

### 3.) Ergebnisse

#### 3.1) Phänotyp der *spd**h*-Mausmutante

Die synpolydactyly homolog (*spd**h*) Mausmutante stellt eine ideale Möglichkeit dar, Phänotyp und Pathogenese der Synpolydaktylie am Tiermodell zu untersuchen. Die mutante Maus ist homozygot lebensfähig und zeigt einen normalen Körperwuchs. Von der Mutation sind vor allem die Pfoten betroffen. Die Finger und Zehen der homozygoten Mutante zeigen starke Brachydaktylie (eine Verkürzung der Phalangen) und Syndaktylie (Fusionen zwischen Finger- bzw. Zehelementen). Zusätzlich zeigen sie auch noch Polydaktylie, also zusätzliche Finger oder Zehen. Dabei sind die Vorderpfoten stärker betroffen als die Hinterpfoten und es existiert eine hohe Variabilität in der Ausprägung des Phänotyps. Der Phänotyp wurde anhand von Skelettpräparationen von verschiedenen Stadien betroffener Mäuse untersucht (Abb.9).



**Abbildung 9: Skelettphänotyp der *spd**h*-Mutante im Vergleich zum Wt anhand von Skelettpräparationen**

Gezeigt sind Skelettpräparationen von Vorderpfoten von wt (oben) und mutanten (unten) Mäusen verschiedener Stadien (Embryonalstadium 15.5 und 18.5, Neugeborenen (NG) und 3 Wochen). Knorpel ist mit Alcian blue, Knochen mit Alizarin Red gefärbt.

Die Mutante weist zusätzliche Finger oder Fingerelemente auf. Der Wt zeigt rot angefärbten Knochen ab E18.5, in der Mutante ist die Entwicklung von Knochen stark verzögert. Zudem ist die Gelenkentwicklung in der Mutante gestört, deutlich in der Vergrößerung der Gelenke (Pfeil) im Alter von 3 Wochen zu erkennen.

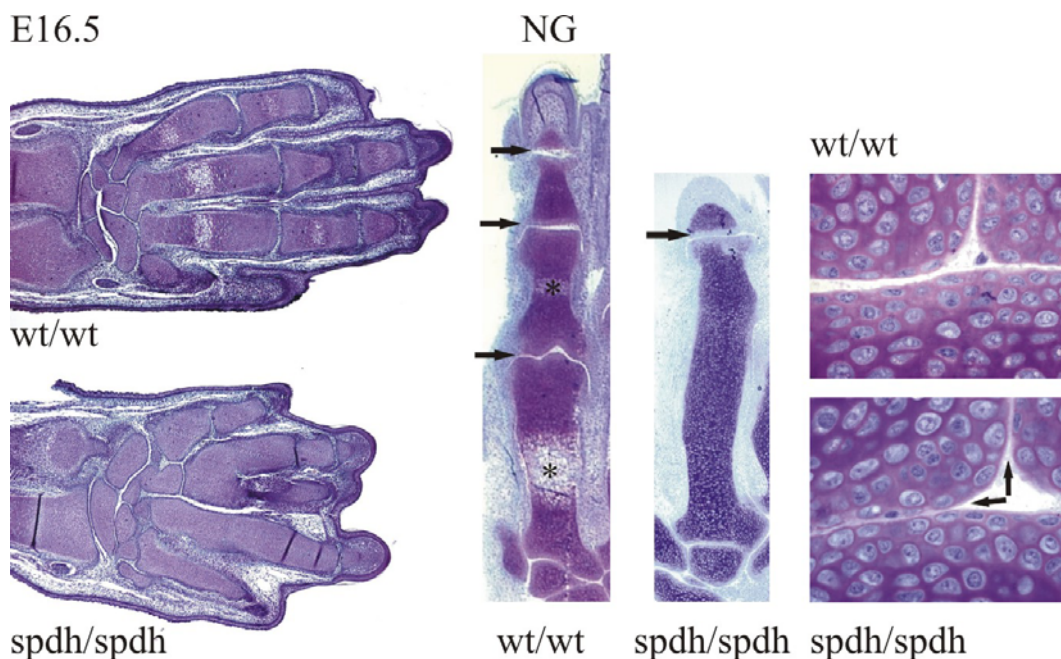
Anhand der Skelettpräparationen erkennt man deutlich die Verkürzung der Phalangen in den betroffenen Mäusen im Vergleich zum Wt. Die Polydaktylie zeigt dabei eine große

Variabilität. In den meisten Fällen existiert ein kompletter zusätzlicher Finger inklusive Krallen, und zudem mehrere Fingerelemente zwischen den Fingern. Der Finger I ist in vielen Fällen länglich gespalten mit Fusionen zwischen den Segmenten.

Zusätzlich ist auch die Entstehung von Knochen in den Metakarpalen und Phalangen in der mutanten Maus gestört. Selbst in neugeborenen Mäusen fehlen Verknöcherungen komplett, mit Ausnahme der distalen Phalangen, in denen sich Knochen gebildet hat. Die Entstehung von Knochen beginnt in den Metakarpalen und proximalen Phalangen der Mutanten erst nach der Geburt, wobei aber das Muster gestört ist und es zu Deformationen des Knochens kommt.

Deutlich ist auch zu erkennen, dass in der mutanten Maus die Gelenkentwicklung gestört ist. In den meisten Fällen fehlen die Gelenke zwischen den Metakarpalen und den Phalangen 1 sowie zwischen den Phalangen 1 und 2 komplett. Das Gelenk zwischen den 2. und den distalen Phalangen entwickelt sich zum Teil.

Zur genaueren Untersuchung der Gelenke wurden Vorderpfoten von wt und mutanten Mäusen in Plastik eingebettet und anschließend geschnitten (Abb.10).



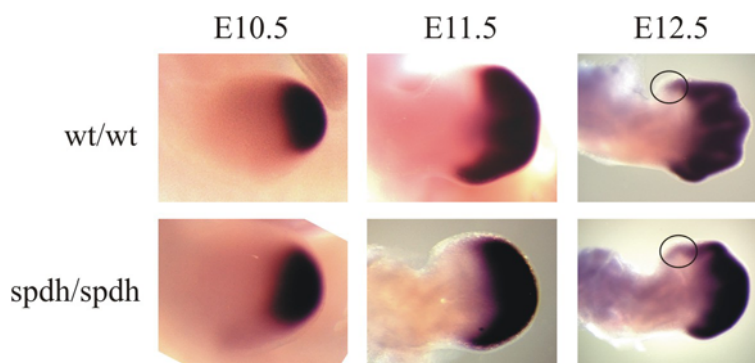
**Abbildung 10: Phänotyp der spdH-Mutante im Vergleich zum Wt anhand von Plastikschnitten**  
Gezeigt sind Plastikschnitte der Vorderpfoten von wt und mutanten Mäusen Stadium E16.5 und NG. Die Schnitte sind mit Toluidinblau gefärbt.

Im Wt entwickelt sich hypertropher Knorpel (\*) und Gelenke (Pfeile). In der Mutante ist die Knochen- und Gelenkentwicklung gestört, mit Ausnahme des distalen Gelenks (Pfeil). Rechts eine Vergrößerung der Gelenkzwischenräume der Karpalknochen, die in der Mutante viel enger oder fusioniert sind (Pfeile).

Auch in den Plastikschnitten erkennt man deutlich die fehlenden Gelenke in den Fingern und die verzögerte Knorpeldifferenzierung. In der Vergrößerung der Finger neugeborener Mäuse sieht man, dass sich nur das distale Gelenk der Phalangen in der Mutante bildet (Pfeil in der Mutante). Die Bereiche, in dem sich die Chondrozyten bereits zu hypertrophem Knorpel differenziert haben, ist im Wt mit einem \* gekennzeichnet und fehlen in der Mutante komplett. Die Vergrößerung der Gelenke zwischen den Karpalen zeigt, dass in der Mutante der Raum in den Gelenken viel enger ist und es auch hier zum Teil zu Fusionen kommt.

### 3.2) Expression von *Hoxd13* in der Maus

Um die Expression von *Hoxd13* in der mutanten Maus zu verschiedenen Entwicklungsstadien zu untersuchen, wurden Embryonen von wt und mutanten Mäusen gesammelt. Für die frühen Stadien E10.5, E11.5 und E12.5 wurden Whole mount in situ Hybridisierungen (WM-ISH) durchgeführt (Abb.11).



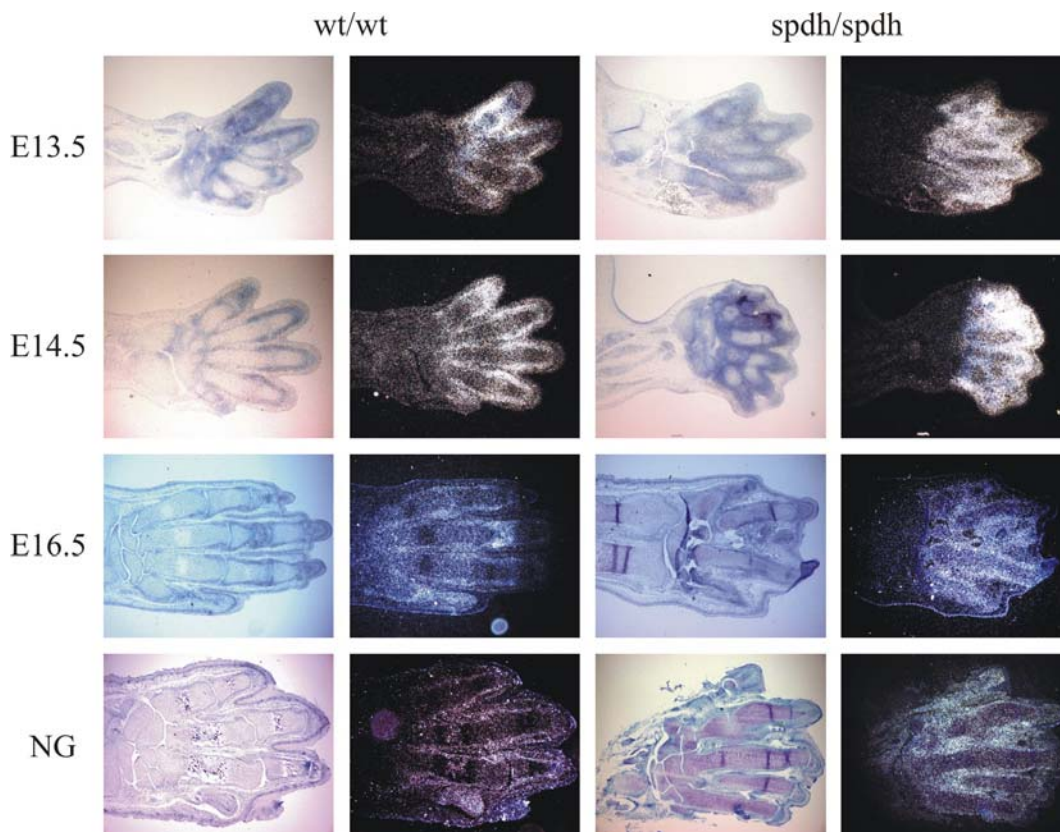
**Abbildung 11: Expression von *Hoxd13* in frühen Stadien von Wt und Mutante durch Whole-Mount in situ Hybridisierung**

Man sieht eine starke Expression von *Hoxd13* im distalen Bereich der Vorderextremität (E10.5). In den späteren Stadien ist *Hoxd13* im Bereich der sich entwickelnden Finger stark exprimiert, mit Ausnahme des 1. Fingers (Kreis). Der Bereich der Expression ist in der Mutante etwas verkürzt im Vergleich zum Wt, die Stärke der Expression ist aber identisch.

Die Mutante zeigt ein identisches Muster der Expression von *Hoxd13* im Vergleich zum Wt, allerdings ist der Bereich der Expression insgesamt in der Mutante kleiner. Das Gen ist zu diesen frühen Stadien im gesamten Autopod stark exprimiert, also in einem Bereich, in dem sich später die Finger entwickeln. Ab E12.5 sieht man einen Rückgang der *Hoxd13* Expression in den Kondensationen der entstehenden Finger.

Zur Untersuchung der Expression von *Hoxd13* zu späteren Stadien wurde auf Schnitten der Stadien E13.5, E14.5, E16.5 und Neugeborenen radioaktive in situ Hybridisierungen (rISH) durchgeführt (Abb.12).

Auch in den späteren Stadien ist die Expression von *Hoxd13* in der Mutante identisch zum Wt. Bei E13.5 zeigt sich eine beginnende Konzentration der Expression im Perichondrium, im Bereich des Knorpels wird die Expression schwächer. Dies wird in den Stadien E14.5 und E16.5 noch deutlicher, in den hypertrophen Chondrozyten dieser Stadien wird *Hoxd13* überhaupt nicht mehr exprimiert. Dieses Expressionsmuster ist auch noch bei den Neugeborenen zu finden.

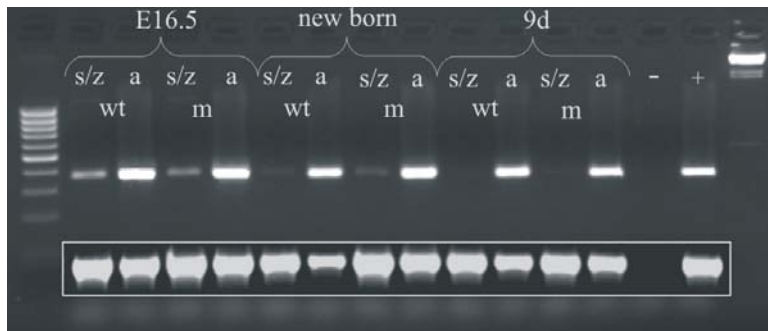


**Abbildung 12: Expression von *Hoxd13* in späten Entwicklungsstadien von Wt und Mutante durch  $^{33}\text{P}$  in situ Hybridisierung auf Paraffinschnitten**

In den späten Stadien ist *Hoxd13* primär im Perichondrium und nur noch schwach in den Knorpelanlagen exprimiert. Auch nach der Geburt ist diese Expression noch vorhanden. Man sieht keine Unterschiede zwischen Wt und Mutante.

Um die Expression von *Hoxd13* in späteren Stadien weiter zu untersuchen, wurde bei den Extremitäten von wt und mutanten Mäusen der Stadien E16.5, Neugeborene und 9 Tage Autopod von Stylopod/Zeugopod getrennt und aus diesen beiden Geweben RNA isoliert. Das Stylopod/Zeugopod-Gewebe dient dabei als interne Kontrolle, da in diesen Geweben *Hoxd13* nicht oder nur sehr schwach exprimiert wird. Die RNA wurde dann über reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und mit dieser eine semi-quantitative RT-PCR

durchgeführt. Dabei wurden *Hoxd13*-spezifische Primer verwendet, die das Intron 1 überspannen, um ein Produkt aus genomischer DNA zu vermeiden (Abb.13).



**Abbildung 13: Expression von *Hoxd13* durch RT-PCR von totaler RNA**

Dargestellt ist die Expression von *Hoxd13* im Gewebe des Autopod (a) und Stylopod/Zeugopod (s/z) von wt und mutanten (m) Mäusen der Stadien E16.5, NG und 9 Tage. *Hoxd13* ist zu allen Stadien im Autopod von wt und mutanten Mäusen stark exprimiert. Im Stylopod/Zeugopod findet sich keine oder nur schwache Expression. Als Kontrolle für die RNA wurde die Expression von *Actin* ebenfalls untersucht (Kasten).

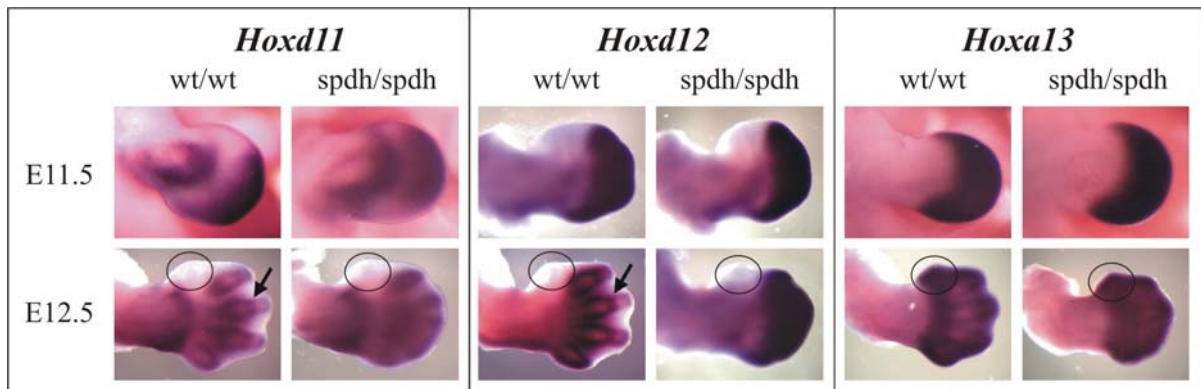
Die RT-PCR zeigt eine starke Expression von *Hoxd13* im Autopod in allen Stadien im Wt und in der Mutante. Im Stadium E16.5 und NG findet man auch eine schwache Expression im Stylopod/Zeugopod. Die Stärke der Expression im Autopod nimmt dabei nach der Geburt kaum ab, was darauf schließen lässt, dass *Hoxd13* auch nach der Entwicklung noch bei Prozessen wie z. B. dem Wachstum beteiligt ist.

### 3.3) Expression anderer *Hox*-Gene im Autopod

Während der Extremitätenentwicklung werden eine Reihe von *Hox*-Genen des A- und D-Clusters exprimiert. Bei der Entwicklung des Autopods sind das neben *Hoxd13* auch *Hoxd11*, *Hoxd12* und *Hoxa13*. Um die Expression dieser Gene in den frühen Stadien in wt und mutanten Mäusen zu untersuchen wurde eine WM-ISH mit spezifischen Sonden durchgeführt (Abb.14).

Das Muster der Expression der Gene *Hoxd11*, *Hoxd12* und *Hoxa13* ist identisch zwischen wt und mutanten Mäusen im Stadium E11.5, wobei auch bei diesen Genen der Bereich der Expression in der Mutante kleiner ist. Im Stadium E13.5 verschwindet bei allen drei *Hox*-Genen die Expression aus den Knorpelzellen der entstehenden Phalangen und zeigt stärkere Lokalisation der Expression im Perichondrium, das die Kondensationen umgibt. Im Wt findet man zusätzlich Expression von *Hoxd11* und *Hoxd12* in den Regionen der zukünftigen Gelenken der Finger. Diese Expression fehlt in den Mutanten. Da sich in der *spdh*-Maus die

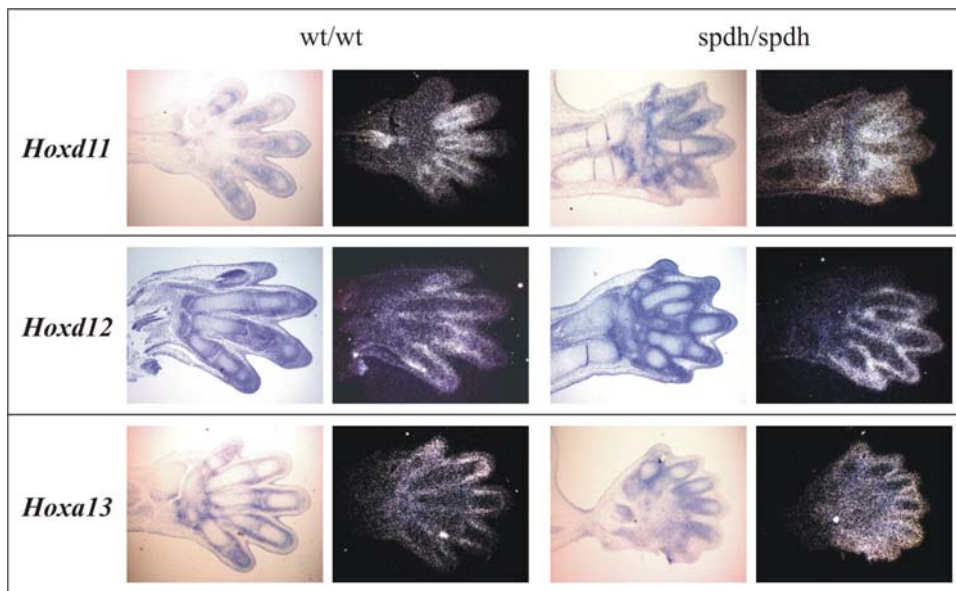
Gelenke nicht richtig bilden, könnte dies ein Hinweis für eine Rolle dieser *Hox*-Gene bei der Gelenkentwicklung sein.



**Abbildung 14: Expression von *Hoxd11*, *Hoxd12* und *Hoxa13* in frühen Stadien von Wt und Mutante durch Whole-Mount in situ Hybridisierung**

Man sieht eine Expression von *Hoxd11* im Bereich des entstehenden Handgelenks und der Finger, *Hoxd12* und *Hoxa13* nur im Bereich der Finger. Im 1. Finger (Kreise) ist vor allem *Hoxa13* exprimiert. Man sieht bei allen 3 *Hox*-Genen keinen Unterschied in Stärke und Muster der Expression zwischen Wt und Mutante. Im Stadium E12.5 findet man bei *Hoxd11* und *Hoxd12* im Wt Expression in den entstehenden Gelenken der Finger (Pfeil), diese fehlt in der Mutante.

Zur Untersuchung der Expression dieser *Hox*-Gene zu einem späteren Stadium wurden rISH auf Schnitten des Stadiums E14.5 durchgeführt (Abb.15).



**Abbildung 15: Expression von *Hoxd11*, *Hoxd12* und *Hoxa13* zum Stadium E14.5 in Wt und Mutante durch  $^{33}\text{P}$  ISH auf Paraffinschnitten**

In späteren Stadien zeigen diese *Hox*-Gene eine Expression primär im Perichondrium der Finger, in den Zellen des Knorpels ist die Expression zurückgegangen. Es ist kein Unterschied in der Expression zwischen Wt und Mutante zu erkennen.

Auch bei diesem späteren Stadium ist das Expressionsmuster und die Expressionsstärke identisch zwischen Wt und Mutante. Wie schon *Hoxd13* sind auch die anderen *Hox*-Gene stark im Perichondrium exprimiert, während die Expression in den Knorpelzellen zurückgeht. Durch die Mutation in *Hoxd13* wird also in der *spdh*-Maus die Expression der *Hox*-Gene im Autopod nicht oder kaum beeinflusst.

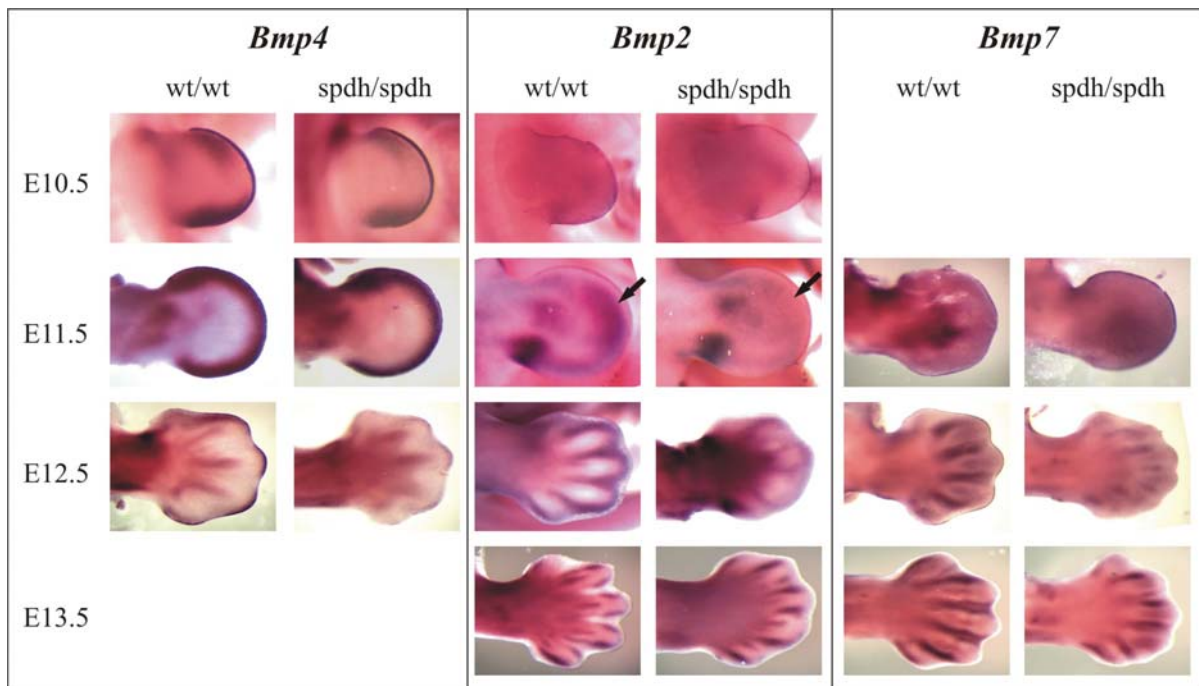
### **3.4) Musterbildung, Knorpeldifferenzierung und Knochenentwicklung in den Vorderpfoten der *spdh*-Maus**

#### **3.4.1) Musterbildung und Kondensationen**

Bei der frühen Entwicklung der Extremitäten und der Kondensationen der Phalangen spielen Bone Morphogenetic Proteins (Bmps) eine wichtige Rolle. Die Expression der *Bmps*, die in den Vorderpfoten aktiv sind, wurde zu frühen und späteren Entwicklungsstadien durch WM-ISH und rISH untersucht.

*Bmp2* ist im Stadium E10.5 im AER (Apikale Ektodermale Randleiste) und im Bereich der ZPA (Zone der Polarisierende Aktivität) exprimiert (Abb.16). Zu diesem frühen Stadium findet man keinen Unterschied in der Expression im Vergleich zwischen wt und mutanten Mäusen. Im Stadium E11.5 nimmt die Expression in der ZPA stark zu. Im AER wird *Bmp2* nicht mehr exprimiert, dafür aber im Mesoderm, das direkt unterhalb liegt (Pfeile). Diese Expression ist in der Mutante sehr viel schwächer. In den Stadien E12.5 und E13.5 wird *Bmp2* im Perichondrium der Kondensationen der entstehenden Finger exprimiert. Im Wt sieht man dabei schon in E12.5 die fünf Kondensationen der Finger, die von *Bmp2*-Expression im Interdigitalgewebe umgeben sind. Im Stadium E13.5 haben sich die einzelnen Finger und auch die Bereiche der *Bmp2*-Expression bereits voneinander getrennt. In der Mutante dagegen ist die Entwicklung der Finger verzögert und in E13.5 sind die einzelnen Bereiche noch nicht separiert, sondern noch miteinander verbunden. Zudem sind auch die Abstände zwischen den Bereichen der Expression unregelmäßig und irregulär.

Die Expression von *Bmp7* ist der Expression von *Bmp2* sehr ähnlich (Abb.16). Im Stadium E11.5 findet man *Bmp7* im AER und im darunter liegenden Gewebe, allerdings in einem größeren Bereich als *Bmp2*. Im Stadium E12.5 ist *Bmp7* im Perichondrium exprimiert. Man findet auch hier in der Mutante die Unregelmäßigkeiten des Musters und der Abstände der Expressionen, aber die Stärke ist zwischen Wt und Mutante vergleichbar.



**Abbildung 16: Expression von *Bmp4*, *Bmp2* und *Bmp7* in frühen Stadien von Wt und Mutante durch WM-ISH**

Man sieht Expression von *Bmp4* im Stadium E10.5 und E11.5 im AER und im direkt darunter liegenden Gewebe. Später findet man zusätzlich Expression in den Knorpelanlagen der Finger, die Expression im AER zwischen den einzelnen Fingern verschwindet. Die Expression ist in der Mutante deutlich schwächer im Vergleich zum Wt. *Bmp2* zeigt zum Stadium E10.5 Expression im AER und ZPA. Im Stadium E11.5 nimmt die Expression im ZPA stark zu. Im AER geht die Expression zurück, dafür wird *Bmp2* nun aber im Mesoderm direkt unter dem AER exprimiert (Pfeile). In der Mutante ist diese Expression deutlich schwächer. Später wird *Bmp2* im Perichondrium der Fingern exprimiert. In der Mutante ist die Expression schwächer und das Muster irregulär. *Bmp7* zeigt ein sehr ähnliches Expressionsmuster wie *Bmp2*.

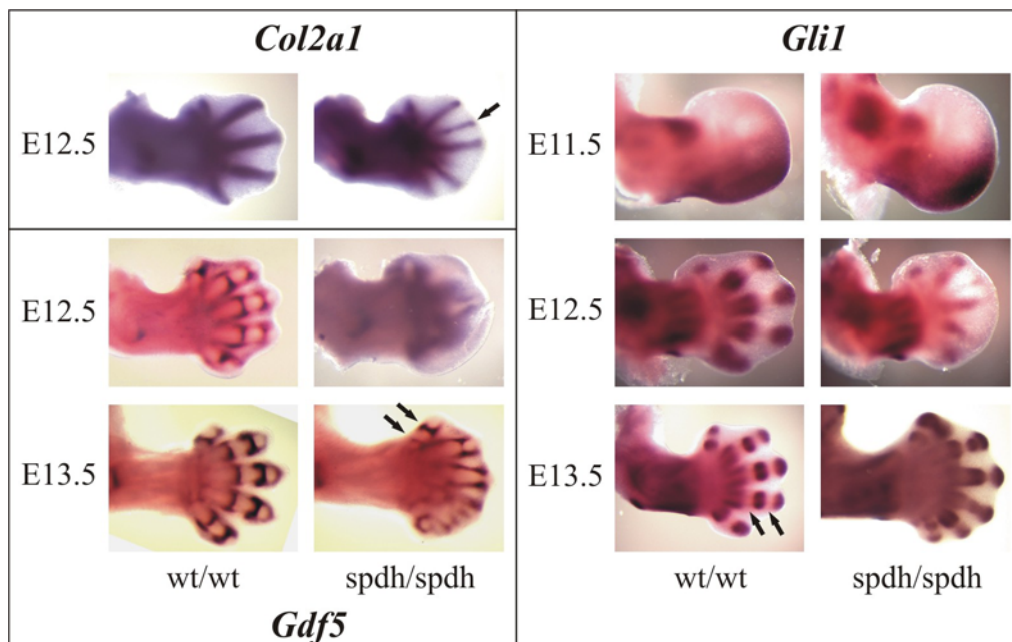
*Bmp4* zeigt eine starke Expression im AER und im darunter liegenden Mesoderm in den Stadien E10.5 und E11.5, sowohl im Wt als auch in der Mutante (Abb.16). Im Stadium E12.5 verschwindet die Expression im AER in den Fingerzwischenräumen. *Bmp4* wird nun auch in den Knorpelanlagen der Finger exprimiert. In der Mutante ist die Expression in diesem Stadium deutlich schwächer im Vergleich zum Wt.

*Collagen Typ II* ist ein Marker von Knorpelzellen (Chondrozyten) und wird in den frühen Knorpelanlagen (den Kondensationen), sowie später in ruhenden, proliferierenden und prä-hypertrophen Chondrozyten exprimiert. In den sich entwickelnden Gelenken und in hypertrophen Chondrozyten findet man dagegen keine Expression von *Collagen Typ II* mehr. Mit einer spezifischen Sonde (*Col2a1*) wurde die Expression von *Collagen Typ II* zu frühen und späten Stadien zwischen Wt und Mutante verglichen.



Im Wt kann man im Stadium E12.5 bereits deutlich die 5 Kondensationen der Fingeranlagen erkennen (Abb.17). In der Mutante sind auch beginnende Kondensationen der entstehenden Finger zu erkennen, aber die Entwicklung scheint verzögert zu sein und auch das Muster ist gestört. So sieht man schon zu diesem frühen Stadium, dass sich zusätzliche Kondensationen zwischen den Fingeranlagen bilden (Pfeil).

Ein Marker für die Entwicklung der Gelenke ist der *Growth/Differentiation Factor 5 (Gdf5)*, ein Signalmolekül aus der *Tgf*-Superfamilie. Er wird in den frühen Anlagen der Finger im Perichondrium exprimiert. Später wird *Gdf5* in den Bereichen, in denen ein Gelenk entsteht, angeschaltet. Dabei geht es der Bildung des Gelenks voraus und spielt bei der Entstehung der Interzone und der Regulierung des Wachstums des Knorpels eine Rolle.



**Abbildung 17: Expression von *Col2a1*, *Gdf5* und *Gli1* in frühen Stadien von Wt und Mutante durch WM-ISH**

*Col2a1* markiert die Knorpelkondensationen. In der Mutante sieht man die unregelmäßige Anordnung der Finger und zusätzliche Kondensationen (Pfeil). *Gdf5* zeigt im Wt im Stadium E12.5 und E13.5 ein charakteristisches Streifenmuster der entstehenden Gelenke in den Fingern. In der Mutante ist die Expression deutlich schwächer und unorganisiert (E12.5). Im Stadium E13.5 fehlt das typische Streifenmuster mit Ausnahme des 1. Fingers (Pfeile). *Gli1* ist zuerst im posterioren Bereich exprimiert (E11.5). Später in den Kondensationen mit Ausnahme der Gelenke (Pfeile). In der Mutante ist die Expression im Stadium E12.5 in den Kondensationen deutlich schwächer und das Muster ist irregulär.

Im Stadium E12.5 sieht man die Expression von *Gdf5* im Wt im Perichondrium der Finger und auch in den entstehenden Gelenken, wodurch sich ein für *Gdf5* charakteristisches Streifenmuster bildet (Abb.17). Dies ist im Stadium E13.5 noch deutlicher ausgeprägt. In der

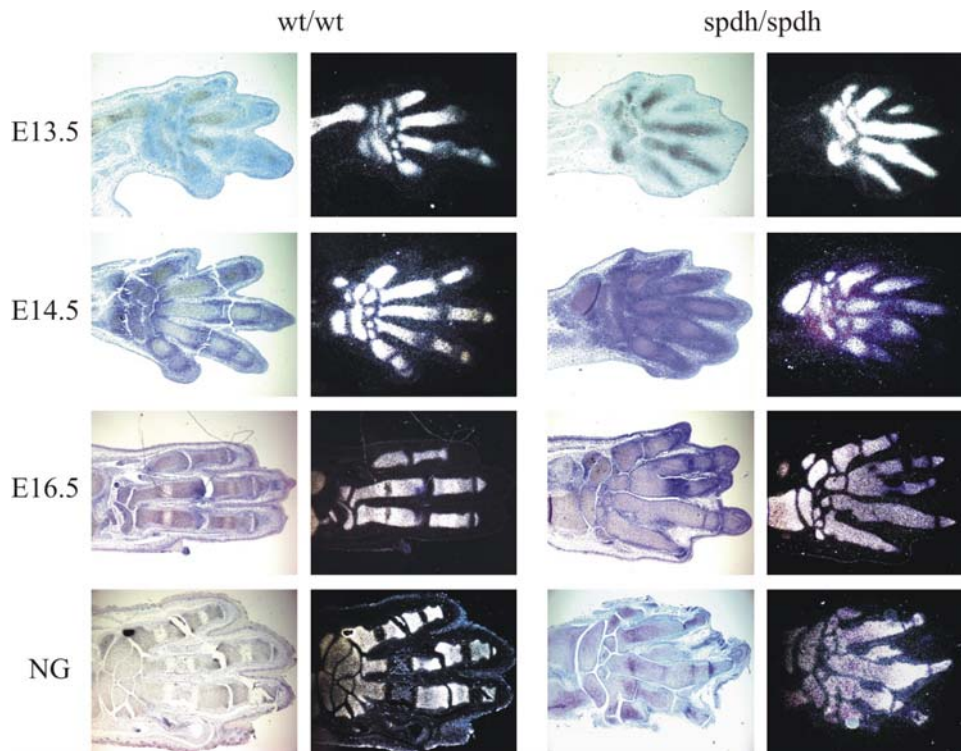
Mutante ist das Expressionsmuster im Stadium E12.5 stark reduziert und disorganisiert. Das Streifenmuster fehlt komplett. Im Stadium E13.5 ist *Gdf5* zwar deutlich im Perichondrium exprimiert, es fehlt aber auch zu diesem Zeitpunkt eine Expression in den Gelenken. Dabei bildet das Gelenk im ersten Finger eine Ausnahme, sowie die Gelenke zwischen den distalen und mittleren Phalangen, in denen *Gdf5* schwach exprimiert wird.

Während der Entwicklung und Musterbildung der Extremitäten spielt der Sonic-Hedgehog-Signalweg eine entscheidende Rolle. Ein wichtiger Vermittler in diesem Signalweg ist *Gli1*. *Gli1* ist zuerst im posterioren Bereich der Vorderpfote exprimiert (Abb.17). Diese Expression wird durch *Shh* gesteuert. In den späteren Stadien wird die Expression von *Gli1* durch *Ihh* reguliert und findet sich in den Kondensationen der Finger mit Ausnahme der entstehenden Gelenkregion, in den Bereichen, in denen *Gdf5* exprimiert wird. In der Mutante ist die Expression im Stadium E12.5 stark reduziert. Zudem bleibt die Expression durchgehend in den Fingeranlagen vorhanden, mit Ausnahme der distalen interphalangealen Gelenke. Dies zeigt, dass in der *spdh*-Mutante Gene, die bei der Musterbildung im Autopod beteiligt sind, deutlich verändert oder schwächer exprimiert werden.

### 3.4.2) Frühe Knorpeldifferenzierung

Die Marker der frühen Kondensation- und Knorpelentwicklung wurden auch in späteren Stadien mit rISH auf Schnitten untersucht. Für *Col2a1* sieht man ein starkes Signal in den Knorpelzellen der entstehenden Finger bei Wt und Mutante (Abb.18).

Im Wt sieht man allerdings schon im Stadium E14.5 einen Rückgang der Expression von *Col2a1* in den entstehenden Gelenken, während in der Mutante die Expression noch durchgehend in den ganzen Fingern vorhanden ist. Im Stadium E16.5 sieht man im Wt auch einen Rückgang der Expression von *Col2a1* in den sich differenzierenden hypertrophen Knorpelzellen in der Mitte der einzelnen Phalangen. Auf Schnitten vom Wt nach der Geburt ist dieser Prozess noch weiter fortgeschritten. Diese Differenzierung der Knorpelzellen ist in der Mutante nicht zu finden und die Expression von *Col2a1* ist zu diesem Stadium und auch nach der Geburt immer noch ununterbrochen in den Fingern vorhanden.

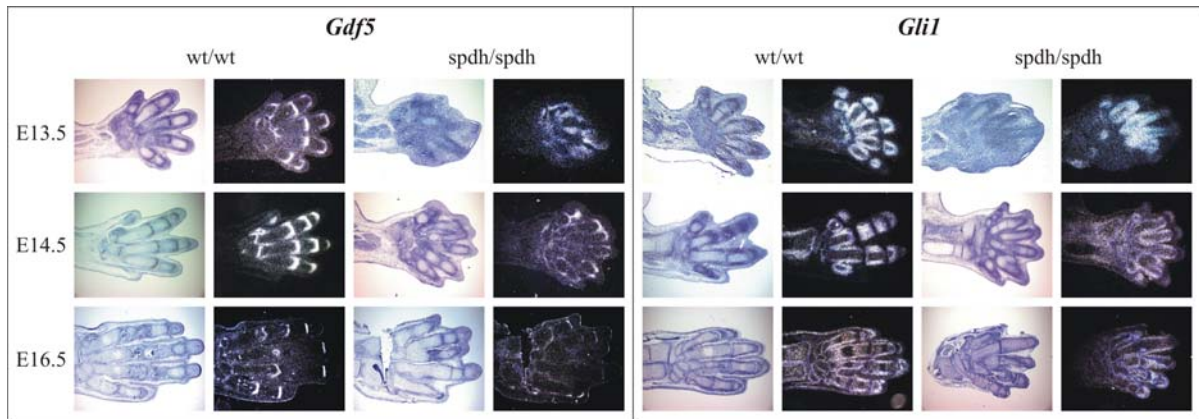


**Abbildung 18: Expression von *Col2a1* in späten Entwicklungsstadien von Wt und Mutante durch  $^{33}\text{P}$  in situ Hybridisierung auf Paraffinschnitten**

*Col2a1* ist in den Knorpelzellen exprimiert. Im Wt sieht man einen Rückgang der Expression in den entstehenden Gelenken der Finger, ab dem Stadium E16.5 auch in der Mitte der einzelnen Phalangen durch Differenzierung der Chondrozyten und Entstehung von Knochen. In der Mutante fehlt diese Entwicklung, die Expression ist in allen Stadien in den Fingern ununterbrochen, mit Ausnahme der distalen Phalangen und des 1. Fingers.

Auch *Gdf5* ist während der weiteren Entwicklung der Finger exprimiert (Abb.19). Im Wt sieht man auf Schnitten mit rISH deutlich die Expression in den Bereichen, in denen sich die Gelenke bilden werden, der sogenannten Interzone. Die Expression im Perichondrium verschwindet dagegen in diesen späteren Stadien. In der Mutante ist diese Entwicklung stark verzögert. So findet man in den Stadien E13.5 und E14.5 noch Expression im Perichondrium, zu einem Zeitpunkt, an dem sie im Wt dort schon verschwunden ist. Auch sieht man deutlich die fehlende oder gestörte Entwicklung der Gelenke in der Mutante.

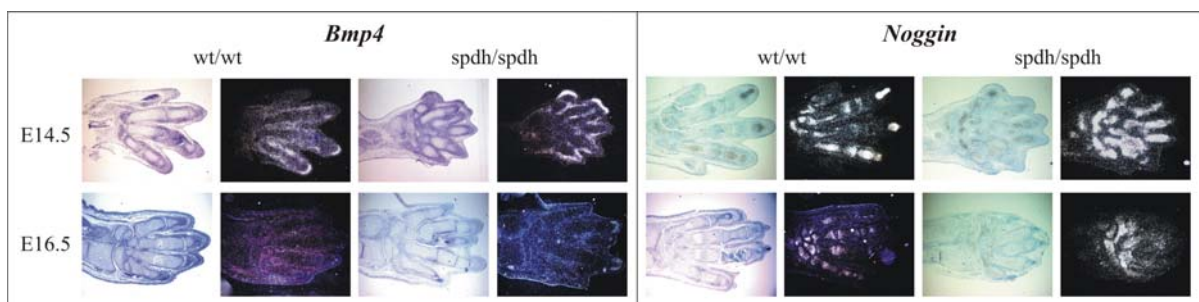
*Gli1* ist in den späteren Stadien im Wt in einem Bereich exprimiert, der die Knorpelanlagen der Metakarpalen und Phalangen umgibt (Abb.19). Dabei bleiben die Gelenkregionen frei von *Gli1*-Expression. In der Mutante dagegen ist die Expression in einem durchgehenden Ring, der die gesamte Knorpelanlage umgibt, vorhanden, mit Ausnahme des distalen Gelenks der Finger.



**Abbildung 19: Expression von *Gdf5* und *Gli1* in späten Entwicklungsstadien von Wt und Mutante durch  $^{33}\text{P}$  in situ Hybridisierung auf Paraffinschnitten**

*Gdf5* ist im Wt zu diesen späteren Stadien nur noch in den entstehenden Gelenken exprimiert. In der Mutante findet man dagegen Expression hauptsächlich im Perichondrium und nur in den distalen Gelenken der Finger. Im Stadium E16.5 ist in der Mutante kaum noch *Gdf5*-Expression zu finden. *Gli1* ist im Wt stark im Perichondrium der Finger exprimiert, wobei die Gelenkregion frei von Expression ist. In der Mutante ist die Expression dagegen durchgehend vorhanden, nur das distale Gelenk ist frei von Expression.

*Bmp4* ist in den späteren Stadien (E14.5) im Perichondrium und in den Fingerspitzen exprimiert (Abb.20). Im Stadium E16.5 nimmt die Expression dann zunehmend ab. In der Mutante sieht man eine ähnliche Expression im Vergleich zum Wt. Allerdings sind die Fingerspitzen zum Teil nicht getrennt und die Expression von *Bmp4* in den einzelnen Fingerspitzen ist miteinander verbunden, während sie im Wt komplett voneinander getrennt sind.



**Abbildung 20: Expression von *Bmp4* und *Noggin* in späten Entwicklungsstadien von Wt und Mutante durch  $^{33}\text{P}$  in situ Hybridisierung auf Paraffinschnitten**

*Bmp4* zeigt in der Mutante eine gestörte Trennung der Expression in den Fingerspitzen. *Noggin* ist im Wt im Knorpel neben den Gelenken exprimiert. In der Mutante ist die Expression von *Noggin* im gesamten Knorpel der Finger zu finden.

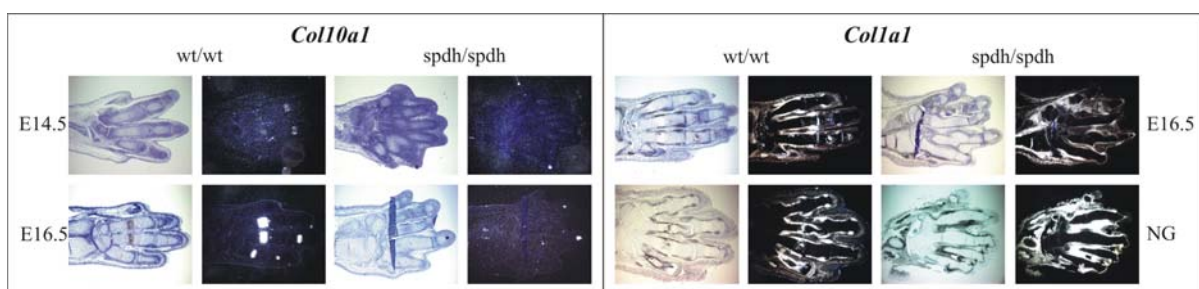
*Noggin* ist ein Antagonist der Bmps und es ist bekannt, dass *Noggin* bei der Gelenkentwicklung eine Rolle spielt. In den frühen Stadien, bevor die Gelenkentwicklung beginnt, ist *Noggin* in den gesamten Knorpelanlagen exprimiert. Später wird die Expression

auf den Knorpel, der die Gelenkregion umgibt, beschränkt. Dies sieht man im Wt in den Stadien E14.5 und E16.5 (Abb.20). In der Mutante dagegen bleibt die Expression im Stadium E14.5 im gesamten Knorpel vorhanden. Später, E16.5, wird die Expression bei beiden in den Phalangen schwächer, das veränderte Expressionsmuster in der Mutante bleibt aber vorhanden. Damit sind einige Gene, die bei der frühen Differenzierung des Knorpels eine Rolle spielen, in der *spdh*-Mutante verändert exprimiert.

### 3.4.3) Späte Knorpeldifferenzierung und Knochenbildung

*Collagen Typ X (Col10)* ist ein Marker von prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten, die erst in späteren Stadien der Autopodentwicklung zu finden sind. Deshalb wurde mit einer spezifischen Sonde gegen *Col10* mit rISH auf Schnitten in den Stadien E14.5 und E16.5 die Expression in Wt und Mutante überprüft. Im Wt findet sich Expression von *Col10* bereits im Stadium E14.5 (Abb.21). Im Stadium E16.5 ist die Expression dann sehr stark in den prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten in der Mitte der Phalangen vorhanden. In der Mutante dagegen ist zu keinem dieser Stadien eine Expression von *Col10* in den Phalangen zu finden, weil die Differenzierung der Knorpelzellen noch nicht begonnen hat.

*Collagen Typ I* ist im Perichondrium exprimiert und ist zusätzlich ein Marker für Osteoblasten im Knochen. Mit einer spezifischen Sonde (*Coll1a1*) wurde mit rISH auf Schnitten die Expression von *Collagen Typ I* in den Stadien E16.5 und Neugeborenen zwischen Wt und Mutante verglichen.



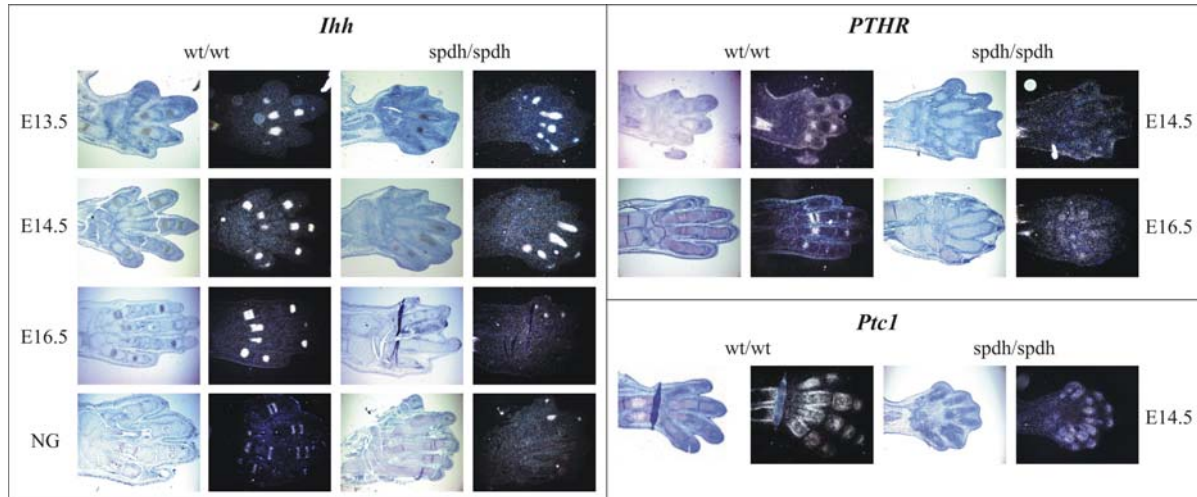
**Abbildung 21: Expression von *Col10* und *Coll1* in späten Entwicklungsstadien von Wt und Mutante durch  $^{33}\text{P}$  in situ Hybridisierung auf Paraffinschnitten**

*Col10*-Expression beginnt im Wt bereits im Stadium E14.5 und ist E16.5 sehr stark in den hypertrophen Chondrozyten. In der Mutante fehlt die Expression komplett.

*Coll1* ist im Wt im Perichondrium und im beginnenden Knochen exprimiert, in der Mutante findet man Expression nur im Perichondrium.

Im Wt wird *Coll1a1* im Perichondrium, den Gelenken und in den Osteoblasten exprimiert (Abb.21). In der Mutante findet man die Expression nur im Perichondrium, da die Gelenkentwicklung gestört ist und die Differenzierung des Knorpels zu Knochen, in dem sich die Osteoblasten befinden, noch nicht stattgefunden hat.

Indian Hedgehog (*Ihh*) ist ein Signalmolekül, das bei der Regulierung der Knorpeldifferenzierung eine zentrale Rolle spielt. *Ihh* wird in prähypertrophen Chondrozyten exprimiert und reguliert den Übergang der Chondrozyten vom prähypertrophen zum hypertrophen Stadium. Im Wt gibt es in den früheren Stadien (E13.5 bis E16.5) in der Mitte jeder phalangealen Anlage der Finger eine Zone mit *Ihh*-Expression, die durch die *Gdf5*-positiven Interzonen voneinander getrennt sind (Abb.22). In den späteren Stadien werden diese einzelnen Zonen durch die Entstehung von Knochen in 2 aufgeteilt und voneinander getrennt. In der Mutante wird *Ihh* zur gleichen Zeit exprimiert wie im Wt, allerdings werden die einzelnen Zonen der Expression innerhalb der Phalangen nicht voneinander getrennt. Im Stadium E16.5 geht die Expression von *Ihh* dann deutlich zurück, zu einem Zeitpunkt in dem im Wt noch starke Expression vorhanden ist.



**Abbildung 22: Expression von *Ihh*, *PTHR* und *Ptc1* in Wt und Mutante durch  $^{33}\text{P}$  in situ Hybridisierung auf Paraffinschnitten**

*Ihh* ist im Wt in der Mitte der einzelnen Phalangen in allen Stadien exprimiert. In der Mutante sind die Expressionen der Phalangen fusioniert und die Expression ist im Stadium E16.5 nicht mehr vorhanden. Die Expression von *PTHR* ist im Wt in der Zone der proliferierenden Chondrozyten vorhanden, in der Mutante wird *PTHR* nicht exprimiert. Die Expression von *Ptc1* umgibt im Wt die Expression von *Ihh*, die Region der Gelenke ist frei von Expression. In der Mutante ist *Ptc1* durchgehend über die Gelenkregionen exprimiert.

*PTHR* ist der Rezeptor vom Parathyroid Hormone-like Hormone (*Pthlh*), das zusammen mit *Ihh* über einen negativen Feedback-Loop die Differenzierung der Chondrozyten zu hypertrophen Zellen reguliert. Im Wt wird *PTHR* in proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten exprimiert (Abb.22). In der Mutante ist Expression von *PTHR* weder zum Stadium E14.5 noch zu einem späteren Zeitpunkt (E16.5) zu finden.

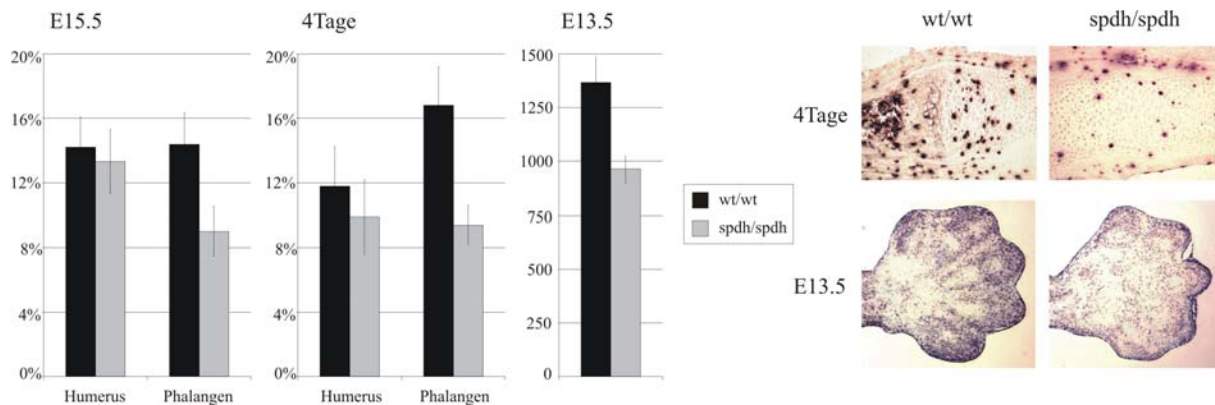
*Patched-1 (Ptc1)* ist ein weiteres Zielgen des Hedgehog Signalwegs und wird während der Chondrozytendifferenzierung von *Ihh* reguliert. Im Wt findet man Expression von *Ptc1* im Gewebe, das die *Ihh*-Expression umgibt. Die Region der zukünftigen Gelenke bleibt dabei frei von Expression. In der Mutante ist *Ptc1* durchgehend exprimiert, die Gelenkregion ist nicht frei von Expression (Abb.22).

Mit diesen Ergebnissen wird deutlich, dass in der *spdh*-Mutante der Hedgehog-Signalweg gestört ist, der bei der Kontrolle der Differenzierung der Chondrozyten eine entscheidende Rolle spielt.

### **3.5) Proliferation der Chondrozyten**

Für die Entwicklung der Brachydaktylie, also die Verkürzung der Finger, in der Mutante kann es verschiedene Ursachen geben. Eine Möglichkeit besteht darin, dass die Chondrozyten sich nicht genug teilen und es so zu einer Verkürzung der einzelnen Fingerglieder kommt. Um diese Möglichkeit zu testen, wurde zu verschiedenen Stadien eine Markierung mit BromdesoxyUridin (BrdU) durchgeführt. Dabei wird Brom-markiertes Uridin in die DNA sich-teilender Zellen eingebaut. Mit einem Antikörper kann man diese Zellen markieren und so die Teilungsrate bestimmen.

Bei der Auswertung diente der Humerus als interne Kontrolle, da *Hoxd13* dort nicht exprimiert wird und so kein Unterschied zwischen Wt und Mutante zu finden sein sollte. Zu 3 verschiedenen Stadien (E13.5, E15.5 und 4 Tage) wurden die BrdU-positiven Zellen im Humerus und in den Phalangen von Wt und Mutante gezählt und der Prozentsatz im Vergleich zu den negativen Zellen ermittelt (Abb.23). In den Humeri aller drei Stadien zeigt sich kein Unterschied in der Teilungsrate zwischen Wt und Mutante. In den Phalangen dagegen, ist die Proliferation der Chondrozyten in der *spdh*-Mutante in allen Stadien stark vermindert im Vergleich zum Wt. Die Verkürzung der Finger ist damit auf eine verringerte Teilungsrate der Knorpelzellen in den Phalangen zurückzuführen.



**Abbildung 23: Untersuchung der Teilungsrate der Chondrozyten in Wt und Mutante durch BrdU-Markierung proliferierender Zellen auf Paraffinschnitten**

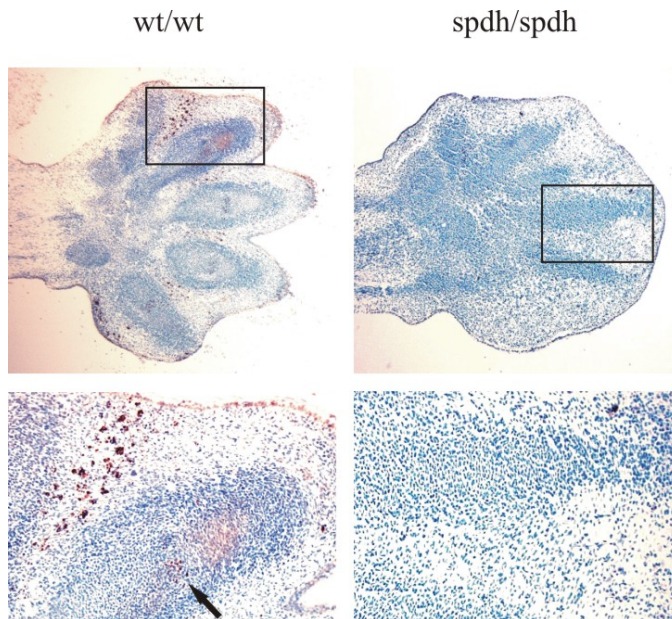
Die Diagramme zeigen das Ergebnis der Auszählung der BrdU-positiven Chondrozyten zu 3 Stadien. In den Stadien E15.5 und 4Tage ist die Angabe in Prozent, im Stadium E13.5 ist die Gesamtzahl der proliferierenden Zellen von je 3 Bereichen pro Schnitt angegeben. Bei allen 3 Stadien ist die Zahl proliferierender Chondrozyten in der Mutante um etwa 1/3 reduziert im Vergleich zum Wt. Als interne Kontrolle wurden Chondrozyten des Humerus gezählt. Hier findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen Wt und Mutante.

Auf der rechten Seite sind Bilder der Schnitte der Stadien 4 Tage und E13.5 abgebildet. Die BrdU-positiven Zellen sind dunkelbraun angefärbt.

### 3.6) Apoptose der Chondrozyten

Eine weitere mögliche Ursache für die Verkürzung der Phalangen könnte eine erhöhte Apoptoserate der Knorpelzellen sein. Zudem spielt der organisierte Zelltod während der Extremitätenentwicklung eine wichtige Rolle in der Trennung des Gewebes zwischen den einzelnen Finger und in der Entstehung der Gelenke. Aus diesem Grund wurde anhand eines TUNEL-Assays die Apoptose in den Vorderpfoten der mutanten Maus im Stadium E13.5 im Vergleich zum Wt untersucht.





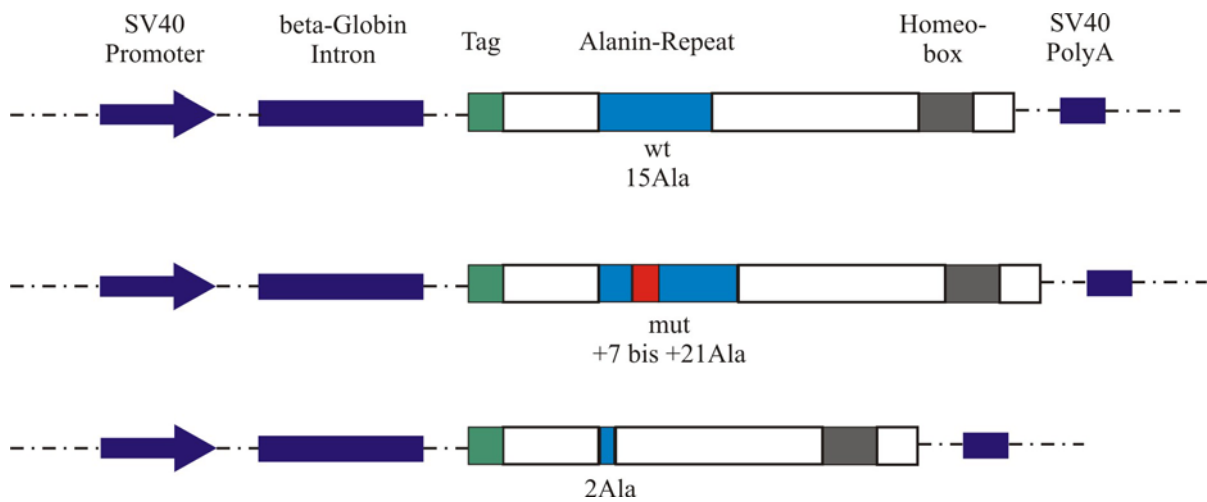
**Abbildung 24: Untersuchung der Apoptose in Händen von wt und mutanten Mäusen durch TUNEL-Assay auf Paraffinschnitten des Stadiums E13.5**

TUNEL-positive Zellen sind in rot angefärbt. Man sieht im WT viele positive Zellen im Gewebe zwischen den Fingern und einige positive Zellen im Bereich der entstehenden Gelenke (Pfeil). In der Mutante sind keine apoptotische Zellen in den Fingerzwischenräumen oder den Gelenkregionen vorhanden. Innerhalb der Kondensationen finden sich bei beiden keine positiven Knorpelzellen.

Im Wt findet man starke Apoptose im Mesenchym zwischen den einzelnen Fingern und etwas schwächer in Zellen im Bereich der zukünftigen Gelenke (Abb.24). In der Mutante findet keine Apoptose in den Fingerzwischenräumen statt und auch nicht in der Region der Gelenke. Weder bei wt noch bei mutanten Mäusen findet man zu diesem Zeitpunkt Zelltod in den Knorpelzellen. Die Verkürzung der Finger in der Mutante ist daher nicht auf das Sterben von Knorpelzellen zurückzuführen.

### 3.7) Klonierung der Konstrukte für die Zelltransfektion

Um die Lokalisation des Proteins in der Zelle zu untersuchen, wurde das *Hoxd13*-Gen mit verschieden langen Alanin-kodierenden Repeats (2, 15 (wt), 22, 23, 24, 25, 29 und 36 Alanine) in einen Expressionsvektor kloniert. Dazu wurden 2 Vektoren verwendet, die ein HA-Tag (pTL1-HA) bzw. ein Flag-Tag (pTL10-Flag) N-terminal des inklonierten Gens enthalten, sowie einen SV40-Promoter, ein beta-Globin-Intron und eine SV40-PolyA-Sequenz (Abb.25)

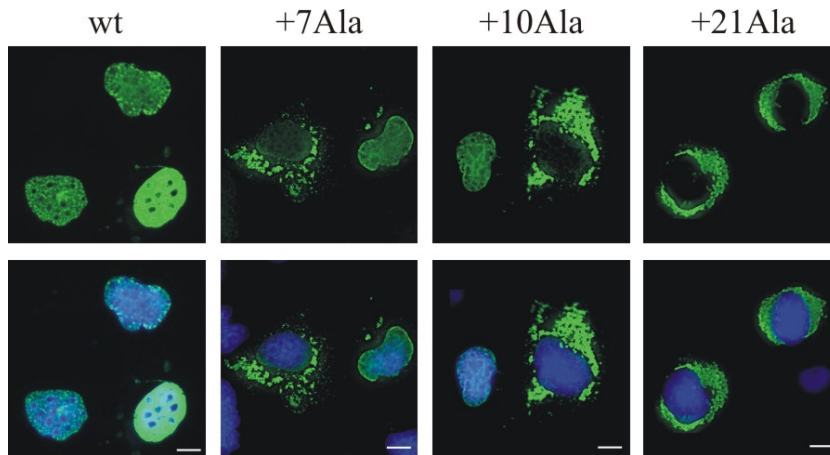


**Abbildung 25: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pTL-HA bzw. -Flag mit den einklonierten *Hoxd13*-Konstrukten für die Transfektion der COS-1 Zellen**

In den pTL1-HA Vektor wurden ebenfalls die Gene *Hoxd11*-wt, *Hoxd12*-wt, *Hoxa13*-wt, *Hoxa13*+11Ala, *Runx2*-wt, *Runx2*+10Ala, *Sox3*-wt und *Sox3*+11Ala kloniert und für Transfektionsexperimente in COS-1 Zellen verwendet.

### 3.8) Lokalisation des Hoxd13 Proteins in der Zelle

Mit den *Hoxd13*-Konstrukten wurden COS-1 Zellen transfiziert und mit spezifischen Antikörpern gegen das Tag die Lokalisation des Proteins in der Zelle bestimmt.



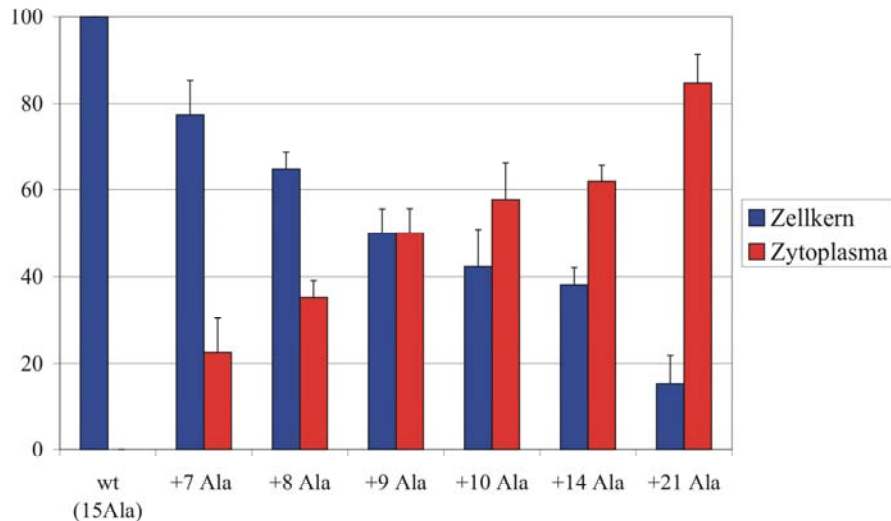
**Abbildung 26: Proteinlokalisierung von Hoxd13 mit verschiedenen langen Alanin-Repeats in transfizierten COS-1 Zellen**

Das Hoxd13-Protein ist in grün dargestellt, der Zellkern ist mit DAPI in blau gefärbt. Das wt-Protein ist in allen Zellen im Nukleus lokalisiert. Bei den Proteinen mit Expansionen kommt es in manchen Zellen zu Aggregatbildung im Zytoplasma und einem Rückgang der Lokalisation im Zellkern.

Das wt-Protein sowie das Protein mit nur 2 Alaninen zeigen eine Lokalisation des Proteins im Nukleus in allen gefärbten Zellen. In den Konstrukten mit Verlängerungen des Alanin-Repeats finden sich zusätzlich zu Zellen mit Lokalisation im Nukleus auch solche, die Proteinanhäufungen im Zytoplasma haben (Abb.26). Diese Aggregatbildung des mutierten Proteins scheint mit der Länge des Alanin-Repeats zuzunehmen. So zeigen die kürzeren Verlängerungen in der Mehrzahl der Zellen eine Proteinlokalisierung im Nukleus, während die langen Expansionen in der Mehrzahl der Zellen zu Aggregatbildung führen.

Um die Häufigkeit der Aggregatbildung der verschiedenen Konstrukte genauer zu vergleichen, wurde für jedes Konstrukt ausgezählt, in wie vielen Zellen das Protein im Zellkern lokalisiert ist und in wie vielen es Aggregate im Zytoplasma bildet.

Anhand des Diagramms (Abb.27) sieht man deutlich eine Zunahme der Häufigkeit der Aggregatbildung mit zunehmender Länge des Repeats. In den kurzen Expansionen (+7 und +8 Alanine) ist das Protein noch in der Mehrzahl der Zellen im Nukleus lokalisiert, während in den längeren Expansionen (+10 und +14 Alanine) bereits die Mehrzahl der Zellen Proteinaggregate im Zytoplasma zeigen. In der längsten getesteten Expansion (+21 Alanine) ist das Protein nur noch in vereinzelt Zellen im Nukleus zu finden.

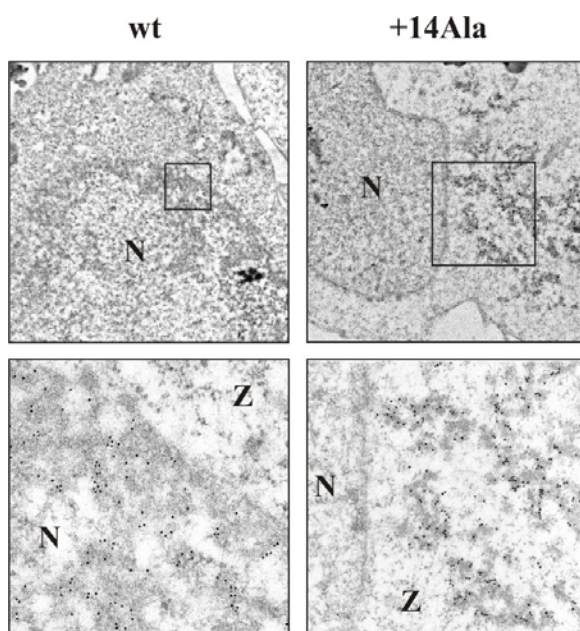


**Abbildung 27: Verteilung des Hoxd13 Proteins mit verschiedenen langen Expansionen zwischen Zellkern und Zytoplasma**

Die blauen Balken stehen für eine Lokalisation im Zellkern, die roten für das Zytoplasma. Die Zunahme der Aggregatbildung im Zytoplasma korreliert mit der Zunahme der Expansionen des Alanin-Repeats.

Es scheint damit so, dass die Länge der Expansion mit einer Zunahme der Aggregatbildung direkt zusammenhängt und diese ansteigt, je länger der Repeat wird. Das stimmt mit Beobachtungen bei SPD beim Menschen überein, bei der die Länge der Expansion auch mit der Penetranz und Schwere des Phänotyps korreliert ist.

Um die Proteinaggregate genauer zu untersuchen, wurde das Protein auf Schnitten transfizierter Zellen mit Immunogold markiert und dann in einem Elektronenmikroskop analysiert.



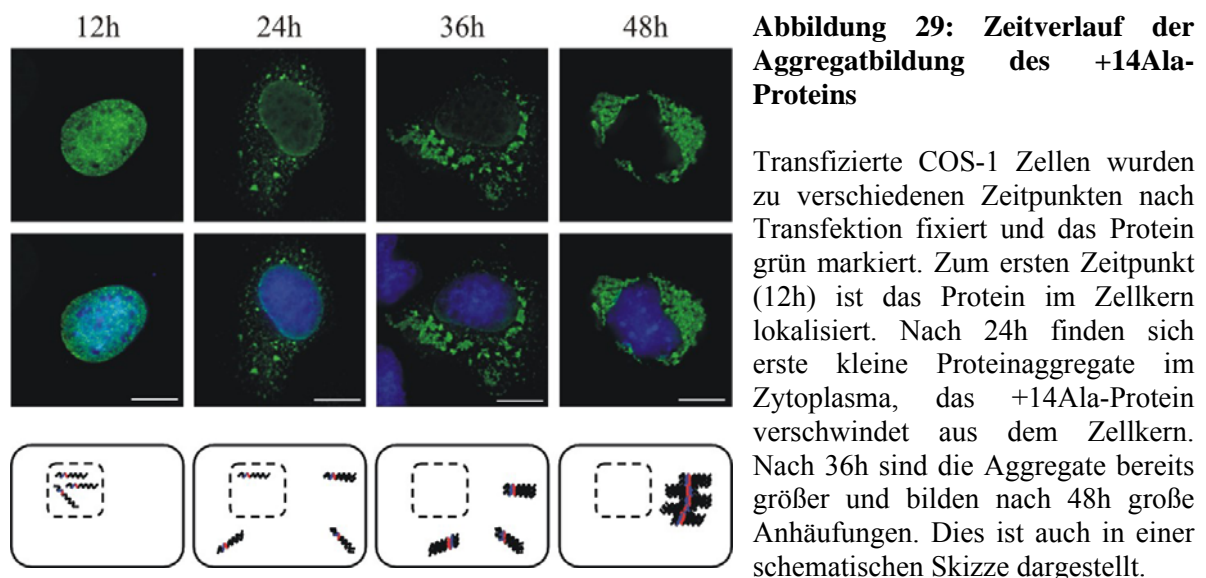
**Abbildung 28: Immunogold-Markierung des wt- und +14Ala-Proteins in transfizierten COS-1 Zellen im Elektronenmikroskop**

Das wt-Protein ist im Zellkern (N) lokalisiert, in Bereichen mit Chromatin Kondensationen. Das +14Ala-Protein ist im Zytoplasma (Z) lokalisiert, in lockeren Aggregaten ohne erkennbare Struktur.

Das wt Hoxd13-Protein ist ausschließlich im Nukleus lokalisiert, besonders in der Peripherie des Zellkerns in Bereichen mit Chromatin Kondensationen. Das mutierte Protein (+14 Alanine) ist dagegen im Zytoplasma in lockeren Aggregaten zu finden (Abb.28). Diese Aggregate weisen keine höhere Struktur auf und unterscheiden sich damit von den Aggregaten, die in poly-Glutamin-assoziierten Krankheiten gefunden wurden.

### 3.9) Zeitverlauf der Aggregatbildung

Um die Aggregatbildung des mutierten Proteins genauer zu untersuchen, wurden mit +14Ala-Hoxd13 transfizierte Zellen zu 4 verschiedenen Zeitpunkten (12h, 24h, 36h und 48h) nach der Transfektion fixiert und das Protein angefärbt.

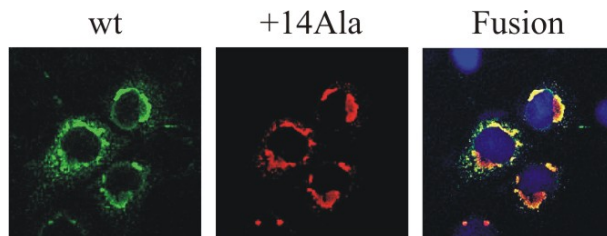


Nach 12h ist das Protein noch recht schwach exprimiert und befindet sich hauptsächlich im Zellkern. Nach 24h sieht man bereits die beginnende Bildung von kleinen Aggregaten, die im ganzen Zytoplasma der Zelle verteilt sind, und einen Rückgang des Proteins im Zellkern. Mit der Zeit werden die Aggregate größer (36h) und bilden schließlich nach 48h große Anhäufungen um den Zellkern herum. Dies ist auch in der schematischen Darstellung der Aggregatbildung verdeutlicht (Abb.29).

### 3.10) Interaktion des mutierten Hoxd13-Proteins mit anderen Proteinen

Um eine mögliche Interaktion zwischen wt und mutiertem Protein zu untersuchen, wurden COS-1 Zellen mit dem wt-Flag- und dem +14Ala-HA-Konstrukt co-transfiziert und die beiden Proteine mit unterschiedlich markierten Antikörpern gefärbt.

In den Co-Transfektionen ist das wt-Protein mit dem mutierten Protein in den Aggregaten co-lokalisiert und wird davon abgehalten, in den Zellkern einzudringen (Abb.30). Dieser Einfluss des mutierten Proteins auf die Lokalisation des wt-Proteins ist eine mögliche Erklärung für den dominanten Charakter der Alanin-Expansion bei SPD im Menschen.

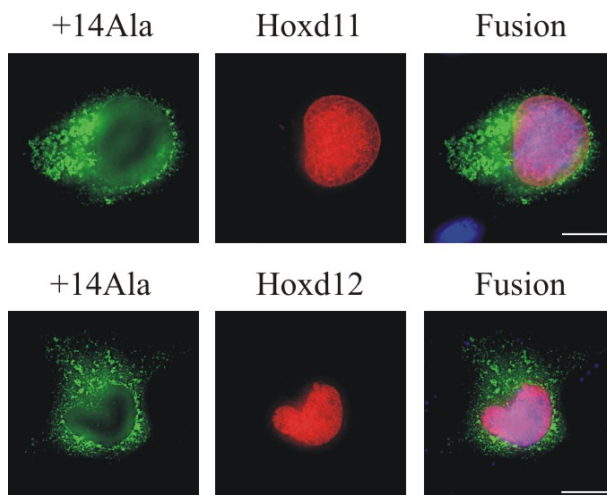


**Abbildung 30: Co-Lokalisation von wt- und +14Ala-Protein im Zytoplasma**

Bei Co-Transfektion wird das wt-Protein (grün) in die Aggregate des +14Ala-Proteins (rot) hineingezogen und davon abgehalten, in den Zellkern zu gehen.

Um zu untersuchen, ob das mutierte Hoxd13-Protein auch auf andere co-exprimierte Hox-Proteine einen Einfluss hat, wurden COS-1 Zellen mit dem +14Ala-Flag-Konstrukt und *Hoxd12*-HA bzw. *Hoxd11*-HA co-transfiziert.

Man sieht, dass diese beiden *Hox*-Gene nicht in ihrer Lokalisation vom mutierten Hoxd13-Protein beeinflusst werden und ungestört in den Zellkern gehen (Abb.31). Der Einfluss des mutierten Hoxd13-Proteins auf die Lokalisation anderer Hox-Proteine ist damit auf Hoxd13 beschränkt.



**Abbildung 31: Co-Transfektion von +14Ala mit *Hoxd11* und *Hoxd12***

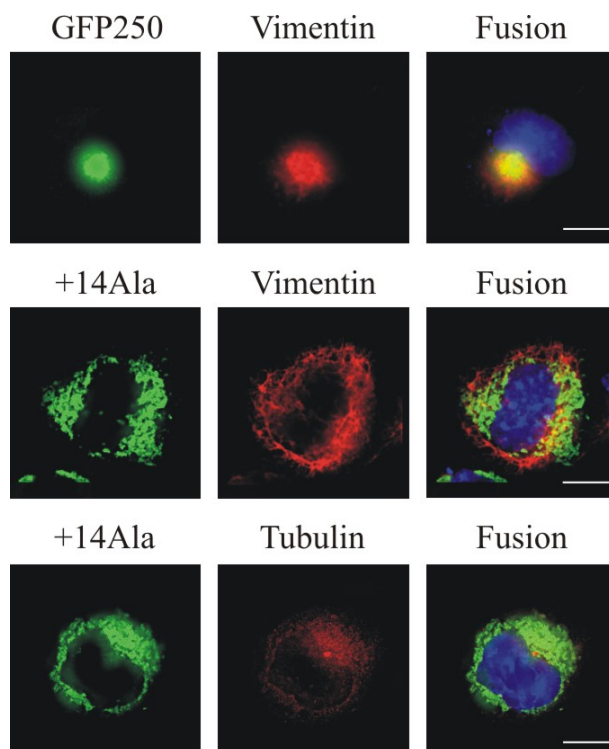
Die Proteine der Gene *Hoxd11* und *Hoxd12* (beide rot) werden durch die Aggregatbildung des mutierten Hoxd13-Proteins (grün) nicht in ihrer Lokalisation beeinflusst. Beide Proteine sind im Zellkern lokalisiert und zeigen keine Co-Lokalisation mit den Aggregaten im Zytoplasma.

### 3.11) Co-Lokalisation der Hoxd13-Aggregate mit Zellorganellen

Es wurde gezeigt, dass in manchen Fällen fehlgefaltete Proteine an einer bestimmten Stelle in der Zelle akkumulieren, dem sogenannten „Microtubule Organizing Center“ (MTOC), wo sie dann vom Proteasom abgebaut werden. Durch diese Ansammlung im MTOC entsteht das

sogenannte Aggresom. Bei dessen Bildung kommt es zu einer Neuordnung des intermediären filamentösen Zytoskeletts der Zelle, zu dem auch Vimentin gehört. Vimentin-Filamente bilden normalerweise ein feines Netz peripherer Fasern, die im MTOC zusammenlaufen. Die Entstehung eines Aggresoms, z. B. durch GFP250, resultiert in dem Zusammenbruch der intermediären Vimentin-Filamente, die dann das aggregierte Protein am MTOC wie ein Käfig umschließen.

Um zu untersuchen, ob die Protein-Aggregate im Fall von Hoxd13 zur Bildung eines Aggresoms führen, wurde in COS-1 Zellen, die mit dem +14Ala-Konstrukt transfiziert waren, zusätzlich Vimentin bzw. Tubulin, als Marker für das MTOC, angefärbt. Als Vergleich diente eine Transfektion mit GFP250, das im Aggresom am MTOC aggregiert.



**Abbildung 32: Färbung von Elementen des Zytoskeletts in Zellen mit Hoxd13 Protein-Aggregaten**

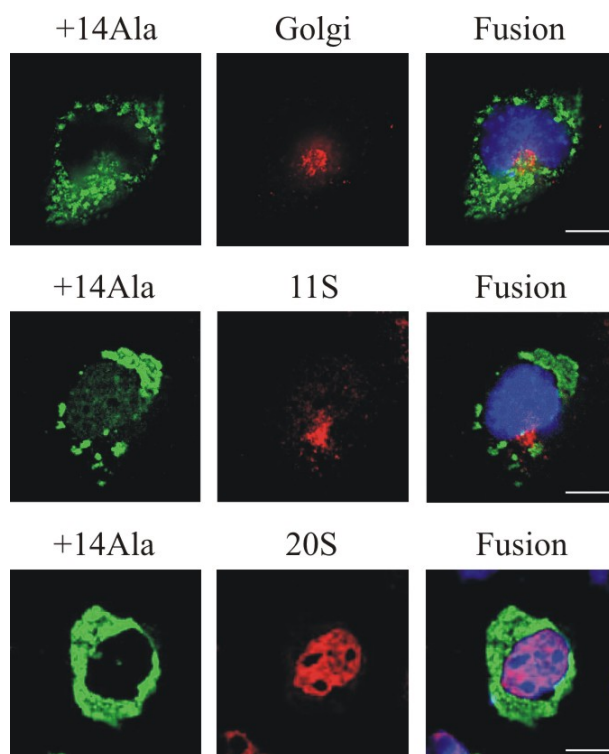
In transfizierten COS-1 Zellen wurde das +14Ala-Protein in grün angefärbt. Vimentin-Filamente, die Teil des intermediären filamentösen Zytoskeletts sind, und Tubulin, als Marker des MTOCs, wurden in rot markiert. Bei der Bildung eines Aggresoms durch GFP250 werden die Filamente mit dem Aggregat am MTOC zusammengelagert (obere Reihe). Durch die Aggregatbildung des mutierten Hoxd13-Proteins kommt es nicht zu so einer Veränderung des Zytoskeletts. Zudem sind die Aggregate nicht im Bereich des MTOCs konzentriert, sondern sind um den ganzen Zellkern herum verteilt.

Die Markierung der Elemente des Zytoskeletts der Zelle und der Vergleich mit GFP250 zeigen, dass die Aggregate des mutierten Hoxd13-Proteins nicht im Aggresom lokalisiert sind. Das Zytoskelett der Vimentinfasern bleibt unverändert und in der ganzen Zelle verteilt (Abb.32). Zudem sind auch die Proteinaggregate um den gesamten Zellkern herum locker verteilt und nicht dicht gepackt im MTOC, wie das bei GFP250 der Fall ist.

In der Nähe des MTOC liegen auch einige Zellorganellen, die beim Abbau fehlgefalteter Proteine eine Rolle spielen, so z. B. der Golgi-Apparat und das Proteasom. Um zu überprüfen, ob diese Zellorganellen mit den Hoxd13-Aggregaten co-lokalisieren, wurde der

Golgi-Apparat und die Proteasom-Untereinheiten 11S und 20S mit spezifischen Antikörpern in +14 Ala-transfizierten COS-1 Zellen angefärbt.

Weder der Golgi-Apparat noch die Untereinheiten des Proteasoms co-lokalisieren mit den Hoxd13-Aggregaten (Abb.33). Es kommt also durch die Aggregatbildung des mutierten Hoxd13-Proteins nicht zur Bildung eines Aggresoms und die Zellorganellen, die in diesem Fall für den Abbau der Proteine zuständig sind, zeigen keine Co-Lokalisation mit den Hoxd13-Aggregaten.



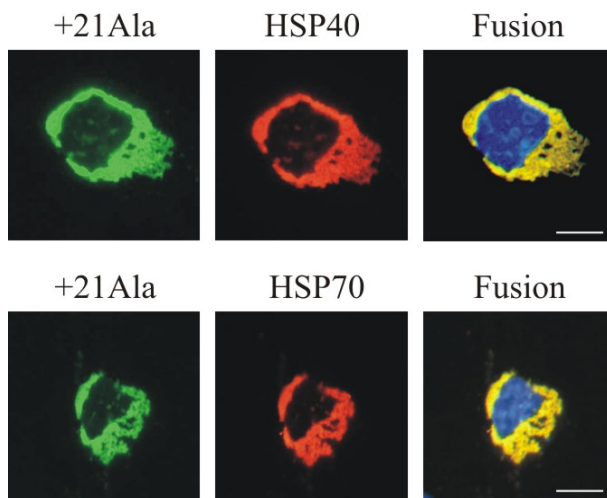
**Abbildung 33: Färbung vom Golgi-Apparat und der Ribosomen-Untereinheiten 11S und 20 S in Zellen mit Hoxd13 Protein-Aggregaten**

Das +14Ala-Protein ist in grün, Golgi und Ribosomen-Untereinheiten 11S und 20S in rot gefärbt. Man sieht, daß die Aggregate nicht mit diesen Zellorganellen, die beim Proteinabbau in einem Aggresom beteiligt sind, co-lokalisiert sind.

### 3.12) Co-Lokalisation mit Hitze-Schock-Proteinen

Bei der Faltung von neu-synthetisierten Proteinen spielen Chaperone, besonders die Hitze-Schock-Proteine (HSPs), eine entscheidende Rolle. Die HSPs sind darüber hinaus auch bei der Erkennung fehlgefalteter Proteine und einer möglichen Re-Faltung denaturierter Proteine beteiligt. Besonders die HSPs 40 und 70 können die Re-Faltung eines Proteins in eine aktive Form steuern oder auch intrazelluläre Proteinaggregate in lösliche Formen auftrennen. Aus diesem Grund wurde in den +14Ala-transfizierten COS-1 Zellen die Expression und Lokalisation dieser beiden HSPs mit spezifischen Antikörpern untersucht.





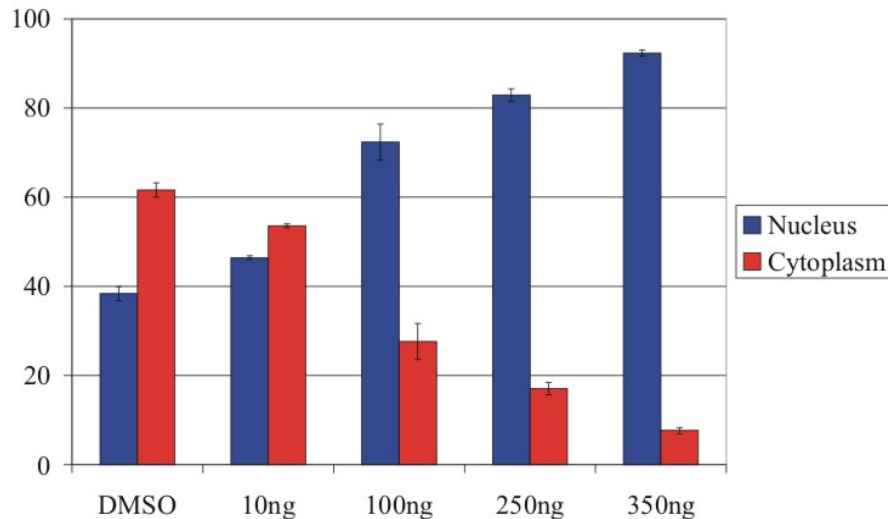
**Abbildung 34: Co-Lokalisation der Hoxd13 Protein-Aggregate mit den Hitze-Schock-Proteinen 40 und 70**

Das +21Ala-Protein ist in grün, die HSPs in rot gefärbt. Man sieht, dass beide HSPs in den Zellen mit Aggregaten stark exprimiert werden und mit dem mutierten Hoxd13-Protein co-lokalisieren.

Sowohl HSP40 als auch HSP70 werden stark in den transfizierten Zellen exprimiert und co-lokalisieren mit den Hoxd13-Proteinaggregaten (Abb.34). Durch die Aggregatbildung wird die Expression dieser beiden HSPs ausgelöst und beide Proteine werden in die Aggregate rekrutiert.

Man kann die Expression von *HSP40* und *HSP70* mit Geldanamycin, einer natürlich auftretenden Tumor-Droge, hochregulieren. Geldanamycin ist ein Inhibitor von HSP90, welches sonst den Heat-Shock-Transkriptionsfaktor HSF1 bindet, der die Expression von *HSP40* und *HSP70* aktiviert. Die Inhibierung von HSP90 durch Geldanamycin führt somit zu einer erhöhten Aktivierung der Expression von *HSP40* und *70*. Die COS-1 Zellen, die mit +14Ala transfiziert wurden, wurden zeitgleich mit Geldanamycin in verschiedenen Mengen behandelt. Nach ca. 40h wurde dann ausgezählt, in wie vielen Zellen das Protein im Zellkern lokalisiert ist und in wie vielen es noch Aggregate im Zytoplasma bildet. Dabei wurde DMSO, in dem Geldanamycin gelöst ist, als Kontrolle verwendet.

Man sieht deutlich, dass es durch die Gabe von Geldanamycin zu einem Rückgang der Aggregatbildung und einer Zunahme der Lokalisation des Hoxd13-Proteins im Zellkern kommt, abhängig von der gegebenen Menge (Abb.35). Damit konnte gezeigt werden, dass die HSPs 40 und 70 in der Lage sind, die Aggregatbildung des mutierten Hoxd13-Proteins zu verhindern oder entstehende Aggregate wieder aufzulösen, wenn sie bereits zu Beginn der Proteinexpression vorhanden sind.



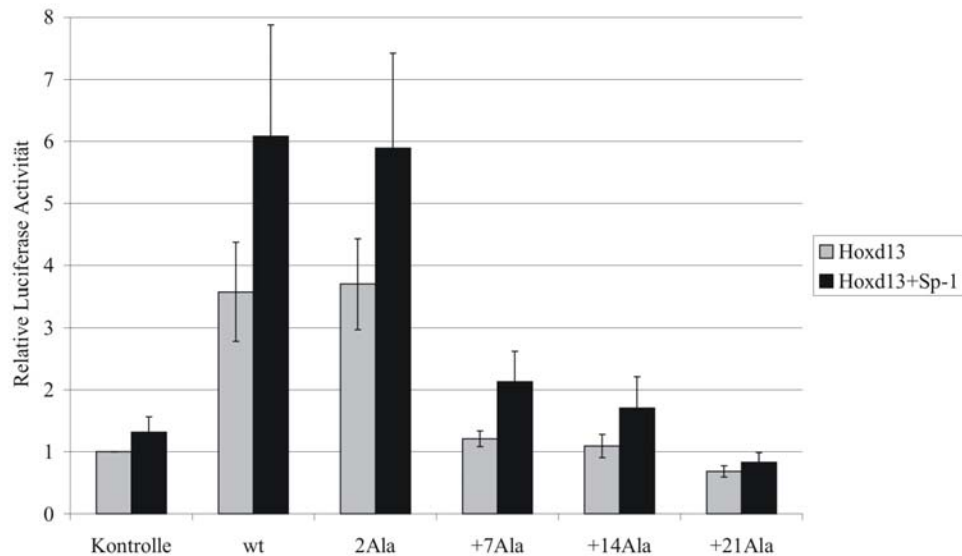
**Abbildung 35: Verteilung des +14Ala-Proteins zwischen Zellkern und Zytoplasma nach Gabe unterschiedlicher Mengen Geldanamycins**

Die blauen Balken stehen für eine Lokalisation im Zellkern, die roten für das Zytoplasma. Durch die Gabe von Geldanamycin kommt es zu einem Rückgang der Lokalisation im Zytoplasma und einer Re-Lokalisation im Zellkern abhängig von der gegebenen Menge.

Die Alanin-Expansionen in Hoxd13 führen somit wahrscheinlich zu einer Fehlfaltung des Proteins, da eine rechtzeitige, hohe Expression der HSPs 40 und 70, die fehlgefaltete Proteine erkennen und neu falten können, die Aggregatbildung verringert.

### 3.13) Transkriptionsaktivität von wt und mutiertem Hoxd13

Es ist noch nicht viel darüber bekannt, welche Gene spezifisch von Hoxd13 reguliert werden, da die Erkennungssequenz der DNA-bindenden Domäne sehr unspezifisch ist. Es wurde aber bereits gezeigt, dass die Expression von *Bmp4* direkt durch Hoxd13 aktiviert wird. Um zu testen, ob die Expansion des Alanin-Repeats einen Einfluss auf die Aktivität des Hoxd13-Proteins hat, wurde eine Luciferase-Messung mit einem *Bmp4*-Reporter-Konstrukt durchgeführt. Dabei wurden *Hoxd13*-Konstrukte mit verschiedenen langen Alanin-Expansion im Vergleich zum wt- und dem 2Ala-Konstrukt jeweils zusammen mit einem *Bmp4*-Promoter-Luciferase-Konstrukt und einer Renilla-Kontrolle in NG108-15 Zellen transfiziert und nach ca. 40h die Luciferase-Aktivität gemessen. Zur Verstärkung der Aktivität von Hoxd13 wurde ein SP-1-Konstrukt co-transfiziert. SP-1 gehört zu den GC-Box bindenden Proteinen und es ist bekannt, dass diese mit Hoxd13 und auch Hoxa13 kooperieren, um Transkription zu stimulieren. Als Kontrolle wurde statt dem *Hoxd13*-Konstrukt der Leervektor transfiziert.



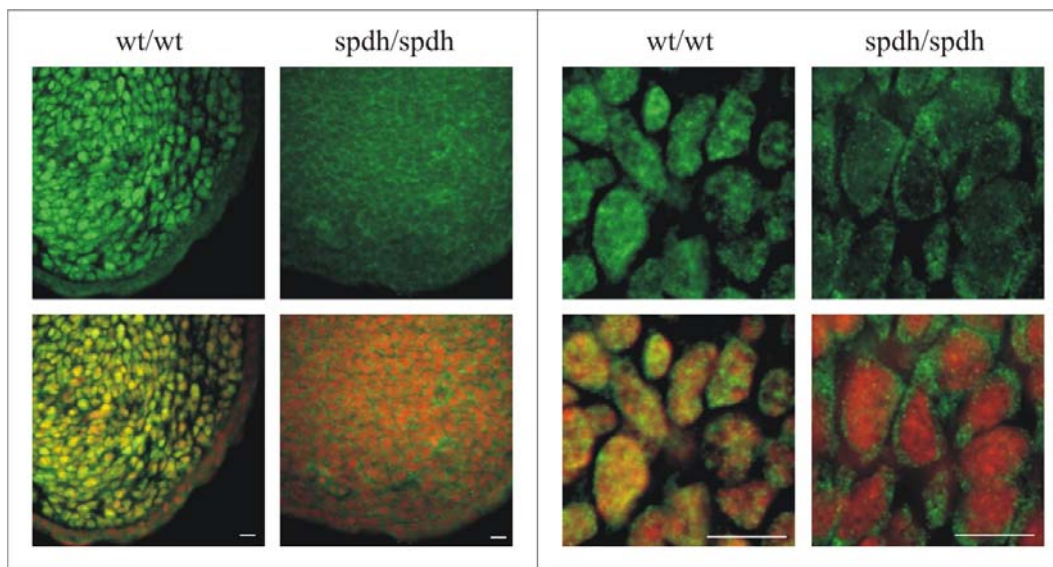
**Abbildung 36: Aktivierung des *Bmp4*-Promoters durch Hoxd13 mit verschiedenen langen Alanin-Repeats**

Das Diagramm zeigt die relative Luciferase-Aktivität der verschiedenen *Hoxd13*-Konstrukte ohne (grau) oder mit (schwarz) SP-1. Das wt- und 2Ala-Konstrukt zeigen eine deutliche Aktivierung des *Bmp4*-Promoters, die durch SP-1 noch verstärkt wird. Die Konstrukte mit +7 und +14 Alaninen zeigen eine deutlich geringere Aktivität, die aber noch über der Leervektor-Kontrolle liegt. Die +21Alanin-Expansion zeigt dagegen keine Aktivität mehr.

Man sieht im Diagramm (Abb.36), dass das wt- und das 2Ala-Konstrukt eine deutliche Aktivität zeigen und die Transkription vom *Bmp4*-Promoter stimulieren. Diese Aktivität wird durch die Co-Transfektion mit dem SP-1-Konstrukt noch verstärkt (schwarze Balken). Im Vergleich zur Kontrolle ohne Hoxd13, die gleich 1 gesetzt wurde, ist die relative Luciferase-Aktivität etwa um das 6-fache erhöht. Im Gegensatz dazu ist die Aktivität der Konstrukte mit Alanin-Expansionen deutlich reduziert bzw. keine Aktivität mehr vorhanden. So ist die Aktivität des +7Ala-Konstrukts nur etwa 2-fach erhöht und die des +14Ala-Konstrukts nur etwa 1,5-fach. Beim Konstrukt mit der längsten Expansion, +21 Alanine, ist keine Luciferase-Aktivität mehr vorhanden. Dies deutet darauf hin, dass durch die Expansionen des Alanin-Repeats die Aktivität des Hoxd13-Proteins reduziert bzw. gestört wird. Da das Konstrukt mit der Verkürzung des Repeats auf insgesamt 2 Alanine aber keine Veränderung in der Aktivität im Vergleich zum Wt zeigt, scheint der Alanin-Repeat an sich keine entscheidende Rolle für die Aktivität des Hoxd13-Proteins zu spielen.

### 3.14) Proteinverteilung *in vivo*

Um die Expression und Verteilung des mutierten Hoxd13-Proteins *in vivo* zu untersuchen, wurden Paraffinschnitte von Händen des Stadiums E13.5 von wt und homozygoten spdh Mäusen angefertigt. Das Hoxd13-Protein wurde dann mit einem spezifischen anti-Hoxd13-Antikörper markiert.



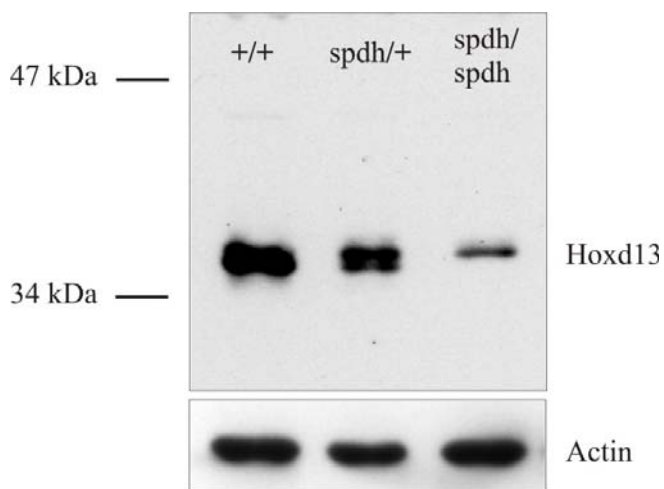
**Abbildung 37: Hoxd13 Protein-Verteilung in wt und mutanten Mäusen im Stadium E13.5 auf Paraffinschnitten**

Das Hoxd13-Protein ist in grün, die Zellkerne sind in rot angefärbt. Auf der linken Seite sieht man die Verteilung des Proteins mit geringer Vergrößerung (200-fach). Im Wt ist das Protein stark exprimiert. In der Mutante sieht man in Vergleich dagegen eine deutlich schwächere Expression. In der Vergrößerung (630-fach) auf der rechten Seite sieht man die Lokalisation des wt-Proteins im Zellkern. Das mutierte Protein dagegen zeigt Lokalisation primär im Zytoplasma.

Das Hoxd13-Protein ist im Wt stark exprimiert und ausschließlich im Zellkern lokalisiert (Abb.37). Bei der Mutante sieht man in der kleineren Vergrößerung eine deutlich schwächere Expression des mutierten Proteins im Vergleich zum Wt. Da bereits gezeigt wurde, dass in der Mutante die Hoxd13-RNA normal stark exprimiert ist, kann diese schwächere Expression des Proteins mit der Alanin-Expansion *in vivo* nur auf einen Abbau des Proteins zurückzuführen sein. In der höheren Vergrößerung sieht man zudem eine Verschiebung der Lokalisation des mutierten Proteins vom Zellkern ins Zytoplasma (Abb.36), wie es auch schon *in vitro* in der Zellkultur beobachtet wurde.

Um diese immunohistochemischen Ergebnisse zu bestätigen, wurde von je 3 wt, heterozygoten und homozygoten spdh-Mäusen Gewebe der Vorderpfoten des Stadiums

E13.5 lysiert und anschließend auf einem Western-Gel aufgetrennt und geblottet. Das Protein wurde dann mit dem spezifischen anti-Hoxd13-Antikörper detektiert.



**Abbildung 38: Analyse der Proteinmenge von je 3 wt, heterozygoten und homozygoten Mäusen im Western-Blot**

Proteinlysate der Vorderpfoten von je 3 Mäusen des Stadiums E13.5 wurden über ein Western-Gel aufgetrennt und geblottet. Das Hoxd13-Protein wurde mit einem spezifischen Antikörper markiert. Man sieht eine starke Bande im Wt. In der heterozygoten Spur ist die Bande etwa halb so intensiv und in der homozygoten Spur ist die Menge um etwa 90% reduziert.

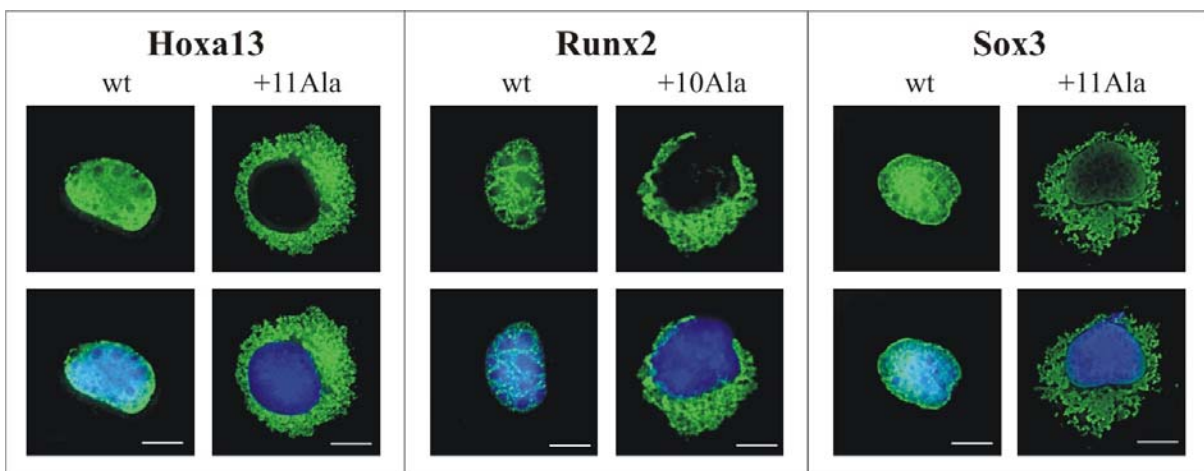
Man sieht auf dem Western-Blot deutlich die Banden des Hoxd13-Proteins (Abb.38). Während in der wt-Spur die Bande sehr stark ist, sind sie in den beiden anderen Spuren deutlich schwächer. In der heterozygoten Maus ist die Proteinmenge um ca. 50% reduziert, in der homozygoten um etwa 90%, womit sich das Ergebnis der Immunhistochemie auf Schnitten bestätigt.

*In vivo* wird das mutierte Protein in der homozygoten spdh-Mutante also zum Großteil abgebaut. Das wenige vorhandene mutierte Protein befindet sich im Gegensatz zum wt-Protein nicht im Zellkern, sondern hauptsächlich im Zytoplasma.

### 3.15) Aggregatbildung in 3 weiteren Polyalanin-Mutationen

Von den insgesamt 9 Genen mit Poly-Alanin-Mutationen, wurden drei weitere, *HOXA13* (mutiert +11 Alanine), *RUNX2* (mutiert +10 Alanine) und *SOX3* (mutiert +11 Alanine), jeweils in wt und mutierter Form in den pTL1-HA Expressionsvektor kloniert. Mit diesen wurden dann COS-1 Zellen transfiziert und die Lokalisation der Proteine überprüft.

Bei allen 3 Genen kommt es durch die Verlängerung des Alanin-Repeats zu einer Verschiebung der Lokalisation vom Zellkern ins Zytoplasma und zu Aggregatbildung des mutierten Proteins (Abb.39). Dies könnte ein Hinweis auf einen allgemeinen Mechanismus dieser Form der Mutation sein.



**Abbildung 39: Transfektion von COS-1 Zellen mit wt- und Alanin-Expansions-Konstrukten von *HOXA13*, *RUNX2* und *SOX3***

Die Proteine sind in grün und der Zellkern in blau gefärbt. Bei allen 3 Genen kommt es durch die Expansion des Alanin-Repeats zu Aggregatbildung im Zytoplasma, während die wt-Proteine im Zellkern lokalisiert sind.