

**MOLEKULARGENETISCHE
ANALYSE DER MAUSMUTANTE
„SHORT DIGITS” (DSH)**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dipl. Biol. **MICHAEL NIEDERMAIER**

Berlin, Juli 2005

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Mundlos

Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Ihnestr. 73, 14195 Berlin

Tel.: 8413/1267

mundlos@molgen.mpg.de

2. Gutachter: Prof. Dr. Ansgar Klebes

Freie Universität Berlin

Institut für Biologie – Genetik, Arnimallee 7

Tel.: 838/55138

klebes@genetik.fu-berlin.de

Disputation am 10.10.2005

1	Einleitung.....	1
1.1	Identifizierung von Krankheitsgenen beim Menschen	1
1.2	Kopplungsanalyse.....	2
1.3	Modellsystem Maus	3
1.4	Vertebraten Entwicklung	5
1.5	Gene der Hedgehog-Familie in Vertebraten.....	6
1.6	Hedgehog Signaltransduktion	7
1.7	Shh während der Musterbildung in der Gliedmaßenanlage.....	9
1.8	Hedgehog Gene und assoziierte humane Erkrankungen.....	12
1.9	Die „short digits“ (Dsh) Mausmutante	13
1.10	Zielstellung der Arbeit	13
2	Material und Methoden.....	14
2.1	Material	14
2.1.1	Chemikalien.....	14
2.1.2	Radiochemikalien	14
2.1.3	Pufferlösungen.....	14
2.1.4	Enzyme	14
2.1.5	Kits	15
2.1.6	Vektoren	15
2.1.7	Bakterien.....	15
2.1.8	DNA Banken	15
2.1.9	Tiere.....	16
2.1.10	Datenbanken und Tools für in silico Analysen	16
2.2	Methoden.....	17
2.2.1	Plasmid DNA Präparation	17
2.2.2	BAC DNA Präparation.....	17
2.2.3	Genomische DNA Extraktion aus Mausgewebe	17
2.2.4	Automatisierte DNA Isolierung (GenoM-48 Robotic Workstation).....	18
2.2.5	Wiedergewinnung von DNA Fragmenten.....	18
2.2.6	Aufreinigung von PCR Produkten.....	18
2.2.7	Isolierung von RNA	19
2.2.8	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	19
2.2.9	Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren.....	20
2.2.10	Radioaktive Sondengenerierung durch in vitro Transkription	21
2.2.11	Southern Blot Hybridisierung.....	21
2.2.12	Northern Blot Hybridisierung.....	22
2.2.13	Real-time PCR.....	23
2.2.14	Klonierung/ Rekombinante DNA	24
2.2.15	Bruchpunktklonierung	24
2.2.16	Genotypisierung	25
2.2.17	Nichtradioaktive In situ Hybridisierung auf Gefrierschnitten.....	26
2.2.18	Radioaktive In situ Hybridisierung auf Paraffinschnitten	27
2.2.19	Fluoreszenz In situ Hybridisierung (FISH) auf Chromosomen.....	28
2.2.20	Skelettpräparation	28

2.2.21	Hämatoxylin/ Eosin Färbung.....	29
2.2.22	LacZ Färbung	29
2.2.23	Feinkartierung.....	30
2.2.24	Magnetresonanztomographie (MRT)	32
3	<i>Ergebnisse</i>	33
3.1	Homozygoter (<i>Dsh/Dsh</i>) Phänotyp	33
3.2	Heterozygoter (<i>Dsh/+</i>) Phänotyp.....	34
3.3	Komplementationstest.....	37
3.4	<i>Sonic hedgehog</i> Expressionsanalyse.....	38
3.5	Mutationsanalyse von <i>Sonic hedgehog</i>	39
3.6	Feinkartierung	41
3.7	Identifizierung der <i>Dsh</i> Inversion	45
3.8	Einfluß der <i>Dsh</i> Inversion auf flankierende Gene.....	49
3.9	Molekulare Konsequenzen der <i>Dsh</i> Inversion.....	51
3.10	Identifizierung von konservierten nichtcodierenden Elementen (CNE) durch vergleichende Genom Sequenzanalyse	55
3.11	Funktionelle Charakterisierung der CNE mittels Reporter-Konstrukten	57
4	<i>Diskussion</i>	59
4.1	Überblick	59
4.2	<i>Dsh/Dsh</i> und <i>Shh</i> sind allelisch	60
4.3	Die <i>Shh</i> Expression ist in <i>Dsh/Dsh</i> Embryonen misreguliert.....	61
4.4	Sequenzierung des 14 kb <i>Shh</i> Locus von <i>Dsh/Dsh</i>	62
4.5	Identifikation einer Inversion bei <i>Dsh</i> auf Chromosom 5	62
4.6	Molekulare Konsequenzen der <i>Dsh</i> Inversion.....	65
4.7	Bedeutung und Analyse von CNEs	69
4.8	Cis-Regulation von <i>Sonic hedgehog</i>	72
4.9	<i>Dsh/+</i> als Modell für die Entstehung von Brachydaktylie.....	74
4.10	Ausblick	78
5	<i>Literaturverzeichnis</i>	79
6	<i>Zusammenfassung</i>	90
7	<i>Summary</i>	92
8	<i>Anhang</i>	94