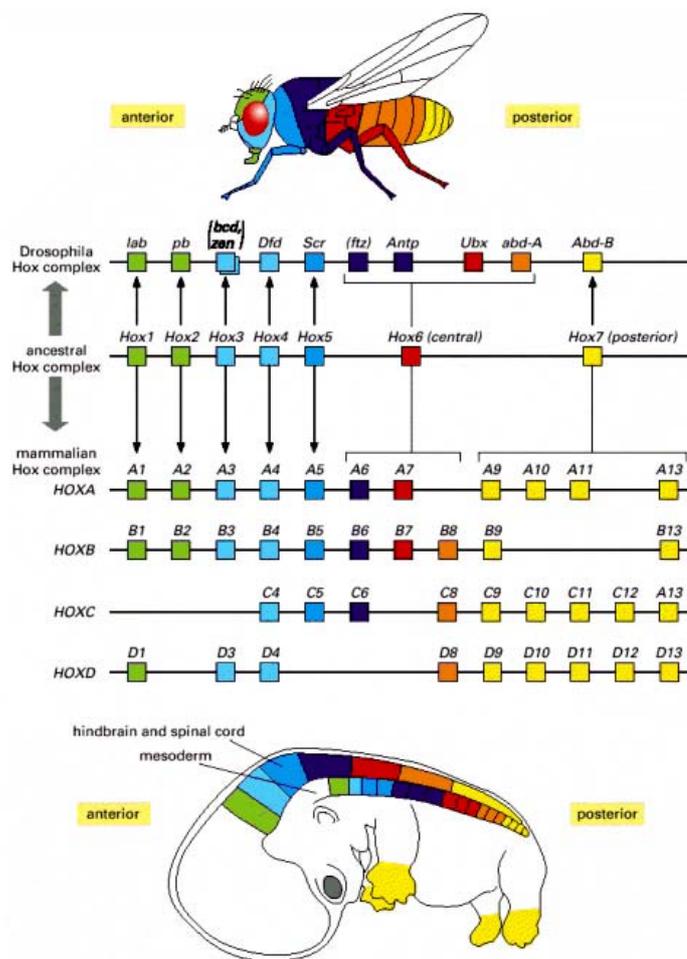


# 1) Einleitung

## 1.1) Hox-Gene

Die *Hox*-Gene gehören zu einer evolutionär hoch konservierten Gruppe von Genen. Sie alle besitzen die sogenannte Homeobox, eine 180 Basenpaar lange Sequenz, die ein DNA-Bindungs-Motiv kodiert, die Homeodomäne. Die Homeodomäne faltet sich in 3  $\alpha$ -Helices, wobei die dritte die DNA-Erkennungshelix darstellt. Innerhalb des Genoms sind die *Hox*-Gene in Clustern angeordnet. Bei *Drosophila* existiert 1 *Hox*-Cluster aus 8 Genen, die in 2 Gruppen eingeteilt werden können, den Antennapedia-Komplex (ANT-C) und den Bithorax-Komplex (BX-C). Säugetiere besitzen dagegen 4 *Hox*-Cluster (A-D) mit insgesamt 39 Genen (Abb.1). Es wird angenommen, dass diese 4 Cluster durch 2 oder 3 Duplikationsereignisse aus einem ursprünglich *Hox*-Cluster entstanden sind, aus dem sich auch das Cluster von *Drosophila* entwickelt hat. Dabei sind einzelne Gene innerhalb der Cluster verloren gegangen.



**Abbildung 1: Darstellung der Hox-Cluster in *Drosophila* und Säugetieren im Vergleich**

In der oberen Reihe sind die Gene des Clusters in *Drosophila* in ihrer Reihenfolge auf dem Chromosom dargestellt. Die vier unteren Reihen zeigen die korrespondierenden Gene der 4 Cluster der Säugetiere. Dazwischen ist das ursprüngliche *Hox*-Cluster dargestellt, aus dem sich die anderen Cluster entwickelt haben. In der Fliege wurde dieses Cluster in 2 getrennte Komplexe unterteilt, in den Antennapedia- und den Bithorax-Komplex. Während der Evolution der Wirbeltiere verdoppelte sich das Cluster mehrmals, so dass insgesamt 4 Cluster entstanden. Die Gene der Cluster lassen sich in 13 paraloge Gruppen einteilen. Die Expression der Gene ist vereinfacht durch Farben in Skizzen von Fliege und Säugetier entlang der primären Körperachse dargestellt und folgt dabei räumlich und zeitlich dem Prinzip der Kolinearität.

(Aus: Molecular Biology of the Cell)

Aufgrund der großen Ähnlichkeit lassen sich die *Hox*-Gene in 13 paraloge Gruppen unterteilen, die untereinander größere Sequenzähnlichkeiten besitzen als mit den Genen desselben Clusters.

Die *Hox*-Gene spielen in vielen Prozessen während der Entwicklung entscheidende Rollen, besonders bei der Festlegung der primären (Kopf zu Fuß) und sekundären (Genital und Extremitäten) Körperachsen. In *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass die *Hox*-Gene die Identität der Segmente bestimmen und damit, wo sich z. B. Antennen, Beine oder Flügel bilden. Mutationen in *Hox*-Genen bei *Drosophila* führen zu sogenannten homöotischen Transformationen einzelner Segmente. So führt z. B. die ektope Expression des Gens *Antennapedia* zur Bildung von Beinen anstelle von Antennen im Kopfsegment (Schnewly et al., 1987). Bei den Säugetieren sind sie bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems, des axialen Skeletts, des Gastrointestinal- und Urogenitaltrakts, der äußeren Genitalien und der Extremitäten von Bedeutung.

## 1.2) Regulation der *Hox*-Gene

Das Besondere der Regulation der *Hox*-Gene ist die Organisation ihrer Expression. Sie werden in einer zeitlichen und räumlichen Reihenfolge exprimiert, die ihrer Anordnung auf dem Chromosom entspricht. Man spricht hier von Kolinearität. So werden die Gene der 3`gelegenen paralogenen Gruppen früher und mehr anterior exprimiert und die 5`gelegenen später und in posterioren Bereichen (Krumlauf, 1994). Ihre Anordnung in Clustern spielt dabei wahrscheinlich eine entscheidende Rolle, um diese Art der Regulation zu ermöglichen. Wie genau diese kolineare Expression reguliert wird ist noch nicht eindeutig geklärt, man geht aber davon aus, dass sie durch einen Regulator außerhalb des Clusters gesteuert wird. Für den *HoxD*-Cluster wurden in den letzten Jahren 2 solche Kontrollregionen auf beiden Seiten des Clusters gefunden und beschrieben (Kmita et al., 2002; Spitz et al., 2003; Zakany et al., 2004). Die Gene des *HoxD*-Clusters spielen bei der Entwicklung der Extremitäten eine wichtige Rolle und ihre Regulation wurde dort am intensivsten untersucht.

Zu Beginn der Extremitätenentwicklung wird ihre Expression durch die „early limb control region“ (ELCR) gesteuert, die 3` vom Cluster liegt (Zakany et al., 2004). Die Expression folgt dabei dem Prinzip der Kolinearität, wobei der Abstand der Gene zu dieser Region eine Rolle bei der Stärke der Expression spielt. Nahe gelegene Gene (*Hoxd1-Hoxd3*) werden stark und in der ganzen Extremitätenknospe exprimiert, während weiter entfernte Gene (*Hoxd12* und *Hoxd13*) schwächer und nur im posterioren Bereich exprimiert werden.

Auf der anderen Seite des Clusters liegt die „global control region“ (GCR), die mehrere Enhancer beinhaltet, unter anderem einen „Digit Enhancer“, der die spätere Expression der 5'-gelegenen *Hoxd*-Gene (*Hoxd13-Hoxd10*) in der distalen Extremität, also dem Bereich, in dem sich die Finger bilden werden, reguliert (Spitz et al., 2003). Auch bei diesem Enhancer ist die Stärke der Expression vom Abstand der Gene abhängig, wodurch die Kolinearität umgekehrt wird (sog. reverse Kolinearität). *Hoxd13* zeigt nun die stärkste Expression und wird im kompletten distalen Bereich der Extremität exprimiert, während *Hoxd12* und *Hoxd11* deutlich schwächer und in einem kleineren Bereich exprimiert werden. Dass die Stärke der Expression abhängig vom Abstand des Gens zum Enhancer ist, konnte durch Inaktivierungs- und Deletionsexperimente in der Maus gezeigt werden (Kmita et al., 2002). Wird *Hoxd13* inaktiviert, ändert sich an der Expression der anderen Gene nichts. Wird *Hoxd13* aber durch loxP/Cre-Rekombination entfernt und dadurch der Abstand zwischen Enhancer und dem vor *Hoxd13* gelegenen Gen (*Hoxd12*) verkürzt, wird *Hoxd12* in der Domäne von *Hoxd13* exprimiert. Entfernt man zusätzlich auch *Hoxd12*, gleicht nun die Expression von *Hoxd11* der Expression von *Hoxd13*. Bei der Entwicklung der Extremitäten spielen also 2 gegensätzliche kolineare Prozesse eine Rolle, die die Expression der *Hoxd*-Gene regulieren.

### **1.3) Extremitätenentwicklung bei Wirbeltieren**

Die Entwicklung der Extremität beginnt mit dem Auswachsen einer Knospe an der Seite des Körpers. Diese Knospe besteht aus dem „Lateralplatten-Mesoderm“ (LPM) und dem darüber liegendem Ektoderm. Die mesenchymalen Zellen in der Knospe proliferieren und die Zellen im Zentrum kondensieren zu den Vorläufern der Skelettelemente. Diese Kondensationen wachsen kontinuierlich in proximal-distaler Richtung in die Länge. Die einzelnen Skelettelemente werden dabei durch die Entstehung der Gelenke voneinander getrennt. Dies geschieht ebenfalls von proximal nach distal, so dass zuerst das proximale Element, das Stylopodium (Oberarm) abgetrennt wird, als nächstes das Zeugopodium (Unterarm) und zum Schluss das distale Element, das Autopodium (Hand).

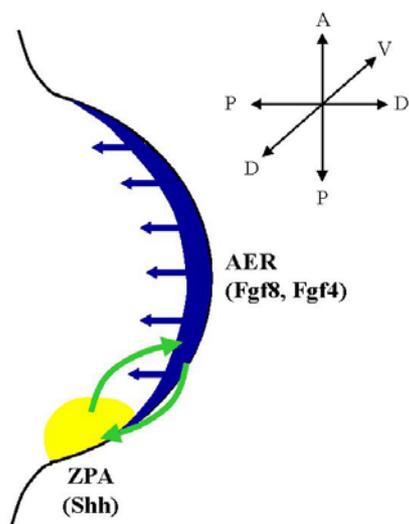
Während der Entwicklung der Extremität bilden sich 3 Achsen. Entlang ihrer proximal-distalen Achse (Schulter-Finger) verlängert sich die Extremität, sie wird entlang ihrer anterior-posterioren Achse asymmetrisch (Daumen-kleiner Finger) und entlang ihrer dorsal-ventralen Achse abgeflacht (Handrücken-Handflächen). Das Auswachsen und die

Musterbildung werden durch die Bildung und Erhaltung von 3 unterschiedlichen Signalzentren gewährleistet.

1.) Die „Apikale Ektodermale Randleiste“ (AER) entsteht im Ektoderm entlang des distalen Endes der Knospe oberhalb des LPM. Hier werden Fgfs (Fibroblast Growth Factors) sekretiert, die für das proximal-distale Wachstum der Extremität essentiell sind (vor allem Fgf8 und Fgf4).

2.) Die „Zone der Polarisierenden Aktivität“ (ZPA) entsteht im Mesenchym am posterioren Rand der Knospe. Hier wird das Signalmolekül *Sonic Hedgehog* (*Shh*) exprimiert, das für die Musterbildung entlang der anterior-posterioren Achse verantwortlich ist. Shh diffundiert aus der ZPA durch das Mesenchym und bildet einen Gradienten. Zwischen Shh und dem AER bildet sich dabei ein positiver Feedback-Loop (Abb.2).

3.) Das dorsale Ektoderm, das *Wnt7a* exprimiert, spielt bei der dorsal-ventralen Musterbildung eine Rolle (siehe Martin, 1998).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der frühen Extremitätenknospe mit den 3 Entwicklungsachsen**

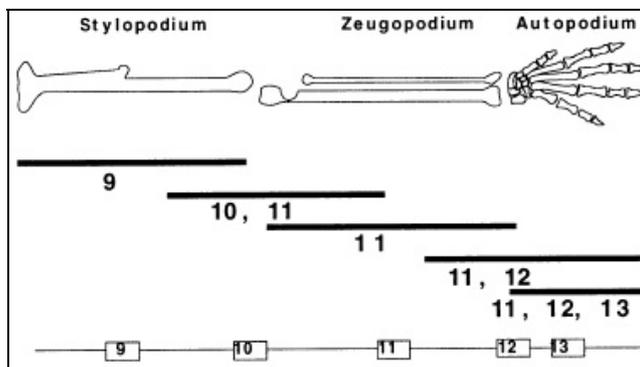
Die „Apikale Ektodermale Randleiste“ (AER) ist in blau dargestellt, von hier werden Fgf8 und Fgf4 sekretiert. Die „Zone der Polarisierenden Aktivität“ (ZPA) ist in gelb dargestellt, hier wird *Shh* exprimiert.

Zwischen dem AER und der ZPA besteht ein positiver Feedback-Loop (grüne Pfeile).

Shh erfüllt 2 Aufgaben innerhalb der Extremitätenknospe, die Festlegung der Anzahl und der Position, und damit der Identität, der Finger. Dabei wirkt Shh unter anderem durch den Transkriptionsfaktor Gli3, von dem es eine Aktivator- und eine Repressorform gibt. *Shh* verhindert die Prozessierung der Repressorform von Gli3 auf eine konzentrationsabhängige Weise. Dadurch entsteht ein Gradient der Aktivatorform von Gli3 im posterioren Bereich der Knospe, in dem die Zielgene exprimiert werden, während anterior die Repressorform die Aktivierung der Zielgene verhindert. Auf diese Weise entstehen zwei gegenläufige Gradienten von Gli3-Aktivator und Gli3-Repressor, die die Identität der Finger bestimmen.

Ein weiterer Faktor, der dabei eine Rolle spielt, sind die „*Bone Morphogenetic Proteins*“ (*Bmps*), die in der Extremität durch *Shh* induziert werden (siehe Tickle, 2003).

Wie bereits erwähnt, spielen während der Entwicklung der Skelettelemente der Extremitäten die 5`gelegenen *Hox*-Gene (9-13) der Cluster A und D entscheidende Rollen. Ihre Expression folgt dabei zunächst entlang der proximal-distalen Achse dem Prinzip der Kolinearität und wird durch die ELCR gesteuert. So werden die Gene der Gruppen 9 und 10 früher und in proximalen Bereichen der Extremität exprimiert, während die Gene der Gruppe 13 später nur in den distalen Bereichen exprimiert werden. Für die Entwicklung des Stylopodiums ist deshalb hauptsächlich die Gruppe 9 verantwortlich, für die des Zeugopodiums die Gruppe 11 und für die des Autopodiums die Gruppe 13 der *Hox*-Gene (Abb.3).



**Abbildung 3: Funktionelle Domänen der *Hox*-Gene 9-13 der Cluster A und D in der Extremität**

Die dicken Linien zeigen die Bereiche, die bei Mutationen der Gene 9-13 betroffen sind.

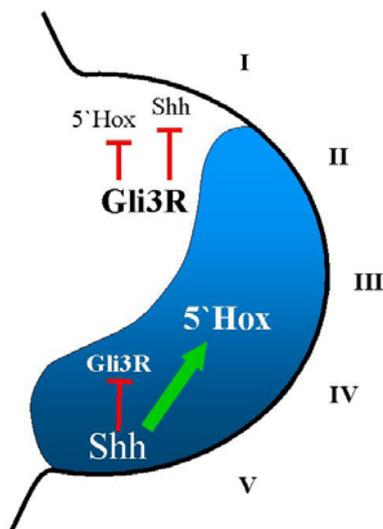
Die dünne Linie mit den Boxen zeigt, welche Gene bei der Spezifizierung der verschiedenen Bereiche der Extremität beteiligt sind.

(Aus Zakany und Duboule, 1999)

Die Rolle der *Hox*-Gene während der Entwicklung der Extremitäten wurde anhand der Knock-out Technologie in der Maus untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Inaktivierung einzelner Gene nur zu schwachen Phänotypen führt, die Inaktivierung paraloger Gene dagegen zum Verlust ganzer Skelettelemente. Durch die Inaktivierung von *Hoxa11* und *Hoxd11* zusammen kommt es z. B. zum kompletten Verlust von Radius und Ulna (Davis et al., 1995).

Die Entwicklung des Autopodiums wird vor allem durch die Gene *Hoxd11*, *Hoxd12*, *Hoxd13* und *Hoxa13* reguliert (Zakany und Duboule, 1996; Fromental-Ramain et al., 1996; Davis und Capecchi, 1996). Man findet die erste Expression von *Hoxd12* und *Hoxd13* früh im posterioren Bereich der Knospe, in Zellen, die später *Shh* exprimieren werden. Diese frühe Expression der 5`gelegenen *Hoxd*-Gene wird durch die ELCR gesteuert und ist ein entscheidender Faktor für die frühe Organisation der anterior-posterioren Asymmetrie der Extremität und bestimmt so die örtliche Aktivierung von *Shh* im ZPA. Sobald *Shh* posterior aktiviert wurde, kontrolliert es die Expression der 5`*Hoxd*-Gene durch den Digit Enhancer in

der GCR, die jetzt in reverser Kolinearität exprimiert werden (Abb.4). Shh fungiert somit als „molekularer Schalter“ zwischen kolinearer und revers-kolinearer Expression der *Hoxd*-Gene. Im anterioren Bereich der Knospe wird ihre Expression durch die Repressorform von Gli3 unterdrückt. Diese Kontrolle der *Hoxd*-Expression durch Shh ist ein entscheidender Faktor bei der Bestimmung von Anzahl und Identität der Finger (Zakany et al., 2004).



**Abbildung 4: Model für die Entstehung der anterior-posterioren Asymmetrie in der Hand**

Das Shh-Protein bildet einen Gradienten (blau) von posterior nach anterior und kontrolliert die Expression der 5'-*Hox*-Gene im distalen Bereich der Hand (grüner Pfeil). Gleichzeitig wird die Bildung der Repressorform von Gli3 (Gli3R) posterior unterdrückt (rote Balken). Anterior wird Gli3R gebildet und unterdrückt dort die Expression von *Shh* und den 5'-*Hox*-Genen (rote Balken). Die auf diese Weise entstehende Asymmetrie bestimmt die Identität der einzelnen Finger (I bis V).

#### 1.4) Die Knochenentwicklung

Man unterscheidet zwei Typen der Knochenentwicklung. Bei der desmalen Ossifikation differenzieren mesenchymale Zellen des Bindegewebes zu Osteoblasten und bilden den Knochen. Auf diese Weise werden die Kieferknochen, das Neucranium und ein Teil des Schlüsselbeins gebildet.

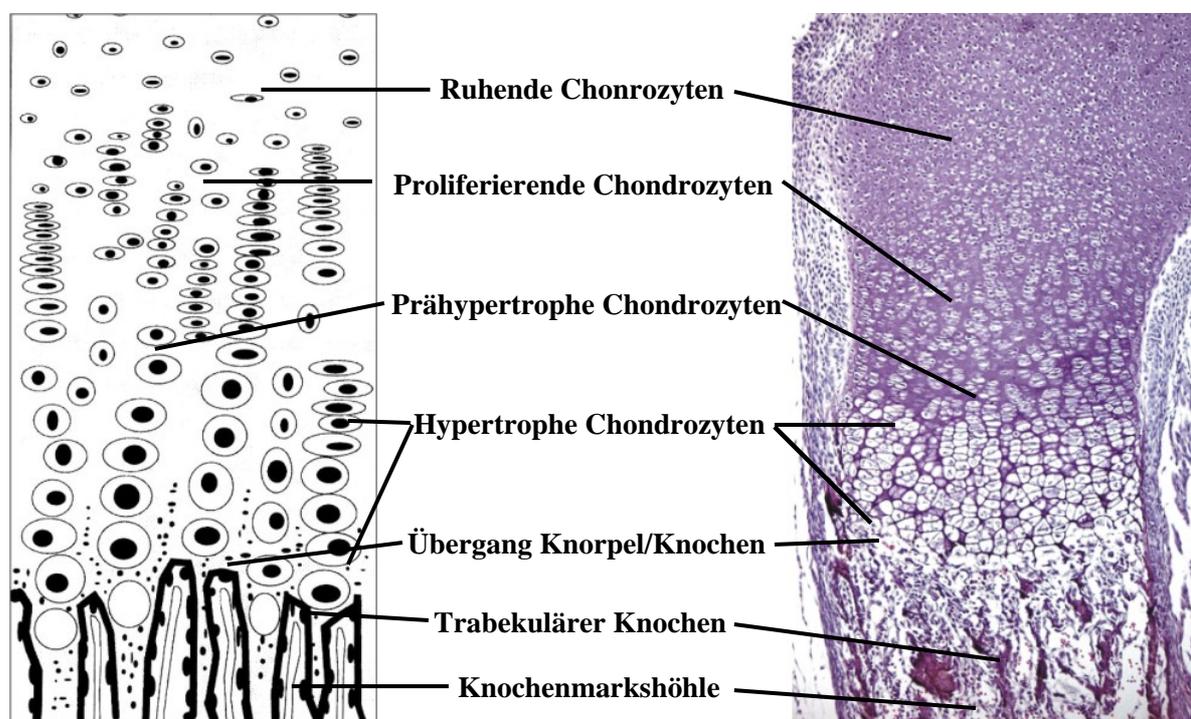
Bei der endochondralen Ossifikation wird dagegen zunächst Knorpel gebildet, der dann während der Entwicklung durch Knochen ersetzt wird. Durch diesen Prozess entsteht das gesamte axiale und appendikuläre Skelett sowie einige Knochen des Gesichtsschädels (siehe Erlebacher et al., 1995; Hall und Miyake, 2000).

Zu Beginn der endochondralen Ossifikation kondensieren mesenchymale Zellen zu Knorpelvorläuferzellen, den Chondroblasten. Diese differenzieren dann zu Knorpelzellen, den Chondrozyten, und bilden die Knorpelanlage. Die Zellen, die diese umgeben, werden zur Knorpelhaut, dem Perichondrium. Durch Proliferation und Rekrutierung weiterer Zellen aus dem umgebenden Mesenchym dehnt sich die Knorpelanlage aus. In der Mitte der Anlage beginnen schließlich die Chondrozyten zu differenzieren, wobei sie ihr Volumen deutlich vervielfachen. Man bezeichnet diese Zellen als hypertrophe Chondrozyten. Am Ende ihrer

Differenzierung produzieren diese Zellen unter anderem den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ( Schipani et al., 2001), ein Signalmolekül, durch das Blutgefäße angezogen werden (Risau, 1997). Zudem sezernieren sie Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die die Knorpelmatrix zersetzen. Die terminalen hypertrophen Chondrozyten werden schließlich apoptotisch und sterben. Von außen dringen nun Osteoklasten ein, die ebenfalls MMPs sezernieren und so die Knorpelmatrix noch weiter zersetzen. Auf diese Weise wird eine Höhlung geschaffen, die spätere Knochenmarkshöhle (Vu et al., 1998). In diese wandern Blutgefäße ein und ermöglichen es den Osteoblasten, in die Höhlung zu gelangen und dort den trabekulären Knochen aufzubauen. Das flankierende Perichondrium wird dabei zum Periosteum, welches den kortikalen Knochen bildet.

### 1.5) Die Chondrozytendifferenzierung

Das Wachstum der Skelettelemente wird hauptsächlich durch das Wachstum des Knorpels reguliert. Deshalb spielt die Proliferation und die Differenzierung der Chondrozyten eine zentrale Rolle bei der Kontrolle des Skelettwachstums. Jeder Schritt der Chondrozytendifferenzierung wird durch verschiedene Signalwege kontrolliert.



**Abbildung 5: Differenzierung des Knorpels und Übergang zum trabekulären Knochen.**

Die Abbildung zeigt links eine schematische Darstellung der Wachstumsfuge, rechts einen Hämatoxylin/Eosin-gefärbten Schnitt durch den proximalen Teil eines embryonalen Humerus am Tag E17.5. Die wesentlichen Schritte der Knorpeldifferenzierung und des Übergangs zum trabekulären Knochen sind angegeben.

Zunächst spielt der Transkriptionsfaktor Sox9 eine entscheidende Rolle, da er essentiell für die Kondensation der Chondrozyten aus mesenchymalen Zellen ist (Lefebvre et al., 1997; Bi et al., 1999). Weitere Faktoren, die bei der Bildung des Knorpels eine Rolle spielen, sind das Signalmolekül Gdf5, das zur *Tgfb*-Superfamilie gehört, und die Familie der „Bone Morphogenetic Proteins“ (Bmps). Die ruhenden Chondrozyten (Abb.5) beginnen schließlich zu proliferieren, ein Vorgang, der durch Signalmoleküle wie Fgfs, Bmps und Indian Hedgehog (Ihh) gesteuert wird (Naski, et al., 1998; St. Jacques et al., 1999; Minina et al., 2001). Schließlich endet die Phase der Proliferation und die Zellen beginnen zu differenzieren und werden hypertroph. Die Steuerung dieses Prozesses findet in der Zone der prähypertrophen Chondrozyten statt (siehe Abb.5). Diese Zellen exprimieren *Ihh*, das seinen Rezeptor Patched (Ptc) im anliegenden Perichondrium aktiviert (Vortkamp et al., 1996) und dadurch die Osteoblastendifferenzierung reguliert (St-Jacques et al., 1999). Zusätzlich diffundiert *Ihh* in die Gelenkregion und aktiviert dort das Signalmolekül Parathyroid Hormone-like Hormone (Pthlh) (Koziel et al., 2004), das durch die Wachstumsfuge zu seinem Rezeptor PTHR diffundiert. *PTHR* wird überlappend mit *Ihh* exprimiert und verhindert eine weitere Differenzierung der Chondrozyten. Dadurch wird auch indirekt die Expression von *Ihh* herunterreguliert. Durch diesen negativen Feedback Loop zwischen *Ihh* und Pthlh wird die Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten gesteuert (Vortkamp et al., 1996).

Welche Rolle die *Hox*-Gene bei der Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten spielen ist noch unbekannt. Die *spdh*-Mausmutante bietet aber eine gute Möglichkeit, zu untersuchen, inwieweit *Hox*-Gene bei diesen Prozessen beteiligt sind.

### **1.6 Mutationen in *HOXD13***

Die erste beschriebene Mutation in einem *Hox*-Gen ist die Synpolydaktylie (SPD, OMIM 186000), eine sehr seltene, dominant vererbte Fehlbildung der distalen Extremitäten (Muragaki et al., 1996). Patienten mit SPD haben eine Syndaktylie (Fusionen der Finger) zwischen den 3. und 4. Fingern und den 4. und 5. Zehen, sowie einen zusätzlichen Finger und Zeh (Polydaktylie). Zusätzlich findet man variabel Klinodaktylie (Schiefstellung der Fingerglieder), Camptodaktylie (Verkrümmung der Finger) und/oder Brachydaktylie (Verkürzung der Finger) des 5. Fingers, sowie Syndaktylie und Brachydaktylie vom 2. bis 5. Zeh mit Hypoplasie (Unterentwicklung) oder Fehlen der mittleren Phalangen. Unvollständige Penetranz und eine hohe Variabilität kennzeichnen den Phänotyp. Bei der

Mutation handelt es sich um eine Expansion des N-terminalen Alanin-kodierenden Repeats im 1. Exon von *HOXD13*, der in den Patienten um +7, +8, +9, +10 oder +14 Alanin-Codons verlängert ist (Akarsu et al., 1996; Baffico et al., 1997; Goodman et al., 1997; Kjaer et al., 2002). Da der Alanin-kodierende Repeat aus 4 unterschiedlichen Codons besteht (GCA, GCC, GCG, GCT) und die Expansionen meiotisch stabil sind, geht man davon aus, dass die Expansionen durch ungleiches Crossing-over bei der Replikation entstanden sind (Warren, 1997). Die Länge der Expansion korreliert dabei mit der Penetranz und der Schwere des Phänotyps (Goodman et al., 1997). Diese Genotyp/Phänotyp Korrelation wird auch in den seltenen homozygoten SPD-Fällen beobachtet (Muragaki et al., 1996; Akarsu et al., 1995) (Abb.6).



**Abbildung 6: SPD-Phänotypen beim Menschen**

Abhängig von der Länge der Alanin-Expansion findet man Syndaktylie, Synpolydaktylie, Synpolydaktylie mit Brachydaktylie und bei homozygot-betroffenen Patienten Brachydaktylie mit Hypodaktylie (Fehlen von Fingern/Zehen).

Die Zunahme der Penetranz und der Schwere des Phänotyps mit einer Zunahme der Länge der Expansion deutet auf einen steigenden Funktionsgewinn des Proteins. Man geht davon aus, dass das mutierte Protein normal an die DNA bindet, aber Interaktionen des N-terminalen Bereichs mit anderen Proteinen möglicherweise gestört werden. Auf diese Weise entsteht ein dominant-negativer Effekt, da DNA-Bindungsstellen vom mutierten Protein besetzt werden, die Regulation der Zielgene aber verhindert wird oder verändert ist.

Diese Theorie wird durch Untersuchungen an Mäusen unterstützt. Hier führt die Deletion des 5'-Endes des *Hoxd*-Clusters, durch die die Gene *Hoxd11*, *Hoxd12* und *Hoxd13* entfernt werden, homozygot zu einem SPD-ähnlichen Phänotyp (Zakany und Duboule, 1996).

Es wurden bisher noch 5 weitere Mutationen in *HOXD13* beschrieben, die zu Fehlbildungen der Extremitäten führen. Bei 3 handelt es sich um Deletionen innerhalb des *HOXD13*-Gens, durch die trunkierte Proteine entstehen, denen die Homeodomäne komplett oder fast

komplett fehlt. Diese Deletionen führen zu einer untypischen Form der SPD mit sehr niedriger Penetranz und einer zusätzlichen Fuß-Fehlbildung, die in SPD-Patienten nicht vorhanden ist (Goodman et al., 1998; Calabrese et al., 2000). Alle Deletionen führen zu einem inaktiven Protein, da sie nicht an DNA binden können.

Bei einer weiteren Mutation handelt es sich um eine Missense-Mutation in Exon 2. Auch bei dieser Mutation findet man die zusätzliche Fuß-Fehlbildung der Deletions-Mutationen und die Penetranz des SPD-Phänotyps ist gering (Debeer et al., 2002). Diese Missense-Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch (R31W) in der II. Helix der Homeodomäne, wodurch wahrscheinlich die Bindung der Homeodomäne an die DNA destabilisiert wird. Eine weitere Missense-Mutation in Exon 2 führt zu einem Aminosäureaustausch (I47L) in der III. Helix der Homeodomäne. Der Phänotyp besteht aus einer Kombination aus Brachydaktylie und Polydaktylie (Goodman et al., 2001). Auch durch diesen Aminosäureaustausch wird wahrscheinlich die Fähigkeit des Proteins, an die DNA zu binden, verändert.

Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass ein Funktionsverlust von *HOXD13* zu Phänotypen führt, die sich deutlich von dem unterscheiden, der durch Expansionen des Alanin-kodierenden Repeats verursacht wird, und diese statt dessen zu einem Funktionsgewinn bzw. zu einem dominant-negativen Effekt des Proteins führen.

In dieser Studie wurde ein Mausmodell zur menschlichen SPD verwendet, um die Pathogenese, die dem Phänotyp der SPD zugrunde liegt, zu untersuchen. Es handelt sich um die „synpolydactyly homolog“ (spdh) Mausmutante, die eine spontan aufgetretene +7 Alanin-Expansion im *Hoxd13*-Gen trägt. Der Phänotyp bei homozygoten spdh-Mäusen ist dem der SPD beim Menschen vergleichbar (Johnson et al., 1998) und bietet deshalb eine gute Möglichkeit, die SPD an Mäusen molekulargenetisch zu analysieren.

### **1.7) Polyalanin-Expansionen**

Expansionen von Trinucleotid Wiederholungen (Repeats) sind weit verbreitet und die Ursache einer Reihe von Krankheiten. Vor allem Expansionen von Polyglutamin-kodierenden Repeats, die neurodegenerative Erkrankungen wie Chorea Huntington verursachen, sind seit längerer Zeit bekannt und untersucht. In den letzten Jahren wurden auch Expansionen in Polyalanin-kodierenden Repeats als Ursache einiger Krankheiten identifiziert. Im Unterschied zu den Polyglutaminen sind Polyalanin-kodierenden Repeats meiotisch stabil und nur wenig polymorph. Innerhalb der Säugetiere ist ihr Vorkommen und ihre Länge hoch konserviert, über ihre Funktion ist allerdings noch nichts bekannt.

Insgesamt wurden bisher 9 Gene beschrieben, in denen Expansionen eines Alanin-kodierenden Repeats zu Erkrankungen führen: *HOXD13* (Synpolydaktylie, OMIM 186000), *HOXA13* (Hand-Foot-Genital Syndrom, OMIM 140000), *RUNX2* (Cleidocraniale Dysplasie, OMIM 119600), *SOX3* (Mentale Retardierung mit Wachstumshormondefizienz, OMIM 300123), *ARX* (Partington Syndrom, OMIM 309510), *FOXL2* (Blepharophimosis Epicanthus Inversus Syndrom, OMIM 110100), *PHOX2B* (Congenital Central Hypoventilation Syndrom, OMIM 209880), *ZIC2* (Holoprosencephalie Typ5, OMIM 603073.0003) und *PABPN1* (Oculopharyngeale Muskeldystrophie, OMIM 164300). Mit Ausnahme von *PABPN1*, bei dem es sich um ein poly-A-bindendes Protein handelt, kodieren alle diese Gene Transkriptionsfaktoren, die wichtige Aufgaben während der Entwicklung und Differenzierung erfüllen. Die Länge der Repeats sind in allen diesen Genen ähnlich (14 bis 20 Alanine), ebenso auch die Länge der Repeats mit Expansionen (18 bis 29 Alanine). Es ist daher naheliegend, dass allen Erkrankungen ein gemeinsamer Mechanismus zu Grunde liegt. Ein weiteres Ziel dieser Studie ist es, den molekularen Mechanismus der Polyalanin-Expansion in *Hoxd13* zu untersuchen und zu identifizieren.