

## 4 Diskussion

### 4.1 Überblick

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 [Selby et al. 1993]. Die Mutation wurde zunächst auf dem C3H/101 Mausstamm gehalten, später dann in den C57Bl10 Inzuchtstamm eingekreuzt. Homozygote Dsh/Dsh -Mäuse sind charakterisiert durch eine Vielzahl von internen und skelettären Defekten. Die internen Defekte entstehen aufgrund eines schweren Mittelliniendefekts und beinhalten das volle Spektrum der Holoprosencephalie mit allen assoziierten Fehlbildungen: Diese beinhalten die Fusion des Frontalhirns, Defekte im Mittelgesicht und die Fusion der Augenanlage, welche zur Zyklopie führt. Weitere Defekte der homozygoten Mutante bestehen unter anderem in einer hypoplastischen Lunge, einem singulären Ventrikel, einer mittelständigen Niere. Der Dsh/Dsh Phänotyp gleicht dem der Shh<sup>-/-</sup> Maus, die 1996 von Chiang et al. beschrieben wurde. 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. Die kurzen Finger werden durch eine Fusion der ersten und zweiten Phalanx im Finger 2- 5 und einer verkürzten proximalen Phalanx im Finger 1 hervorgerufen. Die Mittelhandknochen und Mittelfußknochen sowie auch das übrige appendikuläre Skelett weisen keine Veränderungen auf. Dieser heterozygote Phänotyp, der der humanen Brachydaktylie Typ A1 ähnelt, ist nur in der Dsh/+ Mutante vorhanden, jedoch nicht in der Shh<sup>+/-</sup> Maus. Eine initiale Kartierung lokalisierte den Dsh Locus auf den proximalen Bereich von Chromosom 5, welcher das Gen *Sonic hedgehog* (*Shh*) einschließt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Dsh Mausmutante eingehend zu charakterisieren und den für die Phänotypen zugrunde liegenden molekularen Defekt zu entschlüsseln. Zu diesem Zweck wurde ein positioneller Klonierungsansatz verwendet.

## 4.2 Dsh/Dsh und Shh sind allelisch

Aufgrund der großen Ähnlichkeiten der Phänotypen der Dsh/Dsh Mausmutante und der Shh k.o. Maus wurde überprüft, ob der der Dsh/Dsh Mutante zugrundeliegende genetische Defekt das gleiche Gen (*Shh*) betrifft, oder ob von Mutationen in unterschiedlichen Genen ausgegangen werden musste. Hierzu wurde ein Komplementationstest durchgeführt. Der ursprünglich von Lewis 1955 bei Eukaryoten beschriebene cis-trans Test führte zum Begriff des Cistrons, des Gens als funktioneller Einheit [Brewer und Sing 1983; Seyffert 1998].

Um zu überprüfen, ob Dsh und *Sonic hedgehog* (*Shh*) allelisch sind wurden *Shh*<sup>+/-</sup> Mäuse mit *Dsh*<sup>+</sup> Mäusen gekreuzt. Die Phänotypen der resultierenden doppelt heterozygoten trans-Typen (*Dsh*<sup>+</sup> *Shh*<sup>+/-</sup> Mäuse) wurden mit den Phänotypen der *Dsh*<sup>+</sup> und *Shh*<sup>-/-</sup> Mäuse verglichen: Hierbei zeigen *Dsh*<sup>+</sup> *Shh*<sup>+/-</sup> Mäuse einen nahezu identischen Phänotyp im Vergleich zu *Shh*<sup>-/-</sup> und *Dsh*<sup>+</sup> Mäusen:

Der gemeinsame Phänotyp ist charakterisiert durch das volle Spektrum der Mittelliniendefekte, internen Abnormalien und Malformationen des axialen Skelettes sowie der Extremitäten. Die nahezu identischen Phänotypen der Individuen des Komplementationstest belegen, dass Dsh und *Shh* nicht komplementieren und somit allelisch sind. Würden die beiden Mutationen komplementieren, so müssten sich in den doppelt heterozygoten trans-Typen (*Dsh*<sup>+</sup> *Shh*<sup>+/-</sup> Mäuse) die Phänotypen der heterozygoten Elterntiere *Dsh*<sup>+</sup> und *Shh*<sup>+/-</sup> manifestieren. Da heterozygote *Shh*<sup>+/-</sup> Mäuse einen Wt Phänotyp aufweisen, müssten somit die *Dsh*<sup>+</sup> *Shh*<sup>+/-</sup> Mäuse den Phänotyp von heterozygoten *Dsh*<sup>+</sup> Mäusen aufweisen. Es dürften jedoch unter keinen Umständen Embryonen mit dem Habitus von *Dsh*<sup>+</sup> oder *Shh*<sup>-/-</sup> in der Nachkommenschaft auftreten. Da keine Komplementation festgestellt wurde sollten Dsh und *Shh*-Mutation dasselbe Gen betreffen.

### 4.3 Die *Shh* Expression ist in Dsh/Dsh Embryonen misreguliert

Die *Sonic hedgehog* Expression wurde mit Hilfe von Northern Blot Hybridisierung und durch Realtime PCR Analyse untersucht. Die Tatsache, dass im Stadium E 10.5 sowohl im Northern Blot als auch in der Realtime PCR Analyse kein *Sonic hedgehog* Transkript nachgewiesen werden kann erklärt den schweren Mittelliniendefekt und die assoziierten Malformationen der Dsh/Dsh Embryonen, die im selben Ausmaß in *Shh* <sup>-/-</sup> Embryonen vorhanden sind [Chiang et al., 1996]. Im Stadium E 11.5 konnte im Northern Blot eine sehr geringe *Shh* Expression in Dsh/Dsh Embryonen detektiert werden. Die geringe Restexpression von *Shh* im Stadium E 11.5, die im Northern Blot detektiert wurde steht im Widerspruch zum Ergebnis aus der Realtime PCR Analyse. Dieses konträre Ergebnis könnte dadurch zustande kommen, dass die verwendete 642bp cDNA Sonde, welche *Shh* Exon1 (unvollständig), das vollständige *Shh* Exon2 und *Shh* Exon 3 (unvollständig) beinhaltet, unter Umständen in der Lage ist, das homologe Gen *Indian hedgehog* (*Ihh*) aus der eingesetzten Gesamt RNA zu detektieren.

Die *Ihh* Exone 1-3 weisen gegenüber der *Shh* Exone 1-3 eine Homologie von 78%, 79% bzw. 64% auf. Insbesondere das stark konservierte Exon 2, welches 262bp der zur Hybridisierung eingesetzten *Shh* cDNA Sonde repräsentiert, könnte aufgrund seiner 79% Homologie und Fragmentgröße für eine Kreuzhybridisierung und somit zur Detektion von *Ihh* ausreichend sein. Die Reexpression von *Shh* in Dsh/Dsh Embryonen in den Stadien E 12.5 und 13.5, die 10% bzw 27% des entsprechenden Wildtyp Stadiums erreichen war jedoch ein unerwartetes und überraschendes Ergebnis, das die Möglichkeit einer regulatorischen *Sonic hedgehog* Mutation als molekularen Defekt eröffnete. Experimente im Zebrafisch Modellsystem hatten gezeigt, dass die *Shh* Expression in der floorplate und im Notochord durch intronische Enhancer (engl:Verstärker der Transkription) gesteuert werden [Muller et al., 1999]. Dies konnte zu einem späteren Zeitpunkt auch im Mausmodell gezeigt werden [Jeong et al., 2003].

#### 4.4 Sequenzierung des 14 kb *Shh* Locus von Dsh/Dsh

Die Tatsache, dass das 101 Allel innerhalb des *Shh* Locus nachgewiesen werden konnte, jedoch keine Mutation innerhalb des 14 kb großen, sequenzierten *Shh* Locus festgestellt werden konnte, deutete zusammen mit den Ergebnissen der Expressionsanalyse auf mehrere mögliche Szenarien: Eine Möglichkeit bestand in einem bislang unbekanntem *Shh* steuernden/ interagierenden Gen, welches sich in dem 14 cM Intervall, das aus der initialen Kartierung resultierte und den Dsh Locus auf den proximalen Bereich von Chromosom 5 kartierte, befinden könnte. Der Komplementationstest, der zeigt, dass Dsh und *Shh* allelisch sind, spricht allerdings gegen die Beteiligung eines weiteren Gens.

Es könnten auch bislang unbekannte cis-regulatorische Elemente, welche über sehr große (1Mb) Distanzen wirken können [Lettice et al., 2003] von der Dsh Mutation betroffen sein. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit liegt in einem chromosomalen Rearrangement, welches solch cis-regulatorische Elemente von *Shh* direkt betrifft, z.B. aufgrund einer Deletion oder sie vom *Shh* Locus physisch entfernt, z.B. aufgrund einer Inversion und dadurch inaktiviert. Dies ist in Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei der Dsh Mutante um eine strahleninduzierte Mausmutante handelt, ein nicht unwahrscheinlicher Erklärungsversuch. Es konnte gezeigt werden, dass eine Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen häufig DNA Doppelstrangbrüche und genomische Rearrangements zur Folge hat [Woychik et al., 1990].

#### 4.5 Identifikation einer Inversion bei Dsh auf Chromosom 5

Um die molekulare Ursache der Dsh Mutante zu entschlüsseln wurde ein positioneller Klonierungsansatz verfolgt, in dessen Folge mittels Feinkartierung ein 13 Mb großes Intervall auf Chromosom 5 identifiziert wurde. Ein Southern Blot Screen identifizierte den distalen Bruchpunkt der Dsh Inversion auf Chromosom 5, die Inversionssequenz wurde mit Hilfe von Genome Walking ermittelt und die 11,7 Mb große Inversion, welche das *Shh* Gen beinhaltet, mittels FISH Analysen bestätigt.

Das große Intervall und das Fehlen von rekombinanten Mäusen zwischen den Markern D5 Mit226 und D5N13 deutete auf eine Inversion innerhalb des Intervalls hin. Es ist bekannt, dass das Vorhandensein von Inversionsschleifen während der Meiose zu

instabilen Gameten führt und die daraus resultierenden Zygoten in einem sehr frühen Entwicklungsstadium absterben [Stubbs et al., 1997]. Eine Inversion und die daraus folgende Unterdrückung der Rekombination bis in die Nähe der Inversionsbruchpunkte war demnach die wahrscheinlichste Mutationsursache, die der Dsh Mutante zugrunde liegen sollte. Diese Hypothese wurde durch weitere strahleninduzierte Mausmutanten unterstützt: In der Mutante *replicated anterior zeugopod (raz)* konnte eine Inversion auf dem proximalen Arm von Chromosom 5 nachgewiesen werden. Die im Rahmen dieser Studie erfolgte Feinkartierung von *raz* zeigte eine Unterdrückung der Rekombination in einem 12,9 Mb Intervall [Krebs et al., 2003]. Bei der strahleninduzierten Mausmutante *hairy ears (Eh)* konnte ebenfalls eine Suppression der Rekombination innerhalb eines 30 cM Intervalls, verursacht durch eine Inversion, beobachtet werden [Davisson et al., 1990]. Die Mutante *ulnaless (ul)* stellt ein weiteres Beispiel für ein strahleninduziertes, chromosomales Rearrangement dar: Nach einer initialen Kartierung auf Maus Chromosom 2 [Davisson and Cattanaach., 1990] konnte mittels Feinkartierung ein 1,7 Mb Intervall identifiziert und ein YAC contig von *ul* erstellt werden [Peichel et al., 1996; Peichel et al., 1997]. 2003 gelang es schließlich unter anderem mit Southern Blot Hybridisierungen nachzuweisen, dass *ulnaless* durch eine Inversion auf Chromosom 2 verursacht wird, welche den *Hoxd* cluster einschließt [Spitz et al., 2003]. Die Historie der strahleninduzierten *ul* Mausmutante zeigt auch, dass die Identifikation von chromosomalen Rearrangements in der Maus schwierig ist: Die im Rahmen der 1996 Studie von Peichel durchgeführte Pulsed field Gelanalyse des *Hoxd* clusters zeigte keine Alterationen in der *ul* Mutante.

Um die Bruchpunkte der vermuteten Inversion bei Dsh nachzuweisen, wurde deshalb ein klassischer Screen mit Hilfe von Southern Blot Hybridisierungen durchgeführt. Ausgangspunkt der Suche war die telomere Position, D5N13, des Feinkartierungsintervalls, an der 6 Rekombinanten identifiziert werden konnten: Am angrenzenden Marker D5N12 in Richtung Centromer/ *Shh* konnten keine Rekombinanten mehr nachgewiesen werden. Wie die Mutationsanalyse von *Shh* gezeigt hat, ist im 14kb genomischen *Shh* Locus keine Mutation auf der Nukleotidebene feststellbar, das 101 Ursprungsallels ist jedoch erhalten. Dies stellte einen weiteren Anhaltspunkt für die Möglichkeit einer Inversion dar, da das 101 Allel aus oben angeführten Gründen durch eine Inversion vor Rekombination „geschützt“ blieb.

Zur Erforschung der Effekte von Chemikalien und Strahlung auf das Erbgut werden seit dem Ende der 1960 Jahre am Oak Ridge National Laboratory, USA großangelegte Studien am Mausmodell durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass durch

ionisierende Strahlung sehr effektiv Mutationen in Keimzellen von Mäusen induziert werden können [Cattanach, B.M., 1994; Russel, L.B., 1994]. Hierbei werden durch ionisierende Strahlung vor allem chromosomale Rearrangements in den bestrahlten Individuen verursacht, deren Nachkommenschaft entweder lethal (aufgrund von asymmetrischen Austausch oder Deletionen) oder aber lebensfähig sind, welche symmetrische reziproke Translokationen, Inversionen oder Insertionen aufweisen [Generoso, W.M., 1984].

Die Einwirkung von ionisierender Strahlung auf die DNA kann zu verschiedenen Arten von Beschädigungen der DNA führen: Es können zum einen Doppelstrangbrüche (Brechen der Phosphodiesterbindung durch reaktive Radikale) und Einzelstrangbrüche entstehen, zum anderen können Basen beschädigt werden und DNA-Protein Kreuzverbindungen entstehen [Ward, J.F. 1988].

Über die molekularen Reparaturmechanismen der strahleninduzierten DNA Beschädigung ist bislang wenig bekannt. Mit der Klonierung von *XRCC1* (x-ray cross complementing) konnte ein Faktor identifiziert werden, der für die Reparatur von Einzelstrangbrüchen essentiell ist [Thomson, L.H. et al., 1990]. Das Gen *XRCC5* kodiert für eine 80 kD Untereinheit von Ku, welches die freien Enden von doppelsträngiger DNA bindet und als Teil eines größeren Komplexes an der Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen beteiligt ist [Taccioli et al., 1994].

In jüngster Zeit wurden beim Menschen vermehrt Krankheiten identifiziert, wie z.B. das Sotos Syndrom [Kurotaki et al., 2003], die mit einer strukturellen Veränderung des Genoms einhergehen, welches zum Verlust, Gewinn oder Disruption eines dosis-sensitiven Gens führt. In den meisten Fällen der Deletions oder Duplikations Syndrome ist das rearrangierte genomische Segment durch große (>10kb), hochhomologe low copy repeat (LCR) Strukturen flankiert, welche als „Rekombinationssubstrat“ dienen können. Die Rekombination zwischen nicht allelischen LCR Kopien, auch als nicht allelische homologe Rekombination bezeichnet, kann zu einer Deletion oder Duplikation des eingeschlossenen Segments führen. Es wird spekuliert, dass auch bei anderen chromosomalen Rearrangements, wie z.B. Inversionen die Architektur des Genoms ein entscheidender Faktor darstellt [Shaw et al., 2004]. Es sind humane Inversionen beschrieben, bei denen sich LCRs und AT-reiche Palindrome in der Bruchpunktregion befinden [Gimelli et al., 2003; Giglio et al., 2002]. In der Maus konnte gezeigt werden, dass große palindromische Sequenzbereiche in Keimzellen extrem instabil sind und dort stabilisierende Rearrangements, oft durch Deletionen, stattfinden [Lewis et al., 1999; Zhou et al., 2001]. Interessanterweise befinden sich

beide Bruchpunkte der Dsh Inversion in der Nähe von Repeatbereichen. Ein durch die initiale Bestrahlung verursachter Doppelstrangbruch der DNA in der Nähe der Repeatbereiche könnte somit in einer aberranten Art repariert worden sein und dadurch zu dem beobachteten Rearrangement, der Dsh Inversion, geführt haben.

Welche molekularen Konsequenzen zieht die Dsh Inversion nach sich, und wie können die Dsh Phänotypen erklärt werden?

#### 4.6 Molekulare Konsequenzen der Dsh Inversion

Wie durch Northern Blot und Realtime PCR Analyse gezeigt werden konnte weisen Dsh/Dsh Embryonen in frühen Entwicklungsstadien eine fast vollständige Inaktivierung der *Shh* Transkription auf, dies erklärt den schweren Mittelliniendefekt und die assoziierten Malformationen der Dsh/Dsh Embryonen, die im selben Ausmaß in *Shh*<sup>-/-</sup> Embryonen vorhanden sind [Chiang et al., 1996]. In späteren Entwicklungsstadien ist jedoch eine Reaktivierung zu beobachten (siehe auch 4.3). Wie durch in situ Hybridisierung gezeigt werden konnte, lässt sich *Shh* Transkript im Proboscis von Dsh/Dsh Embryonen am Tag E13.5 nachweisen. Es kann somit festgestellt werden, dass die Dsh Inversion eine Misregulierung der *Shh* Genexpression in Dsh/Dsh Mutanten verursacht. Diese Misregulierung von *Sonic hedgehog* ist ursächlich für die Ausbildung des Dsh/Dsh Phänotyps, der durch das volle Spektrum der Holoprosencephalie charakterisiert ist [Niedermaier et al., 2005].

Wie kommt diese Misregulierung der *Shh* Transkription zustande?

Der distale Bruchpunkt der Dsh Inversion liegt 13 kb stromaufwärts des *Shh* Gens; durch das genomische Rearrangement bleiben jedoch der Promoter, die Exone und 2 Enhancer intakt. Im Menschen sind Translokationen beschrieben, die sich 15 - 265 kb stromaufwärts des *SHH* Promoters befinden [Roessler et al., 1997]. Diese Translokationspatienten weisen Holoprosencephalie Phänotypen auf, die den Phänotypen in Individuen mit Mutationen im *SHH* Gen gleichen [Belloni et al., 1996]. Dies kann durch einen long-range Positionseffekt erklärt werden, bei dem die transkriptionelle Kontrolle der Genexpression durch die zwei folgenden Mechanismen gestört wird:

Erstens kann die Interaktion der basalen Transkriptionseinheit (Promoter, transkribierte Exone und Introne) mit ihren cis-regulatorischen Elementen durch eine Mutation oder physikalische Dissoziation des transkribierten Gens von seinen cis-Regulatoren gestört sein. Ein weiteres prominentes Beispiel neben der Holoprosencephalie ist hierfür die humane Krankheit Aniridia, bei der Bruchpunkte bis zu 125 kb stromabwärts von *PAX 6* beschrieben sind. Dies führt zur Inaktivierung des Gens, in Folge der Dissoziation von einem 200kb stromabwärts liegenden cis-Regulator [Kleinjan et al., 2001]. *SOX9* repräsentiert eines der ältesten Beispiele eines humanen Gens, bei dem eine long-range Regulation vermutet und untersucht wurde. Für das HMG box Gen, welches für die karpomele Dysplasie verantwortlich ist, wurden chromosomale Rearrangements beschrieben, die zwischen 50 kb und 950 kb stromaufwärts von *SOX9* lokalisieren [Pfeifer et al., 1999]. Durch vergleichende Genomsequenzanalyse zwischen Mensch und *Fugu rubripes* konnten 5 konservierte Elemente in dem 290 kb Bereich 5' des humanen *SOX9* sowie 3 weitere Elemente 3' von *SOX9* identifiziert werden. Die Expressionsdomänen von YAC transgenen Mäusen lassen darauf schließen, dass 3 der 5 identifizierten konservierten 5' Elemente mögliche Enhancer für die *SOX9* Expression in der Extremitätenknospe und in der Wirbelsäule darstellen [Bagheri-Fam et al., 2001].

Zweitens kann die Genexpression als Folge der veränderten, umgebenden Chromatinstruktur inhibiert werden. In *Drosophila melanogaster* bestehen ungefähr 30% des Genoms aus Heterochromatin, das vor allen um den Bereich der Centromere lokalisiert und sich aus einfachen Repeatsequenzen zusammensetzt [Lohe et al., 1993]. Heterochromatin wurde ursprünglich als die chromosomalen Regionen der Chromosomen definiert, die während des gesamten Zellzyklus in einem kondensierten Zustand verbleiben. Außerdem sind sie durch einen Verlust der Genexpression gekennzeichnet [Heitz et al., 1928; Russel et al., 1963]. Der starke Einfluß der Chromatinstruktur auf die Genregulation konnte im *Drosophila* Modellsystem im Zusammenhang mit „position-effect variegation“ (PEV) Mutationen gezeigt werden: Hierbei kommt es zu einem mosaikartigen Expressionspattern des *white* Gens, welches sich innerhalb des Euchromatins vom X Chromosom befindet und dessen Genprodukt für die Pigmentierung des Auges der Fliege benötigt wird. Wird dieses Gen aufgrund eines chromosomalen Rearrangements in die Nähe eines Bruchpunktes in Heterochromatin platziert, führt dies zu Individuen, welche weiße (*white* Gen inaktiv) und rote (*white* Gen aktiv) Flecken in den Augen aufweisen. Das beobachtete mosaikartige Expressionspattern wird auch als PEV bezeichnet [Wallrath and Ellgin,

1995]. Die Auswirkungen der umgebenden Chromatinstruktur auf die Genexpression konnte auch in transgenen Mäusen beobachtet werden, deren funktionelle Geneinheiten in heterochromatische Genomregionen inserierten und inaktiviert wurden. [Milot et al., 1996 ; Festenstein et al., 1999].

Die long-range Kontrolle der Genexpression durch cis-regulatorische DNA Elemente wird durch eine zunehmende Anzahl von humanen Erkrankungen, die durch Positionseffekte (in Anlehnung an PEV) verursacht werden, belegt [Kleinjan et al., 2005]. Vor allem aber für Gene, die die Embryonalentwicklung steuern und somit eine exakte zeitliche und räumliche Regulation ihrer Transkription benötigen wurden im Mausmodell cis-regulatorische Elemente, die sehr weit vom Promoter entfernt sein können identifiziert.

Durch den Einfluß von Chromatin modifizierenden Proteinen und Enzymen, wie z.B der HMG (high-mobility-group) Proteine können strukturelle Änderungen des Chromatins, wie z.B DNA „Loops“ induziert und stabilisiert werden [Bustin and Reeves, 1996]. So läßt es sich erklären, weshalb auch sehr weit entfernte Enhancer, mit gebundenen Transkriptionsfaktoren, mit dem Core Promoter des Zielgens interagieren können.

Einige der Entwicklungsregulatorgene befinden sich in sogenannten „gene deserts“ [Nobrega et al., 2003], das heißt in bis zu 1 Mb großen genomischen Bereichen, in denen sich nur das Gen selbst und seine putativen cis – regulatorischen Elemente befinden, wie z.B. für *DACH* und *SOX9* gezeigt wurde [Nobrega et al., 2003; Pfeifer et al., 1999]. Diese genomische Organisation trifft auch auf *Sonic hedgehog* zu: Das nächste flankierende 3' Gen *Rnf32* befindet sich ungefähr 700 kb entfernt. Der *Shh* Enhancer ZRS, der die ZPA spezifische Expression von *Shh* in der Extremitätenknospe steuert, ist im 930 kb entfernten 3' Gen *Lmbr 1* lokalisiert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mit Hilfe von *MultiPIP Maker* Genomsequenzvergleichen der Spezies Maus, Mensch, Huhn und Fugu innerhalb dieses *Sonic hedgehog* „gene deserts“ 5 putative cis-regulatorische Elemente identifiziert werden, die in allen 4 untersuchten Spezies konserviert sind. Insbesondere die phylogenetische Konservierung im äußerst kompakten und divergenten Fugu Genom, das entscheidend zur Identifikation von unbekanntem Genen und regulatorischen Elementen beiträgt [Brenner et al., 1994], läßt auf die Funktionalität der durch *in silico* Analyse identifizierten nichtcodierenden Elemente CNE1-CNE5 schließen. Die Separierung der basalen *Shh* Transkriptionseinheit von solchen Elementen durch die Dsh Inversion sollte zur Reduktion oder vollständigen Inaktivierung der *Shh*

Transkription führen. Dies ist, wie durch Northern Blot und Realtime PCR Analyse gezeigt wurde in frühen Dsh/Dsh Entwicklungsstadien der Fall. Der fast vollständige Verlust der *Shh* Expression erklärt den schweren Mittelliniendefekt und die assoziierten Malformationen in Dsh/Dsh Embryonen, die sich nicht vom *Shh*<sup>-/-</sup> Phänotyp unterscheiden. Zusammengefaßt kann festgestellt werden, dass die Dsh Inversion in frühen Entwicklungsstadien zu einem Verlust der Genfunktion führt.

Wie bereits erwähnt kommt es jedoch zu einer Reexpression von *Shh* vom Zeitpunkt E 13.5 an, das bedeutet, dass die Dsh Inversion nicht nur eine fast vollständige Inaktivierung, sondern eher die Misregulierung von *Shh* verursacht. In heterozygoten Dsh/+ Embryonen führt dies ab E 13.5 zu einer starken ektopen *Shh* Expression in den Phalangen der sich entwickelnden Finger, in deren Konsequenz sich der „short digits“ Phänotyp entwickelt (siehe Dsh/+ als Modell für die Entstehung von Brachydaktylie). Dieser heterozygote Phänotyp kann demnach als „Gain of Function“ Phänotyp, verursacht durch die Dsh Inversion, betrachtet werden.

Die beobachtete Misregulierung von *Sonic hedgehog* in der Dsh Mausmutante kann am besten mit der physikalischen Trennung von cis-regulatorischen Elementen, die Enhancer, Silencer, Insulatoren oder auch Locus control region (LCR) repräsentieren können erklärt werden.

Durch Experimente in transgenen Zebrafischen und Mäusen konnte gezeigt werden, dass die *Shh* Expression durch mehrere intronische, transkriptionelle Regulatoren kontrolliert wird [Muller et al., 1999; Jeong, Y., 2003]. Ein weiteres regulatorisches Element, konnte im Intron 5 des flankierenden *Lmbr1* Gens, welches sich ungefähr 1 Mb von *Shh* entfernt befindet indentifiziert werden. Die Disruption des als ZRS bezeichneten Elements in der *Sasquatch* (*Ssq*) Mausmutante führt zusätzlich zur normalen posterioren *Shh* Expressionsdomäne, zur ektopen *Shh* Expression im anterioren Bereich der Extremitätenknospe, was einen Polydaktylie Phänotyp zur Folge hat [Lettice et al., 2002]. Punktmutationen in diesem Element führen zur Polydaktylie, wie in 4 verschiedenen postaxialen Polydaktylie Familien und der *Hemimelic extra toes* (*Hx*) Mausmutante gezeigt werden konnte. Durch einen genetischen Test mit den *Ssq*, *Hx*, und *Shh*<sup>-/-</sup> Allelen konnte auf eine elegante Art demonstriert werden, dass das ZRS Element ein cis-regulatorisches Element darstellt, welches die ZPA spezifische Expression von *Shh* in der Extremitätenknospe steuert [Lettice et al., 2002; Lettice et al., 2003; Sagai et al., 2004].

Mit diesen Ergebnissen kann die humane Krankheit *Acheiropodie*, die durch eine Deletion von Exon4 und umgebender intronischer Sequenz des humanen *Lmbr1*

Homologen *C7ORF2* verursacht wird jedoch nicht erklärt werden. Der humane *Acheiropodie* Phänotyp, der mit der Trunkierung der distalen Extremitäten einhergeht ist dem Extremitätenphänotyp der in der *Shh*<sup>-/-</sup> Maus auftritt sehr ähnlich [Ivanakiev et al., 2001]. Er könnte durch den Verlust eines weiteren, bislang unbekanntes *Shh* cis-regulatorischen Elements, das vermutlich zu einem Enhancer/Repressor Komplex gehört, erklärt werden. Es gibt weitere Evidenzlinien, die belegen, dass neben dem bisher bekannten ZRS Element weitere cis-Regulatoren existieren müssen, die die ZPA spezifische Expression von *Shh* steuern: Sie gründen auf den Studien der Mausmutante *replicated anterior zeugopod (raz)* [Krebs et al., 2003] und der Hühnermutante *oligozeugodactyly (ozd)* [Ros et al., 2003]. Interessanterweise wird *raz*, ähnlich wie *Dsh*, durch eine Inversion die den *Shh* Locus einschließt verursacht. Die Bruchpunkte sind jedoch nicht genau definiert und befinden sich ungefähr 12 Mb distal von *Lmbr1* und 3 Mb proximal von *Shh*. Sowohl die *raz* Mutante als auch die *ozd* Mutante ist durch die Herunterregulierung bzw. Verlust der *Shh* Expression in der Gliedmaßenanlage geprägt. Dies läßt auf die Beteiligung eines noch unbekanntes ZPA spezifischen Enhancers schließen, dieser könnte sich in den in dieser Arbeit identifizierten Elemente CNE1-CNE4 befinden, die zwischen dem *Dsh* Bruchpunkt und dem *Lmbr1* Gen lokalisiert sind.

Eine weitere Möglichkeit, wie die ektopische *Shh* Expression in *Dsh*<sup>+/+</sup> erklärt werden kann ist die Beteiligung eines *Shh* Silencer oder Repressor Elementes, das durch die *Dsh* Inversion physikalisch entfernt und somit inaktiviert wird. Der Verlust dieses putativen Repressors durch das chromosomale Rearrangement würde dann in einer ektopischen *Shh* Expression resultieren, wie sie in den Phalangen der *Dsh*<sup>+/+</sup> Gliedmaßenanlagen durch in situ Hybridisierung und Realtime PCR Analyse nachgewiesen werden konnte.

#### 4.7 Bedeutung und Analyse von CNEs

Die Identifikation und Charakterisierung von cis-regulatorischen Elementen/ Regionen innerhalb nichtcodierender DNA im Vertebratengenom ist eine der Herausforderungen in der post-Genom Ära. Diese Elemente sind evolutionär stark konserviert und werden aufgrund dieser Eigenschaft in Genomsequenzvergleichen verschiedener Spezies als konservierte, nichtcodierende Elemente (CNE) identifiziert. CNEs, werden vor allem bei Entwicklungsgenen, wie z.B. *Shh*, für die exakte zeitliche und räumliche Steuerung der Genexpression benötigt. Die grundlegenden Erkenntnisse, die belegen, dass die Entwicklung von Organismen durch cis-regulatorische DNA Elemente, wie z.B.

Enhancer und Silencer, gesteuert werden sind in Invertebratenmodellssystemen wie *Drosophila* und Seeigel beschrieben worden [Davidson et al., 2002; Oliveri et al., 2004]. Es wird angenommen, dass diese Elemente unterschiedliche, teils in Clusteranordnung vorkommende Bindungsstellen für eine große Anzahl von Transkriptionsfaktoren beinhalten und gemeinsam genregulatorische Netzwerke bilden, die für eine ordnungsgemäße Embryonalentwicklung notwendig sind. In Vertebraten steht die Entschlüsselung dieser genregulatorischen Netzwerke noch am Anfang. Nach dem Abschluß des *Human Genome Project* und der Fertigstellung der Genomprojekte von verschiedenen, relevanten Modellssystemen sind mit Hilfe geeigneter bioinformatischer Tools [Schwarz et al., 2000] multiple Sequenzvergleiche zwischen den Genomen der Spezies möglich. Hierbei ist der Genomvergleich von Mensch oder Maus mit dem Kugelfisch *Fugu rubripes* (Fugu) von besonderer Relevanz: Der letzte gemeinsame Vorfahre von Mensch und Fugu existierte vor 450 Millionen Jahren [Kumar et al., 1998], dies legt die Vermutung nahe, dass die konservierten, nichtcodierenden DNA Sequenzen (CNE) zwischen diesen Spezies eine Funktion in der Vertebratenentwicklung beinhalten [Bofelli et al., 2004]. Das Fugu Genom ist außerdem äußerst kompakt (300Mb), dies reduziert die intronischen und intergenischen Distanzen im Vergleich zum Menschen um den Faktor 10 [Brenner et al., 1994]. Dieser *in silico* Ansatz der vergleichenden Genomik hat bereits zur Identifikation von zahlreichen cis-regulatorischen Elementen geführt [Bagheri-Fam et al., 2001; Lettice et al., 2003; Spitz et al., 2003; Kimura-Yoshida et al., 2004]. Interessanterweise konnten für eine große Zahl von ursprünglich experimentell validierter cis-regulatorischer Elemente, z.B. mit Hilfe von transgenen Reporterstudien, eine hohe Konservierung zwischen verschiedenen Vertebratenspezies gezeigt werden. Diese cis-regulatorischen Elemente repräsentieren bisher fast ausschließlich Enhancerelemente. Dies ist vor allem durch die Tatsache begründet, dass der Enhancer Assay der einzig etablierte *in vivo* Ansatz ist, welcher abhängig vom Modellsystem „relativ“ schnell durchgeführt werden kann und im Maus und im Zebrafischmodell praktiziert wird. Demnach können andere Elemente, wie z.B. Silencer oder Insulatoren mit den bislang verwendeten Enhancermodellssystemen nicht nachgewiesen werden: In diesen Reporterstudien wird das konservierte, nichtcodierende Element, CNE, vor einen Minimalpromoter kloniert, der an ein Reporter-gen (LacZ oder GFP) fusioniert ist.

In einem genomweiten Ansatz wurden beim Vergleich von Mensch und Fugu insgesamt 1400 hoch konservierte nichtcodierende Elemente gefunden. Die meisten der Elemente wurden innerhalb und in der Nähe von Genen identifiziert, welche in der Entwicklung

eine tragende Rolle einnehmen. In einem in vivo Enhancer assay im Zebrafisch konnten z.B für *sox21* und *pax6* gewebespezifische Enhanceraktivität von CNEs gezeigt werden. [Woolfe et al., 2005].

Eine in vitro Methode zum Test der CNEs ist die Aktivitätsbestimmung mit Hilfe von Luciferasereportervektoren: Hier ist vor allem auf die Auswahl einer geeigneten Zelllinie zu achten, in der z.B. gegebenenfalls benötigten Kofaktoren, exprimiert werden. Trotzdem ist ein in vitro Zellkultursystem nur bedingt nützlich, um Prozesse, die während embryonaler Entwicklungsphasen stattfinden zu rekapitulieren. Insbesondere die dynamische Architektur des Chromatins während solcher Entwicklungsprozesse kann in diesen Zellkulturversuchen nicht simuliert werden. Desweiteren ist durch die Isolierung eines genomischen Segments aus seinem Kontext die Interaktion mit weiteren benachbarten Elementen unterbunden. Deshalb ist die technisch und zeitlich aufwendige, genomische Deletion entsprechender konservierter, nichtcodierender Bereiche die Methode der Wahl, um exakte Aussagen über die Funktion der Elemente machen zu können.

Es ist zu beachten, dass trotz eines hohen Grades an Konservierung von nichtcodierenden Sequenzen zwischen Spezies, vor allem bei Mensch / Maus Vergleichen nicht „automatisch“ auf eine tatsächliche Funktionalität der Elemente geschlossen werden kann. In der Studie von Nobrega und Mitarbeiter 2003 wurden zwei *gene deserts*, 1,5 Mb und 845 kb groß, im Mausgenom deletiert. Die beiden Elemente wiesen zusammen über 1200 nichtcodierende Sequenzen auf, die im Mensch und in der Maus konserviert sind (>100 bp; 70% Identität). Die heterozygoten, sowie die homozygoten Mäuse weisen einen Phänotyp auf, der im Bezug auf die Morphologie, Reproduktivität, Wachstum und anderen Parametern nicht vom Wildtyp zu unterscheiden ist. Dieses überraschende Ergebnis zeigt Evidenz dafür, dass konservierte Sequenzen im Genom von Mammaliern existieren können, die für die Lebensfähigkeit eines Organismus nicht essentiell benötigt werden und vielleicht sogar keine Funktion erfüllen und somit „überflüssig“ sind. Allerdings können die Auswirkungen der Deletionen in der Maus in der Laborhaltung nur in einem begrenzten Maße festgestellt werden. So könnten z.B. Verhaltensanalysen der Mäuse (in „Freilandbeobachtungen“) weitere Aufschlüsse über mögliche Funktionen der deletierten Sequenzbereiche liefern. Es wird allgemein angenommen, dass mindestens 5% des humanen Genoms unter Selektion stehen und demnach funktionelle Eigenschaften aufweisen sollten [Chiaromonte et al., 2003]. Bislang sind Protein codierende Gene, deren codierende Exone und UTRs ungefähr 2% des humanen Genoms darstellen, die am besten

analysierten und charakterisierten Sequenzen [International Human Genome Sequencing consortium, 2001]. Die restlichen 3 %, die den unerforschten „funktionellen Bereich“ des humanen Genoms darstellen, sollten demnach hauptsächlich Bereiche mit genregulatorischem Charakter darstellen. Die funktionelle Annotation dieser Bereiche, die Enhancer, Silencer, Insulatoren, Locus control Regionen oder micro RNAs, (und unbekannte Elemente) darstellen hat gerade erst begonnen. Es ist davon auszugehen, dass neue, bislang unbekannte funktionelle Elemente zu den bereits erwähnten entdeckt werden sollten. Dies ist auch im Anbetracht der Tatsache, dass z.B. bis vor wenigen Jahren micro RNAs unbekannt waren und deren Beteiligung an entwicklungsbiologischen Prozessen im Fokus der aktuellen Forschung steht, sehr wahrscheinlich.

#### **4.8 Cis-Regulation von *Sonic hedgehog***

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die nichtcodierenden putativ cis-regulatorischen *Shh* Elemente CNE1-CNE5, die zwischen den Spezies Mensch, Maus, Huhn und *Fugu rubripes* konserviert sind vorrangig mit dem *MultiPIPMaker* Tool [Schwartz et al., 2000] identifiziert. Eine weiterführende *in silico* Analyse der Elemente wurde mit der Datenbank *TRANSFAC PRO* durchgeführt. Die konservierten Elemente können mittels eines Suchalgorithmus auf Bindungsstellen für spezifische Transkriptionsfaktoren untersucht werden. Die vorhergesagten Transkriptionsfaktorbindungsstellen können Hinweise auf die assoziierten Signalwege und mögliche Funktionen der Elemente geben. Solche Assoziationen sind jedoch ohne experimentelle Validierung der Bindungsstellen spekulativ.

CNE 1, CNE 2, CNE 3 und CNE 4 befinden sich 318 kb, 410 kb, 688 kb und 728kb stromabwärts von *Shh*. Die Elemente CNE 1-4 sind durch ihre phylogenetische Konservierung in Mensch, Maus, Huhn und *Fugu rubripes* charakterisiert (detaillierte Charakteristika, wie prozentueller Grad der Konservierung und Länge der Elemente in den verschiedenen Speziesvergleichen sind im Ergebnisteil 3.10, Abbildung 17 beschrieben). Vor allem die Konservierung im *Fugu* Genom läßt mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine tatsächliche Funktionalität schließen [Brenner et al., 1994; Nobrega et al., 2003; Rubin, EM., 2005, persönliche Kommunikation]. In einer 2005 veröffentlichten Studie von Woolfe und Mitarbeitern wurden CNE 1, CNE 3 und CNE 4 in einem genomweiten Sequenzvergleich von Mensch und *Fugu* bestätigt. Im Rahmen der Woolfe Studie wurde eine funktionelle Analyse mit einem *in vivo* Enhancer assay

(GFP-Reportervektoren) im Zebrafischmodellssystem durchgeführt. Es konnte für die CNE 1 zugrundeliegende Sequenz eine Reporterexpression im ZNS (Mittelhirn, Hinterhirn) und in Zellen der Retina von transgenen Zebrafischen gezeigt werden. Für die CNE 3 zugrundeliegende Sequenz konnte vor allem im Herz GFP Reporteraktivität detektiert werden. Dieses Expressionsmuster läßt sich sehr gut mit der vorhergesagten Bindungsstelle bei CNE3 für *Nkx2.5*, ein Homeobox Transkriptionsfaktor welcher spezifisch im embryonalen und adulten Herz exprimiert ist [Lints et al., 1993], erklären. Die CNE 4 zugrundeliegende Sequenz bewirkte die GFP Reporterexpression vor allem Notochord und im ZNS (Vorderhirn und Hinterhirn).

Das 840 kb entfernte Element CNE 5 ist als einziges der 5 Elemente innerhalb des genomischen Locus eines flankierenden Gens lokalisiert: Die *MultiPIPMaker* Analyse (Maus/Fugu Vergleich) von *Lmbr1* zeigt neben dem bereits bekannten ZRS Element, welches die *Shh* Expression im Autopod steuert und sich innerhalb des Intron 5 befindet, nur 1 weiteres hochkonserviertes Element: CNE 5, das im Intron 9 von *Lmbr1* lokalisiert ist. Insbesondere die vorhergesagte Bindungsstelle für *Runx* Transkriptionsfaktoren könnte darauf hindeuten, dass es sich bei CNE 5 um den vermuteten *Shh* Repressor handeln könnte. In jüngster Zeit wurden für *Runx* Transkriptionsfaktoren Funktionen bei der transkriptionellen Repremierung und Inaktivierung von Genen beschrieben [Durst et al., 2004]. Erste *in vitro* Experimente (nicht dargestellt) zur Aktivitätsbestimmung von CNE5 mit einem Luciferasereportersystem zeigen jedoch keine Repressoraktivität, dieses Ergebnis kann in vielfältigen Ursachen, wie z.B. fehlende benötigte Cofaktoren, die in der verwendeten Zelllinie nicht exprimiert werden oder die Isolierung des Elements aus seiner nativen Chromatinstruktur begründet sein. Die Deletion von CNE5 im Mausmodellssystem könnte entscheidene Antworten für die Repressorhypothese liefern.

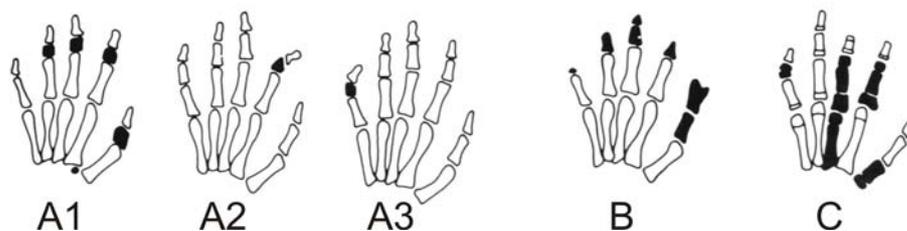
Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der funktionellen *in vivo* Analyse der Elemente CNE1, CNE2 und CNE3 im Mausmodellssystem begonnen: Hierfür wurden Maus DNA Fragmente der CNE 1-3 in einen  $\beta$ -Galaktosidase (lacZ)-Reporter-Vektor kloniert. Dieser Vektor (P1230) enthält ein Reporterogen,  $\beta$ -Galaktosidase, dessen enzymatische Aktivität leicht nachweisbar ist, und das unter der Kontrolle eines humanen minimalen  $\beta$  Globin Promotors exprimiert wird. Die Maus CNE Fragmente wurden vor den  $\beta$ -Globin Minimalpromoter kloniert und die sequenzverifizierten Konstrukte zur Generierung von transgenen Reportermausen verwendet. Die Aktivität der Elemente kann durch eine Färbetechnik (lacZ Färbung) der Embryonen sichtbar gemacht werden. Die Reporterexpression, die aus P1230/CNE2 hervorgeht spiegelt nicht exakt die

endogene Expression von Sonic hedgehog wieder, die im Stadium E 12.5 auf die ZPA in der Extremitätenknospe beschränkt ist. Die Expression des Reporters ist vielmehr in der gesamten Extremitätenanlage vorhanden, jedoch nicht ubiquitär. Dies wird durch distale Expressionsdomäne belegt, die auf die Anlagen der Phalangen beschränkt ist, das zwischen den Fingern liegenden mesenchymale Gewebe bleibt ungefärbt. Dieses gliedmaßenspezifische CNE2 Reporterexpressionsmuster könnte darauf hindeuten, dass neben dem bereits bekannten ZRS Element, welches die Shh Expression in der ZPA steuert noch weitere gliedmaßenspezifische Elemente innerhalb des Shh „gene desert“ vorhanden sind. Diese Elemente könnten auch Teil eines älteren Regulationsmechanismus darstellen, der im Zuge der Diversifizierung der *Hedgehog* Genfamilie in heutigen Vertebraten nicht mehr verwendet wird. Die Ergebnisse müssen durch die Analyse von weiteren Embryonen aus anderen, unabhängigen transgenen Reporterlinien des Konstruktes P1230/CNE2 bestätigt werden.

#### 4.9 Dsh/+ als Modell für die Entstehung von Brachydaktylie

Heterozygote Träger des defekten Allels 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. Es konnte mit Hilfe von Skelettpräparationen gezeigt werden, dass die kurzen Finger durch eine Fusion der ersten und zweiten Phalanx im Finger 2- 5 und einer verkürzten proximalen Phalanx im Finger 1 hervorgerufen werden. Der *Dsh/+* Phänotyp ist der humanen Brachydaktylie Typ A1 sehr ähnlich.

Brachydaktylien stellen eine Gruppe kongenitaler Handfehlbildungen dar, bei denen sich aufgrund einer abnormen Entwicklung der Phalangen oder Metakarpalia eine Verkürzung der Finger manifestiert und die Gelenkbildung gestört ist [Bell, 1951; Kornak et al., 2003]. Die Brachydaktylien werden klinisch in 5 Gruppen, A bis E, und 3 Subgruppen A 1-A 3 eingeteilt.



**Abbildung 19:** Übersicht der verschiedenen Brachydaktylie Typen

Es sind die schematischen Handphänotypen der Brachydaktylien vom Typ A1, A2, A3, B und C gezeigt. Die Hand ist jeweils mit Metakarpalia und den drei Phalangen abgebildet; die betroffenen Skelettelemente sind in schwarz dargestellt (nach Temtamy & McKusick, The genetics of hand malformation, 1978).

Die Brachydaktylie Typ A1 (BDA 1) ist durch die Aplasie aller Mittelphalangen gekennzeichnet. BDA 1 wird durch Mutationen in den aminoterminalen Domänen von Indian hedgehog (IHH) hervorgerufen [Gao et al., 2001]. Die Brachydaktylie A2 ist durch eine Hypoplasie der Mittelphalanx des 2. Fingers gekennzeichnet und konnte auf Mutationen im BMPR1B-Rezeptor zurückgeführt werden [Lehmann et al., 2003]. Die Punktmutationen führen zu einer Inaktivierung des Rezeptors. BMPR1B ist der primäre Rezeptor für GDF5, was diesen als Ligand in hoher Affinität bindet.

Heterozygote Funktionsverlustmutationen in GDF5, ein Signalmolekül der TGF- $\beta$  Superfamilie und bmp analog, das im Perichondrium und im Gelenkspalt exprimiert wird [Francis-West et al., 1999] führen zur Brachydaktylie Typ C, die einen komplexen Phänotyp der Hände zeigt: 1., 2., 3. und 5. Finger sind durch eine Brachymesophalangie gekennzeichnet, häufig zusammen mit einer Hyperphalangie des 2. und 3. Fingers. Das Metakarpale I ist häufig stark verkürzt. Der 4. Finger ist im Allgemeinen wenig oder nicht betroffen, sodass er immer der längste Finger ist. [Polinkovsky et al., 1997]. Der Funktionsverlust von Gdf5 in der Mausmutante Brachypodism führt zur Brachydaktylie und zum Verlust der Gelenke in den Fingern [Storm et al., 1994]. Die humane akromesomale Chondrodysplasie vom Grebe-Typ [Thomas et al., 1996] sowie die Hunter-Thomson-Dysplasie [Thomas et al., 1997], verursacht durch homozygote Punktmutationen im GDF5, weisen große Ähnlichkeiten zum vorgenannten Phänotyp der Brachypodism Mausmutante auf.

Die Brachydaktylie Typ B ist durch eine Aplasie der distalen Phalangen 2-5 charakterisiert und wird durch Mutationen in der Rezeptortyrosinkinase ROR2 hervorgerufen [Schwabe et al., 2000].

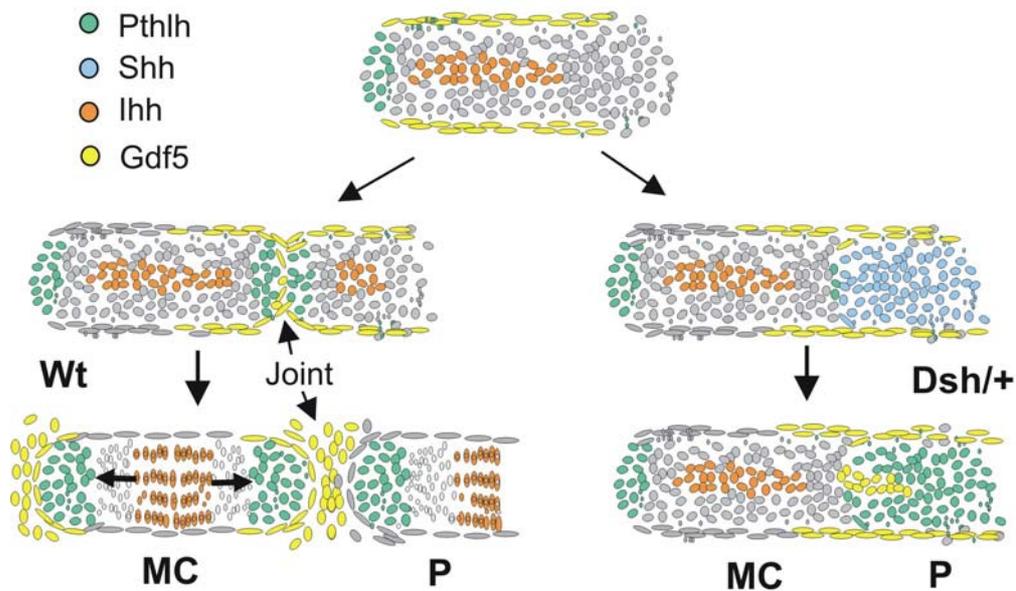
Es konnte durch quantitative Realtime PCR Analyse gezeigt werden, dass in *Dsh/+* Extremitäten im Stadium E 10.5 und E 11.5 das *Shh* Transkript auf ungefähr 50% der Menge des *Wt* reduziert ist; das Ergebnis ist im Einklang mit der Erwartung an eine regulatorische heterozygote Mutation. In den *Wt* Extremitäten wird *Shh* zum Zeitpunkt E 12.5 stark herunterreguliert und danach abgeschaltet. In der *Dsh/+* Extremität wird das *Shh* Transkript zum Zeitpunkt E 12.5 ebenfalls herunterreguliert. Im Gegensatz zum Wildtyp wird *Shh* in der *Dsh/+* Mutante zum Zeitpunkt E 13.5 und E 14.5 stark hochreguliert. In situ Hybridisierungen belegen die ektopen *Shh* in den distalen Bereichen der Fingeranlage. Dies führt zu einem Verlust der *Ihh* Expression in der proximalen und mittleren Phalanx in *Dsh/+*. Zum anderen zur massiven ektopen

Pthlh Expression über die ganze Anlage der Phalangen hinweg, die in Wt Mäusen auf die Enden der Anlage beschränkt ist.

Ein grundlegender Mechanismus in der Organogenese von Phalangen und den dazwischenliegenden Gelenken ist der Ihh-Pthlh Regelkreislauf: Indian hedgehog, ein sezerniertes Signalpeptid der Hedghog Genfamilie, wird in prähypertrophen Chondrozyten exprimiert. Es aktiviert Pthlh, das im perartikularen Knorpel exprimiert ist und inhibiert die Umwandlung von proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten in hypertrophe Chondrozyten. Hierdurch wird ein Rückkopplungsmechanismus zwischen Ihh und Pthlh etabliert, der essentiell für die Regulation der Chondrozytendifferenzierung ist [Vortkamp et al., 1996]. Ein Funktionsverlust von Ihh in Mäusen führt zu Phänotypen, die verkürzte, knorpelige Extremitäten ohne Gelenkbildung aufweisen [St-Jacques, B., 1999]. Dies zeigt, dass die Interaktion von Ihh und Pthlh nicht nur eine wichtige Rolle bei der Regulation der Chondrozytendifferenzierung in der Wachstumsfuge spielt, sondern auch essentiell ist für die Normalentwicklung von Gelenken ist. Es konnte ferner gezeigt werden, dass ein feinabgestimmtes Signaling von FGF und BMP, die antagonistisch wirken, für die Steuerung der Expression von Ihh und dem Prozeß der hypertrophen Chondrozytendifferenzierung benötigt wird [Minina et al., 2002].

Wie in verschiedenen in vitro und in vivo Modellen gezeigt wurde kann die Aktivierung von Hedgehog (Hh) Zielgenen durch jedes der 3 Hh Homologen Shh, Ihh und Dhh erfolgen [Pathi et al., 2001]. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die ektope Shh Expression in der phalangealen Anlage von Dsh/+ zu einer ektopen Expression des Ihh Zielgens Pthlh führt; Ihh wiederum wird seinerseits wie gezeigt inaktiviert. In Überexpressionsexperimenten von Ihh im Hühnerembryo konnte gezeigt werden, dass dies zur Herunterregulierung des endogenen Ihh führt, vermutlich durch die Hochregulation von Pthlh [Vortkamp et al., 1996].

Die vorgenannten Daten zeigen, dass die Störung des Ihh-Pthlh Regelkreislaufes in Dsh/+ für die verzögerte Chondrozytendifferenzierung verantwortlich ist, die zur Fusion der Phalanx 1 und 2 in den Fingern der heterozygoten Dsh/+ Mäuse führen.



**Abbildung 20:** Entwicklung von Fingern und Gelenken

Schemata vom Wt (links) und Dsh/+ (rechts): Entwicklung der Finger und Gelenke, sowie Genexpressionsmuster die zum Entwicklungsstadium E12.5 (oben), E 13.5 (mitte) und E 14.5 (unten) korrespondieren. Ihh induziert Pthlh über eine Distanz hinweg und reguliert dadurch die Distanz zum sich entwickelnden Gelenkspalt. Die Expression von Gdf5 beginnt in den kondensierenden Zellen der Knorpelanlage (E 12.5) und setzt sich in den zukünftigen Gelenkspalt fort, wo es die Rekrutierung von Zellen und deren Proliferation reguliert. In der Dsh/+ Extremität ist dieser Prozeß durch die Expression von Shh (ab E 13.5) in der Knorpelanlage und im Perichondrium des zukünftigen Phalanx 1 (P1) gestört. Dadurch wird Pthlh induziert und Ihh und Gdf5 reprimiert. Shh wird jedoch nicht in den Metakarpalia exprimiert. Die vorgenannten Prozesse führen in Folge zu einer Fusion von P1 und P2.

## 4.10 Ausblick

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Sequenzvergleiche des Sonic hedgehog „gene deserts“ stellt die Grundlage für weiterführende Versuche dar. Die putativ regulatorischen, nichtcodierenden Elemente aus der in silico PIPMaker Analyse können mit Hilfe von geeigneten Reportervektoren im Mausmodellsystem auf ihre Funktionalität überprüft werden: Die LacZ Expression sollte im günstigsten Fall Teilareale der endogenen Shh Expression rekapitulieren. Die in dieser Arbeit klonierten CNE/ LacZ Reportervektoren exprimieren die konservierten Elemente unter einem  $\beta$ -globin Minimalpromoter. In weiteren Experimenten könnte dieser durch den endogenen Shh Promoter ersetzt werden, um eine Expression zu ermöglichen, die der nativen Situation am nächsten kommt. In weiterführenden Experimenten sollten außerdem die in silico ermittelten DNA Bindungsstellen innerhalb der Elemente verifiziert werden. Die ermittelten Bindungsstellen für bestimmte Transkriptionsfaktoren könnten mit Hilfe von EMSA Experimenten (electro-mobility-shift-assay) nachgewiesen werden. Hierfür wird eine Zelllinie benötigt, in der der Shh Signalweg konstitutiv aktiv ist. Insbesondere der Nachweis der RUNX Bindungsstelle im konservierten Elemente CNE 5 im Intron 9 von *Lmbr1* ist hierbei von besonderem Interesse, da deren Nachweis einen weiteren Hinweis auf den vermuteten Shh Repressor darstellt. Eine Aktivitätsbestimmung des Elementes mit Hilfe von Luciferasevektoren in einem artifiziellen Zellsystem könnte ein nächster Schritt sein, jedoch ist hier die Auswahl der Zelllinie zu beachten und eventuell benötigte Kofaktoren erschweren die Durchführung.

Das Experiment der Wahl ist die Deletion des genomischen Fragmentes im Mausmodellsystem. Durch die Verfügbarkeit und Verwendung von genomischen Maus BAC Klone, welche den genomischen CNE Locus enthalten und die Technik der homologen Rekombination in *E.coli*, wird die Herstellung eines CNE 5 defizienten Mausmodells entscheidend erleichtert.