

**Synpolydaktylie in Mensch und Maus:
Molekulargenetische Untersuchung von Polyalanin-
Expansionen**

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

**Eingereicht im
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin
Juli 2005**

**von
Dipl. Biol. Andrea Nicole Albrecht
geboren am 17.01.1975 in Frankfurt a. M.**

Disputation am 25.10.2005

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Mundlos

Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik

Ihnestr. 73, 14195 Berlin

Tel: 84131267

email: mundlos@molgen.mpg.de

2. Gutachter: Prof. Dr. Horst Kress

Freie Universität Berlin, Institut für Biologie

Entwicklungsgenetik II

Arnimallee 7, 14195 Berlin

Tel: 83856015

email: kress@zedat.fu-berlin.de

Inhaltsverzeichnis

1) EINLEITUNG	1
1.1) <i>Hox</i> -Gene	1
1.2) Regulation der <i>Hox</i> -Gene	2
1.3) Extremitätenentwicklung bei Wirbeltieren	3
1.4) Die Knochenentwicklung	6
1.5) Die Chondrozytendifferenzierung	7
1.6) Mutationen in <i>HOXD13</i>	8
1.7) Polyalanin-Expansionen	10
2) MATERIAL UND METHODEN	12
2.1) Allgemeine molekularbiologische Methoden	12
2.1.1) DNA-Isolation	12
2.1.2) RNA-Isolation	12
2.1.3) RT-PCR	12
2.2) Histologie und Skelettpräparationen	12
2.2.1) Paraffinschnitte	12
2.2.2) Plastikschnitte	13
2.2.3) Skelettpräparationen	13
2.2.4) Bestimmung der Teilungsrate	13
2.2.5) Bestimmung der Apoptose	14
2.3) In situ Hybridisierungen	14
2.3.1) Verwendete Sonden	14
2.3.2) Linearisierung der Sonden	15
2.3.3) Whole-Mount In situ Hybridisierung (WM-ISH)	15
2.3.4) ³³ P-ISH	16
2.4) Zellkulturmethoden	17
2.4.1) Klonierung der Konstrukte	17
2.4.2) Transfektion in COS-1 Zellen	20
2.4.3) Antikörperanalyse auf transfizierten COS-1 Zellen	21
2.4.4) Elektronenmikroskopie	22
2.4.5) Luciferase-Messung	22

2.5) Proteinbestimmung <i>in vivo</i>	22
2.5.1) Immunocytochemie auf Paraffinschnitten	22
2.5.2) Western Blot	23
2.5.3) Verwendeter Mausstamm	23
2.5.4) Genotypisierung der Mäuse durch PCR	24
2.6) Lösungen und Puffer	24
3.) ERGEBNISSE	25
<hr/>	
3.1) Phänotyp der <i>spdh</i> -Mausmutante	25
3.2) Expression von <i>Hoxd13</i> in der Maus	27
3.3) Expression anderer <i>Hox</i> -Gene im Autopod	29
3.4) Musterbildung, Knorpeldifferenzierung und Knochenentwicklung in den Vorderpfoten der <i>spdh</i> -Maus	31
3.4.1) Musterbildung und Kondensationen	31
3.4.2) Frühe Knorpeldifferenzierung	34
3.4.3) Späte Knorpeldifferenzierung und Knochenbildung	37
3.5) Proliferation der Chondrozyten	39
3.6) Apoptose der Chondrozyten	40
3.7) Klonierung der Konstrukte für die Zelltransfektion	41
3.8) Lokalisation des <i>Hoxd13</i> Proteins in der Zelle	43
3.9) Zeitverlauf der Aggregatbildung	45
3.10) Interaktion des mutierten <i>Hoxd13</i> -Proteins mit anderen Proteinen	45
3.11) Co-Lokalisation der <i>Hoxd13</i> -Aggregate mit Zellorganellen	46
3.12) Co-Lokalisation mit Hitze-Schock-Proteinen	48
3.13) Transkriptionsaktivität von wt und mutiertem <i>Hoxd13</i>	50
3.14) Proteinverteilung <i>in vivo</i>	52
3.15) Aggregatbildung in 3 weiteren Polyalanin-Mutationen	54
4) DISKUSSION	55
<hr/>	
4.1) Die synpolydactyly homolog (<i>spdh</i>) Maus als Tiermodell für SPD	55
4.2) Expression der <i>Hox</i> -Gene in der <i>spdh</i> -Maus	56
4.3) Knorpeldifferenzierung und Knochenentwicklung in der <i>spdh</i> -Maus	58
4.3.1) Musterbildung und Kondensation	58

4.3.2) Gelenkentwicklung	59
4.3.3) Knorpeldifferenzierung und Knochenentwicklung	61
4.3.4) Brachydaktylie in der spd ^h -Maus	61
4.4) Alanin-Expansionen in Hoxd13 führen zu Aggregatbildung	62
4.5) Hoxd13 Aggregate entstehen durch Fehlfaltung des mutierten Proteins	64
4.6) Alanin-Expansionen in Hoxd13 verringern die Transkriptionsaktivität	65
4.7) Proteindegradation und Lokalisation im Zytoplasma des mutierten Hoxd13-Proteins in der spd ^h -Maus	67
4.8) Alanin-Expansionen in 3 weiteren Genen führen zu Aggregatbildung	68
4.9) Ausblick	69
5) LITERATURVERZEICHNIS	71
6) ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	
6.1) Zusammenfassung	80
6.2) Summary	82
7) ANHANG	84
7.1) Publikationsliste	84
7.2) Abkürzungen	85
7.3) Danksagung	86
7.4) Lebenslauf	87
7.5) Selbständigkeitserklärung	88