

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde die Mausmutante „*short digits*“ (*Dsh*) analysiert. Bei „*short digits*“ (*Dsh*) handelt es sich um eine strahleninduzierte Mausmutante mit autosomal semidominantem Erbgang, deren Phänotyp erstmalig 1993 von Selby et al. beschrieben wurde. 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.

Homozygote *Dsh/Dsh* Mäuse sind charakterisiert durch eine Vielzahl von internen und skelettären Defekten und beinhalten schwere Mittelliniendefekte. Der *Dsh/Dsh* Phänotyp gleicht dem der *Shh*^{-/-} Maus. Der gemeinsame Phänotyp ist durch den Holoprosencephalie Phänotyp charakterisiert. Mit einem genetischen Komplementationstest konnte gezeigt werden, dass *Dsh* und *Shh* allelisch sind. Es konnte jedoch durch DNA Sequenzierung des 14 kb umfassenden *Shh* Locus sowie der *Shh* cDNA keine Mutation im *Dsh* Kandidatengen *Shh* nachgewiesen werden. Im Rahmen eines positionellen Klonierungsansatzes konnte gezeigt werden, dass *Dsh* durch eine große chromosomale Inversion verursacht wird: Die zunächst durchgeführte Feinkartierung konnte trotz 1000 analysierter Meiosen den *Dsh* Locus auf Chromosom 5 nicht wie erwartet einengen. Die beobachtete Unterdrückung der Rekombination bis in die Bruchpunktregion ist auf das chromosomale Rearrangement zurückzuführen. Die Inversionsbruchpunkte wurden durch einen klassischen Screen mit Hilfe von Southern Blot Hybridisierungen identifiziert, die Inversion durch FISH Analysen auf Chromosomen bestätigt. Durch die Analyse der Bruchpunktregionen mit Hilfe der ermittelten Bruchpunktsequenzen kann gezeigt werden, dass kein Gen direkt von der *Dsh* Inversion, welche 11,7 Mb umfasst, betroffen ist. Quantitative Realtime PCR Experimente zeigen, dass die Expression der zum Teil sehr weit entfernten, flankierenden Gene beider Bruchpunkte durch die *Dsh* Inversion nicht beeinträchtigt sind und somit nicht in kausalem Zusammenhang mit den Mechanismen stehen, die zum *Dsh/Dsh* bzw. *Dsh*⁺ Phänotyp führen.

Die *Dsh* Inversion, deren telomerer Bruchpunkt sich 13 kb vom *Shh* Gen befindet, läßt die Exone, den Promoter und 2 Enhancer intakt. Die Inversion führt zu einem Positionseffekt, der die Regulation von *Shh* betrifft. Humane Translokationen, die sich 15-265 kb stromaufwärts des *Shh* Promoters befinden und zu Holoprosencephalie Phänotypen führen, weisen ebenso wie die *Dsh* Mausmutante auf das Vorhandensein von cis-regulatorischen Elementen hin. Diese Elemente werden vor allem bei

Entwicklungsgenen, wie z.B. *Shh*, für die exakte zeitliche und räumliche Steuerung der Genexpression benötigt. Durch eine bioinformatische *in silico* Analyse konnte gezeigt werden, dass im 1Mb umfassenden *Shh* „gene desert“ 5 putativ cis-regulatorische DNA Elemente vorhanden sind. Diese Ergebnisse stellen eine plausible Erklärung dafür dar, weshalb die *Dsh* Inversion zu einer Dysregulation der *Shh* Genexpression führt.

Homozygote *Dsh/Dsh* Embryonen weisen in sehr frühen Entwicklungsstadien kein *Shh* Transkript auf, was den schweren Mittelliniendefekt Phänotyp erklärt, der sich im selben Maß in *Shh* Embryonen manifestiert. In späteren Entwicklungsstadien (E 13.5) erfolgt eine Reexpression, die mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen im Proboscis nachgewiesen werden konnte. In heterozygoten *Dsh/+* Embryonen führt die Inversion zunächst zu einer erwarteten, ungefähr 50% Reduktion der *Shh* Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp. Ab E 13.5 erfolgt im Gegensatz zum Wildtyp eine stark hochregulierte und ektopische *Shh* Expression in der Extremitätenknospe. Dies hat die Aktivierung von *Hedgehog* Zielgenen, wie z.B. *Pthlh* zur Folge. Der für eine Normalentwicklung von Fingern und Gelenken essentielle *Ihh-Pthlh* Regelkreislauf wird gestört, was eine verzögerte Chondrozytendifferenzierung nach sich zieht, in deren Folge sich der *Dsh/+* Phänotyp ausbildet: Die kurzen Finger („short digits“) die durch eine Fusion der ersten und zweiten Phalanx im Finger 2- 5 und einer verkürzten proximalen Phalanx im Finger 1 hervorgerufen werden, sind namensgebend für die *Dsh* Mutante. Dieser heterozygote Phänotyp ist der humanen Brachydactyly Typ A1 sehr ähnlich, die durch Mutationen in *IHH* zu einer Verkürzung bzw. zum Verlust der mittleren Phalangen führt. Desweiteren konnten in *Dsh/+* Mäusen strukturelle Veränderungen im Kleinhirn nachgewiesen werden, deren Zusammenhang mit der *Shh* Dysregulation noch untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der funktionellen Analyse der *in silico* identifizierten, putativ cis-regulatorischen DNA Elemente begonnen. Die generierten transgenen Reporter-Mäuse und die Analyse der Embryonen aus deren Nachkommenschaft wurden in dieser Arbeit kurz dargestellt.

Zusammengefasst zeigt die molekulargenetische Analyse der *Dsh* Mausmutante neue Einblicke in den komplexen Regulationsmechanismus von *Shh* und deren Beteiligung in den Prozessen von Entwicklung und Krankheit.