

1 Einleitung

1.1 Identifizierung von Krankheitsgenen beim Menschen

Nur wenige Gebiete im Bereich der Medizin haben sich in den letzten 25 Jahren so schnell und grundlegend entwickelt wie die Identifizierung von krankheitsverursachenden Genen beim Menschen. Noch zu Beginn der 1980er Jahre war der „Functional cloning“ Ansatz die Methode der Wahl, um sich der genetischen Ursache einer Krankheit zu nähern: Das Prinzip der Genidentifizierung basiert auf dem Kenntnis des grundlegenden biochemischen Defekts auf der Proteinebene, jedoch ohne Information über die chromosomale Lokalisation. Ausgehend von einem funktionalen Defekt eines Proteins wurde nach dem dafür codierenden Gen gesucht. Bekannte Beispiele für die erfolgreiche funktionelle Klonierung eines krankheitsverursachenden Gens schließen die Phenylketonurie und die Sichelzellanämie ein. Jedoch war, und ist dieser Ansatz aufgrund des noch limitierten Verständnisses für die grundlegenden und komplexen Mechanismen der Krankheitsentstehung, nur in wenigen Fällen verfügbar.

Die Klonierung von krankheitsverursachenden Genen mittels „candidate gene approach“ erfordert zumindest eine partielle funktionelle Information über die Krankheit, um eine gewisse Anzahl von „educated guesses“ zu machen, die zur Identifizierung des Gens führen. Das Krebsyndrom Li-Fraumeni, durch Mutationen in *p53* verursacht, [Freboung et al., 1995] stellt ein erfolgreiches Beispiel für diese Strategie dar, bei der keine Positionsinformation verwendet wurde.

Der Ansatz der reinen positionellen Klonierung eines Krankheitsgens setzt keinerlei funktionelle Informationen über die Krankheit voraus. In einem ersten Schritt wird mit Hilfe einer Kopplungsanalyse der betroffene chromosomale Bereich eingeeengt und anschließend wird versucht das verantwortliche Gen ausschließlich auf der Basis dieser Positionsinformation zu identifizieren. Die erste erfolgreiche positionelle Klonierung wurde 1986 von Royer-Pokora et al beschrieben: Die Klonierung des X-Chromosom gekoppelten Gens, das für die septische Granulomatose/ CGD verantwortlich ist, stellte das Proof of principle Experiment dar.

Der Beginn des *Human Genome Project (HGP)* im Jahr 1990 und der daraus resultierenden Fülle an Sequenzdaten des humanen Genoms etablierte den „positional candidate approach“ als Methode der Wahl. Im Zuge dieser Doppelstrategie wird mit Hilfe einer Kopplungsanalyse zunächst der Genlocus identifiziert. Danach werden die im Intervall bereits bekannten Gene auf ihren möglichen Zusammenhang mit der

Krankheit hin ausgewählt (Kandidatengene) und überprüft [zusammengefasst aus Collins, 1995].

1.2 Kopplungsanalyse

Die Kopplungsanalyse stellt einen generellen Ansatz zur Genkartierung dar. Prinzipiell kann jeder monogene Krankheitslocus unter folgenden Voraussetzungen kartiert werden: Beim Menschen sollten im Idealfall mehrere Stammbäume mit einer großen Anzahl von Nachkommen vorhanden sein; im Maussystem kann im Prinzip eine „beliebige“ Anzahl der zu untersuchenden Meiosen generiert werden. Außerdem sollten ausreichend Marker für die Kartierung zur Verfügung stehen. Nach Abschluß des *Human Genome Project* (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001) und der Sequenzierung des Mausgenoms (Waterston et al., 2002) ist die Anzahl der Marker kein limitierender Faktor mehr, da diese aufgrund der vorhandenen Sequenzinformationen und mit entsprechender Software mit einer fast beliebig großen Auflösung de novo generiert werden können.

Mit Hilfe der Kopplungsanalyse kann ein Gen aufgrund seiner Nähe zu einem anderen Locus (Marker) auf demselben Chromosom lokalisiert werden. Die Kopplungsanalyse basiert auf Rekombinationen, die als Folge von Cross-over Ereignissen während des Pachytän Stadiums der Meiose I in der Keimzellentwicklung stattfinden. Die Arme von zwei homologen Chromosomen können sich überkreuzen (Cross-over) und somit chromosomales Material untereinander austauschen. Diese Rekombinationen erhöhen das Potential der genetischen Diversität der Gameten. Sind zwei Loci weit voneinander entfernt auf einem Chromosom lokalisiert, werden sie mit größerer Wahrscheinlichkeit durch ein solches Crossing-over getrennt, entkoppelt und somit getrennt voneinander vererbt. Hingegen bleiben zwei nahe beieinander liegende Loci nach einem Cross-over mit großer Wahrscheinlichkeit zusammen und werden gemeinsam vererbt.

Die Frequenz der Rekombination zwischen zwei Loci bestimmt die genetische Distanz, die in centi Morgan (cM) Einheiten angegeben wird. Für zwei Loci, die 1 cM voneinander entfernt sind bedeutet dies, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 1% zwischen diesen Loci eine Rekombination während der Keimzellentwicklung stattfindet. Die Relation von genetischer Distanz zu physikalischer, chromosomaler Distanz ist nicht linear. Dies hat mehrere Gründe: Erstens findet Rekombination in Autosomen bei weiblichen Individuen häufiger als bei männlichen Individuen statt. Zweitens variiert die Rekombinationsfrequenz in den unterschiedlichen Bereichen der

Chromosomen (Rekombinationshotspots), und scheint in der Nähe vom Telomer größer zu sein als in der Nähe vom Zentromer. Im Durchschnitt korrespondiert 1cM mit 1 Mb beim Menschen bzw. mit 2 Mb in der Maus. [Ott, 1991, Silver, 1995].

1.3 Modellsystem Maus

Die Maus als Modellsystem ist aus vielen Gründen das System der Wahl für die genetische Analyse von entwicklungs - biologischen Prozessen in Mammaliern. Die kleine Gestalt und ihre hohe Reproduktivität gepaart mit einer kurze Generationsdauer ermöglichen groß angelegte Mutagenese Studien und extensive genetische Kreuzungsexperimente.

Viele Aspekte der Physiologie, Entwicklung und Zellbiologie sind in Maus und Mensch sehr ähnlich. Somit war *Mus musculus* auch in Anbetracht des *Human Genome Project* der relevante Modellorganismus [Meisler, 1996], was eine rasche Sequenzierung des Mausgenoms zur Folge hatte. Mit dem Abschluß beider Genomprojekte zeigt sich trotz ungefähr 90 Millionen Jahre getrennt verlaufender Entwicklung [Springer et al., 2003] die hohe Konservierung auf der gesamten DNA Ebene zwischen den beiden Spezies: dies hatte sich bereits früher durch den verhältnismäßig hohen Grad der Sequenzkonservierung in den codierenden Sequenzen von Maus und Mensch angedeutet. Aus diesem Grund konnten für fast alle menschlichen Gene relativ einfach die homologen Gene der Maus identifiziert werden.

Die Tatsache, dass auch große chromosomale Segmente in Maus und Mensch konserviert sind [Andersson et al.,1996] ist für die medizinische Forschung von besonderer Bedeutung: Mutationen im Menschen und ihre orthologen Mausmutanten verursachen oftmals ähnliche Phänotypen, so dass die positionelle Klonierung eines krankheitsverursachenden Gens in einer Spezies von beträchtlicher Relevanz für die andere Spezies sein kann. Mit Hilfe von Mausinzuchtstämmen, die ein homozygoten Genom besitzen, können somit in Kreuzungsexperimenten (Kopplungsanalysen) mit der zu untersuchenden Mausmutante Mäuse erzeugt werden, die am Krankheitslocus nur zwei Allele, Mutiert und Wildtyp-Form, für das krankheitsverursachende Gen besitzen. Dies ermöglicht den direkten Vergleich der Individuen mit den Allelvarianten. Da im Prinzip eine beliebige Anzahl an untersuchenden Meiosen generiert werden kann,

welche die Auflösung der Kartierung bestimmt, ist dies der entscheidende Vorteil im Vergleich zur Kopplungsanalyse beim Menschen. Es gibt verschiedene Arten von Mausmodellen für humane Erkrankungen, zum einen spontan auftretende Mutationen wie zum Beispiel die *spdh* Maus (Phänotyp überlappt mit der humanen Synpolydactyly) [Albrecht et al., 2002], zum anderen artifiziell generierte.

Klassische Methoden zur artifiziellen Herstellung von Mausmutanten sind die *in vivo* Mutagenese durch Bestrahlung mit hohen Dosen von Röntgenstrahlen (siehe *Dsh* Mausmutante) oder durch die Exposition mit stark mutagenen Chemikalien (z.B. ethyl nitrosurea, ENU). Die oftmals schwierige Lokalisation der genetischen Defekte in den durch klassische, ungerichtete Mutagenisierung entstandenen Mausmutanten sollte in Zukunft durch die vollständige Sequenzinformation des Mausgenoms entscheidend erleichtert werden. Die klassischen Methoden zur Herstellung von Mausmutanten wurden in den letzten 10 Jahren zunehmend durch gerichtete Mutagenese Techniken (Gene Targeting / Transgeninserierung) ersetzt. Dennoch ist es manchmal trotz moderner Techniken schwierig ein Mausmodell für eine bestimmte humane Erkrankung herzustellen. Dies ist in den elementaren Unterschieden zwischen beiden Spezies begründet. Obwohl zum Beispiel die biochemischen Signalwege in Säugern im allgemeinen ziemlich stark konserviert sind, gibt es signifikante Unterschiede: Für die Funktion der humanen Retina zum Beispiel ist das *Rb* Genprodukt zwingend notwendig, für die Retina anderer Vertebraten hingegen nicht. Dies ist der Grund, warum die Inaktivierung von *Rb1* in der Maus, im Gegensatz zum Menschen, nicht zur Entstehung von Retinoblastomen führt; interessanterweise wurde bislang auch keine spontane Mausmutante für *Rb1* beschrieben [Winshaw-Boris et al., 1996]. Ein weiterer Grund liegt darin, dass es sich um Mausinzuchtstämme handelt. So kann ein bestimmter Phänotyp in verschiedenen Mausstämmen deutlich variieren. Diese Tatsache ist darin begründet, dass sich die unterschiedlichen homozygoten Mausstämmen an Loci unterscheiden, welche Modifier Gene beinhalten, die mit dem Krankheitslocus interagieren können.

Allen Mausmodellen gemeinsam ist ihre große Bedeutung für die medizinische Forschung, da sie eine detaillierte Untersuchung der physiologischen Grundlagen der Erkrankung erlauben und auch eine erste Möglichkeit zum Test neuer Therapieansätze ermöglichen.

1.4 Vertebraten Entwicklung

Der Entwicklungsprozess von vielzelligen Lebewesen folgt einem stark konservierten Muster. Der Prozess ist gekennzeichnet durch mehrere Stadien. Der Fertilisation folgen Furchungsteilungen, die Gastrulation und die Organogenese. Zur Steuerung dieser komplexen Prozesse auf dem Weg vom Embryo zur adulten Lebensform ist eine orchestrale Koordination der Gene notwendig: Zu definierten Zeitpunkten müssen viele verschiedene Entwicklungsgene aktiviert oder reprimiert werden, miteinander interagieren, um die Normalentwicklung sicherzustellen.

Nach der Befruchtung der Eizelle erfolgen zunächst asynchrone, rotationale Furchungsteilungen, in deren Folge sich die Zygote bis zum kompakten Trophoblasten entwickelt; dieser beinhaltet das Blastocoel, die umhüllenden Trophoblastenzellen und die innere Zellmasse, aus der sich der spätere Embryo entwickelt. Im Anschluß erfolgt die Gastrulation, eine koordinierte Serie von Zellbewegungen, die zu einem Rearrangement des Embryos und zur Anlage von Ektoderm, Mesoderm und Endoderm führt. Die Organogenese beginnt mit der Neurulation, in der durch Interaktion zwischen dem Chordamesoderm und dem darüberliegenden Ektoderm das Neuralrohr angelegt wird. Gene der Pax-Familie spielen bei diesen Prozessen eine wichtige Rolle. Danach beginnt von cranial nach caudal die Somitogenese mit der Anlage der Somiten, die sich später in Sklerotom (Bildung des Axialskeletts mit Schlüsselgenen aus den *Pax*-, *BMP*- und *TGF β* -Familien), Myotom (Bildung der Muskulatur mit der Beteiligung wichtiger Gene aus der *MyoD*- und *Myf*-Familie) und Dermatome differenzieren. Die Entwicklung bis zum vollständigen Embryo dauert bei Mammaliern zwischen wenigen Tagen (z.B. Maus: 21 Tage) und einigen Monaten.

Dabei bildet das Ektoderm die Derivate des Nervensystems. Aus dem Endoderm entwickeln sich vorwiegend die Gewebe des Verdauungsapparates. Vom Mesoderm leitet sich z.B. das Skelett, die Muskulatur sowie das Herz ab [Gilbert 1997]. Die Steuerung dieser Musterbildungsprozesse, bei denen die Zellen determiniert werden, erfolgt durch Morphogene. Diese sezernierten Proteine, deren Konzentration über eine bestimmte Distanz entlang eines Gradienten variiert, aktivieren Gene, die für die Determinierung in eine bestimmte Entwicklungsrichtung notwendig sind. Solche Schaltergene werden nur durch die erforderliche Schwellenkonzentration eines Morphogens exprimiert, wobei verschiedene Gene auf unterschiedlich hohe Schwellenkonzentrationen reagieren [Wolpert 1998]. Als ein Morphogen mit Schlüsselfunktion in der Musterbildung von Vertebraten wurde *Sonic hedgehog*, als

eines von drei Vertebratenhomologen von *hedgehog* identifiziert. Das Drosophila-Gen *hedgehog* (*hh*) wurde im Rahmen eines „Screens“ für Mutanten der Segmentierung als Segmentpolaritätsgen entdeckt [Nüsslein-Vollhardt und Wieschhaus, 1980]. Bei der Festlegung der Segmentpolarität erhält *hedgehog* im Zusammenspiel mit *wingless* (*wg*) die Expression der zwei Gene, welche beide für sezernierte Proteine codieren. Durch den Konzentrationsgradienten der Proteine werden die Segmentgrenzen definiert. Darüber hinaus wird *hedgehog* für die Anlage der Imaginalscheiben benötigt. In den Bein- und Flügelimaginalscheiben ist *hh* in den anterior-posterioren Musterbildungsprozess, sowie den proximodistalen Auswuchs der Imaginalscheiben involviert. *Wingless* (*wg*) und *decapentaplegic* (*dpp*) sind hier die Zielgene von *hedgehog* [Hammerschmidt et al., 1997].

1.5 Gene der Hedgehog-Familie in Vertebraten

In Mammaliern wurden drei homologe Drosophila *hedgehog*-Gene identifiziert: *Sonic hedgehog* (*Shh*), *Indian hedgehog* (*Ihh*) und *Desert hedgehog* (*Dhh*).

Die Expression von *Shh* startet kurz nach dem Beginn der Gastrulation im zukünftigen Mittellinienmesoderm (Notochord, Floorplate) [Chang et al., 1994; Riddle et al., 1993]. und ist verantwortlich für die Anlage der rechts-links Asymmetrie des Körpers [Levin et al., 1995] welche unter anderem zum rechts-links Situs des Herzens führt. Im zentralen Nervensystem (ZNS) bewirkt *Shh* aus der Chorda und der Bodenplatte des Neuralrohrs ventrale Zellschicksale und ist entscheidend bei der Musterbildung des Vorder-Mittel- und Hinterhirns. [Dale et al., 1997; Agarwala et al., 2001; Ye et al., 1998]. *Shh* induziert Oligodendrozyten Vorläuferzellenzellen [Alberta et al., 2001] und ist noch in maturen Neuronen nachweisbar [Gritli-Linde et al., 2001]. *Shh* wird für die Entwicklung der Muskulatur als induzierender, proliferations oder survival-Faktor benötigt [Marcelle et al., 1999; Kruger et al., 2001]. *Shh* spielt eine entscheidende Rolle für die Morphogenese der Lunge [Litington et al., 1998], der Niere [Kim et al., 2001], der Zähne [Bitgood und McMahoan, 1995] und in der Haar/Federentwicklung [Wang et al., 2000]. In der Extremitätenknospe der Vertebraten reguliert die Expression von *Shh* im Organisationszentrum ZPA (zone of polarising activity) die anterior-posteriore Identität der Finger (siehe Abbildung 2).

Die Inaktivierung von *Shh* in der Maus führt zu schweren Defekten: *Shh*^{-/-} Mutanten sind nicht lebensfähig. Die Defekte umfassen die Anlage und Erhaltung von

Mittellinienstrukturen, den Verlust distaler Gliedmaßenanlagen, Zyklopie, das Fehlen ventraler Zelltypen innerhalb des Neuralrohres, sowie den Verlust der Wirbelsäule und der meisten Rippen. Heterozygote *Shh*^{+/-} Mäuse weisen einen *Wt* Phänotyp auf [Chiang et al., 1996].

Ihh wird in Knorpelzellen der Knochenanlage während der Embryonalentwicklung expremiert. Es spielt hier die entscheidende Rolle beim Differenzierungsprozess von Knorpelzellen während der endochondralen Ossifikation. [St-Jacques et al., 1999]. Weitere Expressionsdomänen schließen den Darm, die Lunge [Bitgood und McMagoon, 1995], sowie das extraembryonale Endoderm [Becker et al., 1997] ein. Die Inaktivierung von *Ihh* in der Maus führt zu schwersten Skelettfehlbildungen, in deren Folge die Embryonen schon kurz nach der Geburt sterben [St-Jacques et al., 1999].

Dhh wird im sich entwickelnden Darm und den Sertolizellen des Testis expremiert [Parmantier et al., 1999]. Die Inaktivierung von *Dhh* in der Maus führt zu lebensfähigen Individuen, die männlichen Tiere sind jedoch durch Infertilität gekennzeichnet. Weibliche Tiere hingegen sind gänzlich unauffällig [Oldak et al., 2001].

1.6 Hedgehog Signaltransduktion

Die Erkenntnisse über die Hedgehog Signaltransduktion wurden, und werden im wesentlichen im *Drosophila* Modellsystem gewonnen.

Das sezernierte Morphogen Hh wird initial autoprozessiert, hierdurch wird es in ein 20kDa N-terminales und ein 25kDa C-terminales Fragment aufgespalten [Porter et al., 1995]. Das C-terminale Fragment katalysiert die autoproteolytische Teilungsreaktion. Das N-terminale Fragment übernimmt die Signalübertragung: Hierfür wird ein Cystein des Signalpeptids an seinem N-Terminus palmitoyliert; der C-Terminus wird durch Anhängen eines Cholesterinmoleküls modifiziert [Porter et al., 1996a,b]. Trotz dieser zweifachen Lipidmodifikation und der dadurch bedingten Membranassoziiierung wirkt Hh auf entfernte Zellen während der Entwicklung ein: Das Transmembran Transporter-ähnliche Protein Dispatched (Disp) bewirkt hierfür die Freisetzung von Hh von sezernierenden Zellen [Burke et al., 1999; Kawakami et al., 2002], die Heparansulfatproteoglycane Dally-like (Dlp) und Dally werden für den extrazellulären Transport der Hh Proteine benötigt [Han et al., 2004]. Die Hedgehog Signaltransduktion wird durch die Bindung von Hh an seinen Transmembranrezeptor Patched (Ptc) vermittelt [Stone et al., 1996] der in Abwesenheit von Hh das Transmembranprotein Smoothed (Smo) inaktiviert [Taipale et al., 2002]. Durch die Bindung von Hh an Ptc

wird Smo stabilisiert, 10-fach akkumuliert und aktiviert [Lum et al., 2003, Alcedo et al., 2000, Deneff et al., 2000]. Hierdurch wird Cos2 von Smo rekrutiert und liegt zusammen mit dem aktivierten Fused (Fu) und Cubitus interruptus (Ci) als cytoplasmatischer Komplex vor. Smo, Fu, der Supressor von Fu (Su(fu)) und Cos2 werden phosphoryliert [Robbins et al., 1997, Sisson et al., 1997, Lum et al., 2003, Deneff et al., 2000, Therond et al., 1996]. Dadurch verliert Cos2 seine Ci-Ankereigenschaft, Su(fu) wird inaktiviert und die Prozessierung von Ci in die Repressorform CiR wird blockiert. Das unprozessierte Ci kann aus dem cytoplasmatischen Komplex dissoziieren und gelangt als Effektor in den Zellkern, wo es mit dem Co-faktor CBP (Co-binding-protein) [Akimaru et al., 1997] die Transkription von Hh Zielgenen bewirkt.

Der Signalweg von Shh in Vertebraten zeigt starke Homologien: In Vertebraten sind 2 Ptc Rezeptoren, Ptc1 und Ptc2 [Motoyama et al., 1998;], sowie das Smo Homolog identifiziert worden. Für den Router Cos2 und Regulator Fu sind bislang keine homologen Proteine in Vertebraten bekannt, einzig der Regulator von Fu, Su(fu), [Pearse et al., 1999] konnte funktionell nachgewiesen werden. Für den transkriptionellen Effektor Ci, ein Zinkfingerprotein, sind in Vertebraten 3 Homolge Proteine identifiziert worden: Gli1, Gli2 und Gli3. Diese üben divergente Funktionen aus: Gli1 und Gli2 fungieren als positive transkriptionelle Effektoren, Gli3 stellt einen negativen Effektor dar.

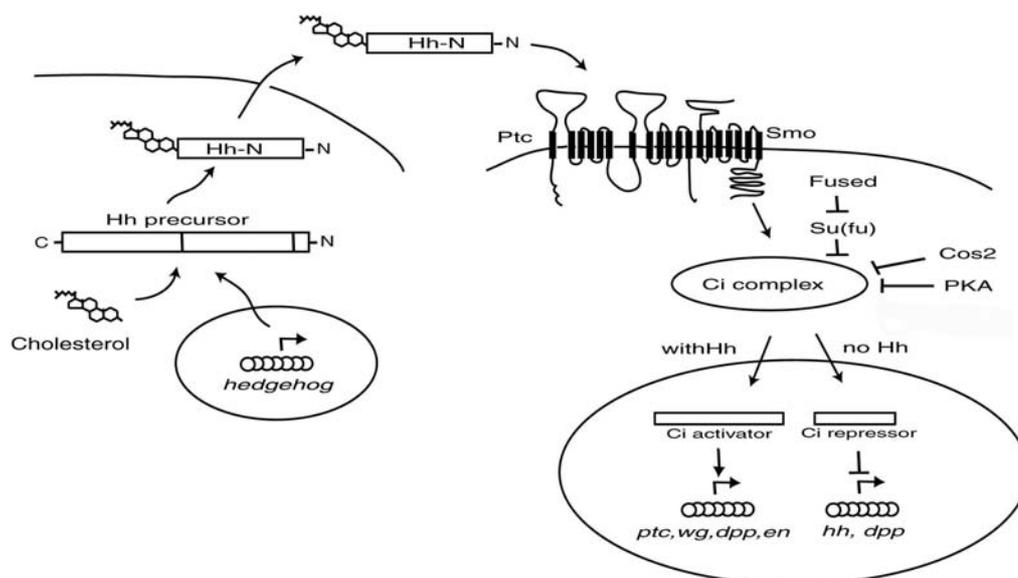


Abbildung 2: Shh Signaltransduktion

Abbildung verändert nach McMahon. More surprises in the Hedgehog Signaling Pathway. Cell, Vol.100, 185-188.

Ausführliche Erläuterungen siehe Text 1.6

Die Gliedmaßenanlage der Vertebraten stellt ein wichtiges experimentelles Modellsystem dar, um die Signale, die Zellen während der Prozesse der Musterbildung von embryonalen Feldern untereinander austauschen, zu analysieren. Die Experimente von Mangold und Spemann im Jahr 1924 hatten gezeigt, dass organisierende Zentren die embryonale Musterbildung vermitteln. Ihre einzigartigen signalisierenden Eigenschaften ermöglicht es ihnen, andere Zellen zu rekrutieren und deren Entwicklungsschicksal zu bestimmen.

1.7 Shh während der Musterbildung in der Gliedmaßenanlage

Die Zone der polarisierenden Aktivität (ZPA) ist das mesenchymale Signalzentrum, welches sich in der posterioren Seite der Extremitätenknospe befindet. Im Hühnerembryo führen die ektope Transplantation von ZPA Zellen auf die anteriore Seite einer Extremitätenknospe zu einer spiegelsymmetrischen Verdoppelung des Knochenmusters [Saunders and Gasseling, 1968]. Diese Experimente zeigten, dass die Zone der polarisierenden Aktivität die Anzahl der Finger sowie die anterior-posteriore Achse determiniert. Die apikale ektodermale Randleiste (AER), ein weiteres Signalzentrum während der Gliedmaßendifferenzierung, ist ein hoch spezialisiertes Ektoderm, welches sich an dem äußeren Rand der Extremitätenknospe bildet. Die Entfernung der AER zu verschiedenen frühen Zeitpunkten der Extremitätenentwicklung zeigten, dass die AER für das proximo-distale Auswachsen der Gliedmaßen verantwortlich ist [Saunders, 1948; Zwilling, 1955].

Die Identifikation von Signalmolekülen der AER und ZPA wurde jedoch erst durch die Molekulargenetik ermöglicht: Die entscheidenden Wachstumssignale der AER sind die sezernierten Wachstumsfaktoren der *fibroblast growth factor* Familie: *Fgf4*, das die Funktion der AER im Hühnerembryo ersetzen kann, wurde 1993 von Niswander und Mitarbeiter identifiziert. Fgf Signale werden durch Rezeptoren, welche im Mesenchym exprimiert werden, vermittelt. Das entscheidende Signalmolekül der ZPA ist *Sonic hedgehog* (Shh); es wurde 1993 von Tabin und Mitarbeiter identifiziert: Die Implantation von Shh exprimierenden Fibroblastenzellen an der anterioren Flanke der Extremität führt zur spiegelbildlichen Verdopplung des Autopods [Riddle et al., 1993]. Der Verlust von Shh während der Extremitätenentwicklung in Vertebraten führt zu einstrahligen Gliedmaßen ohne anterior-posterioren Charakter: Nur der anteriore digitus

(Finger1) ist nicht betroffen, dagegen kommt es zu einem Verlust der Finger 5 bis 2 und der Ulna (posteriorer Knochen) [Chiang et al., 1996; Chiang et al., 2001; Kraus et al., 2001]. Diese Studien verdeutlichen die Wichtigkeit des Shh Signaling für die anterior-posteriore Musterbildung der Extremität.

Shh erhält und fördert seine Expression mittels eines positiven Rückkopplungsmechanismus zwischen der ZPA und dem AER: Das Shh-Signal wird an die AER durch die Formin-abhängige Aktivierung des *bone morphogenetic protein* (BMP) Antagonisten *Gremlin* vermittelt. Die *Gremlin* vermittelte BMP Antagonisierung ermöglicht in der Folge die Expression von Fgfs, wie z.B *Fgf4* in der posterioren AER [Zuninga et al., 1999, Michos et al., 2004]. Das *Fgf* Signaling im posterioren AER wiederum erhält und fördert das distale Shh Signaling durch den *Shh/Fgf4* Rückkopplungsmechanismus [Niswander et al., 1993; Laufer et al., 1994] (siehe Abbildung 2).

Das mature Shh-Protein ist in der Lage ausgehend von der ZPA über weite Strecken zu diffundieren und so seine Signalaktivität über eine große Distanz zu vermitteln. Für dieses Long Range Signaling ist die Cholesterolmodifikation von *Shh* notwendig [Lewis et al., 2001]. Deshalb sind auch Mechanismen erforderlich, die die Reichweite des Shh-Signals einschränken, um eine ektope Aktivierung von *Shh* Zielgenen zu verhindern. Der direkteste Mechanismus ist die transkriptionelle Hochregulierung des *Shh* Rezeptors Patched [Goodrich et al., 1996]. So konnte in Patched1-defizienten Mäusen eine ektope Aktivierung von Shh Zielgenen gezeigt werden [Goodrich et al., 1997]. Die Reduktion von Patched1 in der Mausextremitätenknospe führt ebenfalls zu einer ektope anterioren *Shh* Expression und somit zu einer Polydaktylie [Milenkovic et al., 1999]. Zusätzlich wird die Reichweite des Shh Signals in Vertebraten durch das Hedgehog-interacting protein, HIP [Chuang & McMahon, 1999] eingeschränkt. Die Expression von HIP in mesenchymalen Zellen der Extremitätenknospe wird aufgrund des Shh Signals aktiviert. Das HIP Protein erzeugt einen zusätzlichen negativen Rückkopplungsmechanismus, indem es den Liganden bindet und dadurch die Reichweite von Hedgehog limitiert. Im allgemeinen reagieren Zellen auf ein Shh Signal mit der Aktivierung des Gli1 Transkriptionsfaktors (siehe Hh Signaltransduktion). Durch genetische Analysen in der Maus konnte jedoch gezeigt werden, dass Gli1 für die Extremitätenentwicklung nicht notwendig ist [Park et al., 2000]. Das Gli2 Protein ist ebenfalls nicht hinreichend für die normale Extremitätenentwicklung [Bai et al., 2002]. Es konnte gezeigt werden, dass in der Extremitätenknospe durch den Einfluss von Shh die Repressorform von *Gli3* (*Gli3R*) in die aktivierte Form *Gli3 A* konvertiert, was

einen Gradienten von anterior nach posterior bewirkt. Über diesen Mechanismus wird Gli3-Expression innerhalb der Extremitätenknospe moduliert und ist hier entscheidend für das Extremitätenmuster [Litingtung et al., 2002; Welscher et al., 2002]. In eleganten genetischen Experimenten wurden jüngst alle *Shh* exprimierenden Zellen sowie ihre Abkömmlinge durch die permanente Aktivierung mit β -galactosidase markiert [Harfe et al., 2004] und die Experimente zeigten, dass der zeitliche Shh Gradient für die Anlage der posterioren digiti 3 bis 5 und die Ulna verantwortlich ist; darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass nur der Finger 2 Shh Long Range Signaling benötigt und sich Finger1 (Daumen) sowie Radius unabhängig von Shh entwickeln.

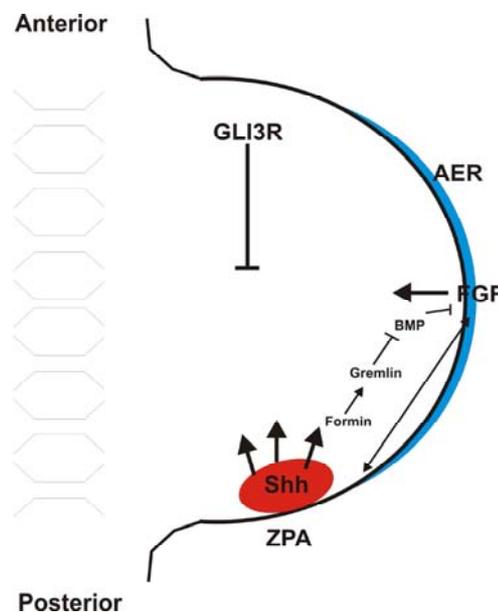


Abbildung 2: Shh Signaling im Prozeß der Musterbildung der Extremitätenknospe. Die Zone der polarisierenden Aktivität (ZPA) kontrolliert die anterior-posteriore Musterbildung über die Expression von Shh. Durch den Einfluß von Shh wird die Repressorform von Gli3, Gli3R, in die aktivierte Form Gli3A konvertiert, was einen Gradienten von anterior nach posterior bewirkt. Shh erhält und fördert seine Expression mittels eines positiven Rückkopplungsmechanismus zwischen der ZPA und dem AER: das Shh Signal wird an die AER durch die Formin-abhängige Aktivierung des bone morphogenetic protein (BMP) Antagonisten Gremlin vermittelt. Die Gremlin vermittelte BMP Antagonisierung ermöglicht in der Folge die Expression von Fgf Signalmolekülen der posterioren AER. Das Fgf Signaling im posterioren AER wiederum erhält und fördert das distale Shh Signaling durch den SHH/FGF4 Rückkopplungsmechanismus.

1.8 Hedgehog Gene und assoziierte humane Erkrankungen

In Anbetracht der tragenden Rolle die Hedgehog Gene bei verschiedensten Prozessen während der embryonalen Musterbildung, Wachstum und Zellspezifizierung spielen, ist es nicht verwunderlich, dass Mutationen in humanen Hedgehog Genen, oder in Genen der Signaltransduktion mit einer großen Anzahl von Krankheiten verknüpft sind. Humane *IHH* Mutationen sind für die dominant vererbte Brachydaktylie Typ A1 verantwortlich. Der Phänotyp der betroffenen Individuen ist durch die Verkürzung bzw. das Fehlen der mittleren Phalangen charakterisiert [Gao et al., 2001]. Polydaktylien sind durch die Verdopplung von Fingern charakterisiert und können durch ektope Shh Expression verursacht werden. Sie sind eine der häufigsten Entwicklungsstörungen überhaupt und treten bei ungefähr 15 von 10000 Neugeborenen auf. Mutationen im ZRS, einem regulatorischen Element, welches die Expression von *SHH* in den Gliedmaßen steuert, führen beim Menschen zur präaxialen Polydaktylie [Lettice et al., 2003].

Haploinsuffizienz von *SHH* beim Menschen verursacht Holoprosencephalie (HPE), ein schwerer Mittelliniendefekt, der durch die unvollständige Separierung des Vorderhirns in seine beiden cerebralen Hemisphären gekennzeichnet ist. Assoziierte craniofaziale Fehlbildungen sind die Zyklopie, Lippen-Kiefer-Gaumenspalte, ein mittelständiger Schneidezahn und eine nasenartige Struktur (Proboscis). [Belloni et al. 1996; Nanni et al., 1999; Roessler et al., 1997]. HPE tritt bei 1 von 250 Embryonen auf; aufgrund der großen Lethalitätsrate, die mit dem Defekt einhergeht kann HPE „nur“ bei 1 von 16000 Neugeborenen festgestellt werden [Matsunaga et al., 1977; Roach et al., 1975].

Mutationen in *Patched 1* führen zum Gorlin Syndrom, das neben einer Vielzahl von sklettalen Fehlbildungen durch die Prädisposition zur Bildung von bestimmten Tumoren (basales Zellkarzinom, Medullablastome) charakterisiert ist [Gorlin et al., 1995]. Diese Tumore werden mit großer Wahrscheinlichkeit durch die fortwährende Stimulation der Proliferation von entsprechenden Vorläuferzellen verursacht. [Chiang et al., 1999]. Weitere Krankheiten, die auf Mutationen in Genen der Hedgehog Signalkaskade beruhen sind z.B. das Greig bzw. das Pallster-Hall-Syndrom (Mutationen in *GLI3*) [Vortkamp et al., 1991; Kang et al., 1997], sowie das Rubinstein-Taybi-Syndrom (Mutation in *CBP*) [Blough et al., 2000].

1.9 Die „short digits“ (Dsh) Mausmutante

Der Phänotyp der „short digits“ (Dsh) Mausmutante wurde 1993 zum erstenmal von P.B. Selby beschrieben. Dsh ist eine autosomal semidominante Mutation, welche in der Nachkommenschaft eines (101/C3H) F1-Hybriden auftrat, der zuvor mit 600 Röntgen (R) (96R/min) bestrahlt wurde. Der Versuch fand im Rahmen von Experimenten zur Mutagenese von Strahlung statt [Selby et al. 1993]. Die Mutation wurde zunächst auf dem C3H/101 Mausstamm gehalten, später dann in den C57B110 Inzuchtstamm eingekreuzt. Homozygote Dsh/Dsh -Mäuse sind charakterisiert durch eine Vielzahl von internen und skelettären Defekten. Der Dsh/Dsh Phänotyp gleicht dem der Shh -/- Maus, wie 1996 von Chiang et al. beschrieben. Heterozygote Dsh/+ Mäuse weisen einen charakteristischen Phänotyp auf, der namensgebend für die Mutante war: Dsh/+ Mäuse haben kurze Finger, daher *short digits*, Dsh als Bezeichnung der Maus Mutante. Dieser heterozygote Phänotyp, der der humanen Brachydaktylie Typ A1 ähnelt, ist nur in der Dsh/+ Mutante vorhanden, jedoch nicht in der Shh +/- Maus. Eine initiale Kartierung lokalisierte den Dsh Locus auf den proximalen Bereich von Chromosom 5, welcher das Gen *Sonic hedgehog* (*Shh*) einschließt.

1.10 Zielstellung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, die Dsh Mausmutante weiterführend morphologisch und molekular zu charakterisieren und den für die Phänotypen zugrunde liegenden molekularen Defekt zu entschlüsseln.

Zu diesem Zweck wurde ein positioneller Klonierungsansatz verwendet: Der Dsh Locus sollte hierbei in einem ersten Schritt durch eine Feinkartierung eingegrenzt werden, um anschließend die in Frage kommenden Kandidatengene zu analysieren.

Die weiterführende Charakterisierung der Dsh/Dsh und Dsh/+ Phänotypen sollte auf morphologischer Ebene, z.B. mit Hilfe von histologischen Techniken, Skelettpräparationen und Magnetresonanztomographie erfolgen. Die molekulare Analyse der Phänotypen sollte experimentell durch molekularbiologische Methoden vor allem auf DNA und RNA Ebene, wie z.B. die Expressionsanalyse durch in situ Hybridisierung sowie *in silico* durch die Anwendung von bioinformatischen Werkzeugen, wie zum Beispiel dem PIPMaker Programm zur vergleichenden Genomsequenzanalyse erfolgen.