

Interaktionsanalyse der
Transkriptionsfaktoren Gli3 und Trps1 in
Chondrozyten

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
der Fakultät für
Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Verena Alexandra Schneider
aus Mainz

Mai 2013

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Zentrum für Medizinische Biotechnologie in der Abteilung für Entwicklungsbiologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Andrea Vortkamp

2. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Horsthemke

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Shirley Knauer

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juli 2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	10
Tabellenverzeichnis	12
1 Einleitung	13
1.1 Das Skelett der Wirbeltiere	13
1.2 Die enchondrale Ossifikation	13
1.3 Die Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten in der Wachstumsfuge wird durch Indian Hedgehog reguliert	15
1.4 Die Transkriptionsfaktoren der Gli-Familie	15
1.5 Die Hedgehog-Signaltransduktion findet bei Vertebraten im primären Cilium statt	17
1.6 Der Transkriptionsfaktor Trps1 interagiert mit Gli3A in Chondrozyten	18
1.7 Transkriptionsfaktoren sind spezifische Regulatoren der Genaktivität	19
1.8 Die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	21
2 Zielsetzung	23
3 Material und Methoden	25
3.1 Material	25
3.1.1 Chemikalien	25
3.1.2 Enzyme	26
3.1.3 Kits	27
3.1.4 Puffer	27
3.1.5 Antikörper	31
3.1.6 Verbrauchsmaterialien und Sonstiges	31
3.1.7 Geräte	32
3.1.8 Nährmedien für Zellen und Bakterien	33
3.1.9 Zelllinien	34
3.1.10 Bakterienstämme	34
3.1.11 Expressionsplasmide und Leervektoren	35
3.1.12 Primersequenzen	36

3.1.13	Software	38
3.2	Methoden	39
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	39
3.2.1.1	Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)	39
3.2.1.2	Aufreinigung von PCR-Fragmenten	41
3.2.1.3	TOPO-TA- Klonierungen	41
3.2.1.4	Die quantitative PCR (qPCR)	41
3.2.1.5	DNA-Konzentrationsbestimmung	42
3.2.1.6	Agarose-Gelelektrophorese	43
3.2.1.7	Restriktion von Plasmiden	43
3.2.1.8	Aufreinigung von Fragmenten aus Agarosegelen	44
3.2.1.9	Herstellung von Blunt-End-DNA-Fragmenten	44
3.2.1.10	Dephosphorylation von linearisierten Vektoren	45
3.2.1.11	Ligation	45
3.2.1.12	Transformation in chemisch kompetenter Bakterien	45
3.2.1.13	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien	46
3.2.1.14	Klonierungsstrategien	46
3.2.1.14.1	Gli3-Deletionskonstrukte	47
3.2.1.14.2	Retrovirale Expressionsvektoren	47
3.2.1.14.3	Luciferase-Konstrukte	47
3.2.1.15	Sequenzierung	48
3.2.2	Zellbiologische Methoden	48
3.2.2.1	Auftauen und Einfrieren von Zelllinien	48
3.2.2.2	Kultivierung von Zelllinien	48
3.2.2.3	Transfektion von HEK293-T-Zellen	49
3.2.2.4	Transfektion von ATDC5-Zellen	49
3.2.2.5	Retrovirale Transduktion von ATDC5-Zellen	50
3.2.2.6	Luciferase-Assay	51
3.2.2.7	Immunfluoreszenzfärbungen	52
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden	53
3.2.3.1	Die Co-Immunopräzipitation	53
3.2.3.2	Die SDS-Gelelektrophorese	54
3.2.3.3	Western Blot	55
3.2.3.4	Chromatin-Immunopräzipitation	56
3.2.4	Durchführung und bioinformatische Auswertung der ChIP-Seq	58
3.2.5	Statistische Auswertung	59

3.2.6	Histologie	59
3.2.6.1	Einbetten der Vordergliedmaßen von Mäuseembryonen in Paraffin	59
3.2.6.2	Anfertigung von Gewebsschnitten der Gliedmaßen am Mikrotom	60
3.2.7	<i>In situ</i> Hybridisierung	60
3.2.7.1	Herstellung radioaktiv-markierter mRNA-Sonden	60
3.2.7.2	Prähybridisierung und <i>in situ</i> Hybridisierung	61
3.2.7.3	Waschen der Schnitte und Behandlung mit Photo- emulsion	62
4	Ergebnisse	63
4.1	Eingrenzen der Trps1-Bindedomäne in Gli3A	63
4.2	Trps1 beeinflusst die subzelluläre Lokalisation von Gli3	66
4.3	Etablierung der ChIP von Trps1 und Gli3 in Chondrozyten	71
4.3.1	Etablierung eines retroviralen Transduktionssystems in ATDC5-Zellen	71
4.3.2	Etablierung der ChIP in ATDC5-Zellen	73
4.3.3	ChIP-Seq	76
4.4	Bioinformatische Analyse der ChIP-Seq-Datensätze	77
4.4.1	Definition von Peaks mit MACS	78
4.4.2	DNA-Bindemotivanalyse mit MEME	81
4.4.3	GREAT - eine Analyse der Datensätze mit Hilfe von Anno- tationen	81
4.5	Bestätigung von DNA-Bindestellen	84
4.6	<i>Gtf2i</i> , ein putatives Zielgen von Trps1, ist spezifisch in der Kno- chenanlage exprimiert	86
4.7	Gli3 und Trps1 binden kooperativ an regulatorische Elemente	87
4.7.1	Trps1 bindet an ein putatives Enhancerelement von <i>Col2a1</i>	87
4.7.2	Gli3Amc und Trps1myc binden gemeinsam ein Fragment 107kb upstream von <i>Pthlh</i>	89
4.7.3	Gli3A und Trps1 regulieren gemeinsam die Aktivität des <i>Wnt5a</i> -Promotors	90
5	Diskussion	93
5.1	Trps1 bindet an die Transaktivator-domäne von Gli3A und reguliert dessen zelluläre Lokalisation	93

5.2	ChIP-Seq identifiziert neue Zielgene von Gli3 und Trps1	96
5.2.1	Etablierung der ChIP	96
5.2.2	Qualität des ChIP-Seq-Datensatzes	98
5.2.3	Motiv- und Positionsanalyse der DNA-Binderegionen	100
5.2.4	Bestätigung der Bindung von Gli3A und Trps1 an putative Bindestellen	102
5.2.5	Gli3A und Trps1 binden gemeinsam an regulatorische Ele- mente	105
5.3	Ausblick in die kooperativen Genregulation von Gli3A und Trps1	108
6	Zusammenfassung	110
7	Abstract	112
8	Literatur	114
9	Anhang	126
	Danksagung	134
	Publikationen	135
	Lebenslauf	136
	Eidesstattliche Erklärungen	137

Abkürzungsverzeichnis

α	anti-
3C	<i>Chromosome Conformation Capture</i>
4C	<i>Chromosome Conformation Capture-on-Chip</i>
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CBP	cAMP response element-Bindeprotein
CCAT	<i>Control-based ChIP-seq Analysis Tool</i>
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
Ci	Cubitus interruptus
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Dhh	Desert Hedgehog
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ENCODE	ENCyclopedia Of DNA Elements
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GCPS	Greig Cephalopolysyndaktylie-Syndrom
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GliA	Gli-Aktivator
GliR	Gli-Repressor
GREAT	<i>Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
H3K9ac	acetyliertes Lysin 9 des Histon 3
Hdac	Histondeacetylase

Hh	Hedgehog
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
I	<i>Input</i>
IGV	<i>Integrated Genome Viewer</i>
Ihh	Indian Hedgehog
IP	Immunopräzipitation
kDa	kilo Dalton
LB	Luria Bertani
M	Marker
M	Molar
MACS	<i>Model-based Analysis of ChIP-Seq</i>
MEME	<i>Multiple EM for Motif Elicitation</i>
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NLS	nukleares Lokalisationssignal
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
Ptch	Patched
PTHrP	Parathyroid Hormone-related Peptide
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
S	<i>Supernatant</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
Shh	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
TAD	Transkriptions Aktivierungs Domäne
TBS	Tris-gepufferte Natriumchloridlösung (<i>Tris-buffered saline</i>)
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFIID	Transkriptionsfaktor II D
TRPS1	Tricho-Rhino-Phalalgeales Syndrom 1
TSS	Transkriptionsstart (<i>transcriptional start site</i>)
U	Unit
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

YFP Gelb-fluoreszierendes Protein (*Yellow Fluorescenting Protein*)

Abbildungsverzeichnis

1	Schematischer Ablauf der enchondralen Ossifikation	14
2	Schematische Darstellung von Domänen und Motive der Gli-Proteine.	16
3	Hh-Signale führen zur Anreicherung von GliA in der Cilie	18
4	Ein Modell der transkriptionellen Genregulierung	20
5	Prinzip der Chromatin-Immunopräzipitation	22
6	Vektorkarten der in Luciferaseexperimenten verwendeten Vektoren .	52
7	Darstellung von Gli3-Deletionskonstrukten	64
8	Co-IPs von Trps1Flag mit Gli3A-Deletionskonstrukten	65
9	Expression von Trps1YFP, Trps1R952C-GFP und eGFP in ATDC5-Zellen	66
10	Trps1 beeinflusst die zelluläre Verteilung von Gli3Amyc in ATDC5-Zellen	67
11	Gli3Rmyc ist bei Coexpression von Trps1 im Nukleus von ATDC5-Zellen angereichert.	68
12	Trps1 Überexpression hat keinen Einfluss auf die zelluläre Verteilung von Gli3TCmyc.	69
13	Quantifizierung des Effekts von Trps1 auf die zelluläre Lokalisation von Gli3	70
14	Western Blot Analyse von HEK-293T-Verpackerzellen sowie infizierter ATDC5-Zellen	72
15	Immunfluoreszenzfärbungen infizierter ATDC5-Zellen zeigen spezifische Expressionsmuster der einzelnen Transkriptionsfaktoren . . .	73
16	Agarose-Gelelektrophorese von fragmentiertem Chromatin.	74
17	Mit der ChIP lassen sich spezifisch Bindungen von Gli3Amyc und Gli3Rmyc an Enhancern von Zielgenen nachweisen.	75
18	Überprüfung der ChIP mit qPCR	76
19	Herstellung einer Library für die ChIP-Seq	77
20	Quantifizierung der kartierbaren Reads	78
21	Verteilung der Peakanreicherungen auf den einzelnen Chromosomen	80
22	”Motif probability Graph“ Darstellungen von DNA-Bindemotiven von Gli3Amyc, Gli3Rmyc und Trps1myc	81
23	Entfernungen der Bindestellen von den nächsten TSS	83
24	Analyse der Bindung von Gli3Amyc und Trps1myc an potentielle Binderegionen	84

25	<i>Gtf2i</i> ist in distinkten Zonen der embryonalen Vordergliedmaßen exprimiert.	86
26	Trps1 bindet an einen DNA-Bereich 38kb vor der <i>Col2a1</i> -TSS . . .	88
27	Gli3A und Trps1 binden an ein putativen regulatorisches Element von <i>Pthlh</i> , regulieren jedoch nicht dessen Aktivität in HEK-293T-Zellen. <i>Pthlh</i>	90
28	Gli3A und Trps1 regulieren die Promotoraktivität von <i>Wnt5a</i> . . .	91
29	Modell der Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren an DNA-Bereiche ohne Konsensusmotiv	101

Tabellenverzeichnis

1	Programm zum Einbetten von Extremitäten in Paraffin.	59
2	Einfluss der unterschiedlichen Algorithmen auf die Anzahl der Peaks	79
3	Überprüfte Bindestellen von Gli3Amyc und Trps1myc	85
4	Darstellung der biologischen Prozesse, die nach Verwendung zweier Logarithmen im Gli3Amyc Datensatz angereichert sind.	127
5	Position der einzelnen Binderegionen in “Reglation of Cartilage De- velopment“ des Gli3Amyc Datensatzes in Relation zur TSS der an- gegebenen Gene	128
6	Position der einzelnen Binderegionen der Annotation “Regulation of Chondrocyte Differentiation“ des Gli3Amyc Datensatzes in Relation zur TSS der angegebenen Gene	128
7	Darstellung der biologischen Prozesse, die nach Verwendung zweier Logarithmen im Gli3Rmyc Datensatz angereichert sind.	129
8	Position der einzelnen Binderegionen der Annotation “Developmental Growth involved in Morphogenesis“ des Gli3Rmyc Datensatzes in Relation zur TSS der angegebenen Gene	130
9	Darstellung der biologischen Prozesse, die nach Verwendung zweier Logarithmen im Trps1myc Datensatz angereichert sind.	131
10	Darstellung der “MGI Expression“, die nach Verwendung zweier Logarithmen im Trps1myc Datensatz angereichert sind.	132
11	Position der einzelnen Binderegionen der Annotation “axial Skele- ton“ des Trps1myc Datensatzes in Relation zur TSS der angegebe- nen Gene	133
12	Position der einzelnen Binderegionen der Annotation “humerus ex- pression“ des Trps1myc Datensatzes in Relation zur TSS der ange- gebenen Gene	133

1 Einleitung

1.1 Das Skelett der Wirbeltiere

Das Skelett der Wirbeltiere besteht aus über 200 Knochen und erfüllt im Organismus vielfältige Aufgaben. So dient es als Stütz- und Bewegungsapparat, der den aufrechten Gang ermöglicht sowie dem Schutz der inneren Organe durch den Brustkorb. Zudem erfolgt die Blutbildung im roten Knochenmark der Röhrenknochen. Das Skelett wird in das kraniales, axiales und appendikuläres Skelett unterteilt. Das Axialskelett setzt sich aus der Wirbelsäule und den Rippen zusammen, auf welchem das kraniale Skelett, der Schädel, aufsitzt. Das appendikuläre Skelett bezeichnet das Skelett der oberen und unteren Extremitäten, es ist durch den Schulter- und Beckengürtel mit dem Axialskelett verbunden (Kaufman 1992). Es besteht aus zwei unterschiedlichen Geweben (Knorpel und Knochen) und mindestens drei unterschiedlichen Zelltypen (Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoklasten) (Karsenty 2003). Das Skelett entsteht während der Embryonalentwicklung durch zwei unterschiedliche Mechanismen: der desmalen und enchondralen Ossifikation. Während bei der desmalen Ossifikation das Knochengewebe darunter Teile des Schädels und der Schlüsselbeine direkt aus dem mesenchymalen Vorläufergewebe entsteht, entwickeln sich die Teile der Gesichtsknochen, Wirbel, Rippen und die langen Röhrenknochen während der enchondralen Ossifikation aus einer temporären Knorpelanlage (Erlebacher u. a. 1995; Jacenko u. a. 1993).

1.2 Die enchondrale Ossifikation

Der erste Schritt der Knochenentwicklung durch die enchondrale Ossifikation ist die Kondensierung und Differenzierung mesenchymaler Zellen zu Chondrozyten, die eine Knorpelanlage bilden (Abbildung 1a). Die Knorpelanlage verlängert sich zu den distalen Enden hin durch eine anhaltende Proliferation der Chondrozyten. Proliferierende Chondrozyten sind in zwei Klassen unterteilt: Distale Chondrozyten mit einer niedrigen Proliferationsrate und kolumnare Chondrozyten, welche im Zentrum der Anlage zu Säulen angeordnet sind und eine hohe Proliferationsrate aufweisen (Long u. a. 2001; Kobayashi u. a. 2002b; MacLean und Kronenberg 2005). Kolumnare Chondrozyten, die den Zellzyklus verlassen, differenzieren in prähypertrophe und anschließend in hypertrophe Chondrozyten, dies geht mit einer Zunahme der Zellgröße einher (Abbildung 1b). Diese Zellen produzieren eine

mineralisierte extrazelluläre Matrix und gehen im Zentrum der Anlage in Apoptose. Die Knorpelanlage ist von fibroblastenähnlichen Zellen, dem Perichondrium, umhüllt. Im Bereich der hypertrophen Zellen differenzieren die Zellen des Perichondriums in Osteoblasten, welche eine Knochenmanschette, das Periost, bilden. Durch diesen Bereich dringen Blutgefäße in den Bereich der hypertrophen Chondrozyten ein, welche Osteoklasten mit sich führen, die die mineralisierte Matrix der hypertrophen Chondrozyten degradierten. Zudem erreichen durch die Blutgefäße Osteoblasten die Knochenanlage, sie bilden die Knochenmatrix der primären Spongiosa aus ((Hall und Miyake 2000) und Abbildung 1c). Im weiteren Verlauf der Entwicklung bildet sich die Knochenmarkhöhle aus, in der im Bereich des roten Knochenmarks die Hämatopoese stattfindet. Nach der Geburt kommt es zur Ausbildung eines sekundären Ossifikationszentrum in der Zone der distalen Chondrozyten. Eine Population sich teilender Chondrozyten bleibt bis zum Auswachsen des Individuums bestehen und wird als Wachstumsfuge bezeichnet und gewährt das Größenwachstum bis zum Ende der Pubertät (Abbildung 1d).

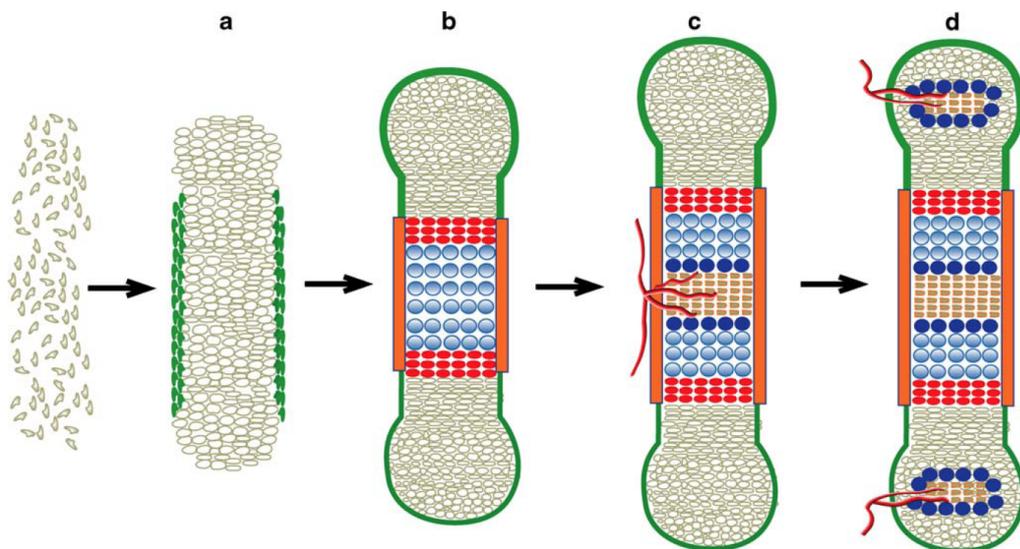


Abbildung 1: Schematischer Ablauf der enchondralen Ossifikation. Mesenchymale Zellen kondensieren, differenzieren in Chondrozyten und bilden eine Knorpelanlage, welche vom Perichondrium (grün) umhüllt ist (a). Proliferierende Zellen verlassen im Bereich des Anlagenzentrums den Zellzyklus und differenzieren zu prähypertrophen (rot) und später zu hypertrophen Chondrozyten (blau) (b). Hypertrophe Chondrozyten untergehen der Apoptose und durch das das Anlagenzentrum umhüllende Periost (orange) dringen Blutgefäße in die Knochenanlage ein (c). Postnatal kommt es distal zur Ausbildung von sekundären Ossifikationszentren (d). (aus: Wuelling und Vortkamp (2010))

1.3 Die Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten in der Wachstumsfuge wird durch Indian Hedgehog reguliert

In Vertebraten existieren drei Signalproteine der Hedgehog (Hh)-Familie. Indian Hedgehog (Ihh), Sonic Hedgehog (Shh) und Desert Hedgehog (Dhh) regulieren z.B. die Differenzierung der Gliedmaßenanlage, des zentralen Nervensystems und der Somiten (Hammerschmidt u. a. 1997). In *Drosophila melanogaster* reguliert ein einziges Hedgehog-Protein viele Prozesse in der Embryonalentwicklung, wie z.B. die segmentale Musterbildung. Alle Mitglieder der Hedgehog-Familie sind Morphogene, die von Zellen sezerniert durch den extrazellulären Raum diffundieren und durch Rezeptorbindung Signale an Zellen weitergeben (Varjosalo und Taipale 2008). Als Morphogen diffundiert Ihh durch die Wachstumsfuge und aktiviert die Proliferation der distalen und kolumnaren Chondrozyten. Zudem reprimiert Ihh den Beginn der hypertrophen Differenzierung durch die Aktivierung des "Parathyroid Hormone-related Peptide" (PTHrP, neu: Pthlh) in distalen Chondrozyten. Dieser Faktor bindet in den proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten an den Pthlh-Rezeptor, diese Interaktion zwischen Ihh und Pthlh führt zu einer Inhibition der hypertrophen Differenzierung und stellt somit einen negativen Rückkopplungsmechanismus dar. *Ihh*-defiziente Mäuse haben eine stark reduzierte Proliferationsrate in Chondrozyten sowie Defekte in der Chondrozytendifferenzierung und in der Differenzierung von Osteoblasten (Vortkamp u. a. 1996; St-Jacques u. a. 1999).

1.4 Die Transkriptionsfaktoren der Gli-Familie

Intrazellulär wird das Ihh-Signal durch Transkriptionsfaktoren der Gli-Familie verarbeitet. Zu der Gli-Familie zählen in Vertebraten Gli1, Gli2 und Gli3. Gli1 aktiviert Genexpression in Antwort auf Hh-Signale, wogegen Gli2 und Gli3 bifunktionale Aufgaben erfüllen. In ihrer vollen Länge agieren sie als Genaktivatoren (GliA), in Abwesenheit von Ihh-Signalen werden diese Faktoren jedoch proteolytisch gespalten und reprimieren in der C-terminal trunkeierten Repressorform (GliR) die Expression von Genen, wobei Gli2 nur eine schwache Repressoraktivität besitzt (Wang u. a. 2000; Pan u. a. 2006). Gli3 ist der Hauptregulator des Ihh-Signals in der Knorpelanlage, da ein Verlust von Gli3 in *Ihh*-defizienten Mäusen deren Defekt in Chondrozytenproliferation und in der hypertrophen Differenzierung wiederherstellen kann (Hilton u. a. 2005; Koziel u. a. 2005). Im Gegensatz zu Verte-

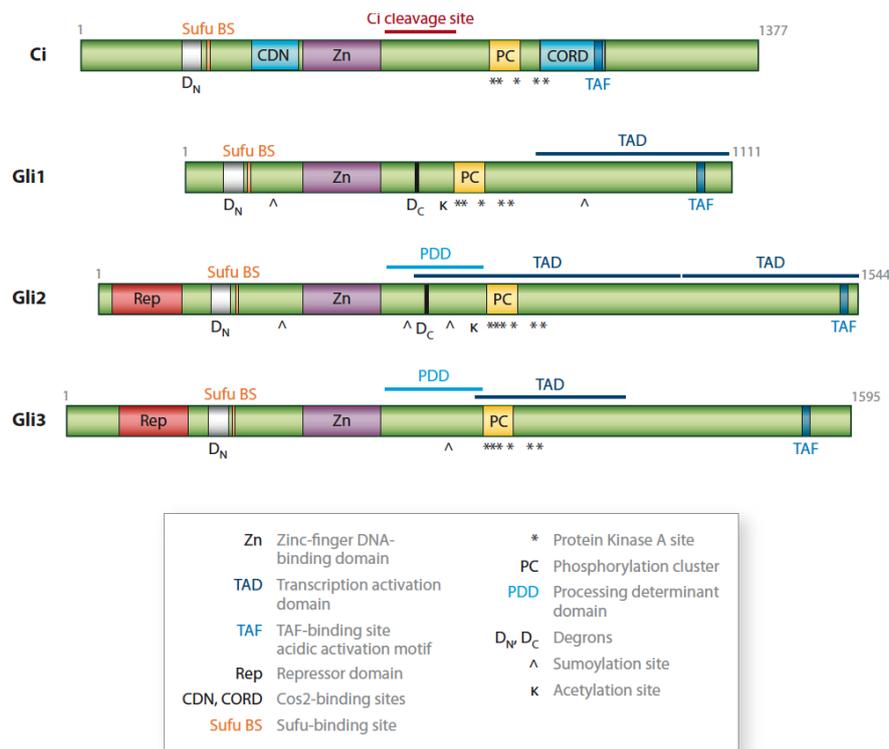


Abbildung 2: Schematische Darstellung von Domänen und Motive der Gli-Proteine. Das Gli-Homolog von *Drosophila melanogaster* (Ci) sowie Gli1-3 der Maus sind schematisch dargestellt (Hui und Angers 2011).

braten besitzen Invertebraten wie *Drosophila melanogaster* nur ein Gli-Homolog, Cubitus interruptus (Ci). Strukturell zeigen alle Gli-Proteine Gemeinsamkeiten auf (Abbildung 2). Alle Mitglieder der Gli-Familie besitzen homologe Zinkfinger-DNA-Bindedomänen und Phosphorylierungsdomänen. Zudem beinhalten sie eine Bindedomäne des negativen Hedgehog Regulators “Supressor of fused“ (Sufu), der an GliA bindet und durch Rekrutierung eines Repressorkomplexes die Transkription von Gli-Zielgenen reprimiert (Hui und Angers 2011). Interessanterweise kann Gli1 als einziges Homolog nicht proteolytisch gespalten und somit nicht als transkriptioneller Repressor fungieren. An die “Transkriptions Aktivierungs Domäne“ (TAD) im C-Terminus binden für die Transkriptionsaktivierung wichtige Faktoren wie z.B. cAMP response element-Bindeprotein (CBP) (Dai u. a. (1999)).

Die Funktion von *Gli*-Genen während der Embryonalentwicklung wurde durch die Analyse von mit GLI3-Mutationen einhergehenden humanen Syndromen, wie z.B. dem Greig Cephalopolysyndaktylie-Syndrom (GCPS) unterstrichen (Vortkamp u. a. 1991). GCPS ist eine autosomal dominante Erbkrankheit und geht mit Fehlentwicklungen der Gesichtsknochen sowie mit dem Auftreten von Polysyndaktyly einher. Die Mausmutante *Extra-Toes* (*Gli3^{XtJ}*), in der die Expression

von *Gli3* durch eine Deletion am 3'-Ende des Gens verhindert wird, stellt ein Modell für GCPS in der Maus dar (Schimmang u. a. 1992; Hui und Joyner 1993). Die Deletion von *Gli3* führt neben Polysyndaktylien zu einer leichten Verkürzung der Knochenlänge. Zudem treten schwere kraniofaziale Abnormalitäten wie ein vergrößerter Oberkieferknochen, ein reduzierter nasaler Fortsatz sowie Fehler in der Schädelwölbung auf (Mo u. a. 1997). Embryonal startet die Expression von *Gli3* während der Mesoderm differenzierung und kann während der Gliedmaßenentwicklung in der Zone der proliferierenden Chondrozyten sowie im Perichondrium detektiert werden (Hui und Joyner 1993). An den distalen Enden der Skelettelemente sowie in den Gelenkregionen kann in späteren Stadien eine starke *Gli3*-Expression nachgewiesen werden (Koziel u. a. 2005).

1.5 Die Hedgehog-Signaltransduktion findet bei Vertebraten im primären Cilium statt

Das primäre Cilium ist eine Organelle aus Mikrotubuli, welche proximal an einen Basalkörper verankert ist. Ein einziges Cilium ist auf der Zelloberfläche von fast allen Vertebratenzellen vorhanden. In der Cilie findet intraflagellarer Transport statt, der für die Signaltransduktion durch Hh unentbehrlich ist (Goetz und Anderson 2010). So befinden sich in Knorpelzellen die Komponenten der Ihh-Signalkaskade im Bereich des primären Ciliums (Ruiz-Perez u. a. 2007; Huangfu und Anderson 2005). In Abwesenheit von Hh-Signalen in der extrazellulären Matrix bindet der Transmembranrezeptor Patched (Ptch) das Transmembranprotein Smoothened (Smo), welches dadurch an der Translokation in die Membran der Cilie gehindert wird. Dadurch verhindert Smo die Lokalisation von Gli2-Sufu oder Gli3-Sufu Komplexen (im Folgenden als Gli-Sufu bezeichnet) in der Cilie. Daraufhin werden Gli-Proteine proteolytisch gespalten. Die gespalteten Gli Proteine (GliR) wandern in den Zellkern ein und reprimieren die Aktivität von Hh-Zielgenen (Abbildung 3a). Durch die Bindung von Hh an den Transmembranrezeptor Ptch kommt es zu einer intrazellulären Anreicherung von Ptch gebundenen Vesikeln und einer Translokation von Smo in die Membran der Cilie. Dies führt zu einer Anreicherung von Gli-Sufu Komplexen in der Cilienspitze und anschließenden Dissoziation von Sufu und Gli. Nicht prozessiertes Gli (GliA) wird in den Zellkern transportiert und aktiviert dort Hh-Zielgene (Abbildung 3b). Als Gli-Zielgene wurden zwei Faktoren des Hh-Signalweges beschrieben: *Ptch* (Agren u. a. 2004) und *Gli1* (Dai u. a. 1999).

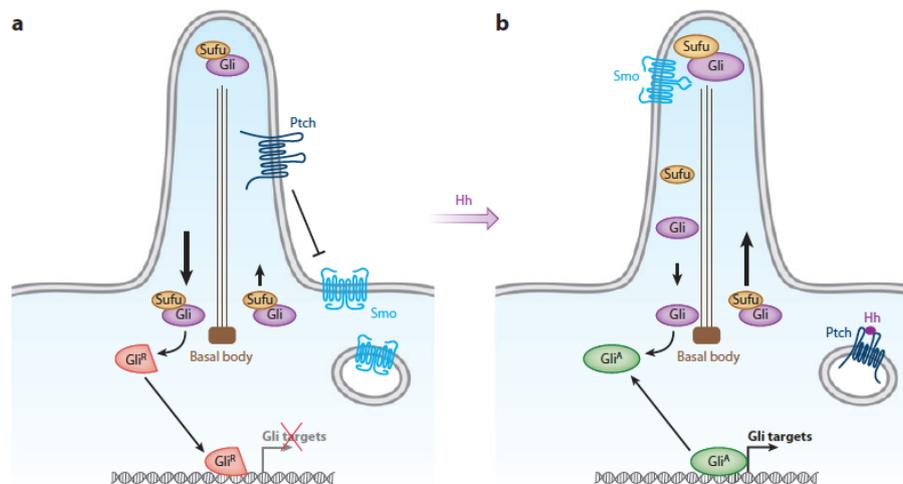


Abbildung 3: Hh-Signale führen zur Anreicherung von GliA in der Cilie. (a) Ohne Hh-Signale bindet der Rezeptor Ptch an Smo und verhindert dessen Anreicherung in der Cilie. In der Cilie befinden sich geringe Level von Gli-Sufu Komplexen, so wird Gli proteolytisch gespalten und reprimiert als GliR Hh-Zielgene. (b) Hh-Bindung an Ptch führt zu einer Ansammlung von Smo in der Cilie, was einer Ansammlung in der Cilienspitze und anschließenden Dissoziation des Gli-Sufu Komplexes bewirkt. Unprozessiertes Gli (GliA) aktiviert im Zellkern die Aktivität von Hh-Zielgenen. Aus: (Hui und Angers 2011)

1.6 Der Transkriptionsfaktor Trps1 interagiert mit Gli3A in Chondrozyten

Das Gen *Trps1* codiert für einen Multi-Zinkfinger Transkriptionsfaktor. Mutationen eines Allels von *TRPS1* beim Menschen führt zu der Ausbildung des Tricho-Rhino-Phalalgealem Syndrom (TRPS), einer dominant vererbaren Skeletterkrankung. Die Patienten entwickeln Defekte bei der Bildung von Haaren, den Gesichtsknochen und zeigen ein vermindertes Knochenwachstum (Momeni u. a. 2000). Wird die DNA-Bindedomäne von *Trps1* deletiert (*Trps1^{+/-Δgt}*), entwickeln Mäuse einen Phänotyp ähnlich des humanen Syndroms (Malik u. a. 2002). Die Expression von *Trps1* in Embryonen der Maus beginnt ab dem Entwicklungstag 7,5 (E7,5) in viszeralen Strukturen und kann ab E12,5 auch in Elementen der Gliedmaßenknospe und der Haarfollikel nachgewiesen werden. In den Knochenanlagen ist *Trps1* in proliferierenden Chondrozyten exprimiert, wobei das Level an *Trps1* mRNA in den Gelenken, den distalen Chondrozyten und in der Grenzregion zwischen proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten am höchsten ist (Kunath u. a. 2002).

In *in vitro* Experimenten wurde eine Bindung von *Trps1* an GATA-Sequenzen in dem *Pthlh*-Promotor (Nishioka u. a. 2008) sowie an den Promotor von zwei

Hauptregulatoren der Osteogenese: *Osteocalcin* (*Ocn*) und *Runx2* (Napierala u. a. 2005; Piscopo u. a. 2009; Kanno u. a. 2011) gezeigt.

Zudem wurde eine Interaktion von *Trps1* mit den Histondeacetylasen (Hdacs) 1, 3, 4 und 6 auf Proteinebene beschrieben ((Pasdziernik 2012) und unpublizierte Ergebnisse der AG Vortkamp). Die Regulation der Histondeacetylaseaktivität durch *Trps1* konnte zusätzlich nachgewiesen werden. In *Trps1* ^{Δ gt/ Δ gt}-Mutanten ist eine Reduktion der Knochenlänge und eine verzögerte hypertrophe Differenzierung zu beobachten. Zudem ist in mutanten Tieren die Zone der distalen Chondrozyten verkleinert, was mit einer stark verkleinerten Zone an *Pthlh* exprimierenden Zellen einhergeht (Wuelling u. a. 2009). In *Extra Toes* Mausmutanten, in welchen ein Allel von *Gli3* inaktiviert ist (*Gli3* ^{X^{tJ}}), wurde ein ähnlicher Phänotyp beobachtet (Koziel u. a. 2005), sodass eine Interaktion von *Gli3* und *Trps1* in Chondrozyten untersucht wurde. Co-Immunoprecipitations- (Co-IPs) und GST-Pulldownexperimente zeigten, dass *Trps1* mit der Aktivatorform von *Gli3* (*Gli3A*), aber nicht mit dessen Repressorform (*Gli3R*) in Chondrozyten interagiert (Wuelling u. a. 2009).

Im C-terminalen Teil von *Gli3A* befindet sich eine Transkriptions-Aktivierungsdomäne (TAD, siehe Abbildung 2). Es wurde gezeigt, dass das CREB-Bindeprotein sowie der Mediator Komplex an diese Domäne binden, was deren Repression von *Hh*-Zielgenen aufhebt (Zhou u. a. 2006).

Ob *Trps1* auch an diese Domäne bindet und in ähnlicher Weise wirkt, ist nicht bekannt. Auch ist die Funktion der Interaktion zwischen *Trps1* und *Gli3A* nicht aufgeklärt. Da beide Proteine im Zellkern vorhanden und als Transkriptionsfaktor beschrieben wurden, erscheint eine Funktion dieses Komplexes während der Genregulation als wahrscheinlich.

1.7 Transkriptionsfaktoren sind spezifische Regulatoren der Genaktivität

Jede Zelle eines Organismus trägt die gesamte Erbinformation, die Differenzierung unterschiedlicher Gewebe erfolgt durch eine zeitlich genau definierte Aktivität bestimmter Gene in unterschiedlichen Geweben. Die Aktivität eines Gens wird durch viele Faktoren beeinflusst. Im direkten Promotorbereich binden generelle Transkriptionsregulatoren, wie z.B. die RNA-Polymerase II und der Transkriptionsfaktor II D (TFIID) an definierte Motive wie die TATA-Box oder Initiatorsequenzen. Die dadurch erlangte basale Genaktivität wird durch die Bindung von

spezifischen Faktoren an Sequenzen im proximalen Promotor sowie an distal gelegenen Enhancerelementen reguliert (Abbildung 4).

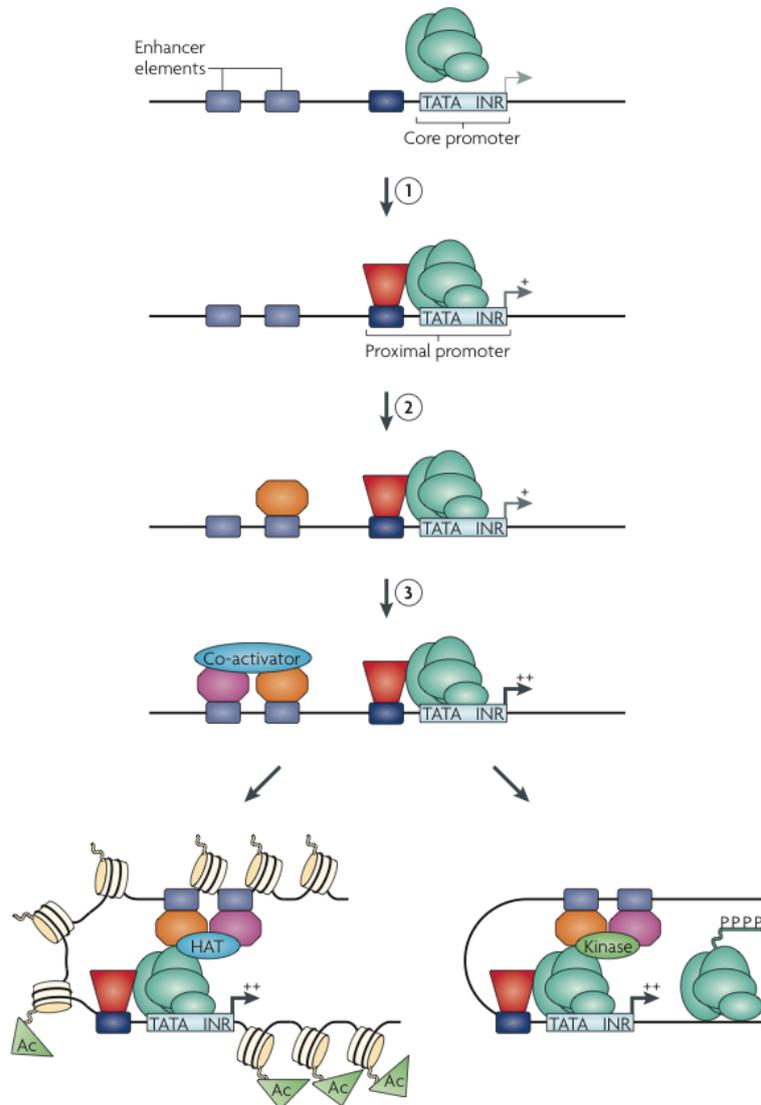


Abbildung 4: Ein Modell der transkriptionellen Genregulierung. Faktoren genereller Transkriptioninitiationskomplexe wie z.B. die RNA-Polymerase II (grüne Kreise) binden in Promotorregionen an Elemente wie die TATA-Box (TATA) oder Initiatorsequenzen (INR). Dadurch wird eine geringe Genaktivität erlangt. Diese Aktivität wird durch die spezifische Bindung von Faktoren (rot) und proximale *cis*-regulatorische Elemente (dunkelblau) in der proximalen Promotorregion (Schritt 1) begünstigt. Die Bindung von Transkriptionsfaktoren (orange) an distale Enhancerelemente verstärkt die Genaktivität (Schritt 2). Die Bindung von gewebspezifischen Faktoren (pink), welche die Rekrutierung von Co-Aktivatoren erlauben, steigert die Genaktivität wiederum (Schritt 3). Im Folgenden können die Enhancerelemente z.B. durch Co-Faktoren wie Histonacetyltransferasen (HAT) stimuliert werden (wie unten links dargestellt). Alternativ können sie Kinase binden, welche die C-Termini der RNA Polymerasen phosphorylieren und somit die Transkription stimulieren können (rechts) (Farnham 2009).

Dabei spielt nicht nur die Bildung von Komplexen aus unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren eine Rolle, sondern auch die Modifizierung des Chromatins durch die Rekrutierung von Histon-modifizierenden Enzymen. Diese Komplexe können Kinasen beinhalten, welche durch Phosphorylierung die Aktivität von z.B. der RNA-Polymerase beeinflussen können (Farnham 2009). Somit ist das Zusammenspiel von generellen und spezifischen Transkriptionsfaktoren und deren Bindung an *cis*-regulatorische Elemente (wie Promotoren und Enhancer) essenziell für die genaue Regulierung der Genaktivitäten. Neben Enhancern, welche die Genaktivität positiv regulieren, existieren weitere *cis*-regulatorische Elemente. An Silencerfragmente binden transkriptionelle Repressoren, welche die Bildung des generellen Transkriptionsinitiationskomplexes verhindern, oder repressive Chromatinstrukturen durch die Rekrutierung von Histon-modifizierenden Komplexen vermitteln. Insulatoren dienen als Barriere gegen den Einfluss von positiven Signalen der Enhancer sowie negativer Signale der Silencer und des Heterochromatins. Neben diesen Elementen existieren Strukturen, welche die Aktivität eines Enhancers mit der Aktivität eines bestimmten Genes in der Umgebung steuern. Diese "tethering elements" befinden sich meist in der Nähe des proximalen Promotors eines Zielgens (Farnham 2009; Spitz und Furlong 2012). Die zeit- und gewebespezifische Aktivität von Genen während der Embryonalentwicklung wird somit durch eine kooperative Bindung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren an *cis*-regulatorische Elemente reguliert. Die Zugänglichkeit des Chromatins spielt bei der Bindung von Transkriptionsfaktoren eine große Rolle. So kann es in *cis*-regulatorischen Elementen zu einer Methylierung am Lysin 4 des Histons 3 (H3K4me1) oder zu einer Acetylierung am Lysin 27 (H2K27ac) kommen. Letztere wurde mit aktiven Enhancerregionen und der Aktivität des nächstgelegenen Gens in Verbindung gebracht (Rada-Iglesias u. a. 2011; Creyghton u. a. 2010).

1.8 Die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Die Lage von regulatorischen Elementen, welche sowohl im direkten Promotorbereich zu finden sind, als auch durch die Bindung an *cis*-regulatorische distale Bereiche in weiter Entfernung vom Promotor die Aktivität von Genen beeinflussen, ist weitgehend unbekannt (Visel u. a. 2009). Um die Bindung von Transkriptionsfaktoren an regulatorische Bereich der DNA zu bestimmen, wurde in den letzten Jahren die Methode der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) gefolgt von Hochdurchsatzsequenzierungen (ChIP-Seq) entwickelt. Diese Methode findet

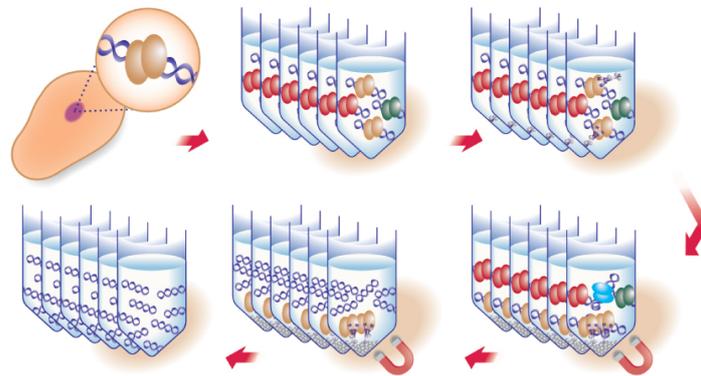


Abbildung 5: Prinzip der Chromatin-Immunopräzipitation. Proteine werden mit Formaldehyd an der DNA fixiert. Anschließend erfolgt eine Inkubation mit einem spezifischen Antikörper. Antikörper-Protein-Komplexe werden mit Hilfe von magnetischen Beads präzipitiert und an die Proteine gebundene DNA aufgereinigt. (Verändert nach: www.activemotif.com)

zudem in der epigenetischen Forschung, in der Histonmodifizierungen Aufschluss über die Aktivität des jeweiligen DNA-Bereichs geben, hohen Anklang (Robertson u. a. 2007). Am Anfang der ChIP werden DNA-bindende Proteine mit Formaldehyd an der DNA der Zelle fixiert. Anschließend werden die Zellen lysiert und die DNA mit Hilfe von Ultraschall fragmentiert. Antikörper, welche gegen bestimmte Proteine (z.B. gegen spezifische Transkriptionsfaktoren) gerichtet sind, werden verwendet, um diese und die an sie gebundene DNA zu präzipitieren. Im Anschluss wird die Fixierung zwischen Protein und DNA gelöst (Abbildung 5). Die aufgereinigte DNA wird im Folgenden für die Erstellung einer Library verwendet, dazu erfolgt eine Größensortierung, Amplifikation und Ligation von Adaptersequenzen an die DNA-Fragmente. Die Sequenzierung erfolgt meist mit Hilfe der “Next Generation“ Sequenzierer, welche einzelne DNA-Fragmente sequenzieren. Diese Reads werden im Anschluss bioinformatisch auf dem Referenzgenom kartiert, daraufhin können Anreicherungen der Reads als Peaks definiert und grafisch dargestellt werden.

2 Zielsetzung

Der Multi-Zinkfinger Transkriptionsfaktor Trps1 reguliert gemeinsam mit dem Indian hedgehog (Ihh)/Gli3-Signalweg die Differenzierung und Proliferation von Chondrozyten während des Knochenwachstums. Co-Immunopräzipitationen zeigten eine spezifische Interaktion von Trps1 mit der Aktivatorform des Transkriptionsfaktors Gli3 (Gli3A), die C-terminal trunkierte Repressorform von Gli3 (Gli3R) hingegen interagiert nicht mit Trps1 (Wuelling und Vortkamp 2010). In der vorliegenden Dissertation wird auf der genetischen, zellulären und Proteinebene die Interaktion zwischen Gli3A und Trps1 analysiert.

Auf Proteinebene soll im Zuge dieser Dissertation die Bindestelle von Trps1 an Gli3A lokalisiert werden. So werden Gli3-Konstrukte, welche zu verschiedenen Graden C-terminal trunkiert sind, kloniert und in Co-Immunopräzipitationen auf eine Interaktion mit Trps1 hin überprüft.

Trps1 ist vorwiegend im Zellkern zu finden, während Gli3A sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma von ATDC5-Zellen detektierbar ist. Mit Hilfe von Co-Transfektion von Gli3A und Trps1 in ATDC5-Zellen und anschließender Immunfluoreszenzfärbung und Auswertung der Mikroskopaufnahmen wird die Rolle von Trps1 in einer erwartigen Stabilisierung von Gli3A im Nukleus analysiert. Als Kontrolle dienen Trps1-Mutationskonstrukte, bei welchen keine Kernlokalisation des Proteins möglich ist.

Da die Transkriptionsfaktoren Gli3A und Trps1 in Chondrozyten interagieren, wird in der vorliegenden Dissertation die These untersucht, ob diese Proteine während der Knochenbildung Gene gemeinsam als Bestandteile eines Komplexes regulieren. Diese Zielgene sollen mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP), gefolgt von High Throughput Sequencing (ChIP Seq) identifiziert werden. Zunächst soll hierfür ein retrovirales Transduktionssystem etabliert werden, das stabil Sequenzen von myc-Fusionsproteinen von Gli3A, Gli3R oder Trps1 in das Genom der chondrogenen Zelllinie ATDC5 integriert. Die Kontrolle der ChIP erfolgt durch quantitative PCR (qPCR) mit Primern, welche eine publizierte Gli-Bindestelle in einer Enhancerregion von *Gli1* amplifizieren, sowie mit Primern, welche im Promotor von *beta Actin* liegen und nicht von Gli3 oder Trps1 gebunden werden sollen. Nach erfolgreicher Kontrolle der Methode wird das restliche Chromatin für den Illumina Genome Analyzer vorbereitet und mit selbigen sequenziert. Nach bioinformatischer Auswertung können Stellen auf der DNA, welche durch Gli3A in oder ohne Kom-

bination mit Trps1, aber auch von Gli3R gebunden werden, identifiziert werden. Die Bindung der Transkriptionsfaktoren an bestimmte DNA-Bereiche wird durch erneute CHIP, gefolgt durch qPCR mit Primern, welche potentielle Bindestellen amplifizieren, überprüft. Diese Daten werden durch die Identifikation neuer Gli3- und Trps1-Zielgene Aufschluss über die Funktion der Interaktion von Gli3A und Trps1 auf die Differenzierung von Chondrozyten geben.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Im Folgenden sind alle bei den verschiedenen Experimenten benutzten Chemikalien, Enzyme, Antikörper, Verbrauchsmaterialien, Kits, Geräte und Software mit der entsprechenden Bezugsquelle aufgeführt. Des Weiteren sind die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen und Nährmedien beschrieben und die Bakterienstämme, sowie Primersequenzen und Vektoren aufgelistet, die in dieser Arbeit benutzt wurden. Alle Puffer und Nährmedien wurden mit „Milli Q™“-gereinigtem Wasser hergestellt. Die meisten Puffer wurden als konzentrierte Stammlösungen angesetzt. Angegebene Konzentrationsangaben beziehen sich auf die jeweiligen Endkonzentrationen. Puffer, Medien und andere Lösungen wurden autoklaviert oder, falls hitzelabile Bestandteile enthalten waren, mittels Filtration sterilisiert. Pipettenspitzen, Eppendorf-Reagenzgefäße, Glasgeräte und Metallgeräte wurden ebenfalls durch Autoklavieren sterilisiert. Eppendorf-Reaktionsgefäße, Falcon-Reagenzgefäße, 5, 10 und 25ml Pipetten und alle Utensilien für die Zellkultur waren gamma-sterilisierte Einwegmaterialien. Die folgenden beschriebenen Methoden und Arbeitstechniken basieren auf Protokollen des Instituts für Entwicklungsbiologie.

3.1.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Laborchemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Taufkirchen) bezogen, wenn es nicht anders angegeben ist.

Chemikalien	Bezugsquelle
Agarose	Serva (Heidelberg)
Ampicilin	Calbiochem (Bad Soden)
ATP	Thermo Scientific (Dreieich)
Bacto-Yeast Extract	BD Diagnostic Systems (Heidelberg)
Difco-Pepton	BD Diagnostic Systems (Heidelberg)
DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific (Bonn)
dNTPs	Thermo Scientific (Dreieich)
DPX-Mounting Medium	Fluka (Deisenhofen)

Chemikalien	Bezugsquelle
Dynabeads Protein G	Life Technologies (Darmstadt)
Entwickler	Kodak (Stuttgart)
Ethanol	VWR (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Calbiochem (Bad Soden)
Fixierer	Kodak (Stuttgart)
Fluorescence Mounting Medium	Dako (Hamburg)
Glycogen (20 mg/ml)	Roche (Mannheim)
Isopropanol	VWR (Darmstadt)
Kanamycin	Calbiochem (Bad Soden)
MassRuler DNA Ladder-Mix	Thermo Scientific (Dreieich)
Methanol	Fischer Scientific (Schwerte)
Photoemulsion (NTB)	Integra Biosciences (Fernwald)
Pierce ECl Western Blot Substrate	Thermo Fisher Scientific (Bonn)
Polybrene	Calbiochem (Bad Soden)
Ponceau S	Serva (Heidelberg)
Protease Inhibitor Cocktail	Calbiochem (Bad Soden)
Protein G-Agarose	Roche (Mannheim)
Protein Ladder-Mix	Thermo Scientific (Dreieich)
Puromycin	Calbiochem (Bad Soden)

3.1.2 Enzyme

Enzyme	Konzentration	Bezugsquelle
DNase I, RNase free	10 U/ μ l	Roche (Mannheim)
DreamTaq-Polymerase	5U/ μ l	Thermo Scientific (Dreieich)
FastDigest Restriktionsenzyme	1 FDU/ μ l	Thermo Scientific (Dreieich)
Klenow Fragment	5U/ μ l	Thermo Scientific (Dreieich)
KOD Hot Start DNA Polymerase	1U/ μ l	Merck Millipore (Darmstadt)
Mung Bean Nuklease	10U/ μ l	NEB (Frankfurt am Main)
Proteinase K	10mg/ml	Roche (Mannheim)
RNaseA	10mg/ml	Roche (Mannheim)
T3-, T7-, SP6-Polymerase	20U/ μ l	Roche (Mannheim)
T4-DNA-Ligase	5U/ μ l	Thermo Scientific (Dreieich)

3.1.3 Kits

Kit	Hersteller
Beetle-Juice BIG KIT	PJK (Kleinblittersdorf)
Cell Line Nucleofector Kit T	Lonza (Köln)
ChIP-Seq Sample Prep Kit	Illumina (San Diego)
jet Prime DNA Transfection Reagent	Polyplus-Transfection (Illkirch Cedex)
MinElute PCR Purification Kit	Quiagen (Hilden)
my-Budget 5x EvaGreen (R) QPCR-Mix II (ROX)	BioBudget (Krefeld)
NucleoSpin Extract II	Machery-Nagel (Düren)
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Quiagen (Hilden)
Renilla-Juice BIG KIT	PJK (Kleinblittersdorf)
TOPO TA Cloning Kit	Life Technologies (Darmstadt)

3.1.4 Puffer

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
10 x Elektrophoresepuffer	250 mM Tris/HCl 2,5 M Glycin 1% (w/v) SDS
10x PBS	1,37 M NaCl 26,8 mM KCl 100 mM Na ₂ HPO ₄ 17 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
1x TAE	40 mM Tris-Base 10 mM EDTA pH 8,0 (Essigsäure)
20x TBS	3 M NaCl 1 M Tris, pH 7,4
1x TBST	1x TBS mit 0,5% (v/v) Tween 20

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
4x SDS-PAGE Ladepuffer	50 mM Tris/HCl, pH 6,8 20% (w/v) β -Mercaptoethanol 8% (w/v) SDS 40% (v/v) Glycerin 0,1% (w/v) Bromphenolblau
6x Orange G-Auftragungspuffer	300 ml/l Glycerin 2 g/l Orange G
50x Denhardt's Reagenz	100 g/l Ficoll 10 g/l Polyvinylpyrrolidone 10 g/l BSA
10x Waschpuffer(<i>in situ</i>)	4 M NaCl 100 ml Tris, pH 7,5 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
ChIP Lysepuffer	20mM Tris/HCl pH 8,0 85mM KCl 0,5% (w/v) NP-40
ChIP-Elutionspuffer	1%SDS 0,1M NaHCO ₃
Dilution Puffer	20mM Tris/HCl pH 8,0 150mM NaCl 2mM EDTA 1% (w/v) Triton X-100
High Salt Puffer	20mM Tris/HCl pH 8,0 2mM EDTA 500mM NaCl 0,1% (w/v) SDS 1% (w/v) Triton X-100

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
Hybridisierungspuffer (<i>in situ</i>)	50% Formamid (deionisiert) 3 M NaCl 20 mM Tris, pH 7,4 5 mM EDTA, pH 8,0 10 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0 10% (w/v) Dextransulfat 1x Denhardts 0,5 mg/ml Hefe-RNA
IP-Puffer	20 mM Tris/HCL, pH 7,6 100 mM NaCl 0,2 mM EDTA 0,1% (w/v) NP40 1 mM DTT 1% (v/v) Protease Inhibitor Cocktail
LiCl Puffer	250mM LiCl 1mM EDTA 20mM Tris-Cl pH 8,0 1% (w/v) NP-40 1% (w/v) Natriumdeoxycholat
Low Salt Puffer	20mM Tris-Cl pH 8,0 2mM EDTA 150mM NaCl 0,1% (w/v) SDS 1% (w/v) Triton X-100
Nuclei Lysis Buffer	50mM TrisCl pH 8,0 10mM EDTA 1% (w/v)SDS
P1 (Miniprep)	50 mM Tris-Cl, pH 8,0 10 mM EDTA

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
P2 (Miniprep)	200 mM NaOH 1% (w/v) SDS
P3 (Miniprep)	3 M Kalium-Acetat, pH 5,5
PBT	1x PBS mit 0,1% (v/v) Tween 20
PFA	4% (w/v) in 1x PBS
SDS-PAGE Sammelgel (5%)	5% (v/v) Acrylamid 125 mM Tris/HCL, pH 6,8 0,1% (w/v) SDS 0,1% (w/v) APS 1:1000 TEMED
SDS-PAGE Trenngel (x%)	x% (v/v) Acrylamid 400 mM Tris/HCL, pH 8,8 0,1% (w/v) SDS 0,1% (w/v) APS 1:1000 TEMED
TE-Puffer	10 mM Tris pH 8,0 1mM EDTA
TES	TE + 0,1% (w/v) SDS
Transferpuffer	50 mM Borsäure, pH 8,5 10% Methanol

3.1.5 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Firma
goat α - mouse HRP	1:10000	Santa Cruz (California)
goat α - ms Alexa488	1:1000	Life Technologies (Darmstadt)
goat α - ms Alexa594	1:1000	Life Technologies (Darmstadt)
normal mouse IgGs	2,5 μ g (ChIP)	Merck Millipore (Darmstadt)
swine α - Rabbit HRP	1:5000	Dako (Hamburg)
α - Actin (ab1801)	1:500	Abcam (Cambridge)
α - c-myc (9E10)	1:5000	Santa Cruz (California)
α - c-myc (9E10)X	2,5 μ g (ChIP)	Santa Cruz (California)
α - Flag M2	1:5000	Stratagene (Waldbronn)
α - Gli3	1:000	Santa Cruz (California)
α - Trps1	1: 1000	Eurogentec (Seraing)
α - Tubulin	1: 5000	Abcam (Cambridge)

3.1.6 Verbrauchsmaterialien und Sonstiges

Verbrauchsmaterialien und Sonstiges	Bezugsquelle
15/ 50ml Falcons	Corning (Amsterdam)
6-Well Platten	Corning (Amsterdam)
96-Well CoStar Half Area	Corning (Amsterdam)
96-Well qPCR Platten	BioBudget (Krefeld)
Deckgläser	Roth (Karlsruhe)
Einwegpipetten	Corning (Amsterdam)
Elektroporationsküvetten (Zellkultur)	Lonza (Köln)
Nitrocellulose-Membran	Bio-Rad (München)
Objektträger (SuperfrostPlus)	Roth (Karlsruhe)
Pipettenspitzen RNase DNase fre	Starlab (Hamburg)
Röntgenfilme	Thermo Fisher Scientific (Bonn)
Spritzenaufsatzfilter	Roth (Karlsruhe)
Whatman Papier	Macherey-Nagel (Düren)
Zellkulturflaschen	Corning (Amsterdam)

3.1.7 Geräte

Geräte	Hersteller
Berthold Centro LB 960 (Luminometer)	Berthold Technologies (Bad Wildbad)
Biophotometer	Eppendorf (Hamburg)
Bioruptor	Diagenode (Leiden)
Brutschrank (Bakterien)	Memmert (Schwabach)
Dynamag- Spin Magnet	Life Technologies (Darmstadt)
Dynamag-2 Magnet	Life Technologies (Darmstadt)
Elektrophoresekammern (horizontal)	Peqlab (Erlangen), Serva (Heidelberg)
Elektrophoresekammern (vertikal)	Hofer (Holliston)
Entwicklermaschine für Filme (Curix 60)	AGFA (Leverkusen)
Feinwaage	Mettler Toledo (Gießen)
Gel-Dokumentationsanlage	INTAS (Göttingen)
Genome Analyzer II	Illumina (San Diego)
Mikroliterpipetten	Peqlab (Erlangen)
Mikroskop (Axioplan 2)	Zeiss (Göttingen)
Mikrowelle	Sharp (Hamburg)
MilliQ-Anlage	Millipore (Schwalbach)
Nanodrop	Peqlab (Erlangen)
Nucleofector	Lonza (Köln)
PCR-Geräte (Mastercycler epgradientS)	Eppendorf (Hamburg)
PCR-Geräte (Thermocycler T3000)	Biometra (Göttingen)
pH-Meter	Mettler Toledo (Gießen)
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Schüttelinkubator	HT Infors (Einsbach)
StepOne Real-Time PCR System	Applied Biosystems /Life Technologies (Darmstadt)
Stereomikroskop (MZ FLIII)	Leica (Wetzlar)
Sterilbank	BDK (Sonnenbühl-Genkingen)
Sterilbank (HERAsafe, MSC-Advantage)	Thermo Fisher Scientific (Bonn)

Geräte	Hersteller
Thermo-Magnet-Rührer	IKA (Staufen)
Thermobad	GFL (Burgwedel)
Thermomixer	Eppendorf (Hamburg)
Vortex	Scientific Industries (New York)
Westernblot-Transfertank	Peqlab (Erlangen), Hoefer (Holliston)
Zeiss Axiovert 200 Mikroskop	Zeiss (Göttingen)
Zellkultur-Inkubatoren	Labotect (Göttingen)
Zentrifuge (5810R) (Rotor F45-30-11 für Eppendorf-Gefäße, Rotor A-4-62 für Falcon-Gefäße)	Eppendorf (Hamburg)

3.1.8 Nährmedien für Zellen und Bakterien

ATDC5 und HEK293-T Zellen wurden in folgenden Medien kultiviert und eingefroren. DMEM/F12, DMEM hoch Glukose (Glutamax), Penicillin/Streptomycin (P/S), PBS (Zellkultur) wurden von Life Technologies (Darmstadt), Fötale Kälber Serum (FCS) von PAN-Biotech (Aidenbach) bezogen.

Medium	Zusammensetzung
ATDC5 Einfriermedium	DMEM/F12 20% FCS 10% DMSO 1% P/S
ATDC5 Kultivierungsmedium	DMEM/F12 5% FCS 1% P/S
HEK293-T Einfriermedium	DMEM Glutamax 20% FCS 10% DMSO 1% P/S

HEK293-T Kultivierungsmedium	DMEM Glutamax
	10% FCS
	1% P/S

Zur Kultivierung von *Escherichia coli* wurde Luria Bertani-(LB)-Medium oder LB-Agar verwendet. Die Lösungen wurden vor Zugabe des Antibiotikums autoklaviert. Zur Selektion der Bakterien wurde dem LB-Medium oder dem LB-Agar entweder Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) zugesetzt.

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt 1 % (w/v) NaCl pH7,0
LB-Agar	1,5% (w/v) Agar in LB-Medium

3.1.9 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
ATDC5	Murine chondrogene Zelllinie	Atsumi u. a. (1990)
HEK-293T	Humane embryonale Nierenzelllinie	Graham u. a. (1975)

3.1.10 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5α	F- Φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR</i> , <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK- mK +) <i>phoA supE44</i> <i>λthi-1 gyrA96 relA1</i>	LifeTechnologies (Darmstadt)
TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>)Φ80 <i>dlacZ</i> Δ- M15Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK rspL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	LifeTechnologies (Darmstadt)
Mach1	F- Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 hsdR</i> (rK-, mK+) Δ <i>recA1398 endA1 tonA</i>	LifeTechnologies (Darmstadt)

3.1.11 Expressionsplasmide und Leervektoren

Folgende Expressionsplasmide wurden in den Experimenten verwendet:

Expressionsplasmid	Eigenschaften	Quelle
Gli3Amyc	cDNA für humanes Gli3A, N-terminaler 6x myc-Tag, in pCS2+MT	Ruiz i Altaba (1999)
Gli3Rmyc	cDNA für humanes Gli3R, N-terminaler 6x myc-Tag, in pCS2+MT	Ruiz i Altaba (1999)
pFlag-Trps1	cDNA für humanes Trps1, C-terminaler Flag-Tag, im pFLAG-N3	Dr. Frank Kaiser, Lübeck
Trps1R952C-GFP	cDNA für humanes Trps1, N-terminaler GFP Tag in peGFP-N3	Kaiser u. a. (2004)
Trps1YFP	cDNA für humanes Trps1, N-terminaler YFP Tag in peYFP	Dr. Frank Kaiser, Lübeck

Folgende Leervektoren wurden u.a. zur Klonierung verwendet:

Vektor	Verwendung	Quelle
pcDNA TM 3.1(-)/myc-His (C)	Klonierung/ Transfektionskontrolle	LifeTechnologies
pBABEpuro	Klonierung retroviraler Expressionsvektor	Morgenstern und Land (1990)
pHIT-G	Verpackerplasmid	Soneoka u. a. (1995)
pHIT-60	Verpackerplasmid	Soneoka u. a. (1995)
pGL4.10	Luciferase ohne min. Promotor	Clontech
pGL4.23	Luciferase mit min. Promotor	Clontech
phRG-TK	Renilla Transfektionskontrolle	Clontech
peGFP-N3	GFP Leervektor, Transfektionskontrolle	Clontech
pFLAG-CMV	FLAG Leervektor, Transfektionskontrolle	SigmaAldrich

3.1.12 Primersequenzen

In der folgenden Tabelle sind Primer aufgelistet, die für die Klonierung von Gli3-Expressionsplasmiden benötigt wurden. Unterstrichen sind eingefügte Restriktionsschnittstellen, fett dargestellt ist der Transkriptionsstart.

Name	Sequenz
Gli3TD EcoRV fw	GCGATAT <u>CGAAACCCCAATCAT</u> GGAC
Gli3C EcoRV rw	TAGATAT <u>CCTAAAGCGTCAT</u> GGCCCA
Gli3TD EcoRV rw	ATGATAT <u>CCTACGCGTCAAAGTCAAAGT</u> CACCG
myc-Tag BamHI fw	TGGAT <u>CCATGGAGCAA</u> AAGCTCATT
myc-Tag EcoRI rev	GAGCACTTCACTATGG <u>AATTC</u> AAG
Gli3TCBamHI fw1	ATAGGAT <u>CCATGCTCCCGGGC</u> AGAAGCGAC
Gli3TC EcoRI rw2	GCGCGAAT <u>TCCTATTGCATA</u> ACTGCAAGGA

Folgende Primer wurden für die Klonierung von Luciferasekonstrukten benutzt. Dabei wurde nach TOPO-Zwischenklonierung die Promotorsequenz von *Wnt5a* in pGL4.10, die Sequenzen der *Col2a1*- und *Pthlh* Peaks in pGL4.23 kloniert.

Primer	Sequenz
Pthlh Luci fw	TTTGGCGGTTGGACTCCCCT
Pthlh Luci rev	AGCAGGTCGAGCTGGGGTTT
Wnt5a Luci fw	TGAGACATTGTTTGAGCATGC
Wnt5a Luci rev	GCACAGAACACTTACCTTCAT
Col2a1 Luci Fw	AGTCTCTTCAGGAGGGATGT
Col2a1 Luci rw	AGTCAGTGTGACCAAGACAA

Diese Primer wurden benutzt, um von cDNA der Maus einen intronüberspannenden Bereich der *Gtf2i* mRNA zu amplifizieren. Nach TOPO-Zwischenklonierung kann das Plasmid mit den angegebenen Enzym linearisiert und mit der angegebenen mRNA Polymerase eine antisense-Probe generiert werden.

Name	Sequenz	Restriktion	Polymerase
Gtf2i in situ fw	AGGCTTTGCAAGGAAGCCAT	BamHI	T7
Gtf2i in situ rw	GGGGCTTCGGAAAGGAATGT		

Für qPCR Analyse von ChIP-Seq Peaks wurden folgende Primer verwendet:

Gen	Sequenz	Koordinaten
Col2a1 fw	TCTCCGGCTGTCGATGGCAA	chr15:97,873,225
Col2a1 rw	TGTCCCCACAGCAACACATGC	-97,873,404
Fibulin fw	ACATCCCCGGGTCCCTTCCT	chr15:85,158,198
Fibulin rw	GCGTGAAGACCATCCCGGC	-85,158,404
Fst fw	ATCGCAGGACTGACCCCTCT	chr13:115,299,690
Fst rw	CTGGCTTCTTGAAAGAGGTTGGG	-115,300,079
Gtf2i fw	CCGCCACACCAGGTTTATCC	chr5:134,805,785
Gtf2i rw	CTTGAGGTGGGAGAACAGGCT	-134,806,079
Hhip fw	TCCAGGGCAGCCTCATAGCC	chr-82,702,111
Hhip rw	GGCTTTGGGACAGGGAAGGC	-82,702,111
Pax1 fw	TCTGGTGCTGCAGGCTTCCT	chr2:147,082,509
Pax1 rw	AGGGGCAGATGCTTCTCTGGG	-147,082,667
Pthlh fw	CCTCTGCCTGGACTGGGGCT	chr6:147,093,516
Pthlh rw	TGAGCAGCTGCCACTTGGGC	-147,094,335
Sfrp2 fw	GTGGGGAGGTAGCCATCAAGTCA	chr3:83,565,580
Sfrp2 rw	GGCCTCAGAGCCATCCAACC	-83,566,594
Snail fw	TGTACCCATTCCCACGTGTCGT	chr2:167,337,579
Snail rw	CATGACCTCTGCTCAGCCCCT	-167,338,059
Sox9#3 fw	AAGTCGGAAGGGCGTCGTGA	chr11:112,487,199
Sox9#3 rw	GGGGCCCTGCCAAGGTGTTA	-112,487,511
Sox9#4 fw	TTCTTGGCTGGCCTGGCTTC	chr11:112,709,949
Sox9#4rw	GGTGATGTGCTGTGTGCTGGC	-112,710,165
Wnt5a fw	TGGAGTCTGGATCCCCGGTT	chr14:29,317,174
Wnt5a rw	GCTTGGAGGGTAGAGTGGGC	-29,317,331

Folgende Primerpaare wurden für die Kontrolle der ChIP mit konventioneller und qPCR verwendet:

Name	Sequenz	Information
Gli1 fw	GGACAAAGAGACCTGGGACA	Vokes u. a. (2007)
Gli1 rw	AGGAGATGCTCTGACGCCTA	
Ptch fw	GAAGTATTGCATGCGAGAGG	Vokes u. a. (2007)
Ptch rw	CTGTCAGATGGCTTGGGTTT	
beta Actin fw	AGAAGGACTCCTATGTGGGTGA	Vokes u. a. (2007)
beta Actin rw	ACTGACCTGGGTCATCTTTTC	
beta Actin fw	GCCCCTGTCCTGAGACTCCCA	Kontrolle ChIP-qPCR
beta Actin rw	GGACAGCACAGCCTGGATGGC	

3.1.13 Software

Software	Version	Anwendung
Excel	14.2.5	Datanalyse
MetaMorph		Aufnahme Fluoreszenzen
MetaMorphOffline		Auswertung Fluoreszenzen
MicroWin2000	4.41	Luciferase
StepOne	2.1	qPCR
Photoshop	11.0	Bildbearbeitung
MACS	1.4.1	Peak calling
PeakAnalyzer	1.0	Anzeige von Peaks
CCAT	3.0	Peak Calling
MEME	4.8.1	Motivanalyse
IGV	2.0	Visualisierung von Peaks
RStudio	0.97.449	statistische Auswertung

3.2 Methoden

Alle Zellkulturarbeiten bis auf die retrovirale Transduktion wurden in einem S1-Zellkulturlabor mit Umluftstrom-Sterilbank durchgeführt. Versuche mit genetisch veränderten Organismen wurden im S1-Labor durchgeführt. Die folgenden beschriebenen Methoden und Arbeitstechniken basieren auf Protokollen des Instituts für Entwicklungsbiologie.

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten. Sie beruht auf der Eigenschaft von DNA-Polymerasen, einzelsträngige DNA als Matrize zur Synthese eines Komplementärstrangs zu nutzen, um im großen Maßstab Kopien einer spezifischen DNA-Sequenz zu produzieren (Mullis und Faloona 1987). Zur Amplifikation eines DNA-Fragments wird zu der DNA-Probe eine thermostabile DNA-Polymerase, der zugehörige Puffer, die vier Desoxyribonukleotidtriphosphate, sowie zwei spezifische Primer, die komplementär zu den Enden der zu vervielfältigen DNA-Sequenz sind, hinzugefügt. Die Zusammensetzung eines 25 μ l PCR-Ansatzes ist im Folgenden dargestellt:

1-20ng	Plasmid oder 100ng genomische DNA
2,5 μ l	10x Dream Taq Puffer
2 μ l	MgCl ₂
1,25 μ l	DMSO
0,5 μ l	forward Primer (100pmol/ μ l)
0,5 μ l	reward Primer (100pmol/ μ l)
0,2 μ l	dNTPs (100mM)
0,1 μ l	Dream Taq Polymerase (5U/ μ l)
	+ H ₂ O
<hr/>	
25 μ l	

Bei jedem Zyklus der PCR wird die doppelsträngige DNA durch Temperaturerhöhung auf 92-98°C denaturiert. Durch Abkühlung auf eine Primer-spezifische Temperatur können die Oligonukleotide mit den 5'- und 3' flankierenden Sequenzen der zu amplifizierenden DNA hybridisieren (Annealing). Im nächsten Schritt erfolgt die Synthese des Komplementärstrangs durch die DNA-Polymerase (Elongation).

gation). Die Temperatur beträgt bei Verwendung der Taq-Polymerase 72°C. Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des zu erwartenden PCR-Produkts. Die zyklische Wiederholung dieser verschiedenen Temperaturveränderungen führt schließlich zu einem exponentiellen Anstieg der DNA-Konzentration. Die Zyklusbedingungen sind von unterschiedlichen Faktoren abhängig und wurden den jeweiligen DNA-Matrizen und Primerschmelztemperaturen angeglichen. Sie wurden jeweils nach folgendem Muster variiert:

1. Denaturierung der DNA	95°C	5min	35x
2. Denaturierung der DNA	95°C	30s	
3. Annealing	50-60°C	20s	
4. Elongation	72°C	1min	
5. terminale Elongation	72°C	7min	

Für die Klonierung von Fragmenten in Expressionsvektoren wurde eine Proofreading-Polymerase verwendet, die Fehler im Nukleotideinbau erkennt und behebt. Durch die Verwendung dieser KOD-Polymerase ist gewährleistet, dass ein Basenaustausch nicht zu Mutationen im Protein oder sonstigen Fehlinformationen in der Translation führt. Die Ansatzbedingungen für die KOD-Polymerase sind wie folgt:

1-20ng	Plasmid oder 100ng genomische DNA	
5µl	10x Dream Taq Puffer	
6µl	MgSO ₄	(1,5mM)
0,6µl	forward Primer	(0,3µM)
0,6µl	reward Primer	(0,3µM)
5µl	dNTPs	(0,2mM)
1µl	KOD Hot Start Polymerase	(0,02 U/µl)
+ H ₂ O		
<hr/>		
50µl		

Für Fragmente über 3kb wurden dabei folgende Zyklusbedingungen angewandt:

1. Denaturierung der DNA	95°C	2min	35x
2. Denaturierung der DNA	95°C	20s	
3. Annealing	niedrigste Primer T _m	10s	
4. Elongation	70°C	25s/kb	
5. terminale Elongation	70°C	5min	

Da die KOD-PCR-Produkte “Blunt Ends“ liefert, wurden vor Subklonierung in pCRII-TOPO 3' 3' Desoxyadenosinüberhänge durch Zugabe von 0,2µl DreamTaq und Inkubation für 10 Minuten bei 72°C angefügt.

3.2.1.2 Aufreinigung von PCR-Fragmenten

PCR-Ansätze enthalten Primer und dNTPs, die für Klonierungen hinderlich sein können. Für Klonierungen wurden deshalb PCR-Fragmente mit Hilfe des NucleoSpin II Kits von Machery-Nagel nach Herstellerangaben aufgereinigt.

3.2.1.3 TOPO-TA- Klonierungen

Zum Subklonieren von PCR-Fragmenten mit 3' Desoxyadenosinüberhängen in die multiple cloning site (MCS) eines Vektors wurde die TOPO-TA-Klonierung angewandt. Die Subklonierung erfolgte mit Hilfe des TOPO-TA Klonierungskits von Invitrogen nach Herstellerangaben in den pCRII-TOPO Vektor.

3.2.1.4 Die quantitative PCR (qPCR)

Mit Hilfe der quantitativen PCR lässt sich die Anreicherung von PCR-Produkten analysieren. Interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe wie SYBR Green, die nach DNA-Bindung fluoreszieren, werden verwendet, um den PCR-Zyklus des exponentiellen Anstiegs der PCR-Produktmenge zu bestimmen. Der Teil der Kurve, in dem die Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrund ansteigt, wird als Ct-Wert bezeichnet. Dieser Ct-Wert gibt Aufschluss über die Anreicherung eines bestimmten Fragments in einer Probe verglichen mit Kontrollbereichen. Die qPCR findet sowohl in der Analyse von Transkriptmengen, welche von RNA zu cDNA umgeschrieben wurden (Reverse Transkriptase quantitative PCR = RT-qPCR), als auch bei Analysen von genomischer DNA nach ChIP Verwendung. Die qPCR wurde mit Hilfe des EvaGreen-qPCR-Master Mixes durchgeführt. Dabei wurden, sofern nicht anders angegeben, Duplikate verwendet. Der Ansatz für eine qPCR ist im Folgenden angegeben:

14,6µl	H ₂ O
4µl	EvaGreen 5x Master Mix
0,2µl	forward Primer (Stock: 10pmol/µl)
0,2µl	reward Primer (Stock: 10pmol/µl)
1µl	DNA
<hr/>	
20µl	

Um sicher zu gehen, dass die qPCR genaue Aussagen über die Anreicherung bestimmter DNA-Sequenzen liefert, wurden alle eingesetzten Primerpaare vor Verwendung mit einer Verdünnungsreihe von genomischer DNA getestet. Trägt man nach Test-qPCR die DNA-Konzentrationen auf einer logarithmischen Skala gegen die Ct-Werte auf, so sollten die Werte mit einer Geraden der Steigung 1 verbunden werden können. So ist gewährleistet, dass sich in jedem PCR-Zyklus die Menge an DNA-Fragmenten verdoppelt.

Die Auswertung der ChIP-Experimente nach qPCR erfolgte durch die Auswertung der % Input an präzipitierter DNA. Zuerst erfolgte die Anpassung des Ct-Wertes des Inputs an die Ct-Werte der ChIP-qPCRs. Dazu wurde der $\log_2(\% \text{ DNA Menge Input, wenn DNA-Menge ChIP} = 100\%)$ von den Ct-Werten des Inputs subtrahiert. Die Berechnung des % Input Wertes erfolgte daraufhin mit folgender Formel:

$$\% \text{ Input} = 100 \times 2^{(\text{angepasster Ct}(\text{Input}) - \text{Ct}(\text{ChIP}))}$$

Die % Input-Werte der potentiellen Binderegionen wurden auf die % Input-Werte der *beta Actin*-qPCRs normalisiert, um die Anreicherung im Verhältnis zu unspezifischen Bindungen zu bestimmen.

3.2.1.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA-Proben wurde mittels Nano-Drop (Peqlab) bestimmt. Die Technik basiert auf einer spektralphotometrischen Messung bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm. Dabei entspricht eine Extinktion von 1,0 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Durch die Ermittlung der optischen Dichte (OD260) bei dieser Wellenlänge λ kann die Konzentration der Nukleinsäure-Lösung berechnet werden. Ein OD260-Wert von 1 entspricht einem DNA-Gehalt von 50 µg/ml. Bei RNA-Messungen entspricht ein OD260-Wert von 1 einem RNA-Gehalt von 40 µg/ml. Da die aromatischen Aminosäuren der Proteine bei einer Wellenlänge von $\lambda=280$ nm absorbieren, wird die Reinheit der Nukleinsäuren

durch das Verhältnis OD260/OD280 festgestellt. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen OD260/OD280-Wert von ungefähr 1,8, während eine reine RNA-Lösung ein OD260/OD280-Verhältnis von circa 2,0 erhält.

3.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe mit Hilfe eines elektrischen Feldes aufgetrennt werden. In Taschen eines horizontalen Agarosegels geladen, wandert die negativ geladene DNA in einem angelegten elektrischen Feld zum positiven Pol. Abhängig von den Fragmentgrößen werden 0,8-2 prozentige Agarosegele in 1x TAE-Puffer verwendet. Die benötigte Menge an Agarose wird hierzu in TAE-Puffer gemischt und aufgekocht bis eine klare Lösung entsteht. Nach Abkühlen der Lösung wird 0,3µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und lässt sich mit UV-Licht sichtbar machen. Die Lösung wird in Schlitten gegossen und ein Kamm mit der Anzahl an benötigten Ladetaschen eingehängt. Wenn das Gel polymerisiert ist, wird es in eine horizontale Gelkammer gelegt und mit 1x TAE Puffer überschichtet. Die Proben werden mit 6x Orange G Auftragungspuffer versetzt und mit einem DNA-Marker zusammen aufgetragen. Die Gelelektrophorese wird bei 80-130V durchgeführt. Das DNA-Bandenmuster lässt sich anschließend unter UV-Bestrahlung sichtbar machen und kann fotografiert werden.

3.2.1.7 Restriktion von Plasmiden

Typ II Restriktionsendonukleasen erkennen spezifisch eine definierte DNA-Sequenz von 4 bis 8 Basenpaaren (meistens 6) und schneiden den DNA-Doppelstrang spezifisch in dieser Sequenz. Die Restriktion von Plasmiden erfolgte mit Fast Digest Enzymen (Thermo Scientific). Dabei verdaut 1 FDU Enzym 1µg DNA innerhalb von 5-15 Minuten bei 37°C. Die Reaktionen fanden in 1x FastDigest Pufferlösungen statt. Verwendet man 1x FastDigest Green Puffer, kann man den Ansatz ohne Zugabe von Ladepuffer nach erfolgtem Verdau direkt auf ein Agarosegel laden. Ein Restriktionsansatz berechnet sich wie folgt:

5µl	10x FastDigest (Green) Buffer
1µl	FastDigest Restriktionsenzym (1FDU/µl)
1µg	Plasmid DNA
+ H ₂ O	
<hr/>	
50µl	

3.2.1.8 Aufreinigung von Fragmenten aus Agarosegelen

Zu Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das „NucleoSpin Extract II“ Kit von Machery-Nagel verwendet. Das gewünschte DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell unter Gebrauch einer UV-Handlampe aus dem Gel herausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Elution der DNA erfolgte nach Herstellerangaben.

3.2.1.9 Herstellung von Blunt-End-DNA-Fragmenten

Durch die Restriktion entstehen entweder Einzelstrangüberhänge (sticky-ends) oder ein glatter Doppelstrang (blunt-end). Möchte man sticky-ends zu blunt-ends umwandeln, kann man die Einzelstrangüberhänge abspalten oder auffüllen.

Die Mung-Bean-Nuklease (NEB) spaltet überhängende Nukleotide ab, sodass glatte Enden entstehen. Hier ist ein Ansatz für die Behandlung von 1µg Plasmid DNA gezeigt:

5µl	10x Mung-Bean-Nuklease-Puffer
0,5µl	Mung-Bean-Nuklease (5U)
1µg	Plasmid-DNA
+ H ₂ O	
<hr/>	
50µl	

Die Reaktion fand 30 Minuten bei 30°C statt, danach kann die DNA mit Hilfe eines Kits aufgereinigt werden. Um 3'-Überhänge aufzufüllen, erfolgt eine Behandlung mit dem Klenow-Fragment (Fermentas).

2µl	10x Klenow reaction Puffer
0,1µl	Klenow-Fragment (1U)
200ng	linearisiertes Plasmid
0,05mM	dNTPs
+ H ₂ O	
<hr/>	
20µl	

Die Reaktion fand bei 37°C für zehn Minuten statt und wurde durch Inkubation für zehn Minuten bei 75°C inaktiviert.

3.2.1.10 Dephosphorylation von linearisierten Vektoren

Um eine Religation der Vektoren während der Ligation zu vermeiden, wurden sie mit einer thermosensitiven alkalinen Phosphatase behandelt. Diese katalysiert die Abspaltung von 5'- und 3'-Phosphatgruppen von der DNA. Die Behandlung der linearisierten Vektor DNA erfolgt mit der FastAP (Thermo Scientific):

2µl	FastAP 10x Puffer oder 10X FastDigest Buffer
1µl	FastAP (1U)
1µg	Plasmid-DNA
+ H ₂ O	
<hr/>	
20µl	

Die Reaktion erfolgt für 10 Minuten bei 37°C, danach erfolgt eine Inaktivierung des Enzyms für 5 Minuten bei 75°C. Wurde der FastDigest Puffer für die Reaktion verwendet, kann im Anschluss die Ligation ohne Aufreinigung des Fragmentes ablaufen, da auch hier derselbe Reaktionspuffer verwendet werden kann.

3.2.1.11 Ligation

Bei der Ligation von zwei kompatiblen, linearen DNA-Fragmenten entsteht eine Phosphodiesterbindung zwischen einem freien 5'Phosphat und einer freien 3'Hydroxylgruppe. Um eine möglichst hohe Effizienz der Ligation zu erreichen, wurden 50ng dephosphorylierter Vektor und ein 3-facher molarer Überschuss des Inserts eingesetzt. Vor der Ligation wurde das Insert über Gelextraktion aufgereinigt. Die Ligation erfolgte mit der T4-Ligase von Thermo Scientific über Nacht bei 22°C. Ein Ligationsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

2µl	T4 DNA Ligase Buffer oder 10X FastDigest Buffer
1µl	T4 DNA Ligase (1U)
50ng	linearisierter, dephosphorylierter Vektor
3x	molarer Überschuss Insert
0,05mM	ATP (bei FastDigest Puffer)
+ H ₂ O	
<hr/>	
20µl	

3.2.1.12 Transformation in chemisch kompetenter Bakterien

Für die Transformation chemisch kompetenter *E.coli* Bakterien wurden die

Stämme Top10 oder Mach1 (Invitrogen) für Topo-TA Reaktionen, DH5 α für Ligationen oder Retransformationen verwendet. Chemisch kompetente Bakterien können mit Hilfe eines kurzen Hitzeschocks transformiert werden. So wurden Aliquots der Bakterien (50-100 μ l), welche bei -80°C gelagert werden, auf Eis aufgetaut und mit dem ganzen Ligationsansatz bzw 2 μ l der TOPO-TA Reaktion oder 10ng Plasmid-DNA gemischt. Der Hitzeschock erfolgte für 45s bei 42°C, danach wurden die Zellen für einige Minuten auf Eis inkubiert und mit 250 μ l LB-Medium versetzt und bei 37°C für eine Stunde geschüttelt. Anschließend wurden die transformierten Bakterien je nach ihrer Antibiotikaresistenz auf den jeweiligen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.1.13 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die Minipräparation von Plasmiden im Zuge von Klonierungen wurden mit einzelnen Klonen in 5ml Kulturen aus LB-Medium mit entsprechender Antibiotikaresistenz angeimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2ml jeder Kultur in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 30s bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 μ l P1 Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 μ l P2 erfolgte die Lyse der Zellen für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Die Neutralisation erfolgte durch Resuspendierung in 150 μ l P3. Anschließend wurden die Ansätze für 5 Minuten bei 13000rpm zentrifugiert und 400 μ l Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 320 μ l Isopropanol und anschließender Zentrifugation für 30 Minuten bei 13000rpm bei 4°C wurde die DNA gefällt. Die DNA wurde in 500 μ l 70% Ethanol für 15 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen, anschließend wurde das Ethanol entfernt und die Pellets getrocknet. Die präzipitierte DNA wurde in Wasser resuspendiert und für weitere Analysen verwendet.

Die DNA Midipräparation wurde für die Herstellung von größeren Mengen an reinem Plasmid für Transfektionen verwendet. Sie erfolgte mit Hilfe des Quiagen Plasmid Midi Kits nach Herstellerangaben.

3.2.1.14 Klonierungsstrategien

Für die einzelnen Experimente wurden eine Vielzahl von Konstrukten kloniert. Die einzelnen Klonierungsstrategien sind im Folgenden dargestellt.

3.2.1.14.1 Gli3-Deletionskonstrukte

Die Gli3A-Deletionskonstrukte Gli3C und Gli3 TAD wurden durch die Ligation von unterschiedlich langen Bereichen des C-Terminus von Gli3A an ein Gli3Rmyc (in pCS2+MT) Plasmid erlangt. Dafür wurden Primer mit EcoRV Schnittstellen verwendet, wobei die reverse Primer eine Stopsequenz beinhalten. Nach erfolgter PCR mit der KOD-Polymerase und Subklonierung in den TOPO-II Vektor wurden die Fragmente durch einen Verdau mit EcoRV aus den Vektoren geschnitten, durch Gelextraktion aufgereinigt und für die Ligation eingesetzt. Gli3Rmyc in pCS2+ wurde mit XbaI linearisiert und anschließend blunt Ends durch Mung-Bean-Nuklease-Behandlung hergestellt. Es erfolgte im Anschluss die Ligation mit den jeweiligen Inserts.

Gli3 Δ Cmyc hingegen wurde durch Deletion des C-Terminus durch Verdau von Gli3Amyc (in pCS2+) mit HindIII und XbaI, anschließender Herstellung von Blunt Ends durch Behandlung mit dem Klenow Fragment und Religation kloniert. Gli3TCmyc wurde durch Insertion des PCR-Fragments des C-Terminus von Gli3A in pcDNA3.1(A) kloniert.

3.2.1.14.2 Retrovirale Expressionsvektoren

Um myc-getaggte Fusionsproteine in retrovirale pBABE-puro Expressionsvektoren zu klonieren, wurde zunächst ein N-terminaler myc-Tag per PCR mit Primern, die eine BamHI (im forward Primer) und EcoRI (im reverse Primer) Schnittstelle tragen, von Gli3Amyc in pCS2+MT amplifiziert. Danach erfolgte eine Subklonierung in den TOPO-TA Vektor und anschließende Restriktion mit BamHI und EcoRI. Der pBABE-puro Zielvektor wurde mit EcoRI und BamHI linearisiert und im Anschluss erfolgte die Ligation mit dem myc-Fragment. Gli3Amyc und Gli3Rmyc wurden mit EcoRI Hydrolyse aus den pCS2+MT Vektoren herausgeschnitten und im Anschluss in einem mit EcoRI linearisierten pBABEpuro-myc Vektor ligiert. Trps1myc in pBABE-puro wurde im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikum Essen von Stephanie Gkalypoudis kloniert.

3.2.1.14.3 Luciferase-Konstrukte

Die Sequenz möglicher Gli3myc- und Trps1myc Bindestellen wurden mit PCR amplifiziert, in TOPO-TA Vektoren subkloniert und im Anschluss gerichtet in pGL4.10 (Wnt5a), oder in pGL4.23 Vektoren (Promega) kloniert. Die Klonierung der Luciferase-Konstrukte erfolgte durch Yvonne Krause (Abt. Entwicklungsbiologie, ZMB Essen).

3.2.1.15 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden bei GATC (Konstanz) durchgeführt. Die ermittelten Sequenzen wurden mittels NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mit den Datenbank-Sequenzen verglichen.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

Alle Zellkulturarbeiten wurden an Sterilbänken durchgeführt. Zelllinien wurden in Flaschen bzw. Well-Platten von Corning kultiviert. Die Inkubation der Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37°C, 5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Die Zentrifugation von Zellen wurde immer für 5 min bei 1000 rpm und RT durchgeführt.

3.2.2.1 Auftauen und Einfrieren von Zelllinien

Zum Auftauen von Zelllinien wurde ein Cryoröhrchen mit 1ml Zellsuspension direkt von der -150°C Truhe in ein 37°C Wasserbad überführt. Die aufgetauten Zellen wurden mit 1ml Medium aus dem Cryoröhrchen in eine T75 Flasche mit 10ml überführt. Nach einem Tag erfolgte ein Medienwechsel, danach konnten die Zellen für Experimente verwendet werden. Um Zelllinien einzufrieren, wurden die adhären Zellen zunächst in PBS gewaschen und anschließend mit 0,5% Trypsin behandelt. Nach 2-5 Minuten konnten die Zellen vom Boden der Flaschen gelöst und gezählt werden. Die Zellen wurden zentrifugiert und in einer Konzentration von jeweils 1×10^6 Zellen/ml in Einfriermedium aufgenommen. Jeweils 1ml wurde in Cryoröhrchen überführt. Nun wurden die Zellen in einem Isopropanolbad auf -80°C gestellt. Isopropanol kühlt 1°C/min ab, somit ist ein schonendes Einfrieren der Zellen gewährleistet. Nach einem Tag wurden die Röhrchen auf -150°C überführt, wo sie für mehrere Jahre gelagert werden können.

3.2.2.2 Kultivierung von Zelllinien

Die verwendeten ATDC5- und HEK-293T-Zellen wurden im Brutschrank in T75 oder T175 Zellkulturflaschen kultiviert. Dabei wurden die Zellen, um sie in ihrer logarithmischen Wachstumsphase zu halten, passagiert und dabei 1:10 oder 1:20 verdünnt. Zum Ablösen der adhären Zellen wurden diese zunächst mit 1x PBS gewaschen, anschließend mit 0,5%igem Trypsin/EDTA überschichtet, 2-5 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend durch Klopfen abgelöst. Durch Zugabe von

Medium wurde das Trypsin inaktiviert und die Zellen im Anschluss weiterverarbeitet. ATDC5-Zellen wurden in DMEM/F12 mit 5% FCS (Fötale Kälber Serum) und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S), HEK293-T Zellen in DMEM hoch Glukose mit 10% FCS und 1% P/S kultiviert.

3.2.2.3 Transfektion von HEK293-T-Zellen

Die Transfektion von Expressionsplasmiden in HEK293-T-Zellen erfolgte mit dem JetPRIME Transfektionsreagenz (Polyplus). Zunächst wurden Zellen in Wells von 6-Well Platten oder in T25 Flaschen ausgesät. Dabei wurden $7,5 \times 10^5$ Zellen/6-Well in 2ml Medium, bzw 2×10^6 Zellen/T25 in 5ml Medium kultiviert. Nach einem Tag haben die Zellen eine Dichte von ca 80% erreicht und konnten transfiziert werden. Die Transfektionsansätze wurden wie folgt in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert:

Transfektionsansatz 6-Well		Transfektionsansatz T25	
200µl	JetPRIME Puffer	200µl	JetPRIME Puffer
2µg	Plasmid	4µg	Plasmid
4µl	JetPRIME Reagenz	8µl	JetPRIME Reagenz

Anschließend wurden die Ansätze gevortext, kurz zentrifugiert und nach 10 Minuten vorsichtig in das Medium der Zellansätze pipettiert. Nach vier Stunden wurde das Medium der Zellen ausgetauscht und nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und weiter verarbeitet.

3.2.2.4 Transfektion von ATDC5-Zellen

Für die Transfektion von ATDC5-Zellen wurde das Cell Line Nucleofector Kit T von Lonza verwendet. Zunächst wurden pro Ansatz ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 500µl Medium, sowie 2 6-Wells mit 2ml Medium bei 37°C warm gestellt. Pro Ansatz wurden 2µg Plasmid in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt. Die adhärenen Zellen wurden im Anschluss trypsinisiert und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Anschließend wurden 2×10^6 Zellen pro Ansatz in einen 15ml Falcon überführt und herunterzentrifugiert. Das Medium wurde von den Zellen abgezogen und die Zellen in 50µl Nucleofactor T-Lösung resuspendiert. Anschließend wurde der Ansatz in das Eppendorf-Reaktionsgefäß mit den vorgelegten Plasmiden überführt, kurz mit den Plasmiden vermischt und anschließend in eine Küvette überführt. Nun wurde mittels Elektroporation die DNA in die Zellen eingebracht.

Dies erfolgte mit Hilfe des Nucleofactors von Lonza und dem Programm T20. Nach erfolgter Elektroporation wurden die Zellen mit 500µl vorgewärmtem Medium aus den Küvetten gespült und in 2 6-Well überführt. Einmal verwendete Küvetten wurden mit 70% Isopropanol ausgespült, getrocknet und einmal wiederverwendet. Nach einem Tag erfolgte ein Medienwechsel, nach zwei Tagen wurden die Zellen für weitere Untersuchungen verarbeitet.

3.2.2.5 Retrovirale Transduktion von ATDC5-Zellen

Um in ATDC5-Zellen mit großer Effizienz DNA-Konstrukte einzubringen, wurde die retrovirale Transduktion etabliert. Am ersten Tag wurden HEK-293T Zellen in T25-Flaschen mit einem Gemisch aus dem Expressionsvektor (pBABEpuro (Morgenstern und Land 1990) mit Gli3Amyc, Gli3Rmyc, Trps1myc oder dem myc-Tag) und zwei Helferplasmiden, die die Information für die Virusproteine enthalten (pHITG und pHIT60 (Soneoka u. a. 1995)), transfiziert. Für Gli3Amyc, Gli3Rmyc und Trps1myc wurden jeweils zwei Transfektionsansätze durchgeführt. Das Verhältnis der Plasmide stellte sich wie folgt zusammen:

pBABEpuro	pHIT G	pHIT60
1,5µg	0,5µg	0,5µg

Ab diesem Zeitpunkt wurden diese Verpackerzellen unter S2 Richtlinien in einem S2 Labor kultiviert. Nach vier Stunden bei 37°C im Brutschrank wurde das Medium der Zellen abgezogen und durch 2,5ml neues Medium ersetzt. Die Zellen wurden ab diesem Zeitpunkt in einem Inkubator bei 32°C inkubiert um die Stabilität der ins Medium abgegebenen Viren zu erhöhen. Am nächsten Tag wurden 1×10^5 ATDC5-Zellen pro T25 Flasche ausgesät. Nach fünf Stunden erfolgte die erste Infektion. Dazu wurde das Medium von den Verpackerzellen abgenommen und durch 2,5ml neues Medium ersetzt. Das abgenommene Medium wurde in Falkons gesammelt. Dabei wurde das Medium der doppelten Ansätze gepoolt. Anschließend wurde der Überstand mit einem 0,45µm Spritzenvorsatzfilter filtriert und mit 6µg Polybrene/ml versetzt. Polybrene begünstigt das Andocken der Viren an den Zielzellen. Nun wurde das Medium der ATDC5-Zielzellen abgezogen und durch das filtrierte Medium der Verpackerzellen ersetzt. Einen Tag später wurde die eben beschriebene Infektion wiederholt, danach wurden jedoch die Verpackerzellen mit 1x PBS gewaschen und in 1ml IP Puffer lysiert. Am vierten Tag wurden die ATDC5-Zellen trypsinisiert und auf T75-Flaschen überführt. Für die Selektion infizierter Zellen wurde nach sechs Stunden 6µg/ml Puromycin auf die Zellen

gegeben. Nach zwei Tagen erfolgt bei nicht infizierten Zellen der massive Zelltod durch die Puromycinbehandlung, infizierte Zellen hingegen sind resistent gegen diese Behandlung. So wurde nach drei Tagen Puromycinbehandlung das Medium der Zellen ersetzt, oder sie wurden bei hoher Konfluenz auf T175 Flaschen expandiert. In der folgenden Woche erfolgte die Expandierung der einzelnen infizierten Ansätze, anschließend wurden geringe Mengen der Zellen in IP-Puffer lysiert um die Effektivität der Infektion zu überprüfen. Restliche Zellen wurden für die ChIP fixiert und lysiert.

3.2.2.6 Luciferase-Assay

Zur Überprüfung der Enhancer- oder Promotoraktivität von putativen Bindestellen der in der ChIP verwendeten Transkriptionsfaktoren wurden Luciferase-Assays ausgeführt. Zunächst wurden die Bereiche einiger potentiellen Bindestellen in Luciferasevektoren kloniert. Dabei wurde für Enhancerfragmente der pGL4.23 Vektor (Promega) verwendet, der das Firefly-Luciferase *luc2*-Reportergen und einen Minimalpromotor mit einem TATA-box Element und ein SV40-Polyadenylierungssignal enthält. (siehe Abbildung 6(b)). Für die Klonierung des *Wnt5a*-Promotors wurde der pGL4.10 Vektor (siehe Abbildung 6(a)) (Promega) verwendet. Dieser Vektor hat alle Eigenschaften des pGL4.23, besitzt jedoch keinen minimalen Promotor. Als Standard für die Transfektionseffizienz erfolgte eine Cotransfektion mit einem phRG-TK-Vektor (siehe Abbildung 6(c)), der die *Renilla*-Luciferase unter einem Thymidin Kinase (TK)-Promotor codiert. Die Vektorkarten der in den Luciferase-Assays verwendeten Plasmide sind in Abbildung 6 zu sehen.

Der Einfluss von Gli3Amyc und Trps1Flag auf die Aktivität der einzelnen Fragmente wurde in HEK293-T Zellen und in chondrogenen ATDC5-Zellen getestet. Die Zelllinien wurden mit folgenden Plasmidratis transfiziert:

	pGL4.10/pGL4.23 pGL-Fragment	Gli3Amyc pcDNA3.1	Trps1Flag pFlag	phRG-TK
HEK-293T	1,33µg	0,3µg	0,3µg	0,066µg
ATDC5	1µg	0,9µg	0,9µg	0,1µg

HEK-293T-Zellen wurden nach einem Tag, ATDC5-Zellen zwei Tage nach der Transfektion lysiert. Die Lyse erfolgte nach einmaligen Waschen der Zellen in 1xPBS in 400µl Lysispuffer, der aus reinem Wasser und 1x Lysispuffer (Stock:

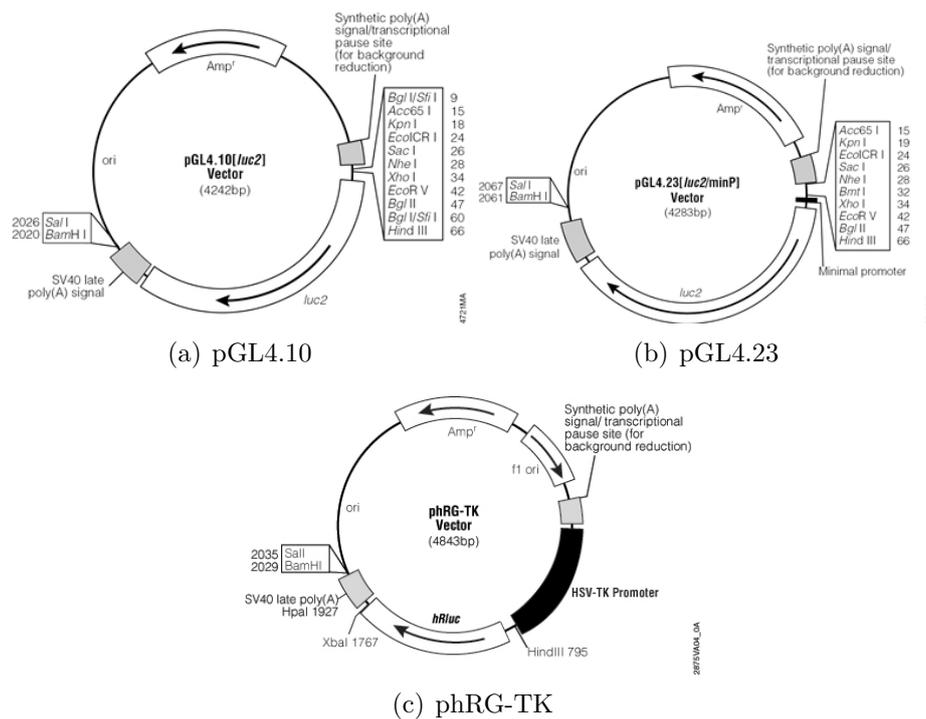


Abbildung 6: Vektorkarten der in Luciferaseexperimenten verwendeten Vektoren

5x von Promega) zusammengesetzt ist. Dabei wurden die 6-Wellen der HEK-293T-Zellen in 400µl, die 6-Wellen der ATDC5-Zellen in je 200µl Lysispuffer lysiert und anschließend gleiche Ansätze vereint. Nach Zugabe des Lysispuffers wurden die Zellen vom Wellboden abgekratzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wurden die Lysate durch Pipettieren erneut resuspendiert und je 25µl in 10 Wells einer 96-Well-Platte (CoStar half area, Corning) überführt. Nun erfolgte die Messung der Luciferase- und Renillaaktivitäten. Hierbei werden zwei unterschiedliche Substrate benötigt. Beetle-Juice enthält D-Luciferin und reagiert mit der Firefly-Luciferase, Renilla-Juice enthält Coelenterazine und ist das Substrat der Renilla-Luciferase. Beide Substratlösungen wurden über PJK bezogen, die Messungen erfolgten nach Angaben von PJK mit auf dem Luminometer von Bechthold Technologies mit der MicroWin2000 Software.

3.2.2.7 Immunfluoreszenzfärbungen

Für die Fluoreszenzfärbung von Gli3 und Trps1 cotransfizierten ATDC5 Zellen wurden diese nach Transfektion auf Glasdeckgläsern kultiviert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 15 Minuten mit 4% PFA/PBS fixiert. Im Anschluss wurden sie 2x für 5min bei RT auf einer Wippe mit PBS gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte durch Zugabe von 0,4% PBT (mit

Triton X100) für 10 Minuten. Nach einer Waschung in PBS für 5min wurden die Zellen in 10% goatserum in 0,1% PBT für eine Stunde geblockt, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermindern. Der myc-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:500 in 10% Goatserum/0,05% PBT auf die Zellen gegeben und für 1-2 Stunden bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden nicht gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen für 5 Minuten in 0,01% PBT gewegewaschen. Im Anschluss darauf erfolgte im Dunklen für eine Stunde die Inkubation mit einem Alexa488 oder Alexa594-gekoppelten goat-anti-mouse-Sekundärantikörper. Dieser wurde 1:1000 in 5% Goatserum/0,05% PBT verdünnt. Danach wurden die Zellen 2x für 5min in 0,05% PBT gewaschen, bevor die Zellkerne für 10 min mit DAPI (100ng/ml) angefärbt wurden. Die letzten Waschschritte erfolgten für 2x 5min in PBS, bevor die Präparate mit Fluorescent mounting Medium (DAKO) oder Mowiol eingedeckelt wurden.

Die Analyse der Präparate erfolgte mit dem Zeiss Axiovert 200 Mikroskop mit einer Spot 23.0 Kamera, es wurden für die Translokalisationsstudien Aufnahmen mit stets den selben Einstellungen gemacht (DAPI: 10ms, RedFP: 300ms, GFP: 100ms). Pro Transfektion wurden 20 Bilder aufgenommen, welche für die Analyse der Signalintensitäten im Zytoplasma und im Nukleus mit MetaMorph (Offline Version) analysiert wurden. Dabei erfolgte durch die Software Berechnung der durchschnittliche Fluoreszenzintensität des Zytoplasmas und des Zellkerns im roten Kanal, zudem wurden die durchschnittlichen Pixelintensitäten der DAPI-Färbung ermittelt. Der Quotient aus der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität des Zellkerns und des Zytoplasmas wurde ermittelt, um die Anreicherung der Färbung im Nukleus im Vergleich zum Zytoplasma zu berechnen. Zudem wurde der Quotient aus der durchschnittlichen Pixelintensität der myc- und DAPI-Färbungen gebildet, um die Anreicherung des myc-Signals im Zellkern zu quantifizieren. Die Transfektionen wurden mit Ausnahme von Gli3TCmyc (2x) jeweils 3x wiederholt.

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Die Co-Immunopräzipitation

Mit Hilfe der Co-Immunopräzipitation (Co-IP) können Proteininteraktionen untersucht werden. Hierbei werden Proteine durch spezifische Antikörper gebunden, welche mit Hilfe von Protein G-Agarosebeads präzipitieren werden können. Durch SDS-PAGE und Western Blot können danach interagierende Proteine de-

tektiert werden. Zunächst wurden HEK-293T-Zellen in T25-Flaschen transfiziert und einen Tag später einmal in 1xPBS gewaschen und anschließend in 1,2ml kalten IP-Puffer lysiert. Danach wurden die Lysate für eine Stunde bei 4°C rotiert um eine effiziente Lyse der Zellen zu gewährleisten. Danach wurden die Lysate für 2 Minuten bei 2000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut für eine Minute bei 14000rpm zentrifugiert um nicht lösliche Fragmente zu sedimentieren. Vom Überstand wurden 100µl als Input und zweimal 500µl für die Co-IPs in Eppendorf-Reaktionsgefäße vorgelegt. Als erster Schritt der Co-IP erfolgte eine Präabsorption, durch welche unspezifische Bindungen von Proteinen der Lysate an die Agarosebeads minimiert werden sollten. Pro Ansatz wurden 30µl Agarosebeads in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt und 5x mit kaltem IP Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Beads pro Ansatz in 50µl IP Puffer aufgenommen und auf die Lysate gegeben. Nach ca. zwei Stunden Rotation bei 4°C wurden die Ansätze bei 2000g für 2 Minuten zentrifugiert und der Überstand in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und 2,5µg Antikörper hinzugegeben. Die Inkubation der Lysate mit den Antikörpern erfolgte über Nacht, am nächsten Morgen wurden pro Ansatz 60µl Agarosebeads die wie für die Präabsorption beschrieben 5x in kaltem IP Puffer gewaschen wurden. Die Bindung der Protein G Agarose an die Antikörper-Proteinkomplexe erfolgte für 4 Stunden bei Rotation bei 4°C. Die Agarose wurde hierauf sedimentiert (2000g für 2 Minuten) und der Überstand für Kontrollzwecke aufbewahrt. Die Beads wurden 5-mal in 1ml IP Puffer gewaschen. Um die Proteinkomplexe von der Protein-G-Agarose zu lösen, wurde die Agarose in 1x SDS-PAGE Ladepuffer resuspendiert auf 99 °C aufgeköcht und die Agarose sedimentiert (2000 x g für 2 Minuten.). Die Proteinkomplexe im Überstand wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

3.2.3.2 Die SDS-Gelelektrophorese

Zur Analyse von Zelllysaten, Co-IPs und anderen Proteinproben wurden SDS-PAGEs durchgeführt. Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine denaturierende, diskontinuierliche Gelelektrophorese, mit der Proteine nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld aufgetrennt werden (Laemmli 1970). SDS-Polyacrylamid-Gele bestehen aus zwei Gelen, die sich im Hinblick auf pH, Ionenstärke und Porengröße unterscheiden. Die Proteine werden zunächst im Sammelgel konzentriert, bevor sie im Trenngel separiert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten SDS-Gele enthielten eine Acrylamid-Konzentration von 8% im Trenngel und von 5% im Sammelgel. Nach dem Zusammenfügen aller Komponenten

wurde die radikalische Polymerisation im Trenngel durch Zugabe von APS und TEMED ausgelöst. Die Lösung wurde sofort in die Gießkammer gegossen und das Gel mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Laufgels wurde das Isopropanol entfernt, die Lösung des Sammelgels mit APS und TEMED versetzt, auf das Trenngel gegossen, einen Kamm mit der erwünschten Taschenzahl und -Größe eingesetzt bevor das Trenngel polymerisierte. Nachfolgend ist die Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels beschrieben:

	5% Sammelgel (5ml)	8% Laufgel (10ml)
MQ H ₂ O	3,5ml	5ml
30 % Acrylamid	850µl	2,65ml
1M Tris pH 6,8	625µl	–
1M Tris pH 8,8	–	2,5ml
10% SDS	50µl	100ml
TEMED	5µl	6µl
10% APS	50µl	100µl

Proteinproben wurden mit 1x SDS-PAGE Probenpuffer (4x Stock) versetzt, für fünf Minuten bei 95°C aufgekocht und anschließend auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente ein Proteinmarker (Prestained Protein Ladder, Fermentas). Die Gele wurden in einem Tris-Glyzin Elektrophorese-Puffer zuerst bei 8 V/cm Gel bis zum Erreichen des Trenngels und dann bei 15 V/cm Gel bis kurz vor Ende des Trenngels laufen gelassen.

3.2.3.3 Western Blot

Nachdem die Proteine mittels SDS-PAGE separiert wurden, wurden sie über Nacht in einer Tank-Blot-Apparatur bei 12V im Transfer-Puffer auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Nach dem Transfer wurden die Membranen mit Ponceaurot überschichtet und somit die Proteinbanden angefärbt. TBS-T entfärbte die Membranen. Im Anschluss erfolgte das Blocken der Membranen zur Minimierung unspezifischer Bindungen je nach verwendetem Antikörper in 5% Milchpulver/TBS-T oder 1% BSA/TBS-T für eine Stunde. Danach erfolgte die Inkubation mit entsprechend verdünnten Antikörpern in 5% Milchpulver/TBS-T oder 1% BSA/TBS-T für 3 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Membranen 3-mal mit TBS-T gewaschen und für 45 Minuten mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Danach wurden die Membranen 2x mit TBS-T und

einmal in TBS gewaschen und anschließend erfolgte die Detektion der Proteinbanden mit der Chemolumineszenz-Reaktion mit dem „Pierce ECL Western Blot Substrate“ Kits. Der aufgelegte Röntgenfilm wurde entsprechend der Signalstärke entwickelt.

3.2.3.4 Chromatin–Immunopräzipitation

Die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) wurde etabliert, um die Bindung von Transkriptionsfaktoren an spezifische Bereiche der DNA nachzuweisen. Da diese Methode sehr anfällig für DNA-Kontamination ist, wurden ausschließlich sterile und DNA-freie Gebrauchsmittel verwendet, zudem wurden alle Lösungen mit 0,2µm Filtern sterilfiltriert. Um der Degradation von Proteinen entgegenzuwirken wurden alle Puffer der Lyse- und Waschschriffe mit Protease Inhibitor (Roche) versetzt.

Als ersten Schritt der ChIP wurden dem Medium infizierter ATDC5-Zellen (siehe 3.2.2.4) Formaldehyd in einer Endkonzentration von 1% hinzugefügt und für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde diese Reaktion durch die Zugabe von 0,125M Glycin (Stock = 2,5M) für 5 Minuten gestoppt und die Zellen mit 4°C PBS gewaschen. Daraufhin wurden den Zellen 4ml ChIP-Lysispuffer hinzugegeben, die Zellen wurden mechanisch abgelöst und anschließend in 15ml Falkons überführt. Im Anschluss erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 2000rpm bei 4°C. Das Pellet, welches die Zellkerne enthielt wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die ChIP startete mit einer Resuspendierung des Pellets in Nuclei Lysispuffer, dessen Menge je nach Pelletgröße von 900-1500µl variierte. Anschließend wurden die resuspendierten Pellets in 300µl Portionen in Eppendorf–Reaktionsgefäße aliquotiert. Um die DNA zu fragmentieren, wurden die Lysate in einem Ultraschallbad (Diagenode) für 15 Zyklen à 1 Minute Ultraschall mit High Throughput gefolgt von 1 Minute Pause behandelt. Im Anschluss wurden Bestandteile der Kernmembran durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 4°C und 13200rpm sedimentiert. Der DNA-Gehalt des Überstands wurde mit dem NanoDrop Spektrometer determiniert. Die Etablierung der Methode erfolgte mit 20µg DNA/ChIP und im Folgenden wurde die DNA-Menge aufgrund der geringen Ausbeute erhöht. Für den ChIP-Seq wurden 2x20µg/Ansatz eingesetzt und für die Kontrolle der Bindungen erfolgten Experimente mit 60-80µg DNA, wobei die Mengen der Beads, Antikörper und Puffer bis auf die des Elutionspuffers und der Aufreinigung verdoppelt wurden.

1/10 des DNA-Volumens wurde mit Dilutionspuffer versetzt und das Gesamtvolumen der Proben mit PBT auf 150µl aufgefüllt. Gleichzeitig wurden für jeden Ansatz Proben mit je 3µg DNA in 100µl H₂O als Input angesetzt und bei -20°C bis zur späteren Verwendung gelagert. Als nächster Schritt erfolgte eine Präabsorption, mit der unspezifische Bindungen des Lysates an die magnetischen Protein G gekoppelten Dynabeads abgefangen werden. Für die Präabsorption wurden pro Ansatz 10µl Dynabeads in 500µl PBT gewaschen und anschließend in 50µl Volumen auf die Probenansätze gegeben. Danach erfolgte eine Inkubation der Proben auf einem Rotator bei 4°C für 1-2 Stunden. Im Anschluss wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße auf einen speziellen Magneten gestellt, woraufhin die Beads an die Wand des Reaktionsgefäßes bewegt wurden. Die Lösung konnte somit ohne Kontamination mit magnetischen Beads in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Nun erfolgte die Zugabe von Antikörpern, welche spezifisch das myc-Tag der Transkriptionsfaktoren binden. Jeweils 5µg anti-myc und Maus-IgGs wurden den Proben zugesetzt, welche daraufhin bei 4°C über Nacht rotierten. Am folgenden Tag wurden pro Ansatz 40µl Dynabeads 5-mal in 500µl PBT gewaschen und in 100µl pro Ansatz auf die Proben verteilt. Die Bindung der Dynabeads und die Antikörper erfolgte auf einem Rotator für 4 Stunden bei 4°C. Im Anschluss erfolgten Waschschritte für 2-mal 5 und 1-mal 10 Minuten bei 4°C auf einem Rotator in einem low Salt, high Salt und LiCl Puffer. Im Anschluss wurden die Proben bei RT 2x für 1 Minute in TE Puffer gewaschen, um Salzreste der Waschpuffer zu beseitigen. Die Elution der Proteinkomplexe von den Beads erfolgte in 200µl Elutionspuffer bei 65°C für 45 Minuten, wobei die Proben alle 15 Minuten für 10 Sekunden gevortext wurden. Um die Proteine zu degradieren, wurden die Immunopräzipitate und der Input über Nacht bei 55°C mit 10µl Proteinase K (10mg/ml Stock) verdaut. Am nächsten Morgen erfolgte die Degradation von RNA mit 1µl RNaseA (10mg/ml Stock) bei 37°C für eine Stunde.

Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit Hilfe des MinElute Kits von Quiagen. Zunächst wurde den Proben das 5-fache Volumen an PB Puffer und zum Senken des pH-Werts 20µl von 3M NaAcetat pH5,2 hinzugegeben. Die Proben wurden gevortext, 600µl auf die Säulen geladen, welche im Anschluss 1 Minute bei 13000rpm zentrifugiert wurden. Der Durchfluss wurde erneut geladen und zentrifugiert. Anschließend wurden die Säulen mit den restlichen 600µl der Proben beladen und der Durchfluss erneut zentrifugiert. Die Säulen wurden im Anschluss mit 700µl PE für 5min inkubiert und danach für 1min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säulen durch eine erneute Zentrifugation von Flüssigkeitsresten befreit. Im

Anschluss wurde 2x 9µl EB Puffer (auf 55°C aufgewärmt) auf die Membran der Säulen geladen, 1 Minute inkubiert und anschließend zentrifugiert. Im Durchfluss befand sich die aufgereinigte DNA, welche für nachfolgende Analysen wie qPCR verwendet werden konnte.

3.2.4 Durchführung und bioinformatische Auswertung der ChIP-Seq

Für die ChIP-Seq wurde zunächst DNA aus vier Experimenten vereint und je 1µl in die qPCR für die Bindung an ein Enhancerfragment von *Gli1* und als Kontrolle für den *beta Actin*-Promotor eingesetzt. Nach erfolgreicher PCR wurde dieses zur weiteren Analyse nach Kopenhagen geschickt. Die folgenden Experimente wurden von G.Galli am BRIC durchgeführt. Dabei wurde mit Hilfe des ChIP-Seq Sample Prep Kit eine Library erstellt, welche auf dem Genome Analyzer II von Illumina sequenziert wurde. Dabei entstanden 36bp single reads. Die Sequenzierdaten wurden im FastQ Format gespeichert und übermittelt.

Die bioinformatische Auswertung erfolgte in enger Kooperation mit dem Lehrstuhl für Genominformatik an der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen durch Corinna Ernst unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Sven Rahmann. Zunächst wurden die einzelnen 36bp Reads auf dem Genom der Maus (mm9) kartiert, dafür wurde die Internetplattform des USCS Genome Browsers (<http://genome.ucsc.edu/>) in Anspruch genommen. Große Anreicherungen von einzelnen Tags wurden mit Hilfe von MACS mit Standardbedingungen als Peaks definiert und annotiert. Auch MACS (Version 1.4.1) ist als Internetapplikation verfügbar (<http://liulab.dfci.harvard.edu/MACS/>) Auch CCAT3.0 wurde zur Definition von Peaks im Vergleich zu einer Kontrolle angewandt (<http://cmb.gis.a-star.edu.sg/ChIPSeq/index.html>). Die Anzeige der Peaks und den nächstgelegenen Transkriptionsstartpunkten erfolgte mit Hilfe von PeakAnalyzer (<http://www.bioinformatics.org/peakanalyzer/wiki/Main/MainFunctions>). Für die Entdeckung neuer DNA-Bindemotive wurde meme 4.8.1 (<http://meme.nbcr.net/meme/>) angewandt. Dabei wurden die Sequenzen der 50 Peaks mit den höchsten MACS- scores miteinander verglichen (Parameter-Setting: -dna -maxw 10 -nmotifs 5). Die visuelle Analyse der Peakanreicherungen der unterschiedlichen Ansätze erfolgte mit Hilfe des IGV (Integrated Genome Viewer), siehe <http://www.broadinstitute.org/software/igv/home>.

3.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von RStudio (Version 0.97.449). Dabei wurden die Messreihen mit einem Anderson-Darling Test auf Normalverteilung geprüft, wobei alle p-Werte $\geq 0,05$ als normalverteilt angesehen wurden. Da die untersuchten Messreihen nicht normal verteilt waren, wurden sie mit einem Wilcoxon-Rangsummentest auf Signifikanz untersucht, dabei wurden p-Werte $\leq 0,01$ als statistisch signifikant angesehen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an, die mit Excel errechnet wurde.

3.2.6 Histologie

3.2.6.1 Einbetten der Vordergliedmaßen von Mäuseembryonen in Paraffin

Die Vordergliedmaßen von Mäuseembryonen der Entwicklungsstadien E14,5 und E16,5 wurden nach der Präparation über Nacht bei 4°C in 4 % PFA/PBS schwenkend fixiert. Anschließend wurden die fixierten Gliedmaßen im Gewebereinbettungsautomaten dehydriert und mit Paraffin durchtränkt. Dies geschah mit Hilfe von folgendem Programm:

Tabelle 1: Programm zum Einbetten von Extremitäten in Paraffin.

	Zeit
70% EtOH	10min
80% EtOH	10min
95% EtOH	10min
100% EtOH	10min
100% EtOH	10min
100% EtOH	10min
Xylol	20min
Xylol	30min
Paraffin	1h
Paraffin	1h
Paraffin	1h

Nachdem die Gliedmaßen mit Paraffin durchtränkt waren, wurden sie in flüssigem Paraffin ausgerichtet, anschließend auf einer Kühlplatte in Paraffinblöcke eingebettet und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

3.2.6.2 Anfertigung von Gewebsschnitten der Gliedmaßen am Mikrotom

Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden Gliedmaßenschnitte einer Dicke von 5-6µm angefertigt, die zum Ausbreiten in 10% EtOH transferiert wurden. Im Anschluss wurden sie auf einen Objektträger gezogen und auf einer Heizplatte bei 60°C fixiert. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Objektträger bei 4°C gelagert.

3.2.7 *In situ* Hybridisierung

Die radioaktive *in situ* Hybridisierung dient dem spezifischen Nachweis von mRNA eines bestimmten Gens in Geweben oder Zellen. Eine radioaktiv markierte antisense Sonde wird benötigt, die die komplementäre Sequenz der nachzuweisenden mRNA trägt. Die Klonierung der Sonde sowie die Durchführung der *in situ* Hybridisierung erfolgte durch Yvonne Krause in der Abteilung für Entwicklungsbiologie der Universität Duisburg-Essen.

3.2.7.1 Herstellung radioaktiv-markierter mRNA-Sonden

Zunächst wurde das Plasmid, welches die Sequenz der Sonde trägt, durch Restriktion mit BamHI linearisiert und anschließend durch zweimalige Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Dazu wurde die Probe 1:1 mit einem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch versetzt und auf dem Vortexer gemischt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 14.000rpm wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurde das aufgereinigte, linearisierte Plasmid mit dem 0,1-fachen Volumen 3M Natrium-Acetat und 2,5-fachen Volumen 100% EtOH bei -20°C und anschließender Zentrifugation für 30 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C präzipitiert. Abschließend wurde das DNA-Pellet mit 70% EtOH gewaschen und nach Trocknung in H₂O gelöst. Von dieser aufgereinigten, linearisierten DNA wurde durch *in vitro*-Transkription mit entsprechender RNA-Polymerase eine antisense-Sonde hergestellt, wobei die verwendeten UTP-Nukleotide das radioaktive Isotop P³³ tragen. Folgende Reaktion fand bei 37°C für 90 Minuten statt:

500ng	linearisierte DNA
2µl	10x Transkriptionspuffer
2µl	rNTP-Mix (5mM)
1µl	RNAse Inhibitor (40 U/µl)
2µl	RNA-Polymerase (T7)
80µCi	[P ³³]-UTP
<hr/>	
20µl	

Das verwendete [$\alpha^{33}\text{P}$]-UTP wurde von Hartmann Analytik (Braunschweig) bezogen und vor Ablauf der ersten Halbwertszeit eingesetzt. Um die Matizen-DNA aus den DNA-RNA-Hybriden zu entfernen und einzelsträngige RNA-Sonden zu erhalten, wurden 20U DNase zugegeben und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Transkriptionsmix wurde auf 100µl mit DEPC-H₂O verdünnt und mit 200ng/µl Glykogen versetzt. Die transkribierte, radioaktiv-markierte RNA wurde mit dem 0,1-fachen Volumen 4M LiCl und 2,5-fachen Volumen 100% EtOH bei -20° für 60 Minuten präzipitiert und anschließend 30 Minuten bei 14.000rpm und 4°C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol (in DEPC-H₂O) gewaschen, getrocknet, in 50µl TES resuspendiert und 1:20 in Hybridisierungspuffer verdünnt. Die antisense-Sonde wurde fünf Minuten bei 95°C denaturiert und auf Eis bis zum Gebrauch abgekühlt.

3.2.7.2 Prähybridisierung und *in situ* Hybridisierung

Für alle Prähybridisierungslösungen wurde RNase-freies Wasser verwendet. Zunächst wurden die Paraffin-Schnitte der Gliedmaßen für zweimal 10 Minuten in Xylol deparaffinisiert. Daraufhin wurden die Schnitte jeweils zwei Minuten pro Lösung in einer absteigenden Ethanolreihe in zweimal 100%, 95%, 75%, 50% und 30% EtOH rehydriert, fünf Minuten in 0,85% NaCl und weitere fünf Minuten in 1x PBS inkubiert. Schließlich wurden sie für 20 Minuten in 4% PFA fixiert. Danach wurden die Schnitte jeweils 5 Minuten in 1x PBS, 0,2 N HCl, RNase-freiem Wasser und 20ng/ml Proteinase K-Lösung inkubiert. Es folgte eine weitere Fixierung in 4% PFA mit 0,2% Glutaraldehyd für 10 Minuten und 5-minütiges Waschen in 1x PBS. Daraufhin wurden die Schnitte für 10 Minuten in 1,5% Triethanolamin mit 0,2% Essigsäureanhydrid und 5 Minuten in 0,85% NaCl inkubiert. Schließlich folgte die Dehydrierung der Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (30%, 50%, 75%, 100%) für jeweils zwei Minuten pro Lösung. Nachdem die Schnitte bei RT getrocknet waren, wurde die radioaktiv-markierte antisense-Sonde aufgetra-

gen (circa 50µl/Objektträger). Um eine Austrocknung zu verhindern, wurden die Gliedmaßenschnitte mit Folie abgedeckt. Die Hybridisierung erfolgte schließlich bei 70°C über Nacht in einer Kammer, die mit 5x SSC/50% Formamid-Lösung befeuchtet war.

3.2.7.3 Waschen der Schnitte und Behandlung mit Photoemulsion

Nach der Hybridisierung wurden die Gliedmaßenschnitte 30 Minuten in 5x SSC bei 55°C gewaschen. Daraufhin wurden die Schnitte in 2x SSC für 30 Minuten bei 55°C gewaschen und schließlich mit 2,5 µg/ml RNase A in 1x Waschpuffer bei 37°C für 7 Minuten behandelt. Dann folgten weitere Waschungen bei 55°C für 30 Minuten in 2x SSC mit 50% Formamid und zweimal 30 Minuten in 2x SSC. Nun wurden die Gliedmaßenschnitte dehydriert durch 30%, 50%, 70% und 90% EtOH, das 0,3M Ammonium-Acetat enthält. Schließlich wurden die Schnitte zweimal in 100% EtOH inkubiert, getrocknet und über Nacht bei RT ein Röntgenfilm aufgelegt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte im Dunkeln im 40°C Wasserbad in eine Silberionen-enthaltende Photoemulsion gedippt. Die trockenen Schnitte wurden im Dunkeln bei 4°C für die Zeit gelagert, die vom entwickelten Röntgenfilm abgeschätzt wurde. Nach dieser Zeit wurden die in Photoemulsion getauchten Gliedmaßenschnitte in der Dunkelkammer entwickelt, indem sie fünf Minuten in 15°C warmer Entwickler-Lösung inkubiert wurden. Nach kurzem Waschen in Wasser wurden die Schnitte für 15 Minuten bei RT fixiert. Daraufhin wurden die Schnitte mit 0,2% Toluidinblau mit 1% Borax gefärbt und in 30%, 50%, 75%, 95% und 100% Ethanol dehydriert. Abschließend wurden die Schnitte zweimal 10 Minuten in Xylol inkubiert und mit DPX-Mounting Medium eingedeckelt. Die Fotos von diesen Schnitten wurden am Mikroskop im Dunkelfeld aufgenommen.

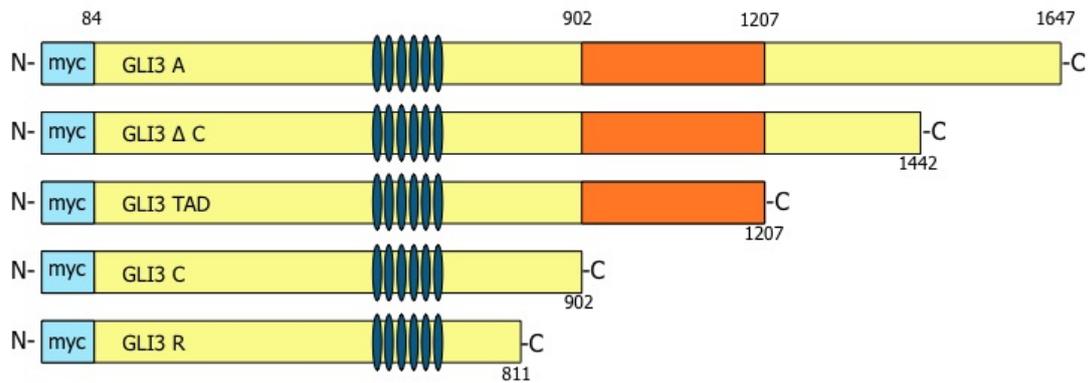
4 Ergebnisse

4.1 Eingrenzen der Trps1-Bindedomäne in Gli3A

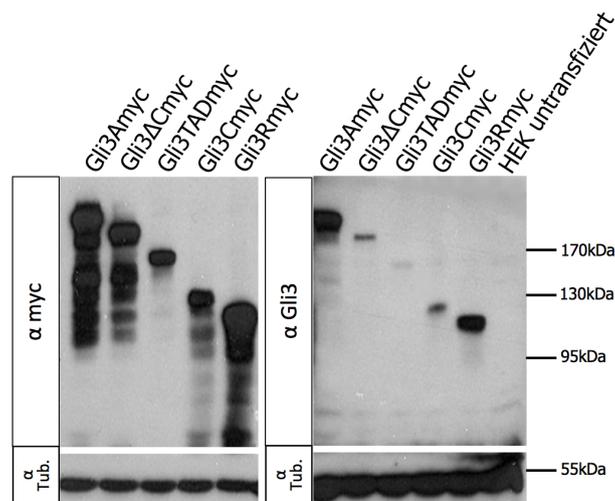
Die Repressorform von Gli3 (Gli3R) entsteht durch proteolytische Spaltung des C-Terminus der Vollängen-Aktivatorform von Gli3 (Gli3A), somit teilen beide Proteine den selben N-Terminus. Gli3A aktiviert die Expression von Hh-Zielgenen. Gli3R hingegen reprimiert die Genaktivität von Hh-Zielgenen in Abwesenheit von Hh-Signalen (Wang u. a. 2000). Da Trps1 an die Aktivatorform von Gli3 (Gli3A), aber nicht an dessen Repressorform (Gli3R) bindet (Wuelling u. a. 2009), ist die Trps1 Bindedomäne innerhalb des C-terminus von Gli3A zu suchen. In diesem Bereich wurde eine Transaktivator-domäne (TAD) beschrieben, an die u.a. das cAMP response element-Bindeprotein (CBP) bindet (Dai u. a. 1999).

Zunächst wurde im Rahmen dieser Arbeit die Bindedomäne von Trps1 innerhalb von Gli3A identifiziert. Als erster Schritt wurden C-terminale deletierte Konstrukte von myc-getagtem Gli3A kloniert (Abbildung 7(a)). Die zur DNA-Bindung benötigte Zinkfingerdomäne sowie ein myc-Tag befinden sich im gemeinsamen N-Terminus aller Konstrukte.

Im Folgenden wurden die Gli3-Konstrukte in HEK-293T-Zellen überexprimiert und die Proteinlysate mit Western Blot auf die Expression und Größe der Konstrukte untersucht (Abbildung 7(b)). Die Expression der einzelnen Konstrukte wurde in HEK-293T-Zellen eindeutig sowohl mit einem Antikörper, der gegen das myc-Tag gerichtet ist, als auch mit einem Antikörper gegen den N-Terminus von Gli3 nachgewiesen. Dies belegt die spezifische Expression der Fusionsproteine. Es wurden im Folgenden Co-Immunopräzipitations (Co-IP)-Experimente der einzelnen Gli3-Konstrukte mit einem Flag-getagtem Trps1 Konstrukt durchgeführt. Für die Co-IP wurden HEK-293T-Zellen mit Trps1Flag sowie einem myc-getagtem Gli3 Deletionskonstrukt transfiziert und nach einem Tag lysiert. Lysate wurden mit Antikörpern gegen das myc- oder Flag-Tag, bzw. gegen Trps1 inkubiert und mit Protein G gekoppelten Agarosebeads präzipitiert. Im Anschluss wurden die präzipitierten Komplexe denaturiert und mit Hilfe von SDS-PAGE ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Nach einem Transfer der Proteine von der SDS-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran wurde dort mit Hilfe von spezifischen Antikörpern Gli3myc, bzw. Trps1Flag detektiert.



(a) Schematische Darstellung von Gli3-Deletionskonstrukten



(b) Western Blot der Proteinextrakte von Gli3-Deletionskonstrukten in HEK-293T-Zellen

Abbildung 7: (a) Darstellung von Gli3-Deletionskonstrukten. Alle Konstrukte tragen einen 6xmyc-Tag am N-Terminus (blau). Die Zn-Finger Domänen sind dunkelblau, die TAD orange hervorgehoben. Die angegebenen Zahlen markieren die jeweilige Aminosäureposition. (b) Western Blot der Proteinextrakte von Gli3-Deletionskonstrukten in HEK-293T-Zellen. Der links dargestellte Western Blot ist mit einem anti-myc, der rechte mit einem anti-Gli3-Antikörper entwickelt. Gli3Amyc ist auf einer Höhe von 190kDa, Gli3ΔCmyc bei 180kDa, Gli3TADmyc bei 170kDa, Gli3Cmyc bei 130kDa und Gli3Rmyc bei 100kDa detektierbar. Auf der Höhe von 55kDa ist die Expression von Tubulin als Ladekontrolle erkennbar.

Mittels eines myc-Antikörpers konnte eine Präzipitation der myc-getaggten Gli3-Konstrukte Gli3Amyc, Gli3ΔCmyc und Gli3TADmyc im myc-Blot, als auch eine Co-IP im Trps1-Blot gezeigt werden. Präzipitationen von Trps1 mit einem Trps1-Antikörper ließen sich im Trps1-Blot detektieren. Co-Präzipitationen der Gli-Konstrukte lassen im myc-Blot erkennen (Abbildung 8 (a) und (b)). Gli3Cmyc und Gli3Rmyc ließen sich mit einem myc-Antikörper präzipitieren, jedoch konnte eine Co-Präzipitation von Trps1 auf den selben Membranen nicht nachgewie-

sen werden. Die Präzipitation von Trps1Flag mit einem Flag-Antikörper führte zu einer Präzipitation von Trps1Flag, jedoch nicht zu einer Co-Präzipitation von Gli3Cmyc-bzw. Gli3Rmyc (Abbildung 8(c)).

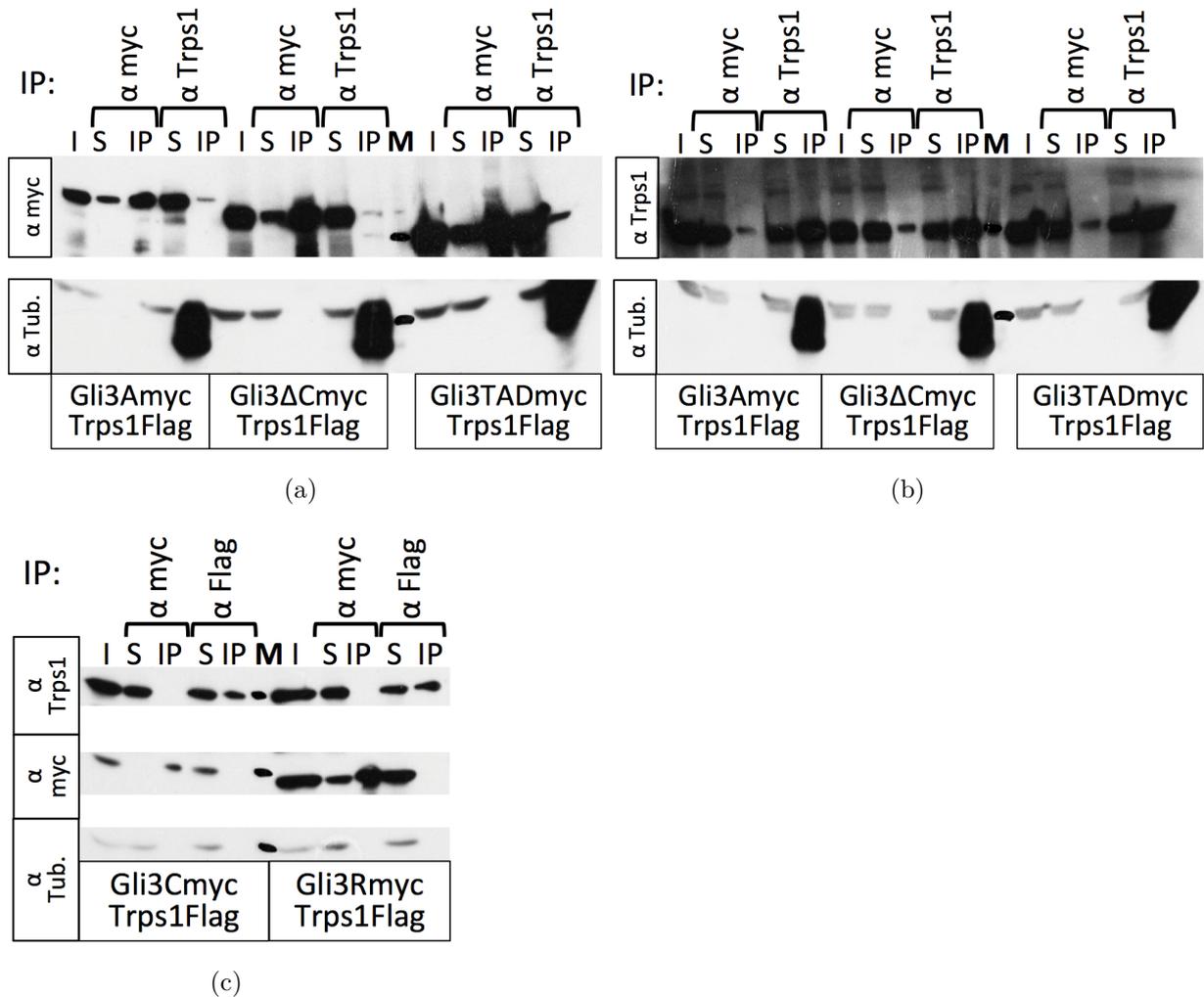


Abbildung 8: Co-IPs von Trps1Flag mit Gli3A-Deletionskonstrukten. Proteinextrakte wurden mit anti-myc- bzw. anti-Trps1-Antikörpern präzipitiert und anschließend mit einem anti-myc oder anti-Trps1-Antikörper detektiert. Anti-Tubulin (Tub.) dient als Ladekontrolle. (a) & (b) Co-Präzipitationen von Trps1Flag mit Gli3Amyc, Gli3ΔCmyc und Gli3TADmyc sind sichtbar. (c) Gli3Cmyc und Gli3Rmyc lassen sich nicht mit Trps1Flag co-präzipitieren. Proteinextrakte sind mit I (Input), S (Supernatant), IP (Immunopräzipitation) und M (Marker) beschriftet.

Um die Spezifität der Co-IP-Experimente zu belegen, wurden die Membranen zusätzlich mit einem Antikörper gegen Tubulin entwickelt. Tubulin sowohl im Input, als auch im Überstand der Co-IPs vorhanden, sollte jedoch nicht mit Trps1 oder Gli3 copräzipitiert werden. Die Präzipitation mit dem Trps1-Antikörper, welcher in der selben Spezies produziert wurde, zeigte starke Hintergrundbanden um

55kDa, die den leichten Ketten der IgGs entsprechen und durch den sekundären Antikörper detektiert werden konnten. Die Präzipitation mit monoklonalen Antikörpern aus der Maus, wie der myc- und Flag-Antikörper, ließ hingegen die Co-Präzipitation von alpha Tubulin ausschließen. Dies weist somit auf die Spezifität der Co-IPs hin. Die Präzipitation von Trps1Flag und Gli3Amyc, Gli3 Δ Cmyc und Gli3TADmyc mit Antikörpern gegen Trps1 und myc resultiert in allen Fällen in spezifischen Präzipitationen von Gli3-Trps1 Komplexen. Diese Ergebnisse konnten für Gli3 Δ Cmyc zweimal, für die übrigen Konstrukte mindestens dreimal wiederholt werden. Somit zeigte sich, dass Trps1Flag mit der TAD-Domäne von Gli3myc interagiert. Im Folgenden wird die Funktion dieser Interaktion auf zellulärer Ebene untersucht werden.

4.2 Trps1 beeinflusst die subzelluläre Lokalisation von Gli3

Trps1 wurde als nuklearer Transkriptionsfaktor beschrieben, der schwach im gesamten Bereich des Zellkerns sowie stärker in punktförmigen Strukturen im Nukleus lokalisiert ist (Kaiser u. a. 2003). Gli3A ist sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma detektierbar, für Gli3R hingegen ist eine Anreicherung im Nukleus beschrieben (Ruiz i Altaba 1999). Um die biologische Funktion der Interaktion von Gli3A und Trps1 zu entschlüsseln, wurde als erster Schritt analysiert, ob Trps1 einen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation von Gli3A ausübt. Um den Einfluss von Trps1 auf Gli3 zu untersuchen, wurden zunächst die Expressionen von YFP-getagtem Trps1 (Trps1YFP) sowie einer zytoplasmatischen Trps1-Variante, in der durch einen Aminosäureaustausch an der Aminosäurenposition 592 von Arginin (R) zu Cystein (C) die nukleare Lokalisationssequenz (NLS) von Trps1 mutiert

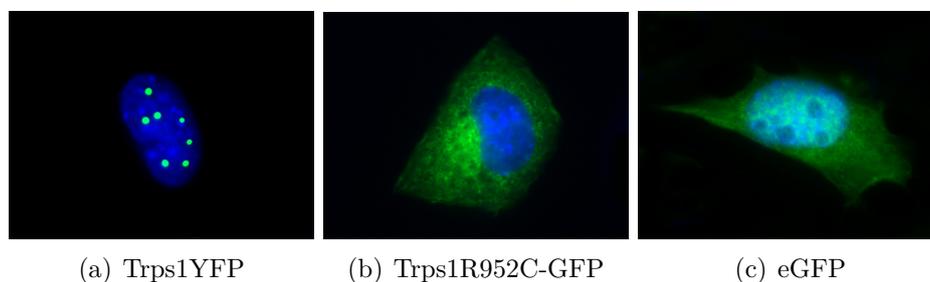


Abbildung 9: Expression von Trps1YFP, Trps1R952C-GFP und eGFP in ATDC5-Zellen. (a) Trps1YFP ist im Zellkern u.a. in punktförmigen Strukturen exprimiert. Expression von Trps1R952C-GFP erfolgt ausschließlich im Zytoplasma der Zellen (b). Die Expression von eGFP erfolgt ubiquitär in ATDC5-Zellen (c). Der Zellkern wurde mit DAPI (blau) sichtbar gemacht. Vergrößerung: 630x

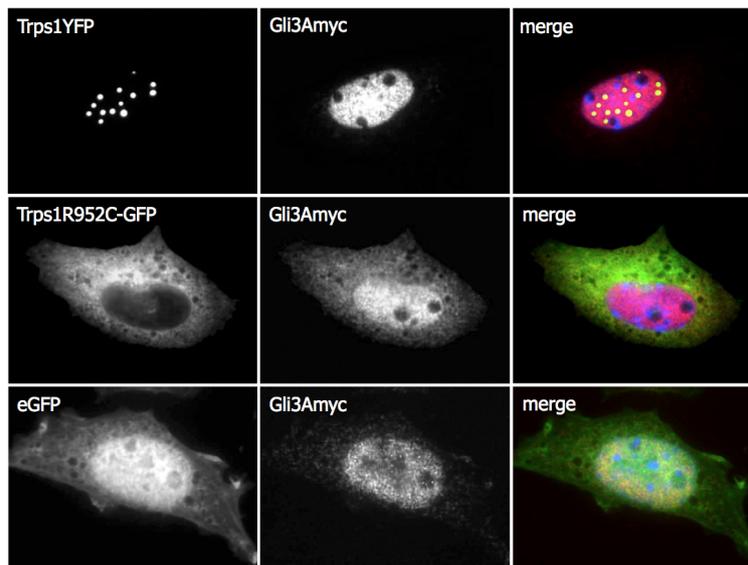


Abbildung 10: Trps1 beeinflusst die zelluläre Verteilung von Gli3Amyc in ATDC5-Zellen. Cotransfektion von Gli3Amyc (rot) mit Trps1YFP führt zu einer Anreicherung von Gli3Amyc im Nukleus, wohingegen nach Cotransfektion einer Trps1-NLS Mutante (Trps1R952C-GFP) genauso wie eGFP alleine Gli3Amyc sowohl im Nukleus, als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden kann. Der Zellkern ist in der Überlagerung (merge) durch DAPI blau eingefärbt. (Vergrößerung: 630x)

wurde (Kaiser u. a. 2004) sowie die Expression eines eGFP-Leervektors in ATDC5-Zellen überprüft (Abbildung 9). Trps1YFP ist im Zellkern in punktförmigen Strukturen exprimiert, wohingegen die Expression von Trps1R952C-GFP ausschließlich im Zytoplasma nachgewiesen werden kann. Da es sich bei eYFP um eine mutierte Version von eGFP handelt und zudem das Vektorrückrad beider Vektoren gleich ist, konnte der Leervektor eGFP-N3 (eGFP) als Kontrolle verwendet werden.

Die Überexpressionskonstrukte von myc-getaggttem Gli3A, Gli3R sowie der gesamten C-terminalen Domäne von Gli3A (Gli3TCmyc), mit welcher sich Gli3A von Gli3R unterscheidet, wurden in chondrogenen ATDC5-Zellen mit den beschriebenen Trps1-Konstrukten cotransfiziert. Im Folgenden wurden die Gli3-Konstrukte mittels eines anti-myc-Antikörpers auf ihre zelluläre Verteilung hin untersucht. Gli3A konnte sowohl im Zytoplasma, als auch mit einer stärkeren Anreicherung im Zellkern nach Cotransfektion mit eGFP detektiert werden. Eine Cotransfektion von Gli3Amyc mit Trps1YFP führte zu einer gesteigerten Anreicherung von Gli3Amyc im Nukleus der Zellen sowie zu einer Verringerung der zytoplasmatischen Lokalisation. Um zu zeigen, dass die Lokalisation von Trps1 im Zellkern für diesen Effekt notwendig ist, wurden Cotransfektionen mit dem zytoplasmatischen Trps1R952C-GFP durchgeführt. Dies führte sowohl zu einer Lokalisation von Gli3Amyc im Zytoplasma, als auch im Zellkern (Abbildung 10).

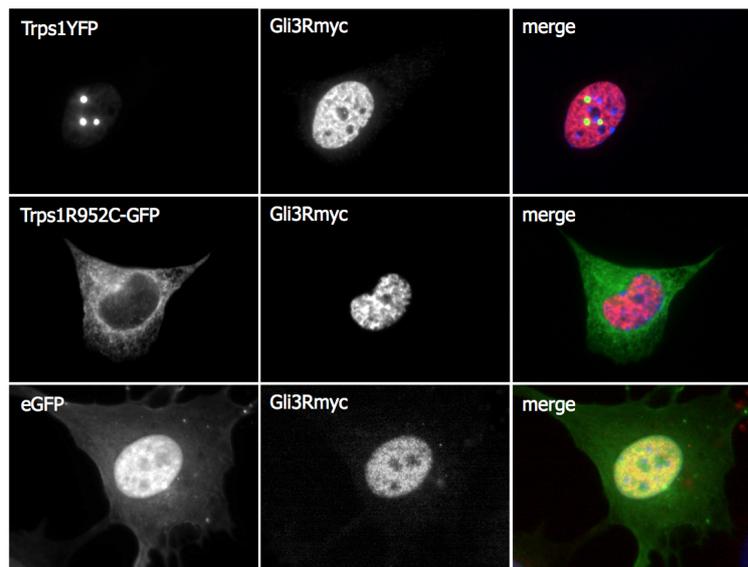


Abbildung 11: Gli3Rmyc ist bei Coexpression von Trps1 im Nukleus von ATDC5-Zellen angereichert. Nach Cotransfektion von sowohl Trps1YFP, als auch Trps1R952C-GFP ist ein starkes Signal von Gli3Rmyc (rot) im Zellkern von ATDC5-Zellen sichtbar, wohingegen dieses Signal nach Cotransfektion von eGFP schwächer ist. Der Zellkern ist in der Überlagerung (merge) durch DAPI blau eingefärbt. (Vergrößerung: 630x)

Um den Einfluss von Trps1 auf die zelluläre Lokalisation von Gli3R zu untersuchen, wurde Gli3Rmyc mit Trps1YFP, Trps1R952C-GFP sowie eGFP in ATDC5-Zellen cotransfiziert. Gli3Rmyc konnte in allen drei Cotransfektionsexperimenten im Zellkern nachgewiesen werden, wobei die Proteinquantität nach Cotransfektion mit Trps1YFP und Trps1R952C-GFP höher war als nach Cotransfektion mit eGFP (Abbildung 11). Um auszuschließen, dass es sich hierbei um Artefakte handelt, wurde der C-Terminus von Gli3A (Gli3TCmyc) mit Trps1 cotransfiziert. Dieser C-Terminus beinhaltet keine NLS und ist in gleichen Maße im Zytoplasma und im Zellkern zu finden (Abbildung 12). Diese zelluläre Verteilung wurde durch die Cotransfektion von Trps1YFP, Trps1R952C-GFP sowie eGFP nicht beeinflusst.

Um den Effekt der zellulären Lokalisation von Gli3 durch Trps1 in ATDC5-Zellen zu quantifizieren, wurden bei Aufnahmen der unterschiedlichen Cotransfektionen die Pixelanzahl pro Fläche im Zytoplasma und im Nukleus bestimmt und anschließend die relativen Fluoreszenzintensitäten des Zellkern über dem Zytoplasma berechnet (Abbildung 13). Nach Cotransfektion mit eGFP ist die Anreicherung von Gli3Amyc im Zellkern über das Zytoplasma 4,3-fach. Cotransfektion mit Trps1R952C-GFP führt zu einem Verhältnis von 3,9, was keinen signifikanten Unterschied darstellt. Im Gegensatz dazu zeigt Gli3Amyc eine etwa 5,5-fache An-

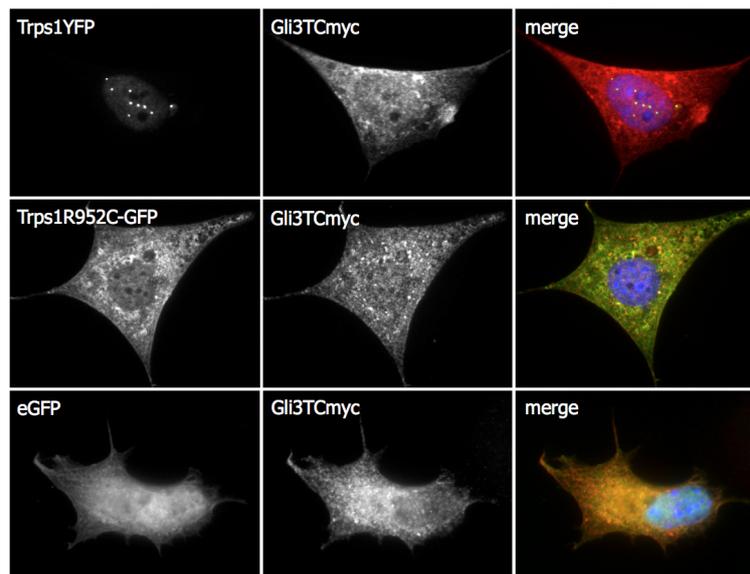


Abbildung 12: Trps1 hat keinen Einfluss auf die zelluläre Verteilung von Gli3TCmyc. Gli3TCmyc (rot) ist in ATDC5-Zellen ubiquitär exprimiert. Die Cotransfektion von Trps1YFP, Trps1R952C-GFP oder eGFP mit hat keinen Einfluss auf die zelluläre Verteilung von Gli3TCmyc. Der Zellkern ist in der Überlagerung (merge) durch DAPI blau eingefärbt. (Vergrößerung 630x)

reicherung im Zellkern über das Zytoplasma nach Cotransfektion mit Trps1YFP, was einen signifikanten Unterschied sowohl zu der Cotransfektion mit Trps1R952C-GFP, als auch zu eGFP darstellt (Abbildung 13(a)). Somit hat die zelluläre Lokalisation von Trps1 einen Einfluss auf die Menge des sich im selben Zellkompartiments befindlichen Gli3Amyc.

Die Cotransfektion von Gli3Rmyc mit eGFP führt zu einer 2,8-fachen Anreicherung im Nukleus im Vergleich zum Zytoplasma. Im Vergleich dazu führt die Cotransfektion von Gli3Rmyc mit Trps1YFP (5,6-fach) und Trps1R952C-GFP (4,8-fach) zu einem Anstieg der nuklearen Anreicherung von Gli3Rmyc über das Zytoplasma. Um diesen Effekt der nuklearen Stabilisierung von Gli3Rmyc zu charakterisieren, wurde die relative Fluoreszenzintensität im Nukleus zu der relativen Fluoreszenzintensität des nuklearen DAPI-Signals normalisiert. Dabei wurde der Unterschied zur eGFP Kontrolle, welche auf 100% gesetzt wurde, berechnet (Abbildung 13(b)). Auffallend ist, dass die relative Fluoreszenzintensität von Gli3Rmyc im Zellkern in Relation zu DAPI größer ist, wenn eine Cotransfektion mit Trps1 erfolgte, wobei es jedoch keine Rolle spielte, in welchem Zellkompartiment Trps1 lokalisiert ist. Aus dieser Beobachtung lässt sich folgern, dass Trps1 unabhängig von seiner zellulären Verteilung die Lokalisation von Gli3Rmyc im Zellkern begünstigt.

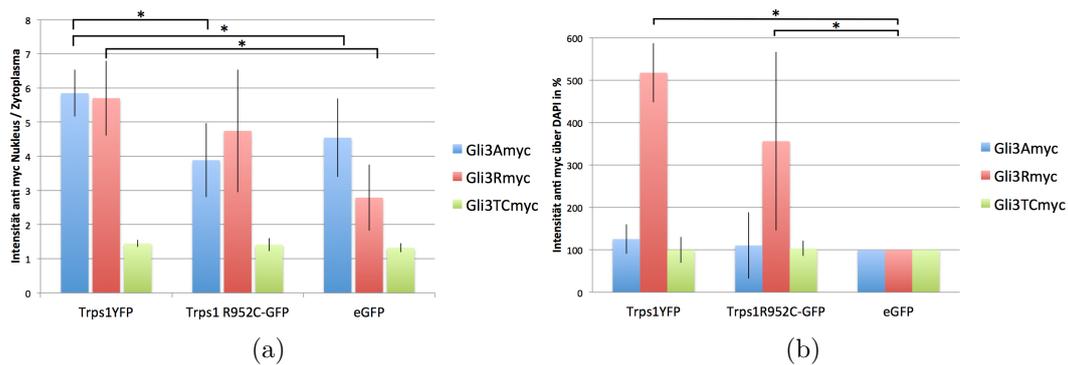


Abbildung 13: Quantifizierung des Effekts von Trps1 auf die zelluläre Lokalisation von Gli3 (a) Die zelluläre Verteilung von Trps1 beeinflusst die Lokalisation von Gli3A. Der Quotient der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität des Zellkerns und dem Zytoplasma sind dargestellt $n=3$, $p \leq 0,056$. (b) Gli3Rmyc ist nach Cotransfektion mit Trps1 im Zellkern angereichert. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität im Zellkern der Gli3-Konstrukte wurde gegen die durchschnittliche Intensität des Zellkernmachers DAPI normalisiert. Dabei wurde die eGFP Kontrolle auf 100% gesetzt. $n=3$ $p \leq 0,01$

Gli3Amyc hingegen zeigt bei Coexpression von Trps1YFP im Vergleich zu eGFP (100%) eine nukleare Anreicherung von 120% im Verhältnis zu DAPI. Gli3Amyc wird im Vergleich zu Gli3Rmyc in nur geringerem Maße nach Cotransfektion mit Trps1YFP im Vergleich zu Trps1R952C-GFP oder eGFP im Zellkern stabilisiert. Die C-Terminale Domäne von Gli3Amyc, Gli3TCmyc hingegen ist gleichmäßig in der Zelle verteilt, diese Verteilung wird nicht durch Cotransfektionen der Trps1 Konstrukte oder durch eGFP beeinflusst. Weder nach Normalisierung des Signals des Zellkerns zum Zytoplasma, noch nach Normalisierung zum DAPI-Signal lässt sich eine Änderung der Quotienten im Vergleich zur eGFP-Kontrolle feststellen. Somit ist die zelluläre Verteilung von Gli3 abhängig von dessen N-Terminus, der die NLS beinhaltet.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Gli3R nach Überexpression mit Trps1 im Nukleus akkumuliert, was unabhängig von der zellulären Verteilung von Trps1 stattfindet. Dies spricht für einen sekundären Effekt von Trps1 auf die Stabilisierung von Gli3R. Die zelluläre Verteilung von Gli3A hingegen wird durch die Lokalisation von Trps1 in Bereichen des Nukleus oder des Zytoplasmas beeinflusst. Dies deutet auf einen direkten Effekt von Trps1 auf die zelluläre Verteilung von Gli3A hin.

4.3 Etablierung der ChIP von Trps1 und Gli3 in Chondrozyten

Nukleares Trps1 begünstigt die Verteilung von Gli3A im Zellkern, im Folgenden soll geklärt werden, ob beide Transkriptionsfaktoren in einem Komplex die Aktivität von Genen modifizieren. Mit Hilfe der ChIP-Seq lassen sich genomweit Bindestellen von DNA-bindenden Proteinen identifizieren. Diese Methode wurde im Zuge dieser Arbeit etabliert und angewandt, um gemeinsame Zielgene von Gli3A und Trps1 zu definieren, aber auch um mögliche Zielgene der einzelnen Transkriptionsfaktoren Gli3A, Gli3R und Trps1 zu finden und somit Informationen über die genetische Regulation durch Gli3 und Trps1 in Chondrozyten zu erlangen.

4.3.1 Etablierung eines retroviralen Transduktionssystems in ATDC5-Zellen

Bei der ChIP handelt es sich um eine Immunopräzipitation, d.h. es wird für die spezifische Präzipitation des Protein-DNA-Komplexes ein Antikörper benötigt, der ausschließlich und spezifisch das Epitop erkennt. Somit ist das Austesten unterschiedlicher Antikörper ein wichtiger Schritt bei der Etablierung der ChIP (Landt u. a. 2012). Erfahrungen der Arbeitsgruppe im Vorfeld zeigten, dass sowohl für Gli3, als auch für Trps1 keine Antikörper, welche spezifisch, reproduzierbar und ausschließlich diese Transkriptionsfaktoren erkennen, verfügbar waren. Dadurch ergibt sich der Rückschluss, dass keine Präzipitation von endogenen Proteinen aus den Knorpelanlagen von Mäuseembryonen oder aus Zelllinien vorgenommen werden konnte, sondern eine Alternativmethode etabliert werden musste.

So wurde ein retrovirales Transduktionssystem in chondrogenen ATDC5-Zellen etabliert. Mit diesem System können getaggte Versionen der einzelnen Transkriptionsfaktoren in die Zellen eingebracht, stabil in deren Genom integriert und überexprimiert werden. Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zu Transfektionen besteht in einer größeren Effizienz der Überexpression verglichen mit herkömmlichen Transfektionsprotokollen. Zudem konnte für die ChIP von Gli3A und Trps1 derselbe Antikörper verwendet werden, dies vereinfachte die Vergleichbarkeit der Datensätze untereinander. Zunächst wurden die Sequenzen von Gli3A_{myc}, Gli3R_{myc}, Trps1_{myc} und dem myc-Tag als Kontrolle mittels retroviraler Transduktion stabil in das Genom von ATDC5-Zellen integriert. Die Retroviren wurden in HEK-293T-Zellen synthetisiert und anschließend aus den Zellen ausgeschleust. Mit dem virusenthaltenden Zellkulturüberständen der HEK-293T-Zellen wurden anschließend chondrogene ATDC5-Zellen infiziert. Nach erfolgreicher Infektion und Selektion von ATDC5-Zellen wurden diese im Western Blot auf

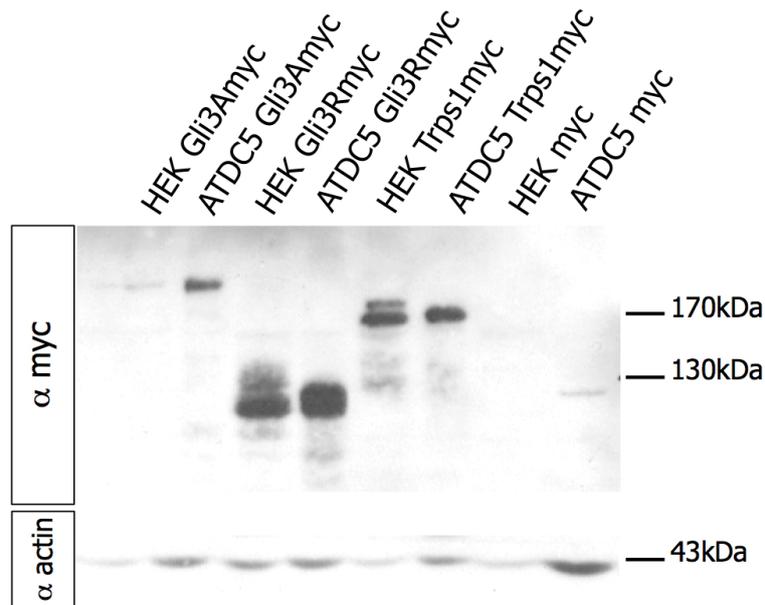


Abbildung 14: Western Blot Analyse von HEK-293T-Verpackerzellen sowie infizierter ATDC5-Zellen. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen das myc-Tag sowie Aktin bei 43kDa als Ladekontrolle entwickelt. Gli3Amyc läuft auf einer Höhe von 190kDa, Trps1myc von 170kDa und Gli3Rmyc von 100kDa. Aufgrund seiner geringen Größe kann das myc-Tag nicht detektiert werden.

Überexpression der einzelnen Transkriptionsfaktoren hin untersucht.

Es sind sowohl in den virusproduzierenden HEK-293T-Zellen, als auch in ATDC5-Zellen in jedem Ansatz Proteinbanden auf spezifischer Höhe der einzelnen Transkriptionsfaktoren sichtbar (Abbildung 14). So kann Gli3Amyc auf einer Höhe von 190kDa, Gli3Rmyc bei 90kDa und Trps1myc bei 170kDa detektiert werden, dies entspricht den beschriebenen Proteingrößen (Ruiz i Altaba 1999; Kaiser u. a. 2003). Als Kontrolle diente das myc-Tag, welches von den Zellen exprimiert wurde, aber aufgrund seiner geringen Größe (ca. 8-10kDa) in diesem Western Blot nicht nachgewiesen werden konnte. In diesen Ansätzen ist kein unspezifisches Bandenmuster durch den myc-Antikörper zu erkennen, was darauf hindeutet, dass dieser spezifisch an das myc-Epitop bindet und für die folgende ChIP benutzt werden konnte. Durch eine Immunfluoreszenzfärbung der überexprimierten Transkriptionsfaktoren mit Hilfe des myc-Antikörpers konnte deren zelluläre Verteilung analysiert werden. In Übereinstimmung mit vorherigen Daten konnte nach Infektion von ATDC5-Zellen Gli3Amyc sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden. Gli3Rmyc war im Zellkern angereichert, genauso wie Trps1myc. Die Expression des myc-Tags erfolgte in den Zellen ubiquitär (Abbildung 15). Mit Hilfe des retroviralen Transduktionssystems ist es möglich, eine effiziente Überexpressionsrate der

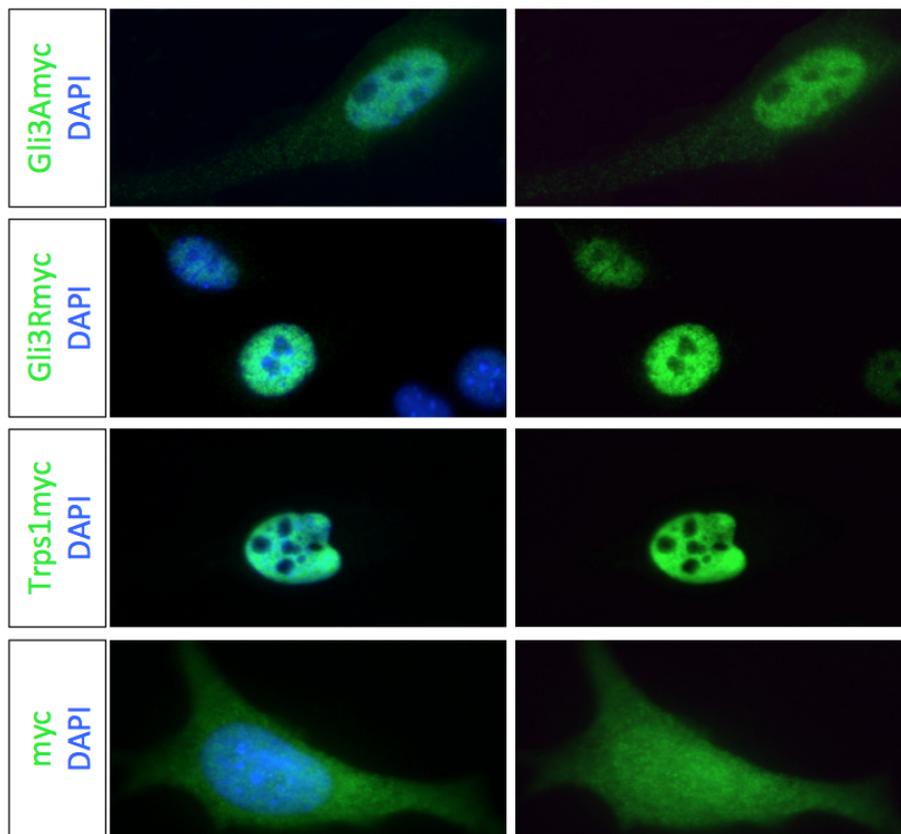


Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbungen infizierter ATDC5-Zellen zeigen spezifische Expressionsmuster der einzelnen Transkriptionsfaktoren. Ein myc-Antikörper gebunden an einen sekundären Alexa488-Antikörper wurde benutzt, um die zelluläre Lokalisation der einzelnen Konstrukte sichtbar zu machen. Gli3Amyc ist schwach im Zytoplasma und stark im Zellkern, Gli3Rmyc und Trps1myc im Zellkern und das myc-Tag ubiquitär in der Zelle lokalisiert. Der Zellkern wurde mit DAPI angefärbt. (Vergrößerung: 630x)

getagten Formen der einzelnen Transkriptionsfaktoren durch stabile Integration der Konstrukte ins Genom von ATDC5-Zellen zu erlangen. In der ChIP konnten so mit Hilfe eines myc-Antikörpers die getagten Transkriptionsfaktoren präzipitiert und auf ihre DNA-Bindung hin untersucht werden.

4.3.2 Etablierung der ChIP in ATDC5-Zellen

Die zelltyp- und proteinspezifische Etablierung der ChIP erfolgte in mehreren Schritten. Nach erfolgter Infektion der Zielzellen wurden für die Durchführung der ChIP die Transkriptionsfaktoren mit Formaldehyd an die DNA fixiert. Zu Etablierung des Protokolls wurden die Fixierungszeiten von 5, 10 und 15 Minuten ausgetestet. Eine zu kurze Fixierungszeit führte zu einer ineffizienten Präzipitation von an die Proteine gebundene DNA, wohingegen eine Überfixierung zu unspezifischer

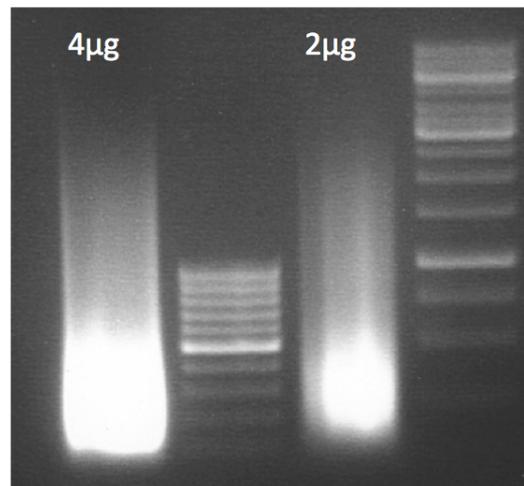


Abbildung 16: Agarose-Gelelektrophorese von fragmentiertem Chromatin. 4µg (links) und 2µg (rechts) ultraschallbehandelte DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Ein 100bp Marker (Mitte) - bzw. 1Kb Marker (rechts) dienen als Größenstandart. Im Vergleich mit dem Marker ergibt sich eine Chromatingröße von 100 – 600bp.

Präzipitation von DNA-Fragmenten führte. Eine Fixierungszeit von 10 Minuten erwies sich als optimal.

Um die Fragmentierung des Chromatins in Größen zwischen 100-600bp zu etablieren, wurden mit Hilfe eines Ultraschallbades unterschiedliche Fragmentierungsbedingungen ausgetestet, dabei wurden die Länge (15s, 30s und 1 Minute) und Anzahl der Ultraschallzyklen (10, 15, 20 und 30 Zyklen) variiert. Agarose-Gelelektrophoresen aufgereinigter DNA nach Ultraschallbehandlung wurden angewandt, um die Größenverteilung der fragmentierten DNA zu untersuchen (Abbildung 16). Das Chromatin wurde in eine Größe von 100-600bp fragmentiert, wobei die größte Anreicherung im Bereich von 250bp zu finden ist. Eine Behandlung der Lysate mit 15 Zyklen à einer Minute Ultraschall bei höchster Geräteleistung gefolgt von je einer Minute Pause führte zu den erforderlichen Fragmentgrößen. Diese Bedingungen wurden für alle folgenden Experimente beibehalten.

Im Folgenden wurde die Spezifität der Präzipitation von DNA-Proteinkomplexen überprüft. So erfolgte nach Fixierung und Fragmentierung des Chromatins die Präzipitation der myc-getaggten Transkriptionsfaktoren mit dem myc-Antikörper. Als Kontrolle erfolgte eine Präzipitation mit einem unspezifischen Flag-Antikörper. Um die Spezifität der Methode zu überprüfen, wurden Primer, welche durch die Literatur bekannte Gli-Bindestellen in Enhancerfragmenten von *Ptch* und *Gli1* eingrenzen, für PCR verwendet (Vokes u. a. 2007). Dabei dienen Primer, welche im *beta Actin*-Promotor binden, als Negativkontrolle. Nach der ChIP wurden PCRs

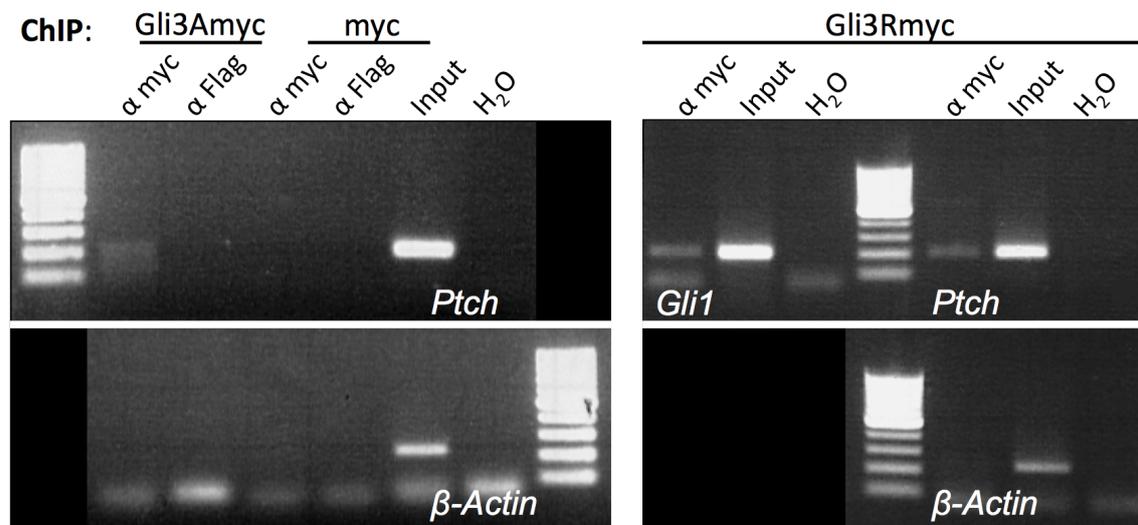


Abbildung 17: Mit der ChIP lassen sich spezifisch Bindungen von Gli3Amyc und Gli3Rmyc an Enhancern von Zielgenen nachweisen. Nach ChIP mit Gli3Amyc, Gli3Rmyc oder myc-infizierten Zellen erfolgten PCRs mit Primern, welche Gli3-Bindestellen in Enhancerregionen von *Ptch* (201bp) und *Gli1* (200bp) sowie als Kontrolle eine Promotorregion von *beta Actin* (223bp) eingrenzen. Gli3Amyc und Gli3Rmyc binden die Enhancerregion von *Ptch*, zudem wurde eine Bindung von Gli3Rmyc auf dem Enhancer von *Gli1* nachgewiesen. Als Positivkontrolle diente unpräzipitierte Input-DNA der jeweiligen Ansätze. ChIP mit einem unspezifischen Flag-Antikörper dient zudem als Negativkontrolle.

auf den *Ptch*- und *Gli1*-Enhancern durchgeführt, wobei das Material aus einer ChIP jeweils auf 2 (Gli3Amyc/myc) - bzw. 3 (Gli3Rmyc) PCRs aufgeteilt wurde. Als Positivkontrolle der PCR diente unpräzipitiertes Chromatin (Input) (Abbildung 17). Es konnte eine Bindung von Gli3Amyc an die Enhancerregion von *Ptch*, aber nicht an die Promotorregion von *beta Actin* nach Präzipitation mit einem myc-Antikörper nachgewiesen werden. Zudem konnte eine spezifische Bindung von Gli3Rmyc an Enhancerregionen von *Ptch* und *Gli1* identifiziert werden, der *beta Actin*-Promotor hingegen wurde nicht gebunden. Wurde die ChIP mit einem unspezifischen Flag-Antikörper, oder nur mit dem myc-Tag durchgeführt, so kam es zu keiner Amplifikation von *Gli1*- oder *Ptch*-Enhancerbereichen. Sowohl Gli3Amyc, als auch Gli3Rmyc binden somit spezifisch bekannte Bindestellen in Enhancerregionen bekannter Zielgene. Weder in ChIP Ansätzen des myc-Tags, noch des unspezifischen Antikörpers kam es zu einer nachweisbaren Präzipitation dieser Regionen. Somit ist die Spezifität der ChIP unter den gewählten Bedingungen gewährleistet.

Um die ChIP-Seq durchzuführen, musste zum einen die Spezifität der Präzipitation mit PCR überprüft werden, zum anderen sollte aber möglichst viel Material für die Durchführung der Sequenzierung zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund wurde

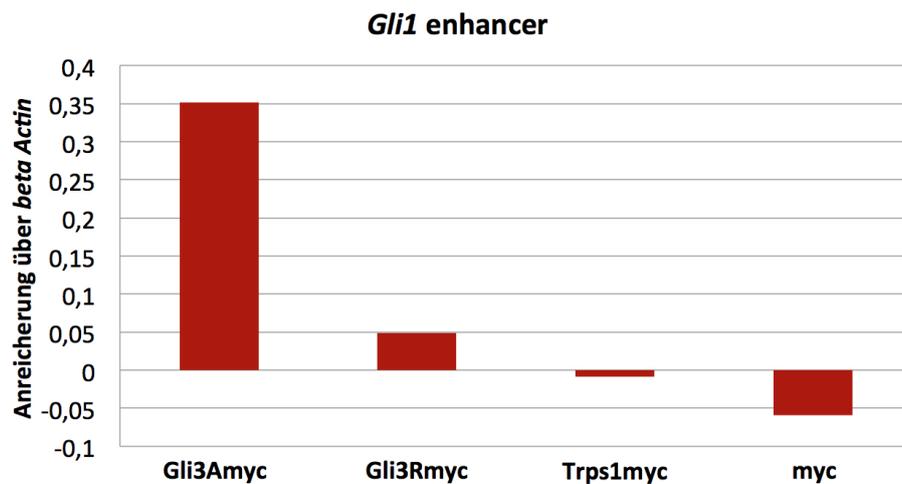


Abbildung 18: Überprüfung der ChIP mit qPCR. Dargestellt ist die Anreicherung von *Gli1* über *beta actin*. Gli3Amyc zeigt eine 0,35-fache, Gli3Rmyc eine 0,05-fache Anreicherung auf dem *Gli1* Fragment im Vergleich zu *beta Actin*. Trps1myc sowie das myc-Tag sind auf diesem Lokus nicht angereichert.

die Spezifität der isolierten DNA mittels quantitative PCR (qPCR) überprüft. geben kann. Die DNA aus vier ChIP-Experimenten aller Transkriptionsfaktoren und des myc-Tags wurde vereinigt und je 1µl mittels qPCR auf eine Anreicherung des *Gli1* Enhancer Fragmentes im Verhältnis zum *beta Actin*-Promotors überprüft. Sowohl für Gli3Amyc, als auch für Gli3Rmyc konnte mit qPCR eine Anreicherung auf der Enhancerregion von *Gli1* gezeigt werden (Abbildung 18). Ob Trps1myc an diesen Bereich bindet, ist nicht beschrieben, eine Anreicherung ist in diesem Experiment nicht gegeben. Für Trps1 sind keine Bindesequenzen bekannt, die in unserem Labor reproduziert werden können. Deshalb wurden die gleichen Bedingungen wie bei den Gli3-Ansätzen verwendet. Das myc-Tag zeigt nach qPCR eine höhere Affinität an *beta Actin* als an *Gli1*. Das restliche Material dieser Proben nach erfolgreicher qPCR wurde zur Durchführung des ChIP-Seqs verwendet.

4.3.3 ChIP-Seq

Die Probenvorbereitung für die ChIP-Seq sowie die Durchführung der Sequenzierung wurde in der Gruppe von A. Lund am BRIC in Kopenhagen von G.Galli durchgeführt. Die Vorbereitung des ChIP-Seqs beinhaltet zunächst die Herstellung einer Library mit einem "ChIP-Seq Sample Prep Kit" (Illumina). Die Größenselektion erfolgte für alle Ansätze zwischen 200-700bp, nach Amplifikation der Library waren in allen Ansätzen außer der Leerkontrolle Fragmente zwischen

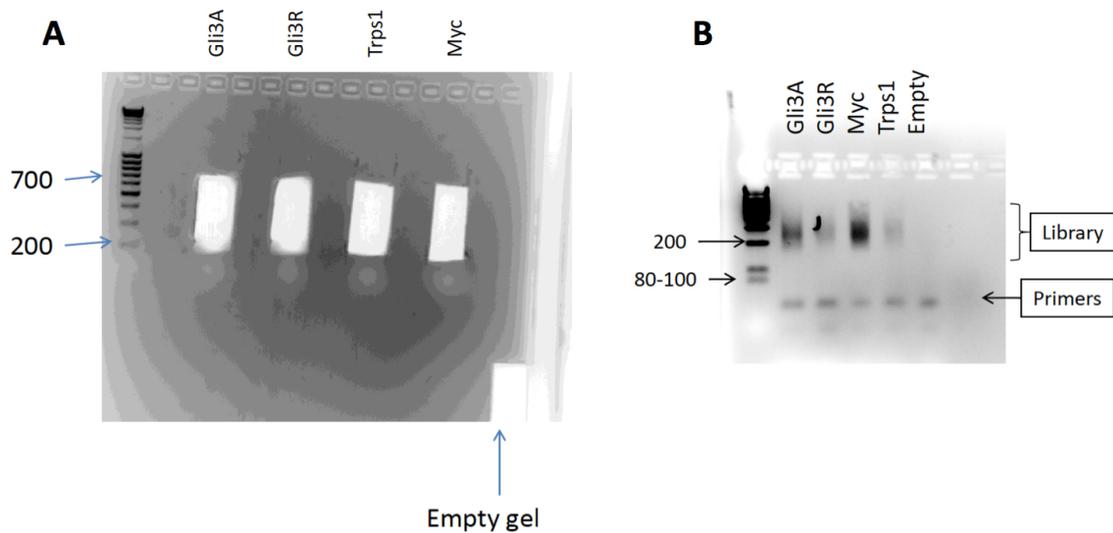


Abbildung 19: Herstellung einer Library für die ChIP-Seq. Nach Reparatur der DNA-Enden, dem Anfügen von 3' A-Überhängen und der Adapterligation erfolgt die Größenselektion der einzelnen Ansätze (A) zwischen 200-700bp. Nach Amplifikation der Library mit PCR konnte eine Größe des amplifizierten Chromatins zwischen 200-500bp festgestellt werden (B). (Abbildung von G.Galli, BRIC)

200-500bp vorhanden (Abbildung 19). Nach erneuter Gelaufreinigung und Elution in 15µl erfolgte eine Quantifizierung des DNA-Gehalts mit einem Qubit Fluorometer (Invitrogen). Die Quantifizierung ergab einen DNA-Gehalt von 17,5ng/µl (Gli3Amyc), 9,5ng/µl (Gli3Rmyc), 10,8ng/µl (Trps1myc) und 30,2ng/µl (myc). Die DNA-Konzentration der Leerkontrolle betrug 3,26ng/µl. Die Amplifikation der Library war somit erfolgreich, diese Proben wurden im Folgenden zur auf einem Illumina Genome Analyzer sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte für alle Ansätze gemeinsam auf einer Flow Cell. Sie resultierte in 36bp langen single-reads, welche im FastQ-Format gespeichert und im Folgenden analysiert wurden.

4.4 Bioinformatische Analyse der ChIP-Seq-Datensätze

Die bioinformatische Auswertung der Datensätze erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Genominformatik an der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen durch Corinna Ernst unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Sven Rahmann. Zunächst wurden die in den FastQ-Dateien enthaltenen single-end 36bp Reads auf dem Genom der Maus mit Hilfe des UCSC Genome Browsers (<http://genome.ucsc.edu/>) kartiert. Im Anschluss erfolgte die Definition und Analyse der in diesen Datensätzen spezifisch angereicherten Regionen (Peaks).

4.4.1 Definition von Peaks mit MACS

Während des ChIP-Seqs wurden nur die ersten 36bp der einzelnen Fragmente sequenziert und die Sequenz dieser Reads im FastQ-Datenformat gespeichert. Diese Daten wurden nun auf dem Genom der Maus kartiert. Auffallend bei der Beurteilung der Qualität der Kartierungen ist, dass in allen Ansätzen ein Großteil der einzelnen Reads nicht kartiert werden konnte (Abbildung 20). Nur eine sehr geringe Anzahl von Reads konnte mehr als einmal auf dem Referenzgenom kartiert werden. So konnten bei den Daten des Gli3Amyc Ansatzes etwa ein Drittel der Reads nicht eindeutig zugeordnet werden, bei Gli3Rmyc und Trps1myc waren es die Hälfte der sequenzierten Reads. In dem myc-Kontrollansatz war die Gesamtanzahl von Reads am höchsten, aber es konnten nur etwa ein Viertel aller Reads eindeutig gemappt werden. Mit Hilfe der FastQ-Anwendung wurden die Reads auf ihre Qualität hin untersucht. Die Ergebnisse dieser Qualitätsanalyse ist als Anlage auf der beigefügten CD zu finden. Die “per base sequence quality“ der 36bp Reads aller Ansätze mit Ausnahme myc-Kontrolle, zeigten gute Scores. Jedoch ist auffällig, dass alle Datensätze ein Duplikationslevel der Reads von 80-90% aufwiesen. Auch die Visualisierung der Datensätze mit dem Integrated Genome Viewer (IGV) bestätigte die hohe Anzahl an Duplikaten. So kamen Anreicherungen von Reads häufig nur in Blöcken vor, die keine Überlappung einzelner Reads zeigten. Da es sich bei diesen Blöcken wohl im PCR-Amplifikate handelte, wurden Duplikate aus den Datensätzen bioinformatisch herausgerechnet, dies verringerte die

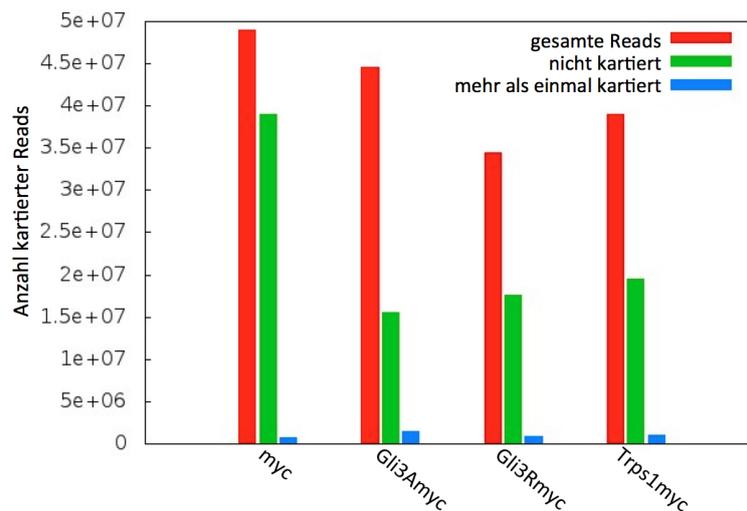


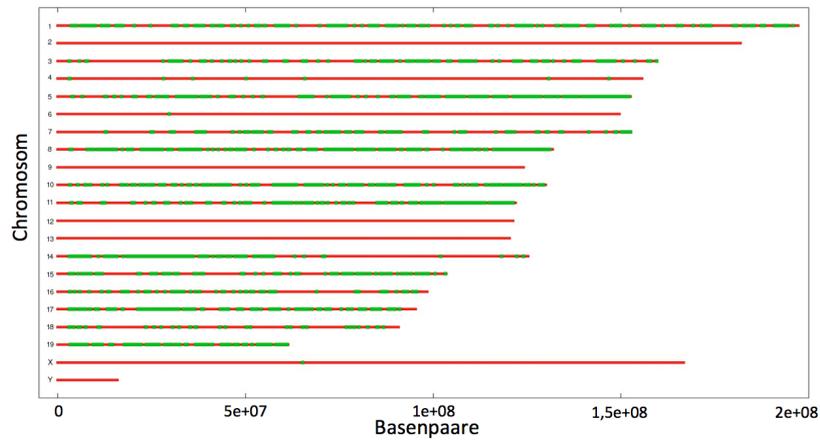
Abbildung 20: Quantifizierung der kartierbaren Reads. Der Anteil der nicht kartierbaren Reads ist bei myc bei ca. 75 Prozent, bei Gli3Amyc, Gli3Rmyc und Trps1myc liegt der Anteil zwischen 30-50 Prozent.

Anzahl der Reads von ca $35\text{-}50 \times 10^6$ auf rund ein Zehntel. Nachdem die einzelnen Reads auf dem Referenzgenom der Maus (mm9) kartiert worden waren, wurden im Folgenden Anreicherungen von gemappten Reads (Tags) als Peaks definiert. Dazu wurde der Algorithmus MACS (Model-based Analysis of ChIP-Seq) verwendet (Zhang u. a. 2008). MACS wurde für alle unterschiedlichen Ansätze (anti-myc-Präzipitation in Gli3Amyc, Gli3Rmyc, Trps1myc und myc) angewandt. Die Daten wurden im .bed-Format mit dem Programm PeakAnalyser bearbeitet, welches u.a. sowohl die genauen Koordinaten der Peaks, als auch die Entfernung und Position der nächsten Gene und nächstgelegenen Transkriptionsstartpunkte angibt (Salmon-Divon u. a. 2010). Zusätzlich erfolgte eine weitere Auswertung mit MACS, in der die Tags der myc-Kontrolle gegen die Tags der jeweiligen Ansätze verrechnet wurden. So konnten unspezifische Bindungen des Antikörpers an die DNA aus den Datensätzen herausgerechnet werden.

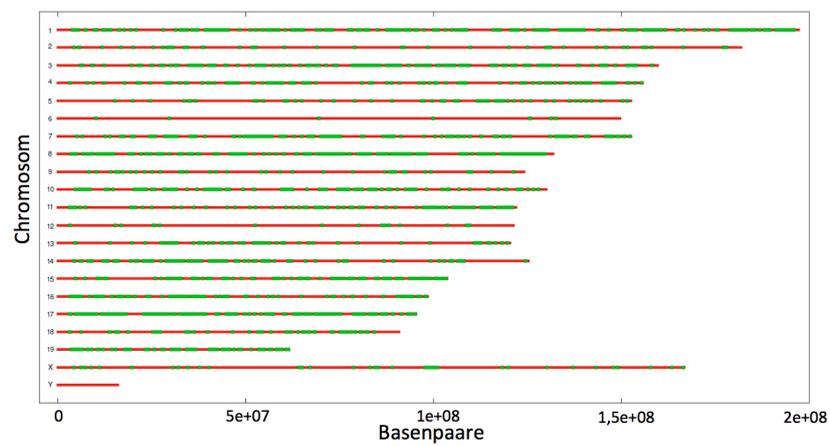
Nach dieser Verrechnung wurde mit MACS die Lokalisation der Peaks jedes einzelnen Transkriptionsfaktors auf den einzelnen Chromosomen der Maus zugeordnet (Abbildung 21). Auffallend ist, dass die Peaks nicht in Bereichen der telozentrischen Centrosomen der Maus angereichert sind, abgesehen davon sind die Peaks gleichmäßig auf den Chromosomen verteilt. Vergleicht man die Peakverteilung zwischen den Gli3Amyc und Gli3Rmyc Datensätzen, so fällt auf, dass die Peakdichte auf den Chromosomen 2, 6, 9, 12, 13 sowie auf den X und Y Chromosomen sehr gering ist. Die Peaks des Trps1 Datensatzes hingegen sind bis auf die Geschlechtschromosomen relativ gleichmäßig über alle Chromosomen verteilt. Zusätzlich erfolgte die Verwendung eines zweiten Algorithmus zur Peakbestimmung, CCAT (Control-based ChIP-seq Analysis Tool). CCAT zieht bei der Definition von Peaks die Erscheinungsrates "falsch positiver" Peaks in die Betrachtung ein (Xu u. a. 2010). Von den Peaks, welche nach Analyse von MACS und CCAT verblieben, wurde eine Aufstellung über Positionen der Peaks, Positionen der nächsten Transkriptionsstartstelle (TSS) und einem MACS-Score, der die Tag-Anreicherung an dem spezifischen Locus widerspiegelt, gemacht (siehe Anlage).

Tabelle 2: Einfluss der unterschiedlichen Algorithmen auf die Anzahl der Peaks

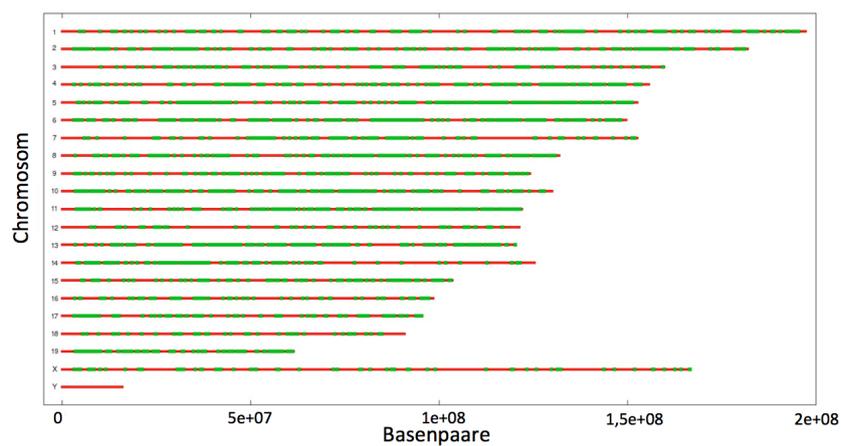
Algorithmus	Gli3Amyc	Gli3Rmyc	Trps1myc
MACS incl. myc	9586	14098	13570
CCAT (Abzug myc-Peaks)	33177	27050	34088
MACS (Abzug myc-Peaks)	446	489	500
MACS & CCAT (gemeinsame Peaks)	294	437	435



(a) Gli3Amyc



(b) Gli3Rmyc



(c) Trps1myc

Abbildung 21: Verteilung der Peakreicherungen auf den einzelnen Chromosomen. Grün dargestellt sind Bereiche auf den Chromosomen (rot) mit erhöhter Peakdichte.

Durch die bioinformatische Analyse der Datensätze mit unterschiedlichen Algorithmen und dem Herausrechnen von Peaks, die mit ähnlicher Anreicherung im Kontrolldatensatz detektiert wurden, verringerte sich die Anzahl der Peaks von etwa 10000 auf 300-400 Peaks pro Datensatz (Tabelle 2). Im Folgenden werden die gefilterten Peaks als DNA-Binderegionen der einzelnen Transkriptionsfaktoren definiert.

4.4.2 DNA-Bindemotivanalyse mit MEME

Gli3A und Gli3R besitzen die gleiche DNA-Bindedomäne im N-Terminus des Proteins. Es wurde die Bindung von Gli3 an eine Gli-Konsensussequenz beschrieben (Vortkamp u. a. 1995). Für Trps1 ist eine mittels seines GATA-Zinkfingers eine Bindung an GATA-Motive gezeigt worden (Malik u. a. 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Bindemotive der einzelnen Transkriptionsfaktoren in den gefundenen Binderegionen ermittelt. Dazu wurden die DNA-Sequenzen der 50 Peaks mit den höchsten MACS-Scores mit MEME (Multiple EM for Motif Elicitation) analysiert. Dabei sucht das Programm nach wiederholten lückenlosen Sequenzmotiven (Bailey u. a. 2006). Die ermittelten Bindemotive für Gli3Amyc und Gli3Rmyc sind sehr ähnlich (Abbildung 22(a) und (b)), Trps1myc hingegen zeigt im "Motif probability Graph" ein abweichendes DNA-Bindemotiv (Abbildung 22(c)). Dabei zeigte sich das Bindemotiv mit einigen Abweichungen im Gli3Amyc Datensatz 47-mal, im Gli3Rmyc Datensatz 50-mal und das Trps1 Bindemotiv zeigte sich 46-mal.

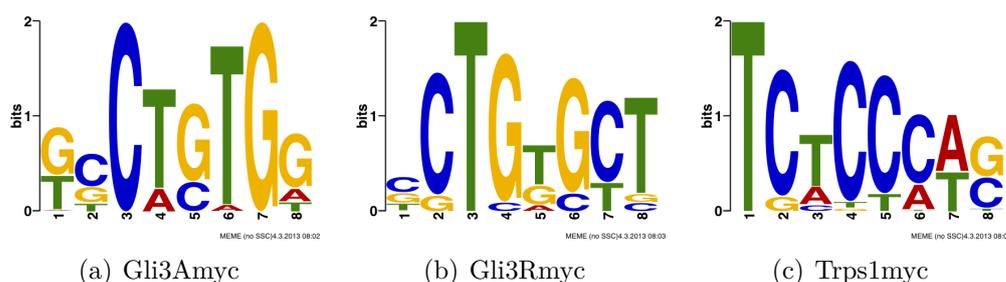


Abbildung 22: "Motif probability Graph" Darstellungen von DNA-Bindemotiven von Gli3Amyc, Gli3Rmyc und Trps1myc

4.4.3 GREAT - eine Analyse der Datensätze mit Hilfe von Annotationen

Eine Möglichkeit, putative Zielgene der einzelnen Transkriptionsfaktoren zu identifizieren stellt die Analyse der Datensätze mit GREAT (Genomic Regions En-

richment of Annotations Tool) dar (McLean u. a. 2010). Im Gegensatz zu den schon verwendeten Tools zieht GREAT nicht nur die nächstgelegenen Gene als putative Zielgene in Erwägung, sondern analysiert sowohl proximale, als auch distale genomische Regionen und überträgt die Annotationen über die biologische Funktion von nahegelegenen Genen auf diese Regionen. Danach berechnet es statistische Anreicherungen dieser genomischen Regionen und Annotationen. Man erlangt am Ende einen Datensatz, welcher signifikant angereicherte Annotationen für den ChIP-Seq Datensatz enthält.

Ob die einzelnen Transkriptionsfaktoren im distalen oder proximalen Bereich von Genen binden, ergab eine Analyse der von GREAT ermittelten potentiellen Bindestellen im Verhältnis zu den zugeordneten Transkriptionsstartpunkten (TSS). Ein Großteil der Bindestellen ist in weiter Entfernung von -50 bis -500kb (22%), bzw. +50 bis +500kb (32%) zu den nächsten TSS zu finden. Nur 6% aller Bindungen sind proximal zu den zugeordneten TSS (unter 50kb) gelegen (Abbildung 23).

Es werden von GREAT mit Hilfe von GO-Annotations biologischen Prozesse, in denen die mit den Binderegionen assoziierten Annotationen signifikant angereichert sind, beschrieben. Jedem bekannten Gen sind hierbei Annotationen wie z.B. Informationen über die Funktion der Gene, assoziierte Phänotypen, regulatorische oder metabolische Signalwege, Expressiondaten oder Genfamilien zugeordnet. Die Daten werden mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Tests, einem binomischen und einem hypergeometrischen Test, untersucht und statistische Anreicherungen von bestimmten Annotationen beschrieben. Dabei berechnet der binomische Test, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass Bindungen zufällig in bestimmten genomischen Bereichen zu finden sind und vergleicht diesen Wert mit dem tatsächlich aufgetretenen. Der hypergeometrische Test hingegen bearbeitet nicht die Binderegion, sondern ordnet der Binderegion den nächstgelegenen TSS in einem definierten Radius zu. Tabellen in denen für jeden Versuchsansatz angereicherte biologische Prozesse aufgeführt sind, sind im Anhang zusammengefasst. Dabei wurden Binderegionen, die einigen Regulatoren der enchondralen Ossifikation, wie z.B. *Runx2*, *Sox9* oder *Wnt5a* zugeordnet sind, in Ontologien der Gli3A- und Gli3R-Datensätze aufgefunden.

Unter den signifikant angereicherten biologischen Prozessen des Gli3A-Datensatzes befinden sich Ontologien über die Regulation der Chondrozytendifferenzierung (9 von 20 Genen) und der Knorpelentwicklung (12 von 26 Genen), was die Spezifität

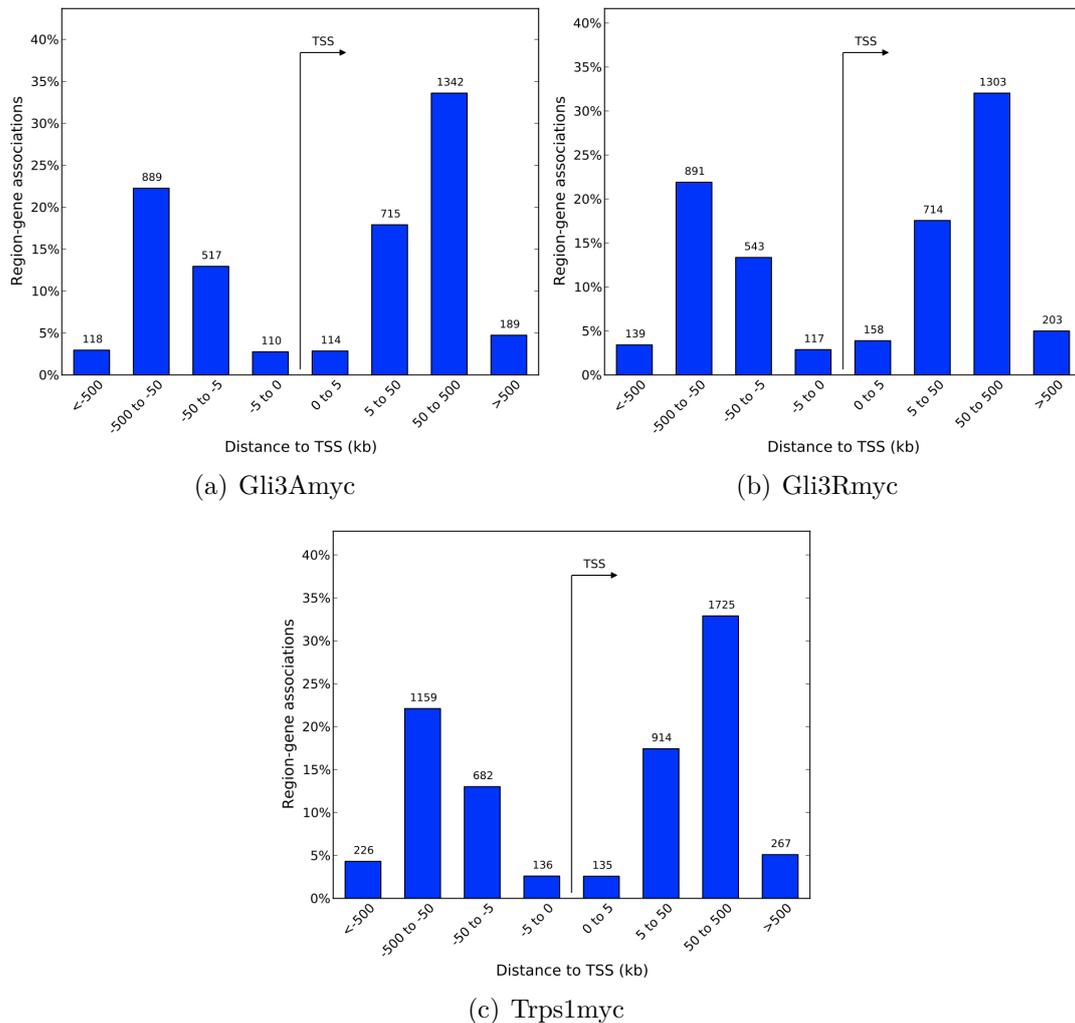


Abbildung 23: Entfernungen der Bindestellen von den zugeordneten TSS. Analyse der Positionen von Bindungen im Datensatz von Gli3Amyc (a), des Gli3Rmyc (b) und Trps1myc (c) zeigt eine ähnliche Verteilung der Bindungen im Verhältnis zu den TSS der mit den Regionen assoziierten Gene. Eine Anreicherung der Bindestellen ist im Bereich von -500 bis -50 sowie in einem Bereich von +50 bis +500kb zu finden.

des Datensatzes hervorhebt, aber auch Ontologien über die Polarität (13 von 33 Genen) oder Proliferation von Epithelien (12 von 27 Genen).

Unter den biologischen Prozessen, die im Datensatz von Gli3Rmyc angereichert sind, befindet sich "developmental growth involved in morphogenesis" (12 von 28 Genen), aber auch Annotationen über die Entwicklung und Morphologie von Organen wie z.B. des Verdauungstraktes, der Niere und dem Hinterhirn.

Die Auswertung des Trps1myc-Datensatzes hingegen zeigte in der Ontologie der angereicherten biologischen Prozesse Annotationen über die Fettsäuresynthese, die Regulation von Proteinubiquitinierung, die Regulation der Angiogenese und der Ent-

wicklung der Blut–Hirnschranke. Interessanterweise war in diesem Datensatz die Ontologie der MGI Expression angereichert. Diese Ontologie enthält Annotationen über spezifische anatomische Strukturen in spezifischen Entwicklungsstadien (Theiler stages (TS)) der Maus. In dieser Liste waren Gene, deren Expression z.B. im Axialskelett bei TS21 (26 von 54 Genen), Knorpelkondensationen der Wirbelkörper bei TS21 (14 von 26 Genen) sowie im Humerus bei TS23 (14 von 30 Genen) exprimiert sind. Unter den in diesen Anotationen gefundenen Genen befinden sich u.a. *Col2a1*, *Fbln1* & *2*, *Fst*, *Gtfrid1*, *Pax1*, *Sox9* oder *Wnt5a*. Diese Gene habenn alle eine Funktion in der Entwicklung der Knorpel- oder Knochenanlage.

4.5 Bestätigung von DNA–Bindestellen

Im Folgenden wurden DNA-Bindestellen von Gli3Amyc und Trps1myc bestätigt. Aus den unterschiedlichen bioinformatischen Auswertungen ergab sich eine große Anzahl von potentiellen Binderegionen, die aufgrund ihres hohen MACS-Score und/oder aufgrund der durch GREAT erlangten Informationen über chondrozyten-spezifische Expressionen im Weiteren analysiert wurden. Im ersten Schritt wurden diese Bindestellen mit Hilfe des Integrated Genome Viewers (IGV) visualisiert. Die Verschachtelung der einzelnen Tags und die Höhe der Peaks gaben Auskunft über ihre Qualität. So konnte u.a. ein niedriger Peak im Bereich des *Gli1*-Enhancers

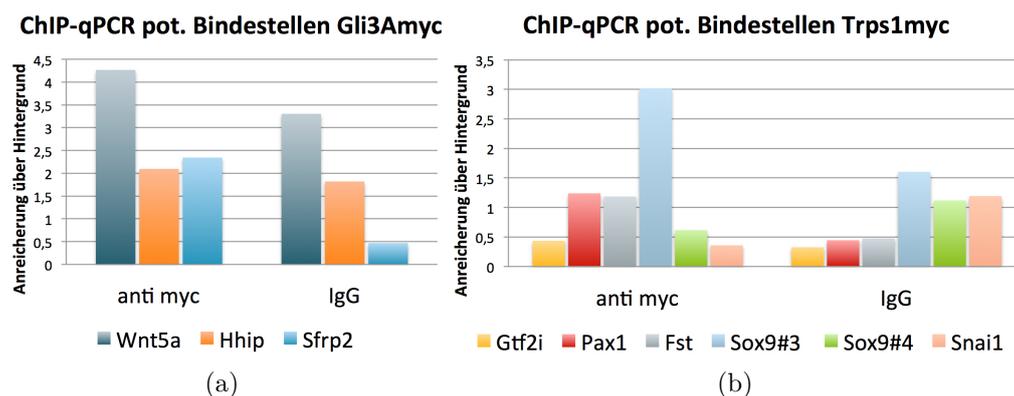


Abbildung 24: Analyse der Bindung von Gli3Amyc und Trps1myc an potentielle Bindestellen. Dargestellt sind repräsentative Anreicherungen über Hintergrund von qPCRs nach ChIP mit anti-myc oder IgG. (a) Repräsentative qPCR-Ergebnisse nach ChIP mit Gli3Amyc zeigen eine Bindung an einen Bereich im *Wnt5a*-Promotor und an *Sfrp2*- und *Hhip* zugeordnete Bindestellen. (b) Trps1myc bindet in Regionen um *Fst*, *Sox9*, *Pax1* und *Gtf2i*. Die Bindung an eine zusätzliche Region um *Sox9* (*Sox9#4*) und *Snai1* konnte nicht gezeigt werden.

der Kontroll-PCR nachgewiesen werden. Im Weiteren wurde die genomische Sequenz der potentiellen Binderegionen benutzt, um Primer zu generieren, welche im Folgenden in qPCRs nach erneuter ChIP verwendet wurden.

Dabei wurden in Duplett-qPCRs von ChIPs mit anti-myc oder, zur Kontrolle der spezifischen Präzipitation, unspezifischen Maus-IgGs auf Bereichen der potentiellen Bindestellen durchgeführt, um die Anreicherung der einzelnen Transkriptionsfaktoren an Bereiche der DNA zu zeigen. qPCRs mit Kontrollprimern wurden durchgeführt, um anschließend die Anreicherung über den Hintergrund aus dem Ct-Wert der untersuchten Region in Relation zu dem Ct-Wert der Kontroll-qPCR zu errechnen.

Die Analyse der Bindung von Gli3Amyc an potentielle regulative Bereiche zeigte eine Bindung dieses Faktors an Bereiche im *Wnt5a*-Promotor sowie in distalen Bereichen von *Hhip* und *Sfrp2*.

Für Trps1myc konnte eine Bindung an Bereiche um die Gene *Fst*, *Sox9*, *Pax1* und *Gtf2i* nachgewiesen werden. Weitere Regionen, davon eine weitere *Sox9* zugeordnete potentielle Bindestelle sowie ein *Snai1* zugeordneter Bereich konnten hingegen nicht als Bindestellen bestätigt werden (siehe Abbildung 24 und Tabelle 3).

Tabelle 3: Überprüfte Bindestellen von Gli3Amyc und Trps1myc

Gen	Position Binderegionen	Distanz zu TSS	Bdg. Gli3Amyc	Bdg. Trps1myc	Quote
<i>Col2a1</i>	chr15:97873225-97873404	-38kb	nein	ja	4 / 4 (Trps1) 1 / 4 (Gli3A)
<i>Fst</i>	chr13:115299690-115300079	-50kb	–	ja	5 / 6
<i>Gtf2i</i>	chr5:134805785-134806079	-15kb	–	ja	3 / 3
<i>Hhip</i>	chr8:82701635-82702111	+24kb	ja	–	2 / 3
<i>Pax1</i>	chr2:147082509-147082667	-115kb	–	ja	5 / 6
<i>Pthlh</i>	chr6:147093516-147094335	-107kb	ja	ja	6 / 7 (Trps1) 3 / 4 (Gli3A)
<i>Sfrp2</i>	chr3:83565580-83566594	-5kb	ja	–	2 / 2
<i>Snai1</i>	chr2:167337579 -167338059	-25kb	–	nein	1 / 3
<i>Sox9#3</i>	chr11:112487199-112487511	-29,5kb	–	ja	4 / 4
<i>Sox9#4</i>	chr11:112709949-112710165	+65kb	–	nein	0 / 3
<i>Wnt5a</i>	chr14:29317174-29317331	-2,3kb	ja	–	3 / 4

Da die Expression aller den untersuchten Binderegionen zugeordneten Gene in der Knochen- und Knorpelentwicklung mit der Ausnahme von *Gtf2i* gezeigt wurde, wurde die Expression dieses Gens mit *in situ* Hybridisierungen in der embryonalen Knochenanlage untersucht.

4.6 *Gtf2i*, ein putatives Zielgen von *Trps1*, ist spezifisch in der Knochenanlage exprimiert

Eine Bindung 15kb upstream des Transkriptionsfaktors *Gtf2i* zeigte nach Analyse mit MACS und CCAT im *Trps1myc*-Datensatz den höchsten MACS-Score. Die Bindung von *Trps1myc* an diesen Bereich konnte mit qPCR nach ChIP bestätigt werden (siehe Abbildung 24). Es wurde im Vorfeld eine Funktion von *Gtf2i* während der Osteogenese in der Repression der durch einen Hauptregulator der Knochenbildung, *Runx2*, aktivierten Transkription von Zielgenen beschrieben (Lazebnik u. a. 2009).

Diese Daten deuten auf eine Funktion von *Gtf2i* während der Knochenentwicklung hin, die Expression von *Gtf2i* wurde jedoch bis dato noch nicht in der Knochenanlage untersucht. So wurden *in situ* Hybridisierungen mit einer *Gtf2i*-spezifischen Sonde auf den Vordergliedmaßen von Wildtypmausembryonen der Stadien E14,5

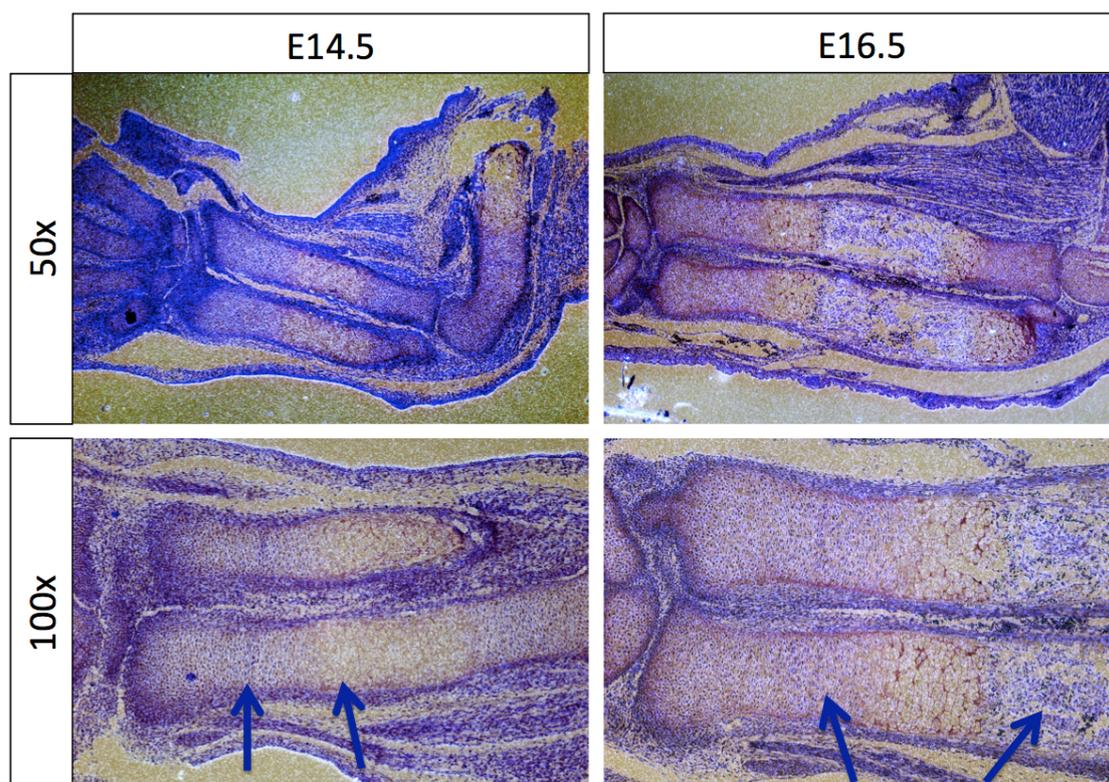


Abbildung 25: *Gtf2i* ist in distinkten Zonen der embryonalen Vordergliedmaßen exprimiert. Im Stadium E14,5 ist *Gtf2i* in den proliferierenden sowie in den hypertrophen Chondrozyten (siehe Pfeile) exprimiert. Die Expression im Stadium E16,5 erfolgt in der gesamten Anlage, mit einem stärkeren Signal in der Verknöcherungszone sowie in den kollumnaren Chondrozyten (siehe Pfeile).

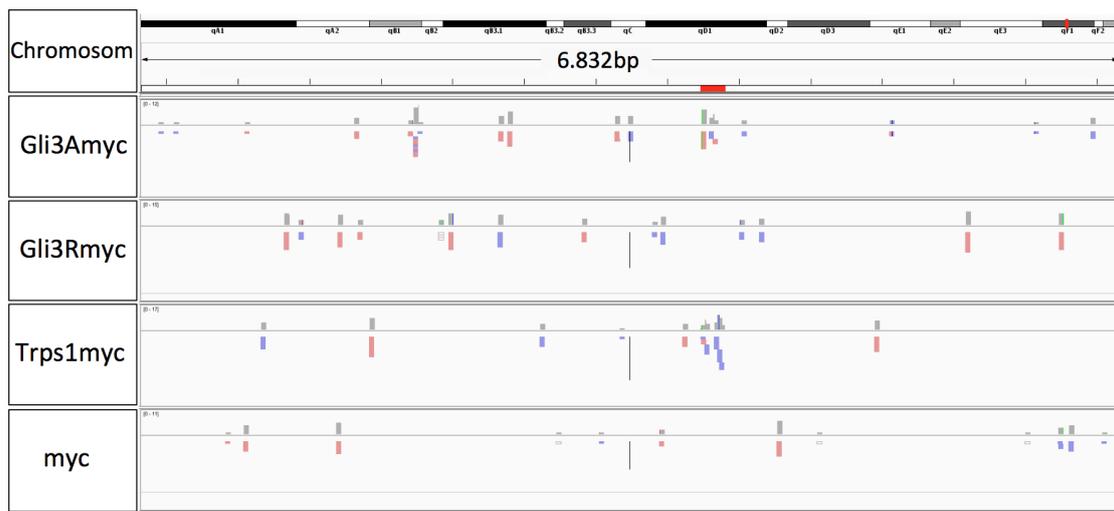
und E16,5 durchgeführt. Die Expression von *Gtf2i* ist in den Vordergliedmaßen von E14,5 Embryonen detektierbar, wobei der zentrale Bereich der Anlage, welche die hypertrophen Chondrozyten beinhaltet, ein stärkeres Signal aufweist als die distalen Bereiche der proliferierenden Chondrozyten (Abbildung 25). In den verschiedenen Zonen der Vordergliedmaßen des Stadiums E16,5 zeigen sich distinkte Unterschiede im Expressionsmuster. So ist *Gtf2i* schwach in den distalen und stärker in kollumnaren Chondrozyten exprimiert. Im Bereich der hypertrophen Chondrozyten ist das Signal der *in situ* Hybridisierung im Vergleich zu der kollumnaren Zone schwächer. Eine starke Expression von *Gtf2i* ist in der Verknöcherungszone erkennbar (Abbildung 25). Somit wurde hier erstmals die spezifische Expression von *Gtf2i* in den Knochenanlagen von E14,5 und E16,5 Wildtypembryonen dokumentiert.

4.7 Gli3 und Trps1 binden kooperativ an regulatorische Elemente

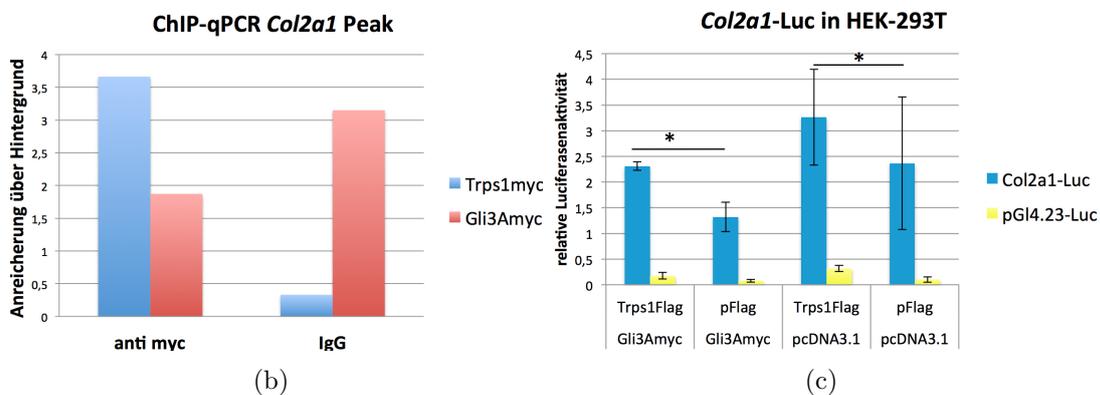
Um zu zeigen, dass Gli3Amyc und Trps1myc gemeinsam Gene regulieren, wurden im Folgenden durch IGV aufgezeigte gemeinsame Bindebereiche analysiert, mit qPCR nach ChIP die Bindung der Transkriptionsfaktoren an jene Bereich überprüft und im Anschluss die regulativen Eigenschaften dieser Bereiche mit Hilfe von Luciferase-Experimenten untersucht.

4.7.1 Trps1 bindet an ein putatives Enhancerelement von *Col2a1*

Eine gemeinsame putative Bindestelle beider Transkriptionsfaktoren lag 38kb upstream der *Col2a1*-TSS. *Col2a1* ist in allen proliferierenden Chondrozyten exprimiert und essenziell für die Ausbildung der Wachstumsfuge (Metsäranta u. a. 1992). Ein Vergleich der Datensätze zeigte eine höhere Komplexität des Peaks des Trps1myc Datensatzes im Vergleich zu dem Peak von Gli3Amyc (siehe Abbildung 26). Diese potentielle Binderegion wurde sowohl mit GREAT im Trps1myc Datensatz der Ontologie "Axial Skeleton" aufgeführt, als auch in den Daten der Analyse der Binderegionen mit CCAT und MACS mit einem hohen MACS-Score angezeigt. Im Folgenden wurde die Bindung von Gli3Amyc und Trps1Flag an diese genomische Region mit qPCR nach ChIP untersucht (Abbildung 26). Nach ChIP konnte eine Bindung von Trps1myc an die potentielle Binderegion wiederholt nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte keine Bindung von Gli3Amyc an



(a)



(b)

(c)

Abbildung 26: Trps1 bindet an einen DNA-Bereich 38kb vor der *Col2a1*-TSS. (a) Untereinander sind jeweils die Coverage-Blots und die Bindung einzelner Tags der Gli3Amyc, Gli3Rmyc, Trps1myc und des myc-Datensatzes dargestellt. Dabei sind Sequenzen, die auf dem Watson oder Crick Strang der DNA hybridisieren, farblich unterschiedlich dargestellt. Rot markiert ist der gemeinsame Bindebereich, der sich 38kb vor dem Transkriptionsstart von *Col2a1* befindet. (b) Darstellung repräsentativer Anreicherungen der Bindung des *Col2a1* Fragments nach ChIP über Hintergrund nach qPCR. Trps1myc zeigte nach ChIP mit anti myc eine höhere Anreicherung auf dem *Col2a1*-Bindebereich als nach Verwendung von IgGs. Im Gegensatz dazu kam es zu einer größeren Anreicherung des *Col2a1*-Fragments nach Verwendung von IgGs im Gli3Amyc Ansatz im Vergleich zu anti myc. (c) Luciferaseexperimente zeigen eine gesteigerte Aktivierung von *Col2a1-Luc* nach Trps1Flag-Überexpression in HEK-293T-Zellen. $n=3$, $p \leq 0,01$

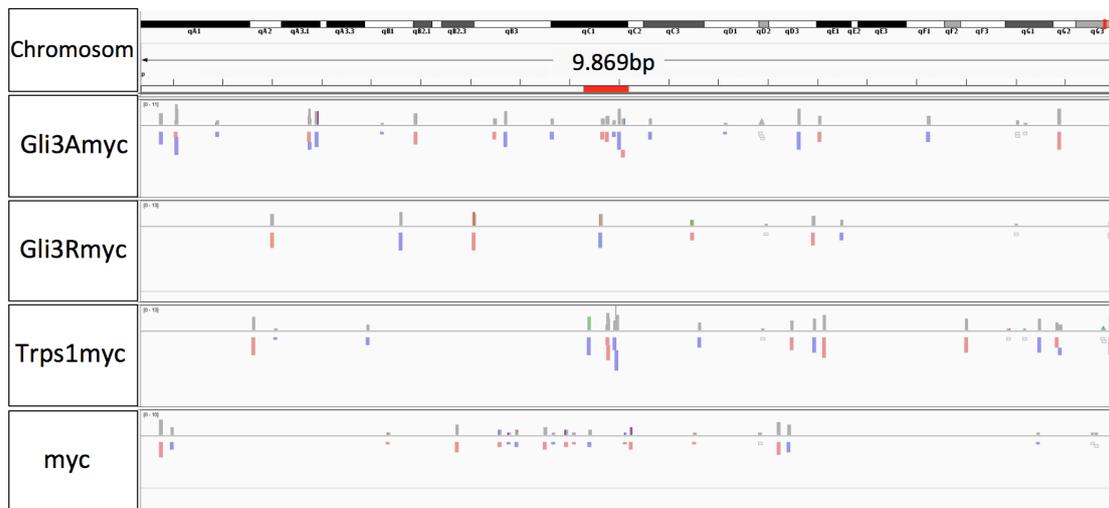
diesen Bereich ermittelt werden. Ob es sich bei dem gebundenen Areal um ein *cis*-regulatorisches Element der DNA handelt, d.h. ob es die Aktivität von Genen spezifisch regulieren kann, wurde im Folgenden durch Luciferase-Assays untersucht.

Dabei wird die Firefly-Luciferase in Abhängigkeit von einem minimalen Promotor des Vektors pGL4.23-Luc und der Binderegion exprimiert.

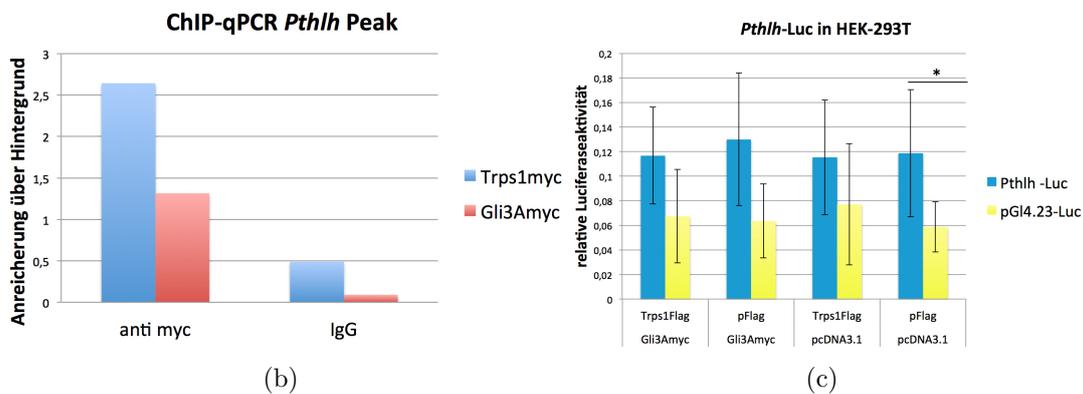
Als interne Transfektionskontrolle dient die Renilla-Luciferase, die auf einem weiteren Plasmid konstant unter einem TK-Promotor exprimiert wird. So wurden HEK-293T-Zellen stets mit der Renilla-Luciferase in Kombination mit pGL4.23 Vektor mit und ohne Insertion des putativen *Col2a1*-Enhancerbereichs (*Col2a1*-Luc) transfiziert. Um die Auswirkung der Bindung von Gli3A oder Trps1 auf die Expression der Firefly-Luciferase zu untersuchen, wurden Gli3Amyc und Trps1Flag in Kombination mit deren jeweiligen Leervektoren transfiziert. Es zeigte sich, dass in allen Cotransfektionen mit *Col2a1*-Luc im Vergleich zu den Cotransfektionen mit dem Leervektor pGL4.23 eine Erhöhung der relativen Luciferaseaktivität vorhanden war, woraus sich eine regulative Eigenschaft des untersuchten Fragments als Enhancer ableiten lässt. Die Cotransfektion von Trps1Flag führte zu einer signifikanten Erhöhung der relativen Luciferaseaktivität von *Col2a1*-Luc verglichen mit der Leerkontrolle oder Gli3Amyc-Coexpression.

4.7.2 Gli3Amyc und Trps1myc binden gemeinsam ein Fragment 107kb upstream von *Pthlh*

Pthlh stellt einen Hauptregulator der Chondrozytendifferenzierung in der Wachstumsfuge dar. In Abhängigkeit von *Ihh* in der Zone der distalen Chondrozyten exprimiert, inhibiert *Pthlh* die hypertrophe Differenzierung von Chondrozyten (Vortkamp u. a. 1996). Aufgrund eines erhöhtem MACS-Score wurde eine Region 107kb upstream von *Pthlh* mit Hilfe von IGV analysiert. Auch hier konnten Bindungen von Gli3Amyc und Trps1myc an übereinstimmenden DNA-Bereichen (rot markiert in Abbildung 27(a)) festgestellt werden. Die Anreicherung von Reads in den Gli3Rmyc und myc-Datensätzen hingegen ist sehr gering (Abbildung 27(a)). Die Analyse der Bindung beider Transkriptionsfaktoren an diesen Bereich mit qPCR nach ChIP zeigte eine Bindung von Gli3Amyc und Trps1myc an dieses Fragment. Luciferaseexperimente in HEK-293T-Zellen zeigten eine leichte, aber signifikante Erhöhung der relativen Luciferaseaktivität in *Pthlh*-Luc verglichen mit dem pGL4.23 Leervektor. Die Überexpression von Gli3Amyc und Trps1Flag führte zu keiner Veränderung der relativen Luciferaseaktivitäten (Abbildung 27 (c)).



(a)



(b)

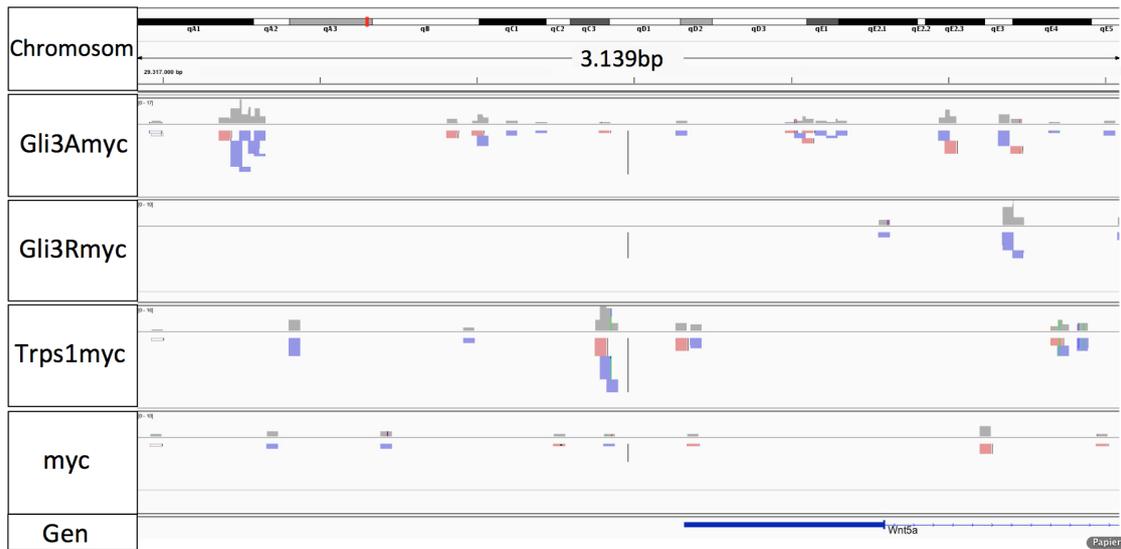
(c)

Abbildung 27: (a) Darstellung von gemeinsamen Taganreicherungen im Gli3Amyc und Trps1myc-Datensatz mit IGV. Untereinander sind jeweils die Coverage-Blots und die Bindung einzelner Tags der Gli3Amyc, Gli3Rmyc, Trps1myc und des myc-Datensatzes dargestellt. Rot markiert ist der gemeinsame Bindebereich, der sich 107kb nach dem Transkriptionsstart von *Pthlh* befindet. (b) Repräsentative qPCR nach ChIP zeigt eine Bindung sowohl von Gli3Amyc, als auch von Trps1myc an die Binderegion. (c) Luciferaseexperimente in HEK-293T-Zellen zeigen eine Steigerung der Luciferaseaktivität bei *Pthlh*-Luc im Vergleich zu pGI4.23, diese Aktivität wird nicht durch Gli3Amyc oder Trps1Flag reguliert. $n=3$, $p \leq 0,01$

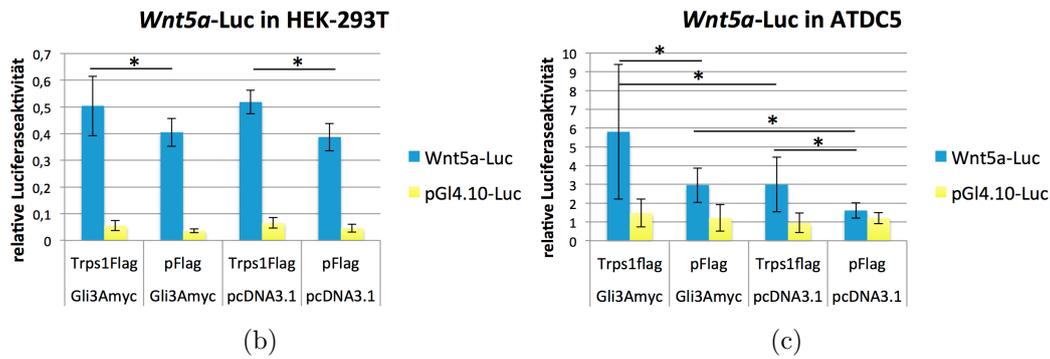
4.7.3 Gli3A und Trps1 regulieren gemeinsam die Aktivität des *Wnt5a*-Promotors

Die Analyse von Genen mit IGV, welche die Knorpeldifferenzierung beeinflussen, führte während der ChIP-Seq Auswertung zu der Analyse der Bindung von Trps1 und Gli3A im Promotor von *Wnt5a*. *Wnt5a* ist ein Mitglied der Familie der Wnt-Wachstumsfaktoren.

Dabei zeigte sich, im Gegensatz zu den zuvor aufgezeigten Beispielen, eine Ver-



(a)



(b)

(c)

Abbildung 28: (a) Darstellung des *Wnt5a*-Promotors mit IGV. Untereinander sind jeweils die Coverage-Blots und die Bindung einzelner Tags der Gli3Amyc, Gli3Rmyc, Trps1myc und des myc-Datensatzes dargestellt. Dabei sind Sequenzen, die auf dem Watson oder Crick Strang der DNA hybridisieren, farblich unterschiedlich dargestellt. (b) Gesteigerte Luciferaseaktivität des *Wnt5a*-Promotors nach Cotransfektion von Trps1Flag in HEK-293T-Zellen. (c) Gli3Amyc und Trps1 aktivieren den *Wnt5a*-Promotor in ATDC5-Zellen. n=3, $p \leq 0,01$

teilung von Bindungen von Gli3Amyc und Trps1myc an unterschiedliche Bereiche des direkten Promotorbereichs in einer Region von 2,5kb (siehe Abbildung 28). Die Bindung von Gli3Amyc an die Binderegion -2,5kb vor dem Transkriptionsstart konnte mit qPCR nach ChIP bestätigt werden (Abbildung 24 und Tabelle 3). Im Folgenden wurde untersucht, ob Gli3A und Trps1 die Aktivität des Promotors von *Wnt5a* gemeinsam regulieren. Dazu wurde der 2,5kb Promotorbereich in einen Luciferasevektor ohne minimalen Promotor kloniert und in HEK-293T-Zellen mit Gli3Amyc, Trps1Flag und den jeweiligen Leervektoren coexprimiert (Abbildung 28). Somit stellt die relative Luciferaseaktivität ein Maß für die Promoteraktivität dar. Die Analyse der *Wnt5a*-Promotoraktivität führte zu einer

Erhöhung nach Coexpression mit Trps1Flag, Überexpression von Gli3Amyc hingegen führte zu keiner Erhöhung der Promotoraktivität. Um zu untersuchen, ob die Aktivitätssteigerung des *Wnt5a*-Promotors durch Trps1 auch in chondrogenen Zellen vorhanden ist, wurde das Experiment in ATDC5-Zellen wiederholt. Dabei zeigte sich überraschenderweise ein unterschiedliches Ergebnis als in cotransfizierten HEK-293T-Zellen. Expression von Gli3Amyc und Trps1Flag führten jeweils zu einer Erhöhung der Promotoraktivität von *Wnt5a*, die Coexpression beider Faktoren führte zu einem zusätzlichen Anstieg der Promotoraktivität in ATDC5-Zellen. Dieser additive Effekt lies sich nur in ATDC5- und nicht in HEK-293T-Zellen beobachten, dies deutet auf eine zelltypspezifische Aktivierung von *Wnt5a* durch Gli3A und Trps1 hin. Die aufgeführten Daten identifizieren *Wnt5a* als erstes gemeinsames Zielgen der Transkriptionsfaktoren Gli3A und Trps1 in Chondrozyten.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Trps1 spezifisch an die TAD-Domäne im C-Terminus von Gli3A bindet. Durch die direkte Interaktion mit Gli3A reguliert Trps1 dessen zelluläre Verteilung. Aufgrund eines sekundären Effekts stabilisiert Trps1 unabhängig von dessen zellulärer Lokalisation die nukleare Akkumulation von Gli3R. Vergleichende Analysen der ChIP-Seq Datensätze von Gli3A und Trps1 zeigten potentielle Binderegionen beider Transkriptionsfaktoren auf, wobei eine Bindung beider Faktoren an ein *Pthlh* zugeordnetes Element gezeigt werden konnte. Trps1 und Gli3A regulieren zelltypspezifisch die Aktivität des *Wnt5a* Promotors in Chondrozyten.

5.1 Trps1 bindet an die Transaktivatorodomäne von Gli3A und reguliert dessen zelluläre Lokalisation

In der Wachstumsfuge regulieren die Vollformen von Gli3, Gli3A und Trps1 die Proliferation von Chondrozyten in Abhängigkeit von Ihh. Zudem sind beide Transkriptionsfaktoren in überlappenden Regionen in der Knorpelanlage exprimiert. Interaktionsanalysen zeigten eine spezifische Bindung von Trps1 mit dessen Zinkfingerdomänen 4-6 an Gli3A (Wuelling u. a. 2009). Gli3A wird in der Abwesenheit von Hh-Signalen partiell proteolytisch degradiert, was zu der Bildung einer C-terminal trunkeierten Repressorform (Gli3R) führt (Wang u. a. 2000). Mit GST-pulldown Experimenten wurde eine spezifische Interaktion von Trps1 mit dem C-Terminus von Gli3A (Aminosäuren 827-1580) nachgewiesen (Wuelling u. a. 2009). Dieser Teil von Gli3A beinhaltet die Transaktivatorodomäne (TAD), an welche das für die Transkriptionsaktivierung wichtige CBP (cAMP response element-Bindeprotein) und der Mediatorkomplex bindet (Dai u. a. 1999; Zhou u. a. 2006). Um die Interaktionsdomäne im C-Terminus von Gli3A zu bestätigen und gegebenenfalls weiter einzugrenzen, wurden Gli3A Konstrukte, die zu unterschiedlichen Teilen C-terminale Deletionen aufweisen, kloniert. Nach Coexpression der Gli3-Konstrukte zusammen mit Trps1Flag in HEK293-T Zellen wurden Co-IPs durchgeführt. Es wurde eine Interaktion von Trps1Flag mit Gli3Amyc, Gli3 Δ Cmyc und Gli3TDmyc nachgewiesen, jedoch keine Interaktion zwischen Trps1Flag und Gli3Cmyc - bzw. Gli3Rmyc. Diese Ergebnisse deuten auf eine spezifische Bindung von Trps1 an die TAD von Gli3A hin. Weitere Deletionen oder Punktmutationen in der TAD von Gli3 würden die Interaktionsdomäne weiter eingrenzen. Da die drei

Gli-Homologe in Vertebraten, Gli1, Gli2 und Gli3, hohe Strukturähnlichkeiten aufweisen, würden Interaktionsanalysen von Trps1 mit diesen Proteinen weiteren Aufschluss über die Regulation der Knochenentwicklung durch Trps1 und Gli-Proteine liefern.

Es wurde gezeigt, dass die Protein-Phosphatase 2A (PP2A) die zelluläre Verteilung des Trps1-Interaktionspartners HDAC4 reguliert (Li u. a. 2012). Hdac4 ist eine Histondeacetylase, die hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert ist. Im Zytoplasma bindet Hdac4 im phosphorylierten Zustand an das Chaperon 14-3-3 (Grozinger und Schreiber 2000). Pp2a kann Hdac4 dephosphorylieren, es wandert daraufhin im hypophosphorylierten Zustand in den Zellkern und reguliert die Genexpression durch Deacetylierung der Histone H3 und H4. Ob Pp2a einen ähnlichen Einfluss auf die Phosphorylierung und zelluläre Lokalisation von Trps1 im Vergleich zu seinem Interaktionspartner Hdac4 besitzt, muss in zukünftigen Studien gezeigt werden.

Durch die Mutation der NLS von Trps1 kann dieses nicht mehr in den Zellkern transportiert werden. So ist es im Zytoplasma zu finden und die in dieser Arbeit erhobenen Daten deuten daraufhin, dass die zytoplasmatische Lokalisation von Trps1 zu einem vermehrten Level an zytoplasmatischen Gli3A führt. So ist es möglich, dass zytoplasmatisches Trps1 ähnlich wie Hdac4 an ein Chaperon gebunden ist und durch direkte Interaktion mit Gli3A dessen Translokation in den Zellkern blockiert oder das Protein im Zytoplasma stabilisiert. Tatsächlich wurde eine Interaktion von Trps1 mit dem Chaperon Hsp90 bereits gezeigt (Pasdziernik 2012). Für die Stabilisierung Gli3As durch Trps1 in Abhängigkeit von dessen zellulärer Verteilung spricht die signifikante Anreicherung von Gli3A im Nukleus über das Zytoplasma nach Coexpression mit Trps1YFP, verglichen mit der Coexpression von Gli3A mit der zytoplasmatischen Trps1-Variante. Der Anteil an nuklearem Gli3A sinkt hingegen nur um 20% nach Trps1R952C-GFP Coexpression, somit ließ sich keine Beeinflussung des Kernimports von Gli3A durch die zytoplasmatische Anreicherung von Trps1 zeigen.

In der Vergangenheit wurde PP2A zudem als Regulator der nuklearen Lokalisation von Gli3 identifiziert (Krauss u. a. 2008). Aktivierung von PP2A führt zu einer vermehrten Lokalisation von GLI3 im Zytoplasma. Inhibition von PP2A hingegen resultiert in einem Anstieg an nuklearem GLI3. Die Anreicherung von GLI3 im Zellkern führt in HeLa-Zellen zu einer gesteigerten Expression des GLI3-Zielgens *CYCLIN D1*. Somit reguliert PP2A die Genaktivität von Hh-Zielgenen durch die

Beeinflussung der zellulären Lokalisation von GLI3. Dies geschieht aber nicht durch direkte Phosphorylierung von Gli3 durch PP2A, ein sekundärer Effekt führt zur Relokalisation von GLI3 (Krauss u. a. 2009). Inwieweit Pp2a die zytoplasmatische Proteininteraktion von Trps1R952C-GFP und Gli3Amyc beeinflusst, welche zu der Anreicherung von Gli3A im Zytoplasma führt, muss zukünftig untersucht werden.

Die Coexpression von Gli3Rmyc mit Trps1YFP sowie mit Trps1R952C-GFP führte zu keinem Unterschied in der nuklearen Anreicherung im Vergleich zum Zytoplasma oder im Vergleich zu DAPI. Vergleicht man diese Werte jedoch mit denen der eGFP-Leerkontrolle, so erkennt man bei der Normalisierung zu DAPI eine fünffache Anreicherung des Gli3R-Signals im Zellkern. In dieser Dissertation wurde bestätigt, dass Gli3R nicht direkt mit Trps1 interagiert, die Studien über die zelluläre Verteilung zeigen jedoch, dass Trps1 einen Einfluss auf das Level an nuklearem Gli3R innehat. Dies geschieht jedoch unabhängig von der zellulären Lokalisation von Trps1, somit ist ein Sekundäreffekt zu beobachten. Ob diese Verteilung abhängig von Pp2a ist, lässt sich nicht ausschließen, da in den vorausgegangenen Lokalisationsstudien nur die Verteilung der Vollängenform von Gli3, jedoch nicht die des C-terminal trunkierten Repressors untersucht wurde. In zukünftigen Studien sollte der beschriebene Effekt von Trps1 auf die Verteilung von Gli3A und Gli3R mit Zellfraktionierungen bestätigt werden.

Zwei bekannte Missensemutationen in *TRPS1* führen bei Patienten zu einem Aminosäureaustausch an der Position 592 (R zu C bzw. H) (Kaiser u. a. 2004). Patienten mit diesen Mutationen zeigen den Phänotyp des Tricho-Rhino-Phalangealen Syndrom des Typs I. Sowohl die Deletion, als auch eine Missensemutation in einem Allel von *TRPS1* führt zur Haploinsuffizienz und Ausprägung dieses Syndroms (Lüdecke u. a. 2001). Interessanterweise führen Missensemutationen in der GATA-DNA-Bindedomäne von *TRPS1* zu der Ausprägung von TRPS1 Typ III, welcher einen stärkeren Phänotyp aufzeigt als TRPS1 Typ I (Lüdecke u. a. 2001; Kobayashi u. a. 2002a). Somit ist sowohl die fehlende Dosis von TRPS1 im Zellkern, als auch die unterbundene DNA-Bindung von TRPS1 mit der GATA-Domäne verantwortlich für die Ausprägung des Phänotyps bei TRPS1-Patienten.

Eine nukleare Positionierung von Trps1 begünstigt die nukleare Verteilung des Interaktionspartners Gli3A. Wenn die Dosis von Trps1 im Zellkern verantwortlich für den korrekten Ablauf der Knochenentwicklung ist, ist es möglich, dass Trps1 Einfluss auf die Knochenbildung nimmt, indem es im Zellkern als Adapter-

protein die nukleare Verteilung von Transkriptionsfaktoren wie Gli3A oder von Chromatin-modifizierenden Faktoren wie Hdacs durch direkte Protein-Protein-Interaktion begünstigt und somit die Genregulation beeinflusst. Expressionsstudien von Gli3A-Zielgenen wie *Gli1* in Zellen mit Überexpression von Trps1 - bzw. der Trps1R952C NLS-Mutante würde den Einfluss der zellulären Trps1-Lokalisation auf die Expression von Hh-Zielgenen aufzeigen. Ob Trps1 einen Einfluss auf die nukleare Lokalisation von interagierenden Hdac-Proteinen hat, wird als Arbeitshypothese aktueller Experimente der AG Vortkamp untersucht.

5.2 ChIP-Seq identifiziert neue Zielgene von Gli3 und Trps1

Die Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren Gli3A und Trps1 in Chondrozyten ließ eine gemeinsame Funktion in der Genregulation von Knorpelzellen vermuten. Darum wurde mit Hilfe von ChIP und der neuen Technologie der Next-Generation-Sequenzierung nach gemeinsamen Zielgenen gesucht.

5.2.1 Etablierung der ChIP

Zwei Faktoren sind entscheidend für eine erfolgreiche ChIP: Die Wahl eines spezifischen Antikörpers mit hoher Affinität zum Antigen sowie die Verfügbarkeit von Gewebe oder Zellmaterial. Die genomweite vergleichbare Analyse von Trps1- und Gli3-DNA-Bindestellen wäre idealerweise in primären Chondrozyten beispielsweise der Gliedmaßenanlage der Maus auf endogenem Proteinlevel erfolgt. Testläufe mit unterschiedlichen Antikörpern führten im Vorfeld dieser Arbeit zu der Erkenntnis, dass kein kommerziell erwerbbarer Antikörper gegen Gli3 oder Trps1 zur ChIP geeignet war. Viele Antikörper zeigten im Western Blot unspezifische Hintergrundbanden und detektierten Gli3 oder Trps1 nicht durchgehend reproduzierbar. Da die Option von getaggtten Versionen der Proteine in Mäusen wie bei Vokes u. a. nicht bestand, wurden deshalb die einzelnen Transkriptionsfaktoren in getaggtter Version in eine Zelllinie eingebracht (Vokes u. a. 2008, 2007). Diese Methode hat den großen Vorteil, dass für alle Ansätze derselbe Antikörper verwendet werden konnte, was zu einer besseren Vergleichbarkeit der Datensätze beitrug.

In der Vergangenheit gab es einige Studien, in denen für die Durchführung der ChIP oder ChIP-Seq getaggtte Versionen von DNA-bindenden Proteinen in Zellen eingebracht wurden. Mazzoni u. a. entwickelten eine Methode, in der in ES-Zellen eingebrachte V5-getaggtte Konstrukte verwendet wurden, deren Expression

durch die Zugabe von Doxycyclin aktiviert werden konnte (Mazzoni u. a. 2011). Die Autoren verglichen ChIP-Seq-Datensätze von endogenem Olig2, in denen die ChIP mit einem anti-Olig2-Antikörper durchgeführt wurde, mit Datensätzen von Olig2V5-Zellen, in denen für die ChIP ein V5-Antikörper eingesetzt wurde. Ein Vergleich der Datensätze zeigte eine große Übereinstimmung der gebundenen Regionen, lediglich 0,2- bzw. 1,1% der Bindestellen zeigten Unterschiede in ihrer Anreicherung. Zudem wurden in beiden Datensätzen die übereinstimmende DNA-Bindemotive für Olig2 entdeckt. Zwischen den Faktoren Olig2 und Hoxc9 wurde bis dato noch keine Verbindung gezeigt. Der Vergleich des Olig2V5-Datensatzes mit einem ChIP-Seq-Datensatz von Hoxc9V5 zeigte eine spezifische Bindung der jeweiligen Faktoren an die für sie definierten DNA-Bindemotive sowie eine geringe Anzahl an gemeinsamen Peaks. Diese Studie demonstriert, dass die Verwendung von getagten Transkriptionsfaktoren für die ChIP-Seq eine gute Alternative zu der Präzipitation von endogenen Proteinen darstellt, da die Ansätze mit denen bei einer Verwendung von spezifischen Antikörper vergleichbar ist, aber Unterschiede zu Datensätzen anderer Proteine mit den selben Tags aufweisen.

Der in dieser Arbeit für die Präzipitation verwendete myc-Antikörper wurde im Vorfeld in unterschiedlichen Experimenten verwendet und getestet. So wurde in allen mit Retroviren infizierten ATDC5-Kulturen die Expression der Konstrukte mittels Western Blot nachgewiesen. Dafür wurde jeweils derselbe monoklonale anti-myc-Antikörper wie für die ChIP verwendet. Immunopräzipitationen mit myc-getagtem Gli3A und Gli3R führten stets zu einer spezifischen Anreicherung der Proteine, wenn die IP-Lysate mit einem myc-Antikörper detektiert wurden. Zusätzlich wurden infizierte Zellen mit Immunfluoreszenzfärbungen auf die zelluläre Verteilung der getagten Proteine hin untersucht. Die Färbungen zeigten eine zelluläre Verteilung der Proteine ähnlich der endogenen Transkriptionsfaktoren, was die Spezifität der Methode unterstreicht. Dabei ist es wichtig, dass die myc-Tag-Kontrolle im Vergleich zu den getagten Transkriptionsfaktoren eine ubiquitäre Verteilung innerhalb der Zellen zeigte und kein spezifisches Expressionsmuster. Tatsächlich zeigte der Kontroll-ChIP-Seq-Datensatz des myc-Tags eine gleichmäßige Verteilung der Tags auf dem Genom ohne hohe Anreicherungen, was darauf hinweist, dass weder der myc-Tag, noch der verwendete Antikörper zu Artefakten im Datensatz geführt haben.

Alle durchgeführten Kontrollen im Vorfeld der ChIP sind auch in den Richtlinien zu ChIP-Seq des ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements)-Konsortiums beschrieben (Landt u. a. 2012). Zusätzlich sprechen sich die Autoren für eine Kon-

trolle der Spezifität des Antikörpers durch Knockdown der Zielproteine durch Methoden wie siRNA gefolgt von Detektion mit dem spezifischen Antikörper in Western Blot aus. Da eine Analyse der myc-Kontrolle im Western Blot im Vergleich zu den getagten Transkriptionsfaktoren keine Proteinbanden lieferte, ist davon auszugehen, dass knockdown Experimente vergleichbare Ergebnisse liefern würden. Eine zusätzliche Kontrolle der Antikörperspezifität wäre die Analyse der immunpräzipitierten Zelllysate mit Massenspektrometrie. In diesem Experiment sollte bei Spezifität des Antikörpers das Zielprotein mit hoher Anreicherung durch Massenspektrometrie in den präzipitierten Proben gefunden werden.

5.2.2 Qualität des ChIP-Seq-Datensatzes

Die Qualität eines ChIP-Seq-Datensatzes kann auf unterschiedliche Arten untersucht werden. Einen ersten Eindruck über die Qualität vermittelt eine Mappingstatistik. Es ist daraus ersichtlich, dass ein Teil der sequenzierten Reads nicht auf dem Referenzgenom der Maus kartiert werden konnten. In der Kontrollsequenzierung mit dem myc-Tag konnten 80% der Reads nicht auf das Referenzgenom kartiert werden, bei den restlichen Ansätzen bewegt sich dieser Wert zwischen 30-50%. Dieses Problem tritt häufig bei geringen DNA-Mengen während der Generierung der Library auf, bei der an die präzipitierten DNA-Fragmente Adapter mit nicht genomischen Sequenzen ligiert werden, die mit komplementären Sequenzen auf der Oberfläche der Flow Cell hybridisieren. Liegen die Adapter nun im Überschuss vor, so können Selbstligationen auftreten. Werden diese Religanten nicht effektiv vor der Amplifikation der Library entfernt, so kommt es zu der Sequenzierung von reinen Adaptersequenzen, die dann als nicht kartierbar in der Mappingstatistik auftreten (Barski und Zhao 2009).

Die Reads der einzelnen Datensätze wurden mit FastQC auf ihre Qualität untersucht. Dabei fiel auf, dass die Qualität der 36bp Reads bei allen Ansätzen außer myc eine gute Qualität aufwies (Vergleiche Anlage). Die Analyse der Duplikationslevel hingegen zeigte, dass in allen Ansätzen die Sequenzen der Reads ein Duplikationslevel von 80-90% zeigten. Diese schwache Komplexität des Datensatzes ließ sich auch durch Visualisierung der Peaks mit IGV bestätigen. Oft kamen Reads in Blöcken vor und waren nicht ineinander verschachtelt. Da es sich bei diesen Blöcken wohl um PCR-Amplifikate handelte, wurden Duplikate aus den Datensätzen herausgerechnet, was die Anzahl der Reads von ca. $35-50 \times 10^6$ auf rund ein Zehntel verringerte. In den Richtlinien des ENCODE-Konsortiums ist ein Richtwert von

10×10^6 einfach gemappten Reads pro ChIP-Seq-Replikate angegeben, der vorliegende Datensatz beinhaltet nach Abzug der Replikate zwischen $2-4 \times 10^6$ einfach gemappte Reads. Somit ist die schwache Komplexität und das niedrige Taganreicherungslevel der in den vorliegenden Datensätzen ermittelten Peaks auf eine zu geringe DNA-Ausgangsmenge für die Durchführung der ChIP-Seq zurückzuführen ist.

Die Analyse des Gli3Rmyc-Datensatzes mit IGV ergab sehr wenige Peaks guter Qualität, sodass das Hauptaugenmerk der vergleichenden ChIP-Seq-Auswertung auf die Gemeinsamkeiten des Gli3Amyc- sowie Trps1myc-Datensätze gelegt wurde. Die DNA-Konzentration des Gli3Rmyc-Ansatzes war nach der Herstellung der Library am geringsten verglichen mit den weiteren Ansätzen, was zu der geringen Qualität dieses Datensatzes beigetragen hat.

Ein Faktor, der die Effizienz der ChIP bestimmt, ist die Häufigkeit des Auftretens von DNA-Proteinbindungen. Dabei ist nicht die Höhe der Expressionslevel, die durch Überexpression der Transkriptionsfaktoren angepasst wurde, ausschlaggebend, sondern die Häufigkeit und Affinität der Protein-DNA-Interaktion. Die Erhöhung der Menge an Startmaterial und der für die Präzipitation benötigten Beads und Antikörper erhöhte die Effizienz der qPCRs nach ChIP deutlich. Jedoch brachten diese Verbesserungen aufgrund der anhaltend geringen DNA-Mengen nicht den gewünschten Effekt für eine weitere Durchführung der ChIP-Seq. Weitere Verbesserungen der Methode, wie z.B. neue Anpassungen der eingesetzten Lysatmengen oder der Waschschriffe könnten helfen, die Effizienz der ChIP in Zukunft weiter zu verbessern.

Die Bindung von Gli3 an einen publizierten Enhancerbereich von *Gli1* (Vokes u. a. 2007) konnte mit qPCR nach ChIP sowie mit Analysen der Peakregionen mit IGV bestätigt werden. Im Gegensatz dazu konnten zuvor beschriebene direkte Bindungen von Gli3 z.B. in Promotorbereichen von *Gli1* (Dai u. a. 1999) nicht identifiziert werden. Auch dies könnte mit der schwachen Komplexität des ChIP-Seq Datensatzes zusammenhängen, sodass eine schwache DNA-Bindung nicht nachgewiesen werden konnte. Dieser Umstand könnte zudem für beschriebene Binderegionen von Trps1 zutreffen. Bindungen von Trps1 an GATA-Motive in Promotorbereichen von u.a. *Stat3*, *Pthlh*, *Sox9* oder *Ocn* konnte im vorliegenden Datensatz nicht bestätigt werden. In allen genannten Beispielen wurden unterschiedliche Zelltypen für den Nachweis der Bindung verwendet, somit könnte zudem eine zelltypspezifische Regulation von Trps1 vorliegen.

5.2.3 Motiv- und Positionsanalyse der DNA-Binderegionen

Zunächst wurden in den Sequenzen der 50 Peaks mit den höchsten Scores gemäß MACS nach angereicherten DNA-Bindemotiven gesucht. Das im Trps1-Datensatz angereicherte DNA-Bindemotiv TCTCCCA/TG/C zeigte keine Ähnlichkeit zu dem Bindemotiv der Gli3A- bzw. der Gli3Rmyc-Datensätze. Für Trps1 wurde in der Vergangenheit eine Bindung an GATA-Konsensussequenzen in Promotorbereichen beschrieben (Malik u. a. 2001), das in dieser Studie beschriebene DNA-Bindemotiv hingegen zeigte keine Ähnlichkeit zu dem GATA-Konsensusmotiv. Die Applikation MEME wies für Gli3Amyc und Gli3Rmyc ein sehr ähnliches DNA-Bindemotiv (CCTGTGTG/C) aus. Dieses Motiv zeigt keine erkennbaren Gemeinsamkeiten mit dem Gli-Konsensusmotiv (GACCACCCA) (Kinzler und Vogelstein 1990). Würde es sich jedoch um ein Artefakt handeln, würden die DNA-Binderegionen im Trps1myc-Datensatz ein ähnliches DNA-Bindemotiv angereichert sein, oder das Vorkommen der vier unterschiedlichen Basen wäre an allen Positionen gleich hoch und es könnte keine Motivanreicherung identifiziert werden. Die genomweite Analyse der Bindung von Gli3RFlag an DNA zeigte, dass das Gli-Bindemotiv nur in Regionen, die sich innerhalb von 2kb um die TSS befanden, signifikant angereichert war. Jene stellten jedoch nur 11% aller Binderegionen dar (Vokes u. a. 2008). Eingehende Analysen der DNA-Bindemotive brachte weitere, von dem Gli-Konsensusmotiv abgewandelte oder neue Motive hervor. Vokes u. a. erklärten das Auftreten neuer Bindemotive mit einem indirekten Mechanismus, z.B. einer Interaktion von Gli3 mit einem weiteren DNA-bindenden Faktor.

Das Auftreten von im Vergleich zu den beschriebenen Konsensussequenzen abweichenden Motiven lässt sich durch ein von Cooper u. a. beschriebenes Modell erklären. Demzufolge kann ein Faktor in vielen unterschiedlichen Zelltypen an ein bestimmtes Konsensusmotiv binden, zudem wird über die Interaktion mit gewebspezifischen Transkriptionsfaktoren eine zelltypspezifische Regulation der Genexpression unterstützt (Cooper u. a. 2007).

Das Vorkommen von den in EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)-Studien definierten abweichenden Gli- bzw. GATA-Bindemotiven in Datensätzen mit zu meist distal zu TSS gelegenen Bindemotiven ist zudem durch ein Modell der Genregulation, das auf unterschiedlichen Affinitäten der einzelnen Faktoren zu DNA-Bereichen beruht, zu erklären. So wurden in EMSA-Experimenten Motive mit der höchsten Affinität für den jeweiligen Transkriptionsfaktor beschrieben. Diese Motive befinden sich meist in proximalen Promotorbereichen, wo die Transkriptions-

faktoren mit einer hohen Affinität binden und die Genexpression regulieren. Die Bindung von Faktoren an entfernte *cis*-regulatorische Elemente, die zur Schlaufenbildung der DNA und Rekrutierung von weiteren Faktoren führt, ist ein Bestandteil der differentiellen Genregulation und dient der gewebsspezifischen Feinjustierung der Genaktivität. Diese These wird durch Studien unterstützt, in denen gezeigt wurde, dass ca. die Hälfte aller DNA-bindenden Proteine der Maus mehrere unterschiedliche DNA-Bindemotive erkennen können (Badis u. a. 2009).

Die Bindung von Transkriptionsfaktoren an von den Konsensussequenzen abweichenden Motiven kann somit durch mehrere Modelle erklärt werden (Abbildung 29). So kann durch Bindung eines weiteren DNA-assoziierten Faktors an entfernten DNA-Bereichen das Auftreten des spezifischen, als auch des Bindemotivs des Bin-

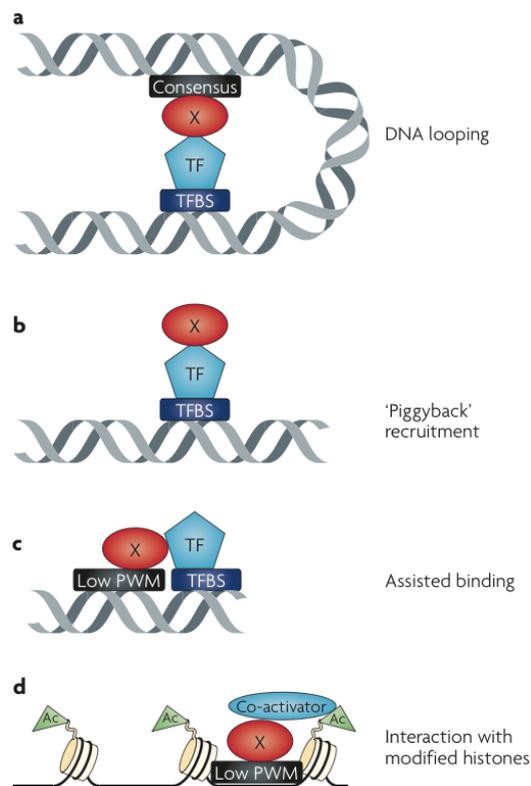


Abbildung 29: Modell der Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren an DNA-Bereiche ohne Konsensusmotiv. (a) Ein Transkriptionsfaktor (X) kann an sein Konsensusmotiv binden und durch Looping der DNA aufgrund von Protein-Protein-Bindungen mit weiteren Transkriptionsfaktoren (TF), welche an entfernte DNA-Bindestellen (TFBS) binden, interagieren. So kann durch Fixierung sowohl das eigene Bindemotiv, als auch das Motiv des Interaktionspartners identifiziert werden. (b) Alternativ kann eine Bindung des Faktor X an weitere Transkriptionsfaktoren ohne eigene DNA-Interaktion stattfinden. (c) & (d) Faktor X kann zusätzlich an Sequenzen, die eine schwache Affinität zu diesem Faktor besitzen, binden. Durch Protein-Protein Interaktionen mit einem benachbarten Transkriptionsfaktor (c), oder Bindung eines Co-Faktors und Anlagerung an modifizierte Histone (d) kann es zum erscheinen von Motiven mit schwacher Affinität zum Faktor X kommen (Farnham 2009).

departners annotiert werden (Abbildung 29(a)). Eine zweite These geht von einer Bindung an Transkriptionsfaktoren aus, ohne dass der untersuchte Faktor selber DNA-Interaktionen eingeht (Abbildung 29(b)). Des Weiteren kann die Entstehung neuer DNA-Bindemotive durch die Bindung des untersuchten Transkriptionsfaktors an DNA-Motive mit geringer Affinität sowie Protein-Protein-Interaktionen mit benachbarten DNA-bindenden Faktoren, welche mit höherer Affinität an den DNA-Bereich binden, erklärt werden. So könnte nach Fixierung des untersuchten Transkriptionsfaktors an den benachbarten Faktor ein DNA-Motiv mit der niedrigeren Affinität im ChIP-Seq Datensatz erscheinen (Abbildung 29(c)). Als weitere Alternative kann der Transkriptionsfaktor über einen Cofaktor an modifizierte Histone verankert werden, auch so könnten Bindestellen mit niedriger Affinität im Datensatz erscheinen (Abbildung 29(d)) (Farnham 2009).

Eine weitere Auffälligkeit in den vorliegenden Datensätzen ist die niedrige Bindehäufigkeit in der Nähe der TSS und das Auftreten der meisten Anreicherungen in einer Distanz von 50-500kb zum Transkriptionsstart. Bindungen von Transkriptionsfaktoren in Promoterbereichen dienen der Stabilisierung der generellen Transkriptionsfaktoren. Durch Looping der DNA und Protein-Protein-Interaktionen mit Faktoren, die distale Elemente binden, wird der Kontakt zwischen distalen *cis*-regulatorischen Enhancern und der Transkriptionsmaschinerie hergestellt (Farnham 2009). So wurde in einer genomweiten Analyse gezeigt, dass weniger als 10% aller getesteten humanen Transkriptionsfaktoren mehr als die Hälfte ihrer DNA-Bindungen innerhalb von 2,5kb zu den TSS binden. Somit ist eine präferenzielle Bindung von Gli3 und Trps1 an distale Elemente und das Auftreten der von den Konsensusmotiven abweichenden Bindesequenzen mit einer Funktion beider Faktoren in der Rekrutierung von *cis*-regulatorischen Elementen z.B. über die Bindung von Cofaktoren oder durch die Bindung an DNA-Motive mit niedrigerer Affinität zu erklären.

5.2.4 Bestätigung der Bindung von Gli3A und Trps1 an putative Bindestellen

Die mit MACS erstellten Binderegionen wurden mit GREAT auf Anreicherungen in verschiedenen Ontologien untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die gefundenen Annotationen der Gli3Amyc- und Trps1myc-Datensätze Übereinstimmungen mit bekannten Funktionen oder Expressionsgeweben zeigten. Die Analyse der Ontologien des Gli3Amyc Datensatzes resultierte in einer Vielzahl unterschiedlicher

biologischer Prozesse, darunter Annotationen über die Regulierung der Knorpelbildung und der Chondrozytendifferenzierung, was die Spezifität dieses Datensatzes hervorhebt. Daneben finden sich z.B. Annotationen über die Entwicklung von Zellpolaritäten oder Regulierung der Neurogenese. Gli3 reguliert die Etablierung der Dorso-Ventralachse des Neuralrohrs in Abhängigkeit von Shh, über die Rolle von Gli3A während der Etablierung der Zellpolaritäten in der Wachstumsfuge ist jedoch bis dato nichts bekannt. Unter den DNA-Binderegionen, welche für die Annotationen über die Knorpelbildung und Chondrozytendifferenzierung angezeigt wurden, befand sich u.a. der Transkriptionsfaktor *c-Maf*. Dieser Faktor ist in hypertrophen Chondrozyten exprimiert und reguliert die terminale Differenzierung von Knorpelzellen (MacLean u. a. 2003). Die Bindung von Gli3A an regulatorische Elemente dieses Gens wurde im Weiteren nicht verfolgt, wäre aber eine zusätzliche Option für zukünftige Studien.

Der Datensatz von Gli3Rmyc lieferte nur wenig angereicherte Annotationen der biologischen Prozesse, darunter jedoch zwei Annotationen über die Entwicklung der Niere. Dass Gli3R spezifisch die Anzahl der Nephronen reguliert, ist bekannt (Cain u. a. 2009), ob die Repressorform von Gli3 jedoch weitere spezifische Mechanismen während der Nierenentwicklung reguliert, ist nicht untersucht. Zudem wurden für *Sall1* im Gli3Rmyc Datensatz eine Vielzahl von putativen Bindestellen identifiziert. *Sall1* codiert für einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der, wenn mutiert, bei Menschen das Townes-Brocks Syndrom (TBS) hervorrufen kann, welches mit Defekten in der Entwicklung u.a. der Niere und der Gliedmaßen einhergeht (Kohlhase 2000). Kawakami u. a. zeigten, dass Gli3 Signale negativ die Expression von *Sall1* und *Sall3* in Phasen der frühen Gliedmaßenknospenentwicklung regulieren (Kawakami u. a. 2009). Die Analyse dieser Regulation durch Gli3R durch ChIP und qPCR sowie RNA-Analysen werden die Funktion von Gli3R in der Expression von *Sall1* aufzeigen.

Die Ontologie der angereicherten biologischen Prozesse im Trps1myc-Datensatz ließ keinen direkten Zusammenhang mit Knorpel- oder Knochenentwicklung erkennen, jedoch wurden Annotationen der Expressionsregionen- und organe mit angereicherten Bindestellen untersucht. Hierbei fanden sich zahlreiche Annotationen wie z.B. Expressionen im Axialskelett, im Knorpel der Bandscheiben oder im Humerus. Da Trps1 in diesen Strukturen exprimiert ist, wurden einige putative Bindestellen, welche den Genen *Col2a1*, *Fst*, *Pax1*, *Snai1* zugeordnet wurden, mit qPCR nach ChIP untersucht. Dabei konnte die Bindung für alle Kandidaten außer *Snai1* bestätigt werden.

Ebenso kann eine Bindung von Trps1myc an die Peakregion von *Sox9* (Sox9#3) nachgewiesen werden, ein weiterer Peak von *Sox9* (Sox9#4) wird jedoch nicht spezifisch gebunden. Da Sox9 sowohl die Kondensierung der mesenchymalen Anlagen, als auch die Differenzierung von Knorpelzellen reguliert, ist Sox9 ein Hauptregulator der Chondrozytendifferenzierung. Sox9 aktiviert u.a. die Expression von *Col2a1* in Chondrozyten (Bell u. a. 1997; Kawakami u. a. 2006). Fantauzzo u. a. zeigten, dass Trps1 spezifisch die Aktivität von *Sox9* in Stammzellen von Haarfollikeln reprimiert. Es wurde nachgewiesen, dass Trps1 den direkten Promterbereich von *Sox9* durch spezifische Bindung an GATA-Motive in HEK-293T-Zellen reguliert (Fantauzzo u. a. 2012). Diese Bindung konnte im ChIP-Seq Datensatz von Trps1myc nicht identifiziert werden, hingegen bindet Trps1 an einen distalen Bereich um *Sox9*, was auf eine zelltypspezifische Regulation dieses Gens von Trps1 durch direkte Bindung im Promotorbereich sowie über die Bindung an potentielle *cis*-regulatorische Elemente hindeuten würde. Die Expression des transkriptionellen Aktivators *Pax1* startet in den Chondrozytenvorläuferzellen des Mesoderms und bleibt während der Differenzierung bis zum prähypertrophen Stadium bestehen. Pax1 und Sox9 wirken bei der frühen Chondrozytendifferenzierung zusammen (Lefebvre und Smits 2005). Neben einer Bindung von Trps1 an einen *Sox9*-zugeordneten Bereich konnte durch qPCR nach ChIP eine Bindung -10kb von *Pax1* nachgewiesen werden. Ob diese Bindung zu einer Regulation dieser Gene führt und Trps1 so die frühe Chondrogenese durch Regulation von *Sox9* und *Pax1* beeinflusst, ist unklar und bleibt ein Ziel für weitere Studien. Zusätzlich wurden im Gli3Amyc- und Gli3Rmyc-Datensatz diverse Bindungen, welche mit dem Transkriptionsfaktor *Sox9* assoziiert wurden, angezeigt. Ob *Sox9* gemeinsam von Gli3 und Trps1 reguliert wird, ist eine interessante These für kommende Experimente.

In der Annotation des axialen Skelettes im Trps1myc-Datensatz finden sich drei potentielle Bindestellen, die dem Gen *Gtf2ird1* zugeordnet werden. Zudem ergab die vergleichende Analyse des Trps1myc-Datensatzes mit MACS und CCAT die Charakterisierung einer potentiellen Bindestelle zwischen *Gtf2i* und *Gtf2ird1* mit dem höchsten MACS-Score dieses Datensatzes. Die Bindung von Trps1myc an diesen Peak wurde durch qPCR nach ChIP bestätigt. *Gtf2ird1* und sein Paralogon *Gtf2i* sind generelle Transkriptionsfaktoren, aus einem Gen durch Duplikation und Divergenz entstanden und liegen auf dem Chromosom ca. 40kb auseinander (Makeyev u. a. 2004). Bei Patienten mit dem Williams-Beuren-Syndrom liegt ein hemizygoter Verlust des Chromosomenbereichs beider Gene vor, was zu einer Ausprägung

von charakteristischen Gesichtszügen, geistiger Behinderung und vermindertem Größenwachstum führt (Morris und Mervis 2000). Homozygoter Verlust von *Gtf2i* und *Gtf2ird1* ist in der Maus letal, heterozygoter Verlust beider Gene hingegen führt zu einem Phänotyp ähnlich des Williams-Beuren-Syndroms. Dabei zeigen die Tiere eine veränderte Entwicklung des Gehirns, kraniofaziale Defekte, ein vermindertes Größenwachstum sowie skeletale Defekte (Enkhmandakh u. a. 2009). In Osteoblasten wurde gezeigt, dass Gtf2i die Expression von Markern der Osteoblastendifferenzierung, der *alkalinen Phosphatase (ALP)* und *Osteocalcin (OCN)* spezifisch reguliert. Dabei agiert Gtf2i als Antagonist von Runx2, einem Hauptregulator der Knorpel- und Knochenentwicklung (Lazebnik u. a. 2009). Da Runx2 und Trps1 in überlappenden Domänen in der Knochenanlage exprimiert sind, auf Proteinebene interagieren und auch Trps1 als Regulator der *Osteocalcin*-Aktivität beschrieben wurde (Piscopo u. a. 2009), wäre eine Analyse der *Gtf2i*-Regulation durch Trps1 und der Funktion von Gtf2i in der Wachstumsfuge von großem Interesse. Erstmals wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von *Gtf2i* in Gliedmaßenanlagen untersucht. Es ergab sich eine spezifische *Gtf2i*-Expression in Zonen der distalen und kollumaren und eine schwächere Expression in den hypertrophen Chondrozyten. Diese Zone überlappt mit der Expressionszone von Trps1 in der Gliedmaßenanlage (Wuelling u. a. 2009). Somit wäre eine Aktivierung des Gens durch Trps1 möglich. Die Expression von *Gtf2i* in Osteoblasten kann durch die hohe Expression dieses Gens in der Verknöcherungszone bestätigt werden, dabei überlappen die Expressionsdomänen von *Gtf2i* und *Runx2* in der Gliedmaßenanlage (Guo u. a. 2006). Im Folgenden werden Luciferase-Experimente zeigen, ob die putative Enhancerregion eine regulatorische Aktivität besitzt. Daneben können qPCRs der cDNA von *Gtf2i* und *Gtf2ird1* in Trps1 Wildtyp- und Knockoutmäusen zeigen, ob die Expressionrate dieser Gene durch Trps1 reguliert ist. Die Expressionsdomänen von *Gtf2ird1* in der embryonalen Knochenanlage kann mittels *in situ* Hybridisierung untersucht werden, um herauszufinden, ob sich auch die Expressionsdomäne von *Gtf2ird1* mit Trps1 überschneidet.

5.2.5 Gli3A und Trps1 binden gemeinsam an regulatorische Elemente

Ein potentielle DNA-Binderegion 38kb upstream von *Col2a1* wurde sowohl über die Annotationen des axialen Skelettes sowie über den hohen MACS Score nach MACS und CCAT Analyse des Trps1myc-Datensatzes festgestellt. Die Analyse des Peaks mit IGV zeigte einen kleineren Peak für Gli3Amyc in der selben Region.

ChIP gefolgt von qPCR bestätigte eine Bindung von *Trps1myc* an diesen Bereich, wohingegen die Bindung von *Gli3A* nicht verifiziert werden konnte. Luciferaseexperimente ergaben eine regulatorische Aktivität dieser Region, die durch die Coexpression von *Trps1Flag* gesteigert wurde. *Col2a1* ist in Knorpelvorläuferzellen und in den Chondrozyten der Wachstumsfuge mit Ausnahme der hypertrophen Zone in Abhängigkeit von *Sox9* exprimiert und stellt eine funktionale Hauptkomponente der extrazellulären Matrix von Knorpelzellen dar (Zhao u. a. 1997; de Crombrughe u. a. 2000). Neben *Sox9* sind *Snai1* und *Slug* sowie *Wnt5a* als Regulatoren der *Col2a1*-Expression bekannt, durch Bindung an den Promotorbereich reprimieren sie die Expression von *Col2a1* in hypertrophen Chondrozyten (Seki u. a. 2003; Yang u. a. 2003). Da *Trps1* wie *Sox9* im Bereich der proliferierenden bis prähypertrophen Chondrozyten exprimiert ist, wäre eine kooperative Regulation von *Col2a1* durch Bindung von *Trps1* an *cis*-regulatorische Elemente sowie *Sox9* im Promoterbereich möglich. Ob jedoch *Trps1* als Adapterprotein agiert und *cis*-regulatorische Bereiche der DNA an Transkriptionsfaktorkomplexe heranbringt, ist eine Hypothese für nachfolgende Experimente.

Für einen Hauptregulator der enchondralen Knochenentwicklung, *Pthlh*, wurde eine gemeinsame Binderegion von *Gli3Amyc* und *Trps1Flag* 120kb downstream vom Transkriptionsstart identifiziert. *Pthlh* kontrolliert durch den *Ihh/Pthlh*-Feedbackloop die Differenzierung von proliferierenden in prähypertrophe Chondrozyten. Dabei aktiviert das in den prähypertrophen Chondrozyten vorhandene *Ihh* die Expression von *Pthlh* im distalen Bereich der Knorpelanlage. *Pthlh* im Gegenzug blockiert die hypertrophe Differenzierung von Knorpelzellen (Vortkamp u. a. 1996). Vorausgegangene Studien zeigten eine negative Regulation der *Pthlh*-Expression durch *Gli3R* in der Knochenanlage. Zusätzlich definieren *GliA*-Signale die Zone der *Pthlh*-Expression (Koziel u. a. 2005). Somit würde eine Bindung von *Gli3A* an regulatorische Elemente von *Pthlh* diese These unterstützen. Es konnte eine Bindung von *Trps1myc* und *Gli3Amyc* an den Peak +107kb von *Pthlh* durch qPCR nach ChIP nachgewiesen werden, dieses Fragment zeigt jedoch in Luciferase-Experimenten in HEK-293T-Zellen keine Aktivitätsänderung nach Coexpression beider Faktoren. Falls für die Regulierung der Aktivität des Fragments bestimmte, knorpelspezifische Cofaktoren notwendig sind, sollte die Wiederholung des Experiments in chondrogenen Zellen eine Veränderung der relativen *Pthlh*-Luciferaseaktivität zur Folge haben. Nishioka u. a. zeigten eine direkte Bindung von *Trps1* an zwei GATA-Motive im direkten Promotor von *Pthlh*, zudem detektierten sie in *Trps1* defizienten Mäusen einen Anstieg der *Pthlh*-mRNA per

RT-qPCR um das zweieinhalbfache. Dies wurde mit *in situ* Hybridisierungen der Knochenanlage bestätigt. Somit zeigten sie eine Inhibierung von *Pthlh* durch *Trps1* (Nishioka u. a. 2008). Diese Daten stehen jedoch im Widerspruch zu Experimenten der AG Vortkamp in denen gezeigt wurde, dass Verlust von *Trps1* zu einer Verkleinerung der *Pthlh*-exprimierenden distalen Zone führt (Wuelling u. a. 2009). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine Bindung von *Trps1* an *cis*-regulatorische Elemente in ATDC5-Zellen, eine Promotorbindung konnte nicht identifiziert werden. Die von Nishioka u. a. (2008) gezeigte Bindung von *Trps1* an GATA-Sequenzen des Promotors wurde im Gewebe des artikulären Knorples gezeigt, der sich auf Differenzierungsebene und somit in der Expression von zelltypspezifischen Faktoren stark von chondrogenen ATDC5 Zellen unterscheidet.

Die Regulation von *Pthlh* durch *cis*-regulatorische Elemente wird durch eine neue Studie gestärkt, in der eine Regulation von humanen *PTHLH* durch *cis*-regulatorische Elemente über eine Distanz von 24,4 Megabasen, die größte bisher gemessene Distanz zwischen einem Enhancer und dem von ihm regulierten Gen, gezeigt wird. Zudem wird im Bereich dieses Enhancers eine lange, nicht codierende RNA gebildet, die konzentrationsabhängig die Expression von *PTHLH* reguliert (Maass u. a. 2012). Diese Studie demonstriert die Bedeutung von *cis*-regulatorischen Elementen in der Genregulation während der enchondralen Ossifikation.

Neben dem *Ihh*-Signalweg wird die Entwicklung des Skelettes u. a. von den Mitgliedern der *Wnt*-Familie reguliert (Geetha-Loganathan u. a. 2008). Ein Vertreter dieser Familie ist *Wnt5a*. Mäuse mit Deletionen für *Wnt5a* fehlen in embryonalen Strukturen, wie z.B dem Schwanz, den Gesichtsknochen, der Zunge, oder den Vorder- und Hintergliedmaßen distale Elemente. So wurde gezeigt, dass sich *Wnt5a* als essenziell für die korrekte Bildung der proximo-distalen Achse der Gliedmaßenknospen erweist (Yamaguchi u. a. 1999). Yang u. a. fanden eine spezifische Expression von *Wnt5a* in der Grenzregion von proliferierenden zu prähypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge sowie in Bereichen des Perichondriums und des Periosts (Yang u. a. 2003). *Wnt5a*^{-/-} Embryonen weisen eine Reduzierung der Teilungsrates der proliferierenden Chondrozyten sowie eine Verzögerung der Chondrozytendifferenzierung auf. Dieser Phänotyp ist, wenn auch schwächer ausgeprägt, in *Trps1*^{Δgt/Δgt} Tieren zu finden (Wuelling u. a. 2009). In einem Bereich bis -2,3kb vor dem *Wnt5a* Transkriptionsstart wurden zwei potentielle Bindestellen für Gli3Amyc sowie ein Peak für *Trps1*myc gefunden. Eine Bindung von Gli3Amyc an die DNA-Sequenz des größeren, distalen Peaks konnte verifiziert werden, die Aktivierung der *Wnt5a* Promotoraktivität wurde in HEK-293T-Zellen durch *Trps1*Flag, je-

doch nicht für Gli3A bestätigt werden. Dagegen wurde *Wnt5a* in ATDC5-Zellen sowohl durch Trps1Flag, als auch durch Gli3Amyc aktiviert. Cotransfektion beider Konstrukte führte zu einer stärkeren Erhöhung der Promotoraktivität als im Vergleich zu den Einzeltransfektionen von Trps1Flag und Gli3Amyc. Dieses Ergebnis zeigt erstmals, dass Gli3A und Trps1 gemeinsam die Aktivität von Genen zelltypspezifisch in Chondrozyten regulieren können. Zu beachten ist jedoch, dass beide Faktoren nicht in überlappenden Bereichen des Promotors gebunden haben, dies wäre mit einer Schlaufenbildung der DNA um den Komplex der Transkriptionsfaktoren zu erklären. In weiteren Experimenten sollten weitere Bereiche der potentiellen Bindestellen mit ChIP bestätigt und auf das Vorkommen von Bindemotiven hin untersucht werden. Mutationen dieser Motive in den Luciferasekonstrukten könnten zeigen, ob die Bindung über diese Motive erfolgt und ob sie für die korrekte Aktivierung der Luciferaseaktivität notwendig sind.

5.3 Ausblick in die kooperativen Genregulation von Gli3A und Trps1

Neben der Funktion von Trps1 als Transkriptionsfaktor wurde Trps1 als spezifischer Interaktionspartner einiger Histondeacetylasen (Hdacs) beschrieben. Trps1 reguliert die Aktivität dieser Enzyme und fördert die Deacetylierungsrate von Histonen *in vitro* und *in vivo* (Pasdziernik 2012). Vergleichende ChIP-Seq-Analysen von Trps1, z.B. mit Histonmodifizierungen wie H3K9ac würde einen Einblick in den Mechanismus der Genregulation durch Trps1 auch auf epigenetischer Ebene gewährleisten. Dabei wäre es interessant zu erfahren, ob die Trps1-Binderegionen auf dem Genom bestimmte Methylierungs- oder Acetylierungsmuster aufweisen. Der Einfluss von Gli3 auf Histonmodifizierungen wurde bis dato nicht untersucht, ebenso fehlen Angaben zur Interaktion von Gli-Proteinen mit Hdacs. So wäre es vorstellbar, dass Gli3 wie Trps1 neben der spezifischen Genregulation auch auf epigenetischer Ebene Einfluss auf die Struktur des Chromatins nimmt und so die Aktivität von Genen beeinflusst.

Obwohl die Bindung und/oder Regulation von Gli3A und Trps1 an putative *cis*-regulatorische Enhancerregionen gezeigt werden konnte, bleiben einige Fragen offen. So beweist eine Bindung eines Transkriptionsfaktors an bestimmte DNA-Bereiche nicht die direkte Regulation eines nahegelegenen Gens, da regulatorische Elemente oft über Distanzen von Megabasen oder sogar auf anderen Chromosomen in die Genregulation eingreifen. Die Methoden der 3C (Chromosome Conformation Cap-

ture) oder 4C (Chromosome Conformation Capture-on-Chip) können die direkte Assoziation von *cis*-regulatorischen Elementen zu den durch sie regulierten Genen nachweisen, dies wäre ein wichtiger Anhaltspunkt um zu zeigen, welche Gene durch neu definierte *cis*-regulatorische Bereiche reguliert werden. Die Charakterisierung von *cis*-regulatorischen Elementen in Enhancer, Silencer oder Insulatoren kann u. a. durch die Durchführung von Luciferaseexperimenten erfolgen. Zudem könnten diese Experimente belegen, ob Gli3A und Trps1 an unterschiedliche DNA-Fragmente binden, auf Proteinebene Komplexe eingehen und so zu einer Konformationsänderung der DNA beitragen, oder ob sie benachbarte DNA-Motive als Komplex binden.

Daneben sind Experimente auf RNA-Ebene, in denen eventuelle Expressionsänderungen potentieller Zielgene in Überexpressions- oder knock-out-Experimenten untersucht werden, wichtig bei der Zuordnung von Binderegionen zu potentiellen Zielgenen. Die Analyse von putativen Enhancerbereichen mittels transgenen Embryonen, in denen die Aktivierung dieser Bereiche in Embryonen zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien mittels X-Gal-Färbungen untersucht werden kann, wäre sehr nützlich um die gewebsspezifische Regulation von Genen durch die spezifische Transkriptionsfaktoren Gli3 und Trps1 zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Im Zuge dieser Dissertation sollte die Interaktion der Transkriptionsfaktoren Gli3 und Trps1 in Chondrozyten untersucht werden. Zunächst wurde durch Co-IPs gezeigt, dass Trps1 an die TAD im C-Terminus des Gli3 Aktivators (Gli3A) bindet. Dieses Ergebnis zeigt somit eine spezifische Interaktion von Trps1 mit der Aktivatorform von Gli3, jedoch nicht mit dessen C-terminal trunkeierten Repressorform. Diese Interaktion hat auf zellulärer Ebene eine Beeinflussung der Lokalisation von Gli3A zur Folge. So ist nach Cotransfektion mit Trps1 das Level an Gli3A im Zellkern erhöht, Cotransfektion mit einer mutanten Form von Trps1, die nicht in den Zellkern transportiert werden kann, führt im Vergleich dazu zu einem erhöhten Level von Gli3A im Zytoplasma der Zelle. Dieser Effekt ist nach Cotransfektion der Trps1-Mutante mit Gli3R nicht zu beobachten, man erkennt jedoch ein erhöhtes Level von Gli3R im Zellkern nach Cotransfektion mit Trps1 verglichen mit einer Leervektorkontrolle. Dabei ist die zelluläre Verteilung von Trps1 nicht relevant, was für das Auftreten eines sekundären Effektes bei der Stabilisierung von Gli3 durch Trps1 spricht.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine vergleichende Analyse der DNA-Bindung von Gli3 und Trps1 mit Hilfe von ChIP-Seq durchgeführt. Zuerst erfolgte die retrovirale Infektion chondrogener ATDC5-Zellen mit myc-getaggten Formen von Gli3A, Gli3R und Trps1. Nach Etablierung der ChIP wurde präzipitiertes Chromatin für "Next-Generation Sequencing" verwendet. Aufgrund der Analyse potentieller Binderegionen der einzelnen Faktoren wurden neue putative DNA-Bindemotive von Gli3 und Trps1 entdeckt. Durch Analyse der Datensätze mit Hilfe von Ontolgien wurden einige potentielle Bindebereiche der Transkriptionsfaktoren, welchen zahlreichen Regulatoren der Chondrozytendifferenzierung zugeordnet werden konnten, beschrieben. Mit Hilfe von qPCR nach ChIP konnten einige spezifische Bindungen der Transkriptionsfaktoren an solche Bereiche bestätigt werden. Um die womögliche gemeinsame Bindung von Gli3A und Trps1 an regulatorische Bereiche des Chromatins zu überprüfen, wurden *Col2a1*, *Pthlh* und *Wnt5a* zugeordnete Bereiche auf die kooperative Bindung beider Faktoren hin untersucht. Zudem wurde mit Hilfe von Luciferase-Experimenten die regulatorische Aktivität potentieller Bindestellen festgestellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass Gli3A und Trps1 gemeinsam an ein dem Hauptregulator der Knorpeldifferenzierung in der Wachstumsfuge, *Pthlh*, zugeordnetes Element binden, die Aktivität dieses Elements jedoch nicht durch diese Faktoren reguliert werden kann. Trps1 bindet an ein Element

30kb vor der TSS von *Col2a1*, einem chondrozytenspezifischem Kollagen. Dieses Element zeigt in Luciferaseexperimenten eine Aktivierung im Vergleich zum Leervektor, diese Aktivität wird durch Coexpression von Trps1 gesteigert. Es konnte eine Bindung von Gli3A im Promotorbereich von *Wnt5a*, einem Mitglied der Familien der Wnt-Signalmoleküle und Regulator der Chondrozytendifferenzierung, gezeigt werden. Zudem beinhaltet der direkte Promotor eine potentielle Bindestelle für Trps1. In Luciferaseexperimenten konnte eine Aktivierung der Promotoraktivität durch Coexpression von Trps1 in HEK-293T-Zellen gezeigt werden. In chondrogenen ATDC5-Zellen hingegen wird die Promotoraktivität jeweils durch die Coexpression von Gli3A und Trps1 verstärkt, Coexpression von beiden Faktoren führt hierbei zu einem additiven Effekt. Somit stellt *Wnt5a* das erste gemeinsame Zielgen von Gli3A und Trps1 in Chondrozyten dar.

Zusätzlich konnte anhand der Analyse des Trps1 ChIP-Seq-Datensatzes erstmals die spezifische Expression von *Gtf2i*, einem putativen Trps1-Zielgen, in der embryonalen Knochenanlage der Maus gezeigt werden.

7 Abstract

Insights into the transcription factor interaction of Gli3 and Trps1 in chondrocytes

The multi-zinc-finger transcription factor Trps1 is known to cooperate with Indian hedgehog (Ihh)/Gli3 signaling to regulate chondrocyte differentiation and proliferation. Co-immunoprecipitation experiments conducted both *in vitro* and *in vivo* have demonstrated that Trps1 specifically interacts with the full length activator form of Gli3 (Gli3A) whereas the C-terminal truncated Gli3 repressor (Gli3R) form does not interact with Trps1.

In order to define the binding domain of Trps1 within Gli3A, co-immunoprecipitations with differently truncated Gli3A C-terminal deletion constructs of have been carried out. They resulted in a specific binding of Trps1 to the transactivation domain in the C-terminus of Gli3A.

On an cellular level, the direct interaction of Gli3A and Trps1 influences the sub-cellular localization of Gli3A in dependency of the cellular localisation of Trps1, as confirmed by localisation studies using fluorescence microscopy. In contrast, Trps1 stabilizes the nuclear localization of Gli3R independently of its cellular localization due to an by now unknown secondary effect.

In order to analyze the Gli3-Trps1 interaction on a genetic level, chromatin immunoprecipitations (ChIP) of Trps1- and Gli3-containing complexes were performed to identify genes transcriptionally targeted by Trps1 and Gli3 during endochondral ossification. Murine chondrogenic ATDC5 cells were infected with retroviruses carrying coding sequences for either myc-tagged fusions to Gli3A, Gli3R, the TRPS1 protein or the myc tag alone as negative control. Expression of the myc-tagged proteins was verified by immunofluorescence of the infected cells using an antibody against the myc tag and by western blot analysis. Chromatin extracts from ATDC5 cells ectopically expressing the myc-tagged proteins were immunoprecipitated using an antibody against the myc tag. Specificity of DNA binding by the transcription factors was investigated by qPCR using the isolated DNA and primers specific for the published Gli3 binding sites in enhancer fragments of target genes. Isolated chromatin after ChIP was used for ChIP-Seq using library preparation and sequencing technology of Illumina.

Careful analysis of the ChIP-Seq data of Trps1 revealed the binding of Trps1 to

a region associated with the transcription factor Gtf2i. The limb-specific expression of *Gtf2i* could be confirmed for the first time by *in situ* hybridisation in the developing limb.

Sequence analysis of the putative binding regions displayed the occurrence of yet unknown Gli3- and Trps1 DNA-binding motifs. Analysis of the datasets revealed a specific binding of Trps1 to an enhancer region 107kb upstream of *Pthlh*, which is a key regulator of Indian hedgehog signaling in the developing bone. Binding of Gli3A and Trps1 in the promoter of *Wnt5a*, a factor, which coordinates chondrocyte proliferation, could be verified by Luciferase experiments. Thereby a chondrocyte-specific activation of the *Wnt5a* promoter by Gli3A and Trps1 led to an additive enhancement of the luciferase activity after cotransfection of both factors.

8 Literatur

Agren u. a. 2004

AGREN, Marie ; KOGERMAN, Priit ; KLEMAN, Marika I. ; WESSLING, Martina ; TOFTGÅRD, Rune: Expression of the PTCH1 tumor suppressor gene is regulated by alternative promoters and a single functional Gli-binding site. In: *Gene* 330 (2004), Apr, S. 101–14

Ruiz i Altaba 1999

ALTABA, A Ruiz i: Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. In: *Development* 126 (1999), Jun, Nr. 14, S. 3205–16

Atsumi u. a. 1990

ATSUMI, T ; MIWA, Y ; KIMATA, K ; IKAWA, Y: A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells. In: *Cell Differ Dev* 30 (1990), May, Nr. 2, S. 109–16

Badis u. a. 2009

BADIS, Gwenael ; BERGER, Michael F. ; PHILIPPAKIS, Anthony A. ; TALUKDER, Shaheynoor ; GEHRKE, Andrew R. ; JAEGER, Savina A. ; CHAN, Esther T. ; METZLER, Genita ; VEDENKO, Anastasia ; CHEN, Xiaoyu ; KUZNETSOV, Hanna ; WANG, Chi-Fong ; COBURN, David ; NEWBURGER, Daniel E. ; MORRIS, Quaid ; HUGHES, Timothy R. ; BULYK, Martha L.: Diversity and complexity in DNA recognition by transcription factors. In: *Science* 324 (2009), Jun, Nr. 5935, S. 1720–3

Bailey u. a. 2006

BAILEY, Timothy L. ; WILLIAMS, Nadya ; MISLEH, Chris ; LI, Wilfred W.: MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. In: *Nucleic Acids Res* 34 (2006), Jul, Nr. Web Server issue, S. W369–73

Barski und Zhao 2009

BARSKI, Artem ; ZHAO, Keji: Genomic location analysis by ChIP-Seq. In: *J Cell Biochem* 107 (2009), May, Nr. 1, S. 11–8

Bell u. a. 1997

BELL, D M. ; LEUNG, K K. ; WHEATLEY, S C. ; NG, L J. ; ZHOU, S ; LING, K W. ; SHAM, M H. ; KOOPMAN, P ; TAM, P P. ; CHEAH, K S.: SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. In: *Nat Genet* 16 (1997), Jun, Nr. 2, S. 174–8

Cain u. a. 2009

CAIN, Jason E. ; ISLAM, Epshita ; HAXHO, Fiona ; CHEN, Lin ; BRIDGEWATER, Darren ; NIEUWENHUIS, Erica ; HUI, Chi-Chung ; ROSENBLUM, Norman D.: GLI3 repressor controls nephron number via regulation of Wnt11 and Ret in ureteric tip cells. In: *PLoS One* 4 (2009), Nr. 10, S. e7313

Cooper u. a. 2007

COOPER, Sara J. ; TRINKLEIN, Nathan D. ; NGUYEN, Loan ; MYERS, Richard M.: Serum response factor binding sites differ in three human cell types. In: *Genome Res* 17 (2007), Feb, Nr. 2, S. 136–44

Creyghton u. a. 2010

CREYGHTON, Menno P. ; CHENG, Albert W. ; WELSTEAD, G G. ; KOOISTRA, Tristan ; CAREY, Bryce W. ; STEINE, Eveline J. ; HANNA, Jacob ; LODATO, Michael A. ; FRAMPTON, Garrett M. ; SHARP, Phillip A. ; BOYER, Laurie A. ; YOUNG, Richard A. ; JAENISCH, Rudolf: Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010), Dec, Nr. 50, S. 21931–6

de Crombrughe u. a. 2000

CROMBRUGGHE, B de ; LEFEBVRE, V ; BEHRINGER, R R. ; BI, W ; MURAKAMI, S ; HUANG, W: Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. In: *Matrix Biol* 19 (2000), Sep, Nr. 5, S. 389–94

Dai u. a. 1999

DAI, P ; AKIMARU, H ; TANAKA, Y ; MAEKAWA, T ; NAKAFUKU, M ; ISHII, S: Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Mar, Nr. 12, S. 8143–52

Enkhmandakh u. a. 2009

ENKHMANKH, Badam ; MAKEYEV, Aleksandr V. ; ERDENECHIMEG, Lkhamsuren ; RUDDLE, Frank H. ; CHIMGE, Nyam-Osor ; TUSSIE-LUNA, Maria I. ; ROY, Ananda L. ; BAYARSAIHAN, Dashzeveg: Essential functions of the Williams-Beuren syndrome-associated TFII-I genes in embryonic development. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009), Jan, Nr. 1, S. 181–6

Erlebacher u. a. 1995

ERLEBACHER, A ; FILVAROFF, E H. ; GITELMAN, S E. ; DERYNCK, R: Toward a molecular understanding of skeletal development. In: *Cell* 80 (1995), Feb, Nr. 3, S. 371–8

Fantauzzo u. a. 2012

FANTAUZZO, Katherine A. ; KURBAN, Mazen ; LEVY, Brynn ; CHRISTIANO, Angela M.: Trps1 and its target gene Sox9 regulate epithelial proliferation in the developing hair follicle and are associated with hypertrichosis. In: *PLoS Genet* 8 (2012), Nov, Nr. 11, S. e1003002

Farnham 2009

FARNHAM, Peggy J.: Insights from genomic profiling of transcription factors. In: *Nat Rev Genet* 10 (2009), Sep, Nr. 9, S. 605–16

Geetha-Loganathan u. a. 2008

GEETHA-LOGANATHAN, Poongodi ; NIMMAGADDA, Suresh ; SCAAL, Martin: Wnt signaling in limb organogenesis. In: *Organogenesis* 4 (2008), Apr, Nr. 2, S. 109–15

Goetz und Anderson 2010

GOETZ, Sarah C. ; ANDERSON, Kathryn V.: The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. In: *Nat Rev Genet* 11 (2010), May, Nr. 5, S. 331–44

Graham u. a. 1975

GRAHAM, F L. ; ABRAHAMS, P J. ; MULDER, C ; HEIJNEKER, H L. ; WARNAAR, S O. ; DE VRIES, F A. ; FIERS, W ; VAN DER EB, A J.: Studies on in vitro transformation by DNA and DNA fragments of human adenoviruses and simian virus 40. In: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 39 Pt 1 (1975), S. 637–50

Grozinger und Schreiber 2000

GROZINGER, C M. ; SCHREIBER, S L.: Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000), Jul, Nr. 14, S. 7835–40

Guo u. a. 2006

GUO, Jun ; CHUNG, Ung-Il ; YANG, Dehong ; KARSENTY, Gerard ; BRINGHURST, F R. ; KRONENBERG, Henry M.: PTH/PTHrP receptor delays chondrocyte hypertrophy via both Runx2-dependent and -independent pathways. In: *Dev Biol* 292 (2006), Apr, Nr. 1, S. 116–28

Hall und Miyake 2000

HALL, B K. ; MIYAKE, T: All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. In: *Bioessays* 22 (2000), Feb, Nr. 2, S. 138–47

Hammerschmidt u. a. 1997

HAMMERSCHMIDT, M ; BROOK, A ; MCMAHON, A P.: The world according to hedgehog. In: *Trends Genet* 13 (1997), Jan, Nr. 1, S. 14–21

Hilton u. a. 2005

HILTON, Matthew J. ; TU, Xiaolin ; COOK, Julie ; HU, Hongliang ; LONG, Fanxin: Ihh controls cartilage development by antagonizing Gli3, but requires additional effectors to regulate osteoblast and vascular development. In: *Development* 132 (2005), Oct, Nr. 19, S. 4339–51

Huangfu und Anderson 2005

HUANGFU, Danwei ; ANDERSON, Kathryn V.: Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005), Aug, Nr. 32, S. 11325–30

Hui und Joyner 1993

HUI, C C. ; JOYNER, A L.: A mouse model of greig cephalopolysyndactyly syndrome: the extra-toesJ mutation contains an intragenic deletion of the Gli3 gene. In: *Nat Genet* 3 (1993), Mar, Nr. 3, S. 241–6

Hui und Angers 2011

HUI, Chi-Chung ; ANGERS, Stephane: Gli proteins in development and disease. In: *Annu Rev Cell Dev Biol* 27 (2011), S. 513–37

Jacenko u. a. 1993

JACENKO, O ; LUVALLE, P ; SOLUM, K ; OLSEN, B R.: A dominant negative mutation in the alpha 1 (X) collagen gene produces spondylometaphyseal defects in mice. In: *Prog Clin Biol Res* 383B (1993), S. 427–36

Kaiser u. a. 2004

KAISER, Frank J. ; BREGA, Paola ; RAFF, Michael L. ; BYERS, Peter H. ; GALLATI, Sabina ; KAY, Teresa T. ; ALMEIDA, Salomé de ; HORSTHEMKE, Bernhard ; LÜDECKE, Hermann-Josef: Novel missense mutations in the TRPS1 transcription factor define the nuclear localization signal. In: *Eur J Hum Genet* 12 (2004), Feb, Nr. 2, S. 121–6

Kaiser u. a. 2003

KAISER, Frank J. ; TAVASSOLI, Kamiab ; BEMD, Gert-Jan Van den ; CHANG, Glenn T G. ; HORSTHEMKE, Bernhard ; MÖRÖY, Tarik ; LÜDECKE, Hermann-Josef: Nuclear interaction of the dynein light chain LC8a with the TRPS1 transcription factor suppresses the transcriptional repression activity of TRPS1. In: *Hum Mol Genet* 12 (2003), Jun, Nr. 11, S. 1349–58

Kanno u. a. 2011

KANNO, Seiji ; GUI, Ting ; ITOH, Shunji ; GAI, Zhibo ; SUN, Yujing ; OIKAWA, Kosuke ; YOSHIDA, Munehito ; MURAGAKI, Yasuteru: Aberrant expression of the P2 promoter-specific transcript Runx1 in epiphyseal cartilage of Trps1-null mice. In: *Exp Mol Pathol* 90 (2011), Apr, Nr. 2, S. 143–8

Karsenty 2003

KARSENTY, Gerard: The complexities of skeletal biology. In: *Nature* 423 (2003), May, Nr. 6937, S. 316–8

Kaufman 1992

KAUFMAN, M.H.: *The atlas of mouse development*. London [etc.] : Academic Press, 1992

Kawakami u. a. 2006

KAWAKAMI, Yasuhiko ; RODRIGUEZ-LEÓN, Joaquín ; IZPISÚA BELMONTE, Juan C.: The role of TGFbetas and Sox9 during limb chondrogenesis. In: *Curr Opin Cell Biol* 18 (2006), Dec, Nr. 6, S. 723–9

Kawakami u. a. 2009

KAWAKAMI, Yasuhiko ; UCHIYAMA, Yukako ; RODRIGUEZ ESTEBAN, Concepcion ; INENAGA, Toshiaki ; KOYANO-NAKAGAWA, Naoko ; KAWAKAMI, Hiroko ; MARTI, Merce ; KMITA, Marie ; MONAGHAN-NICHOLS, Paula ; NISHINAKAMURA, Ryuichi ; IZPISUA BELMONTE, Juan C.: Sall genes regulate region-specific morphogenesis in the mouse limb by modulating Hox activities. In: *Development* 136 (2009), Feb, Nr. 4, S. 585–94

Kinzler und Vogelstein 1990

KINZLER, K W. ; VOGELSTEIN, B: The GLI gene encodes a nuclear protein

which binds specific sequences in the human genome. In: *Mol Cell Biol* 10 (1990), Feb, Nr. 2, S. 634–42

Kobayashi u. a. 2002a

KOBAYASHI, Hiromasa ; HINO, Megumu ; SHIMODAHIRA, Makiko ; IWAKURA, Toshio ; ISHIHARA, Takashi ; IKEKUBO, Katsuji ; OGAWA, Yoshihiro ; NAKAO, Kazuwa ; KURAHACHI, Hiroyuki: Missense mutation of TRPS1 in a family of tricho-rhino-phalangeal syndrome type III. In: *Am J Med Genet* 107 (2002), Jan, Nr. 1, S. 26–9

Kobayashi u. a. 2002b

KOBAYASHI, Tatsuya ; CHUNG, Ung-Il ; SCHIPANI, Ernestina ; STARBUCK, Michael ; KARSENTY, Gerard ; KATAGIRI, Takenobu ; GOAD, Dale L. ; LANSKE, Beate ; KRONENBERG, Henry M.: PTHrP and Indian hedgehog control differentiation of growth plate chondrocytes at multiple steps. In: *Development* 129 (2002), Jun, Nr. 12, S. 2977–86

Kohlhase 2000

KOHLHASE, J: SALL1 mutations in Townes-Brocks syndrome and related disorders. In: *Hum Mutat* 16 (2000), Dec, Nr. 6, S. 460–6

Koziel u. a. 2005

KOZIEL, Lydia ; WUELLING, Manuela ; SCHNEIDER, Sabine ; VORTKAMP, Andrea: Gli3 acts as a repressor downstream of Ihh in regulating two distinct steps of chondrocyte differentiation. In: *Development* 132 (2005), Dec, Nr. 23, S. 5249–60

Krauss u. a. 2008

KRAUSS, Sybille ; FOERSTER, John ; SCHNEIDER, Rainer ; SCHWEIGER, Susann: Protein phosphatase 2A and rapamycin regulate the nuclear localization and activity of the transcription factor GLI3. In: *Cancer Res* 68 (2008), Jun, Nr. 12, S. 4658–65

Krauss u. a. 2009

KRAUSS, Sybille ; SO, Joyce ; HAMBROCK, Melanie ; KÖHLER, Andrea ; KUNATH, Melanie ; SCHARFF, Constance ; WESSLING, Martina ; GRZESCHIK, Karl-Heinz ; SCHNEIDER, Rainer ; SCHWEIGER, Susann: Point mutations in GLI3 lead to misregulation of its subcellular localization. In: *PLoS One* 4 (2009), Nr. 10, S. e7471

Kunath u. a. 2002

KUNATH, Melanie ; LÜDECKE, Hermann-Josef ; VORTKAMP, Andrea: Expression of Trps1 during mouse embryonic development. In: *Mech Dev* 119 Suppl 1 (2002), Dec, S. S117–20

Laemmli 1970

LAEMMLI, U K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), Aug, Nr. 5259, S. 680–5

Landt u. a. 2012

LANDT, Stephen G. ; MARINOV, Georgi K. ; KUNDAJE, Anshul ; KHERADPOUR, Pouya ; PAULI, Florencia ; BATZOGLOU, Serafim ; BERNSTEIN, Bradley E. ; BICKEL, Peter ; BROWN, James B. ; CAYTING, Philip ; CHEN, Yiwen ; DESALVO, Gilberto ; EPSTEIN, Charles ; FISHER-AYLOR, Katherine I. ; EUSKIRCHEN, Ghia ; GERSTEIN, Mark ; GERTZ, Jason ; HARTEMINK, Alexander J. ; HOFFMAN, Michael M. ; IYER, Vishwanath R. ; JUNG, Youngsook L. ; KARMAKAR, Subhradip ; KELLIS, Manolis ; KHARCHENKO, Peter V. ; LI, Qunhua ; LIU, Tao ; LIU, X S. ; MA, Lijia ; MILOSAVLJEVIC, Aleksandar ; MYERS, Richard M. ; PARK, Peter J. ; PAZIN, Michael J. ; PERRY, Marc D. ; RAHA, Debasish ; REDDY, Timothy E. ; ROZOWSKY, Joel ; SHORESH, Noam ; SIDOW, Arend ; SLATTERY, Matthew ; STAMATOYANNOPOULOS, John A. ; TOLSTORUKOV, Michael Y. ; WHITE, Kevin P. ; XI, Simon ; FARNHAM, Peggy J. ; LIEB, Jason D. ; WOLD, Barbara J. ; SNYDER, Michael: ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia. In: *Genome Res* 22 (2012), Sep, Nr. 9, S. 1813–31

Lazebnik u. a. 2009

LAZEBNIK, Maria B. ; TUSSIE-LUNA, Maria I. ; HINDS, Philip W. ; ROY, Ananda L.: Williams-Beuren syndrome-associated transcription factor TFII-I regulates osteogenic marker genes. In: *J Biol Chem* 284 (2009), Dec, Nr. 52, S. 36234–9

Lefebvre und Smits 2005

LEFEBVRE, Véronique ; SMITS, Patrick: Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. In: *Birth Defects Res C Embryo Today* 75 (2005), Sep, Nr. 3, S. 200–12

Li u. a. 2012

LI, Jiali ; CHEN, Jianmin ; RICUPERO, Christopher L. ; HART, Ronald P. ; SCHWARTZ, Melanie S. ; KUSNECOV, Alexander ; HERRUP, Karl: Nuclear accumulation of HDAC4 in ATM deficiency promotes neurodegeneration in ataxia telangiectasia. In: *Nat Med* 18 (2012), May, Nr. 5, S. 783–90

Long u. a. 2001

LONG, F ; ZHANG, X M. ; KARP, S ; YANG, Y ; MCMAHON, A P.: Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. In: *Development* 128 (2001), Dec, Nr. 24, S. 5099–108

Lüdecke u. a. 2001

LÜDECKE, H J. ; SCHAPER, J ; MEINECKE, P ; MOMENI, P ; GROSS, S ; HOLTUM D von ; HIRCHE, H ; ABRAMOWICZ, M J. ; ALBRECHT, B ; APACIK, C ; CHRISTEN, H J. ; CLAUSSEN, U ; DEVRIENDT, K ; FASTNACHT, E ; FORDERER, A ; FRIEDRICH, U ; GOODSHIP, T H. ; GREIWE, M ; HAMM, H ; HENNEKAM, R C. ; HINKEL, G K. ; HOELTZENBEIN, M ; KAYSERILI, H ; MAJEWSKI, F ; MATHIEU, M ; MCLEOD, R ; MIDRO, A T. ; MOOG, U ; NAGAI, T ; NIIKAWA, N ; ORSTAVIK, K H. ; PLÖCHL, E ; SEITZ, C ; SCHMIDTKE, J ; TRANEBJAERG, L ; TSUKAHARA, M ; WITTEWER, B ; ZABEL,

B ; GILLESSEN-KAESBACH, G ; HORSTHEMKE, B: Genotypic and phenotypic spectrum in tricho-rhino-phalangeal syndrome types I and III. In: *Am J Hum Genet* 68 (2001), Jan, Nr. 1, S. 81–91

Maass u. a. 2012

MAASS, Philipp G. ; RUMP, Andreas ; SCHULZ, Herbert ; STRICKER, Sigmar ; SCHULZE, Lianne ; PLATZER, Konrad ; AYDIN, Atakan ; TINSCHERT, Sigrid ; GOLDRING, Mary B. ; LUFT, Friedrich C. ; BÄHRING, Sylvia: A misplaced lncRNA causes brachydactyly in humans. In: *J Clin Invest* 122 (2012), Nov, Nr. 11, S. 3990–4002

MacLean u. a. 2003

MACLEAN, Helen E. ; KIM, James I. ; GLIMCHER, Melvin J. ; WANG, Jinxi ; KRONENBERG, Henry M. ; GLIMCHER, Laurie H.: Absence of transcription factor c-maf causes abnormal terminal differentiation of hypertrophic chondrocytes during endochondral bone development. In: *Dev Biol* 262 (2003), Oct, Nr. 1, S. 51–63

MacLean und Kronenberg 2005

MACLEAN, Helen E. ; KRONENBERG, Henry M.: Localization of Indian hedgehog and PTH/PTHrP receptor expression in relation to chondrocyte proliferation during mouse bone development. In: *Dev Growth Differ* 47 (2005), Feb, Nr. 2, S. 59–63

Makeyev u. a. 2004

MAKEYEV, Aleksandr V. ; ERDENECHIMEG, Lkhamsuren ; MUNGUNSUKH, Ognoon ; ROTH, Jutta J. ; ENKHMANDAKH, Badam ; RUDDLE, Frank H. ; BAYARSAIHAN, Dashzeveg: GTF2IRD2 is located in the Williams-Beuren syndrome critical region 7q11.23 and encodes a protein with two TFII-I-like helix-loop-helix repeats. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004), Jul, Nr. 30, S. 11052–7

Malik u. a. 2001

MALIK, T H. ; SHOICHET, S A. ; LATHAM, P ; KROLL, T G. ; PETERS, L L. ; SHIVDASANI, R A.: Transcriptional repression and developmental functions of the atypical vertebrate GATA protein TRPS1. In: *EMBO J* 20 (2001), Apr, Nr. 7, S. 1715–25

Malik u. a. 2002

MALIK, Talat H. ; VON STECHOW, Dietrich ; BRONSON, Roderick T. ; SHIVDASANI, Ramesh A.: Deletion of the GATA domain of TRPS1 causes an absence of facial hair and provides new insights into the bone disorder in inherited tricho-rhino-phalangeal syndromes. In: *Mol Cell Biol* 22 (2002), Dec, Nr. 24, S. 8592–600

Mazzoni u. a. 2011

MAZZONI, Esteban O. ; MAHONY, Shaun ; IACOVINO, Michelina ; MORRISON, Carolyn A. ; MOUNTOUFARIS, George ; CLOSSER, Michael ; WHYTE, Warren A. ; YOUNG, Richard A. ; KYBA, Michael ; GIFFORD, David K. ;

WICHTERLE, Hynek: Embryonic stem cell-based mapping of developmental transcriptional programs. In: *Nat Methods* 8 (2011), Dec, Nr. 12, S. 1056–8

McLean u. a. 2010

MCLEAN, Cory Y. ; BRISTOR, Dave ; HILLER, Michael ; CLARKE, Shoa L. ; SCHAAR, Bruce T. ; LOWE, Craig B. ; WENGER, Aaron M. ; BEJERANO, Gill: GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. In: *Nat Biotechnol* 28 (2010), May, Nr. 5, S. 495–501

Metsäranta u. a. 1992

METSÄRANTA, M ; GAROFALO, S ; DECKER, G ; RINTALA, M ; CROMBRUGHE, B de ; VUORIO, E: Chondrodysplasia in transgenic mice harboring a 15-amino acid deletion in the triple helical domain of pro alpha 1(II) collagen chain. In: *J Cell Biol* 118 (1992), Jul, Nr. 1, S. 203–12

Mo u. a. 1997

MO, R ; FREER, A M. ; ZINYK, D L. ; CRACKOWER, M A. ; MICHAUD, J ; HENG, H H. ; CHIK, K W. ; SHI, X M. ; TSUI, L C. ; CHENG, S H. ; JOYNER, A L. ; HUI, C: Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. In: *Development* 124 (1997), Jan, Nr. 1, S. 113–23

Momeni u. a. 2000

MOMENI, P ; GLÖCKNER, G ; SCHMIDT, O ; HOLTUM, D von ; ALBRECHT, B ; GILLESSEN-KAESBACH, G ; HENNEKAM, R ; MEINECKE, P ; ZABEL, B ; ROSENTHAL, A ; HORSTHEMKE, B ; LÜDECKE, H J.: Mutations in a new gene, encoding a zinc-finger protein, cause tricho-rhino-phalangeal syndrome type I. In: *Nat Genet* 24 (2000), Jan, Nr. 1, S. 71–4

Morgenstern und Land 1990

MORGENSTERN, J P. ; LAND, H: Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. In: *Nucleic Acids Res* 18 (1990), Jun, Nr. 12, S. 3587–96

Morris und Mervis 2000

MORRIS, C A. ; MERVIS, C B.: Williams syndrome and related disorders. In: *Annu Rev Genomics Hum Genet* 1 (2000), S. 461–84

Mullis und Faloona 1987

MULLIS, K B. ; FALOONA, F A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: *Methods Enzymol* 155 (1987), S. 335–50

Napierala u. a. 2005

NAPIERALA, Dobrawa ; GARCIA-ROJAS, Xavier ; SAM, Kathy ; WAKUI, Keiko ; CHEN, Connie ; MENDOZA-LONDONO, Roberto ; ZHOU, Guang ; ZHENG, Qiping ; LEE, Brendan: Mutations and promoter SNPs in RUNX2, a transcrip-

tional regulator of bone formation. In: *Mol Genet Metab* 86 (2005), Nr. 1-2, S. 257–68

Nishioka u. a. 2008

NISHIOKA, Katsuhiko ; ITOH, Shunji ; SUEMOTO, Hiroki ; KANNO, Seiji ; GAI, Zhibo ; KAWAKATSU, Motohisa ; TANISHIMA, Hiroyuki ; MORIMOTO, Yoshifumi ; HATAMURA, Ikuji ; YOSHIDA, Munehito ; MURAGAKI, Yasuteru: Trps1 deficiency enlarges the proliferative zone of growth plate cartilage by upregulation of Pthrp. In: *Bone* 43 (2008), Jul, Nr. 1, S. 64–71

Pan u. a. 2006

PAN, Yong ; BAI, Chunyang B. ; JOYNER, Alexandra L. ; WANG, Baolin: Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. In: *Mol Cell Biol* 26 (2006), May, Nr. 9, S. 3365–77

Pasdziernik 2012

PASDZIERNIK, Markus: *Charakterisierung des Multi-Zinkfinger Transkriptionsfaktors Trps1 während der Chondrozyten Differenzierung*. 2012

Piscopo u. a. 2009

PISCOPO, Denise M. ; JOHANSEN, Eric B. ; DERYNCK, Rik: Identification of the GATA factor TRPS1 as a repressor of the osteocalcin promoter. In: *J Biol Chem* 284 (2009), Nov, Nr. 46, S. 31690–703

Rada-Iglesias u. a. 2011

RADA-IGLESIAS, Alvaro ; BAJPAI, Ruchi ; SWIGUT, Tomek ; BRUGMANN, Samantha A. ; FLYNN, Ryan A. ; WYSOCKA, Joanna: A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans. In: *Nature* 470 (2011), Feb, Nr. 7333, S. 279–83

Robertson u. a. 2007

ROBERTSON, Gordon ; HIRST, Martin ; BAINBRIDGE, Matthew ; BILENKY, Misha ; ZHAO, Yongjun ; ZENG, Thomas ; EUSKIRCHEN, Ghia ; BERNIER, Bridget ; VARHOL, Richard ; DELANEY, Allen ; THIESSEN, Nina ; GRIFFITH, Obi L. ; HE, Ann ; MARRA, Marco ; SNYDER, Michael ; JONES, Steven: Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing. In: *Nat Methods* 4 (2007), Aug, Nr. 8, S. 651–7

Ruiz-Perez u. a. 2007

RUIZ-PEREZ, Victor L. ; BLAIR, Helen J. ; RODRIGUEZ-ANDRES, M E. ; BLANCO, Maria J. ; WILSON, Amy ; LIU, Yu-Ning ; MILES, Colin ; PETERS, Heiko ; GOODSHIP, Judith A.: Evc is a positive mediator of Ihh-regulated bone growth that localises at the base of chondrocyte cilia. In: *Development* 134 (2007), Aug, Nr. 16, S. 2903–12

Salmon-Divon u. a. 2010

SALMON-DIVON, Mali ; DVINGE, Heidi ; TAMMOJA, Kairi ; BERTONE, Paul:

PeakAnalyzer: genome-wide annotation of chromatin binding and modification loci. In: *BMC Bioinformatics* 11 (2010), S. 415

Schimmang u. a. 1992

SCHIMMANG, T ; LEMAISTRE, M ; VORTKAMP, A ; RÜTHER, U: Expression of the zinc finger gene *Gli3* is affected in the morphogenetic mouse mutant extra-toes (*Xt*). In: *Development* 116 (1992), Nov, Nr. 3, S. 799–804

Seki u. a. 2003

SEKI, Kenji ; FUJIMORI, Toshihiko ; SAVAGNER, Pierre ; HATA, Akiko ; AIKAWA, Tomonao ; OGATA, Naoshi ; NABESHIMA, Yoichi ; KAECHOONG, Lee: Mouse Snail family transcription repressors regulate chondrocyte, extracellular matrix, type II collagen, and aggrecan. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Oct, Nr. 43, S. 41862–70

Soneoka u. a. 1995

SONEOKA, Y ; CANNON, P M. ; RAMSDALE, E E. ; GRIFFITHS, J C. ; ROMANO, G ; KINGSMAN, S M. ; KINGSMAN, A J.: A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. In: *Nucleic Acids Res* 23 (1995), Feb, Nr. 4, S. 628–33

Spitz und Furlong 2012

SPITZ, François ; FURLONG, Eileen E M.: Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. In: *Nat Rev Genet* 13 (2012), Sep, Nr. 9, S. 613–26

St-Jacques u. a. 1999

ST-JACQUES, B ; HAMMERSCHMIDT, M ; MCMAHON, A P.: Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. In: *Genes Dev* 13 (1999), Aug, Nr. 16, S. 2072–86

Varjosalo und Taipale 2008

VARJOSALO, Markku ; TAIPALE, Jussi: Hedgehog: functions and mechanisms. In: *Genes Dev* 22 (2008), Sep, Nr. 18, S. 2454–72

Visel u. a. 2009

VISEL, Axel ; BLOW, Matthew J. ; LI, Zirong ; ZHANG, Tao ; AKIYAMA, Jennifer A. ; HOLT, Amy ; PLAJSER-FRICK, Ingrid ; SHOUKRY, Malak ; WRIGHT, Crystal ; CHEN, Feng ; AFZAL, Veena ; REN, Bing ; RUBIN, Edward M. ; PENNACCHIO, Len A.: ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers. In: *Nature* 457 (2009), Feb, Nr. 7231, S. 854–8

Vokes u. a. 2007

VOKES, Steven A. ; JI, Hongkai ; MCCUINE, Scott ; TENZEN, Toyooki ; GILES, Shane ; ZHONG, Sheng ; LONGABAUGH, William J R. ; DAVIDSON, Eric H. ; WONG, Wing H. ; MCMAHON, Andrew P.: Genomic characterization of Gli-activator targets in sonic hedgehog-mediated neural patterning. In: *Development* 134 (2007), May, Nr. 10, S. 1977–89

Vokes u. a. 2008

VOKES, Steven A. ; JI, Hongkai ; WONG, Wing H. ; MCMAHON, Andrew P.: A genome-scale analysis of the cis-regulatory circuitry underlying sonic hedgehog-mediated patterning of the mammalian limb. In: *Genes Dev* 22 (2008), Oct, Nr. 19, S. 2651–63

Vortkamp u. a. 1991

VORTKAMP, A ; GESSLER, M ; GRZESCHIK, K H.: GLI3 zinc-finger gene interrupted by translocations in Greig syndrome families. In: *Nature* 352 (1991), Aug, Nr. 6335, S. 539–40

Vortkamp u. a. 1995

VORTKAMP, A ; GESSLER, M ; GRZESCHIK, K H.: Identification of optimized target sequences for the GLI3 zinc finger protein. In: *DNA Cell Biol* 14 (1995), Jul, Nr. 7, S. 629–34

Vortkamp u. a. 1996

VORTKAMP, A ; LEE, K ; LANSKE, B ; SEGRE, G V. ; KRONENBERG, H M. ; TABIN, C J.: Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. In: *Science* 273 (1996), Aug, Nr. 5275, S. 613–22

Wang u. a. 2000

WANG, B ; FALLON, J F. ; BEACHY, P A.: Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. In: *Cell* 100 (2000), Feb, Nr. 4, S. 423–34

Wuelling u. a. 2009

WUELLING, Manuela ; KAISER, Frank J. ; BUELENS, Laetitia A. ; BRAUNHOLZ, Diana ; SHIVDASANI, Ramesh A. ; DEPPING, Reinhard ; VORTKAMP, Andrea: Trps1, a regulator of chondrocyte proliferation and differentiation, interacts with the activator form of Gli3. In: *Dev Biol* 328 (2009), Apr, Nr. 1, S. 40–53

Wuelling und Vortkamp 2010

WUELLING, Manuela ; VORTKAMP, Andrea: Transcriptional networks controlling chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral ossification. In: *Pediatr Nephrol* 25 (2010), Apr, Nr. 4, S. 625–31

Xu u. a. 2010

XU, Han ; HANDOKO, Lusy ; WEI, Xueliang ; YE, Chaopeng ; SHENG, Jianpeng ; WEI, Chia-Lin ; LIN, Feng ; SUNG, Wing-Kin: A signal-noise model for significance analysis of ChIP-seq with negative control. In: *Bioinformatics* 26 (2010), May, Nr. 9, S. 1199–204

Yamaguchi u. a. 1999

YAMAGUCHI, T P. ; BRADLEY, A ; MCMAHON, A P. ; JONES, S: A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. In: *Development* 126 (1999), Mar, Nr. 6, S. 1211–23

Yang u. a. 2003

YANG, Yingzi ; TOPOL, Lilia ; LEE, Heuijung ; WU, Jinling: Wnt5a and

Wnt5b exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation. In: *Development* 130 (2003), Mar, Nr. 5, S. 1003–15

Zhang u. a. 2008

ZHANG, Yong ; LIU, Tao ; MEYER, Clifford A. ; EECKHOUTE, Jérôme ; JOHNSON, David S. ; BERNSTEIN, Bradley E. ; NUSBAUM, Chad ; MYERS, Richard M. ; BROWN, Myles ; LI, Wei ; LIU, X S.: Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). In: *Genome Biol* 9 (2008), Nr. 9, S. R137

Zhao u. a. 1997

ZHAO, Q ; EBERSPAECHER, H ; LEFEBVRE, V ; DE CROMBRUGGHE, B: Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. In: *Dev Dyn* 209 (1997), Aug, Nr. 4, S. 377–86

Zhou u. a. 2006

ZHOU, Haiying ; KIM, Seokjoong ; ISHII, Shunsuke ; BOYER, Thomas G.: Mediator modulates Gli3-dependent Sonic hedgehog signaling. In: *Mol Cell Biol* 26 (2006), Dec, Nr. 23, S. 8667–82

9 Anhang

In diesem Anhang sind Daten der Peakanalysen mit GREAT dargestellt. Für jeden Datensatz ist eine Tabelle biologische Prozesse oder Expressionsorgane aufgeführt, die nach der Analyse mit den Binom und Hyper Algorithmus signifikant angereichert waren. Binderegionen der Gruppen mit einem Hintergrund in der Knorpel- oder Knochenbiologie wurden einzeln dargestellt.

Tabelle 4: Darstellung der biologischen Prozesse, die nach Verwendung zweier Logarithmen im Gli3Amnc Datensatz angereichert sind.

Term Name	Binom				Hyper			
	Rank	Raw P-Value	Fold Enrichment	Observed Region Hits	Rank	Fold Enrichment	Observed Gene Hits	Total Genes
establishment of cell polarity	5	0,01366	3723992	27	126	2684503	13	33
cAMP-mediated signaling	6	0,023481	2317945	55	152	198397	23	79
branch elongation of an epithelium	7	0,029237	3585093	27	143	3975129	7	12
cyclic-nucleotide-mediated signaling	8	0,036045	2248551	57	148	1935939	25	88
axis elongation	9	0,049692	3490295	27	169	366935	7	13
establishment or maintenance of cell polarity	11	0,091317	2886342	34	69	2538738	19	51
negative regulation of cell development	18	0,080558	233882	42	124	213589	21	67
L-amino acid transport	21	0,919851	3737946	20	94	3259112	11	23
epithelial cell proliferation	25	0,000002	2625276	32	100	302867	12	27
negative regulation of neurogenesis	29	0,000002	2324205	39	117	2234265	20	61
regulation of heart contraction	31	0,000003	2020726	52	37	2495453	26	71
regulation of establishment of planar polarity	86	0,000075	4297403	11	168	4867505	5	7
regulation of cartilage development	102	0,000108	2104444	32	87	3145157	12	26
regulation of steroid metabolic process	109	0,000124	217974	29	120	2478003	16	44
relaxation of muscle	115	0,000141	4826637	9	73	6814507	5	5
spermatid nucleus differentiation	118	0,000156	4761466	9	106	511088	6	8
regulation of cellular carbohydrate catabolic process	138	0,000267	3701121	11	114	4336504	7	11
cell growth	141	0,000276	2046115	30	55	2697409	19	48
regulation of generation of precursor metabolites and energy	147	0,000331	2885623	15	137	3097503	10	22
relaxation of vascular smooth muscle	160	0,000484	4542277	8	128	6814507	4	4
regulation of chondrocyte differentiation	166	0,000527	2155759	24	172	3066528	9	20
regulation of steroid biosynthetic process	181	0,000727	2188028	22	90	2952953	13	30

Tabelle 5: Position der einzelnen Binderegionen in “Reglation of Cartilage Development“ des Gli3Amyc Datensatzes in Relation zur TSS der angegebenen Gene

Gen	Peak Position					
Bmp4	- 104016	- 319172				
Fgf18	+ 310742					
Maf	+ 817753	+ 661181	+ 21497	- 31784	- 44791	- 532127
Nog	+ 220697					
Pkdcc	- 53019					
Rarb	+ 84443					
Runx2	- 413610					
Shox2	+ 522301					
Smad1	- 14574					
Sox9	- 897780	- 847970	+ 8111	+ 56018	+ 66510	+ 82990
Thrb	- 346642	- 3411				
Wnt5a	- 768412	- 203011	- 83008	+ 185534	+ 450644	+ 478958

Tabelle 6: Position der einzelnen Binderegionen der Annotation “Regulation of Chondrocyte Differentiation“ des Gli3Amyc Datensatzes in Relation zur TSS der angegebenen Gene

Gen	Peak Position					
Bmp4	- 104016	- 319172				
Fgf18	+ 310742					
Fgf18	+ 310742					
Maf	+ 817753	+ 661181	+ 21497	- 31784	- 44791	- 532127
Pkdcc	- 53019					
Rarb	+ 84443					
Runx2	- 413610					
Shox2	+ 522301					
Sox9	- 897780	- 847970	+ 8111	+ 56018	+ 66510	+ 82990
Thrb	- 346642	- 3411				

Tabelle 7: Darstellung der biologischen Prozesse, die nach Verwendung zweier Logarithmen im Gli3Rmyc Datensatz angereichert sind.

Term Name	Binom				Hyper			
	Rank	Raw P-Value	Fold Enrichment	Observed Region Hits	Rank	Fold Enrichment	Observed Gene Hits	Total Genes
neuromuscular process controlling balance	25	0,900041	2748805	31	165	2589806	15	35
metanephros morphogenesis	48	0,000006	3435275	19	254	4028587	6	9
peptidyl-serine phosphorylation	54	0,000009	3092423	21	164	2805623	13	28
regulation of hormone metabolic process	69	0,000024	333511	17	100	4532161	9	12
re-entry into mitotic cell cycle	90	0,000052	7537111	7	220	6042881	4	4
embryonic digestive tract development	139	0,000261	2052881	30	152	3021441	12	24
developmental growth involved in morphogenesis	140	0,000264	2051804	30	238	2589806	12	28
kidney morphogenesis	174	0,00052	2199797	23	264	322287	8	15
regulation of cell shape	201	0,000848	2045858	25	273	2052299	18	53
peptidyl-serine modification	202	0,00085	2080662	24	171	2479131	16	39
positive regulation of peptidyl-threonine phosphorylation	223	0,00108	4005103	8	211	5035734	5	6
hindbrain morphogenesis	239	0,001304	2130533	21	238	2589806	12	28
regulation of peptidyl-threonine phosphorylation	246	0,001453	3469096	9	147	5179612	6	7

Tabelle 8: Position der einzelnen Binderegionen der Annotation “Developmental Growth involved in Morphogenesis“ des Gli3Rmyc Datensatzes in Relation zur TSS der angegebenen Gene

Gen	Peak Position							
Bmp4	- 207507							
Col9a1	+ 399359							
Esr1	- 91021	+ 4520						
Fgf10	+ 160594							
Fgfr2	- 234986	+ 263181						
Rdh10	+ 5543	+ 148533						
Robo1	- 979969	- 975869	+ 464983	+ 862864				
Sall1	- 885461	- 831175	- 745583	- 251023	- 149908	- 64008	- 22147	+ 2079
Sox9	+ 86412	+ 156618	+ 480649	+ 615333				
Tgfb1	+ 35245							
Wnt5a	- 456187	- 161347						
Wnt7b	+ 181956							

Tabelle 9: Darstellung der biologischen Prozesse, die nach Verwendung zweier Logarithmen im TrpSlmyc Datensatz angereichert sind.

Term Name	Binom				Hyper			
	Rank	Raw P-Value	Fold Enrichment	Observed Region Hits	Rank	Fold Enrichment	Observed Gene Hits	Total Genes
fatty acid biosynthetic process	7	0,000002	216938	46	320	1659457	33	94
regulation of protein ubiquitination	11	0,000007	2334307	35	158	2156148	26	57
positive regulation of angiogenesis	34	0,000042	2325194	29	321	2025831	18	42
establishment of endothelial blood-brain barrier	86	0,000391	4194367	9	364	3939116	5	6
positive regulation of protein ubiquitination	113	0,000804	2129494	23	225	236347	17	34

Tabelle 10: Darstellung der "MGI Expression", die nach Verwendung zweier Logarithmen im Trps1myc Datensatz angereichert sind.

Term Name	Binom				Hyper			
	Rank	Raw P-Value	Fold Enrichment	Observed Region Hits	Rank	Fold Enrichment	Observed Gene Hits	Total Genes
TS21 axial skeleton	8	0,000008	2009952	48	281	2275934	26	54
TS23 cornea;stroma	14	0,000025	4455635	12	682	3939116	5	6
TS21 vertebral cartilage condensation	16	0,000031	2560751	25	478	2545275	14	26
TS25 stomach	22	0,000053	2257332	30	267	2721571	19	33
TS23 humerus	63	0,000323	2056151	29	641	2205905	14	30
TS19 metencephalon; lateral wall;basal plate	71	0,000448	3477864	11	837	3376385	5	7
TS21 interventricular septum	73	0,000486	3226806	12	837	3376385	5	7

Tabelle 11: Position der einzelnen Binderegionen der Annotation “axial Skeleton“ des Trps1myc Datensatzes in Relation zur TSS der angegebenen Gene

Gen	Peak Position			
Adam12	- 314026	+ 85094		
Alk	+ 536818			
Arnt	- 18430			
Arnt2	+ 41738	+ 102915	+ 133475	
Col2a1	- 38098			
Cyp26a1	+ 203169			
Emilin3	- 48800	+ 10005		
Erg	- 148371			
Fbln1	+ 121826			
Fbln2	- 4036	+ 60985	+ 111949	+ 122172
Flnb	- 763564	- 525682	- 70850	
Foxa2	- 286657			
Fst	- 338715	- 50852		
Gtf2ird1	- 9801	+ 95553	+ 126571	
Inhba	- 229208			
Inhbb	- 16592	+ 99214	+ 217938	
Matn1	+ 313286	+ 412285	+ 559616	+ 874517
Neo1	+ 190293			
Pax1	- 108160			
Pdgfra	+ 412399			
Ror2	+ 220915			
Scara5	- 47103			
Snai1	- 25929			
Sox9	- 156115	+ 79500	+ 299258	+ 408360
Tgfbi	+ 87819			
Vhl	+ 994			

Tabelle 12: Position der einzelnen Binderegionen der Annotation “humerus expression“ des Trps1myc Datensatzes in Relation zur TSS der angegebenen Gene

Gen	Peak Position					
Bmp3	- 72480	- 48046				
Calcr	- 89282	+ 44883				
Col10a1	- 67899					
Col2a1	- 59801	+ 82928				
Fmod	- 72983					
Gpld1	+ 38875					
Matn1	+ 313286	+ 412285	+ 559616	+ 874517		
Nrp1	- 291279	- 159354				
Sox9	- 156115	+ 79500	+ 299258	+ 408360	+ 499986	+ 630106
Timp2	+ 19718					
Vegfa	+ 323086					
Wnt5a	- 809616	- 622743	+ 40699	+ 108448		
Wnt5b	- 98083					

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Andrea Vortkamp, die mir die Anfertigung meiner Doktorarbeit am Institut für Entwicklungsbiologie ermöglichte. Ich bedanke mich für die Unterstützung und Betreuung während meiner Doktorarbeit, anregende Diskussionen und Korrekturen des Dissertationsmanuskripts.

Frau Dr. Manuela Wüiling gilt zudem mein großer Dank für die vielen motivierenden Gespräche und für die praktische und methodische Betreuung meiner Projekte. Auch für die umfangreichen Korrekturen meiner Dissertation, sowie von zahlreichen Postern und Präsentationen gilt ihr mein Dank.

Meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Sven Rahmann, Corinna Ernst, Giorgio Galli und Dr. Hermann-Josef Lüdecke danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Frau Yvonne Krause gilt mein besonderer Dank für die exzellente Assistenz in der praktischen Durchführung zahlreicher Experimente gegen Ende meiner Doktorarbeit. Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei der restlichen, auch ehemaligen, Besetzung der AG Vortkamp für das gute Arbeitsklima in den letzten Jahren bedanken.

Als assoziiertes Mitglied im Graduiertenkolleg 1431 der DFG: “Transcription, Chromatin Structure and DNA Repair in Development and Differentiation“ durfte ich an zahlreichen Veranstaltungen, Tagungen und Workshops teilnehmen, dafür gilt der DFG mein besonderer Dank.

Mein Bruder Florian betreute geduldig meine ersten Schritte mit \LaTeX und war mir eine große Stütze in der Formatierung der Dissertationsschrift. Dafür gilt ihm mein großes Lob!

Ich habe das große Glück, von der Entscheidung für das Biologiestudium bis hin zum Abschluss der Promotion von meinen Eltern eine bedingungslose Unterstützung und Rückendeckung zu erfahren. Dafür möchte ich ihnen herzlich danken.

Zum Schluss danke ich meinem Freund Uli für die vielen aufbauenden Worte, Ratschläge und Motivation der letzten Jahre und dafür, dass er mich stets zuversichtlich in die Zukunft blicken lässt.

Publikationen

Schneider VA, Krause Y, Galli, G, Ernst, C, Rahmann, S, Vortkamp, A and Wülling, M: Gli3 and Trps1 cooperatively activate the Wnt5a promoter in chondrocytes (Manuskript in Bearbeitung).

Porten E, Seliger B, **Schneider VA**, Wöll S, Stangel D, Ramseger R, Kröger S.; J Biol Chem. 2010: The process-inducing activity of transmembrane agrin requires follistatin-like domains.

Poster:

Schneider et al., 2010: Identification of target genes of Trps1 and Gli3 transcription factors by ChIP-Seq. *Transcription, chromatin structure and DNA repair in development and differentiation, Essen, Deutschland*

Schneider et al., 2011: Revealing the function of Trps1/Gli3 activator interaction during endochondral ossification. *Joint Annual Retreat of the Graduiertenkolleg 1431 and the BIOME "Cell Biology and Genetics" Moduls, Dormagen/Zons, Deutschland*

Schneider et al., 2012: Analysis of Trps1/Gli3 activator interaction during endochondral ossification. *43rd Annual Conference of the German Genetics Society Annual Conference of GRK1431, Essen, Deutschland*

Vorträge:

Schneider, Verena 2013: Transcription factor analysis of Trps1 and Gli3 by ChIP-Seq. *Retreat des Graduiertenkollegs 1431 "Transkriptionskontrolle, Chromatinstruktur und DNA Reparatur in Entwicklung und Differenzierung", Ostbevern, Deutschland*

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Eidesstattliche Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Interaktionsanalyse der Transkriptionsfaktoren Gli3 und Trps1 in Chondrozyten“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Verena Schneider befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Ort, Datum

(Prof. Dr. Andrea Vortkamp)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Ort, Datum

(Verena Schneider)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Ort, Datum

(Verena Schneider)