSDEAAIYIWKVSMNHPPTVLLGHSQEVTSVWCWCPSDFTKIATCSDDNNTLKIWR : 389
Huhn : SGHQNSTFYIKSSIPDDQFLVSGSSDCNAYIWKVSEPSLPPRLVGHQEVTSIAWCWCPSDFTKIATCSDANTVRIWR : 386
      GHQNSTFY6KSS6SPDDQFL6SGSSD AYIWKVVS P PP 6L6GHSQEVTS6 WCWCPSDFTKIATCSD NT64IWR

      400          *          420          *          440          *          460          *
Maus : LNRGLEEKPP--GKRHSIVGWTISQKKREVKACPVTVPSQSTPAKAPRAKSPSISPPSSAAACTPSCAGDLPLPSSTPT : 465
Huhn : LQHYPDEEKSVSNRAKLVGWVITQKKPEEQRGAGRSASQSTPAKA-FSVGSPCASSPRPAACAPSYSGDLPLSTNTPT : 463
      L EE 1K 6VGW 3QKK E S QSTPAKA SP SSP AAC PS GDLPL 3 TPT

      *          480          *          500          *          520          *          540          *
Maus : FSVKTPPATRSVSRRCISISSVSPKPLSFKMSLRNWWTRTPSSPPVTPPASETKISSPRKALIPVSOKSSQADAC : 543
Huhn : VSLKQMAATCTPAKLSGASPRTPSPKLVPSKMSIKHWARTPCSSPEV-----GKKTSPRKALAEVTSLETSST : 536
      S6KT AT 3 G SPK 6 S KMS64 W6 RTP SSP V K SPRKAL V3Q 2

      *          560          *          580          *          600          *          620          *
Maus : -----SESRNRVKRRRLDSSCLESVKQKCVKSCNVCVTELDGQAESLRDLDCISLQSGTQEV-----LSQDSEGFTH : 606
Huhn : PKAQHSQAERAKRRRLDCKSEDEAGQKCLQDCSCVTELDHVAKKSRLNLCHEAAGQRACDEGSLSLADLDNEHEDSTH : 614
      S2 R KRRLD S QKC6 C CVTELD A 4LILC L Q L E T

      *          640          *          660          *          680          *          700          *
Maus : SSKTEGAGTSISEPSPVSPYASEGCGPLPLPLRPGEGSEMVMKENSPPENKNWLLATAAKRKAENSPPRSPSSQT : 683
Huhn : SPK-----ELSPGSLVNPSCGT--TTPVQLQSPCCERDSDIVDKENSPPERKNWLLAAGEKLRITGKAGSP--PSSYT : 682
      S K 6S P S V P 32 P P6 PC S 6V KENSPE KNWL A6 K R SP PSS T

      *          720          *          740          *
Maus : PSSRRQS---CKTSPGPVVTIIPSSMRKICTYFRKKTQDDFCSPHSTEL : 730
Huhn : SSAKROEAAVGTSTPKTAVNIVSMRKICTYFRKRPON----- : 720
      S 4RQ G TSP V T SMRKICTYF RK QI
    
```

Abb. 3.13 Proteinhomologie von Maus- und Huhn-Ramp

Vergleich der vollständigen Aminosäuresequenzen von Maus und Huhn-Ramp. Konservierte Aminosäuren haben schwarz unterlegte Buchstaben.

3.7.1 cRamp-Expression im Huhn, Hamburger-Hamilton-Stadium 22 (HH22)

Ein Vergleich der Expression des cRamp im Huhn HH-Stadium 22 (Hamburger & Hamilton, 1951) mit der mRamp Expression in der Maus am Embryonaltag 10.5 (Abb. 3.8) in einer whole mount *in situ*-Hybridisierung zeigt große Ähnlichkeiten (Abb. 3.14). cRamp-Transkripte sind im ganzen Embryo verteilt und weisen in den Gliedmaßenknospen ein erhöhtes Hybridisierungssignal auf. Über die Expression im Kopfbereich läßt sich über die whole mount *in situ*-Hybridisierung keine Aussage treffen, da auch die *sense*-Kontrolle dort Signal zeigte.



Abb.3.14 cRamp Expressionsprofil HH22

(A) Whole mount *in situ*-Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten *antisense*- (rechtes Embryo) und *sense*-Sonden (linkes Embryo). (B) Vordergliedmaße. (C) Hintergliedmaße.

3.7.2 cRamp Expression in mit PKC-Inhibitor behandelten Gliedmaßenknospen

PKCs (Protein Kinase C) sind eine Subfamilie der Serin/Threonin-Proteinkinasen. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Zell-Proliferation, Differenzierung und bei anderen zellulären Funktionen (Nishizuka, 1986). Es wurde gezeigt, daß PKCs mit dem Retinsäure-Signaltransduktionsweg interagieren bzw. ihn beeinflussen können. Im murinen PKC α -Promotor konnte ein *retinoic acid response element* (RARE) nachgewiesen werden (Desai et al., 1999). In B16 Maus Melanom-Zelllinien reguliert PKC den Retinsäurerezeptor α (RAR α) (Boskovic et al., 2002). Eine PKC-Inhibition bewirkt eine starke Reduzierung der Halbwertszeit des RAR α -Proteins. Zur Untersuchung, ob PKC-Inhibition zu einer Reduzierung der cRamp-Transkription führt, wurden Hühnerembryonen an HH14 in *Chelerythrin Chlorid* (PKC-Inhibitor; 6,5mM) getränkte Kügelchen im lateralen Mesoderm auf Höhe des 15. und 20. Somiten implantiert. 48 Stunden später (HH22-23) wurden die Embryonen entnommen und in einer *in situ*-Hybridisierung auf die Expression von cRamp untersucht (Abb. 3.15). In der behandelten Vordergliedmaßenknospe ist die Expression des cRamp nicht mehr zu erkennen, während in der unbehandelten Gliedmaßenknospe eine unveränderte cRamp Expression zu sehen ist.



Abb. 3.15 Inhibition der cRamp Expression durch *Chelerythrin Chlorid* während der Gliedmaßenentwicklung

Dargestellt ist eine whole-mount *in situ*-Hybridisierung für cRamp in der Vordergliedmaßenknospe Stadium 22 (HH), 48 Stunden nach der Behandlung mit *Chelerythrin Chlorid* (PKC-Inhibitor), welches durch Kügelchen abgegeben

wurde (Stern). In der rechten behandelten Vordergliedmaßenknospe ist keine Expression des cRamp mehr zu erkennen. Die linke unbehandelte Gliedmaßenknospe zeigt eine normale cRamp Expression.

3.7.3 mRamp Überexpression in der Hühnergliedmaßenknospe

Zur Untersuchung der Funktion des mRamp wurde es in der Vordergliedmaßenknospe überexprimiert und auf morphologische Veränderungen hin untersucht. Aus dem Expressionsmuster des mRamp im sich entwickelnden Embryo und in den adulten Geweben sowie aus den Studien zum hRamp (Cheung et al., 2001), in denen gezeigt wurde, daß Ramp in NT2-Zellen die Proliferation um 10-30% aktiviert, läßt sich vermuten, daß Ramp eine Aufgabe in der Zellproliferation hat. Deshalb wurde besonders auf verändertes Größenwachstum der Gliedmaßenknospe geachtet. mRamp wurde mit Hilfe eines replikationskompetenten Vogelretrovirus in der Huhnvordergliedmaßenknospe überexprimiert (Logan & Tabin, 1998). Für dieses Experiment wurde das murine Ramp verwendet, da über Datenbanken die Nukleotidsequenz überprüft werden konnte und somit ungewollte Mutationen, die zu nicht funktionsfähigen Proteinen führen können, vermieden wurden. Des weiteren wurde eine Überprüfung der Infektion über eine *in situ*-Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten *antisense*-Sonden ermöglicht, die nicht mit cRamp-Transkripten hybridisieren. Im Stadium HH7 wurde im rechten Gliedmaßenfeld das Viruskonstrukt injiziert. 48 Stunden später erfolgte die Entnahme einiger Embryonen zur Feststellung des Infektionserfolges (Abb. 3.16). Die übrigen Embryonen wurden bis zu 5 Tage nach der Infektion im Brutofen belassen. Ein Vergleich der infizierten rechten Gliedmaßenknospe mit der uninfizierten linken zeigte keine Veränderung des Größenwachstums oder der Morphologie bis 5 Tage nach der Infektion.



Abb. 3.16 mRamp Überexpression in der Huhngliedmaßenknospe Stadium HH23.

Gezeigt ist eine whole-mount *in situ*-Hybridisierung für mRamp im Hühnerembryo 48 Stunden nach der Infektion mit einem mRamp-enthaltenden replikationskompetenten Vogelvirus. Dorsale Ansicht mit hohen mRamp-Transkriptspiegel in der rechten Vordergliedmaßenknospe (Pfeil). Die linke Gliedmaßenknospe ist nicht infiziert. Der Wirbelsäulenbereich (Pfeilköpfe) wird häufig mitinfiziert.

4 Diskussion

In vielen Stadien der Embryonalentwicklung spielt Retinsäure eine wichtige Rolle. Sie kontrolliert Prozesse wie Proliferation, Differenzierung Morphogenese und Apoptose. In der Gliedmaßenentwicklung ist sie für den Auswuchs und die Bildung der antero-posterioren Achse essentiell. Retinsäureüberschuß zwischen Tag 10.5 und 11.5 p.c. verursacht diverse Mißbildungen der Gliedmaßen. Diese Effekte werden über RAR-Rezeptoren vermittelt. Mißbildungen, die an den RAR α -Subtyp gekoppelt sind, weisen die stärksten Fehlbildungen auf. Der dabei zugrunde liegende Signaltransduktionsweg und die Zielgene der Retinsäure sind jedoch noch nicht bekannt. Um neue Erkenntnisse über die Wirkung der Retinsäure auf die Gliedmaßenentwicklung zu gewinnen, die spezifisch über den RAR α -Rezeptor vermittelt werden, wurde eine Subtraktionsanalyse durchgeführt. Mit mRamp wurde ein neues durch Am580, einem α -Rezeptor spezifischen Agonisten, induziertes Homolog in der Maus isoliert und auf Expression und Funktion in der Embryonalentwicklung hin untersucht.

4.1 Expression und mögliche Funktion von mRamp

mRamp ist das Maus-Homolog des humanen Ramp (retinoic acid regulated nuclear matrix associated Protein; hRamp), welches bisher in nur einer Veröffentlichung beschrieben wurde (Cheung et al., 2001) und zu dem es eine Aminosäurehomologie von 93% besitzt. Hier wurde gezeigt, daß mRamp während der Embryogenese der Maus (von E4.5 bis E18.5) durchgehend exprimiert wird. In *in situ*-Hybridisierungs-Studien ist in jungen Stadien eine ubiquitäre Expression zu beobachten, die im Laufe der weiteren Entwicklung stärker begrenzt ist. Die Expressionsanalysen legen nahe, daß mRamp eine wichtige Aufgabe während der gesamten Entwicklung des Embryos besitzt.

Dies wird unterstützt durch Betrachtung der Homologe von *D. melanogaster* und *Danio rerio* (Zebrafisch) in der Embryonalentwicklung. Das Homolog l(2)dtl von *D. melanogaster*, welches allerdings nur eine Homologie von 58% zu den ersten 390 Aminosäuren besitzt, ist ebenfalls während der gesamten Embryogenese exprimiert. Mutationen in diesem Gen führen zu früher embryonaler Lethalität (Kurzik-Dumke et al., 1996). Das Zebrafisch-Homolog (*Danio rerio* denticles-like protein(dtl)), dessen Sequenz jüngst veröffentlicht wurde (gi:21105424) und eine Homologie von 60% zum mRamp aufweist, ist ebenfalls essentiell für die frühe Embryonalentwicklung (Golling et al., 2002).

Die genaue Funktion des mRamp-Proteins läßt sich bisher nur vermuten. Die hohe Homologie des murinen zum humanen Ortholog läßt eine gleiche Funktion beider Proteine erwarten. Diese Annahme stützt ein Vergleich der in der Veröffentlichung in Northern Blot-Analysen gezeigten humanen Ramp-Expression in fetalen Geweben (Niere, Leber, Milz, Thymus und Lunge) (Cheung et al., 2001) mit den in dieser Arbeit durchgeführten *in situ*-Hybridisierungen von mRamp mit Mausembryonen, der keine Unterschiede zeigte. In jedem dieser Gewebe ist eine deutliche Expression zu beobachten. In humanen adulten Geweben sind in Hoden und Thymus besonders hohe Transkriptspiegel beschrieben (Cheung et al., 2001). Identisches wurde hier auch in adulten Mausgeweben gezeigt.

Studien über hRamp in einer humanen embryonalen karzinomen Zelllinie (NT2) ergaben, daß es im Zytoplasma in geringer und im Nukleus in hoher Konzentration

lokalisiert ist. Die subzelluläre Verteilung läßt vermuten, daß es mit der nukleären Matrix assoziiert ist. Während der Mitose und Zytokinese verteilen sich Matrix assoziierte Proteine normalerweise um. Untersuchungen zeigten eine starke Ramp-Immunoreaktivität im Nukleus und eine geringe im Zytoplasma in der Interphase. Während der Pro-Metaphase und Metaphase war Ramp von den kondensierten Chromosomen ausgeschlossen und nur im Zytoplasma vorhanden. In der Anaphase ist Ramp in der Mittelzone der sich teilenden NT2-Zelle konzentriert und in der Telophase wurde Ramp im Zytosol der Tochterzellen beobachtet.

Des weiteren führte eine Überexpression von hRamp in NT2-Zellen zu einer erhöhten Zellproliferation (10-30%). Somit lassen diese Beobachtungen vermuten, daß hRamp eine Rolle in der Zytokinese spielt.

Auch in den Untersuchungen zu l(2)dtl wird aufgrund der Genlokalisierung zwischen anderen am Zellzyklus beteiligten Genen auf dem Chromosom vermutet, daß dieses darin beteiligt ist (Kurzik-Dumke et al., 1996).

Das Expressionsmuster von mRamp im Mausembryo widerspricht dieser Annahme nicht. Deutlich zu beobachten sind sehr hohe Transkriptspiegel in Regionen starker Zellproliferation wie im Embryo, z. B. in den ventrikulären Zonen, im Thymus oder im postnatalen Gehirn (P7) in der äußeren Körnerschicht (EGL) des Cerebellums.

mRamp-Expression im Gehirn am postnatalen Tag 7 und die Verteilung des Proteins Ki67, eines Proliferationsmarkers, zeigen ein identisches Muster. Dies erhärtet die Annahme, daß mRamp (zumindest im neuralen Gewebe) nur in proliferierenden Zellen exprimiert ist und somit eine Funktion in der Zytokinese ausüben könnte. Auffällig ist jedoch, daß im EGL nicht alle proliferierenden Zellen eine mRamp-Expression zeigen. Dies könnte damit zusammenhängen, daß mit dem Proliferationsmarker Ki67 proliferierende Zellen in jeder Phase nachgewiesen werden, mRamp aber vielleicht nur während einer bestimmten Phase der Zellteilung exprimiert wird.

In Überexpressionsexperimenten von mRamp in Hühnergliedmaßenknospen mit Hilfe eines replikationskompetenten Virus konnte jedoch keine proliferationsaktivierende Wirkung beobachtet werden. Dies indiziert, daß mRamp *in vivo* nicht proliferationsaktivierend wirkt oder nur in so geringem Maße, daß kein verstärktes Wachstum der Gliedmaßenknospe bis 5 Tage nach der Infektion zu beobachten ist. Es ist hier allerdings zu berücksichtigen, daß das Mausprotein im Huhn überexprimiert wurde. Trotz hoher Homologie sind unterschiedliche Funktionen möglich. Außerdem

widerspricht das Ergebnis nicht der Annahme, daß mRamp an der Zytokinese beteiligt ist. Es könnte darin eine Funktion ausüben, ohne selbst proliferationsaktivierend zu wirken.

4.2 Betrachtung potentieller Zusammenhänge von mRamp und RAR α durch Expressionsvergleich

4.2.1 Während der Entwicklung

Daß über den RAR α -Rezeptor mRamp in der Gliedmaßenknospe induziert werden kann, wurde in dieser Arbeit gezeigt. Jedoch könnte auch ein Zusammenhang zwischen RAR α und mRamp in anderen embryonalen Geweben bestehen. Wie mRamp ist RAR α während der Embryogenese nahezu ubiquitär exprimiert (Dolle et al., 1990; Ruberte et al., 1993). Somit könnte mRamp an der Entwicklung des Embryos in allen Bereichen zusammen mit RAR α wirken. Zur Expression von RAR α im Gehirn gibt es widersprüchliche Angaben: In einer Studie mit neugeborenen Jungtieren konnte im Cerebellum der Ratte in einer Northern Blot-Analyse kein RAR α nachgewiesen werden (Yamamoto et al., 1999). Jedoch zeigte eine *in situ*-Studie (im Gehirn adulter Ratten) eine deutliche Übereinstimmung mit der RAR α Expression im Cerebellum, im Hippocampus und *Bulbus olfactorius* (Zetterstrom et al., 1999). Eine *in situ*-Hybridisierungs-Co-Lokalisationstudie von mRamp und RAR α im postnatalen Gehirn (Tag 7) könnte genauere Aufschlüsse geben. Somit ist ein funktioneller Zusammenhang zwischen RAR α und mRamp im sich entwickelnden postnatalen Gehirn nicht ausgeschlossen.

4.2.2 In adultem Thymus und Hoden

In adulten Geweben konnte besonders hohe mRamp-Expression im Thymus und Hoden beobachtet werden. In beiden Geweben wird auch RAR α exprimiert. Das Vitamin A-Defizienz zu einer geschwächten Immunkompetenz führt, die durch

Verabreichung von Retinol aufgehoben werden kann, ist bekannt (Ross & Hämmerling, 1994), die Grundlage der Wirkung jedoch nicht. Gezeigt wurde bisher, daß $RAR\alpha$ (jodoch nicht $RAR\beta$ und $RAR\gamma$) in während der Thymocyten-Entwicklung exprimiert ist (Yagi et al., 1997). Retinsäure steigert die Frequenz der sich entwickelnden T-Zellen, in dem es vermutlich den Prozeß der negativen Selektion der T-Zell Differenzierung inhibiert (Yagi et al., 1997). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte das Retinsäure die Apoptose von Thymocyten inhibiert (Szondy et al., 1998).

Im Hoden wiederum konnte gezeigt werden, daß der $RAR\alpha$ -Rezeptor essentiell für die Spermatogenese ist (Garbe et al., 1992).

In beiden Geweben ist somit ebenfalls eine Signaltransduktion von Retinsäure über den $RAR\alpha$ Rezeptor zu mRamp möglich.

4.3 Analyse der Motive in der Proteinsequenz

Die Untersuchung der Proteinsequenz auf bestimmte Motive und deren Vergleich unter den Homologen ermöglicht weitere Aussagen über die mögliche Funktion und Regulation von Ramp. Es muß jedoch erwähnt werden, daß nur Teile der Nukleotidsequenz von cRamp in EST-Datenbanken enthalten sind und somit auf Fehler untersucht werden konnten. Da die Nukleotidsequenz der cRamp mRNA über die PCR-Reaktion erhalten wurde, sind einzelne Punktmutationen nicht ausgeschlossen. Obwohl die Fehler selten sind, kann dies an vereinzelt Aminosäure-Positionen zu einer fehlerhaften Proteinsequenz führen.

Der Vergleich der Proteinsequenz von mRamp mit hRamp zeigt, daß alle über Datenbankanalysen (*Protein-Prediction-Search* auf dem PSORT- und EBI-Server) gefundenen vorhergesagten Motive und Domänen des hRamp auch im mRamp zu finden sind. Dementsprechend treffen die dort gewonnenen Erkenntnisse aus der Proteinsequenz auch auf das murine Ramp zu.

Obwohl mRamp ein putatives nukleäres Lokalisationssignal an Position 197 (PSKPKKK) enthält (wie auch Mensch-, Huhn- und Zebrafisch-Homolog) und laut Vorhersage mit einer Verlässlichkeit von 94% nukleär lokalisiert ist (Reinhardt & Hubbard, 1998) konnte beim humanen Ramp gezeigt werden, daß es auch in geringer Konzentration im Cytosol zu finden ist.

Es enthält des weiteren eine putative DNA-bindende Domäne mit einem Leucin-Reißverschluß-Motiv im Sequenzbereich 576-597, welches in einer großen Gruppe von Transkriptionsfaktoren vorkommt. Das humane Homolog weist diese Domäne ebenfalls auf; beim Huhn ist an einer entscheidenden Stelle ein Leucin gegen ein Serin ausgetauscht. Eine Überprüfung ob mRamp eine aktive DNA-bindende Domäne besitzt, könnte mit Hilfe eines *Gel-shift*-Experimentes erfolgen.

WD- und WD40-Wiederholungen, die erstmals in der β -Untereinheit von G-Proteinen gefunden wurden, sind in allen Homologen vorhanden. Diese Domäne erleichtert Protein-Protein-Interaktionen und ist in vielen im Zellzyklus involvierten Proteinen wie chromatin assembly factor I, retinoblastoma-binding protein und Cd20/fizzy (Kaufman et al., 1995; Qian & Lee, 1995; Yudkovsky et al., 2000) enthalten.

Das LXXLL-Motiv kommt in den humanen, murinen, Huhn- und Zebrafisch-Homologen vor und ist für Interaktionen mit nukleären Rezeptoren notwendig. Es wurde gezeigt, daß dieses Motiv essentiell für die Assoziation des Thyroid Hormon Rezeptor-bindende Protein mit dem aktivierten Thyroid Hormon-Rezeptor und dem Retinsäure-Rezeptor ist (Ko et al., 2000).

Ein weiteres interessantes prolinreiches Motiv mit der Konsensussequenz PXXP ist an der Position 636-640 (mRamp). Dieses im humanen und murinen Ramp vorhandene Motiv ist an der Bindung an die SH3-Domäne in Proteinen beteiligt.

Mit einem hohen Serin/Threoninanteil, der über 20% liegt, könnte mRamp je nach Phosphorylierungsgrad unterschiedliche Funktionen ausüben. Daß hRamp phosphoryliert wird, wurde beobachtet aber nicht näher beschrieben (Cheung et al., 2001). Welche Proteinkinasen daran beteiligt sind, ist jedoch noch unbekannt. Die Proteinsequenz des mRamp weist 3 potentielle cAMP abhängige, 11 CK2- und 25 PKC-Phosphorylierungsstellen auf. Je stärker die Position eines Motivs in der Evolution konserviert ist, desto wahrscheinlicher ist es, daß sie tatsächlich eine Funktion hat bzw. eine wichtige Rolle spielt. Die potentiellen cAMP-abhängigen Phosphorylierungsstellen im mRamp sind nicht im Huhn- und Zebrafisch-Homolog vorhanden, und nur eine Position ist identisch zum humanen Ramp, welches ebenfalls 3 potentielle cAMP-Phosphorylierungsstellen aufweist. Somit ist die Beteiligung cAMP-abhängiger Proteinkinasen an der mRamp-Phosphorylierung eher unwahrscheinlich. CK2-Phosphorylierungsstellen an den Aminosäure-Positionen 42, 557, 574, und 654 treten in den Spezies Mensch, Maus und Huhn auf, an der Position 326 zusätzlich noch im Zebrafisch und an Position 336 in allen Homologen außer

Zebrafisch. Über alle 5 Spezies findet sich nur an Position 378 eine CK2-Phosphorylierungsstelle. Von den 25 möglichen PKC-Phosphorylierungsstellen im mRamp sind 3 in allen fünf Spezies (Position 121, 142 und 269) und weitere 9 in Mensch, Maus und Huhn (Position 85, 384, 409, 567, 489, 495, 499, 525 und 705) vorhanden. Somit ist auch die Beteiligung von PKC an der Phosphorylierung durchaus möglich. Über *Gel shift*-Experimente mit radioaktiver Phosphorylierung könnte nachgewiesen werden, ob mRamp phosphoryliert wird. Sollte dies der Fall sein, könnte durch Einführung gezielter Punktmutationen an den hoch konservierten Phosphorylierungspositionen über auftretenden Veränderungen des Phosphorylierungsgrades eine Aussage über die tatsächlichen Positionen der Phosphorylierungsstellen erhalten werden.

Von den 4 potentiellen Asn-Glykosylierungsstellen ist jene an Position 316, außer beim Zebrafisch, bei allen Spezies vorhanden. Eine weitere an Position 248 tritt nur in der Huhn-Sequenz nicht auf. Da sich jedoch von Aminosäure 232-253 eine hoch konservierte Region befindet (über alle 5 Spezies) mit einer Aminosäureveränderung im Huhn im Asn-Glykosylierungsmotiv, könnte dies, wie oben beschrieben, aus einem Fehler in der PCR-Reaktion resultieren. Eine Asn-Glykosylierungsstelle an Position 299 und 289 ist in Mensch, Maus, Huhn und Zebrafisch vorhanden. Da die Effekte von Glykosylierungen auf die Proteineigenschaften sehr vielfältig sein können, wie z.B. Einfluß auf physikalische Stabilität, Protease-Resistenz oder Proteinfaltung, läßt sich nicht sagen, welche Auswirkung die Glykosylierung auf mRamp haben könnte. Daß Ramp tatsächlich glykosyliert wird unterstützt eine Western Blot-Analyse in der Studie zum humanen Ramp, in der eine 180 kDa Bande beobachtet wurde, die möglicherweise ein glykosyliertes Ramp repräsentiert.

4.4 PKC - ein potentielles regulatorisches Element der Ramp-Expression

Die Experimente mit dem PKC-Inhibitor *Chelerythrin Chlorid* in der Huhngliedmaßenknospe, welcher alle PKC-Isoformen inhibiert, zeigten eine mögliche Rolle der PKC in der Regulation der Ramp-Expression. Nach Behandlung der Gliedmaßenknospe mit *Chelerythrin Chlorid* ist eine deutliche Reduzierung der Expression von cRamp zu erkennen. Es läßt sich daraus aber nicht ableiten, daß PKC direkt die Transkription von Ramp reguliert. Dies könnte auch ein sekundärer Effekt sein. PKC hat viele Aufgaben, u. a. ist es auch an der Zellproliferation beteiligt (Nishizuka, 1989). Wird PKC inhibiert, geht die Zellproliferationsrate stark zurück, und in der Gliedmaßenentwicklung kommt es zu verkleinerten Gliedmaßenknospen. Dadurch könnte auch die Ramp Expression beeinflußt sein.

Jedoch ist auch ein direkter Einfluß durch Verbindung von PKC und Retinsäure-Signaltransduktionsweg auf die Ramp-Transkription möglich. Wie in Studien gezeigt, gibt es Zusammenhänge zwischen PKC und Retinsäure. Die Isoform des murinen PKC α - enthält im Promotor ein *retinoic acid response element* (RARE) (Desai et al., 1999), und in B16-Maus-Melanom-Zelllinien reguliert PKC den Retinsäurerezeptor α (RAR α) (Boskovic et al., 2002). Inhibition von PKC bewirkt eine starke Reduzierung der Halbwertszeit des RAR α -Proteins. Da mRamp in der Gliedmaßenknospe der Maus über den RAR α -Rezeptor induziert werden kann, ist durchaus denkbar, daß eine mögliche Reduzierung des RAR α -Rezeptors durch eine PKC-Inhibition zu der beobachteten Reduzierung der cRamp-Transkription führen kann. Bei der Annahme, daß Ramp in der Zytokinese eine wichtige Funktion ausübt, könnte die Reduzierung oder Inhibierung von Ramp somit zu der verminderten Zellproliferation führen.

4.5 Teratologische Betrachtung

Wie aus dem Expressionmuster verschiedener Embryonalstadien der Maus zu erkennen, ist die Funktion von mRamp nicht auf die Gliedmaßenentwicklung beschränkt. Sofern mRamp eine Rolle in der Ausbildung teratogener Effekte spielt, könnte es im Zusammenhang mit RAR α auch bei anderen Mißbildungen als denen der Gliedmaßen beteiligt sein. Experimente mit einer Verabreichung von Am580 zeigten - der ubiquitären Expression des RAR α entsprechend - stark unterschiedliche teratogene Effekte in der Embryonalentwicklung. Mißbildungen des Auges, Ohrs, Kiefers, Gaumens sowie Spina bifida, Schwanz- und verschiedene Gliedmaßendefekte treten auf. Da auch mRamp in diesen Geweben exprimiert wird, ist dort eine Vermittlung teratogener Effekte durch Retinsäure über den RAR α Rezeptor und mRamp möglich.

Ein Vergleich der Transkriptverteilung von RAR α und mRamp in der Gliedmaßenentwicklung zeigt große Übereinstimmung (Dolle et al., 1989). Während der Gliedmaßenentwicklung von Tag 9.5 p.c. an reduziert sich die RAR α -Expression immer mehr und ist auf das Mesenchym um die sich entwickelnden Knorpel und den Zwischenfingerbereich begrenzt, entsprechend dem Expressionsmuster von mRamp. Dies unterstützt die Hypothese, daß mRamp im Signaltransduktionsweg von Retinsäure über den α -Rezeptor zur Ausbildung teratogener Effekte in der Gliedmaßenknospe beteiligt sein könnte. Es stellt sich die Frage, was genau eine erhöhte mRamp-Transkriptionsrate in der Gliedmaßenentwicklung bewirkt. Bei teratogenen Effekten wie den Knochen-verkürzungen in verschiedenen Bereichen der Gliedmaßenknospe (siehe Einleitung 1.3) könnte eine zu hohe mRamp-Konzentration zum entscheidenden Zeitpunkt die Differenzierung von Zellen verhindern und somit zum Fehlen bestimmter Strukturen führen. Es ist schon länger bekannt, daß Retinsäure die Chondrogenese inhibiert (Von Schroeder et al., 1994). Dies geschieht in der Gliedmaßenknospe vermutlich über den RAR α -Rezeptor, der ein wichtiger Regulator in der Chondrogenese in der Gliedmaßenknospe der Maus ist (Cash et al., 1997). Es wurde gezeigt, daß eine ektopische Expression von RAR α in der Gliedmaßenknospe zu den gleichen teratogenen Effekten führte wie die Verabreichung von Am580 und daß der Verlust von RAR α vermutlich ein wichtiges regulatorisches Element für die Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu

Chondrocyten ist. Chondrocyten-Vorläuferzellen, die RAR α exprimieren, können nicht zu Chondrocyten differenzieren, die kein RAR α mehr exprimieren.

Mit mRamp könnte hier ein wichtiges Zielgen der Retinsäure identifiziert sein, das diese Effekte vermittelt. Eine Verabreichung von Am580 bewirkt eine Erhöhung der mRamp-Transkription im Mesenchym und könnte somit eine Verzögerung oder Inhibierung der Chondrogenese, was wiederum eine normale Skeletogenese stört, hervorrufen. Eine mögliche zusätzliche Induktion von RAR α durch Am580 (RAR α kann durch Retinsäure aktiviert werden (Song & Siu, 1989)) könnte so diesen Effekt noch verstärken.

Zur Untersuchung der Hypothese, daß mRamp an RAR α -induzierten teratogenen Effekten beteiligt ist, könnte eine transgene Maus, in der mRamp ektopisch in den Gliedmaßenknospen exprimiert wird (z.B. unter Verwendung des Hoxb-6 Promotors (Cash et al., 1997)), auf übereinstimmende teratogene Effekte untersucht werden. *Micromass*-Zellkulturexperimente mit Maus-Gliedmaßenknospen könnten Aufschluß darüber geben, ob mRamp ebenfalls nicht in Chondrocyten exprimiert wird und ob die Chondrogenese in transgenen Zellkulturen inhibiert ist.

In den Studien zum humanen Ramp in der NT2-Zelllinie führte eine langfristige Retinsäurebehandlung nach transienter Induktion des mRamp nach einem Tag zur Herunterregulierung der mRamp-Expression, die jedoch sehr deutlich erst am 7. Tag der Behandlung zu erkennen ist. Retinsäure leitet hier die Differenzierung der NT2-Zellen ein. Nach kurzfristiger Proliferationssteigerung nach einem Tag der Retinsäurebehandlung ging die Zellproliferationsrate am 3. und 4. Tag wieder zurück. Ob es einen solchen längerfristigen Reduzierungseffekt nach einmaliger Retinsäure- bzw. Am580-Behandlung auch bei der mRamp-Expression in der Gliedmaßenknospe gibt, bleibt zu klären. Eine solche Annahme würde zu einer entgegengesetzten Interpretation führen. Retinsäure reduziert in diesem Fall mRamp und die Zellproliferation in der entscheidenden Phase der Gliedmaßenausbildung, so daß nicht genug Gewebe entsteht, aus dem vollständige Gliedmaßen differenzieren können.

Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß hier eine neuronale Zelllinie untersucht und Retinsäure langfristig verabreicht wurde, weshalb diese Ergebnisse nicht unbedingt auf den Organismus übertragbar sein müssen.

Während der postnatalen Entwicklung des Gehirns wurde gezeigt, daß eine neonatale Verabreichung von Retinsäure im Cerebellum der Ratte kleine Veränderungen im Muster hervorruft (Holson et al., 1997; Yamamoto et al., 1999). Der Haupteffekt der dabei beobachtet wurde war eine fleckenartige Verminderung der Körnerzellen der äußeren Körnerschicht (EGL), was vermuten ließ, daß Retinsäure hier zur Inhibierung der Zellproliferation oder zum Zelltod führt. Bei der Annahme, daß diese Ergebnisse auf die Maus übertragen werden können, ist jedoch eine Involvierung des mRamp über den RAR α -Rezeptor nicht abschätzbar, da wie unter 4.2 erwähnt die Expression von RAR α in der Cerebellumentwicklung nicht eindeutig geklärt ist. Somit ist bisher eine Beteiligung von mRamp an der Wirkung von Retinsäure im Cerebellum nicht ausgeschlossen.

In dieser Arbeit wurde mit mRamp ein neues Am580 induziertes Homolog isoliert, das im Embryo weit exprimiert ist, besonders hohe Transkriptspiegel in Regionen hoher Zellproliferation aufweist und im Gehirn postnatal Tag 7 ebenfalls in Bereichen mit Zellproliferation vorkommt. Die gewonnenen Erkenntnisse unterstützen die Hypothese, daß Ramp an der Zytokinese beteiligt ist. Daß es eine essentielle Funktion in der Embryogenese besitzt (wie die Homologe von *D. Melanogaster* und *Dario rerio*), kann bisher nur vermutet und muß noch durch eine *knock out*-Studie belegt werden.

Ein mögliches regulatives Element der Ramp-Transkription ist PKC. PKC-Inhibierung inhibiert die Ramp-Transkription im Huhn. Des weiteren könnte PKC auch die Funktion des Proteins regulieren. Aus dem Homologievergleich geht hervor, daß das Protein 3 hoch konservierte PKC-Phosphorylierungsstellen besitzt. Ob mRamp wie hRamp phosphoryliert werden kann und an welchen Stellen, ist noch zu zeigen. Die regulatorischen Mechanismen sind ebenfalls noch zu klären.

Zur Aufklärung der Mechanismen, die teratogenen Effekte (hier im speziellen der Gliedmaßenknospe) von Retinsäure über den RAR α -Rezeptor hervorrufen, könnte mit der Isolierung von mRamp ein wichtiges Element entdeckt worden sein. Jedoch bleibt letztendlich die genaue Rolle von mRamp in der Am580 induzierten Teratogenität in der Gliedmaßenentwicklung noch zu klären.

5 Zusammenfassung

Retinsäure, das biologisch aktive Vitamin A Derivat, ist für die normale embryonale Entwicklung essentiell. Analoge der Retinsäure, inklusive Retinsäure selber, können in vielen verschiedenen Tierspezies Mißbildungen, unter anderem auch in den Gliedmaßen, induzieren. Diese werden durch die Retinsäurerezeptoren RAR α , β und γ vermittelt. Um neue Gene zu isolieren, die die Effekte von Retinsäure auf die Gliedmaßenentwicklung vermitteln, wurde eine cDNA-Subtraktion mit cDNA aus mit Am580 (synthetischer Agonist, der spezifisch an den Retinsäure Rezeptor α bindet) behandelten und unbehandelten Vordergliedmaßenknospen durchgeführt. Es wurde ein neues retinsäureinduziertes Maus-Homolog des humanen Ramp (retinoic acid regulated nuclear matrix associated protein) isoliert. Das murine Ramp (mRamp) ist ein Serin/Threonin-reiches Protein welches auf Chromosom 1, Region H6 lokalisiert ist. In dieser Arbeit wurde die Expression von mRamp untersucht. Während der Embryogenese ist mRamp von Embryonaltag 4.5 bis 18.5 durchgängig exprimiert. *In situ*-Hybridisierungsstudien zeigen in frühen Entwicklungsstadien eine ubiquitäre Expression, die im Verlaufe der Entwicklung stärker begrenzt ist. Besonders hohe Transkriptspiegel sind in der Gliedmaßenknospe und Regionen hoher Zellproliferation zu beobachten. In adulten Geweben ist die mRamp-Expression im Thymus und in den Hoden besonders hoch.

Im Gehirn junger Tiere (P7) konnte eine hohe mRamp-Expression in der äußeren Körnerschicht (EGL) des Cerebellums und eine geringere im Hippocampus, der subventrikulären Zone, im *rostral migratory stream* und *Bulbus olfactorius* beobachtet werden. In den gleichen Regionen konnte auch Ki67, ein Proliferationsmarker, nachgewiesen werden. Zusammen mit der Expressionsverteilung von mRamp im Embryo läßt sich vermuten, daß mRamp nur in proliferierenden Zellen exprimiert ist. Diese Ergebnisse stimmen mit den bisherigen Erkenntnissen zum humanen Ortholog, dem eine Funktion in der Zytokinese zugesprochen wird, überein.

Ein mögliches regulatorisches Element der Ramp-Transkription ist PKC: Es wurde gezeigt, daß eine PKC-Inhibition in der Gliedmaßenentwicklung des Huhns eine Herunterregulierung der Ramp-Transkription bewirkt. Des weiteren enthält die mRamp-Sequenz 3 putative hoch konservierte PKC-Phosphorylierungsstellen, was eine Modifikation und Regulation des mRamp-Proteins durch PKC vermuten läßt.

Bei den teratogenen Effekten in der Gliedmaßenentwicklung, die über den RAR α -Rezeptor vermittelt werden, ist mRamp ein potentielles Zielgen. Die Expression von mRamp korreliert mit der von RAR α während der Gliedmaßenentwicklung. Die beobachtete Inhibition der Chondrogenese bei ektopischer Expression von RAR α könnte durch mRamp vermittelt werden. Ein Vergleich der Expression von mRamp und RAR α in der Embryogenese zeigte ein identisches Verteilungsmuster. In adulten Geweben mit hoher mRamp Expression ist RAR α ebenfalls exprimiert und übt dort jeweils eine wichtige Funktion aus. Somit ist eine funktionelle Verbindung von mRamp und RAR α auch in anderen Geweben möglich.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse vermuten, daß mRamp eine wichtige Rolle in der Zell-Proliferation und bei RAR α vermittelten teratogenen Effekten spielt.

Schlagnworte: Retinsäure, RAR α , Gliedmaßenentwicklung, Teratogenese, Proliferation

6 Abstract

The active derivate of Vitamin A, retinoic acid is essential for normal embryonic development. High doses of a number of retinoid acid analogues, including retinoic acid itself, have been demonstrated to induce malformations in several species. To identify genes that mediate the effect of retinoids on limb development we used the cDNA-subtraction method with cDNA obtained from E11.25 limb buds exposed to Am580 (a synthetic retinoid, which binds specific to retinoic acid receptor α) or vehicle. A new retinoic acid induced mouse homolog of the human Ramp (retinoic acid regulated nuclear matrix associated protein), mRamp, was isolated. mRamp is a serine/threonine rich protein located on chromosome 1 in region H6. We examined the mRamp expression in the mouse embryo. During the embryogenesis mRamp is expressed from E4.5 to 18.5 with high levels from E10.5 to 13.5. *In situ*-hybridization studies show that mRamp is widely expressed in the embryo. In limb buds, and tissues with strong cell-proliferation, high transcript-levels are detected. The expression of mRamp is ubiquitous in early stages and becomes more restricted during development. In adult tissues mRamp is highly expressed in testis and thymus. In the postnatal brain (P7) strong expression was observed in the outer external granular layer (EGL), and at lower levels in the hippocampus, the subventricular zone, the rostral migratory stream and olfactory bulb.

A comparison to the distribution of ki67-Protein, a proliferation marker, in p7 brain revealed the same pattern. This data and the embryonic expression suggest that mRamp expression is limited to proliferating cells. This fits with postulated role of Ramp in cytokinesis.

A downregulation of Ramp expression during limb bud development after PKC inhibition suggests a regulatory role of PKC in Ramp-Transkription. Moreover mRamp hosts 3 highly conserved putative PKC phosphorylation sites supposing that PKC might regulate the function of mRamp.

In the teratogenesis of limb bud mediated by $RAR\alpha$, mRamp is a potential downstream target. The expression of mRamp correlates highly with $RAR\alpha$ during limb development. The observed inhibition of chondrogenic differentiation after ectopic expression of $RAR\alpha$ could be mediated by mRamp. During embryogenesis mRamp and $RAR\alpha$ expression shows the same pattern and also in adult animals. $RAR\alpha$ is known to fullfill an important role in tissues where mRamp is highly expressed.

Taken together the data suggests that mRamp is an important factor in cell proliferation and $RAR\alpha$ mediated teratogenic effects.

Keywords: retinoic acid, $RAR\alpha$, limb development, teratogenesis, proliferation

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AER	apikale ektodermale Leiste
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
As	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaar (e)
bzw.	beziehungsweise
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxigenin
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonaltag
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EST	expressed sequence tags
EtOH	Ethanol
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HH	Hamburger Hmlton Stadium
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
IHC	Immunhistochemie
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare bzw. Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
Lsg.	Lösung
M	Mol pro Liter
min	Minuten
ml	Milliliter

$\mu\text{l} / \mu\text{g} / \mu\text{M}$	Mikroliter / Mikrogramm / Mikromolar
MOPS	3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA (Boten-Ribonukleinsäure)
NBT	4-Nito-Blue-Tetrazolium-Chlorid
NTP	Ribonukleotidtriphosphat
P	postnataler Tag
p.a.	pro analysi
PBS	Phosphatpuffer, salzhaltig
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:23:1), (v/v/v)
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentium hydrogenii
PVA	Polyvinylalkohol
Ramp	<i>retinoic acid regulated nuclear matrix protein</i>
RAR	<i>retinoic acid receptor</i>
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
rpm _{max}	Maximale Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RXR	<i>retinoid x receptor</i>
s	Sekunde
SDS	sodium dodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
SHH	<i>sonic hedgehog</i>
SSC	Natrium-Citratpuffer, salzhaltig
Std.	Stunden
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-HCl/EDTA-Lösung
TEA	Triethanolamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	unit (Einheit der Enzymaktivität)
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
(v/v)	volume to volume (Volumen/Volumen)
(w/v)	weight to volume (Gewicht/Volumen)
(w/w)	weight to weight (Gewicht/Gewicht)
WMSIH	whole mount <i>in situ</i> -Hybridisierung
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZPA	Zone polarisierender Aktivität

8 Literaturverzeichnis

Agnish, N.D. & Kochhar, D.M. (1992). Developmental toxicology of retinoids. In *Retinoids in clinical practice* (ed G. Koren), pp. 47-76. Dekker, New York.

Ang, H.L., Deltour, L., Hayamizu, T.F., Zgombic-Knight, M., & Duester, G. (1996) Retinoic acid synthesis in mouse embryos during gastrulation and craniofacial development linked to class IV alcohol dehydrogenase gene expression. *J Biol Chem*, 271, 9526-34.

Bernard, B.A., Bernardon, J.M., Delescluse, C., Martin, B., Lenoir, M.C., Maignan, J., Charpentier, B., Pilgrim, W.R., Reichert, U., & Shroot, B. (1992) Identification of synthetic retinoids with selectivity for human nuclear retinoic acid receptor gamma. *Biochem Biophys Res Commun*, 186, 977-83.

Blomhoff, R., Green, M.H., & Norum, K.R. (1992) Vitamin A: physiological and biochemical processing. *Annu Rev Nutr*, 12, 37-57.

Boleda, M.D., Saubi, N., Farres, J., & Pares, X. (1993) Physiological substrates for rat alcohol dehydrogenase classes: aldehydes of lipid peroxidation, omega-hydroxyfatty acids, and retinoids. *Arch Biochem Biophys*, 307, 85-90.

Boskovic, G., Desai, D., & Niles, R.M. (2002) Regulation of retinoic acid receptor alpha by protein kinase C in B16 mouse melanoma cells. *J Biol Chem*, 277, 26113-9.

Brockes, J.P. (1989) Retinoids, homeobox genes, and limb morphogenesis. *Neuron*, 2, 1285-94.

Cash, D.E., Bock, C.B., Schughart, K., Linney, E., & Underhill, T.M. (1997) Retinoic acid receptor alpha function in vertebrate limb skeletogenesis: a modulator of chondrogenesis. *J Cell Biol*, 136, 445-57.

Chang, D.T., Lopez, A., von Kessler, D.P., Chiang, C., Simandl, B.K., Zhao, R., Seldin, M.F., Fallon, J.F., & Beachy, P.A. (1994) Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine hedgehog gene. *Development*, 120, 3339-53.

- Chen, H., Namkung, M.J., & Juchau, M.R. (1995) Biotransformation of all-trans-retinol and all-trans-retinal to all-trans-retinoic acid in rat conceptual homogenates. *Biochem Pharmacol*, 50, 1257-64.
- Cheung, W.M., Chu, A.H., Chu, P.W., & Ip, N.Y. (2001) Cloning and expression of a novel nuclear matrix-associated protein that is regulated during the retinoic acid-induced neuronal differentiation. *J Biol Chem*, 276, 17083-91.
- Clagett-Dame, M. & DeLuca, H.F. (2002) The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Annu Rev Nutr*, 22, 347-81.
- Coberly, S., Lammer, E., & Alashari, M. (1996) Retinoic acid embryopathy: case report and review of literature. *Pediatr Pathol Lab Med*, 16, 823-36.
- De Luca, L.M. (1991) Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *Faseb J*, 5, 2924-33.
- de Roos, K., Sonneveld, E., Compaan, B., ten Berge, D., Durston, A.J., & van der Saag, P.T. (1999) Expression of retinoic acid 4-hydroxylase (CYP26) during mouse and *Xenopus laevis* embryogenesis. *Mech Dev*, 82, 205-11.
- Dencker, L., Annerwall, E., Busch, C., & Eriksson, U. (1990) Localization of specific retinoid-binding sites and expression of cellular retinoic-acid-binding protein (CRABP) in the early mouse embryo. *Development*, 110, 343-52.
- Desai, D.S., Hirai, S., Karnes, W.E., Jr., Niles, R.M., & Ohno, S. (1999) Cloning and characterization of the murine PKC alpha promoter: identification of a retinoic acid response element. *Biochem Biophys Res Commun*, 263, 28-34.
- Dolle, P., Fraulob, V., Kastner, P., & Chambon, P. (1994) Developmental expression of murine retinoid X receptor (RXR) genes. *Mech Dev*, 45, 91-104.
- Dolle, P., Ruberte, E., Kastner, P., Petkovich, M., Stoner, C.M., Gudas, L.J., & Chambon, P. (1989) Differential expression of genes encoding alpha, beta and gamma retinoic acid receptors and CRABP in the developing limbs of the mouse. *Nature*, 342, 702-5.
- Dolle, P., Ruberte, E., Leroy, P., Morriss-Kay, G., & Chambon, P. (1990) Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. *Development*, 110, 1133-51.

- Donovan, M., Olofsson, B., Gustafson, A.L., Dencker, L., & Eriksson, U. (1995) The cellular retinoic acid binding proteins. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 53, 459-65.
- Duester, G. (1996) Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochemistry*, 35, 12221-7.
- Dunagin, P.E., Jr., Zachman, R.D., & Olson, J.A. (1966) The identification of metabolites of retinal and retinoic acid in rat bile. *Biochim Biophys Acta*, 124, 71-85.
- Elmazar, M.M., Reichert, U., Shroot, B., & Nau, H. (1996) Pattern of retinoid-induced teratogenic effects: possible relationship with relative selectivity for nuclear retinoid receptors RAR alpha, RAR beta, and RAR gamma. *Teratology*, 53, 158-67.
- Elmazar, M.M., Ruhl, R., & Nau, H. (2001) Synergistic teratogenic effects induced by retinoids in mice by coadministration of a RARalpha- or RARgamma-selective agonist with a RXR-selective agonist. *Toxicol Appl Pharmacol*, 170, 2-9.
- Elmazar, M.M., Ruhl, R., Reichert, U., Shroot, B., & Nau, H. (1997) RARalpha-mediated teratogenicity in mice is potentiated by an RXR agonist and reduced by an RAR antagonist: dissection of retinoid receptor-induced pathways. *Toxicol Appl Pharmacol*, 146, 21-8.
- Frolik, C.A., Roberts, A.B., Tavela, T.E., Roller, P.P., Newton, D.L., & Sporn, M.B. (1979) Isolation and identification of 4-hydroxy- and 4-oxoretinoic acid. In vitro metabolites of all-trans-retinoic acid in hamster trachea and liver. *Biochemistry*, 18, 2092-7.
- Garbe, A., Buck, J., & Hammerling, U. (1992) Retinoids are important cofactors in T cell activation. *J Exp Med*, 176, 109-17.
- Goldberg, D.A. (1980) Isolation and partial characterization of the *Drosophila* alcohol dehydrogenase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 5794-8.
- Golling, G., Amsterdam, A., Sun, Z., Antonelli, M., Maldonado, E., Chen, W., Burgess, S., Haldi, M., Artzt, K., Farrington, S., Lin, S.Y., Nissen, R.M., & Hopkins, N. (2002) Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nat Genet*, 31, 135-40.
- Hamburger, V. & Hamilton, H.L. (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.*, 88, 49-92.

Harnish, D.C., Jiang, H., Soprano, K.J., Kochhar, D.M., & Soprano, D.R. (1992) Retinoic acid receptor beta 2 mRNA is elevated by retinoic acid in vivo in susceptible regions of mid-gestation mouse embryos. *Dev Dyn*, 194, 239-46.

Haselbeck, R.J. & Duester, G. (1998) ADH4-lacZ transgenic mouse reveals alcohol dehydrogenase localization in embryonic midbrain/hindbrain, otic vesicles, and mesencephalic, trigeminal, facial, and olfactory neural crest. *Alcohol Clin Exp Res*, 22, 1607-13.

Hashimoto, Y. & Shudo, K. (1991) Retinoids and their nuclear receptors. *Cell Biol Rev*, 25, 209-30, 233-5.

Helms, J., Thaller, C., & Eichele, G. (1994) Relationship between retinoic acid and sonic hedgehog, two polarizing signals in the chick wing bud. *Development*, 120, 3267-74.

Hofmann, c. & Eichele, G. (1994). biology, chemistry and mdicine. In the retinoids (eds S. M.B., A.B. Roberts & D.S. Goodman), pp. 387-441. Raven, New York.

Holson, R.R., Gazzara, R.A., Ferguson, S.A., Ali, S.F., Laborde, J.B., & Adams, J. (1997) Gestational retinoic acid exposure: a sensitive period for effects on neonatal mortality and cerebellar development. *Neurotoxicol Teratol*, 19, 335-46.

Iulianella, A. & Lohnes, D. (1997) Contribution of retinoic acid receptor gamma to retinoid-induced craniofacial and axial defects. *Dev Dyn*, 209, 92-104.

Jiang, H., Penner, J.D., Beard, R.L., Chandraratna, R.A., & Kochhar, D.M. (1995) Diminished teratogenicity of retinoid X receptor-selective synthetic retinoids. *Biochem Pharmacol*, 50, 669-76.

Kastner, P., Grondona, J.M., Mark, M., Gansmuller, A., LeMeur, M., Decimo, D., Vonesch, J.L., Dolle, P., & Chambon, P. (1994) Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell*, 78, 987-1003.

Kastner, P., Mark, M., & Chambon, P. (1995) Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell*, 83, 859-69.

Kastner, P., Mark, M., Ghyselinck, N., Krezel, W., Dupe, V., Grondona, J.M., & Chambon, P. (1997) Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development*, 124, 313-26.

- Kastner, P., Mark, M., Leid, M., Gansmuller, A., Chin, W., Grondona, J.M., Decimo, D., Krezel, W., Dierich, A., & Chambon, P. (1996) Abnormal spermatogenesis in RXR beta mutant mice. *Genes Dev*, 10, 80-92.
- Kaufman, P.D., Kobayashi, R., Kessler, N., & Stillman, B. (1995) The p150 and p60 subunits of chromatin assembly factor I: a molecular link between newly synthesized histones and DNA replication. *Cell*, 81, 1105-14.
- Kistler, A. (1981) Teratogenesis of retinoic acid in rats: susceptible stages and suppression of retinoic acid-induced limb malformations by cycloheximide. *Teratology*, 23, 25-31.
- Kliwer, S.A., Umesono, K., Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J., Dyck, J.A., & Evans, R.M. (1992a) Retinoid X receptor-COUP-TF interactions modulate retinoic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 1448-52.
- Kliwer, S.A., Umesono, K., Noonan, D.J., Heyman, R.A., & Evans, R.M. (1992b) Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*, 358, 771-4.
- Ko, L., Cardona, G.R., & Chin, W.W. (2000) Thyroid hormone receptor-binding protein, an LXXLL motif-containing protein, functions as a general coactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 6212-7.
- Kochhar, D.M. (1967) Teratogenic activity of retinoic acid. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 70, 398-404.
- Kochhar, D.M. (1985) Skeletal morphogenesis: comparative effects of a mutant gene and a teratogen. *Prog Clin Biol Res*, 171, 267-81.
- Kochhar, D.M., Jiang, H., Penner, J.D., Beard, R.L., & ChandraratnaAs (1996) Differential teratogenic response of mouse embryos to receptor selective analogs of retinoic acid. *Chem Biol Interact*, 100, 1-12.
- Kochhar, D.M., Jiang, H., Penner, J.D., Johnson, A.T., & Chandraratna, R.A. (1998) The use of a retinoid receptor antagonist in a new model to study vitamin A-dependent developmental events. *Int J Dev Biol*, 42, 601-8.
- Krezel, W., Dupe, V., Mark, M., Dierich, A., Kastner, P., & Chambon, P. (1996) RXR gamma null mice are apparently normal and compound RXR alpha +/- /RXR beta +/- /RXR gamma -/- mutant mice are viable. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 9010-4.

Kurzik-Dumke, U., Neubauer, M., & Debes, A. (1996) Identification of a novel *Drosophila melanogaster* heat-shock gene, lethal(2)denticleless [l(2)dtl], coding for an 83-kDa protein. *Gene*, 171, 163-70.

Lampron, C., Rochette-Egly, C., Gorry, P., Dolle, P., Mark, M., Lufkin, T., LeMeur, M., & Chambon, P. (1995) Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABPII) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal. *Development*, 121, 539-48.

Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M., & Boedtker, H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry*, 16, 4743-51.

Logan, M. & Tabin, C. (1998) Targeted gene misexpression in chick limb buds using avian replication-competent retroviruses. *Methods*, 14, 407-20.

Lohnes, D., Dierich, A., Ghyselinck, N., Kastner, P., Lampron, C., LeMeur, M., Lufkin, T., Mendelsohn, C., Nakshatri, H., & Chambon, P. (1992) Retinoid receptors and binding proteins. *J Cell Sci Suppl*, 16, 69-76.

Lohnes, D., Kastner, P., Dierich, A., Mark, M., LeMeur, M., & Chambon, P. (1993) Function of retinoic acid receptor gamma in the mouse. *Cell*, 73, 643-58.

Lohnes, D., Mark, M., Mendelsohn, C., Dolle, P., Decimo, D., LeMeur, M., Dierich, A., Gorry, P., & Chambon, P. (1995) Developmental roles of the retinoic acid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 53, 475-86.

Lohnes, D., Mark, M., Mendelsohn, C., Dolle, P., Dierich, A., Gorry, P., Gansmuller, A., & Chambon, P. (1994) Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development*, 120, 2723-48.

Loudig, O., Babichuk, C., White, J., Abu-Abed, S., Mueller, C., & Petkovich, M. (2000) Cytochrome P450RAI(CYP26) promoter: a distinct composite retinoic acid response element underlies the complex regulation of retinoic acid metabolism. *Mol Endocrinol*, 14, 1483-97.

Lu, H.C., Revelli, J.P., Goering, L., Thaller, C., & Eichele, G. (1997) Retinoid signaling is required for the establishment of a ZPA and for the expression of Hoxb-8, a mediator of ZPA formation. *Development*, 124, 1643-51.

Lufkin, T., Lohnes, D., Mark, M., Dierich, A., Gorry, P., Gaub, M.P., LeMeur, M., & Chambon, P. (1993) High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor alpha mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 7225-9.

Luo, J., Pasceri, P., Conlon, R.A., Rossant, J., & Giguere, V. (1995) Mice lacking all isoforms of retinoic acid receptor beta develop normally and are susceptible to the teratogenic effects of retinoic acid. *Mech Dev*, 53, 61-71.

Luo, J., Sucov, H.M., Bader, J.A., Evans, R.M., & Giguere, V. (1996) Compound mutants for retinoic acid receptor (RAR) beta and RAR alpha 1 reveal developmental functions for multiple RAR beta isoforms. *Mech Dev*, 55, 33-44.

Maden, M. (1994). Role of retinoids in embryonic development. In *Vitamin A in health and disease* (ed R. Bloomhoff), pp. 289-322. Dekker, New York.

Mangelsdorf, D.J., Borgmeyer, U., Heyman, R.A., Zhou, J.Y., Ong, E.S., Oro, A.E., Kakizuka, A., & Evans, R.M. (1992) Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev*, 6, 329-44.

Mangelsdorf, D.J. & Evans, R.M. (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, 83, 841-50.

Manthey, C.L., Landkamer, G.J., & Sladek, N.E. (1990) Identification of the mouse aldehyde dehydrogenases important in aldophosphamide detoxification. *Cancer Res*, 50, 4991-5002.

McCaffery, P. & Drager, U.C. (1994) Hot spots of retinoic acid synthesis in the developing spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 7194-7.

Mendelsohn, C., Lohnes, D., Decimo, D., Lufkin, T., LeMeur, M., Chambon, P., & Mark, M. (1994) Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development*, 120, 2749-71.

Morriss-Kay, G.M. & Sokolova, N. (1996) Embryonic development and pattern formation. *Faseb J*, 10, 961-8.

Moss, J.B., Xavier-Neto, J., Shapiro, M.D., Nayeem, S.M., McCaffery, P., Drager, U.C., & Rosenthal, N. (1998) Dynamic patterns of retinoic acid synthesis and response in the developing mammalian heart. *Dev Biol*, 199, 55-71.

Napoli, J.L. (1996) Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *Faseb J*, 10, 993-1001.

- Nau, H. (1993) Embryotoxicity and teratogenicity of topical retinoic acid. *Skin Pharmacol*, 6 Suppl 1, 35-44.
- Nau, H., Chahoud, I., DENCKER, L., E.J., L., & W.J., S. (1998). Teratogenicity of Vitamin A and retinoids. In *Vitamin A in Health and Disease* (ed R. Blomhoff), pp. 615-663. Dekker, New York.
- Nau, H. & Elmazar, M.M. (1999). Retinoid Receptors, their ligands, and teratogenesis: synergy and specificity of effects. In *Retinoids: the biochemical and molecular basis of vitamin A and retinoid action* (eds H. Nau & W.S. Blaner), pp. 465-487. Springer, Berlin.
- Niederreither, K., Abu-Abed, S., Schuhbaur, B., Petkovich, M., Chambon, P., & Dolle, P. (2002a) Genetic evidence that oxidative derivatives of retinoic acid are not involved in retinoid signaling during mouse development. *Nat Genet*, 31, 84-8.
- Niederreither, K., McCaffery, P., Drager, U.C., Chambon, P., & Dolle, P. (1997) Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech Dev*, 62, 67-78.
- Niederreither, K., Vermot, J., Schuhbaur, B., Chambon, P., & Dolle, P. (2002b) Embryonic retinoic acid synthesis is required for forelimb growth and anteroposterior patterning in the mouse. *Development*, 129, 3563-74.
- Nishizuka, Y. (1986) Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, 233, 305-12.
- Nishizuka, Y. (1989) Studies and perspectives of the protein kinase c family for cellular regulation. *Cancer*, 63, 1892-903.
- Palczewski, K. & Saari, J.C. (1997) Activation and inactivation steps in the visual transduction pathway. *Curr Opin Neurobiol*, 7, 500-4.
- Perez-Castro, A.V., Toth-Rogler, L.E., Wei, L.N., & Nguyen-Huu, M.C. (1989) Spatial and temporal pattern of expression of the cellular retinoic acid-binding protein and the cellular retinol-binding protein during mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 8813-7.
- Perlmann, T. & Jansson, L. (1995) A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev*, 9, 769-82.

Qian, Y.W. & Lee, E.Y. (1995) Dual retinoblastoma-binding proteins with properties related to a negative regulator of ras in yeast. *J Biol Chem*, 270, 25507-13.

Ray, W.J., Bain, G., Yao, M., & Gottlieb, D.I. (1997) CYP26, a novel mammalian cytochrome P450, is induced by retinoic acid and defines a new family. *J Biol Chem*, 272, 18702-8.

Reinhardt, A. & Hubbard, T. (1998) Using neural networks for prediction of the subcellular location of proteins. *Nucleic Acids Res*, 26, 2230-6.

Riddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E., & Tabin, C. (1993) Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*, 75, 1401-16.

Roberts, A.B., Lamb, L.C., & Sporn, M.B. (1980) Metabolism of all-trans-retinoic acid in hamster liver microsomes: oxidation of 4-hydroxy- to 4-keto-retinoic acid. *Arch Biochem Biophys*, 199, 374-83.

Roberts, A.B., Nichols, M.D., Newton, D.L., & Sporn, M.B. (1979) In vitro metabolism of retinoic acid in hamster intestine and liver. *J Biol Chem*, 254, 6296-302.

Roberts, E.S., Vaz, A.D., & Coon, M.J. (1992) Role of isozymes of rabbit microsomal cytochrome P-450 in the metabolism of retinoic acid, retinol, and retinal. *Mol Pharmacol*, 41, 427-33.

Ross, A. & Hämmerling, U. (1994). Retinoids and the immune system. In *The Retinoids. Biology, Chemistry, and Medicine.* (eds M.B. Sporn, A.B. Roberts & D.S. Goodman), pp. 521-543. Raven Press,, New York.

Ross, S.A., McCaffery, P.J., Drager, U.C., & De Luca, L.M. (2000) Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev*, 80, 1021-54.

Rossant, J., Zirngibl, R., Cado, D., Shago, M., & Giguere, V. (1991) Expression of a retinoic acid response element-hsplacZ transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes Dev*, 5, 1333-44.

Ruberte, E., Friederich, V., Chambon, P., & Morriss-Kay, G. (1993) Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. III. Their differential transcript distribution during mouse nervous system development. *Development*, 118, 267-82.

- Scott, W.J., Jr., Walter, R., Tzimas, G., Sass, J.O., Nau, H., & Collins, M.D. (1994) Endogenous status of retinoids and their cytosolic binding proteins in limb buds of chick vs mouse embryos. *Dev Biol*, 165, 397-409.
- Seed, B. (1982) Diazotizable arylamine cellulose papers for the coupling and hybridization of nucleic acids. *Nucleic Acids Res*, 10, 1799-810.
- Seegmiller, R.E., Ford, W.H., Carter, M.W., Mitala, J.J., & Powers, W.J., Jr. (1997) A developmental toxicity study of tretinoin administered topically and orally to pregnant Wistar rats. *J Am Acad Dermatol*, 36, S60-6.
- Shenefelt, R.E. (1972) Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid: relation to dose and stage at treatment. *Teratology*, 5, 103-18.
- Song, S. & Siu, C.H. (1989) Retinoic acid regulation of the expression of retinoic acid receptors in wild-type and mutant embryonal carcinoma cells. *FEBS Lett*, 256, 51-4.
- Sucov, H.M., Dyson, E., Gumeringer, C.L., Price, J., Chien, K.R., & Evans, R.M. (1994) RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev*, 8, 1007-18.
- Sucov, H.M., Izpisua-Belmonte, J.C., Ganan, Y., & Evans, R.M. (1995) Mouse embryos lacking RXR alpha are resistant to retinoic-acid-induced limb defects. *Development*, 121, 3997-4003.
- Szondy, Z., Reichert, U., Bernardon, J.M., Michel, S., Toth, R., Karaszi, E., & Fesus, L. (1998) Inhibition of activation-induced apoptosis of thymocytes by all-trans- and 9-cis-retinoic acid is mediated via retinoic acid receptor alpha. *Biochem J*, 331 (Pt 3), 767-74.
- Thaller, C. & Eichele, G. (1987) Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud. *Nature*, 327, 625-8.
- Thaller, C. & Eichele, G. (1990) Isolation of 3,4-didehydroretinoic acid, a novel morphogenetic signal in the chick wing bud. *Nature*, 345, 815-9.
- Thompson, J.N., Howell, J.M., Pitt, G.A., & McLaughlin, C.I. (1969) The biological activity of retinoic acid in the domestic fowl and the effects of vitamin A deficiency on the chick embryo. *Br J Nutr*, 23, 471-90.
- Tickle, C., Alberts, B., Wolpert, L., & Lee, J. (1982) Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of the polarizing region. *Nature*, 296, 564-6.

- Von Schroeder, H.P., Hashimoto, Y., & Heersche, J.N. (1994) The effects of natural and synthetic retinoids on the differentiation of RCJ C5.18 chondrogenic cells. *Teratology*, 50, 54-62.
- Vonesch, J.L., Nakshatri, H., Philippe, M., Chambon, P., & Dolle, P. (1994) Stage and tissue-specific expression of the alcohol dehydrogenase 1 (Adh-1) gene during mouse development. *Dev Dyn*, 199, 199-213.
- Wedden, S., Thaller, C., & Eichele, G. (1990) Targeted slow-release of retinoids into chick embryos. *Methods Enzymol*, 190, 201-9.
- White, J.A., Beckett-Jones, B., Guo, Y.D., Dilworth, F.J., Bonasoro, J., Jones, G., & Petkovich, M. (1997) cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450. *J Biol Chem*, 272, 18538-41.
- White, J.A., Ramshaw, H., Taimi, M., Stangle, W., Zhang, A., Everingham, S., Creighton, S., Tam, S.P., Jones, G., & Petkovich, M. (2000) Identification of the human cytochrome P450, P450RAI-2, which is predominantly expressed in the adult cerebellum and is responsible for all-trans-retinoic acid metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 6403-8.
- Wilson, J.G., Roth, C.B., & Warkany (1953) An analysis of the syndrome of malfunctions induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am J Anat*, 92, 189-217.
- Yagi, J., Uchida, T., Kuroda, K., & Uchiyama, T. (1997) Influence of retinoic acid on the differentiation pathway of T cells in the thymus. *Cell Immunol*, 181, 153-62.
- Yamamoto, M., Ullman, D., Drager, U.C., & McCaffery, P. (1999) Postnatal effects of retinoic acid on cerebellar development. *Neurotoxicol Teratol*, 21, 141-6.
- Yu, V.C., Delsert, C., Andersen, B., Holloway, J.M., Devary, O.V., Naar, A.M., Kim, S.Y., Boutin, J.M., Glass, C.K., & Rosenfeld, M.G. (1991) RXR beta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell*, 67, 1251-66.
- Yudkovsky, Y., Shteinberg, M., Listovsky, T., Brandeis, M., & Hershko, A. (2000) Phosphorylation of Cdc20/fizzy negatively regulates the mammalian cyclosome/APC in the mitotic checkpoint. *Biochem Biophys Res Commun*, 271, 299-304.
- Zetterstrom, R.H., Lindqvist, E., Mata de Urquiza, A., Tomac, A., Eriksson, U., Perlmann, T., & Olson, L. (1999) Role of retinoids in the CNS: differential expression

of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid. Eur J Neurosci, 11, 407-16.

Zhang, X.K., Lehmann, J., Hoffmann, B., Dawson, M.I., Cameron, J., Graupner, G., Hermann, T., Tran, P., & Pfahl, M. (1992) Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-cis retinoic acid. Nature, 358, 587-91.

Zile, M.H. (1998) Vitamin A and embryonic development: an overview. J Nutr, 128, 455S-458S.

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorgelegte Dissertation selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Hilfsmittel verfaßt habe. Ich habe die Dissertation nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Arbeit verwendet und nicht vorher publiziert.

Hannover, den 26.6.2003

Markus Hüchel

Curriculum vitae

Angaben zur Person

Name Markus Hückel
Geb. am 11.10.19971 in Hannover
ledig
Adresse Meierwiesen 7
306457 Hannover
Telephon 0511-6042972
E-Mail Markus.Hueckel@mpihan.mpg.de

Schulausbildung/Wehrdienst

1978-1991 Allgemeine Hochschulreife am
Gymnasium Misburg in Hannover

Studium

1992-1998 Diplomstudium Biochemie (Universität Hannover)
Prüfungsfächer: Biochemie, Biophysikalische Chemie
und Immunologie

02/1998-08/1998 Diplomarbeit
Angefertigt am Max-Planck-Institut für Endokrinologie in
Hannover unter der Anleitung von Prof. K. Bauer

Thema: Ko-Lokalisationsstudien zum THR-Rezeptor und dem
THR-abbauenden Ektoenzym in Hypophysenzellen.

Promotion

01/1999-06/2003 Max-Planck-Insitut für experimentelle Endokrinologie und
Tierärztliche Hochschule Hannover
Unter der Anleitung Von Prof. Dr. H. Nau und Prof. Dr. G.
Eichele

