

Aus dem Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Molekulare Pathogenese der Skelettfehlbildung Synpolydaktylie
durch Polyalanin-Expansionen in *Hoxd13***

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Julia Friedrich

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. S. Mundlos
 2. Prof. Dr. med. B. Zabel
 3. Prof. Dr. med. U. Felbor

Datum der Promotion: 22. März 2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Aufbau der Extremitäten von Landwirbeltieren	1
1.2	Angeborene Handfehlbildungen	2
1.3	Embryonale Extremitätenentwicklung	2
1.3.1	Musterbildung	2
1.3.2	Verknöcherung	5
1.4	Bmp-Gene	7
1.4.1	Bmp-Gene in der Extremitätenentwicklung	7
1.4.2	Bmp-Signaltransduktion	7
1.5	Hox-Gene	8
1.5.1	Hox-Gene in der Skelett- und Extremitätenentwicklung	10
1.6	Interaktion von Hox-Genen und BMP-Signalweg	11
1.7	Extremitätenfehlbildungen durch Mutationen in Hox-Genen	13
1.7.1	Mutationen in Hoxd13	13
1.7.2	Mutationen in Hoxa13	15
1.8	Molekulare Pathogenese der Hoxd13-assoziierten Synpolydaktylie	16
1.9	Polyaminosäure-Erkrankungen	18
1.9.1	Polyalanin-Erkrankungen	19
2	Zielsetzung	20
3	Material	21
3.1	Geräte	21
3.2	Verbrauchsmaterialien	22
3.3	Chemikalien	23
3.4	Puffer/Lösungen	25
3.5	Fertiglösungen, Reaktionssysteme/Kits	27
3.6	Marker	27
3.7	Bakterien	27
3.8	Primer	27
3.9	Enzyme	28
3.10	Antikörper	28
3.10.1	Primärantikörper	28
3.10.2	Sekundärantikörper	28
3.11	Plasmidvektoren	29
3.12	Zelllinien	30
3.13	Mäuse	30
3.14	Computerprogramme	31
3.15	Internetquellen	31

Inhaltsverzeichnis

4	Methoden.....	32
4.1	Allgemeine Molekularbiologie.....	32
4.1.1	DNA-Isolierung.....	32
4.1.2	Polymerasekettenreaktion („Polymerase chain reaction“, PCR).....	32
4.1.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	33
4.1.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	34
4.2	Mikrobiologie	34
4.2.1	Bestimmung der Bakteriendichte	34
4.2.2	Flüssigkulturen von Bakterien.....	34
4.2.3	Glycerinkulturen.....	35
4.2.4	Bakterienkulturen auf Agarplatten	35
4.2.5	Herstellung chemokompetenter Bakterien	35
4.2.6	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien.....	35
4.3	Zellkultur	36
4.3.1	Einfrieren von Zellen.....	36
4.3.2	Auftauen von Zellen.....	36
4.3.3	Splitten von Zellen	37
4.3.4	Bestimmung der Zellzahl	37
4.3.5	Transfektion von Zellen	37
4.4	Proteinbiochemie	38
4.4.1	Zellpräparation und Zellyse	38
4.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	38
4.4.3	SDS-PAGE.....	39
4.4.4	Vorbereitung der Proben	40
4.4.5	Western Blot.....	40
4.4.6	Koimmunopräzipitation.....	42
4.4.7	Proteinnachweis aus Gewebelysaten.....	43
4.5	Luciferase-Reporterassay	44
4.6	Immunzytochemie	45
4.7	Mäusezucht.....	46
4.8	Histologie.....	46
4.8.1	Paraffineinbettung	46
4.8.2	Immunhistochemie	47
4.9	Fluoreszenzmikroskopie.....	48

Inhaltsverzeichnis

5	Ergebnisse	49
5.1	Interaktion von expandiertem HOXD13 mit Polyalanin-Transkriptionsfaktoren	49
5.1.1	Expandiertes HOXD13 aggregiert im Zytoplasma	49
5.1.2	Aggregate aus expandiertem HOXD13 sequestrieren Wildtyp-HOXA13	50
5.1.3	Aggregate aus expandiertem HOXD13 sequestrieren Wildtyp-RUNX2	52
5.1.4	Aggregate aus expandiertem HOXD13 kolokalisieren nicht mit Wildtyp-HOXD11 und Wildtyp-HOXD12	53
5.1.5	Wildtyp-HOXA13 fördert die Aggregation von expandiertem HOXD13	55
5.1.6	Aggregate aus expandiertem HOXD13 kolokalisieren nicht mit verkürztem HOXD13 ohne Polyalanintrakt	57
5.1.7	Aggregate aus expandiertem HOXD13 kolokalisieren nicht mit mutiertem HOXD13 ohne Homöodomäne	59
5.1.8	Die Expansion des HOXD13-Polyalanintrakts ist erforderlich für die Interaktion mit Wildtyp-HOXA13	61
5.1.9	HOXA13 ist in spdh-Mäusen im Zytoplasma lokalisiert	63
5.1.10	HOXD13 und HOXA13 sind in spdh-Mäusen reduziert	66
5.2	Generelle Interaktionstendenz von Polyalanin-Transkriptionsfaktoren	68
5.2.1	Expandiertes HOXA13 und expandiertes RUNX2 aggregieren im Zytoplasma und sequestrieren Wildtyp-HOXD13	68
5.3	Funktionelle Interaktion von HOXD13 und SMADs	70
5.3.1	Wildtyp-HOXD13 inhibiert den SMAD-Signalweg stärker als expandiertes HOXD13	70
6	Diskussion	73
6.1	Funktion und Evolution der Polyalaninrepeats	73
6.2	Interaktion von expandiertem HOXD13 mit Polyalanin-Transkriptionsfaktoren	74
6.3	Generelle Interaktionstendenz von Polyalanin-Transkriptionsfaktoren	80
6.4	Funktionelle Interaktion von HOXD13 und SMADs	83
6.5	Molekulare Pathogenese der Hoxd13-assoziierten Synpolydaktylie	87
6.6	Therapie der Polyalanin-Krankheiten	88
7	Zusammenfassung	90
8	Literatur	91
9	Verzeichnisse	99
9.1	Abbildungsverzeichnis	99
9.2	Abkürzungsverzeichnis	100
10	Anhang	102
10.1	Danksagung	102
10.2	Lebenslauf	103
10.3	Veröffentlichung	104
10.4	Selbständigkeitserklärung	105

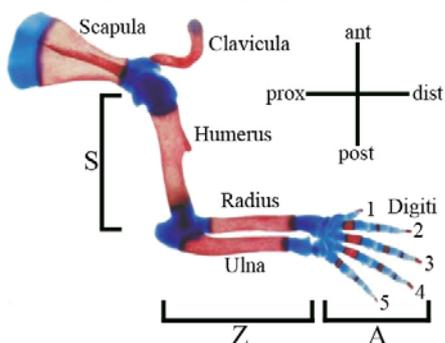
1 Einleitung

1.1 Aufbau der Extremitäten von Landwirbeltieren

Wirbeltiere, die über zwei Extremitätenpaare verfügen oder diese während der Evolution sekundär wieder verloren haben, wie z. B. Schlangen, klassifiziert man als Landwirbeltiere. Zu ihnen gehören Amphibien, Reptilien, Vögel und Säugetiere einschließlich Menschen. Die Extremitäten von Landwirbeltieren stammen von den Brust- bzw. Beckenflossen primitiver kiefermäuliger Wirbeltiere ab¹. Die im Laufe der Evolution entstandenen Gliedmaßen ermöglichen so unterschiedliche Fortbewegungsarten wie laufen, fliegen und schwimmen. Trotz dieser Anpassungsvorgänge ist der grundlegende Aufbau der Gliedmaßen bemerkenswert konserviert. Schon Darwin bemerkte die Ähnlichkeit des Bauplans verschiedener Gliedmaßen und schrieb²: „What can be more curious than that the hand of a man, formed for grasping, that of a mole for digging, the leg of the horse, the paddle of the porpoise, and the wing of the bat, should all be constructed on the same pattern, and should include similar bones, in the same relative positions?“ Die Grundstruktur der meisten Landwirbeltierextremitäten untergliedert sich, wie in Abbildung 1 dargestellt, von proximal nach distal in die drei Abschnitte Stylopod (Oberarm bzw. -schenkel), Zeugopod (Unterarm bzw. -schenkel) und Autopod (Hand bzw. Fuß). Je proximaler die Lage des Abschnitts, desto älter ist er phylogenetisch. Somit ist das Stylopod der älteste Abschnitt, während Zeugo- und Autopod jüngeren Ursprungs, aus dem Devon, sind. Sie wurden auch bei Quastenflossern, den Vorfahren der Landwirbeltiere, nachgewiesen.

Alle modernen Landwirbeltiere verfügen phylogenetisch fixiert über fünf oder weniger Finger bzw. Zehen. Evolutionär fixierte Pseudopolydaktylie, das scheinbare Vorhandensein überzähliger Finger und Zehen, erfolgt durch Modifikation bereits vorhandener Karpal- oder Tarsalknochen zu zusätzlichen Pseudofingern und -zehen bei Fröschen und Pandabären³. Dennoch treten bei verschiedenen Landwirbeltieren polydaktyle Varianten auf. Beispiele dafür sind humane Synpolydaktylie (SPD) und die spontan aufgetretene Mausmutante „*synpolydactyly homolog*“ (*spd*)⁴.

Abbildung 1: Skelettpräparation einer Vordergliedmaße der Maus bei der Geburt



Die rote und blaue histologische Färbung stellen mineralisierten Knochen bzw. Knorpel dar. Die Baupläne von Stylopod (S), Zeugopod (Z) und Autopod (A) entlang der proximal-distalen (prox-dist) Achse und der Digiti 1-5 entlang der anterior-posterioren (ant-post) Achse sind bei allen Landwirbeltieren konserviert. Abbildung nach⁵.

1.2 Angeborene Handfehlbildungen

Die menschliche Hand ist mit 37 Knochen und 36 Gelenken eine hochkomplizierte Konstruktion, deren Entwicklung von einer Vielzahl von Genen gesteuert wird. Daher verwundert es nicht, dass angeborene Handfehlbildungen mit einer Häufigkeit von mindestens 2,3 auf 1000 Geburten relativ oft auftreten⁶. Sie treten als einzelne Fehlbildung oder als Bestandteil verschiedener Syndrome auf. Schon kleine Abweichungen in der Entwicklung können zu Fehlbildungen führen. Die phänotypische Vielfalt an isolierten Handfehlbildungen wird in Gruppen unterteilt⁷. Polydaktylie beschreibt das Auftreten zusätzlicher Finger oder Zehen und Syndaktylie deren häutige oder knöcherne Verschmelzung. Das kombinierte Auftreten beider Fehlbildungen wird als Synpolydaktylie bezeichnet. Brachydaktylie ist charakterisiert durch die Verkürzung von Fingern oder Zehen. Bei der präaxialen Form der Polydaktylie entstehen zusätzliche *Digiti anterior* des Großzehs bzw. Daumens, bei der postaxialen Form entstehen sie posterior des Kleinzehs bzw. des kleinen Fingers und bei der zentralen Form zwischen Fingern bzw. Zehen.

1.3 Embryonale Extremitätenentwicklung

Die Entwicklung der Gliedmaßen beginnt nach der Anlage der primären Körperachse des Embryos. Der Entstehungsort der oberen und unteren Extremitätenknospen in der embryonalen Flanke wird durch die kombinierte Expression verschiedener *Hox*-Gene entlang der Körperachse festgelegt^{8,9}. Mesenchymale Zellen des Seitenplattenmesoderms wandern daraufhin aus, kondensieren und bilden die von ektodermalen Epithelzellen bedeckten Extremitätenknospen¹⁰. Aus ihnen entstehen später Knochen, Knorpel und Sehnen. Die Muskulatur entstammt den Somiten und wächst, ebenso wie Nerven und Blutgefäße, sekundär in die Extremitäten ein¹¹.

1.3.1 Musterbildung

Die initiale dreidimensionale Musterbildung in der Extremitätenknospe während der Embryonalentwicklung beinhaltet die geordnete Kondensation mesenchymaler Zellen zur Festlegung von Größe, Gestalt, Zahl und Anordnung der späteren Knochen. Es werden zwei Phasen der Musterbildung unterschieden. In der ersten Phase bildet sich in der Extremitätenknospe ein frühes anterior-posteriore (a-p) Muster durch die polarisierte Expression von *dHand*, *Gli3*¹² und *Hox*-Genen¹³, die allesamt Transkriptionsfaktoren kodieren. In der zweiten Phase bilden sich, wie in Abbildung 2 dargestellt, in der Extremitätenknospe Signalisierungszentren für die drei senkrecht aufeinander stehenden Raumachsen, die miteinander

interagieren⁹. Die Zone der polarisierenden Aktivität (ZPA) steuert die Asymmetrie entlang der a-p Achse, die vom Daumen zum kleinen Finger verläuft. Die apikale ektodermale Randleiste (AER) organisiert die Verlängerung der Extremität entlang der proximal-distalen (p-d) Achse, die von der Schulter zu den Fingerspitzen verläuft. Vom Epithel an das Mesenchym weitergeleitete Signale steuern das Abflachen der Extremität entlang der dorsal-ventralen (d-v) Achse, die vom Handrücken zur Handfläche verläuft.

Proximal-distales Muster

Das p-d Längenwachstum der Knospe wird durch die AER kontrolliert, die als epitheliale Randleiste entlang der a-p Achse an der Grenzfläche zwischen ventralem und dorsalem Gewebe der distalen Extremitätenknospe verläuft¹⁰. Unter der AER liegen mesenchymale, rasch proliferierende, undifferenzierte Zellen. Die AER treibt das p-d Wachstum und damit die zeitlich aufeinanderfolgende Bildung von Stylopod, Zeugopod und Autopod voran, indem sie fibroblastische Wachstumsfaktoren („Fibroblast growth factors“, FGFs) an das darunterliegende Mesenchym abgibt¹⁴. Die FGFs induzieren dort die Differenzierung mesenchymaler Zellen durch die Aktivierung 5'-lokalisierter *Hox*-Gene. Proximaler gelegene Zellen stehen nicht mehr unter dem Einfluss von FGFs der AER und differenzieren fortschreitend zu Chondrozyten, die zu knorpeligen Anlagen kondensieren¹⁰.

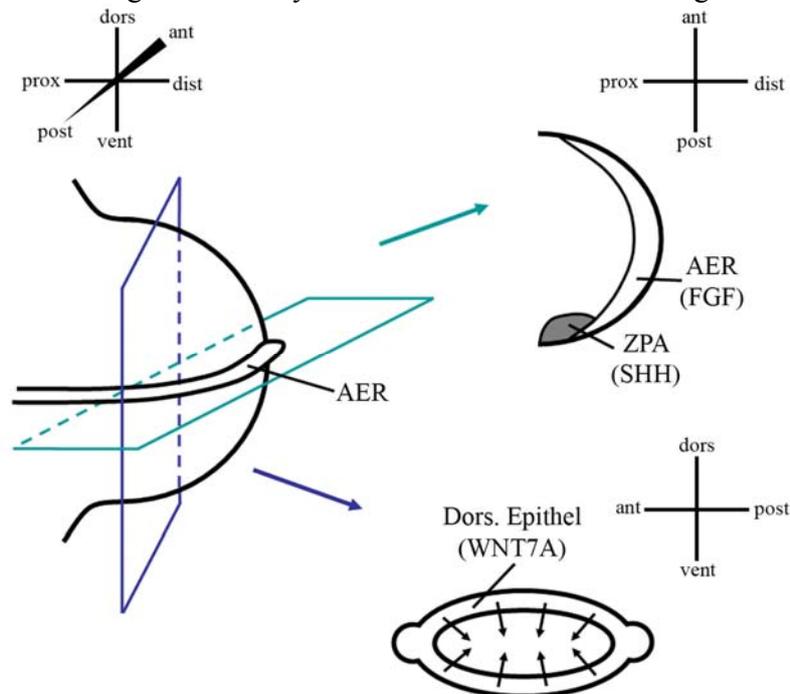
Anterior-posteriore Muster

Die ZPA liegt im posterioren Mesenchym der Knospe und erzeugt die a-p-Achse im distalen Extremitätenabschnitt¹⁰. Die ZPA sezerniert „Sonic hedgehog“ (SHH) und bildet einen SHH-Gradienten¹⁵. In der Extremitätenentwicklung legt SHH die Fingeridentitäten fest und fördert die Proliferation der determinierten Progenitorzellen. Eine Fehlregulation des SHH-Signalweges oder eine Fehlexpression von *Shh* während der Musterbildung führt häufig zur Polydaktylie^{16, 17}. SHH vermittelt seinen morphogenen Effekt durch die Verhinderung der konstitutiven Prozessierung der aktiven Form des Transkriptionsfaktors GLI3 zur Repressorform. So ermöglicht SHH die posteriore Expression der 5'-lokalisierten *Hoxd*-Gene im Autopod und die Festlegung posteriorer Fingeridentitäten¹⁰. Anterior verhindert das Fehlen von SHH zunächst die Expression 5'-lokalisierter *Hoxd*-Gene¹⁸. Außerdem induziert SHH die Expression von knochenmorphogenen Proteinen („Bone morphogenetic proteins“, BMPs) die ebenfalls die Entstehung der Fingeridentitäten entlang der a-p-Achse regulieren¹⁹. Die a-p Achse entsteht und wird aufrechterhalten durch die wechselseitige Interaktion zwischen SHH und der Repressorform von GLI3, die die *Shh*-Expression auf das posteriore Mesenchym begrenzt¹⁸.

Dorsal-ventrales Muster

Das dorsal-ventrale Muster resultiert aus Signalen, die vom Epithel an das darunter liegende Mesenchym weitergegeben werden¹¹. Das dorsale Epithel dorsalisiert die Extremität, indem es das Signalprotein WNT7A sekretiert und so den Transkriptionsfaktor LMX-1B im Mesenchym induziert. Auch die *Shh*-Expression der ZPA wird während des Wachstums der Extremität durch die dorsale *Wnt7a*-Expression aufrechterhalten¹¹. BMPs aktivieren die Expression des epithelial produzierten Transkriptionsfaktors „Engrailed“ (EN1)²⁰. EN1 ventralisiert das Mesenchym, indem es ventralseitig die epitheliale Expression von *Wnt7a* unterdrückt und ist außerdem an der Bildung der AER beteiligt⁹.

Abbildung 2: Musterbildung in der embryonalen Extremitätenentwicklung bei Landwirbeltieren



Linker Teil der Abbildung: Dreidimensionales Schema der frühen Extremitätenknospe mit der apikalen ektodermalen Randleiste (AER). Die drei Achsen der Musterbildung: Proximal (prox) – distal (dist), anterior (ant) – posterior (post), dorsal (dors) – ventral (vent). Die Schnittebenen für die zweidimensionalen Schemata der Extremitätenknospe sind farblich gekennzeichnet. Rechter Teil der Abbildung, rechts oben: Zweidimensionale Schnittansicht entlang der grünen Schnittebene. Die Zone der polarisierenden Aktivität (ZPA) liegt im posterioren Mesenchym und bildet einen Sonic hedgehog (SHH) – Gradienten entlang der post-ant Achse. Die epitheliale AER gibt fibroblastische Wachstumsfaktoren (FGFs) an das Mesenchym ab. Rechts unten: Zweidimensionale Schnittansicht entlang der blauen Schnittebene. Das dorsale Epithel produziert WNT7A und dorsalisiert die Extremität über epithelial-mesenchymale Wechselwirkungen.

1.3.2 Verknöcherung

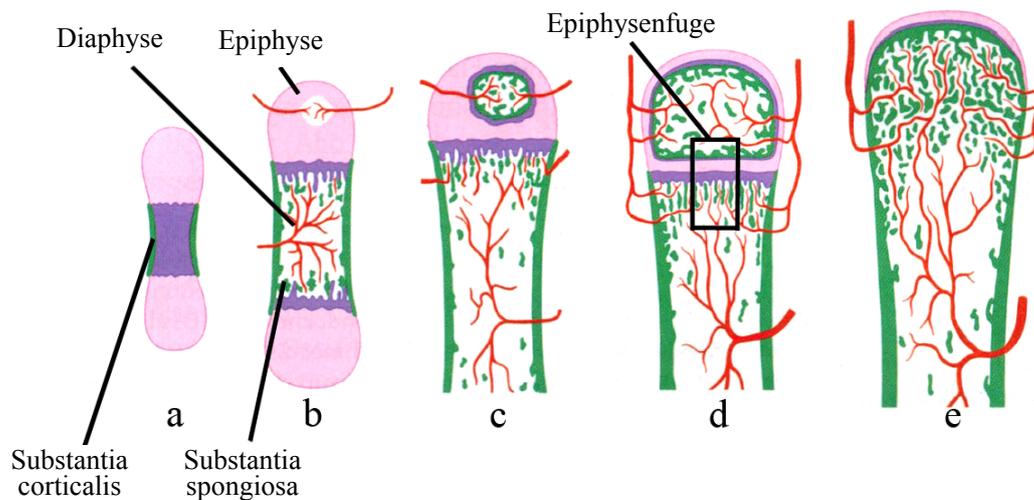
Das Skelett wird in Axial-, Appendikulär- und Kranialskelett unterteilt, die verschiedenen embryonalen Ursprungs sind²¹. Das Axialskelett entstammt den Somiten, das appendikuläre Skelett dem Seitenplattenmesoderm und die kraniofazialen Knochen gehen aus der Neuralleiste hervor. Zum Axialskelett gehören Wirbelsäule, Rippen und Sternum. Es ist mit dem Appendikulärskelett, bestehend aus Schulter- und Beckengürtel sowie den oberen und unteren Gliedmaßen, verbunden. In der Embryonalentwicklung werden individuelle Knochen auf zwei Arten gebildet. Man unterscheidet die direkte bzw. desmale von der indirekten bzw. chondralen Osteogenese.

Bei der desmalen Osteogenese differenzieren Mesenchymzellen direkt zu Osteoblasten. Desmal verknöchern die platten Schädelknochen, der Gesichtsschädel und die laterale Clavicula.

Die weitaus häufigere Form der chondralen Osteogenese findet sich hingegen bei der Entwicklung von Röhrenknochen und kurzen Knochen, wie Hand- und Fußwurzelknochen. Sie ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt. Mesenchymale Zellen bilden prächondrogene Kondensationen und differenzieren anschließend zu Chondroblasten. Aus diesen entstehen durch Dickenwachstum und Längenwachstum die knorpeligen Anlagen in Größe und Form des späteren Knochens. Dieses knorpelige Primordialskelett wird anschließend durch Knochen ersetzt. Im Bereich des Knochenschafts (Diaphyse) der Röhrenknochenanlagen erfolgt die Verknöcherung von außen durch perichondrale Ossifikation und führt zur Bildung der Substantia corticalis, der Knochenmanschette. Sie wird aufgrund ihrer Dicke auch als Substantia compacta bezeichnet. Perichondrale Zellen differenzieren dort direkt zu Knochenmatrix abscheidenden Osteoblasten. Dieser Prozess läuft nach Art der desmalen Osteogenese ab. Die den Knorpel umhüllende Knorpelhaut, das Perichondrium, entwickelt sich zur Knochenhaut, dem Periost. Im Inneren der Anlagen von Röhrenknochen und kurzen Knochen erfolgt die Verknöcherung von innen durch endochondrale Ossifikation und führt zur Bildung der Substantia spongiosa. Bei Röhrenknochen entsteht im Knocheninneren in Höhe der Diaphyse das primäre Ossifikationszentrum. Dort differenzieren Knorpelzellen zu hypertrophen Chondrozyten, die extrazelluläre Matrix sezernieren. Am Ende der Embryonalperiode wachsen Blutgefäße über die Knochenmanschette in den verkalkten Knorpel ein und führen Zellen mit sich, die zu blutbildenden Stammzellen, Osteoblasten und Osteoklasten differenzieren. Die Osteoklasten bauen verkalkten Knorpel ab und die Osteoblasten füllen die entstehenden Erosionsherde mit Knochenmatrix, dem sogenannten Osteoid, auf. Dieses lagert Kalksalze ein und mineralisiert. Letztlich stehen die Osteoblasten als metabolisch inaktivere Osteozyten nur noch über Zellausläufer miteinander in Verbindung. Es entsteht trabekulärer Knochen, in dessen Maschenräumen sich das blutbildende Knochenmark

ansiedelt. Der zentrale primäre Knochenkern dehnt sich immer weiter zu den beiden Knochenenden (Epiphysen) hin aus. Überwiegend postnatal entstehen sekundäre Ossifikationszentren in einer oder beiden knorpeligen Epiphysen der Röhrenknochen, sowie in vielen kurzen Knochen, wie Hand- und Fußwurzelknochen. Bei den Röhrenknochen erfolgt das Längenwachstum von der fetalen Phase bis zum Ende der Pubertät in der knorpeligen Übergangszone zwischen Diaphyse und Epiphyse, der Epiphysenfuge. Dort findet die Chondrozytendifferenzierung in Zonen, die morphologisch gut unterscheidbar sind, statt. An die der Epiphyse zugewandte Zone der ruhenden Reservechondrozyten schließt sich die Proliferationszone mit dem Säulenknorpel an. In der weiter diaphysenwärts gelegenen, benachbarten Zone des Blasenknorpels erfolgt die terminale Differenzierung zu hypertrophen Knorpelzellen. Mit der Chondrozytendifferenzierung verändert sich auch die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, die zunehmend mineralisiert. In der an die Diaphyse grenzenden Eröffnungszone gehen die Knorpelzellen zugrunde. Es dringen Blutgefäße, Osteoklasten und osteoidbildende Osteoblasten ein. Bis zum Ende des 20. Lebensjahres verknöchern die Epiphysenfugen. Nur der Gelenkknorpel verbleibt als Überrest der knorpeligen Anlage.

Abbildung 3: Chondrale Osteogenese der Röhrenknochen



Schematische Darstellung der chondralen Osteogenese. Knorpel rosa, Knochen grün, mineralisierte Knorpelmatrix violett, Blutgefäße rot. (a) Es entsteht die knorpelige Anlage, deren Chondrozyten im Inneren mineralisierte Matrix bilden. Die Substantia corticalis im Bereich der späteren Diaphyse wird durch perichondrale Ossifikation gebildet. (b) In die Diaphyse dringen mit den Blutgefäßen Osteoblasten und Osteoklasten ein und das primäre Ossifikationszentrum entsteht. Dort führt die endochondrale Ossifikation zur Bildung von Substantia spongiosa. Auch in die zunächst knorpelige Epiphyse dringen Blutgefäße ein. (c) Die endochondrale Ossifikation in der Diaphyse schreitet zu den Epiphysen fort und beginnt später auch im sekundären Ossifikationszentrum der Epiphyse. (d) Die Ossifikationszentren dehnen sich weiter aus, bis sie nur noch durch die knorpelige Epiphysenfuge getrennt sind. (e) Im ausgewachsenen Zustand ist die Epiphysenfuge geschlossen. Abbildung modifiziert aus²².

1.4 *Bmp*-Gene

Bmp-Gene kodieren knochenmorphogene Proteine („Bone morphogenetic proteins“, BMPs), die als Wachstumsfaktoren der TGFbeta-Superfamilie vielfältige Funktionen ausüben. Sie wurden in den 60er Jahren aufgrund ihrer Fähigkeit, im Tierversuch ektopen Knochen zu bilden, entdeckt.

1.4.1 *Bmp*-Gene in der Extremitätenentwicklung

Vor allem *Bmp2, 4, 7* und *Gdf5*, die allesamt zu den *Bmps* zählen, steuern die Extremitätenentwicklung. Sie spielen dabei vielfältige, teils antagonistische Rollen in Abhängigkeit vom Gewebe und Entwicklungsstadium. So kann der BMP-Signalweg die Apoptose in den frühen prächondrogenen Kondensationen negativ regulieren²³ und später die Trennung der Finger durch Förderung der interdigitalen Apoptose begünstigen¹⁰. Auch Proliferation und Fingerzahl werden sowohl positiv als auch negativ reguliert²⁴. In der frühen Extremitätenentwicklung sind *Bmps* an der Musterbildung beteiligt, während sie in späteren Stadien die Kondensation mesenchymaler Zellen sowie die Knorpel- und Knochenbildung regulieren^{24, 25}. Die endochondrale Ossifikation wird dabei durch BMP-Proteine über den kanonischen SMAD-Signalweg gesteuert²⁶. Auch die Gelenkbildung wird durch ein Mitglied der BMP-Familie, *Gdf5*, und den BMP-Antagonisten *Noggin* reguliert²⁷.

1.4.2 *Bmp*-Signaltransduktion

Die trans- und intrazelluläre *Bmp*-Signalweiterleitung steuert letztlich die Genexpression. Dimere, aktive BMP-Proteine werden nach ihrer intrazellulären Reifung sezerniert. Sie binden extrazellulär an Transmembran-Rezeptoren. Die nachfolgende, intrazelluläre Signaltransduktion erfolgt über einen allen Mitgliedern der TGFbeta-Superfamilie eigenen Mechanismus²⁸. BMPs binden an membranständige Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren vom Typ I und Typ II. Anschließend transphosphorylieren Typ II-Rezeptoren die Typ I-Rezeptoren und bewirken deren Aktivierung. Zwei Proteingruppen sorgen für die Spezifität der Interaktion zwischen Rezeptoren und Liganden. Erstens inhibieren extrazelluläre diffusible Antagonisten wie NOGGIN konzentrationsabhängig die BMP-Wirkung. Die Antagonisten binden direkt an BMPs und verhindern deren Interaktion mit Rezeptoren. Zweitens modulieren membranständige Ko-Rezeptoren die spezifische Rezeptorbindung und Signalweiterleitung der BMPs. Das Zusammenführen von Rezeptoren durch BMPs aktiviert den Mitogen-aktivierte Protein (MAP)-Kinase-Signalweg, während die Bindung von BMPs an präformierte Rezeptorkomplexe den kanonischen SMAD-Signalweg aktiviert²⁹. Dabei phosphoryliert der Typ I Rezeptor die im

Grundzustand überwiegend zytoplasmatisch lokalisierten Rezeptor-SMADs 1, 5 und 8. Daraufhin dissoziieren die Rezeptor-SMADs vom Rezeptor ab und bilden heteromere Komplexe mit dem gemeinsamen Partner-SMAD („Common-partner SMAD“) 4. Die SMAD-Komplexe translozieren in den Zellkern und steuern dort die Expression von Zielgenen. Nach anschließender Dephosphorylierung dissoziieren die SMAD-Komplexe und die nun homomeren SMADs gelangen zurück ins Zytoplasma, wo sie erneut für die Signaltransduktion zur Verfügung stehen. So erzielt die kontinuierliche Zirkulation der SMADs zwischen Kern und Zytoplasma eine Kopplung zwischen Rezeptoraktivität und SMAD-Signalaktivität. In einem negativen Rückkopplungsmechanismus induzieren aktive SMAD-Komplexe die inhibitorischen SMADs 6 und 7, die die SMAD-Signaltransduktion beendigen.

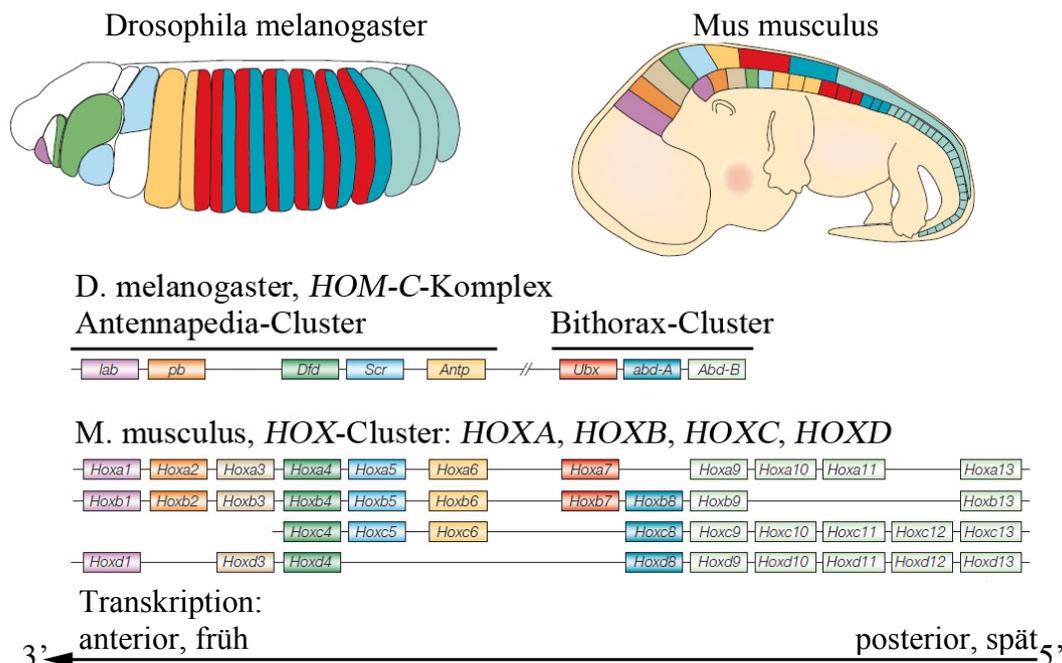
1.5 *Hox*-Gene

Die *Hox*-Gene kodieren eine evolutionär stark konservierte Familie von Transkriptionsfaktoren, deren Gemeinsamkeit die Homöodomäne darstellt. Sie regulieren die Embryonalentwicklung vieler Organe und Strukturen, wie der primären Körperachse und der Extremitäten³⁰. Mutationen in *Hox*-Genen oder die Verschiebung ihrer Expression entlang der von ihnen definierten Achse können eine homöotische Transformation verursachen. Dabei wird ein Körpersegment durch ein anderes, normalerweise an einem benachbarten Ort vorkommendes, ersetzt. Aufgrund dieser Fähigkeit wurden *Hox*-Gene erstmals in *Drosophila melanogaster* entdeckt, wo die homöotische Transformation beispielsweise zur Entstehung von Antennen anstelle von Beinen führt. Bei Wirbeltieren können benachbarte Wirbelsegmente entlang der Wirbelsäule homöotisch ineinander transformiert werden³¹. Analog führt während der Extremitätenentwicklung die Überexpression von *Hoxa13* zur homöotischen Transformation von Zeugopod- in distalere Autopod-Knorpel³² und die Expression vom mutierten *Hoxd13* im Autopod zur homöotischen Transformation von Metakarpal- zu Karpalknochen³³. Charakteristischer Bestandteil der *Hox*-Gene ist die konservierte 180 Basenpaare lange Homöobox. Sie kodiert die Protein-Homöodomäne mit ihrem typischen Helix-Turn-Helix-Motiv, das die relativ unspezifische Bindung an Konsensus-Sequenzen der DNA vermittelt. Mit DNA-bindenden Partnern bilden HOXe multimere Proteinkomplexe, die spezifisch an regulatorische DNA-Sequenzen binden und die Transkription von Zielgenen regulieren³⁴. Die *Hox*-Gene sind in Clustern angeordnet. Bei *Drosophila melanogaster* besteht der *HOM-C*-Komplex aus acht Genen. Diese sind auf zwei separate, auf demselben Chromosom liegende Cluster verteilt, den Antennapedia- und den Bithorax-Cluster. Säuger hingegen besitzen 39 *Hox*-Gene, die in 4 Clustern, *HOXA*, *B*, *C* und *D*, auf verschiedenen Chromosomen arrangiert sind. Die Cluster entstanden im Laufe der Evolution durch mehrere Duplikationen eines

Einleitung

ursprünglichen *Hox*-Clusters, einhergehend mit dem Verlust einzelner Gene. Daher ähneln sich die Sequenzen von Genen an korrespondierenden Cluster-Positionen, sogenannten paralogen Genen. Bei Säugern werden die *Hox*-Gene in 13 paraloge Gruppen gegliedert, deren Sequenzhomologie untereinander größer ist als die Sequenzhomologie der *Hox*-Gene innerhalb eines Clusters³⁰. Die *Hox*-Expression bei Landwirbeltieren ist stark konserviert und folgt, wie in Abbildung 4 dargestellt, in der Embryonalentwicklung dem Prinzip der zeitlichen und räumlichen Kolinearität^{30,35}. Dabei werden am 3'-Ende der DNA gelegene Gene früh und während der Entwicklung des Achsenskeletts anterior, zum Beispiel im Rhombencephalon³⁶, bzw. während der Entwicklung der Extremitäten proximal und anterior³⁷ exprimiert. Die am 5'-Ende der DNA gelegenen *Hox*-Gene hingegen werden später, in der Entwicklung der primären Körperachse weiter posterior, zum Beispiel in den kaudalen Wirbelsegmenten, exprimiert. Während der Extremitätenentwicklung erfolgt ihre Expression posterior und distal.

Abbildung 4: *Hox*-Expression und Anordnung der *Hox*-Gene



Oberer Abbildungsteil: Schema eines *Drosophila melanogaster* (*D. m.*) – und eines *Mus musculus* (*M. m.*) –Embryos mit farblich gekennzeichneten Expressionsdomänen der *Hox*-Gene, deren Farbkennzeichnung mit den entsprechenden *Hox*-Genen im unteren Abbildungsteil übereinstimmt.

Unterer Abbildungsteil: Schematische Anordnung der *Hox*-Gene in *D. m.* und *M. m.* Bei *D. m.* sind die *Hox*-Gene auf den Antennapedia- und den Bithorax-Cluster des HOM-C-Komplexes auf einem Chromosom verteilt. Genabkürzungen: *lab*, labial; *pb*, proboscipedia; *Dfd*, Deformed; *Scr*, Sex combs reduced; *Antp*, Antennapedia; *Ubx*, Ultrabithorax; *abd-A*, abdominal-A; *Abd-B*, Abdominal-B. Die *Hox*-Gene bei *M. m.* sind in vier Clustern *HOXA, B, C, D* auf vier Chromosomen arrangiert. Es werden 13 paraloge *Hox*-Gruppen 1-13 unterschieden. Der Pfeil zeigt die Richtung der Transkription an, die zeitlich und räumlich kolinear erfolgt. Abbildung nach³⁸.

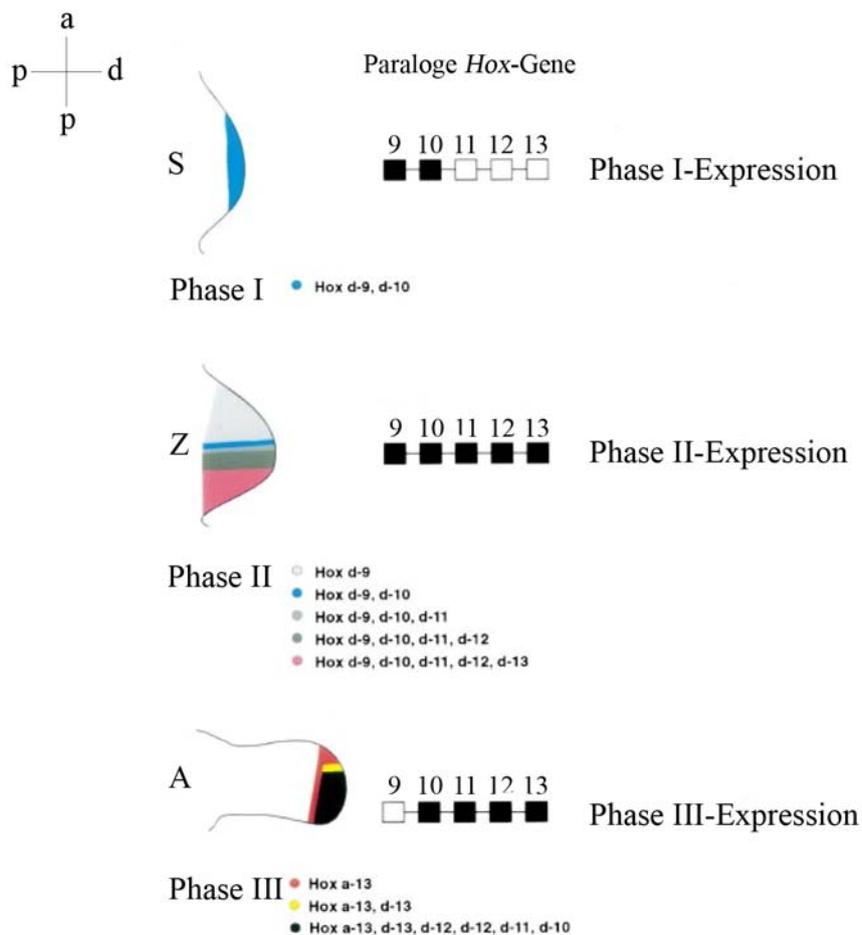
1.5.1 *Hox*-Gene in der Skelett- und Extremitätenentwicklung

Während der Entwicklung des Achsenskeletts werden *Hox*-Gene teils überlappend exprimiert und legen die Segmentidentitäten entlang der anterior-posterioren (a-p) Körperachse fest³⁶. In der Extremitätenentwicklung regulieren *Hox*-Gene die aufeinander folgenden Prozesse Musterbildung, Verknorpelung und Verknöcherung^{33, 39}. Hauptsächlich die paralogen Gruppen 9-13 des *HOXA*- und *HOXD*-Clusters steuern die Funktion der ZPA und der AER in der Musterbildung⁴⁰. *HOXD13* reguliert direkt die Genexpression essentieller Signalwege, die sowohl die a-p als auch die proximal-distale (p-d) Musterbildung sowie später die Skeletogenese kontrollieren⁴¹.

Die räumliche Expression der *Hox*-Gene ändert sich im zeitlichen Verlauf, wobei die Expressionsmuster paraloger Gene sich ähneln^{1, 37, 42}. Aufgrund ihrer überlappenden Expression regulieren Kombinationen von *Hox*-Genen die Genexpression⁴⁰. Schematisch sind die sich dynamisch ändernden Phasen der *Hox*-Expression in Abbildung 5 dargestellt. Zunächst werden die 3'-gelegenen Gene *Hoxd9* und *Hoxd10* zum Zeitpunkt der Festlegung des Stylopods in der gesamten Extremitätenknospe exprimiert. Danach werden die *Hoxd*-Gene in zeitlichen und räumlichen Mustern kolinear exprimiert. Die 3'-lokalisierten Gene werden zuerst und proximal exprimiert. Die 5'-lokalisierten Gene hingegen werden später und weiter distal, in der Spitze der ausknospenden Extremität, exprimiert. Dann bilden die Expressionsdomänen der *Hoxd*-Gene ein ineinander geschachteltes a-p-Muster aus, um die Strukturen des Zeugopods festzulegen. Dabei sind die kleineren Expressionsdomänen der 5'-lokalisierten Gene im Laufe der Entwicklung zunehmend auf die posterior-distale Extremitätenknospe begrenzt. Die größeren Expressionsdomänen der 3'-gelegenen Gene dehnen sich hingegen nach weiter anterior-proximal aus und enthalten somit die Expressionsdomänen der 5'-gelegenen Gene. Die Zellen in der ausknospenden Extremität exprimieren entsprechend ihrer Position verschiedene *Hoxd*-Kombinationen, wobei die posterioren Zellen der ZPA alle *Hoxd*-Gene exprimieren. Die paralogen *Hoxa*-Gene zeigen während der Extremitätenentwicklung ein ähnliches kolineares Expressionsmuster. Allerdings verschwindet die a-p Polarität im Verlauf und es verbleibt lediglich ein p-d Muster⁴³. Während des Auswachsens der Extremität wird das Expressionsmuster zunehmend komplexer. Die Entstehung des späteren Autopods wird durch *Hoxa13* sowie *Hoxd10-13*, hauptsächlich jedoch durch *Hox*-Gene der paralogen Gruppen 11-13, gesteuert⁴⁴. Dabei kehrt sich das a-p-Expressionsmuster um und *Hoxa13* und *Hoxd13* werden in den größten, am weitesten nach anterior reichenden Domänen exprimiert. 3'-gelegene *Hox*-Gene werden hingegen in kleineren, weiter posterior lokalisierten Domänen transkribiert^{1, 42}.

Einleitung

Abbildung 5: Dynamische Phasen der *Hox*-Expression in der Extremitätenentwicklung



Schematische Darstellung der *Hox*-Expression (schwarze Kästchen kennzeichnen exprimierte *Hox*-Gene) während der Extremitätenentwicklung der Landwirbeltiere entlang der proximal-distalen (p-d) und anterior-posterioren (a-p) Achse im zeitlichen Verlauf. In den zeitlich aufeinander folgenden Phasen I-III werden die verschiedenen Extremitätenabschnitte Stylopod (S), Zeugopod (Z) und Autopod (A) angelegt. Dabei unterscheiden sich die Expressionsmuster posteriorer *Hox*-Gene in der Extremitätenknospe und werden im Verlauf zunehmend komplexer. Abbildung nach¹.

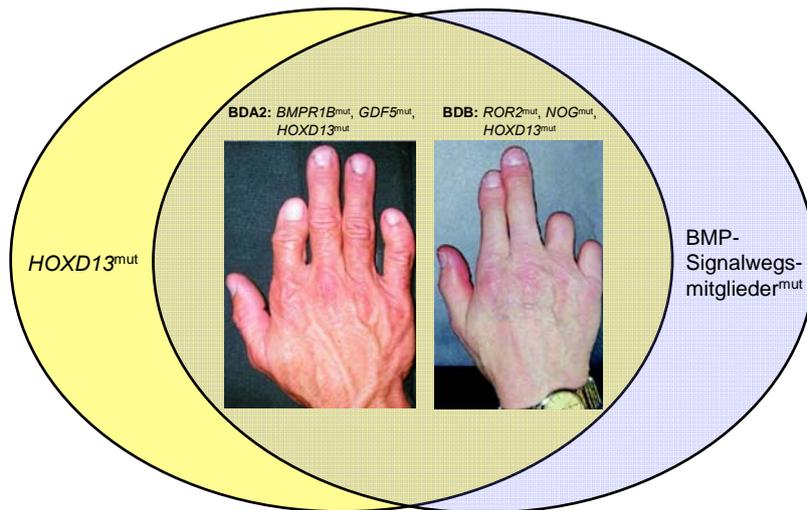
1.6 Interaktion von *Hox*-Genen und BMP-Signalweg

Mitglieder des BMP-Signalwegs und *Hox*-Gene steuern die Extremitätenentwicklung mittels eines gemeinsamen regulatorischen Netzwerks und werden im Autopod teils überlappend exprimiert^{4,33}. Daher führen ihre Mutationen zu ähnlichen Phänotypen, der molekularen Krankheitsfamilie der Brachydaktylien⁴⁵, wie Abbildung 6 zeigt. Mutationen von Mitspielern des BMP-Signalwegs verursachen isolierte Brachydaktylien. Sie wurden identifiziert im BMP-Mitglied *GDF5*, dem BMP-Antagonisten *NOGGIN*, dem BMP-Rezeptor *BMPRII* und dem Tyrosinkinase-Rezeptor *ROR2*, der mit dem BMP-Signalweg interagiert⁴⁵. Gleichmaßen führen Mutationen der *HOX*-Gene der paralogen Gruppe 13 zu isolierten und kombinierten

Einleitung

Brachydaktylien sowie zu Brachydaktylien als Bestandteil von Krankheitssyndromen. So verursachen Missense-Mutationen der *HOXD13*-Homöobox isolierte Brachydaktylien⁴⁵. Die Expansion des *HOXD13*-Polyalaninrepeats verursacht SPD mit Brachydaktylie⁴⁶. Die Expansion eines *HOXA13*-Polyalaninrepeats oder zu Trunkierungen führende Mutationen des *HOXA13* verursachen das Hand-Fuß-Genitalsyndrom mit Brachydaktylie⁴⁵.

Abbildung 6: Ähnliche Phänotypen durch Mutationen in *HOXD13* und der BMP-Signalkaskade



Mutationen des *HOXD13* und der BMP-Signalkaskade führen zu ähnlichen Phänotypen. So verursachen Mutationen des *HOXD13*, des BMP-Rezeptors 1B (*BMPR1B*) und des BMP-Mitglieds *GDF5* Brachydaktylie A2 (BDA2). Mutationen des *HOXD13*, der Rezeptor-Tyrosinkinase *ROR2* und des BMP-Antagonisten *NOGGIN* (*NOG*) verursachen Brachydaktylie B (BDB). Fotos aus^{47, 48}.

Des Weiteren interagieren SMAD-Transkriptionsfaktoren, die Signalwandler des BMP-Signalwegs, mit HOX-Proteinen^{49, 50}. Sowohl HOX- als auch SMAD-Transkriptionsfaktoren erkennen und binden vielfältige DNA-Sequenzen relativ unspezifisch. Um eine spezifische DNA-Bindung zu erzielen, bilden HOXe multimeren Komplexe mit DNA-bindenden Kofaktoren⁵². Die meisten HOXe erkennen sogenannte „HOX-response elements“, die mehrere HOX-Bindungsstellen sowie weitere Bindungsstellen für HOX-Kofaktoren enthalten³⁸. Auch SMADs binden mit geringer Affinität und Spezifität an ihre DNA-Erkennungssequenzen. Sie binden direkt an SMAD-bindende Elemente (SBEs), die einzeln oder gruppiert in vielen SMAD-responsiven Promotorregionen vorkommen, und an GC-reiche Sequenzen⁵¹. Zusammen bilden SBEs, GC-reiche Erkennungssequenzen und weitere koregulatorische Bereiche die sogenannten BMP-responsiven Elemente (BREs)⁵³. Als Antwort auf BMP-Signale binden SMADs neben SBEs auch BREs und regulieren mit weiteren DNA-bindenden Faktoren und Koaktivatoren bzw. Korepressoren die spezifische Transkription von Zielgenen⁵¹. Zu den SMAD-Partnern für eine gezielte Regulation der Transkription zählen unter anderem *HOXD13* und *HOXA13*^{49, 50}.

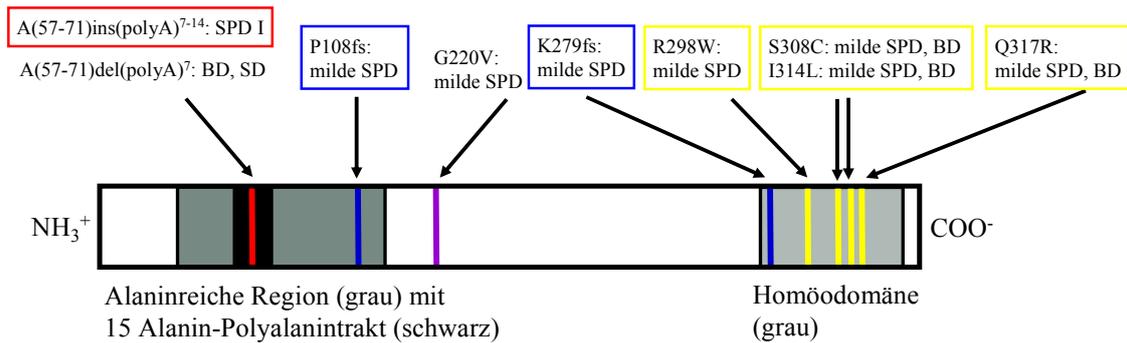
1.7 Extremitätenfehlbildungen durch Mutationen in *Hox*-Genen

Die kolinear exprimierten *Hox*-Gene der paralogen Gruppen 9-13 steuern die Entwicklung der Extremitäten. *Hoxa*- und *Hoxd*-Gene der Gruppen 9 und 10 kontrollieren im frühen Knospenstadium hauptsächlich die Entwicklung des Stylopods. *Hox*-Gene der Gruppe 11 steuern vor allem die Entwicklung des Zeugopods und *Hoxa13* sowie *Hoxd10-13* steuern die Entwicklung des Autopods⁴⁴. Dabei sind für die Autopodentstehung *Hoxa13* und *Hoxd13* essentiell^{54,55}. Der Funktionsverlust von *Hox*-Genen der Gruppen 9-13 verursacht schwere Trunkierungen der Gliedmaßen entlang der p-d-Achse⁴⁰. Dabei können paraloge Gene die Auswirkungen von Funktionsverlust-Mutationen teils kompensieren, da partiell funktionelle Redundanzen vorliegen. Doppelt *Hoxd9/Hoxa9*-defiziente Mäuse weisen Defekte des Humerus auf⁵⁶. Mäuse, denen sowohl *Hoxd11* als auch *Hoxa11* fehlt, bilden Extremitäten mit einem trunkierten Zeugopod⁵⁷. Entsprechend der kolinearen Expression führen Knockout-Mutationen der paralogen Gruppe 10 zu proximaleren Trunkierungen als solche der paralogen Gruppe 11⁵⁸. Der Verlust von *Hoxd13*^{59,60}, *Hoxd11*⁶¹, *Hoxd12*⁶⁰ oder *Hoxa13*⁵⁴ allein oder in verschiedenen Kombinationen^{60,62} führt zu Autopod-Defekten und Fingerfehlbildungen. Bei Mutanten ohne *Hoxa13* und *Hoxd13* fehlt das Autopod fast vollständig⁵⁴. Die gleichzeitige Elimination der *HOXA*- und *HOXD*-Cluster führt zu einer starken Verkürzung des Stylopods, Zeugopod und Autopod fehlen⁵⁵.

1.7.1 Mutationen in *Hoxd13*

Mutationen verschiedener Bereiche des humanen *HOXD13* führen zu Malformationen des Autopods. Die Veränderungen auf Proteinebene sind schematisch in Abbildung 7 gezeigt. *HOXD13* ist das am weitesten zentromerisch und 5'-gelegene Gen des *HOXD*-Clusters auf dem langen Arm des Chromosoms 2 und enthält zwei Exons. Das erste Exon beinhaltet einen Trinukleotidrepeat, der für einen N-terminalen 15-Alanin-Trakt kodiert. Exon 2 kodiert unter anderem die C-terminal liegende Homöodomäne. Das breite Spektrum an Extremitätenfehlbildungen durch Mutationen des *HOXD13* lässt sich phänotypisch in drei, teils überlappende Gruppen untergliedern⁶³: Expansionen des normalerweise 15 Alanine langen Polyalanintrakts um 7-14 zusätzliche Alanine verursachen Synpolydaktylie (SPD) 1^{46,64,65,66}. Missense-Mutationen der Homöodomäne verursachen einen Funktionsverlust und führen zu verschiedenen Brachydaktylien und/oder milder SPD. In Trunkierungen resultierende Frameshift-Deletionen bewirken milde Formen der SPD⁶³.

Abbildung 7: Auswirkungen von Mutationen des humanen *HOXD13* auf Proteinebene



Durch *HOXD13*-Mutationen hervorgerufene Fehlbildungen des Autopods lassen sich in drei phänotypische, teils überlappende Gruppen untergliedern. Verschieden lange Expansionen des Palyalanintrakts [A(57-71)] um 7-14 Alanine [ins(polyA⁷⁻¹⁴)] verursachen Synpolydaktylie (SPD) 1 und sind rot markiert. Zu Trunkierungen führende Frameshift-Mutationen [fs] verursachen milde Formen der SPD und sind blau markiert. Missense-Mutationen der Homöodomäne führen überwiegend zu Brachydaktylien (BD) mit milder SPD bzw. isolierter, milder SPD und sind gelb markiert. Eine Deletion von 7 Alaninen im Palyalanintrakt [del(polyA)⁷] verursacht das Brachydaktylie-Syndaktylie (BD, SD)-Syndrom. Eine Missense-Mutation an Position 220 [G220V] führt zu milder SPD. Schematische Darstellung in Anlehnung an⁶³ und gemäß OMIM-Eintrag *142989 (*HOXD13*).

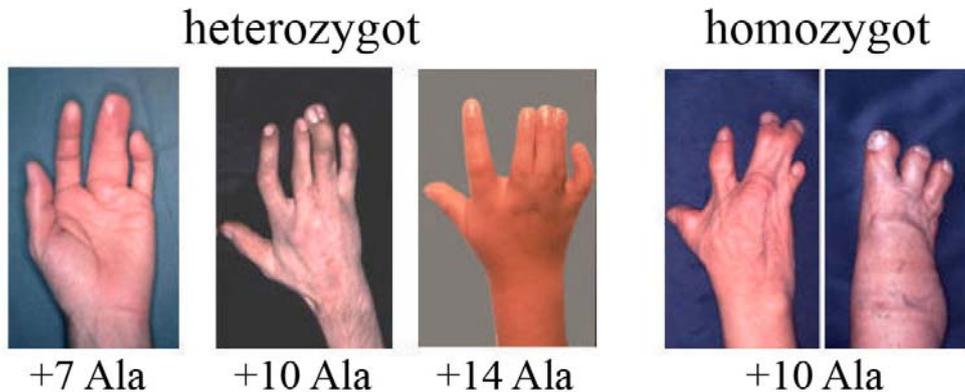
Humane Synpolydaktylie

SPD 1 war die erste Erbkrankheit, als deren Ursache eine Palyalaninrepeat-Expansion in *HOXD13*, identifiziert wurde. Hauptsächlich das Autopod ist betroffen. Kennzeichnend bei Heterozygoten sind eine Syndaktylie des Weichgewebes des 3. und 4. Fingers bzw. 4. und 5. Zehs und zentrale Polydaktylie zwischen dem 3. und 4. Finger. Zusätzlich treten weitere Fehlbildungen wie Klinodaktylie (abgewinkelte Phalangen), Kamptodaktylie (Beugekontraktur der Mittelgelenke) und Brachydaktylie des 5. Fingers sowie variable Syndaktylie der 2.-5. Zehe, Brachy- und postaxiale Polydaktylie der Zehen auf. Es können ein bis alle vier Gliedmaßen betroffen sein. Der variable phänotypische Ausprägungsgrad reicht von partieller häutiger Syndaktylie bis zur kompletten Verdopplung eines Fingers bzw. Zehs. Bei männlichen Betroffenen mit einem mutierten, 29 Alanine kodierenden Repeat in *HOXD13* kann zusätzlich die urogenitale Fehlbildung Hypospadie auftreten⁴⁶. Bei den seltenen Homozygoten findet sich ein ausgeprägter Phänotyp aller vier Extremitäten mit schwerer Synpoly- und Brachydaktylie⁶⁷. Selten tritt zusätzlich eine reduzierte Zehenanzahl auf⁶⁴. Verschiedene phänotypische Ausprägungen sind in Abbildung 8 gezeigt. SPD 1 wird semidominant vererbt. Bei Heterozygoten entspricht der Phänotyp eher dem dominanten Allel, allerdings bleibt die Wirkung des rezessiven Allels erkennbar. Die Wahrscheinlichkeit der phänotypischen Ausprägung, die sogenannte

Einleitung

Penetranz, korreliert ebenso wie der phänotypische Ausprägungsgrad, die sogenannte Expressivität, mit der Expansionslänge des Polyalaninrepeats. Kurze Expansionen verursachen eine inkomplette Penetranz und eine intrafamiliär und intraindividuell variable Expressivität⁴⁶.

Abbildung 8: *HOXD13*-assoziierte Synpolydaktylie 1



Polyalaninrepeat-Expansionen in *HOXD13* führen zu Synpolydaktylie 1. Penetranz und Expressivität korrelieren mit der Expansionslänge (+Ala) des normalerweise 15 Alanine kodierenden Polyalaninrepeats. Dargestellt sind Fotografien von Händen betroffener hetero- und homozygoter Individuen. Fotos von Dr. Pia Kuss, Berlin.

Murine Synpolydaktylie

Die mutante Mauslinie „*synpolydactyly homolog*“ (*spd*) besitzt eine spontan aufgetretene Polyalaninrepeat-Expansion des *Hoxd13* von 15 auf 22 Alanine. Aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeit dient die homozygote *spd*-Maus als Modellorganismus für die Untersuchung der molekularen Pathogenese der humanen SPD¹⁶⁸. Die Vererbung erfolgt rezessiv und Heterozygote weisen sehr milde Phänotypen auf. Bei homozygoten Tieren hingegen finden sich Fehlbildungen des Autopods, es kommt zur SPD in Verbindung mit Brachydaktylie. Männliche Tiere sind infertil. Außerdem sind die Differenzierung und spätere Verknöcherung der knorpeligen Elemente verzögert und die Gelenkbildung gestört^{4,39}. Der Phänotyp zeichnet sich durch eine hohe Varianz aus, wobei die Expressivität in den Vorderpfoten stets die in den Hinterpfoten übertrifft.

1.7.2 Mutationen in *Hoxa13*

Das dominant vererbte Hand-Fuß-Genitalsyndrom wird verursacht durch Nonsense-Mutationen, Missense-Mutationen der Homöobox sowie Expansionen in drei von insgesamt fünf im ersten Exon enthaltenen Polyalaninrepeats des *HOXA13*^{69,70}. Der Phänotyp ist charakterisiert durch hypoplastische Daumen und Großzehen sowie hypoplastische distale Phalangen. Daneben treten Klino- und Brachydaktylie des 5. Fingers sowie Brachydaktylie der 2. - 5. Zehe auf. Diese

Fehlbildungen sind voll penetrant, bilateral symmetrisch und mit nur geringen Expressivitätsunterschieden ausgebildet. Die zusätzlichen, urogenitalen Fehlbildungen sind inkomplett penetrant mit variabler Expressivität⁶⁹. Die Malformation des Autopods repräsentiert einen Funktionsverlust des mutierten *HOXA13+Ala*, während die urogenitalen Fehlbildungen möglicherweise Ausdruck eines zusätzlichen Funktionsgewinns sind⁷¹. Der Funktionsverlust beruht auf der vermehrten Degradation des expandierten *HOXA13+Ala in vivo*⁷¹.

1.8 Molekulare Pathogenese der *Hoxd13*-assoziierten Synpolydaktylie

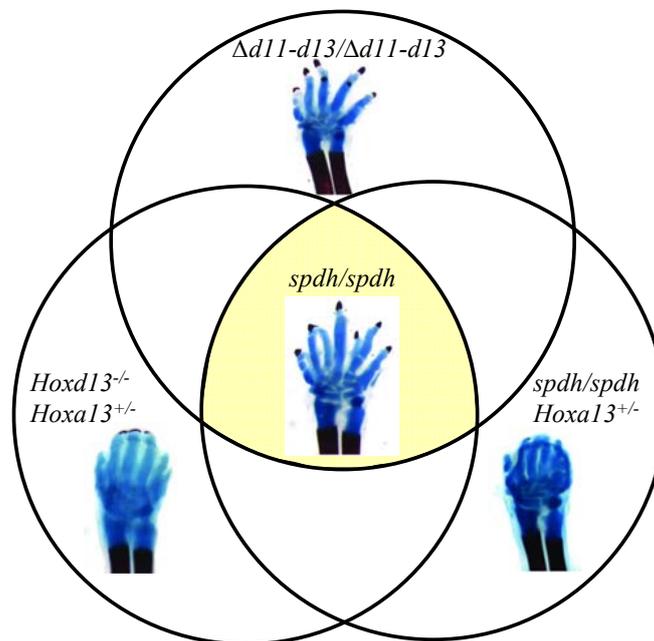
Die molekulare Pathogenese beschäftigt sich mit dem Zusammenhang zwischen genetischer Veränderung und klinischem Phänotyp⁷². Dafür wird der Effekt einer Mutation auf Quantität und Funktion des Genprodukts untersucht. Man unterscheidet Funktionsverlust- von Funktionsgewinn-Mutationen. Funktionsverlust-Mutationen inaktivieren das Genprodukt und führen zum gleichen klinischen Phänotyp wie Gendeletion oder -disruption, wohingegen Funktionsgewinn-Mutationen einen spezifischen Phänotyp verursachen. Eine Mutation kann auch gleichzeitig zu Funktionsgewinn- und Funktionsverlust-Effekten führen, wenn beispielsweise die ursprüngliche Genfunktion eingebüßt wird und gleichzeitig neue Eigenschaften akquiriert werden. Behindert ein mutiertes Protein das Genprodukt eines weiteren Allels, wird dies als negativer Effekt bezeichnet. Man unterscheidet die Wirkung des mutierten Proteins auf das Genprodukt des Wildtyp-Allels in Heterozygoten (dominant negativer Effekt) von einer Wirkung auf Genprodukte weiterer, oft paraloger Gene (negativer Effekt). Voraussetzung dafür ist eine Interaktion von mutiertem und Wildtyp-Genprodukt, die gehäuft bei multimeren Proteinen auftritt.

Der SPD zugrunde liegende Expansionen des *HOXD13*-Polyalaninrepeats verursachen vermutlich eine Kombination aus Funktionsverlust und Funktionsgewinn³⁹. Für einen Funktionsgewinn sprechen folgende Beobachtungen: Erstens unterscheiden sich die humane SPD sowie der Phänotyp der *spdh*-Maus deutlich von der bei Funktionsverlust-Mutationen auftretenden schwächeren Fehlbildung des Autopods^{4, 59, 63}. Der Phänotyp der *spdh*-Maus kann also nicht auf einem reinen Funktionsverlust des *Hoxd13+Ala* beruhen. Zweitens korreliert die Länge des expandierten Polyalaninrepeats des mutierten *Hoxd13+Ala* mit Expressivität und Penetranz der SPD⁴⁶. Analog dazu korreliert *in vitro* die *Hoxd13+Ala*-Expansionslänge mit dem Ausmaß der zytoplasmatischen Aggregation fehlkonformierten Proteins⁷³. Im Rahmen des Funktionsgewinns übt elongiertes *Hoxd13+Ala* in der Autopodentwicklung vermutlich einen negativen Effekt auf 5'-lokalisierte *Hox*-Gene aus^{74, 75}. Darauf deuten Phänotypenvergleiche und Kreuzungsexperimente der *spdh*-Maus mit weiteren mutanten Mauslinien hin, wie Abbildung 9 zeigt. Erstens besteht eine starke phänotypische Ähnlichkeit zwischen homozygoten *spdh*-Mäusen

Einleitung

und solchen, bei denen *Hoxd11*, *12* und *13* homozygot in den Extremitäten inaktiviert sind. Bei beiden Mutanten ist die Knorpelbildung gestört, die Verknöcherung verzögert und es tritt eine zentrale SPD auf^{33, 74, 76}. Zweitens zeigen Kreuzungsexperimente, dass expandiertes *Hoxd13+Ala* möglicherweise einen negativen Effekt auf das paraloge *Hoxa13* ausübt. Die Inaktivierung eines *Hoxa13*-Allels zusätzlich zur homozygoten Inaktivierung von *Hoxd13*^{33, 54} ruft eine zentrale SPD mit drastischer Brachydaktylie hervor und ähnelt dem Phänotypen der homozygoten *spdh*-Maus. Ein ähnlicher, aber schwerwiegenderer Phänotyp wird durch die zusätzliche Inaktivierung eines *Hoxa13*-Allels in *spdh*-Homozygoten verursacht³³.

Abbildung 9: Ähnliche Synpolydaktylie-Phänotypen verschiedener *Hox*-Mausmutanten



Die Abbildung zeigt Fotos der Vorderpfoten verschiedener Mausmutanten im postnatalen Stadium P0, die allesamt eine Synpolydaktylie aufweisen. Die phänotypische Ähnlichkeit von homozygoten *spdh*-Mäusen mit expandiertem *Hoxd13*-Polyalaninrepeat (*spdh/spdh*) und solchen mit einer homozygoten Inaktivierung von *Hoxd11,12* und *13* ($\Delta d11-d13/\Delta d11-d13$) sowie mit durch Verkreuzung entstandenen Mausmutanten mit einer heterozygoten Inaktivierung von *Hoxa13* ($Hoxa13^{+/-}$) zusätzlich zur homozygoten Inaktivierung von *Hoxd13* ($Hoxd13^{-/-}$) bzw. im homozygoten *spdh*-Hintergrund weisen auf einen negativen Effekt von mutiertem *Hoxd13+Ala* auf 5'-lokalisierte *Hox*-Gene hin. Fotos aus³³.

In *spdh*-Mäusen finden sich mehrere Entwicklungsdefekte des Autopods. So ist die frühe Musterbildung gestört und geht einher mit einer fehlerhaften frühen Expression von *Hox*-Genen und *Bmps*. Außerdem sind die Gelenkentwicklung sowie die Expression der diese regulierenden BMP-Signalwegsmittglieder gestört⁴. Des Weiteren ist die Chondrozytendifferenzierung in den phalangealen Anlagen vermindert und in den Fingerzwischenräumen gesteigert sowie die Knochenbildung fehlerhaft. Durch die unkontrollierte Chondrogenese im interdigitalen

Mesenchym werden zusätzliche Finger gebildet. Zugrunde liegt unter anderem eine vermehrte Degradation des expandierten HOXD13+Ala, die zu einer verminderten Retinsäure-vermittelten Inhibition der Knorpelbildung führt³⁹. Außerdem haben *spdh*-Mäuse ein ungenügend differenziertes, unfunktionelles Perichondrium³³. Die Verknöcherung des Autopods in *spdh*-Mäusen erfolgt vermindert, in abnormen Mustern und verspätet. Dabei werden die Metakarpalknochen in Karpalen-ähnliche Knochen transformiert³³. Auch Proliferation und Apoptose sind in *spdh*-Mäusen gestört. Eine verminderte Größe der knorpeligen Anlagen, gefolgt von einer verringerten Chondrozytenproliferation im Bereich der Phalangen führt zur Brachydaktylie. Die reduzierte Apoptose in den Fingerzwischenräumen und Gelenkregionen trägt zur SPD und fehlerhaften Gelenkbildung bei⁴.

Molekularpathogenetisch liegt der SPD eine Fehlfaltung des expandierten HOXD13+Ala zugrunde. Wildtyp-HOXD13 (HOXD13-wt) befindet sich überwiegend im Zellkern. Hingegen aggregiert expandiertes HOXD13+Ala *in vitro* im Zytoplasma. Die Aggregate sequestrieren HOXD13-wt und verhindern so dessen für die Funktion wichtige Translokation in den Nukleus⁷³. *In vivo* ist wegen des vermehrten Abbaus fehlgefalteten Proteins die Menge zytoplasmatisch lokalisierten mutierten HOXD13+Ala reduziert⁷³.

1.9 Polyaminosäure-Erkrankungen

Etwa ein Drittel des menschlichen Genoms enthält sich wiederholende Sequenzabschnitte, sogenannte Repeats⁷⁷. Diese werden unterteilt in über das Genom versprengte Repeats und direkt aneinander grenzende Tandemrepeats. Eine besondere Tandemrepeat-Klasse sind die Trinukleotidrepeats, bei denen das Leseraster intakt ist. Es werden Trinukleotidrepeats in nicht-kodierenden Sequenzen von solchen in kodierenden Sequenzen, den Exons, unterschieden⁷⁸. Die exonischen Repeats wiederum untergliedern sich in Polyglutamin- und Polyalanin-trakt-kodierende Repeats. Homopolymere Aminosäure-Abschnitte sind abundant und 20 % aller humanen Proteine enthalten mindestens einen solchen⁷⁹. Polyglutamin-trakte sind durch perfekte (CAG)_n-Repeats kodiert, während Polyalanin-trakte durch imperfekte (GCN)_n-Repeats kodiert sind⁷⁸. Expansionen der Polyglutaminrepeats verursachen größtenteils Erkrankungen des zentralen Nervensystems, während Expansionen der Polyalaninrepeats überwiegend zu Entwicklungsfehlbildungen führen.

Die meisten Polyglutamin-Erkrankungen^{80,81} verursachen progressiv neurodegenerative Erkrankungen, die in mittlerem Alter einsetzen, wie Chorea Huntington. Sie sind gekennzeichnet durch ein früheres Erkrankungsalter und zunehmende Expressivität in der Folgegeneration, sogenannte genetische Antizipation⁸². Ursächlich ist eine dynamische Mutation, die oberhalb

eines Schwellenwertes von 32-42 Repeats zur Expansion bei den Folgegenerationen führt⁷⁷. Dabei besteht eine inverse Korrelation zwischen Repeatlänge und Alter bei Erkrankungsausbruch⁸².

Anders verhält es sich mit den Polyalanintrakt-kodierenden Repeats. Diese sind kurz, üblicherweise bis zu 20 Alanine. Im Vergleich zu Polyglutaminrepeats liegt der Schwellenwert für eine pathologische Repeatlänge viel niedriger und eine Repeatexpansion erfolgt in der Regel um weniger als 50 %⁸³. Der längste bekannte, pathologische Polyalanintrakt besteht aus 33 Alaninen⁷⁵. Polyalaninrepeats sind wahrscheinlich aufgrund ihrer imperfekten Trinukleotidrepeat-Sequenz mitotisch und meiotisch stabil und intergenerationelle Antizipation wird nicht beobachtet^{70,75}. Sie expandieren sehr selten, vermutlich durch ungleiches Crossing-over fehlgepaarter Wildtyp-Allele in der Meiose⁸⁴ oder durch Verrutschen der DNA-Replikationsgabel⁸⁵.

1.9.1 Polyalanin-Erkrankungen

Alaninrepeat-Expansionen in neun Genen verursachen die als Polyalanin-Krankheiten klassifizierten Erkrankungen. Acht davon kodieren für Transkriptionsfaktoren der frühen Entwicklung. Ihre Mutation führt daher meist zu angeborenen Fehlbildungssyndromen infolge von Entwicklungsdefekten⁷⁵. Dazu gehören skeletale Fehlbildungen: Synpolydaktylie Typ 1 (SPD1, OMIM #186000) (*HOXD13*), cleidocraniale Dysplasie (OMIM #119600) (*RUNX2*) und das Hand-Fuß-Genitalsyndrom (OMIM #140000) (*HOXA13*); Fehlbildungen des zentralen Nervensystems: Holoprosenzephalie Typ V (OMIM #609637) (*ZIC2*), das X-chromosomale West-Syndrom und das Partington-Syndrom (OMIM #308350, #309510) (*ARX*), die X-chromosomale Wachstumshormondefizienz mit bzw. ohne mentale Retardierung (OMIM #300123, #312000) (*SOX3*) und das kongenitale zentrale Hypoventilationssyndrom (OMIM #209880) (*PHOX2B*); und eine kraniofaziale Fehlbildung: Blepharophimosis-Ptosis-Epikanthus-inversus-Syndrom (OMIM #110100) (*FOXL2*)⁷⁵. Die zugrunde liegenden Polyalaninrepeat-Expansionen liegen alle im gleichen Größenbereich und verursachen eine Verlängerung der Polyalanintrakte von 12-20 auf 18-33 Alanine⁸⁶. Die Gemeinsamkeiten der aufgeführten Erkrankungen deuten auf eine gemeinsame molekulare Pathogenese hin. Einen Sonderfall stellt die Polyalanintrakt-Expansion des Poly-A-bindenden Proteins PABPN1 dar. Die Expansion des vergleichsweise kurzen Polyalanintrakts verursacht okulopharyngeale Muskeldystrophie, eine progressive, im mittleren Lebensalter einsetzende Myopathie (OMIM #164300) (*PABPN1*). Deren Pathogenese ähnelt den Polyglutamin-Erkrankungen und es finden sich intranukleäre Einschlüsse in der Skelettmuskulatur⁷⁵.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der molekularen Pathogenese der angeborenen Skelettfehlbildung SPD sowie generell der Polyalanin-Krankheiten.

Aufgrund ihrer phänotypischen Ähnlichkeit mit der humanen SPD dient die *spdh*-Maus als Modellorganismus³⁹. Der SPD zugrunde liegende Alaninrepeat-Expansionen des *Hoxd13*, das einen Transkriptionsfaktor kodiert, verursachen eine Kombination aus Funktionsgewinn und -verlust³⁹. Der Funktionsgewinn beinhaltet wahrscheinlich einen negativen Effekt von expandiertem *Hoxd13+Ala* auf 5'-lokalisierte *Hox*-Gene^{74,76}. Beteiligt daran ist abnorm zytoplasmatisch lokalisiertes HOXD13+Ala, das normalerweise nukleär vorliegendes HOXD13-wt sequestriert⁷³. Der Funktionsverlust beruht auf einer gesteigerten Degradation von expandiertem HOXD13+Ala⁷³. Außerdem regulieren Mitglieder des BMP-Signalwegs zusammen mit *Hoxd13* die Extremitätenentwicklung und ihre Mutationen verursachen ähnliche Phänotypen wie *Hoxd13*-Mutationen⁴⁵. Zudem interagieren SMAD-Transkriptionsfaktoren, die BMP-Signalwandler, mit HOXD13, um die Genexpression zu steuern^{49,50}. Diese Interaktion und die Beeinträchtigung BMP-regulierter Funktionen in *spdh*-Mäusen, wie die ektope interdigitale Knorpelbildung³⁹, weisen auf eine Fehlregulation des BMP-Signalwegs durch expandiertes *Hoxd13+Ala* hin.

Obwohl in den letzten Jahren zunehmend die SPD und die erst im Jahre 2004 neu definierte Gruppe der Polyalanin-Krankheiten⁷⁰ erforscht wurden, sind deren Pathomechanismen weitgehend unbekannt und wurden in dieser Arbeit untersucht. Zur Untersuchung des negativen Effekts von *Hoxd13+Ala* auf 5'-lokalisierte *Hox*-Gene wurden *in vitro* Koexpressionsexperimente durchgeführt, um kolokalisierende Interaktionspartner zu identifizieren. Besonderes Augenmerk wurde auf die vermutete Interaktion von *Hoxd13+Ala* und *Hoxa13* gerichtet, die auch in *spdh*-Mäusen analysiert wurde. Um zu untersuchen, ob die Interaktion *Hox*-spezifisch ist oder ebenso mit anderen Polyalanin-Transkriptionsfaktoren erfolgt, wurde *Runx2* als potenzieller Interaktionspartner getestet. Des Weiteren wurden in Koexpressionsexperimenten mit *Hoxd13*-Deletionsmutanten potenzielle, die Interaktion vermittelnde Proteinmotive untersucht. Außerdem wurde eine mögliche gemeinsame molekulare Pathogenese der Polyalanin-Krankheiten erforscht. Dazu wurden *in vitro* Koexpressionsexperimente mit *Hoxd13-wt* und weiteren mutierten Genen, die expandierte Polyalanin-Transkriptionsfaktoren kodieren, durchgeführt. Zusätzlich wurde eine mögliche funktionelle Interaktion von HOXD13 mit SMADs *in vitro* mittels Luciferase-Reporterassays mit SMAD-responsiven Promotorkonstrukten untersucht.

Erst mit der Kenntnis der molekularen Pathogenese, speziell der SPD und generell der Polyalanin-Entwicklungsfehlbildungen, können zukünftig Therapien dieser Krankheiten entwickelt werden.

Material

3 Material

3.1 Geräte

Gerät	Zusatzinformation	Hersteller
Abbildungssystem für Western Blots	LAS-4000	Fuji
Binokularmikroskop	MZ 12	Leica
Blotkammer	Trans-Blot semi-dry	Bio-Rad
Brutschrank	CO ₂ -Inkubator Steri-Cycle HEPA Class 100	Thermo Scientific
Drehrad		Stuart
Drigalski-Spatel	Glas	Roth
Einbettstation	Microm EC 350-1/EC 350-2	Thermo Scientific
Einfrierbox	5100 Cryo freezing container	Nalgene
Eismaschine	AF 30	Scotsman
ELISA-Reader	SpectraMax 250	Molecular Devices
Entwässerungsautomat	TP1020	Leica
Feuchtkammer		Thermo Scientific
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200	Zeiss
Gefrierschrank	-80 °C, Forma 906	Thermo Scientific
Geldokumentationssystem	E.A.S.Y. Win32	Herolab
Gelelektrophorese-Zubehör	Gießvorrichtung, Kämmen, Kammern, Schlitten	Peqlab
Heizblöcke	Ori-Block OV 3 Thermomixer Comfort	Techne Eppendorf
Impföse	Edelstahl	Roth
Kameras	AxioCam HRc MRc 5	Zeiss Zeiss
Konfokalmikroskop	LSM 510 META	Zeiss
Kühlgefrierkombination	4 °C, -20 °C	Bosch
Laborwaage	FI1500	Fischer
Luminometer	Wallac 1450 MicroBeta TriLux	PerkinElmer
Magnetrührer	IKA-Combimag RET	Janke & Kunkel

Material

Mikrotome	Cool Cut 2050 SuperCut	Microm Reichert-Jung
Mikrowelle	8020	Privileg
Multikanalpipette	3-300 µl	Eppendorf
PCR-Block	Thermal cycler 2720	Applied Biosystems
PH-Meter	MP220	Mettler Toledo
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf
Pipetten	10 µl, 20 µl, 200 µl, 1 ml	Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	Integra Biosciences
Rollator	Roller mixer SRT9	Stuart
Schüttler	G-10 Gyrotory shaker	New Brunswick Scientific
Sterilbank	HERASafe	Kendro
Stoppuhr		Roth
Strom-/Spannungsversorger		Peqlab
Transilluminator		Hartenstein
UV-Dunkelkammer		Hormuth-Vetter
Vortexer	Microspin FV-2400	Lab4you
Wasserbad	D1	Haake Fisons
Wippe	WT15	Biometra
Zentrifugen	Biofuge pico 3417R 5416, für 96-Loch-Platten RC-5 Superspeed	Thermo Scientific Eppendorf Eppendorf DuPont Instruments- Sorvall
	Ultrazentrifuge L7-55 Megafuge 1.0	Beckman Heraeus

3.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Zusatzinformation	Hersteller
8-Tube-Strips und Deckel	0,2 ml, MicroAmp	Applied Biosystems
96-Loch-Platten	MicroAmp	Applied Biosystems
96-Loch-Platten	für Luciferase-Assays	Wallac
Autoklavierband		Neolab

Material

Deckgläser		Leica
Einbettformen		Polysciences
Falcon-Röhrchen	15 ml, 50 ml	TPP, Greiner
Glaspipetten	Fortuna, 1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml	Poulsen & Graf
Handschuhe	Latex	Latech
Kisolfolie	Platzhalter und Isolierfolie	Henry Schein Dental
Klingen	SEC 35p Low profile blades	Microm
Kryoröhrchen	Cryo.s	Greiner
Küvetten	Polystyrol	Roth
Objektträger	SuperFrost Plus	Menzel-Gläser
Parafilm	M PM996	Pechiney
Pasteurpipette	Plastibrand, 3 ml	Sigma-Aldrich
Petrischalen	60 mm	Neolab
Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1000 µl	Biozym, Eppendorf, Gilson
Plastikbeutel	Polypropylen	Roth
Reaktionsgefäße/Tubes	0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Transfermembran	PVDF, Immobilon-P, 0,45 µm	Millipore
Whatman-Papier	Extra thick blot paper Criterion	Bio-Rad
Zellkratzer		TPP
Zellkulturflaschen/-schalen	25 cm ² , 75 cm ² , 150 cm ² / 60 mm	TPP
Zellkultur-Pipetten	Stripette	Costar
Zellkulturplatten	6-, 12-, 24-, 96-Loch-Platten	TPP
Zellzählkammer (Bürker)	Kleinquadrat 0,0025 mm ² , Tiefe 0,1 mm	Roth

3.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Fluka
Acrylamid-Mix, 30%ig, Rotiphorese-Fertiggel	Roth
Agar	Gibco
Agarose	Invitrogen
Ampicillin	Bayer
Aprotinin	Sigma-Aldrich

Material

APS, Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Merck
BSA, bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich
DAPI, 4',6-Diamidino-2-phenylindol	Invitrogen
DEPC, Diethylpyrocarbonat	Sigma-Aldrich
DMSO, Dimethylsulfoxid	Merck
dNTP-Mix, Desoxyribonucleosidtriphosphat-Mix	Fermentas
EDTA „Ethylenediaminetetraacetic acid“, Ethylendiamintetraessigsäure	Merck
Ethanol p. a., EtOH	Merck
Ethidiumbromid-Lösung, 10 mg/ml	Roth
FCS „Fetal calf serum“, fetales Kälberserum	Biochrom
Fluoromount-G	Southern Biotech
Glycerin	Merck
Glycin, p. a.	Merck
Hefeextrakt	Gibco
HEPES, 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Calbiochem
Isopropanol	Merck
KCl, Kaliumchlorid	Merck
KH ₂ PO ₄ , Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Leupeptin	Sigma-Aldrich
L-Glutamin	Cambrex
Methanol p. a., MetOH	Merck
MgCl ₂ , Magnesiumchlorid	Merck
MgSO ₄ , Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich
Milchpulver	Roth
Na ₂ HPO ₄ , Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Na ₃ VO ₄ , Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich
NaCl, Natriumchlorid	Merck
NaF, Natriumfluorid	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Sigma-Aldrich
NGS „Normal goat serum“, Ziegen Serum	Vector Laboratories
NH ₄ Cl, Ammoniumchlorid	Merck
(NH ₄) ₂ SO ₄ , Ammoniumsulfat	Merck
Orange G	Sigma-Aldrich

Material

Paraffin	Leica
PEG 8000, Polyethylenglykol	Sigma-Aldrich
Pen/Strep, Penicillin/Streptomycin	Cambrex
Pepstatin	Sigma-Aldrich
Pepton	Gibco
PFA, Paraformaldehyd	Merck
PMSF, Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich
Saponin	Roth
SDS "Sodium dodecyl sulphate", Natriumdodecylsulfat	Roth
Sucrose	Invitrogen
TEMED, Tetramethylethylendiamin	Invitrogen
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck
Tris	Merck
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypsin	Gibco
Tween 20	Roth
Ultraclear, UC	J.T.Baker

3.4 Puffer/Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Allgemeine Molekularbiologie	
DNA-Polymerase-Puffer (10x)	750 mM Tris-HCl pH 8,8, 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 15 mM MgCl ₂ , H ₂ O bidest; steril filtrieren
Ladepuffer für Agarosegele (6x)	15 g Sucrose, 0,175 g Orange G, 50 ml H ₂ O bidest
SDS-Puffer	0,85 % SDS, 17 mM EDTA, 170 mM NaCl, 17 mM Tris-HCl, 200 µg/ml Proteinase K; pH 7,5
TAE	0,04 M Tris, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA; pH 8
Mikrobiologie	
LB-Medium	10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl; pH 7,4, autoklavieren
TSS	LB-Medium, 10 % (w/v) PEG 8000, 5 % (v/v) DMSO, 20-50 mM MgSO ₄ oder MgCl ₂ ; pH 6,5

Material

Zellkultur

COS-1-/COS-7-Medium	DMEM high glucose-Nährmedium mit 4,5 g/l Glukose (Gibco), 10 % FCS, 2 % L-Glutamin, 1 % Pen/Strep
HepG2-Medium	DMEM/F12-Nährmedium (Gibco), 10 % FCS, 1 % L-Glutamin, 1 % Pen/Strep
Einfriermedium	3,45 ml Medium, 0,05 ml L-Glutamin, 0,5 ml 10%iges DMSO, 1 ml FCS

Proteinbiochemie

Ko-IP-Lysepuffer	50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 % Glycerin, 1 % Triton X-100, H ₂ O bidest; unmittelbar vor dem Gebrauch Protease-Inhibitoren hinzufügen: 1 mM PMSF, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Pepstatin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 mM aktiviertes Na ₃ VO ₄ , 1 mM NaF
Pfoten-Lysepuffer	50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 % Glycerin, 1 % Triton X-100, H ₂ O bidest; unmittelbar vor dem Gebrauch Protease-Inhibitoren hinzufügen: 1 mM PMSF, 1x Complete-Proteaseinhibitorcocktail
Proteinprobenpuffer (2x)	125 mM Tris, 4 % SDS, 0,02 % Bromphenolblau, 20 % Glycerin, 12,5 % 2-Mercaptoethanol, H ₂ O bidest; pH 7,5
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,8
Stripping-Puffer	7,5ml 1 M Glycin pH 2,5, 2 ml 10 % (w/v) SDS; auf 50 ml mit H ₂ O bidest auffüllen
TBS-Puffer (10x)	300 ml 5 M NaCl, 100 ml 1 M Tris, 1 l DEPC-H ₂ O; pH 7,4
TBST	TBS, 0,1 % Tween 20
Transferpuffer (10x)	21,8 g Glycin, 58,2 g Tris, 3,7 g SDS, 1 l H ₂ O bidest
Transferpuffer (1x)	100 ml 10x Transferpuffer, 200 ml MetOH; auf 1 l mit H ₂ O bidest auffüllen

Histologie, Immunzytochemie

Citratpuffer	2,94 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 1 l H ₂ O bidest; pH 6
PBS (10x)	80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na ₂ HPO ₄ , 2,4 g KH ₂ PO ₄ , 1 l DEPC-H ₂ O; pH 7,4
4 % PFA/PBS	40 g PFA, 1 l PBS; durch Erhitzen lösen, pH 7,4

3.5 Fertiglösungen, Reaktionssysteme/Kits

Fertiglösung, Reaktionssystem/Kit	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Pierce
Complete-Proteaseinhibitorcocktail	Roche
DPBS "Dulbecco's phosphate buffered saline"	Lonza
Dual-Glo Luciferase Assay System	Promega
ECL Plus	Amersham
Lipofectamine 2000-Transfektionsreagenz	Invitrogen
Passivlysepuffer, "Passive lysis buffer", 5x	Promega
Plasmid DNA Midi/Maxi Kit NucleoBond PC100/500	Macherey-Nagel
Plasmid DNA Mini Kit	A&A Biotechnology
Turbofect-Transfektionsreagenz	Fermentas

3.6 Marker

Marker	Hersteller
DNA-Marker, 100 bp Plus DNA ladder	Fermentas
Proteinmarker, PageRuler Plus prestained protein ladder	Fermentas

3.7 Bakterien

Stamm	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> Top10	Invitrogen

3.8 Primer

Name	5' – 3'-Sequenz	Schmelzpunkt
spdh for	acttgggacatggatgggct	59,4 °C
spdh rev	cgctcagaggtccctgggta	63,5 °C

3.9 Enzyme

Enzym	Hersteller
Proteinase K	Roth
Taq-Polymerase	MPI für Molekulare Genetik

3.10 Antikörper

3.10.1 Primärantikörper

Antikörper	Ursprung	Hersteller, Katalognr.	Verdünnung	Verwendung für: WB IZC IHC
Anti-HOXD13	Kaninchen	Prof. Atsushi Kuroiwa, Nagoya, Japan	1:8000	
Anti-HOXA13	Kaninchen	Aviva, ARP31955_P050	1:1000	1:1000
Anti- β -Aktin	Maus	Sigma-Aldrich, A5441	1:5000	
Anti-HA	Maus	Sigma-Aldrich, H3663	1:1000	
Anti-HA	Kaninchen	Sigma-Aldrich, H6908		1:500
Anti-FLAG	Maus	Sigma-Aldrich, F3165		1:500
Anti-FLAG, gekoppelt an Agarosekügelchen	Maus	Sigma-Aldrich, A2220		

3.10.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Markierung	Hersteller, Katalognr.	Verdünnung	Verwendung für: WB IZC IHC
Anti-Kaninchen	Peroxidase	Calbiochem, DC03L	1:1000	
Anti-Maus	Peroxidase	Calbiochem, DC08L	1:1000	
Anti-Maus	AlexaFluor 488	Invitrogen, A-11001		1:1000
Anti-Kaninchen	AlexaFluor 568	Invitrogen, A-11011		1:1000
Anti-Kaninchen	AlexaFluor 488	Invitrogen, A-11008		1:500

3.11 Plasmidvektoren

- pCDNA3 (Invitrogen)
- *Hoxd13-wt* in pCDNA3 (Dr. A. Albrecht, Berlin)
- *Hoxd13+7Ala* in pCDNA3, HOXD13 enthält einen um zusätzliche 7 Alanine expandierten Polyalanintrakt (Dr. A. Albrecht, Berlin)
- *Hoxd13+14Ala* in pCDNA3, HOXD13 enthält einen um zusätzliche 14 Alanine expandierten Polyalanintrakt (Dr. A. Albrecht, Berlin)
- pTL1-HA, Derivat des Plasmids pSG5 (Stratagene) modifiziert durch Einfügen einer größeren multiplen Klonierungsstelle mit Schnittstellen für *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *XhoI*, *NotI*, *SmaI*, *PstI*, *SacI*, *KpnI*, *BglII* und eines HA-Tags für die Detektion exprimierter Proteine mit Anti-HA-Antikörpern (Dr. D. Devys, Illkirch, Frankreich)
- *Hoxd13-wt* in pTL1-HA, HOXD13-wt mit N-terminalem HA-Tag (Dr. A. Albrecht, Berlin)
- *Hoxd13-2Ala* in pTL1-HA, HOXD13 enthält einen auf zwei Alanine verkürzten Polyalanintrakt, N-terminaler HA-Tag (Dr. A. Albrecht, Berlin)
- *Hoxd13-Δhd* in pTL1-HA, HOXD13 mit deletierter Homöodomäne, N-terminaler HA-Tag (Dr. A. Albrecht, Berlin)
- *Hoxa13-wt* in pTL1-HA, HOXA13-wt mit N-terminalem HA-Tag (Dr. A. Albrecht, Berlin)
- *Hoxa13+10Ala* in pTL1-HA, HOXA13 enthält einen um zusätzliche 10 Alanine expandierten Polyalanintrakt (N-terminal), N-terminaler HA-Tag (Dr. A. Albrecht, Berlin)
- *Hoxd11-wt* in pTL1-HA, HOXD11-wt mit N-terminalem HA-Tag (Dr. A. Albrecht, Berlin)
- *Hoxd12-wt* in pTL1-HA, HOXD12-wt mit N-terminalem HA-Tag (Dr. A. Albrecht, Berlin)
- *Runx2-wt* in pTL1-HA, RUNX2-wt mit N-terminalem HA-Tag (Dr. A. Albrecht, Berlin)
- *Runx2+10Ala* in pTL1-HA, RUNX2 enthält einen um zusätzliche 10 Alanine expandierten Polyalanintrakt, N-terminaler HA-Tag (Dr. A. Albrecht, Berlin)
- pTL10-FLAG, Derivat des Plasmids pSG5 (Stratagene) modifiziert durch Einfügen einer größeren multiplen Klonierungsstelle mit Schnittstellen für *BamHI*, *HindIII*, *XhoI*, *NotI*, *SmaI*, *PstI*, *SacI*, *KpnI*, *BglII* und eines FLAG-Tags für die Detektion exprimierter Proteine mit Anti-FLAG-Antikörpern (Dr. D. Devys, Illkirch, Frankreich)
- *Hoxd13-wt* in pTL10-FLAG, HOXD13-wt mit N-terminalem FLAG-Tag (Dr. A. Albrecht, Berlin)

Material

- *Hoxd13+7Ala* in pTL10-FLAG, HOXD13 enthält einen um zusätzliche 7 Alanine expandierten Polyalanintrakt, N-terminaler FLAG-Tag (Dr. A. Albrecht, Berlin)
- *Hoxd13+14Ala* in pTL10-FLAG, HOXD13 enthält um zusätzliche 14 Alanine expandierten Polyalanintrakt, N-terminaler FLAG-Tag (Dr. A. Albrecht, Berlin)
- pCS2+ (RZPD)
- *Bmpr1b-ca* in pCS2+, konstitutiv aktiver BMP-Rezeptor 1B mit einer Mutation, die zu einem Aminosäureaustausch von Glutamin nach Asparaginsäure an Position 203 führt⁸⁷ (Dr. Geri Gross, Braunschweig)
- pRL-TK (Promega), *Renilla*-Luciferase in einem Expressionsvektor mit Thymidinkinase-Promotor des *Herpes simplex*-Virus für eine niedrige bis moderate Expression, dient als interne Kontrolle für die Luciferase-Assays
- pGL3 Basic (Promega), *Firefly*-Luciferase in einem Expressionsvektor ohne eukaryotische Promotor- und Enhancersequenzen
- BRE in pGL3 Basic (pBRE-luc), *Firefly*-Luciferase unter der Kontrolle eines Promotors mit vier Kopien eines BMP-responsiven Elements (BRE) gekoppelt an eine TATA-Box und die Initiatorsequenz des adenoviralen „Major late promoter“ im pGL3 Basic-Vektor^{53, 88} (Prof. Dr. Petra Knaus, Berlin)
- SBE in pGL3 Basic (pSBE-luc), *Firefly*-Luciferase unter der Kontrolle eines Promotors mit vier Kopien des SMAD-bindenden Elements (SBE) gekoppelt an eine TATA-Box und die Initiatorsequenz des adenoviralen „Major late promoters“ im pGL3 Basic-Vektor^{88, 89} (Prof. Dr. Petra Knaus, Berlin)

3.12 Zelllinien

- COS-1: CV1-Ursprung mit mutiertem, replikationsdefizientem SV40-Genom, abgeleitet von Nierenzellen der Grünen Meerkatze
- COS-7: CV1-Ursprung mit mutiertem, replikationsdefizientem SV40-Genom, abgeleitet von Nierenzellen der Grünen Meerkatze
- HepG2: abgeleitet von humanen Leberzellkarzinomzellen

3.13 Mäuse

Die Tiere wurden im Tierhaus des Max-Planck-Instituts für Molekulare Genetik von Janine Wetzel unter der Aufsicht von Dr. Ludger Hartmann und der Leitung von Dr. Pia Kuss gezüchtet.

Die „*synpolydactyly homolog*“ (*spdh*)-Mäuse entstammen dem Jackson Lab, Bar Harbor, Maine, USA (stock number: 002875).

3.14 Computerprogramme

Programm	Hersteller	Verwendung
Adobe Photoshop CS3	Adobe Systems	Bildbearbeitung
AIDA Image Analyzer	Raytest	Densitometrische Analyse der Chemilumineszenz
AxioVision 4.6/4.8	Zeiss	Mikroskopie, digitale Fotografie
Chromas	Technelysium	DNA-Sequenzanalyse
E.A.S.Y. Win32	Herolab	DNA-Geldokumentation
Excel	Microsoft	Datenauswertung
Lasergene PrimerSelect 7.0	DNA Star	Primerdesign
Primer3 Input	Open Source Software	Primerdesign
SeqMan	DNA Star	DNA-Sequenzanalyse
Vector NTI 10.0	Invitrogen	Sequenzanalyse
Windows 2000/XP	Microsoft	Betriebssystem

3.15 Internetquellen

Quelle	Adresse
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	www.ncbi.nlm.nih.gov
UniProt	www.uniprot.org
LabLife Vektordatenbank	www.lablife.org/vectordb

4 Methoden

4.1 Allgemeine Molekularbiologie

4.1.1 DNA-Isolierung

Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wird aus Bakterien gewonnen, indem die Bakterien zuerst lysiert werden und anschließend die DNA an einer DNA-bindenden Matrix von den übrigen Zellbestandteilen isoliert wird. Die Isolation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab erfolgte mit dem Plasmid-DNA-Mini-Kit, Isolationen im größeren Maßstab mit dem Midi- bzw. Maxi-Kit gemäß den Anweisungen der Hersteller.

Isolierung von genomischer DNA

Für die Genotypisierung der Mäuse wurde genomische DNA aus Schwanzspitzen gewonnen. Nach Verdau üN bei 55 °C in $0,5\text{ ml}$ SDS-Puffer mit Proteinase K wurden am Folgetag $0,5\text{ ml}$ 5 M NaCl zugegeben, gefolgt von Inkubation für 10 min bei RT auf einer Wippe. Die Proben wurden dann für 10 min auf Eis gestellt und anschließend bei 8000 rpm für 10 min zentrifugiert. $0,5\text{ ml}$ des Überstands wurden in ein Reaktionsgefäß mit 1 ml eiskaltem 100 \% EtOH überführt, gefolgt von erneuter Zentrifugation bei 13000 rpm für 30 min bei 4 °C . Das Sediment wurde dann zweimal mit 70 \% EtOH für 10 min bei 13000 rpm bei 4 °C gewaschen, getrocknet und zuletzt in $150\text{ }\mu\text{l}$ autoklaviertem Wasser gelöst.

4.1.2 Polymerasekettenreaktion („Polymerase chain reaction“, PCR)

Die Polymerasekettenreaktion dient der selektiven Vervielfältigung von DNA-Bereichen. Zunächst wird doppelsträngige DNA durch Erhitzen denaturiert, also in ihre zwei Einzelstränge aufgetrennt. Nach der Anlagerung der die Zielsequenz umrahmenden Oligonukleotide, der sogenannten Primer, erfolgt die selektive Elongation der Einzelstrang-Zielsequenz durch DNA-Polymerase. Die Zyklen der PCR sind Denaturierung, Oligonukleotid-Hybridisierung und Elongation durch die Polymerase und führen letztlich wieder zur Entstehung doppelsträngiger DNA. Durch das Hintereinanderschalten mehrerer Zyklen wird DNA spezifisch exponentiell amplifiziert.

Genotypisierungs-PCR

Die gewonnene DNA wurde in 150 µl Wasser aufgenommen und gegebenenfalls verdünnt. Als Kontrollen dienten stets eine Wasser- sowie eine wt-Probe.

Pipettierschema für Genotypisierungs-PCR-Reaktion (25 µl Ansatz):

Menge	Reagenz
1 µl (20-100 ng)	verdünnte genomische DNA
2,5 µl	DNA-Polymerase-Puffer, 10x
2,5 µl	dNTP-Mix (1,25 mM)
2,5 µl	Forward-Primer <i>spdh</i> for (20 pM)
2,5 µl	Reverse-Primer <i>spdh</i> rev (20 pM)
3,5 µl	DMSO
10,2 µl	aqua bidest
0,3 µl	Taq-Polymerase

Der Ansatz wurde auf Eis in ein 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäß gegeben. Die Polymerase wurde zuletzt zugefügt. Anschließend erfolgte die Inkubation des Ansatzes in einem PCR-Block mit dem nachfolgend angegebenen Programm:

Programm für Genotypisierungs-PCR:

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	1
Denaturierung	94 °C	30 sec	35
Primer-Annealing	51 °C	1 min	
Elongation	72 °C	2 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1
Kühlung	4 °C	∞	1

4.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

DNA ist aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladen und wandert bei der Gelelektrophorese im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. In Agarosegelen können DNA-Moleküle so nach ihrer Größe und Konformation aufgetrennt werden, da sich kleinere Moleküle schneller als große durch das Agarosenetz bewegen. Die DNA-Banden werden im Gel mittels Ethidiumbromid visualisiert, das zwischen den Basen interkaliert und unter UV-Licht orange fluoresziert. Die Auftrennung der amplifizierten Genotypisierungs-DNA erfolgte im 3%igen Agarosegel, um die dicht beieinander liegenden Banden gut unterscheiden zu können. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde ein DNA-Marker auf das Gel aufgetragen. Die *Hoxd13-wt*-Bande liegt bei ca. 220 bp. Für 3%ige Gele wurden 3 g Agarose in 100 ml TAE gelöst, aufgeköcht und nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C mit 3 µl Ethidiumbromidlösung versetzt. Anschließend wurde das Gel mit einem Kamm für die gewünschte Probenanzahl gegossen. Nach Abschluss der Polymerisation wurde das Gel in einer Elektrophoresekammer mit TAE bedeckt und der Kamm

vorsichtig entfernt. Die DNA-Proben wurden so mit 6x Ladebuffer versetzt, dass die Endlösung eine einfache Konzentration enthielt und dann sorgfältig in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 Volt bis der Ladebuffer ca. zwei Drittel des Gels durchlaufen hatte. Die DNA-Banden wurden mittels eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht und über eine Videokamera mit angeschlossenem Drucker dokumentiert.

4.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der gelösten DNA wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm im Photometer bestimmt. Dafür wurde die DNA-Lösung angemessen verdünnt, um eine optische Dichte (OD) im linearen Bereich zwischen 0,1 und 1 zu erhalten. Bei Verwendung einer Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine gemessene OD von 1 ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Der entsprechende Nullwert wurde mit Wasser eingestellt. Die Quotienten OD 260/OD 280 bzw. OD 260/OD 230 ermöglichen eine Aussage über Verunreinigungen der Probe durch Proteine bzw. Peptide, aromatische Verbindungen, Phenole und Kohlenhydrate. Der Quotient OD 260/OD 280 sollte größer als 1,8 bzw. der Quotient OD 260/OD 230 größer als 2 sein.

4.2 Mikrobiologie

4.2.1 Bestimmung der Bakteriendichte

Die Bakterien einer Flüssigkultur verursachen eine Trübung bzw. optische Dichte durch Streuung der einfallenden Lichtstrahlen. Die Streuung in der Suspension (scheinbare Extinktion) bei einer Wellenlänge von 600 nm kann gemessen werden. Bei Verwendung einer Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine gemessene scheinbare Extinktion von 1 einer Bakteriendichte von 8×10^8 Zellen/ml. Der entsprechende Nullwert wurde mit LB-Medium eingestellt.

4.2.2 Flüssigkulturen von Bakterien

Zur Herstellung einer Bakterien-Flüssigkultur wurden 10 ml LB-Medium mit 50 µg/ml des Antibiotikums (AB) Ampicillin zur Selektion resistenter Bakterien im Falcon-Röhrchen vorgelegt, mit einer sterilen Pipettenspitze aus einer Glycerinkultur oder von einer Bakterienkolonie einer Agar-Platte angeimpft und üN auf dem Schüttler bei 37 °C inkubiert.

4.2.3 Glycerinkulturen

Glycerinkulturen wurden für die dauerhafte Aufbewahrung von Bakterienstämmen hergestellt. Dafür wurden 900 µl einer üN-Bakterien-Flüssigkultur zu 600 µl sterilem, 87%igem Glycerin gegeben, in Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Daraus konnte später wieder eine Bakterien-Flüssigkultur hergestellt werden.

4.2.4 Bakterienkulturen auf Agarplatten

Für die Herstellung von Agarplatten wurde LB-Medium mit 1,5 % Agar versetzt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen des Mediums unter Rühren wurde das AB Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/µl zugefügt. Noch flüssig wurde der Agar in sterile Petrischalen gegossen. Diese wurden nach dem Erstarren gedreht, um das Tropfen von Kondenswasser auf die Nährböden zu verhindern. Die Platten wurden dann üN bei RT gekühlt und getrocknet. Danach wurden sie bei 4 °C für maximal 4 Wochen gelagert. Für Bakterien-Agarkulturen wurden 200 µl Flüssigkultur auf die Platte gegeben und mit einem sterilen Drigalski-Spatel ausplattiert. Glycerinkulturen wurden mit einer sterilen Impföse ausgestrichen.

4.2.5 Herstellung chemokompetenter Bakterien

Kompetente Bakterien sind in der Lage, exogene Fremd-DNA aufzunehmen und diese stabil weiterzugeben. Dieser Vorgang wird als Transformation bezeichnet. Nach dem Animpfen chemokompetenter Bakterien wurde eine Flüssigkultur üN unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden 200 ml LB-Medium mit 4 ml Flüssigkultur beimpft und bei 37 °C auf dem Schüttler bis zum Erreichen einer scheinbaren Extinktion von ca. 0,3 inkubiert. Die Kultur wurde dann auf vier Falcon-Röhrchen verteilt und bei 1000 g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment auf Eis in je 1,25 ml TSS resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend auf Eis auf 100 µl-Aliquots in vorgekühlte Reaktionsgefäße verteilt, in Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

4.2.6 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Bei der Transformation in kompetente Bakterien wird zirkuläre, extrachromosomale Plasmid-DNA aufgenommen und an nachfolgende Generationen weitergegeben. Ausgehend von natürlich vorkommenden Plasmiden wurden Plasmidvektoren entwickelt. Diese enthalten einen eigenen Replikationsursprung für ihre Vermehrung, zumeist eine AB-Resistenz-kodierende Sequenz zur

Selektion transformierter Bakterien, und eine multiple Klonierungsstelle („Multiple cloning site“) mit Restriktionsschnittstellen für Klonierungen. Für die Transformation wurde ein Aliquot (100 µl) kompetenter Bakterien mit 100 ng Plasmid-DNA für 60 min auf Eis inkubiert, anschließend für 30 sec einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt und sofort wieder auf Eis gestellt. Nach dem Zusetzen von 900 µl LB-Medium wurde die Bakteriensuspension für 1 h bei 37 °C in einem Reaktionsgefäß schüttelnd inkubiert. Dann wurden verschiedene Bakterienmengen auf zwei Agar-Selektionsplatten mit AB ausplattiert. Auf einer Platte wurde 1/10 der Kultur in 100 µl ausgestrichen, auf der anderen die übrigen 9/10 nach Zentrifugation bei 1000 rpm für 30 sec und anschließender Resuspension des Bakteriensediments in 100 µl LB-Medium.

4.3 Zellkultur

4.3.1 Einfrieren von Zellen

Zellen in großen 150 cm²-Kulturflaschen wurden mit 10 ml vorgewärmtem DPBS gewaschen und mit 5 ml Trypsin für 2 min (COS-1- und COS-7-Zellen) bzw. 10 min (HepG2-Zellen) bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Klopfen gegen die Kulturflasche vom Boden gelöst. Dann wurden 15 ml vorgewärmtes Medium zugegeben. Danach wurde die Zellsuspension für 5 min bei 800 rpm und 27 °C zentrifugiert. Das Sediment einer großen Kulturflasche wurde in Einfriermedium aufgenommen und auf 3 Kryoröhrchen von je 1,5 ml verteilt, gefolgt von sofortigem Einfrieren in einer Einfrierbox bei -80 °C. Nach zwei bis fünf Tagen wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt. Bei der Beschriftung der eingefrorenen Zellen wurde auf eine exakte Angabe von Datum, Zelllinie, Passage und Initialen des Durchführenden geachtet.

4.3.2 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C rasch aufgetaut und sofort in ein Falcon-Röhrchen mit 10 ml warmem Medium überführt, um schädliche Rückstände des Einfriermediums zu neutralisieren. Die Suspension wurde für 5 min bei 800 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Der gesamte Ansatz wurde in Zellkulturflaschen überführt, durch kreisende Bewegungen der Flasche gleichmäßig verteilt, gefolgt von Inkubation bei 37 °C mit 5%iger CO₂-Sättigung im Brutschrank. Regelmäßig wurden das Medium gewechselt und die Zellen gesplittet.

4.3.3 Splitten von Zellen

Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen gesplittet. Zunächst wurden die Zellen in der Kulturflasche mit vorgewärmtem DPBS gewaschen und dann mit Trypsin für 2 min (COS-1- und COS-7-Zellen) bzw. 10 min (HepG2-Zellen) bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend ließen sich die Zellen durch Klopfen gegen die Kulturflasche vollständig ablösen. Dann wurde die dreifache Menge an vorgewärmtem Medium hinzugegeben und die Zellsuspension wurde bei 800 rpm für 5 min zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die gewünschte Zellmenge in Kulturplatten, -schalen oder -flaschen ausgesät.

4.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine geeignet verdünnte Zellsuspension in die Bürker-Zählkammer gegeben. Dann wurden vier Großquadrate unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und der Mittelwert der Zellzahl pro Großquadrat gebildet. Dieser Wert wurde mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor und dem Bürker-Kammerfaktor von $10^4/\text{ml}$ multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu berechnen.

4.3.5 Transfektion von Zellen

Als Transfektion wird das Einbringen fremder DNA in Zellkulturzellen bezeichnet. Es wurde die Methode der transienten Transfektion, des zeitweiligen Einbringens eines Plasmids, angewendet. Die in den Experimenten verwendeten Plasmidvektoren sind dem Materialienkapitel zu entnehmen. Für die Immunzytochemie wurden pro Loch 1×10^4 COS-1-Zellen 24 h vor der Transfektion auf Deckgläsern in 24-Loch-Platten ausgesät. Die transiente Transfektion mit Turbofect-Transfektionsreagenz erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellerprotokolls mit 1 μg Plasmid-DNA je Loch. Bei Doppeltransfektionen mit zwei verschiedenen Plasmiden wurden 500 ng Plasmid-DNA je Loch und Plasmid verwendet. Es wurden 2 μl Turbofect-Transfektionsreagenz je 1 μg DNA eingesetzt und stets Duplikate transfiziert. Für die Koimmunopräzipitation wurden 6×10^5 COS-1-Zellen 24 h vor der Transfektion in 6 cm-Kulturschalen ausgesät. Die transiente Transfektion mit Lipofectamine 2000-Transfektionsreagenz erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellerprotokolls. Es wurden 8 μg Plasmid-DNA je Kulturschale verwendet, bei Doppeltransfektionen mit zwei verschiedenen Plasmiden also 4 μg Plasmid-DNA je Kulturschale und Plasmid. Je 8 μg DNA wurden 20 μl Lipofectamine 2000-Transfektionsreagenz eingesetzt. Für die Luciferase-Assays wurden pro Loch

4×10^4 COS-7-Zellen bzw. 18×10^4 HepG2-Zellen 24 h vor der Transfektion in 24-Loch-Platten ausgesät. Die transiente Transfektion mit Turbofect-Transfektionsreagenz erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellerprotokolls mit 1 μg Plasmid-DNA je Loch. Gegebenenfalls wurde mit den entsprechenden Leervektoren aufgefüllt, um die Menge an Gesamt-DNA in den Ansätzen konstant zu halten. Folgende Plasmidmengen pro Loch wurden jeweils verwendet: *Renilla*-Luciferase-Konstrukt pRL-TK, 300 ng; *Firefly*-Luciferase-Reporterkonstrukt mit SBE- bzw. BRE-haltigem Promotor (pSBE-luc bzw. pBRE-luc), 150 ng; konstitutiv aktives BMP-Rezeptor-Konstrukt *Bmpr1b-ca* in pCS2+ bzw. Leervektor pCS2+, 250 ng; *Hoxd13*-Konstrukt *Hoxd13-wt*, *Hoxd13+7Ala* bzw. *Hoxd13+14Ala* in pCDNA3 bzw. Leervektor pCDNA3, 300 ng. Es wurden 3 μl Turbofect-Transfektionsreagenz je 1 μg DNA eingesetzt und stets Duplikate transfiziert.

4.4 Proteinbiochemie

4.4.1 Zellpräparation und Zellyse

Sowohl für die Luciferase-Reporterassays als auch für die Koimmunopräzipitation wurden Zellkulturlysate hergestellt. Für die Analyse der Proteinexpression in den Pfoten von *spdh*- bzw. wt-Mäusen im Western Blot wurden Gewebelysate hergestellt. Alle Schritte erfolgten, soweit möglich, auf Eis bzw. bei 4 °C. Für die Koimmunopräzipitation wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion zweimal mit eiskaltem DPBS gewaschen und danach in je 500 μl Ko-IP-Lysepuffer mit frisch zugesetzten Proteaseinhibitoren pro 6 cm-Kulturschale lysiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellkratzer gelöst und in ein gekühltes Reaktionsgefäß überführt. Für die Luciferase-Reporterassays wurden die Zellen 18 h nach der Transfektion mit DPBS gewaschen und mit je 100 μl 1x Passivlysepuffer pro Loch der 24-Loch-Platte lysiert. Nach Zentrifugation der Lysate für 4 min bei 10000 rpm zur Abtrennung der Zelltrümmer wurde der Überstand abgenommen und erneut in ein gekühltes Reaktionsgefäß gegeben. Die Überstände wurden sofort für die Kontrolle der Proteinexpression weiter verwendet oder für die spätere Verwendung in der Koimmunopräzipitation bei -80 °C bis zu zwei Wochen eingefroren. Für die Herstellung der Gewebelysate wurden je zwei Pfoten von wt/wt-, wt/*spdh*- und *spdh/spdh*-Mäusen des Entwicklungsstadiums E 13,5 in 150 μl Pfoten-Lysepuffer lysiert und zum Homogenisieren mehrfach auf und ab pipettiert.

4.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit entsprechend den Anweisungen des Herstellers für die Messung im 96-Mikroloch-Platten-Format mit leichten

Modifizierungen. Pro Loch wurden abweichend vom Herstellerprotokoll nur 5 µl BSA-Standardverdünnung bzw. geeignete Lysatverdünnung in Lysepuffer zur Reaktion gegeben. Eine Eichgerade mit BSA diente dabei der Berechnung der unbekanntenen Proteinkonzentrationen. Es wurden jeweils Triplikate gemessen. Die Absorption bei 550 nm wurde mit einem ELISA-Reader ermittelt.

4.4.3 SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld. Die Geschwindigkeit, mit der Moleküle ein elektrisches Feld durchwandern, ist abhängig von drei Faktoren: ihrer Größe, Form und elektrischen Ladung. Bei der SDS-PAGE ist jedoch einzig die Molekülmasse ausschlaggebend für die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im Gel, das wie ein Sieb wirkt. Dies beruht auf der Zugabe des denaturierenden amphiphilen Detergens Natriumdodecylsulfat („Sodium dodecyl sulfate“, SDS) zu Proben, Gelmatrix und Laufpuffer. SDS zerlegt oligomere Proteine in ihre Untereinheiten, entfaltet sie und überdeckt ihre Eigenladungen mit einer stark negativen Ladung. Die negativ geladenen Proteine wandern dann im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. Außerdem enthält der Proteinprobenpuffer reduzierende Thiole zur Aufspaltung der Protein-Disulfidbrücken. Um eine höhere Schärfe der Proteinbanden zu erhalten, werden die Proben zusätzlich nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Elektrophorese durch die Verwendung von Sammel- und Trenngel aufgetrennt. Beide Gele unterscheiden sich in pH-Wert und Porengröße.

Pipettierschema für ein 12%iges Proteingel (für 4 Gele):

Sammelgel		Trenngel	
Menge	Reagenz	Menge	Reagenz
3,4 ml	Wasser	6,6 ml	Wasser
0,83 ml	30 % Acrylamid-Mix	8 ml	30 % Acrylamid-Mix
1,26 ml	0,5 M Tris; pH 6,8	5 ml	0,5 M Tris; pH 8,8
0,05 ml	10 % SDS	0,2 ml	10 % SDS
0,05 ml	10 % APS	0,2 ml	10 % APS
0,005 ml	TEMED	0,008 ml	TEMED

Für das Gießen der Gele wurden Glasplatten mit seitlich platzierten Abstandhaltern in die Gießvorrichtung eingesetzt und die Gießhöhe des Trenngels markiert. Beim Ansetzen des Trenngels und später des Sammelgels wurden APS und TEMED für die Einleitung der Gelpolymerisation jeweils zuletzt zugesetzt. Die Trenngel-Lösung wurde mit einer Pasteur-Pipette bis knapp über die Markierung für das Trenngel in den Aufbau gegeben und mit Isopropanol überschichtet, da die Polymerisation besser unter Luftausschluß abläuft. Nach ca. 40 min war das Trenngel ausgehärtet und das Isopropanol wurde abgegossen. Anschließend wurde das

Sammelgel in den Aufbau pipettiert. Dann wurde vorsichtig ein Kamm mit der benötigten Taschenzahl möglichst luftblasenfrei in das Sammelgel eingesetzt. Nach abgeschlossener Polymerisation wurden die Gele in eine Gelelektrophoresekammer montiert. Dann wurde die Kammer mit SDS-Laufpuffer gefüllt, die Kämmen wurden entfernt und die Geltaschen vorsichtig mit SDS-Laufpuffer gespült, um Luftblasen zu entfernen. Anschließend wurden die Proben sauber in die Taschen geladen. An die Gele wurde eine konstante Spannung von 100 Volt angelegt. Wenn das Bromphenolblau des Markers die untere Kante des Gelaufbaus erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet. Die Gele wurden für die Analyse im Western Blot weiter verwendet.

4.4.4 Vorbereitung der Proben

Die Proben waren entweder Zellkulturlysate oder Gewebelysate aus Extremitätenknospen und wurden in Lysepuffer aufgenommen. Nach der Lyse und gegebenenfalls Ko-IP, wurden die Proben mit einer adäquaten Menge SDS-haltigem Proteinprobenpuffer (2x) für eine einfache Endkonzentration versehen und für 2 min bei 90 °C denaturiert. Insgesamt wurden maximal 35 µl in die breiten bzw. 20 µl in die schmalen Proteingeltaschen gegeben. Zusätzlich zu den zu analysierenden Proben wurde immer 8 µl Proteinmarker auf das Proteingel aufgetragen, um das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine einzuordnen.

4.4.5 Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren zum spezifischen Nachweis von Proteinen in einem Proteingemisch. Dafür werden die Proteine nach der SDS-PAGE auf eine Trägermembran transferiert und anschließend mit primären Antikörpern inkubiert. Danach erfolgt die Inkubation mit, z. B. Peroxidase-gekoppelten, sekundären Antikörpern, die mittels eines „Enhanced chemiluminescence“ (ECL)-Reagenz sichtbar gemacht werden.

Proteintransfer

Eine auf Gelgröße zurecht geschnittene PVDF-Membran wurde für 2 min in MeOH aktiviert. Danach wurden sowohl die Membran als auch das Gel für 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurden die Proteine mit dem Semidry-Blot-Verfahren in einer entsprechenden Blotkammer auf die Membran übertragen. Der Blot-Aufbau erfolgte so, dass die negativ geladenen Proteine auf die positiv geladene Membran transferiert wurden, hier von oben nach unten. Dafür wurde zuunterst ein in Transferpuffer getränktes, dickes Whatman-Papier platziert. Darauf wurde die aktivierte Membran gelegt, gefolgt vom Gel, das ebenfalls von einem weiteren

getränkten Whatman-Papier bedeckt wurde. Eventuell vorhandene Luftblasen wurden durch vorsichtiges Rollen mit einem Glasstäbchen entfernt. Geblottet wurde für 25 min bei 20 Volt. Danach wurden die Blotvorrichtung abgebaut und die Markerbanden mit Bleistift nachgezeichnet. Die Membran konnte nachfolgend für den Antikörpernachweis der Proteine verwendet werden.

Detektion der Proteine mit Antikörpern

Nach dem Blotten wurde die Membran zunächst für 5 min in TBST gewaschen, gefolgt von Blocken für 2 h mit 5 % Milch in TBST bei RT, um unspezifische Bindungen abzudecken. Danach wurde die Membran dreimal für je 5 min in TBST gewaschen und anschließend μ N bei 4 °C in einem 50 ml Falcon-Röhrchen auf dem Rollator mit dem jeweiligen Primärantikörper, verdünnt in 4 ml TBST/5 % Milch, inkubiert. Am Folgetag wurde sechsmal für je 10 min mit TBST bei RT gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT im 50 ml Falcon-Röhrchen auf dem Rollator mit dem jeweiligen sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper, verdünnt in 4 ml TBST, inkubiert. Nach erneutem, dreimaligen Waschen in TBST für je 10 min bei RT wurden die Proteine mittels ECL-Reagenz enzymatisch sichtbar gemacht. Die Verdünnungen der Primärantikörper wurden teilweise mit 1 % Natriumazid versetzt und konnten so zur Wiederverwendung für mehrere Tage bei 4 °C aufbewahrt werden. Eine Tabelle der verwendeten Antikörper und ihrer Verdünnungen findet sich im Materialienkapitel.

Visualisierung der Proteine

Die an die Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase dient der spezifischen Detektion von Proteinen auf der Membran. Die Peroxidase vermittelt bei der Spaltung von Peroxid eine Redoxreaktion und setzt dabei mittels Chemilumineszenz Licht frei. Bei der gesteigerten Chemilumineszenzreaktion („Enhanced chemiluminescence“, ECL)-Reaktion ist die abgegebene Lichtintensität in Anwesenheit eines Enhancers bis zu 1000-fach erhöht und ermöglicht so eine sensitive Detektion kleinster Proteinmengen. Die Detektion der Sekundärantikörper erfolgte mittels eines ECL-Kits entsprechend den Angaben des Herstellerprotokolls. Das ausgesandte Licht ermöglicht dort, wo Proteine durch primären und sekundären Antikörper markiert sind, die spezifische Visualisierung von Banden. Die Signale wurden durch das LAS-4000-Abbildungssystem detektiert und dokumentiert und gegebenenfalls mit der AIDA Image Analyzer-Software quantifiziert.

Strippen der Western Blots und wiederholte Antikörperinkubation

Das Strippen dient der Wiederverwendung eines Western Blots zur erneuten Antikörperinkubation. Dabei werden gebundene Antikörper auf zuvor entwickelten Membranen entfernt, während die transferierten Proteine fest an die Membran gebunden bleiben. Diese Proteine können anschließend mit weiteren Antikörpern auf der Membran nachgewiesen werden. Zunächst wurde die Membran dreimal für je 5 min in TBST gewaschen, gefolgt von zweimaliger Inkubation in Stripping-Puffer für je 10 min bei RT. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 10 min in TBST gewaschen. Nun konnten ein erneutes Blocken der Membran und eine weitere Antikörper-Detektion folgen.

4.4.6 Koimmunopräzipitation

Die Koimmunopräzipitation (Ko-IP) ermöglicht den Nachweis von Protein-Interaktionen in eukaryotischen Zellen, indem ein Köderprotein mit einem artifiziellen Anhang (Tag) mittels Agarose-gekoppelter Antikörper präzipitiert wird. Dabei werden potenzielle Interaktionspartner des Köderproteins kopräzipitiert und können detektiert werden. Zunächst wurden die Proteinkonzentrationen der Zellysate mit dem BCA Protein Assay Kit gemessen. Dann wurden für die Expressionskontrolle jeweils 25 µg Protein pro Spur auf zwei Proteingele aufgetragen, gefolgt von SDS-PAGE, Western Blot und Detektion mittels spezifischer Antikörper. So wurde vor Durchführung der Ko-IP die Expression von HOXA13 bzw. HOXD13-wt/+Ala in den Lysaten dokumentiert. Als Kontrollen wurden die Lysate untransfizierter Zellen sowie die Lysate von nur *Hoxa13*- oder *Hoxd13*-überexprimierenden Zellen auf das Gel aufgetragen. Nur wenn eine vergleichbare Expression von HOXA13 und HOXD13-wt/+Ala in den Lysaten nachgewiesen wurde, erfolgte anschließend die Ko-IP. Dafür wurden die Zellysate nach Entnahme von insgesamt ca. 50 µl, für die Messung der Proteinkonzentrationen und die Expressionskontrollen, für die Ko-IP weiterverwendet. 10 µl mit Anti-FLAG-Antikörpern gekoppelte Agarosekügelchen wurden nach dreimaligem Waschen für 1 h bei 4 °C mit 3 % BSA in Ko-IP-Lysepuffer auf einem langsam rotierenden Drehrad vorblockiert, um unspezifische Bindungen an Agarose zu reduzieren. Anschließend wurden die Agarosekügelchen erneut dreimal gewaschen. Alle Waschschritte erfolgten mit Ko-IP-Lysepuffer, gefolgt von Pelletierung für 10 sec bei 10000 rpm, Abnehmen des Überstands, erneuter Zugabe von 500 µl Puffer und Vermischen durch Antippen des Reaktionsgefäßes. Dann wurden 450 µl Lysat mit einem Proteingehalt von jeweils ca. 450 µg mit 10 µl mit Anti-FLAG-Antikörpern gekoppelten Agarosekügelchen versetzt. Danach wurde für 2,5 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert, um FLAG-getagte Proteine und ihre Interaktionspartner an die Kügelchen zu binden. Um

unspezifische Bindungen zu lösen, wurden die Kügelchen dann erneut sechsmal mit Ko-IP-Lysepuffer gewaschen. Anschließend wurden die Proben direkt in 35 µl 1x Proteinprobenpuffer denaturiert und bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann vorsichtig ohne Mitnahme von Kügelchen zur Analyse mittels SDS-PAGE auf das Gel aufgetragen. Bei der Denaturierung wurden die Primärantikörper von den Kügelchen abgelöst und in leichte (25 Kilodalton, 25 kDa) und schwere (50 kDa) Ketten, die Hintergrundbanden produzieren, aufgetrennt. Als Positivkontrollen zum Nachweis einer funktionierenden Antikörperdetektion wurden Lysate von *Hoxa13*- bzw. *Hoxd13*-überexprimierenden Zellen auf das Gel aufgetragen. Als Negativkontrolle diente das Lysat untransfizierter Zellen. Der SDS-PAGE folgten der Western Blot und die Detektion mittels spezifischer Antikörper. Zuerst erfolgte der Nachweis von HOXA13 und nach dem Strippen der Membran der Nachweis von HOXD13-wt/+Ala. Das Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

4.4.7 Proteinnachweis aus Gewebelysaten

Die Proteinkonzentrationen der Gewebelysate von wt/wt-, wt/*spdh*- und *spdh/spdh*-Mäusen des Entwicklungsstadiums E 13,5 wurden mit dem BCA Protein Assay Kit bestimmt. Es wurden jeweils 20 µg Protein pro Spur aufs Proteingel aufgetragen, gefolgt von SDS-PAGE, Western Blot und Detektion mittels spezifischer Antikörper. Als Positivkontrollen wurden Lysate von *Hoxa13*- bzw. *Hoxd13*-überexprimierenden COS-1-Zellen auf das Gel aufgetragen. Zuerst erfolgte der Nachweis von HOXA13, nach dem Strippen der Membran der Nachweis von HOXD13 und nach erneutem Strippen der Nachweis von β -Aktin zur Kontrolle der gleichmäßigen Gelbeladung. Das Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Signale wurden mit der AIDA Image Analyzer-Software quantifiziert. Die ermittelten Werte wurden für jedes Experiment einzeln auf die Signalintensität des wt/wt-Lysats bezogen, die auf 100 % festgesetzt wurde. Die Bande, die bei Detektion des HOXA13 mit dem Anti-HOXA13-Antikörper (Aviva) unspezifisch oberhalb des HOXA13 zwischen 40 kDa und 55 kDa in den Lysaten erscheint, wurde nicht näher untersucht. Sie fand sich während der Versuchsetablierung auch in den Lysaten untransfizierter Zellen. Während der Versuchsetablierung wurde zusätzlich durch den Nachweis von HOXA13 mittels eines weiteren Anti-HOXA13-Antikörpers (von Prof. Atsushi Kuroiwa, Nagoya, Japan) verifiziert, dass es sich bei der spezifischen, durch den Aviva-Antikörper detektierten Bande, um HOXA13 handelt.

4.5 Luciferase-Reporterassay

Genetische Reportersysteme ermöglichen die Untersuchung der eukaryotischen Genexpression. Beim Luciferase-Reporterassay wird ein Luciferase-Gen unter der Kontrolle eines zu untersuchenden Promotors exprimiert. Durch die Messung der Luciferase-Aktivität wird dann die Promotoraktivität erfasst. In dieser Arbeit wurden Luciferase-basierte Reporterkonstrukte mit einem BMP-responsiven Element (BRE)- oder SMAD-bindenden Element (SBE)-haltigen Promotor verwendet. Als Antwort auf BMP-Signale binden SMAD-Transkriptionsfaktoren zur Regulation der Genexpression an SBEs und BREs^{51, 53}. Neben der eigentlichen Reporterluciferase (*Firefly*-Luciferase aus *Photinus pyralis*, Glühwürmchenluciferase) wurde zur Normalisierung eine weitere Luciferase (*Renilla*-Luciferase aus *Renilla reniformis*, Seestiefmütterchenluciferase) exprimiert. Diese Normalisierung mit einer internen Kontrolle minimiert die experimentelle Variabilität durch Zellunterschiede und unterschiedliche Transfektionseffizienzen. Das Dual-Glo-Luciferase-Reportersystem ermöglicht, die Aktivität von *Firefly*-Luciferase und *Renilla*-Luciferase hintereinander im gleichen Ansatz zu messen. *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase entstammen verschiedenen Organismen. Dies ermöglicht eine selektive Unterscheidung ihrer biolumineszenten Reaktion. Im Dual-Glo-System wird nach Messung der Lumineszenz der *Firefly*-Luciferase die Reaktion abgestoppt und zeitgleich die Reaktion der *Renilla*-Luciferase aktiviert. *Firefly*-Luciferase ist ein 60 kDa großes Protein, das keinerlei Modifizierung benötigt, um enzymatisch aktiv zu sein. Es oxidiert Käfer-Luciferin in einer ATP-, magnesium- und sauerstoffabhängigen Reaktion und erzeugt kurz nach der Substratzugabe eine Lichtreaktion. Diese Reaktion kann durch die Zugabe von Coenzym A verstärkt werden, das auch die Lumineszenz stabilisiert. *Renilla*-Luciferase ist ein 35 kDa großes Protein, das ebenfalls nicht modifiziert werden muss und sofort biolumineszent aktiv ist. Allerdings benötigt *Renilla*-Luciferase ein anderes Substrat als *Firefly*-Luciferase und oxidiert dieses in einer ebenfalls sauerstoffabhängigen Reaktion. Alle Luciferase-Reporterassays wurden mit COS-7- bzw. HepG2-Zellen durchgeführt, die wie beschrieben in 24-Loch-Platten transient transfiziert wurden. Es wurden in jedem Versuch eine Leervektorkontrolle und eine untransfizierte Kontrolle durchgeführt, um jeden Versuch normalisieren und auswerten zu können. Der Dual-Glo-Luciferase-Assay wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die dabei angewendeten Modifikationen sind im Folgenden aufgeführt. 18 h nach der Transfektion wurden das Medium abgesaugt, die Zellen mit DPBS gewaschen und anschließend für 15 min in 100 µl 1x Passivlysepuffer bei RT auf einer Wippe lysiert. Die Proben konnten entweder sofort für die Messung der Lumineszenz weiter verwendet oder bis zur Messung bei -80 °C gelagert werden. Es wurden jeweils 25 µl des Lysats in die Löcher einer 96-Loch-Platte überführt, mit 25 µl Dual-Glo

versehen, gründlich durchmischen und dann im Luminometer mit 10 min Zeitverzögerung gemessen. Währenddessen wurde Dual-Stop&Glo mit Substrat (1:100) versetzt. Von diesem Gemisch wurden 25 µl zu dem bereits gemessenen Luciferaseansatz gegeben und mit 10 min Zeitverzögerung gemessen. Jeder Luciferase-Assay wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und es wurden immer Duplikate transfiziert. Die Auswertung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers des Dual-Glo-Luciferase-Assays. Die ermittelten Werte wurden auf die Leervektor-Kontrolle ohne *Hoxd13*- und ohne *Bmpr1b-ca*-Expression bezogen, deren Lumineszenz auf 100 % festgesetzt wurde, und die Standardabweichungen wurden berechnet.

4.6 Immunzytochemie

Die Immunzytochemie dient dem Nachweis der Anwesenheit und Lokalisation sowie gegebenenfalls der Abschätzung der Quantität intrazellulärer oder zellmembranständiger Proteine mit spezifischen Antikörpern. In der vorliegenden Arbeit wurde die indirekte Immunfluoreszenz angewendet. Dabei wird ein spezifischer, gegen das entsprechende Protein gerichteter, primärer Antikörper durch einen sekundären, speziell markierten Antikörper sichtbar gemacht. Bei der Markierung handelt es sich um Fluoreszenzfarbstoffe, die bei Anregung mit Licht bestimmter Wellenlänge eine spezifische Fluoreszenz erzeugen. Mit einem Fluoreszenzmikroskop lässt sich so die zelluläre Verteilung des untersuchten Proteins analysieren. 48 h nach der Transfektion wurden die mit COS-1-Zellen bewachsenen Deckgläser zweimal für je 5 min mit PBS bei RT gewaschen, anschließend für 20 min mit Methanol (MeOH) bei – 20 °C für 10 min fixiert und erneut für 5 min mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt, dem „Quenching“, wurde zum Abfangen internalisierter Fluorophore, wie Tryptophan und Phenylalanin, für 10 min mit 50 mM NH₄Cl in PBS inkubiert, gefolgt von dreimaligem Waschen für je 5 min mit PBS. Im Grunde erübrigt sich nach der Fixierung mit MeOH die Permeabilisierung der Membran. Dennoch wurde die Membran zur besseren Antikörperreaktion zusätzlich für 30 min mit 3 % BSA/0,1 % Saponin in PBS permeabilisiert. Das BSA sättigt gleichzeitig unspezifische Bindungen ab. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper. Dafür wurden je 50 µl der entsprechenden Antikörper-Lösung, in 3 % BSA/0,1 % Saponin in PBS, pro Deckglas in einer Feuchtkammer auf Parafilm vorgelegt. Dann wurde das Deckglas kopfüber darauf platziert, um ein Austrocknen während der Antikörperinkubation zu verhindern. Am folgenden Tag wurde dreimal mit PBS für 10 min bei RT gewaschen und anschließend mit dem jeweiligen sekundären Antikörper, in 10 % FCS in PBS mit DAPI 1:750, für 1 h bei RT inkubiert. DAPI ist ein blau fluoreszierender DNA-Marker und dient der Anfärbung des Zellkerns, um die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von Proteinen zu erleichtern. Nach erneutem dreimaligen Waschen

mit PBS für je 15 min wurde in Fluoromount-G auf Objektglaträgern eingedeckelt. Bei 4 °C und unter Ausschluss von Licht konnten die Deckgläser für mehrere Wochen aufbewahrt und analysiert werden. Die eingesetzten Antikörper und ihre Verdünnungen sind im Materialienkapitel aufgeführt. Jedes Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und es wurden jeweils Duplikate transfiziert. Für die Quantifizierung der zytoplasmatischen Aggregation des HOXD13+14Ala in Abhängigkeit vom koexprimierten Protein wurden zunächst durch immunzytochemische Anfärbung die Zellen mit einer Koexpression von HOXD13+14Ala und HOXA13-wt, HOXD13+14Ala und HOXD11-wt oder HOXD13+14Ala und HOXD12-wt identifiziert. Entsprechend der Verteilung des HOXD13+14Ala wurden die Zellen in solche mit überwiegend zytoplasmatischer Aggregation sowie schwacher nukleärer Lokalisation und solche mit ausschließlich nukleärer Lokalisation unterteilt und ausgezählt. Anschließend wurden die Anteile der Zellen mit der jeweiligen HOXD13+14Ala-Lokalisation in Prozent und die Standardabweichungen berechnet.

4.7 Mäusezucht

„*Synpolydactyly homolog*“ (*spdh*)-Mäuse besitzen eine spontan aufgetretene, autosomal rezessiv vererbte Polyalaninrepeat-Expansion des *Hoxd13* im B6C3Fe-Mausstamm, die in diesem Hintergrund erhalten wurde⁶⁸. Homozygote *spdh/spdh*-Tiere erhielt man durch Verpaarungen heterozygoter *spdh/wt*-Tiere und die *wt/wt*-Geschwistertiere dienten als Kontrolle. Mittels PCR wurden die Mäuse genotypisiert. Die DNA dafür wurde aus den Schwanzspitzen gewonnen. Bei den Verpaarungen wurde der Tag des Vaginalplugs als Embryonalstadium E 0,5 gewertet.

4.8 Histologie

4.8.1 Paraffineinbettung

Die Paraffineinbettung wurde freundlicherweise durch Dr. Pia Kuss durchgeführt. Die Extremitäten der entsprechenden Stadien wurden abpräpariert und anschließend in 4 % PFA/PBS bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Präparate zweimal für je 5 min in PBS gewaschen, dann für 1 h in 50 % Ethanol (EtOH) bei RT inkubiert und anschließend für 2 h in 70 % EtOH inkubiert. Die nachfolgenden Entwässerungsschritte und die Überführung in Paraffin erfolgten im Entwässerungsautomaten mit folgendem Programm: 3 h 90 % EtOH, 3 h 95 % EtOH, 2 h mit Vakuum 100 % EtOH, 2 h mit Vakuum 100 % EtOH, 2 h mit Vakuum 100 % EtOH, 15 min mit Vakuum Ultraclear (UC), 15 min mit Vakuum UC, 30 min mit Vakuum UC, 3 h mit Vakuum UC/Paraffin, 3 h mit Vakuum Paraffin. Die anschließend in flüssigem

Paraffin vorliegenden Präparate wurden an der Einbettstation eingelagert. Nach dem Aushärten der Blöcke wurden die Extremitäten für die Immunhistochemie am Mikrotom in 7 µm dicke Scheiben geschnitten und auf 2 bis 3 Objektträger verteilt. Dann wurden die Objektträger bei 40 °C vollständig getrocknet und nachfolgend üN bei 37 °C inkubiert. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bei 4 °C.

4.8.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ermöglicht die Visualisierung von Proteinen in Geweben mittels spezifischer Antikörper. Die Lokalisation der Proteine kann sowohl innerhalb des Gewebes als auch intrazellulär sichtbar gemacht werden. In der vorliegenden Arbeit fand die indirekte Immunfluoreszenz Anwendung, bei der ein spezifischer, gegen das entsprechende Protein gerichteter primärer Antikörper durch einen sekundären, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörper sichtbar gemacht wird. Mit einem Fluoreszenzmikroskop lässt sich dann die Verteilung des untersuchten Proteins analysieren. Die immunhistologischen Untersuchungen erfolgten auf Paraffinschnitten. Zunächst wurden die Gewebsschnitte in einer Lösungsreihe deparaffinisiert und rehydriert: 30-40 min in UC, 2 min in 100 % EtOH, 2 min in UC, 2 min in 100 % EtOH, 2 min in UC, 5 min in 100 % EtOH, 5 min in 90 % EtOH, 5 min in 70 % EtOH, 5-15 min in H₂O bidest. Danach wurden die Gewebsschnitte zur besseren Antikörpererkennung in Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6 zweimal für je 3 min gekocht und anschließend für ca. 30 min auf RT abgekühlt. Nach dreimaligem Waschen in PBS für je 5 min wurde mit 0,2 % Triton X-100 in PBS für 15 min bei RT permeabilisiert, gefolgt von dreimaligem Waschen für je 5 min in PBS. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit 5 % NGS/0,2 % Tween 20 in PBS für 1 h bei RT in einer Feuchtkammer blockiert. Dann folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, verdünnt in 5 % NGS/0,2 % Tween 20 in PBS, üN bei 4 °C in einer Feuchtkammer. Am Folgetag wurde dreimal bei RT mit PBS für je 5 min gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper, verdünnt in 3 % BSA/0,1 % Saponin in PBS, für 2 h bei RT in einer Feuchtkammer. Die Sekundärantikörperlösung enthielt zusätzlich DAPI in einer Verdünnung von 1:750 zur Darstellung der Zellkerne. Nach dreimaligem Waschen in PBS für je 30 min wurden die Gewebsschnitte mit Fluoromount-G auf Objektträgern eingedeckelt. Die eingesetzten Antikörper und ihre Verdünnungen sind im Materialienkapitel aufgeführt.

4.9 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie dient der Untersuchung der Lokalisation und Abschätzung der Expressionsstärke fluoreszenzmarkierter Proteine in Geweben und Zellen. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und emittieren Licht einer anderen, größeren Wellenlänge. Das Präparat wird mit der Wellenlänge beleuchtet, die dem spezifischen Absorptionsmaximum des Farbstoffs entspricht. Andere Wellenlängen werden gefiltert. Das vom Präparat emittierte Licht wird dann durch ein weiteres Filtersystem im Okular betrachtet. Nach der immunzyto- bzw. immunhistochemischen Färbung wurden die detektierten Proteine am Fluoreszenzmikroskop analysiert und die Ergebnisse wurden mit Hilfe einer digitalen Kamera dokumentiert. Ein sehr spezielles, fluoreszenzmikroskopisches Verfahren ist die konfokale Laserscanmikroskopie. Durch den Einsatz einer Lochblende gelangt nur die Fluoreszenz eines winzigen Volumenelements in das Mikroskop, während die Hintergrundsignale ebenfalls fluoreszierender, höher oder tiefer gelegener, Schichten ausgeblendet werden. Dies ermöglicht das Mikroskopieren in mehrschichtigen Präparaten, z. B. in Gewebsschnitten. Nach der Immunhistochemie kann so die exakte Bestimmung der Lokalisation fluoreszenzmarkierter Proteine in der gewählten Schnittebene erfolgen.

5 Ergebnisse

5.1 Interaktion von expandiertem HOXD13 mit Polyalanin-Transkriptionsfaktoren

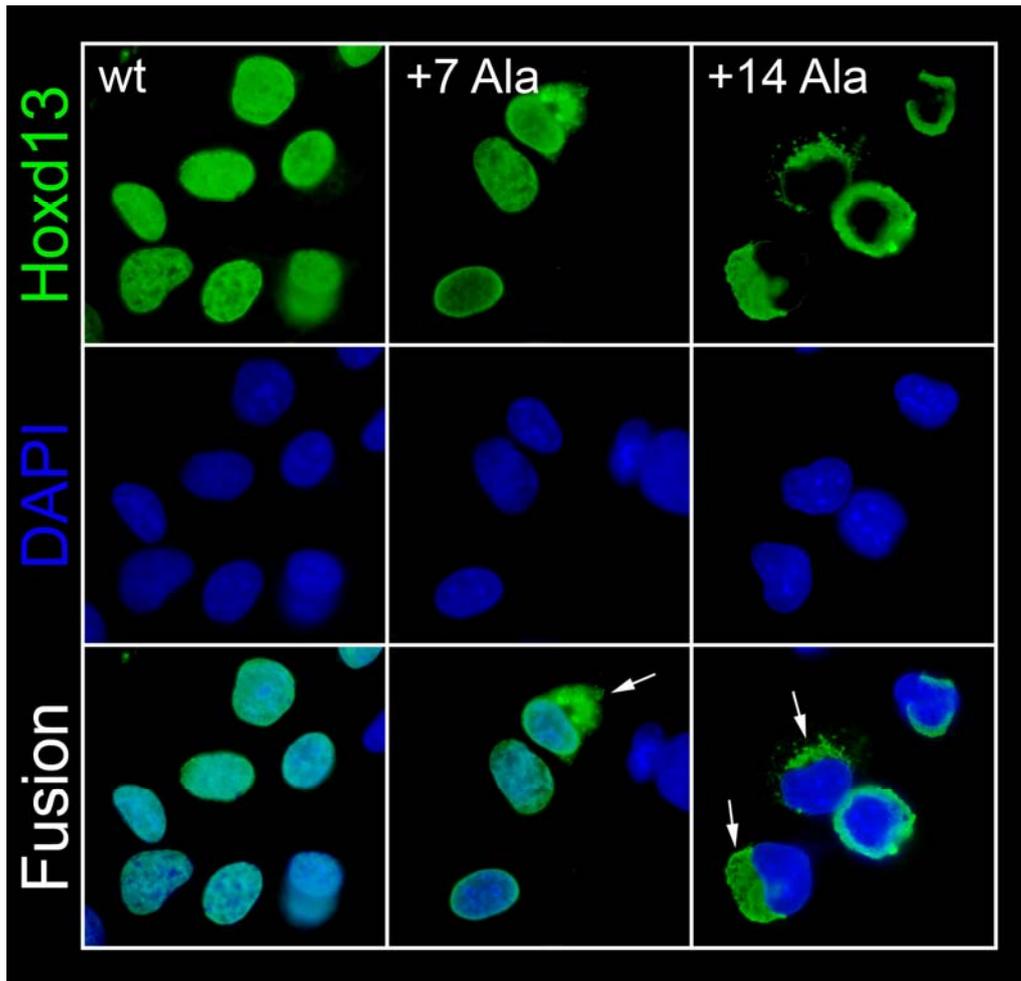
5.1.1 Expandiertes HOXD13 aggregiert im Zytoplasma

Das der Synpolydaktylie (SPD) 1 zugrunde liegende mutierte *HOXD13* mit einem expandierten Polyalaninrepeat (*HOXD13+Ala*) führt *in vitro* zu einer abnormen, zytoplasmatischen Proteinaggregation, deren Ausmaß mit der Polyalanin-Expansionslänge korreliert⁷³. Um die molekulare Pathogenese der SPD genauer zu analysieren, wurde die intrazelluläre Lokalisation von *HOXD13+Ala* mit der kürzesten bzw. längsten bekannten SPD-verursachenden Polyalaninrepeat-Expansion um 7 bzw. 14 Alanine mit der Lokalisation von Wildtyp-*HOXD13* (*HOXD13-wt*) verglichen.

COS-1-Zellen dienten dabei als *in vitro*-Modell zur Untersuchung der molekularen Pathogenese der SPD. *Hoxd13*-Konstrukte mit verschiedenen langen Polyalaninrepeats wurden in COS-1-Zellen überexprimiert. Die Konstrukte enthielten *Hoxd13-wt* oder expandiertes *Hoxd13+Ala* mit für zusätzliche 7 (*Hoxd13+7Ala*) bzw. 14 Alanine (*Hoxd13+14Ala*) kodierenden Polyalaninrepeat-Expansionen. Nach 48 h wurden die Proteine immunzytochemisch mit spezifischen Antikörpern gefärbt, die Zellkerne durch DAPI-Färbung dargestellt und die intrazelluläre Verteilung der Proteine mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt. Als Transkriptionsfaktor befindet sich *HOXD13-wt* im Nukleus. Sowohl expandiertes *HOXD13+7Ala* als auch *HOXD13+14Ala* bilden zytoplasmatische Aggregate. Expandiertes *HOXD13+7Ala* aggregiert nur in einigen Zellen im Zytoplasma, ist jedoch überwiegend nukleär lokalisiert. *HOXD13+14Ala* hingegen bildet in den meisten Zellen zytoplasmatische Aggregate und liegt selten im Zellkern vor. Das Ausmaß der zytoplasmatischen Aggregation von expandiertem *HOXD13+7Ala* und *HOXD13+14Ala* korreliert folglich mit der Expansionslänge.

Abbildung 10: HOXD13+Ala aggregiert im Zytoplasma



Immunocytochemie: *Hoxd13*-wt (linke Spalte), *Hoxd13*+7Ala (mittlere Spalte) oder *Hoxd13*+14Ala (rechte Spalte) wurden in COS-1-Zellen exprimiert, nach 48 h angefärbt (grün) und analysiert. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). In der unteren Reihe sind beide Färbungen übereinander gelagert (Fusion). HOXD13-wt befindet sich im Zellkern. HOXD13+7Ala aggregiert in einigen Zellen im Zytoplasma (weißer Pfeil), liegt jedoch hauptsächlich im Zellkern vor. HOXD13+14Ala aggregiert in den meisten Zellen im Zytoplasma (weiße Pfeile).

Abkürzungen: *Hoxd13*-wt, Wildtyp-*Hoxd13*; *Hoxd13*+7Ala bzw. *Hoxd13*+14Ala, expandiertes *Hoxd13* mit für zusätzliche 7 bzw. 14 Alanine kodierender Polyalaninrepeat-Expansion.

5.1.2 Aggregate aus expandiertem HOXD13 sequestrieren Wildtyp-HOXA13

Phänotypenvergleiche und Kreuzungsexperimente mit mutanten Mauslinien lassen vermuten, dass expandiertes *Hoxd13*+Ala während der Embryonalentwicklung des Autopods einen negativen Effekt auf 5'-lokalisierte *Hox*-Gene ausübt⁷⁴. Des Weiteren wurde gezeigt, dass HOXD13-wt von

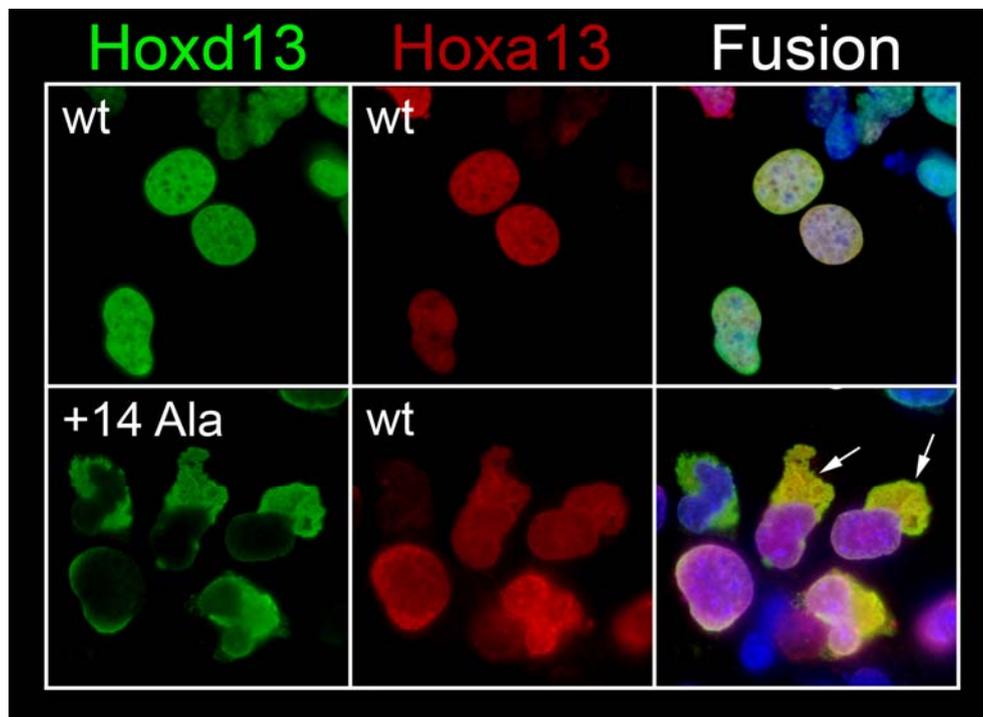
Ergebnisse

zytoplasmatischen Aggregaten aus HOXD13+14Ala mit expandiertem Polyalanintrakt sequestriert wird⁷³.

Um analog eine mögliche Interaktion von expandiertem HOXD13+14Ala mit dem Polyalanin-Transkriptionsfaktor HOXA13-wt zu testen, wurden *Hoxd13-wt* bzw. expandiertes *Hoxd13+14Ala* und *Hoxa13-wt in vitro* in COS-1-Zellen koexprimiert. Nach 48 h wurden die Proteine immunzytochemisch mit spezifischen Antikörpern gefärbt, die Zellkerne durch DAPI-Färbung dargestellt und die intrazelluläre Verteilung der Proteine mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 gezeigt. Erwartungsgemäß befindet sich HOXA13-wt mit HOXD13-wt im Zellkern. Wie vermutet sequestrieren die zytoplasmatischen HOXD13+14Ala-Aggregate das Polyalanintrakt-haltige HOXA13-wt.

Abbildung 11: Aggregate aus HOXD13+Ala sequestrieren HOXA13-wt



Immunzytochemie: In COS-1-Zellen wurden *Hoxd13-wt* und *Hoxa13-wt* (obere Reihe) oder *Hoxd13+14Ala* und *Hoxa13-wt* (untere Reihe) koexprimiert. HOXD13 (grün) und HOXA13 (rot) wurden nach 48 h angefärbt und analysiert. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). In der rechten Spalte sind die Färbungen übereinander gelagert (Fusion). HOXA13-wt liegt mit HOXD13-wt im Zellkern vor. Dagegen wird HOXA13-wt von den zytoplasmatischen Aggregaten aus HOXD13+14Ala sequestriert (weiße Pfeile).

Abkürzungen: *Hoxd13-wt*, Wildtyp-*Hoxd13*; *Hoxd13+14Ala*, expandiertes *Hoxd13* mit für zusätzliche 14 Alanine kodierender Polyalaninrepeat-Expansion; *Hoxa13-wt*, Wildtyp-*Hoxa13*.

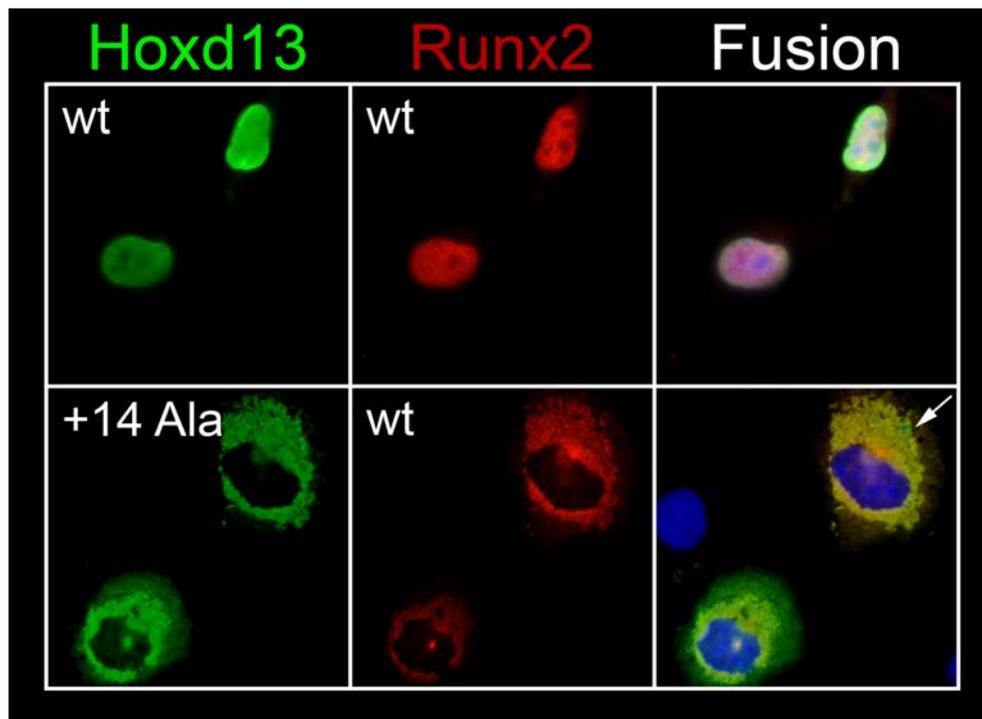
5.1.3 Aggregate aus expandiertem HOXD13 sequestrieren Wildtyp-RUNX2

Das vorhergehende Experiment zeigte, dass zytoplasmatische Aggregate aus HOXD13+14Ala neben HOXD13-wt⁷³ auch das ebenfalls Polyalanintrakt-haltige HOXA13-wt sequestrieren. Falls es sich nicht um eine HOX-spezifische, sondern um eine Polyalanintrakt-abhängige Interaktion handelt, wäre eine Kolo-kalisation von HOXD13+14Ala mit weiteren Wildtyp-Polyalanin-Transkriptionsfaktoren wie Wildtyp-RUNX2 (RUNX2-wt) denkbar. *Runx2* wird im Autopod zusammen mit *Hoxd13* perichondrial exprimiert und steuert die Osteoblastendifferenzierung³³.

Um eine mögliche Interaktion von HOXD13+14Ala mit RUNX2-wt zu testen, wurden *in vitro* analog zum vorangegangenen Versuch *Hoxd13-wt* bzw. *Hoxd13+14Ala* und *Runx2-wt* in COS-1-Zellen koexprimiert. Nach 48 h wurden Genprodukte und Zellkerne gefärbt und mikroskopiert.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 gezeigt. RUNX2-wt liegt mit HOXD13-wt im Nukleus vor. Wie vermutet sequestrieren zytoplasmatische Aggregate aus HOXD13+14Ala das RUNX2-wt.

Abbildung 12: Aggregate aus HOXD13+Ala sequestrieren RUNX2-wt



Immunzytochemie: In COS-1-Zellen wurden *Hoxd13-wt* und *Runx2-wt* (obere Reihe) oder *Hoxd13+14Ala* und *Runx2-wt* (untere Reihe) koexprimiert. HOXD13 (grün) und RUNX2 (rot) wurden nach 48 h angefärbt und analysiert. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). In der rechten Spalte sind die Färbungen übereinander gelagert (Fusion). RUNX2-wt befindet sich mit HOXD13-wt im Zellkern. Zytoplasmatische Aggregate aus HOXD13+14Ala hingegen sequestrieren RUNX2-wt (weißer Pfeil).

Abkürzungen: *Hoxd13-wt*, Wildtyp-*Hoxd13*; *Hoxd13+14Ala*, expandiertes *Hoxd13* mit für zusätzliche 14 Alanine kodierender Polyalaninrepeat-Expansion; *Runx2-wt*, Wildtyp-*Runx2*.

5.1.4 Aggregate aus expandiertem HOXD13 kolokalisieren nicht mit Wildtyp-HOXD11 und Wildtyp-HOXD12

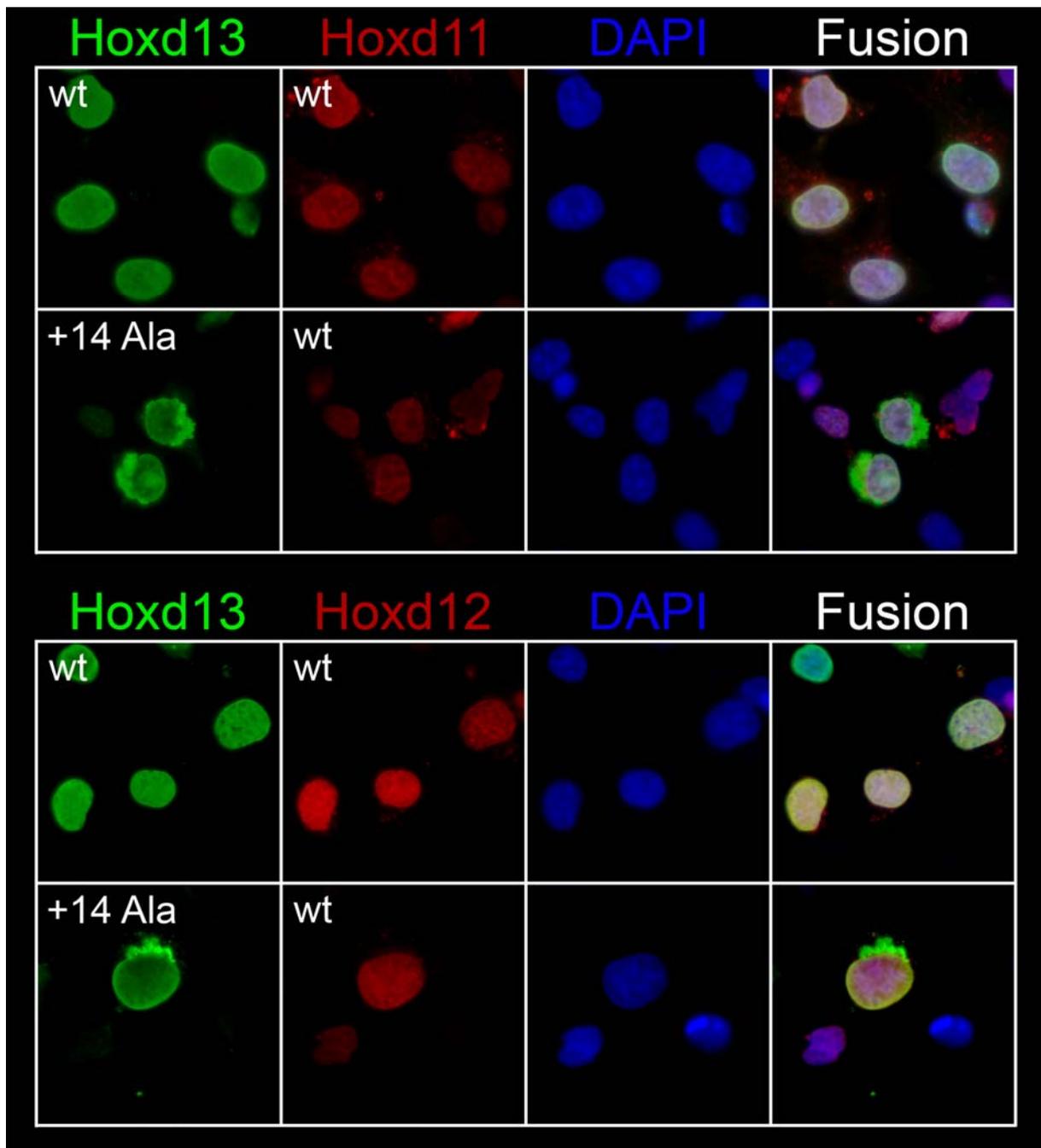
Vorangegangene Versuche zeigten eine Sequestrierung von Wildtyp-Polyalanin-Transkriptionsfaktoren wie HOXD13-wt⁷³, HOXA13-wt und RUNX2-wt durch zytoplasmatische Aggregate aus HOXD13+14Ala mit expandiertem Polyalanintrakt. Folglich könnten die Polyalanintrakte der Wildtyp-Interaktionspartner an der Kolokalisation beteiligt sein.

Um eine mögliche Polyalanin-spezifische Sequestrierung von Wildtyp-Polyalanin-Transkriptionsfaktoren durch expandiertes HOXD13+14Ala zu untersuchen, wurden *in vitro* Koexpressions-Experimente mit *Hoxd13-wt* bzw. expandiertem *Hoxd13+14Ala* und Wildtyp-*Hoxd11* (*Hoxd11-wt*) bzw. Wildtyp-*Hoxd12* (*Hoxd12-wt*) in COS-1-Zellen durchgeführt. Nach 48 h wurden die Proteine immunzytochemisch mit spezifischen Antikörpern gefärbt, die Zellkerne durch DAPI-Färbung dargestellt und die intrazelluläre Verteilung der Proteine mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Bei einer Polyalanin-spezifischen Interaktion wäre eine Sequestrierung von Polyalanintrakt-haltigem HOXD11-wt, nicht jedoch von HOXD12-wt ohne Polyalanintrakt, in Aggregate aus expandiertem HOXD13+14Ala anzunehmen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 gezeigt. HOXD11-wt und HOXD12-wt befinden sich mit HOXD13-wt im Zellkern. HOXD12-wt, das keinen Polyalanintrakt besitzt, wird wie erwartet nicht von zytoplasmatischen Aggregaten aus expandiertem HOXD13+14Ala sequestriert und liegt weiterhin im Zellkern vor. Entgegen den Erwartungen wird auch HOXD11-wt nicht von zytoplasmatischen Aggregaten aus expandiertem HOXD13+14-Ala sequestriert und befindet sich ebenfalls im Nukleus, obwohl es über einen Polyalanintrakt verfügt.

Abbildung 13: HOXD13+Ala-Aggregate kolokalisieren nicht mit HOXD11-wt und HOXD12-wt



Immunzytochemie: In COS-1-Zellen wurden *Hoxd13-wt* und *Hoxd11-wt* (erste Reihe), *Hoxd13+14Ala* und *Hoxd11-wt* (zweite Reihe), *Hoxd13-wt* und *Hoxd12-wt* (dritte Reihe) oder *Hoxd13+14Ala* und *Hoxd12-wt* (vierte Reihe) koexprimiert. HOXD13 (grün) und HOXD11 bzw. HOXD12 (rot) wurden nach 48 h angefärbt und analysiert. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). In der rechten Spalte sind die Färbungen übereinander gelagert (Fusion). HOXD11-wt und HOXD12-wt liegen mit HOXD13-wt im Zellkern vor. Auch in Anwesenheit von HOXD13+14Ala befinden sich HOXD11-wt und HOXD12-wt im Zellkern und kolokalisieren nicht mit den zytoplasmatischen HOXD13+14Ala-Aggregaten.

Abkürzungen: *Hoxd13-wt*, Wildtyp-*Hoxd13*; *Hoxd13+14Ala*, expandiertes *Hoxd13* mit für zusätzliche 14 Alanine kodierender Polyalaninrepeat-Expansion; *Hoxd11/12-wt*, Wildtyp-*Hoxd11/12*.

5.1.5 Wildtyp-HOXA13 fördert die Aggregation von expandiertem HOXD13

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der vorherigen Experimente ergab den Eindruck, dass das Ausmaß der zytoplasmatischen Aggregation des HOXD13+14Ala mit expandiertem Polyalanintrakt vom koexprimierten Protein abhängt.

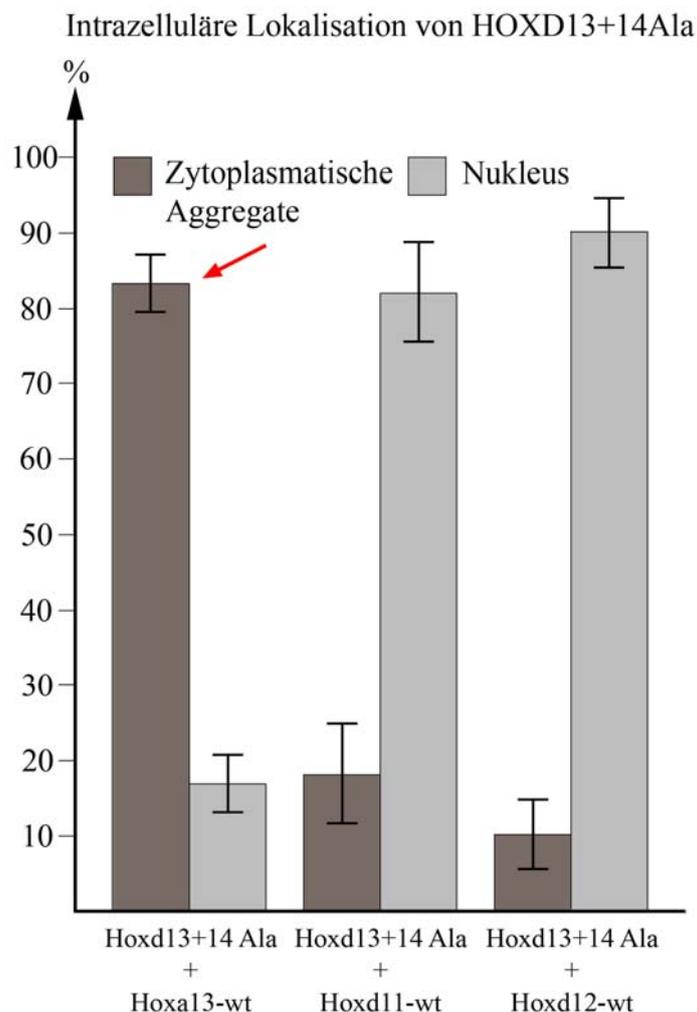
Um diesen Eindruck zu objektivieren, wurden für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente COS-1-Zellen mit fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesener Koexpression von HOXD13+14Ala und HOXA13-wt, HOXD13+14Ala und HOXD11-wt oder HOXD13+14Ala und HOXD12-wt ausgezählt. Dafür wurden nach 48 h die Proteine immunzytochemisch mit spezifischen Antikörpern gefärbt, die Zellkerne durch DAPI-Färbung dargestellt und die intrazelluläre Verteilung der Proteine mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Entsprechend der Verteilung des expandierten HOXD13+14Ala wurden die Zellen in solche mit überwiegend zytoplasmatischer Aggregation sowie geringer nukleärer Lokalisation und solche mit ausschließlich nukleärer Lokalisation unterteilt und der jeweilige Zellanteil wurde quantifiziert.

Wird das koexprimierte Protein, wie HOXA13-wt, in zytoplasmatische Aggregate aus expandiertem HOXD13+14Ala sequestriert, ist eine vermehrte Proteinaggregation denkbar. Hingegen würde HOXD13+14Ala vermutlich bei Koexpression mit nicht kolokalisierendem HOXD11-wt oder HOXD12-wt vergleichsweise weniger aggregieren.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 gezeigt. Wie erwartet führt die Koexpression von *Hoxd13+14Ala* und *Hoxa13-wt* zur vermehrten Bildung von zytoplasmatischen Aggregaten. Etwa 85 % dieser Zellen weisen zytoplasmatische Aggregate auf, verglichen mit nur ca. 20 % bzw. 10 % der Zellen bei Koexpression von *Hoxd13+14Ala* mit *Hoxd11-wt* bzw. *Hoxd12-wt*. Die zytoplasmatische Aggregation des expandierten HOXD13+14Ala ist demnach gesteigert in Anwesenheit des kolokalisierenden HOXA13-wt, verglichen mit der Aggregation in Anwesenheit von HOXD11-wt bzw. HOXD12-wt, die nicht mit HOXD13+14Ala-Aggregaten kolokalisieren.

Ergebnisse

Abbildung 14: HOXA13-wt fördert die Aggregation von HOXD13+Ala



Immunzytochemie und Quantifizierung: In COS-1-Zellen wurde *Hoxd13+14Ala* mit *Hoxa13-wt*, *Hoxd11-wt* oder *Hoxd12-wt* koexprimiert und nach 48 h angefärbt. Zellen mit fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesener Koexpression wurden gezählt. Entsprechend der intrazellulären Verteilung des HOXD13+14Ala wurden die Zellen in solche mit überwiegend zytoplasmatischer Aggregation (Zytoplasmatische Aggregate) und solche mit ausschließlich nukleärer Lokalisation (Nukleus) unterteilt und quantifiziert. Die Abbildung stellt die Ergebnisse dreier unabhängig voneinander durchgeführter Experimente in % dar. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. In Anwesenheit von HOXA13-wt aggregiert HOXD13+14Ala überwiegend im Zytoplasma (roter Pfeil), während es in Gegenwart von HOXD11-wt oder HOXD12-wt meist im Zellkern vorliegt.

Abkürzungen: *Hoxd13+14Ala*, expandiertes *Hoxd13* mit für zusätzliche 14 Alanine kodierender Polyalaninrepeat-Expansion; *Hoxa13-wt*, Wildtyp-*Hoxa13*; *Hoxd11-wt*, Wildtyp-*Hoxd11*; *Hoxd12-wt*, Wildtyp-*Hoxd12*.

5.1.6 Aggregate aus expandiertem HOXD13 kolokalisieren nicht mit verkürztem HOXD13 ohne Polyalanintrakt

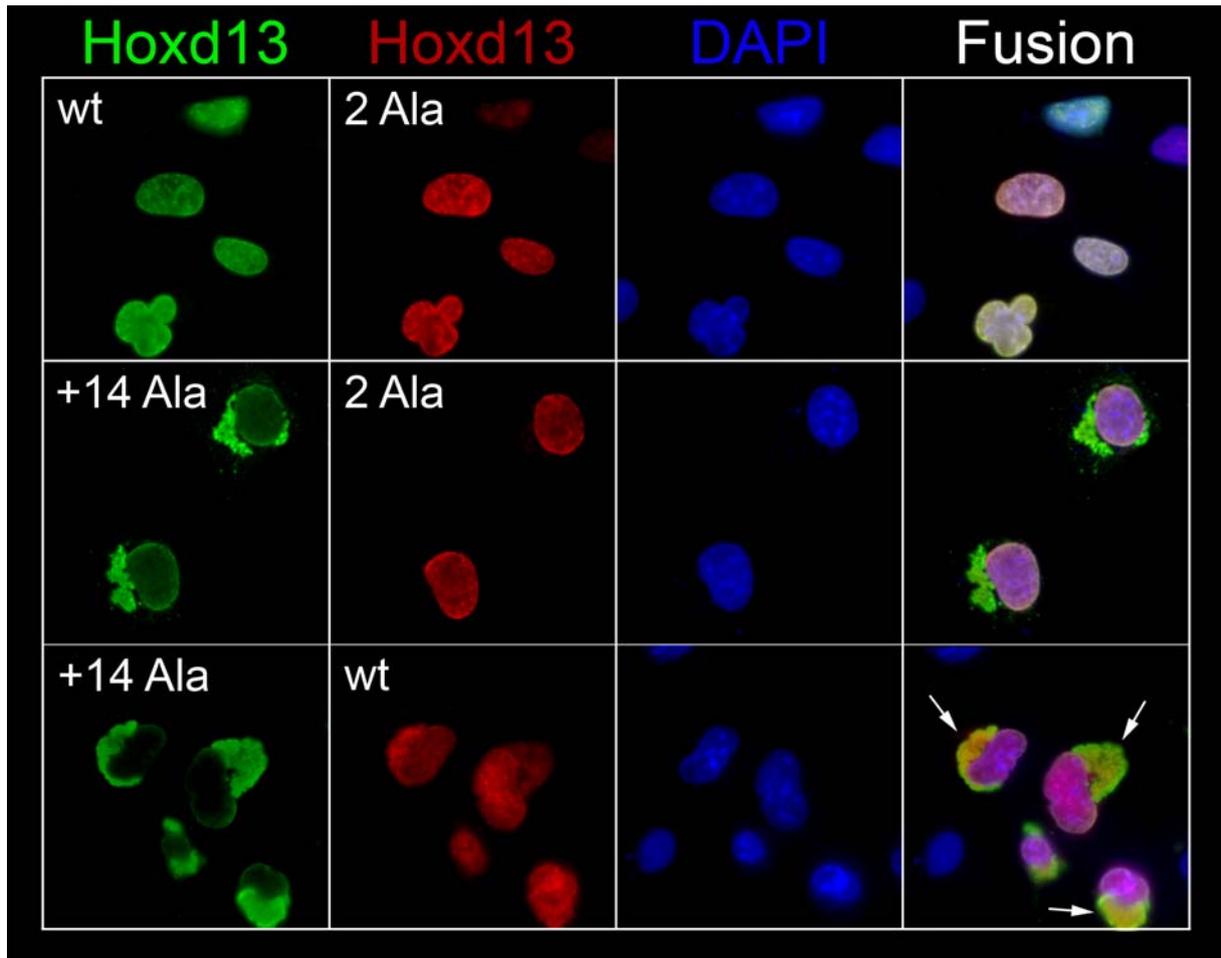
Im Folgenden wurde eine mögliche Beteiligung des Polyalanintrakts von Wildtyp-Polyalanin-Transkriptionsfaktoren an deren Sequestrierung durch HOXD13+14Ala mit expandiertem Polyalanintrakt untersucht.

Dazu wurden *in vitro* Experimente mit mutiertem *Hoxd13* mit einem auf zwei Alanine verkürzten Repeat (*Hoxd13-2Ala*) anstelle des Polyalaninrepeats des *Hoxd13-wt* durchgeführt. Es wurden *Hoxd13-wt* bzw. expandiertes *Hoxd13+14Ala* und verkürztes *Hoxd13-2Ala* in COS-1-Zellen koexprimiert. Als Kontrolle wurden expandiertes *Hoxd13+14Ala* und *Hoxd13-wt* koexprimiert, deren Kolokalisation der Genprodukte in zytoplasmatischen Aggregaten bekannt ist⁷³. Nach 48 h wurden die Proteine immunzytochemisch mit spezifischen Antikörpern gefärbt, die Zellkerne durch DAPI-Färbung dargestellt und die intrazelluläre Verteilung der Proteine mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Bei einer Beteiligung des Wildtyp-Polyalanintrakts an der Interaktion wären zytoplasmatische Aggregate aus expandiertem HOXD13+14Ala erwartungsgemäß nicht in der Lage, verkürztes HOXD13-2Ala zu sequestrieren.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 gezeigt. HOXD13-2Ala liegt wie erwartet mit HOXD13-wt im Zellkern vor. Wie vermutet kolokalisiert verkürztes HOXD13-2Ala nicht mit zytoplasmatischen Aggregaten aus expandiertem HOXD13+14Ala und befindet sich im Zellkern. Hingegen wird HOXD13-wt in zytoplasmatische Aggregate aus expandiertem HOXD13+14Ala sequestriert. Für die Sequestrierung von HOXD13-wt durch HOXD13+14Ala ist somit der Polyalanintrakt des Wildtyp-Interaktionspartners essentiell.

Abbildung 15: Aggregate aus HOXD13+Ala kolokalisieren nicht mit HOXD13-2Ala



Immunzytochemie: *Hoxd13-wt* und *Hoxd13-2Ala* (obere Reihe), *Hoxd13+14Ala* und *Hoxd13-2Ala* (mittlere Reihe) oder *Hoxd13+14Ala* und *Hoxd13-wt* (untere Reihe) wurden in COS-1-Zellen koexprimiert. HOXD13-wt bzw. HOXD13+14Ala (grün) und HOXD13-2Ala bzw. HOXD13-wt (rot) wurden nach 48 h angefärbt und analysiert. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). In der rechten Spalte sind die Färbungen übereinander gelagert (Fusion). HOXD13-2Ala befindet sich mit HOXD13-wt im Zellkern. Auch bei Koexpression mit HOXD13+14Ala liegt HOXD13-2Ala im Zellkern und kolokalisiert nicht mit den HOXD13+14Ala-Aggregaten im Zytoplasma. HOXD13-wt hingegen wird von den zytoplasmatischen Aggregaten aus HOXD13+14Ala sequestriert (weiße Pfeile).

Abkürzungen: *Hoxd13-wt*, Wildtyp-*Hoxd13*; *Hoxd13+14Ala*, expandiertes *Hoxd13* mit für zusätzliche 14 Alanine kodierender Polyalaninrepeat-Expansion; *Hoxd13-2Ala*, mutiertes *Hoxd13* mit einem auf zwei Alanine verkürzten Polyalaninrepeat.

5.1.7 Aggregate aus expandiertem HOXD13 kolokalisieren nicht mit mutiertem HOXD13 ohne Homöodomäne

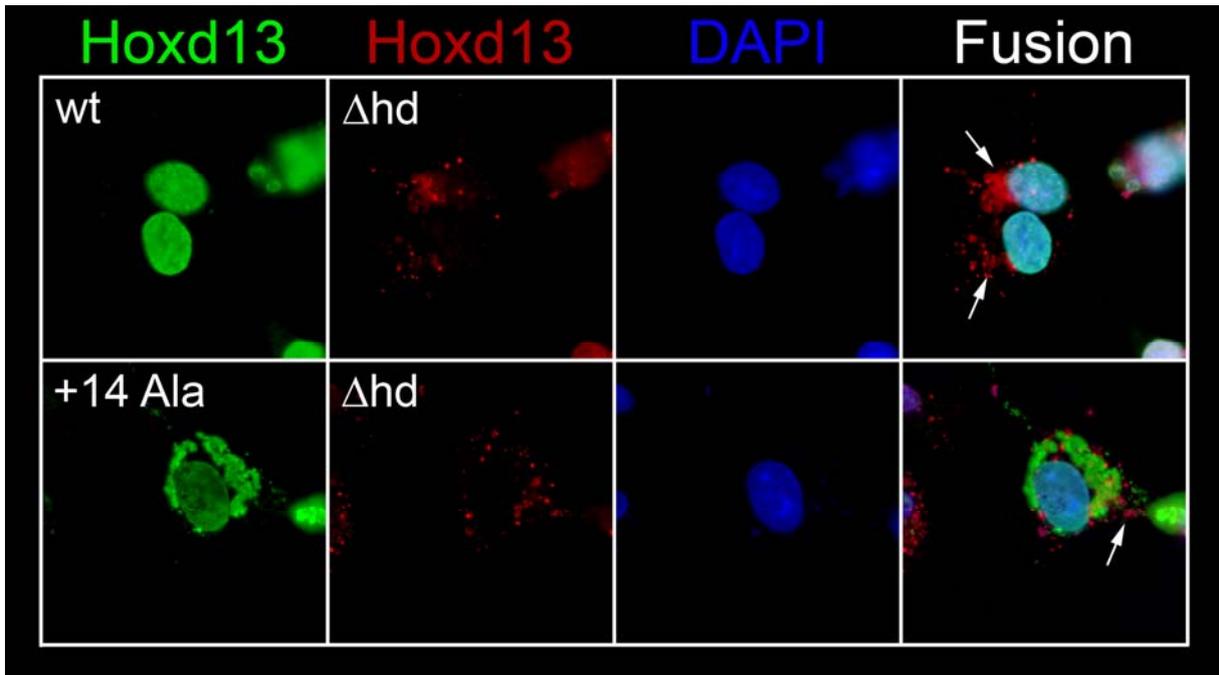
Im vorangegangenen Experiment wurde eine Beteiligung des HOXD13-wt-Polyalanintrakts an der Sequestrierung durch zytoplasmatisch aggregiertes HOXD13+14Ala mit expandiertem Polyalanintrakt gezeigt. HOXD13 enthält auch eine Homöodomäne, die am Transport in den Zellkern mittels eines nukleären Lokalisationssignals mitwirkt und dort die DNA-Bindung vermittelt⁹⁰.

Um eine eventuelle Beteiligung der HOXD13-Homöodomäne an der Sequestrierung durch expandiertes HOXD13+14Ala zu untersuchen, wurden *in vitro* Koexpressionsexperimente mit mutiertem *Hoxd13*, dessen Homöobox deletiert wurde (*Hoxd13-Δhd*) und *Hoxd13-wt* bzw. expandiertem *Hoxd13+14Ala* in COS-1-Zellen durchgeführt. Nach 48 h wurden die Proteine immunzytochemisch mit spezifischen Antikörpern gefärbt, die Zellkerne durch DAPI-Färbung dargestellt und die intrazelluläre Verteilung der Proteine mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Im Falle einer ausschließlich Polyalanintrakt-abhängigen Interaktion ist eine Kolokalisation von mutiertem HOXD13-Δhd ohne Homöodomäne und zytoplasmatischen Aggregaten aus expandiertem HOXD13+14Ala anzunehmen, da HOXD13-Δhd einen intakten Polyalanintrakt enthält.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 gezeigt. Mutiertes HOXD13-Δhd ohne Homöodomäne liegt sowohl bei Koexpression mit nukleär lokalisiertem HOXD13-wt als auch mit expandiertem HOXD13+14Ala, das im Zytoplasma aggregiert, außerhalb des Zellkerns vor. HOXD13-Δhd aggregiert dabei teils flächig verteilt, teils punktförmig im Zytoplasma und kolokalisiert nicht mit den HOXD13+14Ala-Aggregaten. Die Sequestrierung von Polyalanin-Transkriptionsfaktoren in zytoplasmatische HOXD13+14Ala-Aggregate erfordert folglich neben dem Polyalanintrakt weitere Proteinmotive.

Abbildung 16: HOXD13- Δ hd aggregiert im Zytoplasma und kolokalisiert nicht mit HOXD13+Ala



Immunzytochemie: *Hoxd13-wt* und *Hoxd13- Δ hd* (obere Reihe) oder *Hoxd13+14Ala* und *Hoxd13- Δ hd* (untere Reihe) wurden in COS-1-Zellen koexprimiert. HOXD13-wt bzw. HOXD13+14Ala (grün) und HOXD13- Δ hd (rot) wurden nach 48 h angefärbt und analysiert. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). In der rechten Spalte sind die Färbungen übereinander gelagert (Fusion). HOXD13- Δ hd liegt sowohl bei Koexpression mit nukleär lokalisiertem HOXD13-wt als auch mit HOXD13+14Ala, das zytoplasmatische Aggregate bildet, außerhalb des Nukleus vor. HOXD13- Δ hd aggregiert dabei teils flächig verteilt, teils punktförmig im Zytoplasma (weiße Pfeile) und kolokalisiert nicht mit HOXD13+14Ala.

Abkürzungen: *Hoxd13-wt*, Wildtyp-*Hoxd13*; *Hoxd13+14Ala*, expandiertes *Hoxd13* mit für zusätzliche 14 Alanine kodierender Polyalaninrepeat-Expansion; *Hoxd13- Δ hd*, mutiertes *Hoxd13* mit deletierter Homöobox.

5.1.8 Die Expansion des HOXD13-Polyalanintrakts ist erforderlich für die Interaktion mit Wildtyp-HOXA13

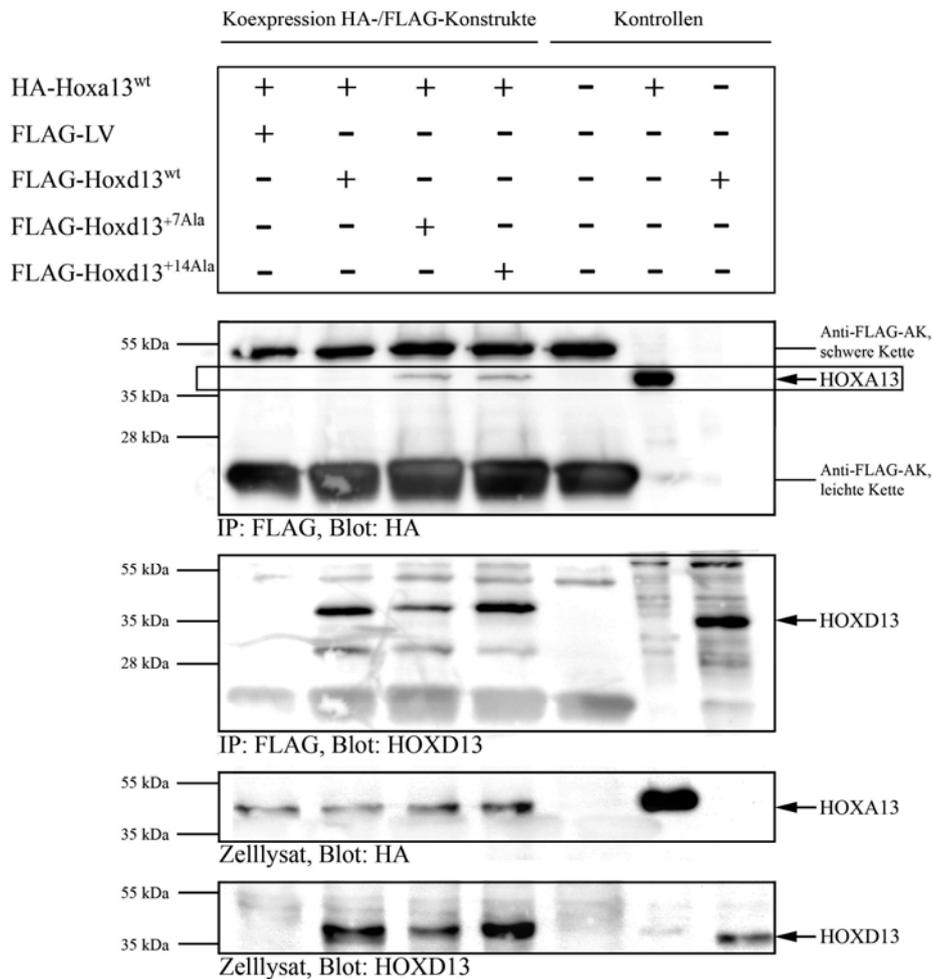
Es wurde gezeigt, dass HOXA13-wt in zytoplasmatische Aggregate aus HOXD13+14Ala mit expandiertem Polyalanintrakt sequestriert wird. Um zu testen, ob die Interaktion von HOXA13-wt und HOXD13+14Ala von der Expansion des HOXD13-Polyalanintrakts abhängt, wurden *in vitro* Koimmunopräzipitations (Ko-IP)-Experimente durchgeführt.

Dafür wurden *in vitro* HA-gekoppeltes *Hoxa13-wt* und FLAG-gekoppeltes *Hoxd13-wt*, expandiertes *Hoxd13+7Ala* oder *Hoxd13+14Ala*, oder FLAG-gekoppelter Leervektor als Kontrolle, in COS-1-Zellen koexprimiert. Nach 36 h wurden die Zellen lysiert. Die vergleichbare Expression der Konstrukte wurde mittels Western Blot und spezifischer Antikörperdetektion von HOXA13 und HOXD13 überprüft. Die Ko-IP erfolgte mit Anti-FLAG-Antikörper-gekoppelten Agarosekügelchen. Diese präzipitierten FLAG-markiertes HOXD13 direkt und dessen Interaktionspartner indirekt. Der Ko-IP folgten die Auftrennung der Proteine im Gel, Western Blot und die spezifische Antikörperdetektion von präzipitiertem HOXD13 und HOXA13. Als Positivkontrollen zum Nachweis einer funktionierenden Antikörperdetektion wurden Lysate von HA-gekoppeltes *Hoxa13*- bzw. FLAG-gekoppeltes *Hoxd13*-überexprimierenden Zellen direkt auf das Gel aufgetragen. Zum Ausschluss einer unspezifischen Proteinbindung an die Agarosekügelchen diente das Lysat untransfizierter Zellen als Kontrolle. Das Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt. Wie zu erwarten, wird HOXA13-wt durch expandiertes HOXD13+7Ala und HOXD13+14Ala koimmunopräzipitiert, nicht jedoch durch HOXD13-wt. Expandiertes HOXD13+Ala interagiert *in vitro* also mit HOXA13-wt und die Interaktion erfordert die Expansion des HOXD13-Polyalanintrakts.

Ergebnisse

Abbildung 17: Die Expansion des HOXD13-Polyalanintrakts ist erforderlich für die Interaktion mit HOXA13-wt



Koimmunopräzipitation: HA-gekoppeltes *Hoxa13-wt* und FLAG-gekoppeltes *Hoxd13-wt*, *Hoxd13+7Ala*, *Hoxd13+14Ala* oder FLAG-gekoppelter LV wurden in COS-1-Zellen koexprimiert. Nach 36 h wurden die Zellen lysiert und die Expression von HOXA13 (Molekülmasse 40 kDa) (Zelllysate, Blot: HA) und HOXD13 (Molekülmasse 36 kDa) (Zelllysate, Blot: HOXD13) wurde überprüft. Die Ko-IP erfolgte mit Anti-FLAG-Antikörper-gekoppelten Agarosekügelchen. Die Elution der Proteine unter reduzierenden Bedingungen führte zur Dissoziation des Anti-FLAG-Antikörpers in leichte (Molekülmasse 25 kDa) und schwere Ketten (Molekülmasse 50 kDa). Nach der Proteinauftrennung im Gel und Western Blot erfolgte der Nachweis von HOXD13 (IP: FLAG, Blot: HOXD13) und HOXA13 (IP: FLAG, Blot: HA). Als Positivkontrollen wurden Lysate von HA-gekoppeltes *Hoxa13*- bzw. FLAG-gekoppeltes *Hoxd13*-überexprimierenden Zellen aufgetragen. Als Kontrolle diente auch das Lysat untransfizierter Zellen. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. HOXA13-wt wird *in vitro* durch HOXD13+7Ala und HOXD13+14Ala koimmunopräzipitiert (schwarze Box), nicht jedoch durch HOXD13-wt oder den LV.

Abkürzungen: *Hoxa13-wt*, Wildtyp-*Hoxa13*; LV, Leervektor; *Hoxd13-wt*, Wildtyp-*Hoxd13*; *Hoxd13+7Ala* bzw. *+14Ala*, expandiertes *Hoxd13* mit für zusätzliche 7 bzw. 14 Alanine kodierender Polyalaninrepeat-Expansion; kDa, Kilodalton; Anti-FLAG-AK, Anti-FLAG-Antikörper; IP, Immunopräzipitation.

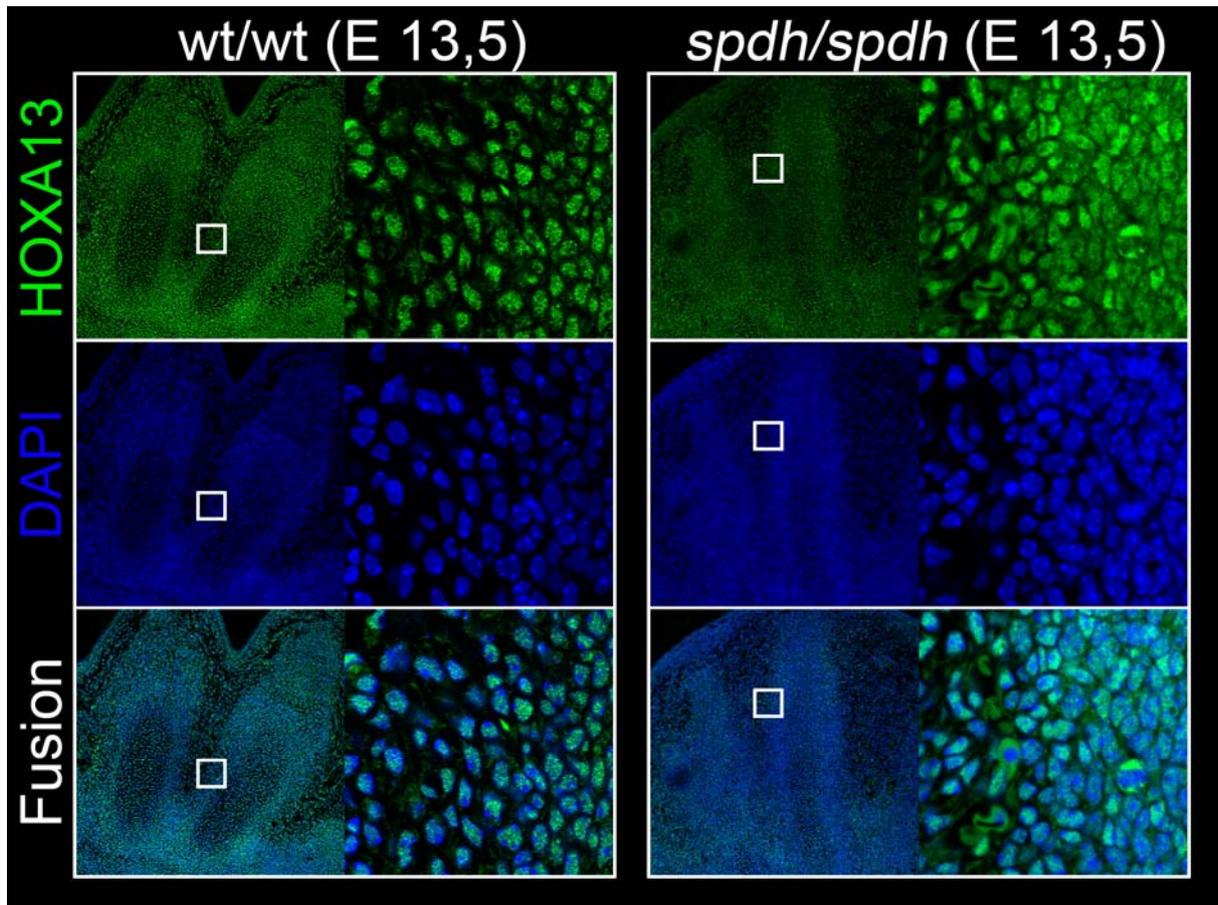
5.1.9 HOXA13 ist in *spdh*-Mäusen im Zytoplasma lokalisiert

Im Folgenden wurde untersucht, wie sich die in den vorangegangenen Experimenten *in vitro* gezeigte Interaktion zwischen HOXD13+Ala mit expandiertem Polyalanintrakt und HOXA13-wt *in vivo* auswirkt. Expandiertes HOXD13+7Ala ist in *spdh*-Mäusen reduziert vorhanden und, im Gegensatz zum in wt-Mäusen nukleär vorliegenden HOXD13-wt, abnorm zytoplasmatisch lokalisiert⁷³. Falls expandiertes HOXD13+Ala und HOXA13-wt auch *in vivo* interagieren, wäre ein vergleichbares Ergebnis für HOXA13 in *spdh*-Mäusen zu erwarten.

Es wurden Paraffinschnitte von Vorderpfoten homozygoter Wildtyp- (wt) und „*synpolydactyly homolog*“ (*spdh*)-Mäuse der Entwicklungsstadien 13,5 (E 13,5) und 14,5 (E 14,5) immunhistochemisch angefärbt. Die Darstellung der Zellkerne erfolgte mit DAPI. Anschließend wurde die HOXA13-Verteilung im Autopod mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop analysiert. Vor allem das Perichondrium war dabei von Interesse, da *Hoxa13* und *Hoxd13* dort zu diesem Zeitpunkt am stärksten exprimiert werden⁴.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 18 und 19 gezeigt. Wie in der 100fachen Vergrößerung zu erkennen ist, wird HOXA13 im Autopod von wt- und *spdh*-Mäusen hauptsächlich im Perichondrium der Metakarpalknochen detektiert. Dabei liegen die perichondrialen Zellen der *spdh*-Mäuse dichter beieinander als in wt-Mäusen. Die 1000fache Vergrößerung zeigt eine nukleäre HOXA13-Lokalisation in homozygoten wt-Mäusen, während HOXA13 in homozygoten *spdh*-Mäusen im E 13,5 in einigen und im E 14,5 in fast allen Zellen überwiegend im Zytoplasma und vermindert in den Zellkernen lokalisiert ist. Außerdem ist die Intensität der HOXA13-Färbung bei *spdh*-Homozygoten im E 13,5 in mehreren und im E 14,5 in fast allen Zellen reduziert und diffus im Vergleich zu wt-Mäusen. In homozygoten *spdh*-Mäusen findet sich also ein vermindertes Level an aktivem HOXA13 und eine zytoplasmatische Lokalisation von HOXA13 im Perichondrium der Metakarpalknochen. Dieser Befund ist im E 14,5 ausgeprägter als im E 13,5. Folglich wird HOXA13 durch expandiertes HOXD13+7Ala auch *in vivo* beeinflusst.

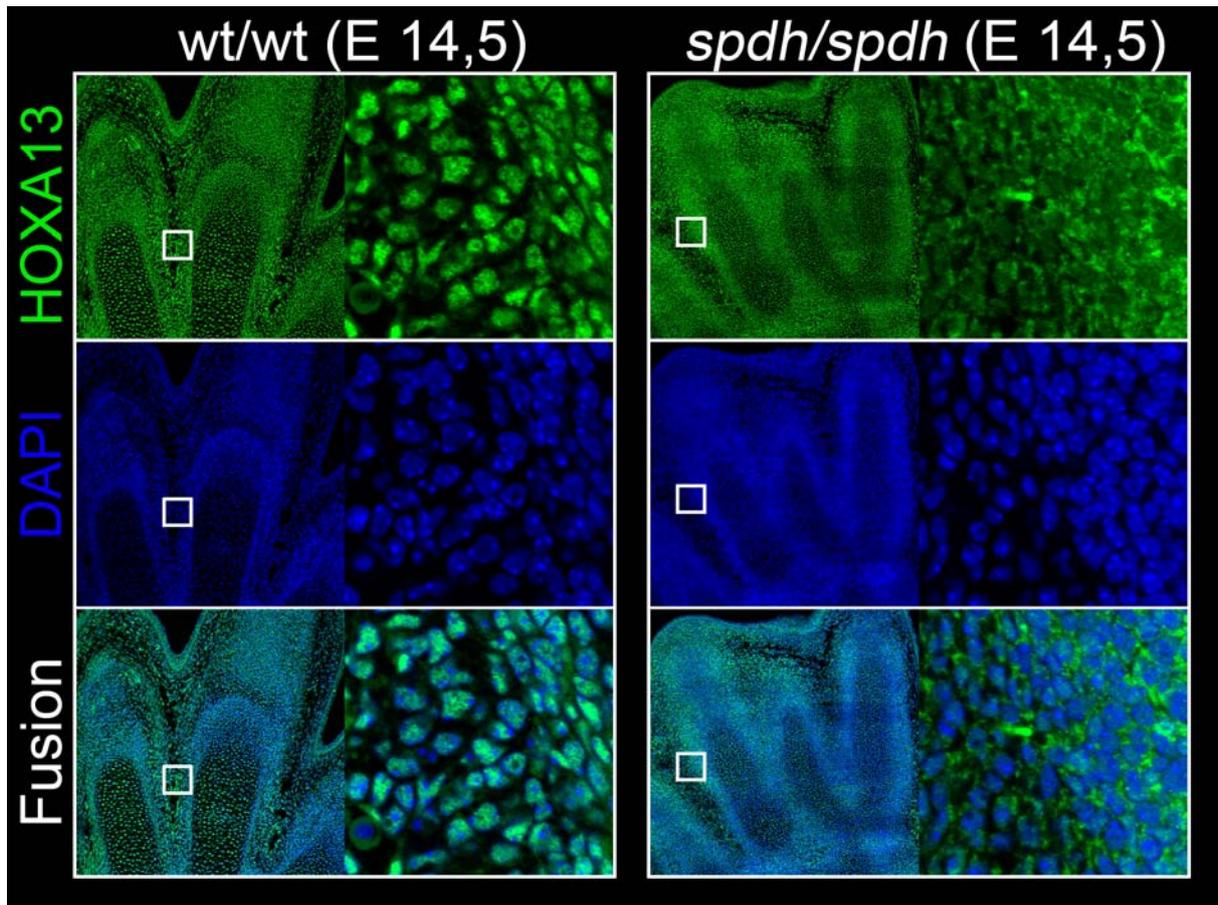
Abbildung 18: HOXA13 ist im Entwicklungsstadium 13,5 im Perichondrium der Metakarpalknochen von *spdh*-Mäusen zytoplasmatisch lokalisiert



Immunhistochemie: Auf Paraffinschnitten der Vorderpfoten von wt/wt- und *spdh/spdh*-Mäusen des E 13,5 wurde HOXA13 (grün, obere Reihe) angefärbt. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau, mittlere Reihe). Die untere Reihe zeigt die übereinander gelagerten Färbungen (Fusion). Die Proteinverteilung von HOXA13 im Autopod (Vergrößerung 100x, linke Spalten) und intrazellulär (Vergrößerung 1000x, rechte Spalten) wurde analysiert. Die weißen, quadratischen Boxen der linken Spalten markieren jeweils den rechts davon dargestellten Ausschnitt des Perichondriums der Metakarpalknochen mit dem angrenzenden interdigitalen Mesenchym. In wt-Mäusen ist HOXA13 hauptsächlich in den Zellkernen perichondrialer Zellen lokalisiert. In *spdh*-Mäusen ist HOXA13 ebenfalls perichondrial lokalisiert, allerdings liegen die Zellen dichter beieinander. In *spdh*-Mäusen wird HOXA13 im Vergleich zu wt-Mäusen mit reduzierter Intensität und in Zellkern sowie Zytoplasma detektiert. In einigen Zellen der *spdh*-Mäuse übertrifft die Signalintensität im Zytoplasma die des Zellkerns.

Abkürzungen: E 13,5, Entwicklungsstadium 13,5; wt/wt, homozygote Wildtyp-Maus; *spdh/spdh*, homozygote „*synpolydactyly homolog*“-Maus.

Abbildung 19: HOXA13 ist im Entwicklungsstadium 14,5 im Perichondrium der Metakarpalknochen von *spd**h*-Mäusen zytoplasmatisch lokalisiert



Immunhistochemie: Auf Paraffinschnitten der Vorderpfoten von wt/wt- und *spd**h*/*spd**h*-Mäusen des E 14,5 wurde HOXA13 (grün, obere Reihe) angefärbt. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau, mittlere Reihe). Die untere Reihe zeigt die übereinander gelagerten Färbungen (Fusion). Die Proteinverteilung von HOXA13 im Autopod (Vergrößerung 100x, linke Spalten) und intrazellulär (Vergrößerung 1000x, rechte Spalten) wurde analysiert. Die weißen, quadratischen Boxen der linken Spalten markieren jeweils den rechts davon dargestellten Ausschnitt des Perichondriums der Metakarpalknochen mit dem angrenzenden interdigitalen Mesenchym. In wt-Mäusen ist HOXA13 hauptsächlich in den Zellkernen perichondrialer Zellen lokalisiert. In *spd**h*-Mäusen ist HOXA13 ebenfalls perichondrial lokalisiert, allerdings liegen die Zellen dichter beieinander. In *spd**h*-Mäusen wird HOXA13 im Vergleich zu wt-Mäusen diffus mit reduzierter Intensität hauptsächlich im Zytoplasma und vermindert im Zellkern detektiert.

Abkürzungen: E 14,5, Entwicklungsstadium 14,5; wt/wt, homozygote Wildtyp-Maus; *spd**h*/*spd**h*, homozygote „*synpolydactyly homolog*“-Maus.

5.1.10 HOXD13 und HOXA13 sind in *spdh*-Mäusen reduziert

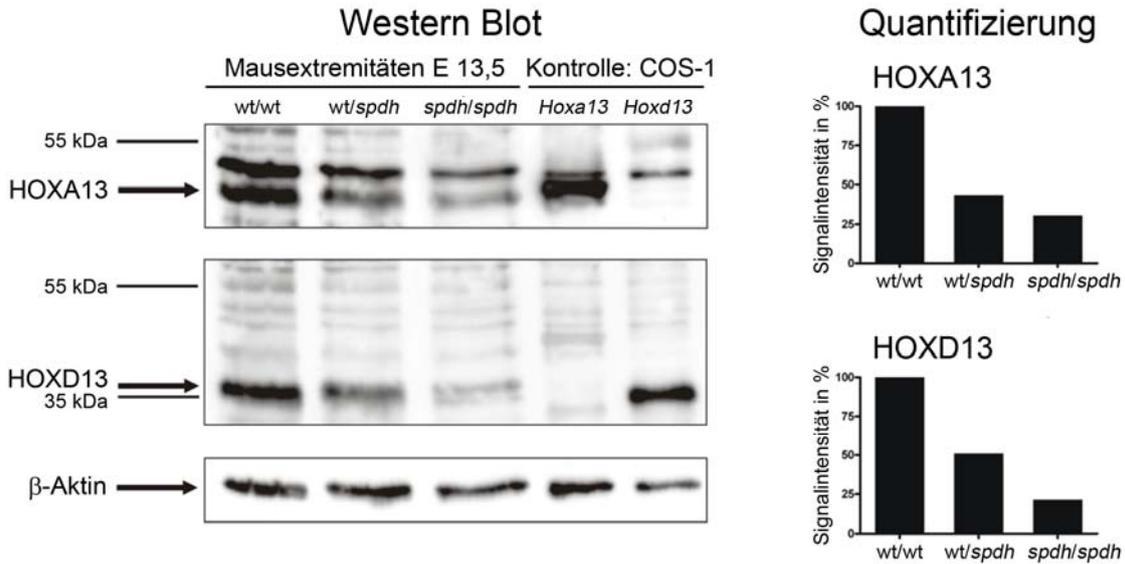
Die Immunhistochemie zeigte eine verminderte Menge an aktivem HOXA13 in den Pfoten homozygoter *spdh*-Mäuse verglichen mit homozygoten wt-Mäusen. Um die HOXA13-Proteinmenge genauer zu bestimmen, wurden Western Blots mit Lysaten der Pfoten von homozygoten wt- und *spdh*-Mäusen sowie von heterozygoten wt/*spdh*-Mäusen durchgeführt.

Es wurden Pfoten des Entwicklungsstadiums 13,5 lysiert und im Proteingel aufgetrennt, gefolgt von Western Blot und Detektion von HOXA13 und HOXD13. Der Nachweis von β -Aktin diente zur Kontrolle der gleichmäßigen Gelbeladung. Als Positivkontrollen zum Nachweis einer funktionierenden Antikörperdetektion wurden Lysate von *Hoxa13*- bzw. *Hoxd13*-überexprimierenden COS-1-Zellen auf das Gel aufgetragen. Die Antikörpersignale wurden quantifiziert. Das Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt. Wie erwartet ist die HOXA13-Proteinmenge in den Pfoten von *spdh*-Mäusen bezogen auf Wildtyp-Tiere reduziert. Die Quantifizierung ergab eine moderate Reduktion des HOXA13 auf ca. 45 % in heterozygoten wt/*spdh*- und eine stärkere Reduktion auf ca. 30 % in homozygoten *spdh/spdh*-Mäusen bezogen auf wt/wt-Mäuse. Analog ist die HOXD13-Proteinmenge auf ca. 50 % in wt/*spdh*- und auf ca. 20 % in *spdh/spdh*-Mäusen verringert. In hetero- und homozygoten *spdh*-Mäusen ist demnach nicht nur die Proteinmenge des HOXD13, sondern auch die des HOXA13 vermindert.

Ergebnisse

Abbildung 20: HOXD13 und HOXA13 sind in den Pfoten von *spdh*-Mäusen reduziert



Western Blot: Lysate der Pfoten von *wt/wt*-, *wt/spdh*- und *spdh/spdh*-Mäusen des E 13,5 wurden im Proteingel aufgetrennt, gefolgt von Western Blot und Nachweis von HOXA13 und HOXD13. Der Nachweis von β -Aktin diente zur Kontrolle der gleichmäßigen Gelbeladung. Als Positivkontrollen wurden Lysate von *Hoxa13*- bzw. *Hoxd13*-überexprimierenden COS-1-Zellen aufgetragen. Die Signale wurden detektiert (linker Teil der Abbildung) und quantifiziert (rechter Teil der Abbildung). Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. HOXA13 (Molekülmasse 40 kDa) ist, ebenso wie HOXD13 (Molekülmasse 36 kDa), in den Pfoten von *spdh*-Mäusen bezogen auf Wildtyp-Tiere reduziert. Die Quantifizierung ergab eine moderate Reduktion des HOXA13 auf ca. 45 % in *wt/spdh*- und eine stärkere Reduktion auf ca. 30 % in *spdh/spdh*-Mäusen bezogen auf *wt/wt*-Mäuse. Analog wurde für HOXD13 eine Reduktion auf ca. 50 % in *wt/spdh*- und auf ca. 20 % in *spdh/spdh*-Mäusen gemessen.

Abkürzungen: E 13,5, Entwicklungsstadium 13,5; *wt/wt*, homozygote Wildtyp-Maus; *wt/spdh*, heterozygote „*synpolydactyly homolog*“ (*spdh*)-Maus; *spdh/spdh*, homozygote *spdh*-Maus; kDa, Kilodalton.

5.2 Generelle Interaktionstendenz von Polyalanin-Transkriptionsfaktoren

5.2.1 Expandiertes HOXA13 und expandiertes RUNX2 aggregieren im Zytoplasma und sequestrieren Wildtyp-HOXD13

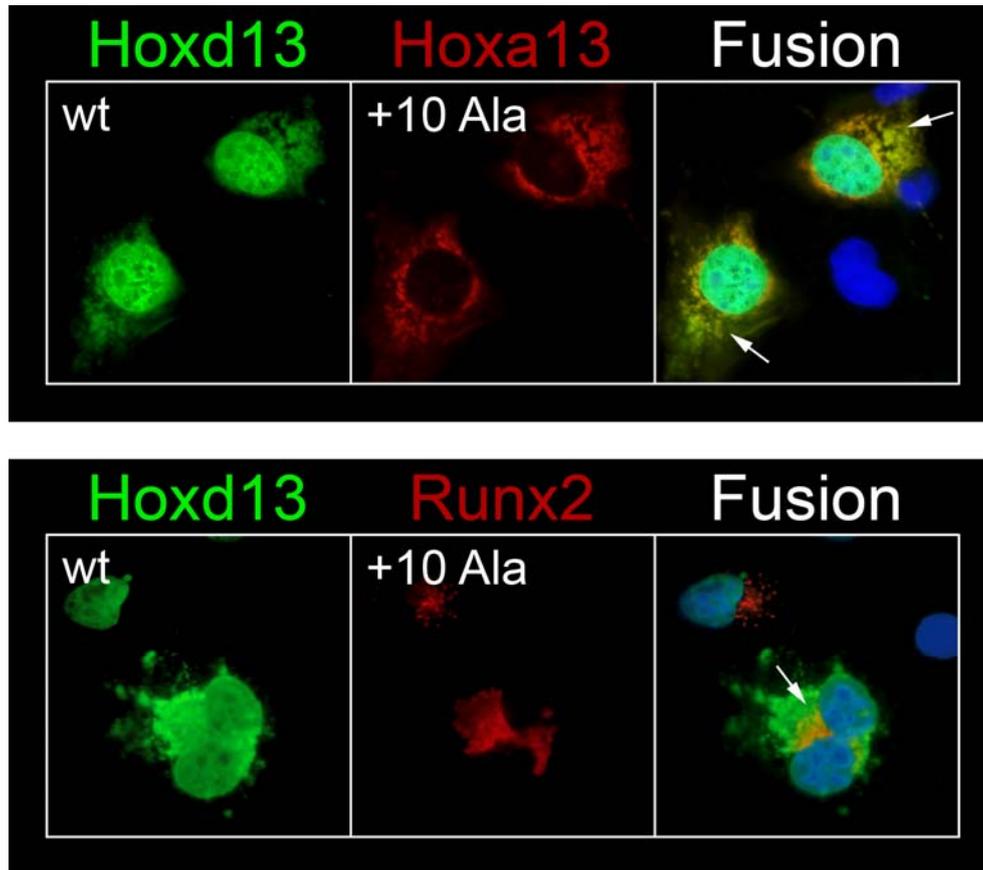
Neben expandiertem HOXD13+Ala führen auch Polyalanintrakt-Expansionen anderer Transkriptionsfaktoren, wie sie bei den Polyalanin-Erkrankungen Hand-Fuß-Genitalsyndrom (*HOXA13*) und cleidocraniale Dysplasie (*RUNX2*) auftreten, *in vitro* zur Bildung zytoplasmatischer Aggregate⁷⁵. Für expandiertes HOXD13+Ala und HOXA13+Ala wurde die Sequestrierung des jeweiligen Wildtyp-Proteins gezeigt^{73, 91}. Außerdem fand sich in den vorangegangenen Experimenten eine Sequestrierung von HOXA13-wt und RUNX2-wt durch zytoplasmatisch aggregiertes, expandiertes HOXD13+14Ala. Um zu untersuchen, ob es sich bei der Sequestrierung von Wildtyp-Polyalanin-Transkriptionsfaktoren durch mutierte Polyalanin-Transkriptionsfaktoren mit expandierten Polyalanintrakten um eine generelle Interaktionstendenz handelt, wurden weitere *in vitro* Experimente durchgeführt.

Es wurden mutiertes *Hoxa13* bzw. *Runx2* mit für zusätzliche 10 Alanine kodierenden Polyalaninrepeat-Expansionen (*Hoxa13+10Ala* bzw. *Runx2+10Ala*) und *Hoxd13-wt* in COS-1-Zellen koexprimiert. Nach 48 h wurden die Proteine immunzytochemisch mit spezifischen Antikörpern gefärbt, die Zellkerne durch DAPI-Färbung dargestellt und die intrazelluläre Verteilung der Proteine mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 gezeigt. Wie bekannt, aggregieren sowohl expandiertes HOXA13+10Ala als auch RUNX2+10Ala im Zytoplasma. Des Weiteren sequestrieren zytoplasmatische Aggregate aus HOXA13+10Ala bzw. RUNX2+10Ala das normalerweise nukleär lokalisierte, Polyalanintrakt-haltige HOXD13-wt. Die Interaktion zwischen expandiertem HOXA13+Ala bzw. RUNX2+Ala und HOXD13-wt erfolgt demnach analog zur in den vorherigen Experimenten gezeigten Sequestrierung von HOXA13-wt bzw. RUNX2-wt durch expandiertes HOXD13+14Ala.

Ergebnisse

Abbildung 21: HOXA13+Ala und RUNX2+Ala aggregieren im Zytoplasma und sequestrieren HOXD13-wt



Immunzytochemie: In COS-1-Zellen wurden *Hoxd13-wt* und *Hoxa13+10Ala* (obere Reihe) oder *Hoxd13-wt* und *Runx2+10Ala* (untere Reihe) koexprimiert. HOXD13 (grün) und HOXA13 bzw. RUNX2 (rot) wurden nach 48 h angefärbt und analysiert. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). In der rechten Spalte sind die Färbungen übereinander gelagert (Fusion). HOXA13+10Ala bzw. RUNX2+10Ala aggregieren im Zytoplasma. Normalerweise nukleär lokalisiertes HOXD13-wt wird in die zytoplasmatischen Aggregate aus HOXA13+10Ala bzw. RUNX2+10Ala sequestriert (weiße Pfeile).

Abkürzungen: *Hoxd13-wt*, Wildtyp-*Hoxd13*; *Hoxa13+10Ala*, expandiertes *Hoxa13* mit für zusätzliche 10 Alanine kodierender Polyalaninrepeat-Expansion; *Runx2+10Ala*, expandiertes *Runx2* mit für zusätzliche 10 Alanine kodierender Polyalaninrepeat-Expansion.

5.3 Funktionelle Interaktion von HOXD13 und SMADs

5.3.1 Wildtyp-HOXD13 inhibiert den SMAD-Signalweg stärker als expandiertes HOXD13

Mitglieder des „Bone morphogenetic protein“ (BMP)-Signalwegs und HOX-Transkriptionsfaktoren steuern die Extremitätenentwicklung und werden im Autopod teils überlappend exprimiert^{4, 33}. Ihre Mutationen verursachen ähnliche Phänotypen⁴⁵. Darüber hinaus interagieren SMADs, die Signalwandler des kanonischen BMP-Signalwegs, mit HOXD13, um die Transkription von Zielgenen zu modulieren⁵⁰. Der BMP-Signalweg übernimmt in der Extremitätenentwicklung vielfältige, teils gegensätzliche Funktionen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium und Gewebe. So reguliert er Musterbildung, Apoptose, Proliferation und Fingerzahl²⁴. In späteren Entwicklungsstadien fördern BMPs die Knorpel- und Knochen- sowie die Gelenkbildung^{25, 27}. All diese Vorgänge sind in homozygoten *spdh*-Mäusen gestört^{4, 33, 39}. Insbesondere die zur Polydaktylie führende interdigitale, ektopische Knorpelbildung der *spdh*-Maus³⁹ lässt eine vermehrte Aktivität des BMP-Signalwegs im Autopod vermuten.

Daher wurde getestet, ob der kanonische, SMAD-vermittelte BMP-Signalweg durch die Expansion des Polyalanintrakts in HOXD13+Ala modifiziert wird. Dazu wurden Luciferase-Assays mit Reporterkonstrukten, die entweder ein SMAD-bindendes Element (SBE) oder ein BMP-responsives Element (BRE) als Promotorbestandteil enthalten, durchgeführt. Aktivierte SMAD-Oligomere binden selbständig an SBEs oder zusammen mit weiteren Kofaktoren an BREs⁵¹ und aktivieren so die Transkription der Glühwürmchenluciferase.

Es wurden mutierte *Hoxd13+Ala*-Konstrukte mit expandierten Polyalaninrepeats, *Hoxd13-wt*, oder ein Kontroll-Leervektor, jeweils mit einem SBE-Glühwürmchenluciferase- (SBE-luc) oder einem BRE-Glühwürmchenluciferase- (BRE-luc) sowie einem *Renilla*-Luciferase-Konstrukt als interne Kontrolle, koexprimiert. Zusätzlich wurden der konstitutiv aktive BMP-Rezeptor 1B (*Bmpr1b-ca*) zur exogenen Aktivierung des BMP-Signalwegs oder ein Leervektor zum Vergleich mit der endogenen BMP-Signalweiterleitung koexprimiert. Die Expression erfolgte in COS-7- und HepG2-Zellen, die nach 18 h lysiert wurden. Anschließend wurden die Luciferase-Aktivitäten gemessen. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente jeweils mit Duplikaten durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt. Die exogene Aktivierung des BMP-Signalwegs steigert die Luciferase-Aktivität im Vergleich zur endogenen BMP-Signalweiterleitung in allen Teilversuchen. *Hoxd13-wt* inhibiert den SMAD-Signalweg. Expandiertes *Hoxd13+Ala* führt, verglichen mit *Hoxd13-wt*, zu einer stärkeren Aktivität des SMAD-Signalwegs.

Bei exogen aktiviertem BMP-Signalweg steigt mit zunehmender Länge des *Hoxd13*-Polyalaninrepeats die Luciferase-Aktivität deutlich an. Bei der endogenen

Ergebnisse

BMP-Signalweiterleitung ist die Luciferase-Aktivität ebenfalls stärker bei Koexpression von *Hoxd13+7Ala* im Vergleich zu *Hoxd13-wt*, steigt allerdings mit zunehmender Expansion des Polyalaninrepeats in *Hoxd13+14Ala* in den meisten Experimenten nicht weiter an.

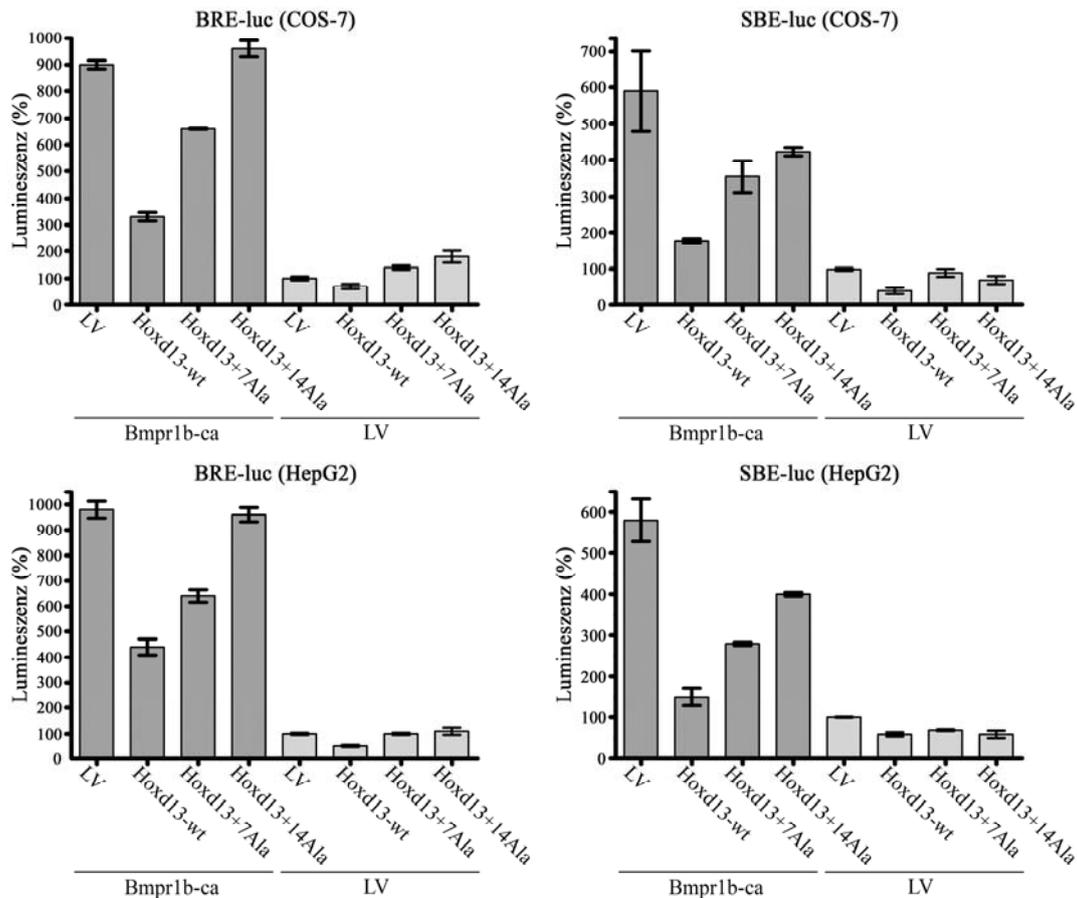
Die SBE-luc-Reporterassays mit dem SMAD-spezifischen Reporterkonstrukt SBE-luc und exogen aktiviertem BMP-Signalweg sowie Koexpression verschiedener *Hoxd13*-Konstrukte zeigen eine verminderte Luciferase-Signalintensität im Vergleich zur Kontrolle ohne *Hoxd13*-Expression. Dabei wird das Aktivitätsniveau der Kontrolle auch bei Koexpression von *Hoxd13+14Ala* nicht erreicht. Bei endogener BMP-Signalaktivität zeigen die SBE-luc-Reporterassays in HepG2-Zellen ein ebensolches Ergebnis, während in COS-7-Zellen bei Koexpression von *Hoxd13+7Ala* die Luciferase-Aktivität der Kontrolle erreicht wird. Folglich inhibiert in den SBE-luc-Reporterassays expandiertes *Hoxd13+Ala* den kanonischen, SMAD-vermittelten BMP-Signalweg weitaus schwächer als *Hoxd13-wt*. *Hoxd13+Ala* bewirkt also, verglichen mit *Hoxd13-wt*, eine höhere Aktivität des SMAD-Signalwegs.

Die BRE-luc-Reporterassays mit dem weniger SMAD-spezifischen Reporterkonstrukt (BRE-luc) und exogen aktiviertem BMP-Signalweg zeigen ebenso eine reduzierte Luciferase-Signalintensität bei Koexpression von *Hoxd13-wt* und *Hoxd13+7Ala* verglichen mit der Kontrolle ohne *Hoxd13*-Expression. Bei Koexpression von *Hoxd13+14Ala* hingegen wird die Luciferase-Aktivität der Kontrolle in HepG2-Zellen erreicht bzw. in COS-7-Zellen leicht übertroffen. Bei endogener BMP-Signalaktivität zeigen die BRE-luc-Reporterassays gleichermaßen eine verminderte Luciferase-Aktivität bei Koexpression von *Hoxd13-wt* im Vergleich zur Kontrolle ohne *Hoxd13*-Expression. Die Koexpression von expandiertem *Hoxd13+7Ala* oder *Hoxd13+14Ala* führt in HepG2-Zellen zum Erreichen bzw. in COS-7-Zellen zum Überschreiten der Luciferase-Aktivität der Kontrolle. Demnach inhibiert expandiertes *Hoxd13+Ala* in den BRE-luc-Reporterassays den SMAD-Signalweg weniger stark als in den SBE-luc-Reporterassays. Die Expression von *Hoxd13+14Ala* führt sogar zur vollständigen Enthemmung bzw. zur Aktivierung des SMAD-Signalwegs bezogen auf die Kontrolle ohne *Hoxd13*-Expression. Ebenso wie in den SBE-luc-Reporterassays inhibiert *Hoxd13-wt* auch in den BRE-luc-Reporterassays den SMAD-Signalweg am stärksten.

Die Experimente in COS-7- und HepG2-Zellen mit den Reporterkonstrukten SBE-luc und BRE-luc liefern somit ähnliche Ergebnisse. HOXD13-wt inhibiert deutlich den kanonischen, SMAD-vermittelten BMP-Signalweg, während expandiertes HOXD13+Ala schwächer bis gar nicht inhibierend wirkt. Expandiertes HOXD13+Ala führt demnach, verglichen mit HOXD13-wt, zu einer erhöhten Aktivität des SMAD-Signalwegs.

Ergebnisse

Abbildung 22: HOXD13-wt inhibiert den SMAD-Signalweg stärker als HOXD13+Ala



Luciferase-Reporterassays: In COS-7- und HepG2-Zellen wurden *Hoxd13-wt*, *Hoxd13+7Ala*, *Hoxd13+14Ala* bzw. ein LV, jeweils mit einem Luciferase-Reporterkonstrukt SBE-luc bzw. BRE-luc und einem *Renilla*-Luciferase-Konstrukt als interne Kontrolle koexprimiert. Außerdem wurde *Bmpr1b-ca* zur exogenen Aktivierung des BMP-Signalwegs bzw. ein LV als Kontrolle koexprimiert. Nach 18 h wurden die Luciferase-Aktivitäten gemessen. Die Diagramme zeigen die Lumineszenz in % bezogen auf die Kontrolle ohne *Hoxd13*-Expression und ohne exogene BMP-Signalwegsaktivierung. Das Ergebnis dreier, jeweils mit Duplikaten unabhängig voneinander durchgeführter, Experimente ist dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Die exogene Aktivierung des BMP-Signalwegs (*Bmpr1b-ca*) steigert die Luciferase-Aktivität. HOXD13-wt inhibiert den BMP-Signalweg und HOXD13+Ala wirkt schwächer inhibierend. Bei exogen aktiviertem BMP-Signalweg steigt mit zunehmender Länge des *Hoxd13*-Polyalaninrepeats die Luciferase-Aktivität deutlich. Bei der endogenen BMP-Signalweiterleitung (LV) ist die Luciferase-Aktivität ebenfalls stärker bei Expression von *Hoxd13+7Ala* im Vergleich zu *Hoxd13-wt*. Sie steigt allerdings bei Expression von *Hoxd13+14Ala* in den meisten Experimenten nicht weiter an.

Abkürzungen: LV, Leervektor; *Hoxd13-wt*, Wildtyp-*Hoxd13*; *Hoxd13+7Ala* bzw. *Hoxd13+14Ala*, expandiertes *Hoxd13* mit für zusätzliche 7 bzw. 14 Alanine kodierender Polyalaninrepeat-Expansion; *Bmpr1b-ca*, konstitutiv aktiver BMP-Rezeptor 1B; BRE-luc bzw. SBE-luc, Reporterkonstrukt mit „Bone morphogenetic protein“ (BMP)-responsivem bzw. mit SMAD-bindendem Element als Promotorbestandteil.

6 Diskussion

6.1 Funktion und Evolution der Polyalaninrepeats

Die physiologische Funktion von Polyalanintrakten ist weitgehend unbekannt. Sie sind ein häufiges Motiv in Transkriptionsfaktoren und erreichen die größte Länge bei Säugern⁹². Mit der Polyalanintraktlänge in Proteinen steigt auch der Anteil an Transkriptionsfaktoren unter ihnen⁷³. Bei den Säugern ist die Länge der Polyalanintrakte in Transkriptionsfaktoren stark konserviert, was auf eine funktionelle oder strukturelle Bedeutung für die Regulation der Transkription hindeutet⁹².

Für mehrere mutierte Transkriptionsfaktoren mit expandierten Polyalanintrakten wurde bereits eine transkriptionelle Dysregulation gezeigt⁹³. Strukturell könnten Polyalanintrakte über hydrophobe Wechselwirkungen⁹⁴ die Interaktion von Polyalanin-Transkriptionsfaktoren vermitteln⁹². Außerdem könnten Polyalanintrakte als Abstandshalter zwischen Proteindomänen die Funktion von Transkriptionsfaktoren beeinflussen⁹⁵. Wird der spezifische Abstand zwischen Proteindomänen durch Expansion verlängert, könnte dies ihre korrekte Funktion beeinträchtigen und so die Genexpression verändern.

Alaninreiche Sequenzen sind ein häufiger Bestandteil von Repressionsmotiven in Transkriptionsfaktoren⁹⁶. Auch in Homöodomänen-Proteinen, zu denen HOXD13 zählt, fungieren Polyalanintrakte oft als transkriptionelle Repressionsdomänen⁹⁷. Die Expansion der Polyalanintrakte vieler Transkriptionsfaktoren geht mit einer verminderten transkriptionellen Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Transkriptionsfaktor einher. So sinkt die Transkriptionsaktivität mit steigender Länge des expandierten Polyalanintrakts der Transkriptionsfaktoren HOXD13+Ala^{33, 39}, FOXL2+Ala⁹⁸, PHOX2B+Ala^{99, 100} und ARX+Ala¹⁰¹. Eine Reduktion der Transkriptionsaktivität im Vergleich zum Wildtyp-Protein findet sich auch bei den expandierten Polyalanin-Transkriptionsfaktoren SOX3+Ala¹⁰², TBX1+Ala¹⁰³ und ZIC2+Ala¹⁰⁴. Eine Verkürzung des ZIC2-Polyalanintrakts auf zwei Alanine verändert promotorabhängig die Transkriptionsaktivität des ZIC2 kaum oder bewirkt eine Aktivierung¹⁰⁴. Hingegen verstärkt eine Verkürzung der ARX-Polyalanintrakte die transkriptionelle Hemmung im Vergleich zu Wildtyp-ARX¹⁰¹. Folglich ist die transkriptionelle Funktion der Polyalanintrakte nicht generell repressiv, sondern abhängig vom zellulären Kontext.

Eine weitere bemerkenswerte Eigenschaft von Polyalanin-Proteinen ist ihre zytoprotektive Funktion. So induzieren sie in Anwesenheit toxischer, expandierter Polyglutamin-Proteine das Chaperon HSP70. Die Polyalanin-Proteine entstehen unter anderem durch Frameshifts bei der Translation von Polyglutamin-Proteinen¹⁰⁵.

Interessanterweise entstanden die Polyalaninrepeats der paralogen Gene *Hoxd13* und *Hoxa13* in der Phylogenese erst bei den Säugern. Sie bildeten sich unabhängig voneinander durch konvergente Evolution, was auf die Übernahme neuer, gleichartiger Aufgaben hindeutet⁹². Im *Hoxd13* der Cetaceae (Wale, Delfine) wurde im Vergleich mit anderen Säugetieren eine neuartige Polyalaninrepeat-Verlängerung identifiziert. Dies lässt eine Bedeutung für die Entstehung der besonderen Morphologie des Autopods der Cetaceae vermuten¹⁰⁶. Auch die Fehlbildung des Autopods bei einer Knockin-Maus mit einem mutierten *Hoxd13* ohne Polyalaninrepeat anstelle des *Hoxd13-wt* weist auf die Bedeutung des Polyalaninrepeats für das phänotypische Erscheinungsbild des Autopods hin¹⁰⁷. Ein weiteres Beispiel für Auswirkungen von Polyalaninrepeats auf phänotypische Merkmale bei Säugern sind Polyalaninrepeat-Expansionen des *Runx2*. Diese stehen im Zusammenhang mit der phänotypischen Variabilität von Gliedmaßen und Schädel bei verschiedenen Hunderrassen. Dabei geht eine steigende Polyalaninrepeatlänge des *Runx2* mit einer zunehmenden Ausprägung von Merkmalen wie Brachyzephalie, einem hypoplastischen Mittelgesicht und einem flachen Nasenrücken einher. Diese Merkmale kennzeichnen auch die humane cleidocraniale Dysplasie, die durch Polyalaninrepeat-Expansionen des *RUNX2* verursacht wird¹⁰⁸. Auch die Polyalaninrepeats des Transkriptionsfaktors *Sox3* traten erstmals bei den Säugetieren auf. Möglicherweise stehen sie im Zusammenhang mit der Entwicklung neuer Gehirnfunktionen¹⁰⁹.

6.2 Interaktion von expandiertem HOXD13 mit Polyalanin-Transkriptionsfaktoren

In dieser Arbeit wurde die molekulare Pathogenese der Synpolydaktylie (SPD) 1 durch Polyalaninrepeat-Expansionen in *HOXD13* im Speziellen und der Polyalanin-Krankheiten, zu denen die SPD gehört, im Allgemeinen untersucht. Einerseits wurden *in vitro*-Experimente mit Zelllinien, die verschiedene *Hoxd13*-Konstrukte überexprimieren, durchgeführt. Andererseits erfolgten *in vivo*-Experimente mit der mutanten Mauslinie „*synpolydactyly homolog*“ (*spd^h*) als Modellorganismus für die Erforschung der SPD. Der SPD zugrunde liegende Expansionen des *Hoxd13*-Polyalaninrepeats verursachen eine Kombination aus Funktionsverlust und Funktionsgewinn³⁹. So weisen Mäuse mit inaktiviertem *Hoxd13* im Vergleich zu *spd^h*-Mäusen eine leichtere Fehlbildung des Autopods ohne SPD auf⁴. Folglich kann der Phänotyp der *spd^h*-Maus nicht auf einem reinen Funktionsverlust beruhen. Der Funktionsgewinn beinhaltet wahrscheinlich einen negativen Effekt von expandiertem *Hoxd13+Ala* auf *Hoxa13*. Erstens bewirkt die Inaktivierung eines *Hoxa13*-Allels zusätzlich zur homozygoten Inaktivierung von *Hoxd13* eine zentrale SPD, die dem Phänotypen der homozygoten *spd^h*-Maus ähnelt^{33, 54}. Zweitens wird ein ähnlicher, aber schwerwiegenderer Phänotyp durch die zusätzliche

Inaktivierung eines *Hoxa13*-Allels in *spdh*-Homozygoten verursacht³³. Drittens ist expandiertes, abnorm zytoplasmatisch lokalisiertes HOXD13+Ala *in vitro* in der Lage, HOXD13-wt, das eine hohe Sequenzidentität zum paralogen HOXA13 aufweist, zu sequestrieren. So kann HOXD13+Ala die funktionswichtige Translokation von HOXD13-wt in den Zellkern verhindern⁷³. Daraus resultierte die Hypothese, dass im Rahmen des Funktionsgewinns HOXD13+Ala mit HOXA13 interagiert und einen negativen Effekt auf dieses ausübt.

Die *in vitro*-Experimente zeigten eine Kolo-kalisation von expandiertem HOXD13+Ala mit HOXA13 in zytoplasmatischen Aggregaten (Abbildung 11). Auf dieser Interaktion beruht möglicherweise der negative Effekt von expandiertem *Hoxd13+Ala* auf *Hoxa13*. Zudem fördert interagierendes HOXA13 im Gegensatz zu nicht-interagierenden Proteinen die Aggregation von HOXD13+Ala (Abbildung 14). Auch *in vivo* zeigte sich in *spdh*-Mäusen eine Interaktion von HOXD13+Ala mit HOXA13. Aus dieser Interaktion resultiert eine abnorme, zytoplasmatische Lokalisation von HOXA13 im Perichondrium der Metakarpalknochen sowie eine reduzierte HOXA13-Proteinmenge in den Extremitäten der *spdh*-Mäuse (Abbildungen 18, 19, 20), wie bereits zuvor für HOXD13+Ala belegt⁷³. Zytoplasmatische Aggregate aus HOXD13+Ala kolokalisieren zwar mit HOXD13-wt, jedoch nicht mit verkürztem HOXD13-2Ala ohne Polyalanintrakt (Abbildung 15). Vermutlich ist also der Polyalanintrakt des Wildtyp-Interaktionspartners für die Interaktion mit expandiertem HOXD13+Ala erforderlich. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass nur expandiertes HOXD13+Ala, nicht aber HOXD13-wt in der Lage ist, mit dem Polyalanin-Transkriptionsfaktor HOXA13 zu interagieren (Abbildung 17). Folglich ist der expandierte Polyalanintrakt von HOXD13+Ala an der Interaktion mit HOXA13 beteiligt.

Die Interaktion von expandiertem HOXD13+Ala mit HOXA13 erfordert anscheinend eine ausreichende Länge des HOXD13-Polyalanintrakts, da erst Expansionen um mindestens 7 auf insgesamt 22 Alanine zum Krankheitsbild der SPD führen⁶³. Auch *in vitro* verursachen erst Polyalanintrakt-Expansionen dieser Größenordnung zytoplasmatische HOXD13+Ala-Aggregate⁷³. Dieses Ergebnis ließ sich auch in dieser Arbeit reproduzieren und eine zytoplasmatische Aggregation *in vitro* von HOXD13+7Ala und HOXD13+14Ala, nicht aber von HOXD13-wt, wurde gezeigt (Abbildung 10).

Wildtyp-Transkriptionsfaktoren sind im Zellkern lokalisiert, um dort die Genexpression zu regulieren. Die Expansion ihrer Polyalanintrakte führt zur Fehlfaltung, die letztlich in der Aggregation und/oder Degradation fehlkonformierten Proteins resultiert⁷⁵. Die Bildung intrazellulärer Aggregate infolge der Expansion ihrer Polyalanintrakte konnte für die Polyalanin-Proteine FOXL2, HOXA13, HOXD13, RUNX2, ARX, SOX3, PHOX2B, ZIC2 und TBX1 gezeigt werden^{73, 93, 103, 104, 110}. Wie bei HOXD13 liegt auch der Schwellenwert für krankheitsverursachende Polyalanintraktlängen von FOXL2 in einem ähnlichen Größenbereich,

Diskussion

bei 19 Alaninen⁹⁸. Expandiertes FOXL2+Ala ist, ebenso wie HOXD13+Ala, abnorm im Zytoplasma lokalisiert und bildet Aggregate⁹⁸. Zudem liegen isolierte Polyalaninintrakte, die an ein gelb fluoreszierendes Protein („yellow fluorescent protein“, YFP) gekoppelt sind, ab einer Länge von 23 Alaninen in einigen Zellen ausschließlich im Zytoplasma vor. Dabei korreliert die Länge des Polyalaninintrakts mit der Anzahl von Zellen mit ausschließlich zytoplasmatischem Vorliegen der Polyalaninintrakte. YFP allein ist hingegen in Zellkern und Zytoplasma verteilt⁹⁴. Gleichermäßen bildet ein an grün fluoreszierendes Protein („green fluorescent protein“, GFP) gekoppelter 19 Alanine langer Polyalanintrakt zytoplasmatische Aggregate. Ein kurzer, GFP-gekoppelter Polyalanintrakt von 7 Alaninen hingegen aggregiert nicht¹¹¹. Der längste bei Säugern vorkommende, nicht pathogene Polyalanintrakt in PHOX2B enthält 20 Alanine⁹². Seine Expansion um 5 Alanine verursacht ebenfalls zytoplasmatische Aggregate¹⁰⁰. Somit bewirken Polyalanintrakt-Expansionen, die einen Schwellenwert von ca. 20 Alaninen überschreiten, vermutlich eine abnorme Lokalisation der expandierten Proteine im Zytoplasma. Dazu passend liegt die Mindestlänge der pathogenen, zu den typischen Polyalanin-Krankheiten führenden, Polyalaninintrakte von Transkriptionsfaktoren zwischen 18 und 27 Alaninen⁸⁶. Im Jahr 2010 wurde eine weitere Polyalanin-Krankheit infolge einer Polyalanintrakt-Expansion von 15 auf 25 Alanine im Transkriptionsfaktor TBX1 (OMIM *602054) entdeckt. TBX1 spielt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung und seine Expansion verursacht einen angeborenen Herzfehler. *In vitro* führt die Expansion des TBX1-Polyalaninintrakts zur abnormen zytoplasmatischen Aggregation sowie einer stark reduzierten Transkriptionsaktivität¹⁰³.

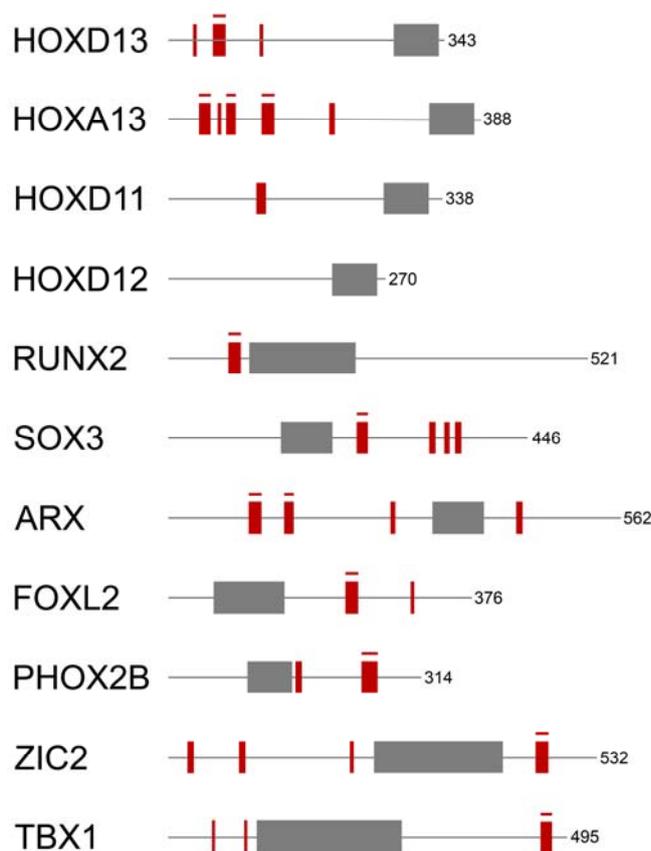
Ferner spricht der Zusammenhang von zunehmender Expressivität der Polyalanin-Krankheiten SPD (*HOXD13*), des kongenitalen zentralen Hypoventilationssyndroms (*PHOX2B*) sowie der *ARX*-assoziierten Phänotypen mit steigender Länge des Polyalaninrepeats⁷⁵ für eine molekulare Pathogenese, die im Zusammenhang mit der Länge des expandierten Polyalaninintrakts steht. Auch die Zunahme zytoplasmatischer Aggregate *in vitro* mit steigender Länge des Polyalaninintrakts der Transkriptionsfaktoren *HOXD13*⁷³, *PHOX2B*¹⁰⁰, *FOXL2*⁹⁸ und *HOXA13*⁹¹ spricht für diese Hypothese.

Des Weiteren zeigten die *in vitro*-Experimente, dass im Gegensatz zu *HOXD13*-wt, das mit *HOXD13*+Ala kolokalisiert⁷³, verkürztes *HOXD13*-2Ala ohne Polyalanintrakt keine Kolokalisation zeigt (Abbildung 15). Für eine Interaktion der Polyalanin-Transkriptionsfaktoren ist demnach wahrscheinlich auch der Polyalanintrakt des Wildtyp-Interaktionspartners erforderlich. Mehrere Polyalanin-Transkriptionsfaktoren mit expandierten Polyalaninintrakten interagieren mit Wildtyp-Polyalanin-Transkriptionsfaktoren. So interagiert *FOXL2*+Ala mit Wildtyp-*FOXL2*¹¹², *PHOX2B*+Ala mit Wildtyp-*PHOX2B*¹⁰⁰ und *HOXA13*+Ala mit Wildtyp-*HOXA13*⁹¹. Ebenso deuten weitere Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass

der Polyalanintrakt des Wildtyp-Interaktionspartners an der Interaktion mit expandiertem HOXD13+Ala beteiligt ist. Erstens kolokalisiert HOXA13 mit expandiertem HOXD13+Ala (Abbildung 11). HOXA13 ist ebenso wie HOXD13 ein Polyalanin-Transkriptionsfaktor und seine Polyalanintrakt-Expansion verursacht die Polyalanin-Krankheit Hand-Fuß-Genitalsyndrom⁷⁵. Zweitens kolokalisiert der Polyalanin-Transkriptionsfaktor RUNX2, ein essentieller Transkriptionsfaktor für die Osteoblastendifferenzierung, mit expandiertem HOXD13+Ala (Abbildung 12). Die Expansion des RUNX2-Polyalanintrakts führt zur Polyalanin-Krankheit cleidocraniale Dysplasie⁷⁵. Drittens kolokalisiert HOXD12, das keinen Polyalanintrakt enthält, nicht mit HOXD13+Ala (Abbildung 13).

Allerdings zeigt auch HOXD11 keine Kolokalisation mit HOXD13+Ala (Abbildung 13), obwohl es einen 13 Alanine langen Polyalanintrakt enthält. Dies war zunächst überraschend, da aufgrund des HOXD11-Polyalanintrakts eine Kolokalisation mit HOXD13+Ala wahrscheinlich erschien. Bei genauer Betrachtung der Sequenz des HOXD11 fällt allerdings auf, dass sein einziger Polyalanintrakt mit einer Länge von nur 13 Alaninen kürzer ist, als die jeweils längsten Polyalanintrakte des mit HOXD13+Ala interagierenden HOXD13, HOXA13 und RUNX2. Die bei ihrer Expansion krankheitsverursachenden Wildtyp-Polyalaninrepeats kodieren in *RUNX2* 17, in *HOXD13* 15 und in *HOXA13*, das drei expandierbare Polyalaninrepeats enthält, 16, 12 und 18 Alanine. Möglicherweise erreicht der HOXD11-Polyalanintrakt nicht die erforderliche Mindestlänge für eine Sequestrierung durch expandiertes HOXD13+14Ala. Außerdem liegt der Polyalanintrakt des HOXD11 isoliert vor. Dies trifft zwar auch auf RUNX2 zu, jedoch ist dessen Polyalanintrakt deutlich länger. Zudem ist, im Gegensatz zu *HOXD13*, *HOXA13* oder *RUNX2*, keine zu einer Polyalanin-Krankheit führende Expansion des *HOXD11*-Polyalaninrepeats bekannt. Auch im Vergleich mit den in dieser Arbeit nicht getesteten Polyalanin-Transkriptionsfaktoren SOX3, ZIC2, ARX, PHOX2B, FOXL2 und TBX1 fällt auf, dass deren bei Expansion krankheitsverursachende Wildtyp-Polyalanintrakte, mit Ausnahme von ARX, die Länge des HOXD11-Polyalanintrakts übertreffen. ARX wiederum verfügt im Gegensatz zu HOXD11 über mehrere benachbarte Polyalanintrakte⁷⁵. Vergleichend sind die den Polyalanin-Krankheiten zugrunde liegenden Polyalanin-Transkriptionsfaktoren sowie zusätzlich HOXD11 und HOXD12 in Abbildung 23 dargestellt.

Abbildung 23: Alignment einiger Polyalanin- und HOX-Transkriptionsfaktoren



Schematisch dargestellt sind die bisher bekannten Polyalanin-Transkriptionsfaktoren, deren Polyalanintrakt-Expansionsen zu Polyalanin-Krankheiten führen. Zusätzlich abgebildet sind die Transkriptionsfaktoren HOXD11 und HOXD12. Graue Linien repräsentieren die Proteinelänge, die als Aminosäurezahl angegeben ist. Existieren mehrere Splicevarianten, wurde die Länge der angegebenen UniProt-Zugangsnummer dargestellt. Die grauen Boxen repräsentieren die DNA-bindenden Domänen, rote Boxen entsprechen Polyalanintrakten ab einer Mindestlänge von vier Alaninen und sind maßstabsgetreu abgebildet. Mit rotem Überstrich markierte Boxen entsprechen expandierbaren Polyalanintrakten als Ursache für Polyalanin-Krankheiten^{69, 75, 86, 103}. Die humanen Proteinsequenzen wurden der UniProt-Datenbank entnommen.

Die Zugangsnummern sind: HOXD13, P35453; HOXA13, P31271; HOXD11, P31277; HOXD12, P35452; RUNX2, Q13950-1; SOX3, P41225; ARX, Q96Q53; FOXL2, P58012; PHOX2B, Q99453; ZIC2, Q95409; TBX1, O43435-3.

HOXD13+Ala interagiert nicht mit HOXD11 und HOXD12 und übt demnach vermutlich keinen negativen Effekt auf diese aus. Wahrscheinlich kolokalisieren nur Wildtyp-Polyalanin-Transkriptionsfaktoren, deren Polyalanintrakt allein lang genug ist oder deren Polyalanintrakt sich in Nachbarschaft weiterer Polyalanintrakte befindet, mit expandiertem HOXD13+Ala. Die Interaktion von Polyalanin-Transkriptionsfaktoren beruht also möglicherweise auf einer allgemeinen Interaktionstendenz von Polyalanintrakten ausreichender Länge. Auch Experimente mit isolierten Polyalanintrakten unterstützen diese Hypothese. Beispielsweise oligomerisieren isolierte Polyalanintrakte über hydrophobe Wechselwirkungen in Abhängigkeit von ihrer Länge. So interagieren längere Polyalanintrakte aus 28 Alaninen mit sich selbst und mit kürzeren aus nur 18 Alaninen. Polyalanintrakte aus 18 Alaninen hingegen interagieren nicht mit sich selbst⁹⁴.

Zukünftig könnten *in vitro*-Koexpressionsexperimente durchgeführt werden, um eine Interaktionstendenz von Polyalanin-Proteinen zu testen. *Hoxd13+Ala* kann mit weiteren Genen, die Wildtyp-Polyalanin-Transkriptionsfaktoren kodieren, wie *Sox3*, *Zic2*, *Arx*, *Phox2b*, *Foxl2* und

Tbx1, koexprimiert werden, um zu untersuchen, ob die Genprodukte wie erwartet mit HOXD13+Ala kolokalisieren. Außerdem kann *Hoxd13+Ala* mit mutierten *Hoxd13*-, *Hoxa13*- und *Runx2*-Konstrukten, deren Polyalaninrepeats unterschiedlich stark verkürzt sind, *in vitro* koexprimiert werden, um einen möglichen Schwellenwert der Länge von Polyalanintrakten für die Kolokalisation zu ermitteln. Die Koexpression von *Hoxd13+Ala* und einem verkürzten *Hoxa13*- bzw. *Runx2*-Konstrukt ohne Polyalaninrepeat dürfte nicht zur Kolokalisation der Genprodukte führen, falls diese auf einer allgemeinen Interaktionstendenz von Polyalanintrakten beruht.

Des Weiteren aggregiert mutiertes HOXD13- Δ hd ohne Homöodomäne im Zytoplasma, ohne dort mit den ebenfalls zytoplasmatischen HOXD13+Ala-Aggregaten zu kolokalisieren (Abbildung 16). Vermutlich führt der Verlust der Homöodomäne inklusive eines in ihr enthaltenen nukleären Lokalisationssignals zur Fehlfaltung und Aggregation von HOXD13- Δ hd im Zytoplasma. Die Notwendigkeit der Homöodomäne für die korrekte nukleäre Lokalisation konnte bereits für die Polyalanin-Transkriptionsfaktoren ARX¹¹⁰ sowie HOXA11¹¹³ und HOXA5⁹⁰ gezeigt werden. Außerdem vermittelt die Homöodomäne neben der DNA-Bindung auch direkte Protein-Interaktionen, z. B. zwischen HOX-Proteinen¹¹⁴. Daher trägt ihre Deletion womöglich zum Verlust der Interaktion mit expandiertem HOXD13+Ala bei. Neben dem Polyalanintrakt sind also weitere Proteinmotive, wie die Homöodomäne, direkt oder indirekt an der Interaktion von Polyalanin-Transkriptionsfaktoren beteiligt.

In Zellen, die neben *Hoxd13+Ala* das interagierende *Hoxa13* koexprimieren, wurde im Vergleich zu Zellen, die nicht interagierendes *Hoxd11* oder *Hoxd12* koexprimieren, eine vermehrte Proteinaggregation beobachtet (Abbildung 14). Diese beruht möglicherweise auf einer massiv gestörten Proteinhomöostase¹¹⁵. Koaggregiertes HOXD13+14Ala und sein Interaktionspartner HOXA13 könnten als Aggregationskeim fungieren und so die Sequestrierung weiteren Proteins begünstigen¹¹⁶. HOXD13+Ala ohne Interaktionspartner hingegen ist eventuell ein vergleichsweise schwacher Aggregationskeim, der die Aggregation weniger fördert. Die Interaktion von HOXD13+Ala mit HOXA13 verursacht wahrscheinlich eine Überlastung der zellulären Rückfaltungs- und Abbaumechanismen wie Chaperone, zytosolische Proteasen und lysosomale Hydrolasen. Diese Überlastung wiederum fördert die weitere Aggregation¹¹⁵.

Für HOXD13+14Ala wurde gezeigt, dass die verminderte Proteinmenge und abnorme zytoplasmatische Lokalisation *in vivo* auf der Fehlfaltung und vermehrten Degradation beruht⁷³. Vermutlich führt auch die Sequestrierung von HOXA13 durch HOXD13+14Ala in *spdh*-Mäusen durch gesteigerte Degradation zur Reduktion der HOXA13-Proteinmenge (Abbildung 20). Die abnorme, zytoplasmatische Lokalisation des HOXA13 (Abbildungen 18, 19) könnte durch mehrere, einander nicht ausschließende Mechanismen zustande kommen. Die Interaktion von HOXD13+Ala und HOXA13 im Zytoplasma könnte den Transport in den Nukleus mittels dafür

erforderlicher Interaktionspartner verhindern und die Diffusion über Kernporen, die bei Proteinen mit einer molekularen Masse bis 40 kDa erfolgt¹¹⁷, behindern. Ferner fungiert expandiertes HOXD13+Ala als zytoplasmatischer Retentionsfaktor für HOXA13 und bewirkt so dessen zytoplasmatische Lokalisation (Abbildung 11).

Analog zur Auswirkung des expandierten HOXD13+Ala auf HOXA13 wäre in *spdh*-Mäusen durch die Interaktion von HOXD13+Ala und RUNX2 auch eine verminderte RUNX2-Proteinmenge und dessen abnorme zytoplasmatische Lokalisation zu erwarten. Mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie kann in Folgeexperimenten die intrazelluläre Lokalisation des RUNX2 in *spdh*-Mäusen untersucht werden. Der Effekt der Proteininteraktion von HOXD13+Ala und RUNX2 *in vivo* auf die RUNX2-Proteinmenge ist vermutlich schwer zu beurteilen, da *Runx2* in *spdh*-Mäusen vermindert exprimiert wird. Seine Expression wird direkt durch *Hoxd13* aktiviert und expandiertes *Hoxd13+Ala* in *spdh*-Mäusen verliert diese Fähigkeit³³. Eine mögliche Proteininteraktion zwischen HOXD13+Ala und RUNX2 könnte zusätzlich zur verminderten *Runx2*- und *Bmp4*-Expression, die in einem Regelkreis aneinander gekoppelt sind³³, möglicherweise zur in *spdh*-Mäusen beobachteten verzögerten Verknöcherung beitragen. Die mögliche Interaktion von RUNX2+Ala und HOXD13 *in vivo* könnte auch klinische Merkmale erklären, die nicht zum klassischen Phänotyp der cleidocranialen Dysplasie gehören. Zum Beispiel weist eine Familie mit einer Polyalaninrepeat-Expansion des *RUNX2* zusätzlich eine Brachydaktylie auf¹¹⁸. Auch Mutationen des *HOXD13* verursachen Brachydaktylie⁶³. Es könnte sich also um einen gleichzeitigen Verlust der *HOXD13*- und *RUNX2*-Funktion bei der beschriebenen Familie infolge einer generellen Interaktionstendenz der Genprodukte handeln.

Zusammenfassend wurde als neuer Aspekt der molekularen Pathogenese der SPD ein negativer Effekt des *Hoxd13+Ala* auf *Hoxa13* nachgewiesen. Zugrunde liegt eine Interaktion von HOXD13+Ala und HOXA13, die *in vivo* zur zytoplasmatischen Lokalisation und Abnahme der HOXA13-Proteinmenge, vermutlich durch Degradation, führt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass an der Interaktion von Polyalanin-Transkriptionsfaktoren der expandierte Polyalanintrakt des HOXD13+Ala sowie wahrscheinlich der Polyalanintrakt des Wildtyp-Interaktionspartners beteiligt sind.

6.3 Generelle Interaktionstendenz von Polyalanin-Transkriptionsfaktoren

In dieser Arbeit wurde die Sequestrierung der Wildtyp-Polyalanin-Transkriptionsfaktoren HOXA13-wt und RUNX2-wt durch expandiertes HOXD13+14Ala gezeigt (Abbildungen 11, 12). Auch HOXD13-wt wird von HOXD13+14Ala sequestriert⁷³. Des Weiteren wurde analog eine Kolo-kalisation von HOXD13-wt mit HOXA13+Ala bzw. RUNX2+Ala entdeckt (Abbildung 21).

Folglich könnte den Polyalanin-Krankheiten eine gemeinsame molekulare Pathogenese zugrunde liegen, die auf einer generellen Interaktionstendenz von Polyalanintrakten beruht. Auch bei den Polyglutamin-Krankheiten¹¹⁹ findet sich eine solche generelle Interaktionstendenz homopolymerer Polyaminoäuretrakte. Erstens könnten der generellen Interaktionstendenz von Polyalanin-Transkriptionsfaktoren hydrophobe Wechselwirkungen zugrunde liegen. Die hydrophoben Polyalanintrakte könnten mit sich selbst und mit Polyalanintrakten weiterer Proteine interagieren. Es ist bekannt, dass hydrophobe Proteinbereiche aufgrund ihrer Interaktionstendenz besonders anfällig für Fehlfaltung sind. Dies führt zur Bildung amorpher oder fibrillärer Aggregate, sogenannten Amyloids^{115, 120}. In Spinnenseide trägt die hydrophobe Interaktion zwischen Polyalanintrakten zur Erhöhung der Faserzugbelastungsstärke bei¹²¹ und die Anzahl der Polyalanintrakte in ihren Kopolymeren korreliert mit der herausragenden Belastbarkeit¹²². Auch das Polyalanin-Protein PABPN1¹²³ sowie Polyalanin-Peptide¹²⁴ bilden mit zunehmender Polyalanintraktlänge *in vitro* vermehrt amyloide Fibrillen durch die Änderung ihrer Konformation¹²⁵. *In silico* Simulationen zeigen, dass der Fibrillenentstehung aus Polyalanin-Peptiden die Bildung amorpher Aggregate vorangeht¹²⁶, wie sie auch durch expandiertes HOXD13+Ala entstehen⁷³. Zweitens koaggregieren bevorzugt gleichartige Proteine und bei der Entstehung von amyloiden Aggregaten steigt die Anlagerungsfrequenz präformierter Fibrillen, das sogenannte Keimen („seeding“), mit zunehmender Sequenzidentität der interagierenden Proteine¹²⁷. Proteine mit expandierten Polyglutamintrakten bilden so intrazelluläre Aggregate und sequestrieren Wildtyp-Polyglutamin-Proteine^{119, 128}. Gleiches wäre auch für Polyalanin-Transkriptionsfaktoren denkbar. Oberhalb eines Schwellenwerts der expandierten Polyalanintrakte könnte ihre Interaktionstendenz überhandnehmen und fehlgefaltete expandierte Polyalanin-Proteine könnten aggregieren und/oder degradiert werden. Die Aggregate könnten durch die zusätzliche Rekrutierung von Wildtyp-Polyalanin-Transkriptionsfaktoren weiter wachsen. Auch mit zunehmender Sequenzidentität der interagierenden Proteinmotive steigt die Aggregationstendenz eines Proteins mit sich selbst sowie mit anderen Proteinen¹²⁹. Dies könnte zur generellen Interaktionstendenz von Polyalanin-Transkriptionsfaktoren beitragen und erklärt möglicherweise, weshalb die meisten, zu Polyalanin-Krankheiten führenden, expandierten Polyalanin-Transkriptionsfaktoren über mehrere Polyalanintrakte verfügen (Abbildung 23). Drittens müssen neu gebildete Proteine erst in ihre native Konformation überführt werden und sind während ihrer Entstehung besonders aggregationsanfällig. Die enge Nachbarschaft identischer, expandierter Polyalanin-Transkriptionsfaktoren während ihrer Synthese im Zytoplasma an den Polyribosomen könnte ihre Aggregation dabei zusätzlich fördern¹³⁰. Viertens verursachen Polyalanintrakte eine erhöhte Fehlfaltungsneigung angrenzender Bereiche¹³¹ und begünstigen so wahrscheinlich die Aggregation expandierter Polyalanin-Proteine.

Vermutlich wirkt der evolutionäre Druck in Richtung einer ausreichenden Sequenzdivergenz, um die Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen zu verhindern¹²⁹. Die Konservierung der Polyalanintraktlängen von Transkriptionsfaktoren bei den Säugern⁹² könnte eine Folge dieses evolutionären Drucks sein.

Aufgrund der paralogen Entstehung von *Hoxa13* und *Hoxd13* ähneln sich ihre Sequenzen. Wie zuvor diskutiert, könnte eine mögliche generelle Aggregationstendenz von Polyalanin-Transkriptionsfaktoren durch eine besonders hohe Sequenzidentität, wie sie zwischen HOXD13 und HOXA13 vorliegt, zusätzlich begünstigt werden. Um die Affinität von HOXD13+Ala zu seinen Interaktionspartnern HOXA13 und RUNX2 zu ermitteln, könnten in Folgeexperimenten verschiedene biochemische Methoden wie Koimmunopräzipitation, Filter Trap Assay oder die Analyse der Koaggregation in lebenden Zellen mittels Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) mit quantitativer Auswertung angewandt werden¹³².

Der Aggregationstendenz wirken gleichzeitig die zellulären Mechanismen der Proteinhomöostase entgegen¹¹⁵. Bei den Polyalanin-Erkrankungen sind verschiedene Systeme der Proteinqualitätskontrolle wirksam⁹³. Erstens wird eine korrekte Faltung durch molekulare „Anstandsdamen“, sogenannte Chaperone, vermittelt. Zweitens werden fehlkonformierte Proteine proteolytisch degradiert. Wichtige Chaperone sind die Hitzeschockproteine (HSP), die entsprechend ihrem Molekulargewicht beispielsweise als HSP40 oder HSP70 benannt wurden. Das Expressionslevel von Chaperonen kann durch zellulären Stress, der die Fehlfaltung von Proteinen begünstigt, erhöht werden¹²⁰. So könnte z. B. ein Temperaturanstieg zur variablen Expressivität der SPD beitragen⁴⁶. HSP70 und HSP40 unterstützen die Überführung von fehlkonformierten Proteinen in ihre native Konformation¹²⁰, unter anderem von HOXD13+Ala⁷³. Werden fehlkonformierte Proteine nicht zurückgefaltet, erfolgt der Abbau durch zytosolische Proteasen, z. B. das 26S-Proteasom beim Abbau von HOXD13+Ala⁷³, oder durch Autophagie mittels lysosomaler Hydrolasen. Sind die Kontrollsysteme überlastet, gerät die Proteinhomöostase aus dem Gleichgewicht. In der Folge aggregieren vermehrt fehlgefaltete Proteine¹¹⁵. Auf diese Weise stören beispielsweise auch Proteine mit expandierten Polyglutamintrakten die zelluläre Proteinhomöostase. Bereits aggregierte Polyglutamin-Proteine fördern kettenreaktionsartig die Aggregation weiterer Proteine. Sie verursachen unter anderem einen Funktionsverlust metastabiler Proteine und verstärken so wiederum die Aggregation¹³³. Vergleichbare Abläufe sind auch für expandierte Polyalanin-Proteine denkbar.

Zunehmend setzt sich die Erkenntnis durch, dass bei den Proteinspeicherkrankheiten, zu denen Polyglutamin-Erkrankungen zählen, lösliche Oligomere toxisch wirken, während die im Endzustand vorliegenden, unlöslichen Aggregate relativ gutartig sind¹¹⁵. Ein ähnlicher Mechanismus ist auch für Polyalanin-Proteine denkbar. Für das expandierte Polyalanin-Protein

PABPN1+Ala wurde bereits gezeigt, dass seine lösliche Form weitaus toxischer als die aggregierte Form ist und die Aggregate wahrscheinlich sogar zytoprotektiv wirken¹³⁴.

Einige Polyalaninrepeat-Expansionen führen zu Funktionsverlust-Mutationen, bei denen mutiertes Protein anscheinend effizient abgebaut wird⁷⁵. Andere Polyalanin-Krankheiten wie die SPD (*HOXD13*)³⁹ und möglicherweise auch das Hand-Fuß-Genitalsyndrom (*HOXA13*)⁷¹ führen, vermutlich durch Überlastung der Proteinhomeostasemechanismen, zu einer Kombination aus Funktionsverlust und Funktionsgewinn. In diesen Fällen wird mutiertes Protein wahrscheinlich ineffizient degradiert und die fehlgefalteten Proteine stören die normalen Zellfunktionen⁷³. So ist expandiertes *HOXD13*+Ala *in vivo* im Zytoplasma lokalisiert und seine Proteinmenge wird durch gesteigerten Abbau nur reduziert⁷³.

6.4 Funktionelle Interaktion von *HOXD13* und SMADs

Mitglieder des „Bone morphogenetic protein“ (BMP)-Signalwegs steuern mit *HOXD13* die Extremitätenentwicklung⁴⁵. Außerdem interagieren SMAD-Transkriptionsfaktoren, die Signalwandler des kanonischen BMP-Signalwegs, mit *HOXD13*, um die Genexpression zu modulieren^{49, 50}. *HOXD13* und der BMP-Signalweg kooperieren demnach bei der Extremitätenentwicklung und BMP-regulierte Funktionen, wie die ektope, interdigitale Knorpelbildung³⁹, sind in *spdh*-Mäusen fehlgesteuert. Dies führte zur Hypothese, dass expandiertes *HOXD13*+Ala eine Fehlregulation des SMAD-Signalwegs bewirkt.

Zur Untersuchung einer möglichen funktionellen Interaktion von *HOXD13* mit SMADs wurden *in vitro* Luciferase-Reporterassays mit SMAD-responsiven Reporterkonstrukten durchgeführt. Die Aktivität des SMAD-Signalwegs in *Hoxd13-wt* bzw. *Hoxd13+Ala* überexprimierenden Zellen sollte so analysiert werden. Alle Experimente zeigten eine deutliche Hemmung des SMAD-Signalwegs durch *HOXD13-wt*, während expandiertes *HOXD13+Ala* schwächer bis nicht hemmend wirkt (Abbildung 22). *HOXD13+Ala* führt also, verglichen mit *HOXD13-wt*, *in vitro* zu einer erhöhten Aktivität des kanonischen BMP-Signalwegs.

Die geringen, im Ergebnisteil detailliert beschriebenen Unterschiede der Luciferase-Messungen können verschiedene methodische Ursachen haben. Erstens wurden die Luciferase-Assays in unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt. Bei COS-7-Zellen handelt es sich um eine fibroblastische Nierenzelllinie mit mesenchymalen Eigenschaften, die der Grünen Meerkatze entstammt. HepG2-Zellen hingegen sind humane Leberzellkarzinomzellen mit epithelialer Morphologie. Beide Zelllinien sind somit von verschiedenen Spezies und Geweben abgeleitet und unterscheiden sich folglich im Expressionslevel von Proteinen, was sich vermutlich auf die gemessenen Luciferase-Aktivitäten auswirkt. Zweitens unterscheiden sich auch die verwendeten

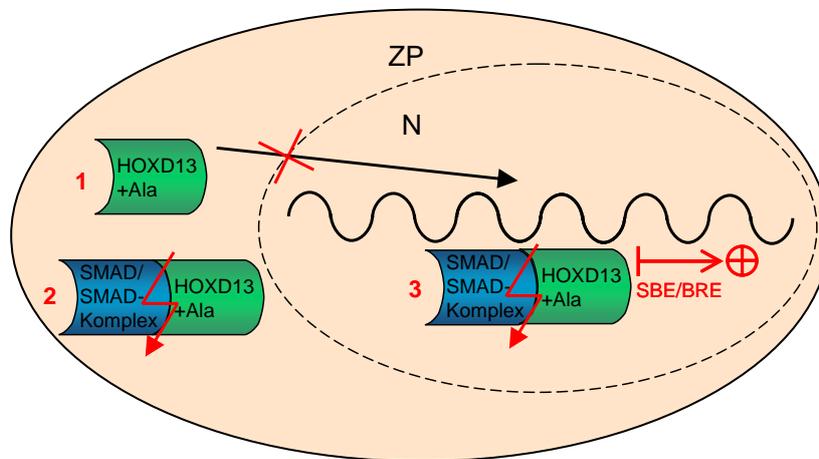
SMAD-responsiven Reporterkonstrukte, deren Aufbau im Materialien- und Methodenteil beschrieben ist. Drittens wurde in einigen Zellen durch die Koexpression eines konstitutiv aktiven BMP-Rezeptors der exogene SMAD-Signalweg aktiviert. Verglichen mit der Kontrolle mit endogener SMAD-Aktivität korrelieren in diesen Zellen steigende Luciferase-Aktivitäten deutlicher mit einer zunehmenden Länge des HOXD13-Polyalanintrakts. Die Ergebnisse bei endogener SMAD-Aktivität sind weniger deutlich, weisen aber in die gleiche Richtung. Sie bilden vermutlich eher die Verhältnisse *in vivo* ab.

Die Polyalanintrakt-Expansion führt demnach *in vitro* zu einer verminderten Hemmung der SMAD-vermittelten Transkription durch HOXD13. Verschiedene Ursachen dafür sind vorstellbar und sind in Abbildung 24 schematisch dargestellt. Erstens könnte die Expansion des HOXD13-Polyalanintrakts seine transkriptionelle Aktivität oder DNA-Bindungsfähigkeit modifizieren und so den Verlust der HOXD13-wt-Repressorfunktion auf den SMAD-Signalweg bewirken. Die zytoplasmatische Fehllokalisierung von expandiertem HOXD13+Ala verursacht eine verminderte Verfügbarkeit im Zellkern. Dies reduziert vermutlich die DNA-Bindung. Für die Polyalanin-Transkriptionsfaktoren ZIC2¹⁰⁴ und PHOX2B wurde eine reduzierte DNA-Bindung infolge der Expansion ihrer Polyalanintrakte bereits gezeigt⁹⁹. Eine Hemmung der SMAD-vermittelten Transkription durch die direkte Bindung von HOXD13 an SBes oder BREs ist nicht wahrscheinlich, da die in den Luciferase-Assays verwendeten Promotoren keine bekannten HOXD13-Bindungsstellen^{135, 136} enthalten. Elektromobilitäts-Experimente könnten durchgeführt werden, um eine potenzielle Bindung von HOXD13 an die eingesetzten SMAD-responsiven Reporterkonstrukte zu detektieren. Ein Verlust der Repressorfunktion des HOXD13 infolge seiner Alanintraktexpansion ist fraglich, da die Expansion von Polyalanintrakten, wie bereits diskutiert, meist eine verminderte Transkriptionsaktivität bewirkt. Zweitens könnte die zytoplasmatische Fehllokalisierung infolge der Alanintraktexpansion von HOXD13+Ala die Interaktionsfähigkeit mit SMADs und weiteren Interaktionspartnern modifizieren und so die SMAD-vermittelte Transkription begünstigen. Es ist bekannt, dass SMADs in Abhängigkeit vom zellulären Kontext die Genexpression aktivieren oder hemmen, indem sie differenziell mit transkriptionellen (Ko-) Aktivatoren und (Ko-) Repressoren interagieren⁵¹. Es wurde gezeigt, dass HOXes und SMADs durch Protein-Interaktionen^{50, 137} und durch Bindung benachbarter DNA-Sequenzen in Promotorbereichen^{138, 139} interagieren. Auch im Autopod vorliegendes HOXD13 und HOXA13 interagieren *in vitro* direkt und indirekt mit SMADs^{49, 50}. Sie hemmen, wie auch in dieser Arbeit für HOXD13-wt gezeigt (Abbildung 22), die SMAD-vermittelte Transkription von einem SMAD-aktivierten Promotor⁴⁹. Möglicherweise verursacht die Expansion des HOXD13-Polyalanintrakts auch *in vivo* eine Aktivitätssteigerung des kanonischen, SMAD-vermittelten BMP-Signalwegs. Da BMPs die Knorpelbildung fördern²⁵, könnte die erhöhte SMAD-Aktivität in *spdh*-Mäusen die

Diskussion

ektopye, interdigitale Chondrogenese steigern³⁹. So könnte HOXD13+Ala durch seine Wirkung auf die SMAD-vermittelte Transkription zur Ausbildung des SPD-Phänotyps in *spdh*-Mäusen beitragen. Außerdem ist bekannt, dass die unkontrollierte interdigitale Knorpelbildung durch den gesteigerten Abbau von expandiertem HOXD13+Ala gefördert wird. Dadurch kommt es zu einer verminderten Retinsäure-vermittelten Inhibition der Knorpelbildung in den Fingerzwischenräumen. Des Weiteren induziert HOXD13+Ala die Knorpelbildung durch die Fehlregulation weiterer Signalwege³⁹. Bei der gesteigerten Knorpelbildung in den Fingerzwischenräumen der *spdh*-Maus handelt es sich also um den Endpunkt verschiedener, durch expandiertes HOXD13+Ala fehlregulierter, zellulärer Prozesse.

Abbildung 24: Modell der Regulation der SMAD-vermittelten Transkription durch HOXD13+Ala



Modell der möglichen pathogenetischen Effekte von expandiertem HOXD13+Ala auf die SMAD-vermittelte Transkription in der Zelle: HOXD13-wt hemmt die SMAD-vermittelte Transkription, während expandiertes HOXD13+Ala zu einer abnorm starken Aktivität des SMAD-Signalwegs führt. Verschiedene Ursachen dafür sind denkbar, einige sind dargestellt. (1) HOXD13+Ala könnte seine DNA-Bindungs- und Fähigkeit zur Interaktion mit Interaktionspartnern im Nucleus (N) durch seine Retention im Zytoplasma (ZP) verlieren. (2) Aberrante Protein-Interaktionen des HOXD13+Ala mit SMADs könnten die SMAD-vermittelte Transkription begünstigen. (3) Infolge der Expansion seines Polyalanintrakts könnte HOXD13+Ala eine mögliche (Ko-) Repressorfunktion auf die SMAD-vermittelte Genexpression verlieren und die Transkription von Promotoren mit SMAD-bindenden Elementen (SBE) oder BMP-responsiven Elementen (BRE) begünstigen.

Um eine mögliche Proteininteraktion von HOXD13 und SMADs in der Extremitätenentwicklung zu detektieren, könnten in Folgeexperimenten verschiedene Methoden wie Immunzytochemie, Koimmunopräzipitation, Pulldown-Assays, Far Western Blot oder FRET¹³² zur Anwendung kommen. Auch die Interaktion von HOXD13 und SMADs bei der Regulation der Genexpression in der Extremitätenentwicklung kann untersucht werden. Dazu könnten zunächst *in silico* Kandidaten-Gene, die von beiden potenziellen Interaktionspartnern reguliert werden, in Wildtyp- und *spdh*-Mäusen identifiziert werden. *In vivo* könnte eine Re-Chromatin-Immunopräzipitation mit Extremitätenlysaten von Wildtyp- und *spdh*-Mäusen durchgeführt werden, um Promotorbereiche zu identifizieren, die sowohl von HOXD13 als auch von SMADs gebunden werden. Eine mögliche Aktivitätssteigerung des SMAD-Signalwegs durch die Expansion des HOXD13-Polyalanintrakts *in vivo* könnte durch die immunhistochemische Anfärbung aktivierter, phosphorylierter SMADs analysiert werden. Es wäre eine erhöhte Menge an Phospho-SMADs in *spdh*-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zu erwarten.

Auch der Polyalanin-Transkriptionsfaktor RUNX2 interagiert mit SMADs. Zusammen regulieren sie die Transkription, indem sie, teils durch direkte Protein-Protein-Interaktion, Komplexe bilden^{140, 141, 142} und an benachbarte DNA-Sequenzen in Promotorbereichen binden¹⁴³. Gemeinsam aktivieren SMADs und RUNX2 die Transkription von Kollagen Typ X, das von hypertrophen Chondrozyten gebildet wird. So regulieren sie zusammen die späte Chondrozytendifferenzierung und Verknöcherung¹⁴³. Wie zuvor diskutiert, könnte aufgrund der generellen Interaktionstendenz von Polyalanin-Transkriptionsfaktoren die Expansion des HOXD13-Polyalanintrakts *in vivo* die Verfügbarkeit von RUNX2-Protein im Zellkern reduzieren. Außerdem wird *Runx2* in *spdh*-Mäusen vermindert exprimiert³³. Zusätzlich ist möglicherweise die Interaktion von RUNX2 mit SMADs in *spdh*-Mäusen gestört. All dies könnte zur verzögerten Verknöcherung beitragen³³. Neben der gestörten Knorpel- und Knochenbildung laufen weitere BMP-regulierte Prozesse wie Apoptose, Proliferation, Musterbildung und Gelenkentwicklung in *spdh*-Mäusen abnorm ab⁴. Die BMP-Signalweiterleitung erfolgt allerdings nicht nur über den kanonischen SMAD-Signalweg, sondern auch über die nicht-kanonischen MAP-Kinase-Signalwege²⁹. Es wäre von Interesse, in weiteren Experimenten eine potenzielle Beeinflussung weiterer BMP-Signalwege durch HOXD13 zu untersuchen. Möglicherweise inhibiert HOXD13-wt zwar, wie gezeigt, die kanonische SMAD-vermittelte BMP-Signalweiterleitung, aktiviert jedoch gleichzeitig andere BMP-Signalwege, um die Extremitätenentwicklung zu fördern. Dafür spricht die Aktivierung des *Bmp4*-Promotors durch HOXD13 und HOXA13¹⁴⁴ und die Förderung der *Bmp4*-Expression durch HOXD13³³. Expandiertes HOXD13+Ala verliert vermutlich diese Fähigkeit und verursacht eine verminderte *Bmp4*-Expression in *spdh*-Mäusen³³.

Auch die Untersuchung einer möglichen funktionellen Interaktion von HOXA13-wt bzw. HOXA13+Ala und SMADs ist von Interesse. So könnte geklärt werden, ob die gezeigte Interaktion mit dem SMAD-Signalweg spezifisch für HOXD13 ist oder auch für das paraloge HOXA13 vorliegt.

Zusammenfassend wurde ein neuer molekularpathogenetischer Effekt von HOXD13+Ala aufgedeckt. HOXD13+Ala verursacht infolge der Expansion des Polyalanintrakts *in vitro* im Vergleich zum hemmend wirkenden HOXD13-wt eine erhöhte Aktivität des SMAD-Signalwegs.

6.5 Molekulare Pathogenese der *Hoxd13*-assoziierten Synpolydaktylie

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei neue, der SPD 1 zugrunde liegende molekularpathogenetische Mechanismen identifiziert.

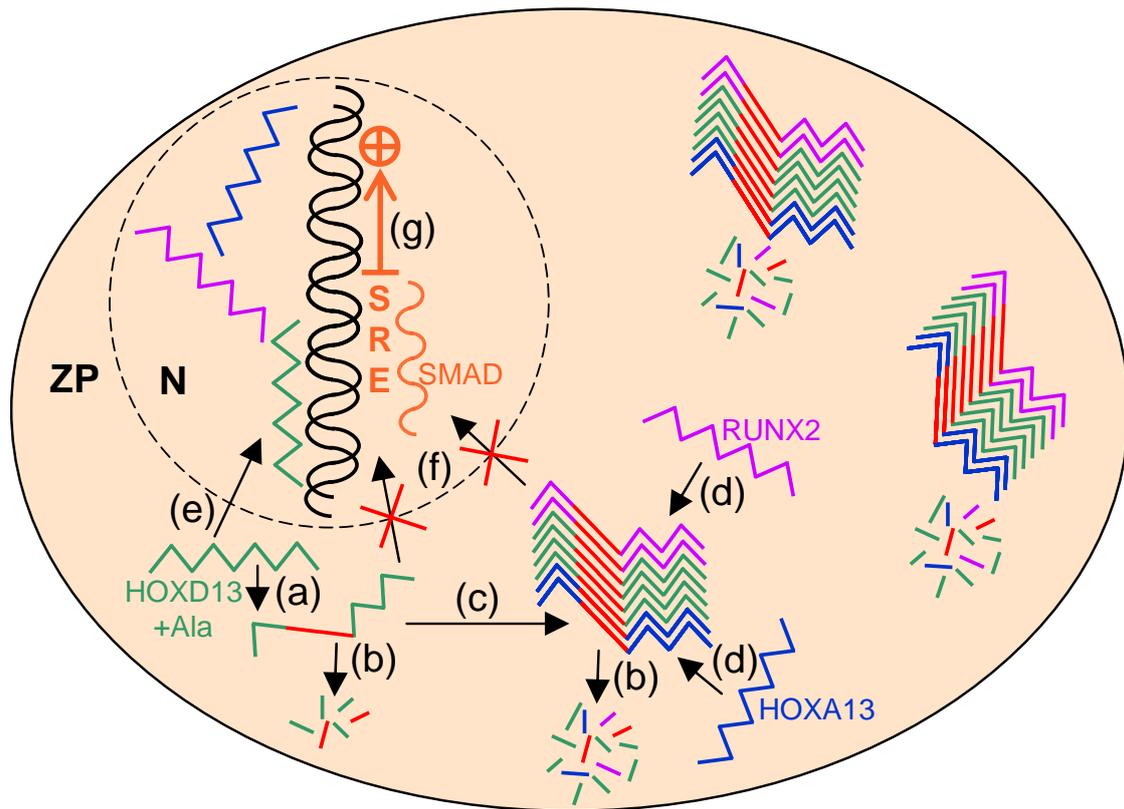
Erstens wurde ein negativer Effekt des *Hoxd13+Ala* auf *Hoxa13* nachgewiesen. Zugrunde liegt eine Interaktion von fehlgefaltetem, im Zytoplasma lokalisierten HOXD13+Ala und HOXA13. Diese Interaktion führt *in vivo* zur abnormen, zytoplasmatischen Lokalisation und Abnahme der HOXA13-Proteinmenge, vermutlich durch Degradation, wie für HOXD13+Ala bekannt⁷³. Des Weiteren wurde gezeigt, dass an der Interaktion wahrscheinlich der expandierte Polyalanintrakt des HOXD13+Ala sowie der Polyalanintrakt des Wildtyp-Interaktionspartners beteiligt sind.

Zweitens verursacht expandiertes HOXD13+Ala im Vergleich zum stark hemmend wirkenden HOXD13-wt eine erhöhte Aktivität des SMAD-Signalwegs *in vitro*. Dies könnte *in vivo* die ektope interdigitale Knorpelbildung³⁹ und die daraus resultierende SPD fördern.

Außerdem weisen die in dieser Arbeit neu entdeckten Interaktionen von HOXD13+Ala mit RUNX2 sowie von HOXA13+Ala bzw. RUNX2+Ala mit HOXD13 darauf hin, dass den Polyalanin-Krankheiten wahrscheinlich eine gemeinsame molekulare Pathogenese zugrunde liegt. Diese beruht vermutlich auf einer generellen Interaktionstendenz von Polyalanin-Proteinen.

Es werden folglich neue Aspekte der molekularen Pathogenese speziell der *Hoxd13*-assoziierten SPD und generell der Polyalanin-Krankheiten vorgeschlagen. Abbildung 25 zeigt ein Modell für die molekulare Pathogenese der SPD.

Abbildung 25: Modell der molekularen Pathogenese der SPD durch HOXD13+Ala



Dargestellt ist das Modell der molekularen Pathogenese der SPD. Expandiertes HOXD13+Ala wird (a) fehlgefaltet und nachfolgend (b) degradiert und/oder (c) aggregiert im Zytoplasma (ZP). Die HOXD13+Ala-Aggregate (d) sequestrieren weitere Polyalanin-Transkriptionsfaktoren wie HOXA13 und RUNX2 und werden ebenfalls (b) degradiert. Dabei werden auch sequestrierte Polyalanin-Transkriptionsfaktoren wie HOXA13 degradiert. Nur korrekt gefaltete Polyalanin-Transkriptionsfaktoren (e) gelangen in den Nukleus (N), um dort die Genexpression zu regulieren. Fehlfaltete Proteine (f) translozieren nicht in den Zellkern. Expandiertes HOXD13+Ala bewirkt im Vergleich zum stark hemmend wirkenden HOXD13-wt eine (g) gesteigerte SMAD-vermittelte Transkription von Promotoren mit SMAD-responsiven Elementen (SRE).

6.6 Therapie der Polyalanin-Krankheiten

Es gibt mehrere Ansätze zur Therapie der Polyalanin-Krankheiten. So können auf verschiedene Weise die Proteinhomeostase günstig beeinflusst und die Aggregation expandierter Polyalanin-Proteine reduziert werden.

Ein Anheben des Chaperon-Levels, vor allem der HSP70-Familie, kann die Bildung fehlgefalteten Proteins verringern¹²⁰ und möglicherweise die Pathogenität expandierter Polyalanin-Proteine mildern. Beispielsweise aktiviert Geldanamycin, ein bakteriell produziertes Antibiotikum und Anti-Krebs-Medikament, das Chaperon-System¹⁴⁵. *In vitro* vermindert Geldanamycin die

Aggregation der expandierten Polyalanin-Transkriptionsfaktoren HOXD13+Ala⁷³ und PHOX2B+Ala¹⁴⁶. Auch andere Chemikalien wie Zinksulfat, 8-Hydroxychinolin und die nichtsteroidalen Antirheumatika Indometacin und Ibuprofen aktivieren die Chaperonexpression¹⁴⁷. Sie reduzieren, ebenso wie die Überexpression molekularer Chaperone¹⁴⁸, *in vitro* die Aggregation und Toxizität des expandierten Polyalanin-Proteins PABPN1+Ala. Auch das chemische Chaperon Trehalose verringert *in vitro* und *in vivo* die Aggregation von PABPN1+Ala und mildert seine Toxizität¹⁴⁹. Gleichmaßen wird die Aggregation von expandiertem ARX+Ala *in vitro* durch die Aktivierung des Chaperon-Systems reduziert¹⁵⁰.

Auch andere Aggregationsinhibitoren vermindern die pathogene Wirkung expandierter Polyalanin-Proteine. So reduzieren Kongorot, Doxycyclin und der Transglutaminase-Inhibitor Cystamin *in vitro*^{151, 152}, bzw. Doxycyclin und Cystamin auch *in vivo*^{152, 153}, die Toxizität von expandiertem PABPN1+Ala. Gleichmaßen verringert Lithium *in vivo*, vermutlich durch Inhibition der Aggregation, die toxische Wirkung eines künstlichen Polyalanin-Peptids im *Drosophila melanogaster*-Modell¹⁵⁴.

Andere Ansätze zielen darauf ab, die native Konformation des expandierten Polyalanin-Proteins zu stabilisieren und so das Gleichgewicht zwischen toxischer und nicht-toxischer Form günstig zu beeinflussen. So reduziert *in vitro* ein spezifischer PABPN1-Antikörper die Aggregation expandierten PABPN1+Ala¹⁵⁵.

Auch eine Stimulation des Abbaus expandierter Polyalanin-Proteine kann ihre Pathogenität mindern. So kann *in vivo* im *Drosophila melanogaster*-Modell die Toxizität eines künstlichen Polyalanin-Peptids durch das Autophagie-induzierende Medikament Rapamycin reduziert werden¹⁵⁶. Rapamycin fördert die Degradation der Polyalanin-Aggregate und kommt auch bei der Behandlung von Polyglutamin-Krankheiten im Tiermodell zum Einsatz¹⁵⁷. Das Protein Ubiquilin stimuliert den proteasomalen Abbau und reduziert *in vitro* ebenfalls die Aggregation und Toxizität eines künstlichen Polyalanin-Peptids¹⁵⁸.

Als direkter Ansatz für die Therapie der Polyalanin-Krankheiten ist darüber hinaus eine selektiv verminderte Expression des expandierten Allels denkbar. Dies wurde erfolgreich *in vivo* bei der Therapie der Polyglutamin-Krankheiten gezeigt¹⁵⁷.

Außerdem wird bei den Polyglutamin-Krankheiten *in vivo* eine gestörte Genexpression mit Histon-Deacetylase-Inhibitoren therapiert. Diese wirken einer verminderten Histon-Acetyltransferase-Aktivität von Transkriptionsfaktoren entgegen^{157, 159}. Die Toxizität des expandierten Polyalaninproteins PABPN1+Ala wird *in vitro* und *in vivo* durch Deacetylase-Inhibitoren gemindert¹⁶⁰. Deren therapeutischer Einsatz wäre auch bei Polyalanin-Krankheiten durch Expansionen in Polyalanin-Transkriptionsfaktoren denkbar.

7 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der molekularen Pathogenese der angeborenen Skelettfehlbildung Synpolydaktylie (SPD), die zur Familie der Polyalanin-Krankheiten zählt und bei Patienten zum Auftreten zusätzlicher, fusionierter Finger und Zehen führt.

Die Ursache der SPD ist eine Alaninrepeat-Expansion (+Ala) in *HOXD13* um mindestens sieben zusätzliche Alanine, deren Länge mit der Penetranz und Schwere des Phänotyps korreliert. Die mutante Mauslinie „*synpolydactyly homolog*“ (*spd^h*) besitzt analog zur humanen SPD eine spontan aufgetretene Alaninrepeat-Expansion des *Hoxd13* (*Hoxd13+Ala*) und dient aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeit als SPD-Modellorganismus. HOXD13 gehört zu einer Familie von nukleär lokalisierten Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren (TF), die maßgeblich die Embryonalentwicklung der primären Körperachse und der Extremitäten regulieren. Auch Skelettfehlbildungen durch Alaninrepeat-Expansionen der TF-kodierenden Gene *HOXA13* und *RUNX2* zählen zur Gruppe der Polyalanin-Krankheiten⁷⁵. Zudem steuern Mitglieder des „Bone morphogenetic protein“ (BMP)-Signalwegs die Extremitätenentwicklung und ihre Mutationen verursachen ähnliche Phänotypen wie *HOXD13*-Mutationen⁴⁵. SMAD-TF, die BMP-Signalwandler, interagieren mit HOXD13, um die Genexpression zu regulieren^{49,50}. *Hoxd13+Ala* bewirkt eine Kombination aus Funktionsverlust und -gewinn³⁹. So unterscheidet sich der Phänotyp der *spd^h*-Maus klar von der bei Funktionsverlust-Mutationen auftretenden, schwächeren Fehlbildung ohne SPD⁴. Kreuzungsexperimente und Phänotypenvergleiche mutanter Mauslinien deuten auf einen negativen Effekt von expandiertem *Hoxd13+Ala* auf weitere *Hox*-Gene hin⁷⁴.

Der negative Effekt von *Hoxd13+Ala* wurde aufgeklärt. *In vitro* aggregiert HOXD13+Ala im Zytoplasma und sequestriert HOXA13 mittels seines expandierten Polyalanintrakts. *In vivo* verursacht diese Interaktion eine abnorme zytoplasmatische Lokalisation und reduzierte Proteinmenge von HOXA13 im Perichondrium von Metakarpalknochen der *spd^h*-Maus. Des Weiteren sequestrieren HOXD13+Ala-Aggregate zwar Wildtyp (wt)-HOXD13⁷³, nicht jedoch verkürztes HOXD13-2Ala ohne Alanintrakt oder mutiertes HOXD13-Δhd ohne Homöodomäne. Die Interaktion von HOXD13+Ala mit Polyalanin-TF erfordert somit neben dem Polyalanintrakt weitere Proteinmotive. Auch RUNX2 wird durch HOXD13+Ala sequestriert. Analog wird HOXD13-wt in zytoplasmatische Aggregate aus HOXA13+Ala sowie RUNX2+Ala sequestriert. Ferner bewirkt HOXD13+Ala, verglichen mit HOXD13-wt, eine erhöhte SMAD-Aktivität.

Zwei neue, der SPD zugrunde liegende, molekularpathogenetische Mechanismen wurden folglich identifiziert. Erstens bewirkt die Expansion des Polyalaninrepeats einen Verlust der Repressorfunktion des *Hoxd13* auf den SMAD-Signalweg. Zweitens übt *Hoxd13+Ala* einen negativen Effekt auf *Hoxa13* aus. Die darüber hinaus neu entdeckte, generelle Interaktionstendenz von Polyalanin-TF erweitert wesentlich das Wissen über Polyalanin-Erkrankungen.

8 Literatur

1. Shubin N, Tabin C, Carroll S. Fossils, genes and the evolution of animal limbs. *Nature* 1997;**388**:639-48.
2. Darwin C. *The Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. London: John Murray; 1859.
3. Tabin CJ. Why we have (only) five fingers per hand: hox genes and the evolution of paired limbs. *Development* 1992;**116**:289-96.
4. Albrecht AN, Schwabe GC, Stricker S, Boddrich A, Wanker EE, Mundlos S. The synpolydactyly homolog (spdh) mutation in the mouse -- a defect in patterning and growth of limb cartilage elements. *Mech Dev* 2002;**112**:53-67.
5. Benazet JD, Zeller R. Vertebrate limb development: moving from classical morphogen gradients to an integrated 4-dimensional patterning system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;**1**:a001339.
6. Lamb DW, Wynne-Davies, R. *Incidence and Genetics*. 1 ed. London: Churchill Livingstone; 1998.
7. Schwabe GC, Mundlos S. Genetics of congenital hand anomalies. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, plastische Chirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Handchirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie der Peripheren Nerven und Gefässe : Organ der Vereinigung der Deutschen Plastischen Chirurgen* 2004;**36**:85-97.
8. Duboc V, Logan MP. Regulation of limb bud initiation and limb-type morphology. *Dev Dyn* 2011;**240**:1017-27.
9. Capdevila J, Izpisua Belmonte JC. Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;**17**:87-132.
10. Zeller R, Lopez-Rios J, Zuniga A. Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis. *Nat Rev Genet* 2009;**10**:845-58.
11. Johnson RL, Tabin CJ. Molecular models for vertebrate limb development. *Cell* 1997;**90**:979-90.
12. te Welscher P, Fernandez-Teran M, Ros MA, Zeller R. Mutual genetic antagonism involving GLI3 and dHAND prepatterns the vertebrate limb bud mesenchyme prior to SHH signaling. *Genes Dev* 2002;**16**:421-6.
13. Tarchini B, Duboule D, Kmita M. Regulatory constraints in the evolution of the tetrapod limb anterior-posterior polarity. *Nature* 2006;**443**:985-8.
14. Sun X, Mariani FV, Martin GR. Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature* 2002;**418**:501-8.
15. Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 1993;**75**:1401-16.
16. Masuya H, Sagai T, Wakana S, Moriwaki K, Shiroishi T. A duplicated zone of polarizing activity in polydactylous mouse mutants. *Genes Dev* 1995;**9**:1645-53.
17. Hill RE. How to make a zone of polarizing activity: insights into limb development via the abnormality preaxial polydactyly. *Dev Growth Differ* 2007;**49**:439-48.
18. Zuniga A, Zeller R. Gli3 (Xt) and formin (ld) participate in the positioning of the polarising region and control of posterior limb-bud identity. *Development* 1999;**126**:13-21.
19. Drossopoulou G, Lewis KE, Sanz-Ezquerro JJ, et al. A model for anteroposterior patterning of the vertebrate limb based on sequential long- and short-range Shh signalling and Bmp signalling. *Development* 2000;**127**:1337-48.

Literatur

20. Ahn K, Mishina Y, Hanks MC, Behringer RR, Crenshaw EB, 3rd. BMPR-IA signaling is required for the formation of the apical ectodermal ridge and dorsal-ventral patterning of the limb. *Development* 2001;**128**:4449-61.
21. Mundlos S, Olsen BR. Heritable diseases of the skeleton. Part I: Molecular insights into skeletal development-transcription factors and signaling pathways. *Faseb J* 1997;**11**:125-32.
22. Lüllmann-Rauch R. *Histologie*. 1 ed. Stuttgart: Thieme; 2003.
23. Yoon BS, Ovchinnikov DA, Yoshii I, Mishina Y, Behringer RR, Lyons KM. Bmpr1a and Bmpr1b have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**:5062-7.
24. Robert B. Bone morphogenetic protein signaling in limb outgrowth and patterning. *Dev Growth Differ* 2007;**49**:455-68.
25. Bandyopadhyay A, Tsuji K, Cox K, Harfe BD, Rosen V, Tabin CJ. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet* 2006;**2**:e216.
26. Retting KN, Song B, Yoon BS, Lyons KM. BMP canonical Smad signaling through Smad1 and Smad5 is required for endochondral bone formation. *Development* 2009;**136**:1093-104.
27. Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* 2002;**2**:389-406.
28. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;**113**:685-700.
29. Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO. Signal transduction of bone morphogenetic proteins. *Cell Signal* 2004;**16**:291-9.
30. Krumlauf R. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 1994;**78**:191-201.
31. Ramirez-Solis R, Zheng H, Whiting J, Krumlauf R, Bradley A. Hoxb-4 (Hox-2.6) mutant mice show homeotic transformation of a cervical vertebra and defects in the closure of the sternal rudiments. *Cell* 1993;**73**:279-94.
32. Yokouchi Y, Nakazato S, Yamamoto M, *et al.* Misexpression of Hoxa-13 induces cartilage homeotic transformation and changes cell adhesiveness in chick limb buds. *Genes Dev* 1995;**9**:2509-22.
33. Villavicencio-Lorini P, Kuss P, Friedrich J, *et al.* Homeobox genes d11-d13 and a13 control mouse autopod cortical bone and joint formation. *J Clin Invest* 2010;**120**:1994-2004.
34. Moens CB, Selleri L. Hox cofactors in vertebrate development. *Dev Biol* 2006;**291**:193-206.
35. Kmita M, Duboule D. Organizing axes in time and space; 25 years of colinear tinkering. *Science* 2003;**301**:331-3.
36. Wellik DM. Hox patterning of the vertebrate axial skeleton. *Dev Dyn* 2007;**236**:2454-63.
37. Dolle P, Izpisua-Belmonte JC, Falkenstein H, Renucci A, Duboule D. Coordinate expression of the murine Hox-5 complex homeobox-containing genes during limb pattern formation. *Nature* 1989;**342**:767-72.
38. Pearson JC, Lemons D, McGinnis W. Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat Rev Genet* 2005;**6**:893-904.
39. Kuss P, Villavicencio-Lorini P, Witte F, *et al.* Mutant Hoxd13 induces extra digits in a mouse model of synpolydactyly directly and by decreasing retinoic acid synthesis. *J Clin Invest* 2009;**119**:146-56.
40. Zakany J, Duboule D. The role of Hox genes during vertebrate limb development. *Curr Opin Genet Dev* 2007;**17**:359-66.
41. Salsi V, Vigano MA, Cocchiarella F, Mantovani R, Zappavigna V. Hoxd13 binds in vivo and regulates the expression of genes acting in key pathways for early limb and skeletal patterning. *Dev Biol* 2008;**317**:497-507.

Literatur

42. Nelson CE, Morgan BA, Burke AC, *et al.* Analysis of Hox gene expression in the chick limb bud. *Development* 1996;**122**:1449-66.
43. Yokouchi Y, Sasaki H, Kuroiwa A. Homeobox gene expression correlated with the bifurcation process of limb cartilage development. *Nature* 1991;**353**:443-5.
44. Zakany J, Duboule D. Hox genes in digit development and evolution. *Cell Tissue Res* 1999;**296**:19-25.
45. Mundlos S. The brachydactylies: a molecular disease family. *Clin Genet* 2009;**76**:123-36.
46. Goodman FR, Mundlos S, Muragaki Y, *et al.* Synpolydactyly phenotypes correlate with size of expansions in HOXD13 polyalanine tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;**94**:7458-63.
47. Lehmann K, Seemann P, Silan F, *et al.* A new subtype of brachydactyly type B caused by point mutations in the bone morphogenetic protein antagonist NOGGIN. *Am J Hum Genet* 2007;**81**:388-96.
48. Seemann P, Schwappacher R, Kjaer KW, *et al.* Activating and deactivating mutations in the receptor interaction site of GDF5 cause symphalangism or brachydactyly type A2. *J Clin Invest* 2005;**115**:2373-81.
49. Williams TM, Williams ME, Heaton JH, Gelehrter TD, Innis JW. Group 13 HOX proteins interact with the MH2 domain of R-Smads and modulate Smad transcriptional activation functions independent of HOX DNA-binding capability. *Nucleic Acids Res* 2005;**33**:4475-84.
50. Li X, Nie S, Chang C, Qiu T, Cao X. Smads oppose Hox transcriptional activities. *Exp Cell Res* 2006;**312**:854-64.
51. Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev* 2005;**19**:2783-810.
52. Mann RS, Lelli KM, Joshi R. Hox specificity unique roles for cofactors and collaborators. *Curr Top Dev Biol* 2009;**88**:63-101.
53. Korchynskiy O, ten Dijke P. Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem* 2002;**277**:4883-91.
54. Fromental-Ramain C, Warot X, Messadecq N, LeMeur M, Dolle P, Chambon P. Hoxa-13 and Hoxd-13 play a crucial role in the patterning of the limb autopod. *Development* 1996;**122**:2997-3011.
55. Kmita M, Tarchini B, Zakany J, Logan M, Tabin CJ, Duboule D. Early developmental arrest of mammalian limbs lacking HoxA/HoxD gene function. *Nature* 2005;**435**:1113-6.
56. Fromental-Ramain C, Warot X, Lakkaraju S, *et al.* Specific and redundant functions of the paralogous Hoxa-9 and Hoxd-9 genes in forelimb and axial skeleton patterning. *Development* 1996;**122**:461-72.
57. Davis AP, Witte DP, Hsieh-Li HM, Potter SS, Capecchi MR. Absence of radius and ulna in mice lacking hoxa-11 and hoxd-11. *Nature* 1995;**375**:791-5.
58. Wellik DM, Capecchi MR. Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. *Science* 2003;**301**:363-7.
59. Dolle P, Dierich A, LeMeur M, *et al.* Disruption of the Hoxd-13 gene induces localized heterochrony leading to mice with neotenic limbs. *Cell* 1993;**75**:431-41.
60. Davis AP, Capecchi MR. A mutational analysis of the 5' HoxD genes: dissection of genetic interactions during limb development in the mouse. *Development* 1996;**122**:1175-85.
61. Davis AP, Capecchi MR. Axial homeosis and appendicular skeleton defects in mice with a targeted disruption of hoxd-11. *Development* 1994;**120**:2187-98.
62. Zakany J, Fromental-Ramain C, Warot X, Duboule D. Regulation of number and size of digits by posterior Hox genes: a dose-dependent mechanism with potential evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;**94**:13695-700.

Literatur

63. Malik S, Grzeschik KH. Synpolydactyly: clinical and molecular advances. *Clin Genet* 2008;**73**:113-20.
64. Muragaki Y, Mundlos S, Upton J, Olsen BR. Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in HOXD13. *Science* 1996;**272**:548-51.
65. Kjaer KW, Hedeboe J, Bugge M, *et al.* HOXD13 polyalanine tract expansion in classical synpolydactyly type Vordingborg. *Am J Med Genet* 2002;**110**:116-21.
66. Akarsu AN, Stoilov I, Yilmaz E, Sayli BS, Sarfarazi M. Genomic structure of HOXD13 gene: a nine polyalanine duplication causes synpolydactyly in two unrelated families. *Hum Mol Genet* 1996;**5**:945-52.
67. Akarsu AN, Akhan O, Sayli BS, Sayli U, Baskaya G, Sarfarazi M. A large Turkish kindred with syndactyly type II (synpolydactyly). 2. Homozygous phenotype? *J Med Genet* 1995;**32**:435-41.
68. Johnson KR, Sweet HO, Donahue LR, Ward-Bailey P, Bronson RT, Davisson MT. A new spontaneous mouse mutation of Hoxd13 with a polyalanine expansion and phenotype similar to human synpolydactyly. *Hum Mol Genet* 1998;**7**:1033-8.
69. Innis JW. Hand-Foot-Genital Syndrome. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, eds. *GeneReviews*. Seattle (WA); 1993.
70. Brown LY, Brown SA. Alanine tracts: the expanding story of human illness and trinucleotide repeats. *Trends Genet* 2004;**20**:51-8.
71. Innis JW, Mortlock D, Chen Z, *et al.* Polyalanine expansion in HOXA13: three new affected families and the molecular consequences in a mouse model. *Hum Mol Genet* 2004;**13**:2841-51.
72. Strachan T, Read AP. In: *Hum Mol Genet*. 2nd ed. New York; 1999.
73. Albrecht AN, Kornak U, Boddlich A, *et al.* A molecular pathogenesis for transcription factor associated poly-alanine tract expansions. *Hum Mol Genet* 2004;**13**:2351-9.
74. Bruneau S, Johnson KR, Yamamoto M, Kuroiwa A, Duboule D. The mouse Hoxd13(spdh) mutation, a polyalanine expansion similar to human type II synpolydactyly (SPD), disrupts the function but not the expression of other Hoxd genes. *Dev Biol* 2001;**237**:345-53.
75. Albrecht A, Mundlos S. The other trinucleotide repeat: polyalanine expansion disorders. *Curr Opin Genet Dev* 2005;**15**:285-93.
76. Zakany J, Duboule D. Synpolydactyly in mice with a targeted deficiency in the HoxD complex. *Nature* 1996;**384**:69-71.
77. Kovtun IV, McMurray CT. Features of trinucleotide repeat instability *in vivo*. *Cell Res* 2008;**18**:198-213.
78. Richard GF, Kerrest A, Dujon B. Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008;**72**:686-727.
79. Karlin S, Brocchieri L, Bergman A, Mrazek J, Gentles AJ. Amino acid runs in eukaryotic proteomes and disease associations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**:333-8.
80. La Spada AR, Taylor JP. Repeat expansion disease: progress and puzzles in disease pathogenesis. *Nat Rev Genet* 2010;**11**:247-58.
81. Gatchel JR, Zoghbi HY. Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nat Rev Genet* 2005;**6**:743-55.
82. Cummings CJ, Zoghbi HY. Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000;**1**:281-328.
83. Mirkin SM. Expandable DNA repeats and human disease. *Nature* 2007;**447**:932-40.
84. Warren ST. Polyalanine expansion in synpolydactyly might result from unequal crossing-over of HOXD13. *Science* 1997;**275**:408-9.

Literatur

85. Cocquempot O, Brault V, Babinet C, Herault Y. Fork stalling and template switching as a mechanism for polyalanine tract expansion affecting the DYC mutant of HOXD13, a new murine model of synpolydactyly. *Genetics* 2009;**183**:23-30.
86. Amiel J, Trochet D, Clement-Ziza M, Munnich A, Lyonnet S. Polyalanine expansions in human. *Hum Mol Genet* 2004;**13 Spec No 2**:R235-43.
87. Zou H, Wieser R, Massague J, Niswander L. Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev* 1997;**11**:2191-203.
88. Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *Embo J* 1998;**17**:3091-100.
89. Zawel L, Dai JL, Buckhaults P, *et al.* Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell* 1998;**1**:611-7.
90. Zhao JJ, Lazzarini RA, Pick L. Functional dissection of the mouse Hox-a5 gene. *Embo J* 1996;**15**:1313-22.
91. Utsch B, McCabe CD, Galbraith K, *et al.* Molecular characterization of HOXA13 polyalanine expansion proteins in hand-foot-genital syndrome. *Am J Med Genet A* 2007;**143A**:3161-8.
92. Lavoie H, Debeane F, Trinh QD, *et al.* Polymorphism, shared functions and convergent evolution of genes with sequences coding for polyalanine domains. *Hum Mol Genet* 2003;**12**:2967-79.
93. Messaed C, Rouleau GA. Molecular mechanisms underlying polyalanine diseases. *Neurobiol Dis* 2009;**34**:397-405.
94. Oma Y, Kino Y, Toriumi K, Sasagawa N, Ishiura S. Interactions between homopolymeric amino acids (HPAAs). *Protein Sci* 2007;**16**:2195-204.
95. Karlin S, Brocchieri L, Bergman A, Mrazek J, Gentles AJ. Amino acid runs in eukaryotic proteomes and disease associations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**:333-8.
96. Hanna-Rose W, Hansen U. Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors. *Trends Genet* 1996;**12**:229-34.
97. Galant R, Carroll SB. Evolution of a transcriptional repression domain in an insect Hox protein. *Nature* 2002;**415**:910-3.
98. Moumne L, Dipietromaria A, Batista F, *et al.* Differential aggregation and functional impairment induced by polyalanine expansions in FOXL2, a transcription factor involved in cranio-facial and ovarian development. *Hum Mol Genet* 2008;**17**:1010-9.
99. Trochet D, Hong SJ, Lim JK, *et al.* Molecular consequences of PHOX2B missense, frameshift and alanine expansion mutations leading to autonomic dysfunction. *Hum Mol Genet* 2005;**14**:3697-708.
100. Bachetti T, Matera I, Borghini S, Di Duca M, Ravazzolo R, Ceccherini I. Distinct pathogenetic mechanisms for PHOX2B associated polyalanine expansions and frameshift mutations in congenital central hypoventilation syndrome. *Hum Mol Genet* 2005;**14**:1815-24.
101. McKenzie O, Ponte I, Mangelsdorf M, *et al.* Aristaless-related homeobox gene, the gene responsible for West syndrome and related disorders, is a Groucho/transducin-like enhancer of split dependent transcriptional repressor. *Neuroscience* 2007;**146**:236-47.
102. Woods KS, Cundall M, Turton J, *et al.* Over- and underdosage of SOX3 is associated with infundibular hypoplasia and hypopituitarism. *Am J Hum Genet* 2005;**76**:833-49.
103. Rauch R, Hofbeck M, Zweier C, *et al.* Comprehensive genotype-phenotype analysis in 230 patients with tetralogy of Fallot. *J Med Genet* 2010;**47**:321-31.
104. Brown L, Paraso M, Arkell R, Brown S. In vitro analysis of partial loss-of-function ZIC2 mutations in holoprosencephaly: alanine tract expansion modulates DNA binding and transactivation. *Hum Mol Genet* 2005;**14**:411-20.

Literatur

105. Berger Z, Davies JE, Luo S, *et al.* Deleterious and protective properties of an aggregate-prone protein with a polyalanine expansion. *Hum Mol Genet* 2006;**15**:453-65.
106. Wang Z, Yuan L, Rossiter SJ, *et al.* Adaptive evolution of 5'HoxD genes in the origin and diversification of the cetacean flipper. *Mol Biol Evol* 2009;**26**:613-22.
107. Anan K, Yoshida N, Kataoka Y, *et al.* Morphological change caused by loss of the taxon-specific polyalanine tract in Hoxd-13. *Mol Biol Evol* 2007;**24**:281-7.
108. Fondon JW, 3rd, Garner HR. Molecular origins of rapid and continuous morphological evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**:18058-63.
109. Mojsin M, Kovacevic-Grujicic N, Krstic A, Popovic J, Milivojevic M, Stevanovic M. Comparative analysis of SOX3 protein orthologs: Expansion of homopolymeric amino acid tracts during vertebrate evolution. *Biochem Genet* 2010;**48**:612-23.
110. Shoubridge C, Cloosterman D, Parkinson-Lawrence E, Brooks D, Gez J. Molecular pathology of expanded polyalanine tract mutations in the Aristaless-related homeobox gene. *Genomics* 2007;**90**:59-71.
111. Webb JL, Ravikumar B, Rubinsztein DC. Microtubule disruption inhibits autophagosome-lysosome fusion: implications for studying the roles of aggresomes in polyglutamine diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;**36**:2541-50.
112. Caburet S, Demarez A, Moumne L, Fellous M, De Baere E, Veitia RA. A recurrent polyalanine expansion in the transcription factor FOXL2 induces extensive nuclear and cytoplasmic protein aggregation. *J Med Genet* 2004;**41**:932-6.
113. Roth JJ, Breitenbach M, Wagner GP. Repressor domain and nuclear localization signal of the murine Hoxa-11 protein are located in the homeodomain: no evidence for role of poly alanine stretches in transcriptional repression. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2005;**304**:468-75.
114. Zappavigna V, Sartori D, Mavilio F. Specificity of HOX protein function depends on DNA-protein and protein-protein interactions, both mediated by the homeo domain. *Genes Dev* 1994;**8**:732-44.
115. Tyedmers J, Mogk A, Bukau B. Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;**11**:777-88.
116. Aguzzi A, Rajendran L. The transcellular spread of cytosolic amyloids, prions, and prionoids. *Neuron* 2009;**64**:783-90.
117. Weis K. The nuclear pore complex: oily spaghetti or gummy bear? *Cell* 2007;**130**:405-7.
118. Mundlos S, Otto F, Mundlos C, *et al.* Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 1997;**89**:773-9.
119. Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 2004;**10** **Suppl**:S10-7.
120. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 2009;**16**:574-81.
121. Simmons AH, Michal CA, Jelinski LW. Molecular orientation and two-component nature of the crystalline fraction of spider dragline silk. *Science* 1996;**271**:84-7.
122. Rabotyagova OS, Cebe P, Kaplan DL. Role of polyalanine domains in beta-sheet formation in spider silk block copolymers. *Macromol Biosci* 2010;**10**:49-59.
123. Scheuermann T, Schulz B, Blume A, Wahle E, Rudolph R, Schwarz E. Trinucleotide expansions leading to an extended poly-L-alanine segment in the poly (A) binding protein PABPN1 cause fibril formation. *Protein Sci* 2003;**12**:2685-92.
124. Blondelle SE, Forood B, Houghten RA, Perez-Paya E. Polyalanine-based peptides as models for self-associated beta-pleated-sheet complexes. *Biochemistry* 1997;**36**:8393-400.
125. Shinchuk LM, Sharma D, Blondelle SE, Reixach N, Inouye H, Kirschner DA. Poly-(L-alanine) expansions form core beta-sheets that nucleate amyloid assembly. *Proteins* 2005;**61**:579-89.

Literatur

126. Nguyen HD, Hall CK. Molecular dynamics simulations of spontaneous fibril formation by random-coil peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**:16180-5.
127. Krebs MR, Morozova-Roche LA, Daniel K, Robinson CV, Dobson CM. Observation of sequence specificity in the seeding of protein amyloid fibrils. *Protein Sci* 2004;**13**:1933-8.
128. Uchihara T, Fujigasaki H, Koyano S, Nakamura A, Yagishita S, Iwabuchi K. Non-expanded polyglutamine proteins in intranuclear inclusions of hereditary ataxias--triple-labeling immunofluorescence study. *Acta Neuropathol* 2001;**102**:149-52.
129. Wright CF, Teichmann SA, Clarke J, Dobson CM. The importance of sequence diversity in the aggregation and evolution of proteins. *Nature* 2005;**438**:878-81.
130. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 2002;**295**:1852-8.
131. Sackewitz M, von Einem S, Hause G, Wunderlich M, Schmid FX, Schwarz E. A folded and functional protein domain in an amyloid-like fibril. *Protein Sci* 2008;**17**:1044-54.
132. Kubota H, Kitamura A, Nagata K. Analyzing the aggregation of polyglutamine-expansion proteins and its modulation by molecular chaperones. *Methods* 2011;**53**:267-74.
133. Gidalevitz T, Ben-Zvi A, Ho KH, Brignull HR, Morimoto RI. Progressive disruption of cellular protein folding in models of polyglutamine diseases. *Science* 2006;**311**:1471-4.
134. Messaed C, Dion PA, Abu-Baker A, *et al.* Soluble expanded PABPN1 promotes cell death in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurobiol Dis* 2007;**26**:546-57.
135. Caronia G, Goodman FR, McKeown CM, Scambler PJ, Zappavigna V. An I47L substitution in the HOXD13 homeodomain causes a novel human limb malformation by producing a selective loss of function. *Development* 2003;**130**:1701-12.
136. Salsi V, Zappavigna V. Hoxd13 and Hoxa13 directly control the expression of the EphA7 Ephrin tyrosine kinase receptor in developing limbs. *J Biol Chem* 2006;**281**:1992-9.
137. Zhou B, Chen L, Wu X, Wang J, Yin Y, Zhu G. MH1 domain of SMAD4 binds N-terminal residues of the homeodomain of Hoxc9. *Biochim Biophys Acta* 2008;**1784**:747-52.
138. Walsh CM, Carroll SB. Collaboration between Smads and a Hox protein in target gene repression. *Development* 2007;**134**:3585-92.
139. Shi X, Bai S, Li L, Cao X. Hoxa-9 represses transforming growth factor-beta-induced osteopontin gene transcription. *J Biol Chem* 2001;**276**:850-5.
140. Song B, Estrada KD, Lyons KM. Smad signaling in skeletal development and regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;**20**:379-88.
141. Alliston T, Choy L, Ducy P, Karsenty G, Derynck R. TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *Embo J* 2001;**20**:2254-72.
142. Hanai J, Chen LF, Kanno T, *et al.* Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads. Synergistic induction of the immunoglobulin germline Calpha promoter. *J Biol Chem* 1999;**274**:31577-82.
143. Drissi MH, Li X, Sheu TJ, *et al.* Runx2/Cbfa1 stimulation by retinoic acid is potentiated by BMP2 signaling through interaction with Smad1 on the collagen X promoter in chondrocytes. *J Cell Biochem* 2003;**90**:1287-98.
144. Suzuki M, Ueno N, Kuroiwa A. Hox proteins functionally cooperate with the GC box-binding protein system through distinct domains. *J Biol Chem* 2003;**278**:30148-56.
145. Sittler A, Lurz R, Lueder G, *et al.* Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 2001;**10**:1307-15.
146. Bachetti T, Bocca P, Borghini S, *et al.* Geldanamycin promotes nuclear localisation and clearance of PHOX2B misfolded proteins containing polyalanine expansions. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;**39**:327-39.

Literatur

147. Wang Q, Mosser DD, Bag J. Induction of HSP70 expression and recruitment of HSC70 and HSP70 in the nucleus reduce aggregation of a polyalanine expansion mutant of PABPN1 in HeLa cells. *Hum Mol Genet* 2005;**14**:3673-84.
148. Abu-Baker A, Messaed C, Laganriere J, Gaspar C, Brais B, Rouleau GA. Involvement of the ubiquitin-proteasome pathway and molecular chaperones in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2003;**12**:2609-23.
149. Davies JE, Sarkar S, Rubinsztein DC. Trehalose reduces aggregate formation and delays pathology in a transgenic mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2006;**15**:23-31.
150. Nasrallah IM, Minarcik JC, Golden JA. A polyalanine tract expansion in Arx forms intranuclear inclusions and results in increased cell death. *J Cell Biol* 2004;**167**:411-6.
151. Bao YP, Sarkar S, Uyama E, Rubinsztein DC. Congo red, doxycycline, and HSP70 overexpression reduce aggregate formation and cell death in cell models of oculopharyngeal muscular dystrophy. *J Med Genet* 2004;**41**:47-51.
152. Davies JE, Rose C, Sarkar S, Rubinsztein DC. Cystamine suppresses polyalanine toxicity in a mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Sci Transl Med* 2010;**2**:34ra40.
153. Davies JE, Wang L, Garcia-Oroz L, *et al.* Doxycycline attenuates and delays toxicity of the oculopharyngeal muscular dystrophy mutation in transgenic mice. *Nat Med* 2005;**11**:672-7.
154. Berger Z, Ttofi EK, Michel CH, *et al.* Lithium rescues toxicity of aggregate-prone proteins in *Drosophila* by perturbing Wnt pathway. *Hum Mol Genet* 2005;**14**:3003-11.
155. Verheesen P, de Kluijver A, van Koningsbruggen S, *et al.* Prevention of oculopharyngeal muscular dystrophy-associated aggregation of nuclear polyA-binding protein with a single-domain intracellular antibody. *Hum Mol Genet* 2006;**15**:105-11.
156. Berger Z, Ravikumar B, Menzies FM, *et al.* Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Hum Mol Genet* 2006;**15**:433-42.
157. Shao J, Diamond MI. Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Hum Mol Genet* 2007;**16 Spec No. 2**:R115-23.
158. Wang H, Monteiro MJ. Ubiquilin overexpression reduces GFP-polyalanine-induced protein aggregates and toxicity. *Exp Cell Res* 2007;**313**:2810-20.
159. Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* 2009;**10**:32-42.
160. Catoire H, Pasco MY, Abu-Baker A, *et al.* Sirtuin inhibition protects from the polyalanine muscular dystrophy protein PABPN1. *Hum Mol Genet* 2008;**17**:2108-17.

9 Verzeichnisse

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Skelettpräparation einer Vordergliedmaße der Maus bei der Geburt	1
Abbildung 2: Musterbildung in der embryonalen Extremitätenentwicklung bei Landwirbeltieren	4
Abbildung 3: Chondrale Osteogenese der Röhrenknochen.....	6
Abbildung 4: Hox-Expression und Anordnung der Hox-Gene	9
Abbildung 5: Dynamische Phasen der Hox-Expression in der Extremitätenentwicklung	11
Abbildung 6: Ähnliche Phänotypen durch Mutationen in HOXD13..... und der BMP-Signalkaskade	12
Abbildung 7: Auswirkungen von Mutationen des humanen HOXD13 auf Proteinebene.....	14
Abbildung 8: HOXD13-assoziierte Synpolydaktylie 1	15
Abbildung 9: Ähnliche Synpolydaktylie-Phänotypen verschiedener Hox-Mausmutanten.....	17
Abbildung 10: HOXD13+Ala aggregiert im Zytoplasma	50
Abbildung 11: Aggregate aus HOXD13+Ala sequestrieren HOXA13-wt	51
Abbildung 12: Aggregate aus HOXD13+Ala sequestrieren RUNX2-wt.....	52
Abbildung 13: HOXD13+Ala-Aggregate kolokalisieren nicht mit HOXD11-wt..... und HOXD12-wt.....	54
Abbildung 14: HOXA13-wt fördert die Aggregation von HOXD13+Ala.....	56
Abbildung 15: Aggregate aus HOXD13+Ala kolokalisieren nicht mit HOXD13-2Ala.....	58
Abbildung 16: HOXD13- Δ hd aggregiert im Zytoplasma und kolokalisiert nicht mit HOXD13+Ala.....	60
Abbildung 17: Die Expansion des HOXD13-Polyalanintrakts ist erforderlich für die Interaktion mit HOXA13-wt.....	62
Abbildung 18: HOXA13 ist im Entwicklungsstadium 13,5 im Perichondrium der Metakarpalknochen von spd ^h -Mäusen zytoplasmatisch lokalisiert	64
Abbildung 19: HOXA13 ist im Entwicklungsstadium 14,5 im Perichondrium der Metakarpalknochen von spd ^h -Mäusen zytoplasmatisch lokalisiert	65
Abbildung 20: HOXD13 und HOXA13 sind in den Pfoten von spd ^h -Mäusen reduziert.....	67
Abbildung 21: HOXA13+Ala und RUNX2+Ala aggregieren im Zytoplasma und sequestrieren HOXD13-wt	69
Abbildung 22: HOXD13-wt inhibiert den SMAD-Signalweg stärker als HOXD13+Ala.....	72
Abbildung 23: Alignment einiger Polyalanin- und HOX-Transkriptionsfaktoren	78
Abbildung 24: Modell der Regulation der SMAD-vermittelten Transkription durch HOXD13+Ala.....	85
Abbildung 25: Modell der molekularen Pathogenese der SPD durch HOXD13+Ala.....	88

9.2 Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotikum
AER	apikale ektodermale Randleiste
AK	Antikörper
Ala	Alanin
a-p	anterior-posterior
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BCA	„bicinchoninic acid“
BD	Brachydaktylie
bidest	zweifach destilliert
BMP, BMPR	„bone morphogenetic protein“, BMP-Rezeptor
BRE	BMP-responsives Element
BSA	bovines Serumalbumin
ca	„constitutively active“
cm	Zentimeter
C-terminal	carboxyterminal
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	„Dulbecco's modified eagle medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„deoxyribonucleic acid“
dNTP-Mix	Desoxynukleotidtriphosphat-Mix
DPBS	„Dulbecco's phosphate buffered saline“
d-v	dorsal-ventral
E	Entwicklungsstadium
ECL	„enhanced chemiluminescence“
EDTA	„ethylenediaminetetraacetic acid“
ELISA	„enzyme-linked immuno sorbent assay“
EN1	„engrailed 1“
EtOH	Ethanol
FCS	„fetal calf serum“
fs	„frameshift“
FGF	„fibroblast growth factor“
FRET	Fluoreszenzresonanzenergietransfer
g	Gramm, Erdschwerebeschleunigung
GFP	„green fluorescent protein“
h	Stunde
HD	Homöodomäne
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HSP	Hitzeschockprotein
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IP	Immunopräzipitation
IZC	Immunzytochemie
kDa	Kilodalton
Ko-IP	Koimmunopräzipitation
l	Liter
LB	„lysogeny broth“
luc	Luciferase
LV	Leervektor
M	molare Konzentration

Verzeichnisse

MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MetOH	Methanol
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolare Konzentration
MPI	Max-Planck-Institut
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ng	Nanogramm
NGS	“normal goat serum”
nm	Nanometer
N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
OMIM	“Online Mendelian Inheritance in Man“
p. a.	pro analysi
PABPN1	“Poly(A) binding protein, nuclear 1”
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	“polymerase chain reaction”
p-d	proximal-distal
PEG	Polyethylenglykol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenii
pM	picomolare Konzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RL	<i>Renilla</i> -Luciferase
rpm	“revolutions per minute”
RT	Raumtemperatur
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung
SBE	SMAD-bindendes Element
SDS	“sodium dodecyl sulphate”
sec	Sekunde
SHH	„sonic hedgehog“
SPD	Synpolydaktylie
<i>spdh</i>	„ <i>synpolydactyly homolog</i> “
SV40	„ <i>Simian virus 40</i> “
TBS/T	„tris buffered saline“/mit Tween 20
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TK	Thymidinkinase
TSS	„transformation and storage solution”
UC	“Ultraclear”
üN, ÜNK	über Nacht, Über-Nacht-Kultur
UV	ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
w/v	“weight/volume”
YFP	“yellow fluorescent protein“
ZPA	Zone der polarisierenden Aktivität

10 Anhang

10.1 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren, mich unterstützt und begleitet haben.

Vor allem meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Stefan Mundlos danke ich sehr, für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik anzufertigen sowie für die äußerst wertvollen Ratschläge und Anregungen.

Besonders herzlicher Dank gilt Dr. rer. nat. Pia Kuss für den steten ideellen und praktischen Beistand. Die großartige Betreuung, permanente Ansprechbarkeit und Diskussionsbereitschaft trugen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Auch Dr. med. Pablo Villavicencio-Lorini gebührt ganz besonderer Dank für vielerlei praktische Hilfestellungen und fruchtbare Diskussionen.

Allerbester Dank geht an Prof. Dr. rer. nat. Petra Seemann für die Unterstützung bei der Untersuchung der BMP-Signalwegsinteraktion.

Mareen Schmidt von Kegler und Maria Walther möchte ich für ihre praktische Hilfe dabei meinen herzlichen Dank aussprechen.

Dr. rer. nat. Jochen Hecht danke ich sehr für seine ständige Hilfsbereitschaft und viele nützliche methodische Tipps.

Für die Hilfe bei den konfokalmikroskopischen Analysen danke ich Dr. rer. nat. Rudi Lurz.

Der gesamten Arbeitsgruppe „Development and Disease“ gebührt ein wunderbares Dankeschön für die überaus kollegiale und freundliche Arbeitsatmosphäre und für Rat und Tat bei der Erstellung dieser Arbeit.

Insbesondere möchte ich auf diesem offiziellen Weg meinen Eltern, meinem Bruder und meinem Mann danken, die mich immer in allen Belangen unterstützt und an meinen Erfolg geglaubt haben. Meiner Tochter danke ich für ihre Geduld, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

10.2 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10.3 Veröffentlichung

Villavicencio-Lorini, P., Kuss, P., Friedrich, J., Haupt, J., Farooq, M., Türkmen, S., Duboule, D., Hecht, J., Mundlos, S. Homeobox genes d11-d13 and a13 control mouse autopod cortical bone and joint formation. *J Clin Invest* **120**, 1994-2004 (2010).

10.4 Selbständigkeitserklärung

„Ich, Julia Friedrich, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Molekulare Pathogenese der Skelettfehlbildung Synpolydaktylie durch Polyalanin-Expansionen in *Hoxd13*“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“