

3 Ergebnisse

"Short digits" (*Dsh*) ist eine strahleninduzierte Mausmutante mit semidominantem Erbgang. Selby et al beschrieben 1993 erstmalig den Phänotyp.

3.1 Homozygoter (*Dsh/Dsh*) Phänotyp

Homozygote Mutanten sind lethal, jedoch überleben ungefähr 50% der *Dsh/Dsh* Embryonen bis zur Geburt, sterben aber kurz danach. *Dsh/Dsh* Mutanten sind durch eine große Anzahl von internen und skelettären Defekten charakterisiert: Die internen Defekte entstehen aufgrund eines schweren Mittelliniendefekts und beinhalten das volle Spektrum der Holoprosencephalie mit allen assoziierten Missbildungen: Diese beinhalten die Fusion des Frontalhirns, Defekte im Mittelgesicht und die Fusion der Augenanlage, welche zur Zyklopie führt. Weitere Defekte der homozygoten Mutante bestehen unter anderem in einer hypoplastischen Lunge, einem singulären Ventrikel und einer mittelständigen Niere (nicht abgebildet). *Dsh/Dsh* Embryonen sind ab E10.5 vom Wildtyp aufgrund des schweren Mittelliniendefekts zu unterscheiden. Im Verlauf der weiteren Entwicklung sind *Dsh/Dsh* Embryonen durch die Fusion des Frontalhirns mit der Nasenanlage gekennzeichnet, welche sich in einer nasenartigen Struktur, dem Proboscis manifestiert. Die fast vollständige Abwesenheit der Muskulatur [Kruger et al., 2001] läßt die *Dsh/Dsh* Embryonen ab E14.5 als "Hautsäcke" erscheinen, welche neben dem Proboscis und der Zyklopie durch die unausdifferenzierten Extremitäten charakterisiert sind. Die skelettären Fehlbildungen umfassen die vollständige Abwesenheit von craniofaziellen Knochen, knorpelartiges Gewebe in der cranofaziellen Region ist jedoch vorhanden, wird aber nicht ossifiziert. Darüber hinaus fehlen in der homozygoten Mutante die Wirbelkörper, dorsale Rippen, und distale Extremitätenstrukturen. In der Vorderextremität werden Scapula und Humerus gebildet; ein einzelner Knochen, der Radius und Ulna ersetzt ist mit dem Humerus im Gelenkbereich fusioniert. In der hinteren Extremität ist der Femur vorhanden und grenzt an die Tibia, welche kurz nach dem Gelenk trunkiert ist. Der Autopod (Fuß) ist in den hinteren Gliedmaßen nicht vorhanden. In der vorderen Extremität ist der Autopod (Hand) durch ein einziges, fingerähnliches Element repräsentiert (Abbildung 3).



Abbildung 3: Dsh/Dsh Phänotyp
Dargestellt ist der Phänotyp von E17.5 Embryonen. Dsh/Dsh Embryonen zeigen eine starke Abweichung des Habitus. Im Vergleich zum Wildtyp erscheinen sie als „Hautsack“, geprägt durch eine nasenartige Struktur, Probozise, und die Fusion der Augenanlage (Zyklopie). Alizarin Rot (Knochen) /Alcain Blau (Knorpel) gefärbte Skelettpräparationen zeigen die schweren Defekte der craniofacialen Region, des axialen Skellets und der Extremitäten.

Die Phänotypen von Dsh/Dsh und Shh^{-/-} [Chiang *et al.* 1996] sind sich in vielen Aspekten sehr ähnlich, es gibt jedoch einen auffälligen Unterschied: Im Gegensatz zur heterozygoten Sonic hedgehog (Shh) Maus weist die Dsh^{+/+} Mutante einen offensichtlichen Phänotyp auf.

3.2 Heterozygoter (Dsh/+) Phänotyp

Heterozygote Träger des defekten Allels weisen einen charakteristischen Phänotyp auf, der namensgebend für die Mutante war: Dsh^{+/+} Mäuse haben kurze Finger, daher *short digits* Dsh als Bezeichnung der Maus Mutante. Die kurzen Finger werden durch eine Fusion der ersten und zweiten Phalanx im Finger 2-5 und einer verkürzten proximalen Phalanx im Finger 1 hervorgerufen. Die Mittelhandknochen (Metacarpalia) und

Mittelfußknochen (Metatarsalia) sowie auch das übrige appendikuläre Skelett weisen keine Veränderungen auf. Zu Beginn von E14.5 ist die Chondrogenese in den Phalangen und Metacarpalia bzw. Tarsalia von Dsh/+ Mäusen verzögert; dies zeigt sich durch eine fehlende Alcian Blau Färbung (Abbildung 4). Zum Zeitpunkt E 15.5 haben sich im Wildtyp die proximale (P1), mittlere (P2) und distale (P3) Phalanx gebildet und sind durch Gelenke voneinander getrennt. In der Dsh/+ Maus hingegen ist zu diesem Zeitpunkt ein einzelner Knochen vorhanden, der aus einer Fusion von P 1 und P 2 entsteht. Dieser ist außerdem nicht vollständig von den Metacarpalia durch ein Gelenk getrennt. Phalanx P 3 zeigt keine Auffälligkeiten und ist regulär geformt. Die proximale Phalanx im ersten Finger ist gespalten. In den Extremitäten von 4 Wochen alten Dsh/+ Mäusen sind die Finger II-V stark verkürzt aufgrund der Fusion von P1 und P2. Zusätzlich kann eine milde Verkürzung der Metacarpalia beobachtet werden. (Abbildung 4A) Die distale Phalanx sowie das distale interphalangeale Gelenk sehen normal gebildet aus. Im Finger IV ist das metacarpophalangeale Gelenk fusioniert. Vorder und Hinterextremität der Dsh/+ Maus sind von den beschriebenen Alterationen im selben Ausmaß betroffen. Der Dsh/+ Phänotyp ist daher der humanen Brachydaktylie Typ A1 sehr ähnlich.

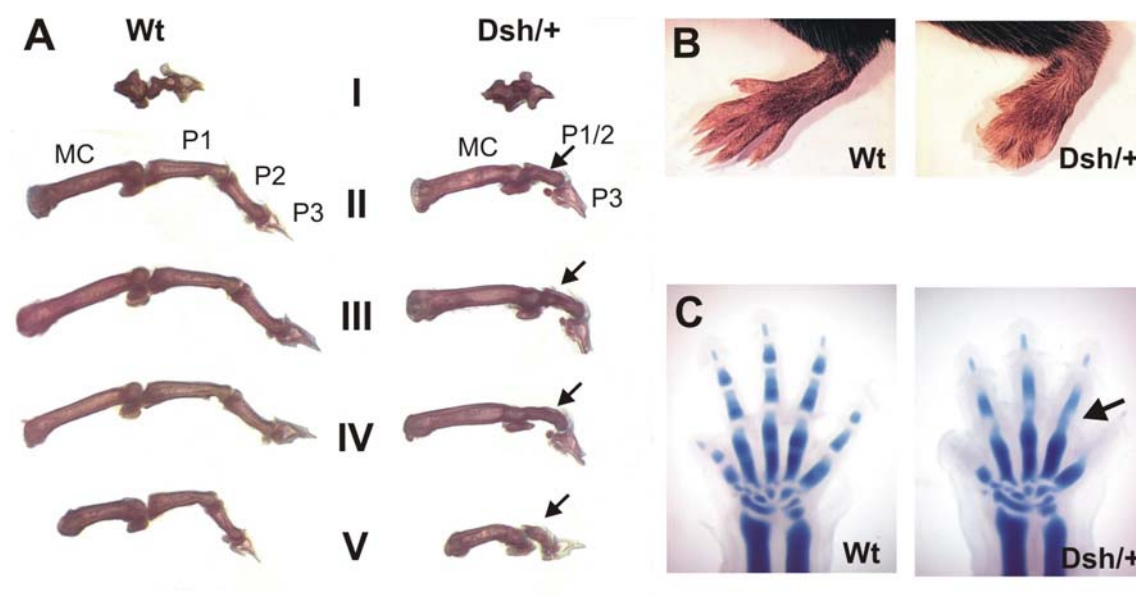


Abbildung 4: Dsh/+ Hand Phänotyp.

(A) Alizarin Rot gefärbte Skelettpräparation von 4 Wochen alten Wildtyp und Dsh/+ Fingern der Vorderpfote. MC, Metacarpalia. Finger I-V sind abgebildet. In den Fingern von Dsh/+ Mäusen sind die Elemente P1 und P2 fusioniert (P1/2, Pfeile) und stark verkürzt. Im Finger IV ist das metacarpophalangeale Gelenk fusioniert. (B) In der Hinterpfote von adulten Wt und Dsh/+ Mäusen kann man deutlich die starke Verkürzung der Finger erkennen. (C) Alcian Blau Färbung von E15.5 Wt und Dsh/+ Händen. Die Anlage der mittleren Phalanx (P2) fehlt in allen Fingern. Eine durchgängige Färbung zwischen den entstehenden Metacarpalia und P1 läßt auf eine verzögerte oder fehlende Gelenkbildung schließen.

Mit Hilfe von Magnetresonanztomographie (MRT) und klassischer Histologie wurde im Rahmen dieser Arbeit mit der Analyse des Zentralen Nervensystems der *Dsh/+* Maus begonnen. Erwachsene *Dsh/+* Mäuse zeigen im Alter von 4 Monaten erhebliche Defekte in der Ausbildung von neuronalen Strukturen: Am auffälligsten ist das fast vollständige Fehlen des Flocculus nodularis des Cerebellums. Dies konnte sowohl mit Hilfe von MRT Aufnahmen als auch auf Gefrierschnitten des adulten Gehirns nachgewiesen werden (Abbildung 5). Der Flocculus nodularis ist im wesentlichen für die Steuerung der Okulomotorik und für die Stützmotorik zuständig. Erwachsene *Dsh/+* Mäuse zeigen im Vergleich zum Wildtyp keine Störung des Bewegungsablaufs. Außerdem sind in der *Dsh/+* Maus stark vergrößerte Ventrikel zu erkennen. Diese sind bereits im Embryonalstadium E 15.5 angelegt. Zu diesem Zeitpunkt kann eine verminderte *Sonic hedgehog* Expression im Cortex mittels in situ Hybridisierung gezeigt werden.

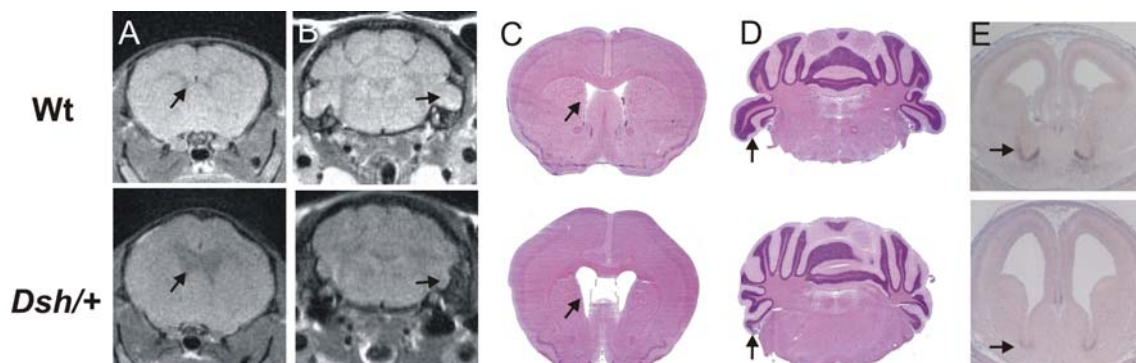


Abbildung 5: Neuraler *Dsh/+* Phänotyp

MRT Aufnahmen von 4 Monate alten Wt und *Dsh/+* Mutanten (A, B). *Dsh/+* Mutanten weisen vergrößerte Ventrikel auf (A) und besitzen nur eine rudimentäre Anlage des Flocculus nodularis im Cerebellum (B). Hematoxylin-Eosin gefärbte Schnitte von adulten Wt und *Dsh/+* Vorderhirn und Cerebellum (C, D) bestätigen die Ergebnisse der MRT. In situ Hybridisierung von E 15.5 Wt und *Dsh/+* Frontalhirnschnitten zeigt eine reduzierte *Shh* Expression im Cortex (Pfeile). Vergrößerte Ventrikel sind in *Dsh/+* bereits vorhanden.

3.3 Komplementationstest

Um zu überprüfen, ob *Dsh* und *Sonic hedgehog (Shh)* allelisch sind wurden *Shh*^{+/-}-Mäuse (freundlicherweise von P.Beachy zur Verfügung gestellt) mit *Dsh*^{+/+}-Mäusen gekreuzt. Die resultierenden doppelt heterozygoten (*Dsh*^{+/+} *Shh*^{+/-}) Mäuse wurden mit *Dsh*^{/Dsh} und *Shh*^{-/-}-Mäusen verglichen: Hierbei zeigen *Dsh*^{+/+} *Shh*^{+/-}-Mäuse einen nahezu identischen Phänotyp im Vergleich zu *Shh*^{-/-} und *Dsh*^{/Dsh}-Mäusen: Der gemeinsame Phänotyp ist charakterisiert durch das volle Spektrum der Mittelliniendefekte, internen Abnormalien und Malformationen des axialen Skelettes sowie der Extremitäten (Abbildung 6). Interessanterweise sind E17.5 *Dsh*^{/Dsh} Embryonen größer und der Proboscis erscheint im Vergleich mit *Shh*^{-/-} Embryonen größer. Die nahezu identischen Phänotypen der Individuen des Komplementationstest belegen, dass *Dsh* und *Shh* nicht komplementieren und somit allelisch sind.

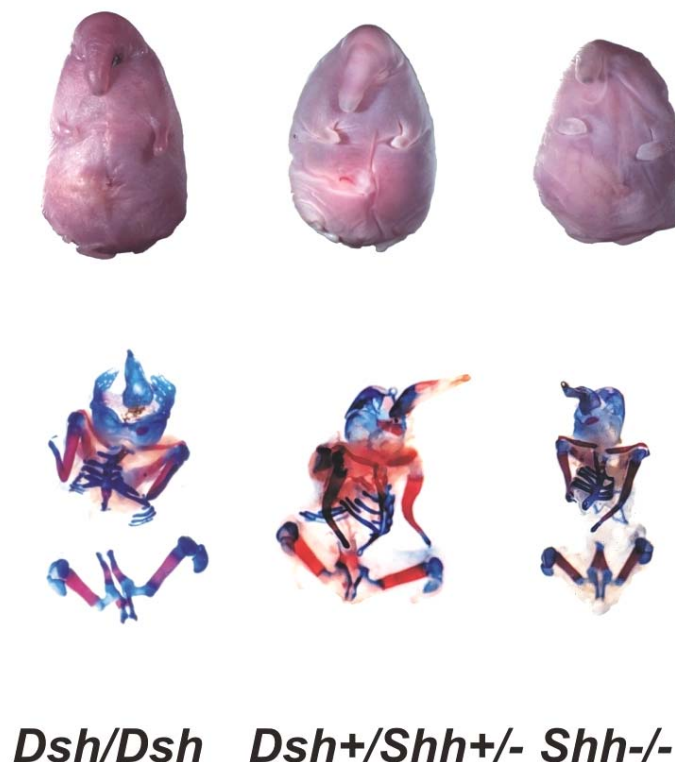


Abbildung 6: Komplementationstest

Übersicht der resultierenden Phänotypen des Komplementationstest: E17.5 Embryonen aus den Verkreuzungen von *Dsh*^{+/+} und *Shh*^{+/-}-Mäusen. Alizarin Rot und Alcain Blau-gefärbte Skelettpräparationen. *Dsh*^{/Dsh}, *Dsh*^{+/+};*Shh*^{+/-}, und *Shh*^{-/-} Embryonen zeigen einen nahezu identischen Phänotyp.

3.4 *Sonic hedgehog* Expressionsanalyse

Nachdem bestätigt wurde, dass *Dsh* und *Shh* allelisch sind, galt es zu klären, ob und in welchem Ausmaß die Transkription von *Shh* in der *Dsh* Mutante betroffen war. Initial wurde die *Shh* Expression mit Hilfe einer Northern Blot Hybridisierung untersucht. Im Stadium E10.5 kann kein *Shh* Transkript in *Dsh/Dsh* Embryonen nachgewiesen werden. Im Stadium E 11.5 konnte in *Dsh/Dsh* Embryonen eine sehr geringe *Shh* Restexpression detektiert werden. Um eine exakte Quantifizierung der Transkriptmenge zu ermöglichen wurden mit Hilfe der Realtime PCR die Embryonalstadien E 10.5 bis E 13.5 untersucht: Die Quantifizierung der *Shh* Expression wurde unter Anwendung der Standard Kurven Methode durchgeführt, die einen Abgleich gegen ein ubiquitäres Haushaltsgen (*Gapdh*) vornimmt. Hierbei zeigt sich in den Stadien E 10.5 und E 11.5, dass in *Dsh/Dsh* Embryonen kein *Shh* Transkript gebildet wird. Im Stadium E 12.5 und E 13.5 konnte jedoch überraschenderweise *Shh* Transkript nachgewiesen werden: Die Quantifizierung der *Shh* Expression im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp im Stadium E12.5 und E 13.5 zeigt eine Reduktion auf 10% und 27%.

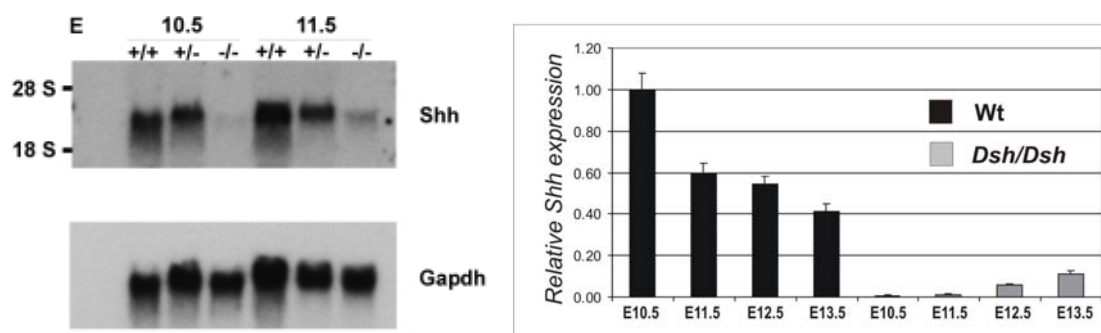


Abbildung 7: *Shh* Expressionsanalyse

(linke Seite): Northern Blot: Gesamt RNA aus E 10.5 und E 11.5 Maus Embryonen wurde mit einer ^{32}P *Shh* cDNA Sonde hybridisiert. Die *Gapdh*-Sonden-Hybridisierung diente als Kontrolle. (rechte Seite): Quantitative RT-PCR von Wt und *Dsh/Dsh* RNA Proben, die aus Embryonen der Stadien E10.5, E11.5, E12.5 und E13.5 isoliert wurden. Die Balken stellen den Grad (+/- SD) der *Shh* Expression relativ zum Wt E 10.5 dar.

3.5 Mutationsanalyse von *Sonic hedgehog*

Eine initiale Kartierung, die vor dem Beginn dieser Arbeit durchgeführt wurde, legt den *Dsh* Locus auf den proximalen Bereich von Chromosom 5 fest. Das Intervall umfasst auch das *Shh* Gen. Aufgrund dieser Vorarbeiten, den Ergebnissen aus dem Komplementationstest und der Expressionsanalyse wurde *Shh* als primärer Kandidat einer Mutationsanalyse unterzogen. Der *Shh* Locus konnte mit Hilfe der Sequenzdaten der NCBI Datenbank (2001) zusammengefügt (assembliert) werden. Eine 14 kb genomische *Shh* Region, die die Exone 1-3, den Promoterbereich und den brain enhancer enthält wurde PCR amplifiziert. Die resultierenden Fragmente wurden in PCR XL Topo Vektor kloniert und sequenziert. Der 10 kb stromaufwärts gelegene floor plate enhancer (enhancer/ engl:Verstärker der Transkription), zu diesem Zeitpunkt neben dem brain enhancer einzig bekanntes cis regulatorisches Element, wurde ebenfalls amplifiziert und sequenziert. Als Ausgangsmaterial dienten cDNA und genomische DNA folgender Mausstämme: Dsh/Dsh, C57Bl6, 101, C3H. In diesen Bereichen konnten keine Mutationen festgestellt werden. Allerdings konnten im gesamten 14 kb umfassenden *Shh* Locus Sequenzpolymorphismen detektiert werden (Abbildung 8). Die ermittelten Polymorphismen sind 101 spezifisch. Dies belegt, dass die Mutation im 101 Chromosom des bestrahlten (101/C3H) F1 Männchen induziert worden ist. In der PIP Maker Übersicht des sequenzierten *Shh* Locus sind die Positionen der 101 Stammpolymorphismen mit Pfeilen markiert. Die Sequenzpolymorphismen sind in nachfolgender Tabelle 1 dokumentiert.

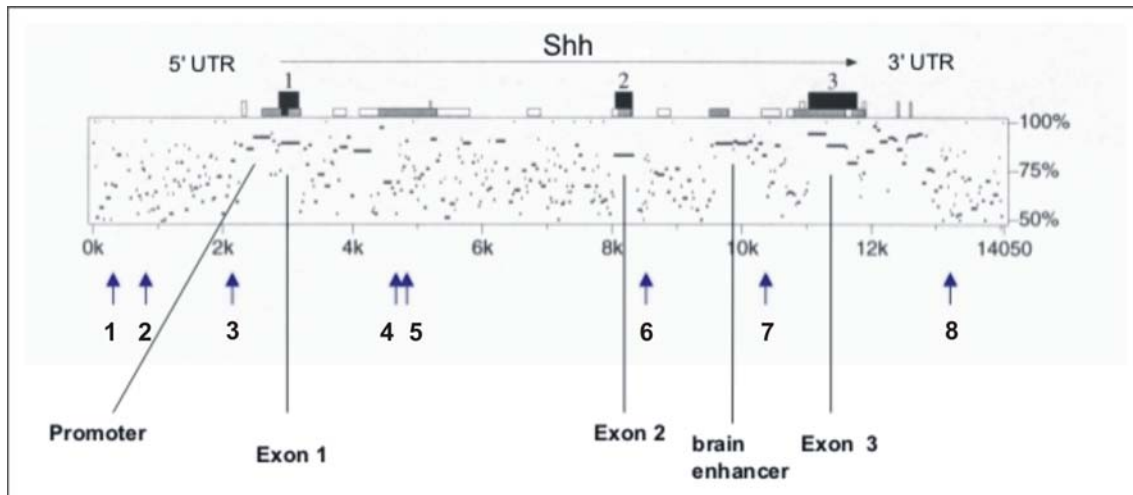


Abbildung 8: PIP Maker Übersicht des sequenzierten 14 kb *Shh* Locus

PIP (engl: Plot der Identität in Prozent) Übersicht des genomischen Maus-Mensch Vergleich des sequenzierten 14kb *Shh* Locus zeigt die konservierten Exone 1-3, den Promoter und brain enhancer. Die signifikanten Alignments sind als horizontale Linien (x-Achse) dargestellt, die Identität der Alignments ist in Prozent (y-Achse) angegeben. Im gesamten 14kb *Shh* Locus von Dsh/Dsh konnten keine Mutationen festgestellt werden. Die Positionen der identifizierten Sequenzpolymorphismen sind mit Pfeilen markiert.

Sequenzpolymorphismus	1	2	3	4	5	6	7	8
Position (bp)	329	920	2025	4862	4950	8543	10807	13189
Datenbank	G	T	T	A	G	A	A	TG
Dsh/Dsh	A	G	C	G	A	G	G	CA
101	A	G	C	G	A	G	G	CA
C57Bl/6	G	T	T	A	G	A	A	TG
C3H	G	T	T	A	G	A	G	TG

Tabelle 1: Zusammenfassung der Sequenzpolymorphismen im 14kb *Shh* Locus

3.6 Feinkartierung

Die initiale Kopplungsanalyse, bei der 109 Meiosen ausgewertet wurden, legte den Dsh kritischen Bereich auf ein 14cM großes Intervall zwischen den Mikrosatelliten Markern D5 Mit 331 (3cM) und D5 Mit 44 (17cM) auf Chromosom 5 fest.

Um die Dsh kritische Region weiter einzugrenzen und die molekulare Ursache der Dsh Mutante zu entschlüsseln wurde ein positioneller Klonierungsansatz verfolgt. Für die notwendige Feinkartierung wurde ein Backcross (Outcross und anschließender Intercross) vorgenommen: Zuerst wurden Heterozygote Dsh/C57BL10 Mäuse auf den Balb/c Mausstamm eingekreuzt (Outcross). In einem zweiten Schritt wurden anschließend die von der Mutation betroffenen F1 (+/m) Individuen untereinander verkreuzt (Intercross). Die resultierenden F2 Individuen des Genotyps (+/m) wurden für eine Feinkartierung an definierten Marker Loci genotypisiert.

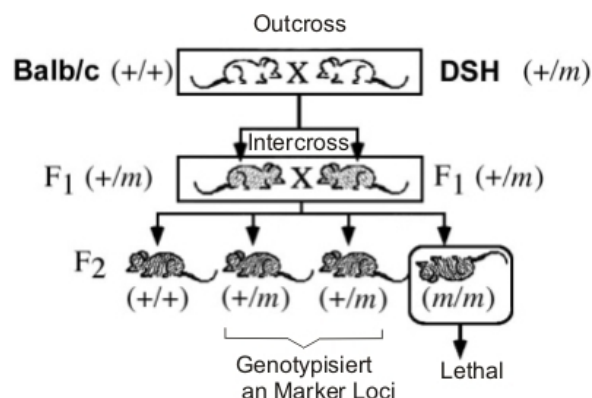


Abbildung 9: Kreuzungsschema zur Generierung der Mäuse für die Feinkartierung. Heterozygote Dsh/+ Böcke wurden mit Balb/c Weibchen verkreuzt (Outcross). Betroffene F1 (+/m) Individuen wurden untereinander verkreuzt (Intercross). Die resultierenden F2 heterozygoten Träger (+/m) des defekten Allels wurden an Marker Loci genotypisiert.

Den hierdurch generierten F2 Tieren wurde im Alter von 3 Wochen eine Schwanzbiopsie entnommen und daraus DNA isoliert. Zu diesem Zeitpunkt ist eine eindeutige Bestimmung des Phänotyps (kurze Finger) möglich und somit wurden

ausschließlich heterozygote Träger des defekten Allels einer Genotypisierung an definierten Marker Loci unterzogen. Für das zu untersuchende 14 cm Intervall auf Chromosom 5 wurden zum einen Mikrosatelliten Marker aus Datenbanken (<http://www-genome.wi.mit.edu>) verwendet. Diese klassischen Mikrosatelliten Marker sind meist $(CA)_n$ - Repeat Marker. Hierbei handelt es sich um repetitive Abfolgen zweier Nukleotide, meist mit 20 bis 30 Wiederholungseinheiten. Diese Bereiche im Genom können in den verschiedenen Mausstämmen polymorph sein, das heißt sich in der Anzahl der repetitiven Einheiten unterscheiden [Love et al., 1990]. Diese polymorphen Marker können zur Kartierung der *Dsh* Mutante verwendet werden, sie waren jedoch nur begrenzt verfügbar. Somit mussten für den zu untersuchenden Bereich weitere Repeat Marker entwickelt werden:

Mit Hilfe des Tandem Repeat Masker Programmes, und des vollständig sequenzierten Mausgenoms (2003) war es möglich, an vielen Positionen im Genom innerhalb des Intervalls auf Chromosom 5 repetitive Bereiche zu identifizieren. Das Tandem Repeat Masker Programm ist in der Lage, in einer gegebenen Sequenz Di, Tri, Tetra etc. Wiederholungen von Nukleotidsequenzen zu erkennen. Die flankierenden Sequenzen, die einen Repeat Bereich umgeben, wurden benutzt, um Primer für den jeweiligen Bereich zu generieren. Die Primer wurden anschließend einer genomweiten Blast Analyse unterzogen (<http://www.ensembl.org/BLAST>). Dies ist von entscheidender Bedeutung zur Vorauswahl der Marker. Die Marker wurden anschließend mittels PCR mit genomischer Maus DNA der Stämme C57, 101 und Balb/c getestet. Zur exakten Bestimmung der 101 und Balb/c Allele des jeweiligen Markers und zur Überprüfung, ob die Marker für die Mausstämmen polymorph und somit informativ sind, wurden mit Hilfe einer Einzelreaktion-Nested PCR Methode (siehe Material/Methoden 2.2.22) HEX - fluoreszenzmarkierte PCR Fragmente des jeweiligen Mausstammes hergestellt. Die Produkte wurden mit ROX Standard (Perkin Elmer) versetzt und auf einem ABI 3100 Prism Genetic Analyzer analysiert. Alle generierten Marker wurden sequenzverifiziert. Die unterschiedlichen Allele für die in der Feinkartierung verwendeten polymorphen Marker und die jeweiligen Primer Sequenzen der Marker sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Repeat Marker Name / (Repeat) _n	Primersequenz (5'- 3')	Allel 101	Allel Balb/c
D5 Mit 331 (CA) ₂₁	For: TGTAACGACGGCCAGTTACCACATAGAG ATGAGATGTATTTGA Rev: TCT TTT TAA GGG TGG GTA ATA TTC C	111 bp	107
D5Mit 226 (CA) ₂₃	For: TGT AAA ACG ACG GCC AGT ACA GAT CAC GTT CAG GAA TGG Rev:GAA ACT GGA GGA AGA AGG GG	98 bp	104 bp
D5N 2 (CA) ₂₀	For: : TGT AAA ACG ACG GCC AGT TTG TCC CCA ACC TAG TCA GG Rev: AGG GAG ACA AAG GTG GGA GT	359 bp	349 bp
D5N 5 (CA) ₂₃ (TAGA) ₈	For: TGT AAA ACG ACG GCC AGT GGA ATT CAG TTC CCA GCA CA Rev: CAG CAT GTG TGA AGT CCT TGA T	265 bp	267 bp
D5N 8 (CA) ₂₂	For: TGT AAA ACG ACG GCC AGT TGG AAT TAA GAT GGC AGA AAC A Rev: AGG CAG TGA GGA GGC AGA TA	277 bp	291 bp
D5Mit 387 (CA) ₂₀	For: TGT AAA ACG ACG GCC AGT CCC CAT GTA TCT CTA GAT TAA CAA TG Rev: GCA CTC GTG TAC ATA ACC AAA TAC	176 bp	182 bp
D5N 12 (GA) ₂₂	For: TGT AAA ACG ACG GCC AGT GTG GGT AGG TTG GAG AGC AA Rev: : CAC GTG TCT GGC TAC CTG TG	195 bp	205 bp
D5N 13 (CA) ₂₆	For: TGT AAA ACG ACG GCC AGT AGC AAC CAT GAG GGT CAA AC Rev: TCA ACC TGT CAC CCT TTT CC	232 bp	246 bp
D5N 15 (CA) ₂₃	For: : TGT AAA ACG ACG GCC AGT ACC CTG ATT CTT GCT GAT GC Rev: CAT AGC CCA CAC ATG TCC AC	171 bp	177 bp
D5N 18 (CA) ₃₀	For: TGT AAA ACG ACG GCC AGT GCA GGA GCT TAA GGC ACA TC Rev: ACG TGT GAG GGG TTG TTC TG	226 bp	224 bp
D5N 19 (CA) ₂₆	For: TGT AAA ACG ACG GCC AGT TAT GGC TGT CAT GTC CCA GA Rev: TGA TTT CCT GGC ATT TTT CC	323 bp	325 bp
D5N 22 (TC) ₂₄	For: TGT AAA ACG ACG GCC AGT GCC TTC CAC ATC TCA GTG CT (38-mer) Rev: : TGA GTT TCA TGT TGA GGT GGA (21-mer)	320 bp	330 bp
D5Mit 229 (CA) ₂₅	For: TGT AAA ACG ACG GCC AGT TGG AAG TTG GTT CAT CAG CA Rev: : ACT GTC CCT GGT CTC TGC AT	116 bp	120 bp
D5Mit 13 (CA) ₂₄	For: : TGT AAA ACG ACG GCC AGT CAT CGT TGC TCT TGA CAG GA Rev: CCG GGA GAA CCC AAA TAA GT	206 bp	194 bp

Tabelle 2: Zusammenstellung der Repeat Marker, die für die Dsh Feinkartierung generiert und verwendet wurden. Repeat Eigenschaft, Primersequenzen des Markers und spezifische Größe der detektierten 101 und Balb/c Allele sind dargestellt.

Die für die Feinkartierung generierten 1000 F2 (+/m) Tiere wurden an den etablierten Marker Loci genotypisiert. Für den Marker D5Mit 226 konnten 25 rekombinante Individuen ermittelt werden. Der centromere Bereich der Dsh kritischen Region auf Chromosom 5 konnte somit von 4,2 Mb (D5 Mit 331) auf 14,1 Mb (D5 Mit 226). eingegrenzt werden. Im telomeren Bereich des Dsh kritischen Intervalls auf Chromosom 5 konnten 6 rekombinante Mäuse für den Marker D5N 13 identifiziert werden. Der telomere Bereich wurde mit Hilfe dieser Feinkartierung von 40 Mb (D5 Mit 44) auf 27 Mb (D5N13) eingrenzt. Für die Marker D5N2, D5N5, D5N8, D5Mit387 und D5N12 konnten keine rekombinanten Mäuse identifiziert werden. Das Dsh kritische Intervall schloss nach Abschluß der Feinkartierung weiterhin das *Shh* Gen ein (Abbildung 10). Das große Intervall und das Fehlen von rekombinanten Mäusen zwischen den Markern D5 Mit226 und D5N13 deutete auf eine Inversion innerhalb des Intervalls hin.

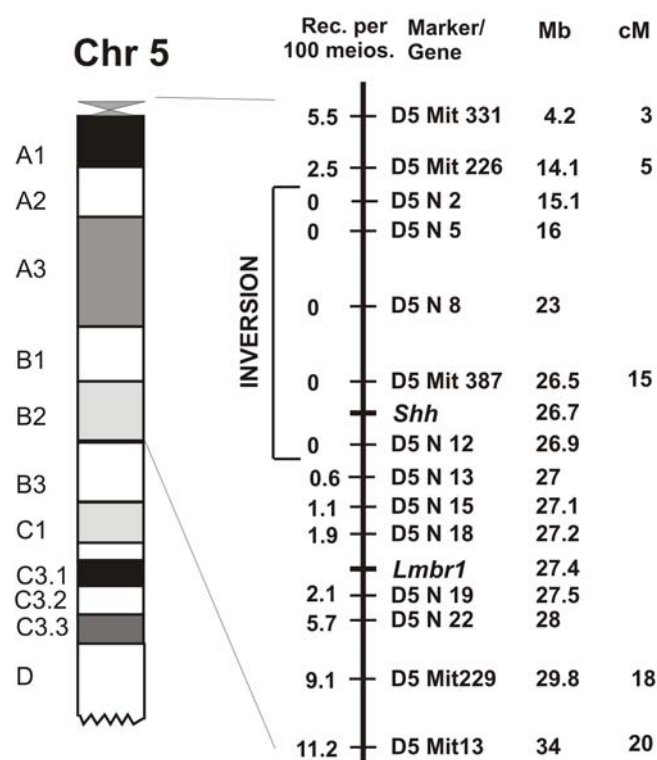


Abbildung 10: Feinkartierung von Dsh

Eine schematische Übersicht der proximalen Region von Chromosom 5 ist auf der linken Seite der Abbildung dargestellt. Die Vergrößerung des markierten Bereichs stellt das Kopplungsintervall mit den getesteten Markern und der Position der Gene *Shh* und *Lmbr1* dar. Die physikalische Lokalisation der Marker auf Chromosom 5 ist in Megabasen (Mb), die genetische in centi Morgan (cM) angegeben. Die Anzahl der ermittelten rekombinanten Mäuse ist pro 100 Meiosen (Recomb/ 100 meios) angegeben. Innerhalb des Intervalls D5Mit226 – D5N13 tritt keine Rekombination auf.

3.7 Identifizierung der Dsh Inversion

Sowohl das ungefähr 13 Mb große Intervall als auch die Repression der Rekombination zwischen den Markern D5N 2 und D5 N 12 ließen auf ein chromosomales Rearrangement, wie zum Beispiel einer Inversion schließen. Es galt zu klären, ob die fehlende Rekombination innerhalb des Intervalls tatsächlich durch eine Inversion verursacht worden ist.

Um diese wahrscheinlichste Mutationsursache nachzuweisen, wurde ein klassischer Screen mit Hilfe der Southern Blot Hybridisierung durchgeführt. Hiermit sollten die Inversionsbruchpunkte identifiziert werden. Ausgangspunkt der Suche war die telomere Position, D5N13, des Feinkartierungsintervalls, an der 6 Rekombinanten identifiziert werden konnten: Am angrenzenden Marker D5N12 in Richtung Centromer/ *Shh* konnten keine Rekombinanten mehr nachgewiesen werden. Wie die Mutationsanalyse von *Shh* gezeigt hat, ist im 14kb genomischen *Shh* Locus das *101* Ursprungsallels erhalten. Zwischen *Shh* und D5 MitN13 sollte im Fall einer Inversion der distale Bruchpunkt zu finden sein. Für dieses Intervall wurde mit Hilfe von MapDraw (DNAStarPackage Software) eine Restriktionskarte erstellt. Die genomischen Hybridisierungs sonden wurden innerhalb des Intervalls in einer Distanz von 5-10kb gewählt. Für den Screen wurde genomische DNA von homozygoten Dsh/Dsh Mäusen und 101 (Wt) Kontrollmäusen mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonmembranen geblottet. Die vorbereiteten Membranen wurden mit den ³²P radioaktiv markierten genomischen DNA Sonden aus dem Intervall hybridisiert. Das Vorhandensein eines Bruchpunktes der vermuteten Inversion sollte mit der Detektion eines aberranten Bandenmusters einhergehen. Tatsächlich konnte ein aberrantes Bandenmuster für Sonde 372k nachgewiesen werden (Abbildung 11).

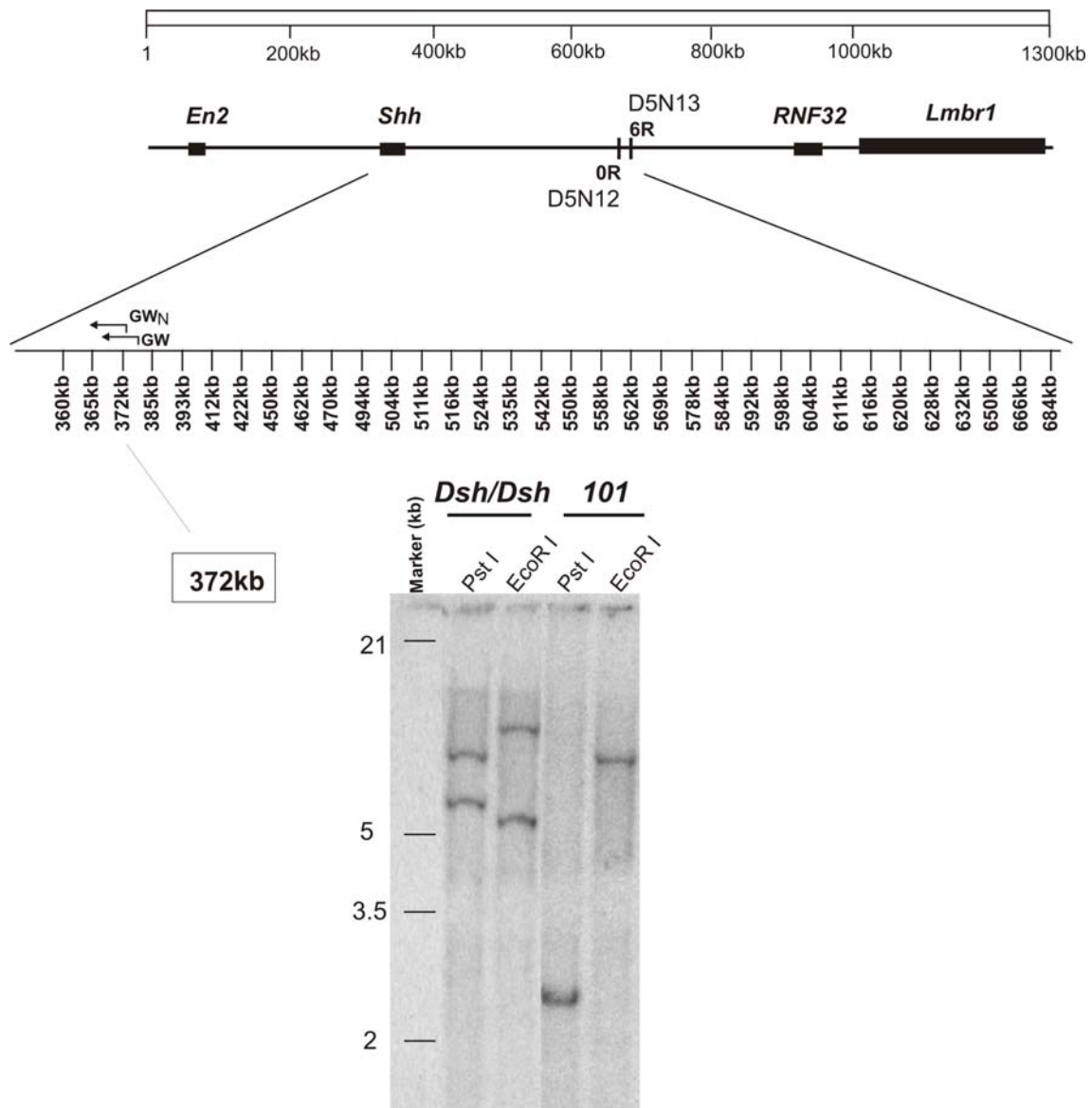


Abbildung 11: Screen zur Identifizierung des Inversionsbruchpunktes

Schematische Darstellung des 1,3 Mb Locus von *Shh* zwischen den flankierenden Genen *En 2* und *Rnf32*, *Lmbr1*. Die Vergrößerung zeigt im Screening Intervall, *Shh* - D5MitN13, die relativen Positionen der Sonden in kb, die mittels Southern Blot hybridisiert wurden. Die Anzahl der rekombinanten Mäuse (R) für relevante Marker der Feinkartierung sind angegeben. Der Southern Blot, mit Sonde 372kb hybridisiert, zeigt ein aberrantes Bandenmuster für *Dsh/Dsh* im Vergleich zum *101* (Wt) Kontrollstamm und identifiziert den telomeren Bruchpunkt der *Dsh* Inversion. Die Position und Richtung des Genome Walking Primer (GW) der Primäramplifikation und des Genome Walking Nested Primer (GW_N) der Sekundäramplifikation zur Amplifikation des *Dsh/Dsh* Bruchpunktes sind mit Pfeilen markiert.

Dies bedeutete die Identifikation des telomeren Bruchpunktes einer Inversion in der Dsh/Dsh Mutante. Die Inversion wurde zusätzlich durch eine *Fluoreszenz in situ Hybridisierung* (FISH) bestätigt: Hierzu wurden aus der ENSEMBL-Datenbank bakterielle artifizielle Chromosomen (BAC) contigs entnommen, die beide Enden des Kartierungsintervalls überspannen. Diese BACs wurden als Sonden eingesetzt und auf gespreitete Interphasen und Metaphasen aus Milz Lymphozyten hybridisiert (Abbildung 12). Die Analyse der Hybridisierungsexperimente zeigt für BAC RP23-94F17 (26.65-26.89 Mb), der im telomeren Bereich des Kartierungsintervalls lokalisiert, ein gespaltenes Signal auf einem Allel von Dsh/+. Zusätzlich zeigt der angrenzende BAC RP24-507K16 (26.50-26.68 Mb) vom telomeren Bereich, und der BAC RP23-130D17 (15.21-15.41 Mb) vom centromeren Bereich eine entgegengesetzte Orientierung auf einem Allel von Dsh/+. Diese Ergebnisse der FISH bestätigen die Dsh Inversion. Die FISH Experimente wurden von Anne Helmrich (Institut für medizinische Genetik, Charite, Humboldt Universität) durchgeführt.

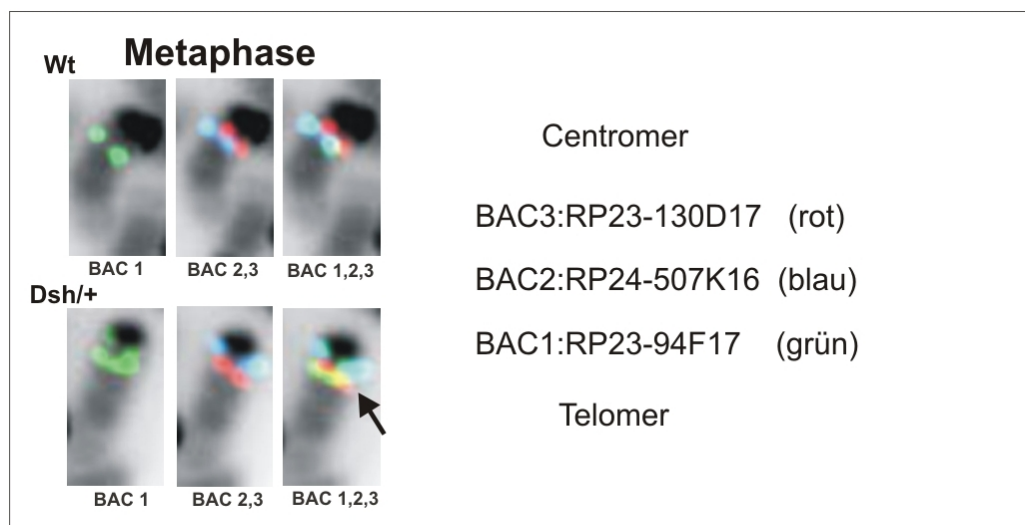


Abbildung 12: *Fluoreszenz in situ Hybridisierung* mit BACs von Maus Chromosom 5, die die Inversionsbruchpunkte flankieren.

Im Wildtyp sind 3 Farben sichtbar, rot, blau/grün (vom Centromer zum Telomer, BAC 1,2,3). In der Dsh/+ Mutante zeigt BAC RP23-94F (BAC 1, grün) ein gespaltenes Signal. Die Anordnung der telomeren und centromeren BACs ist von blau/grün zu rot/grün verändert (BAC1,2,3), und führt auf einem Allel von Dsh/+ zu einem gelben Überlagerungssignal. Diese Ergebnisse bestätigen die Inversion.

Der exakte physikalische Bruchpunkt wurde im Anschluß mit Hilfe der Genome Walking Technik ermittelt: Hierbei wurde zunächst eine genomische Dsh/Dsh Bibliothek erstellt. Die Dsh/Dsh DNA wurde nach Restriktion mit spezifischen Enzymen mit Adaptoren ligiert. Mit Hilfe eines sequenzspezifischen Primers und eines Adapterprimers können so in einer Primäramplifikation und anschließender Sekundäramplifikation unbekannte, den Bruchpunkt überspannende Fragmente aus der Dsh/Dsh Bibliothek amplifiziert werden. Die resultierenden Fragmente wurden in Topo II Vektor subkloniert und sequenziert. Auf diese Weise konnte der telomere Bruchpunkt bestimmt werden, der sich an der folgenden Position auf Chromosom 5 befindet: 26.731374 Mb (Abbildung 13). Der telomere Bruchpunkt befindet sich 13.298kb stromaufwärts von *Shh* und 3.874 kb stromaufwärts des floorplate enhancers. Die Blast Analyse (<http://www.ensembl.org/>) der Inversionssequenz zeigt, dass sich der centromere Bruchpunkt an Position 15.006770 Mb auf Chromosom 5 befindet, was durch ein einen zweiten Genome Walking Ansatz in entgegengesetzter Richtung verifiziert wurde. Die identifizierte Inversion umfasst 11.7 Mb und beinhaltet das *Shh* Gen [Niedermaier et al., 2005]. Eine detaillierte Ansicht der genomischen Umgebung der Inversionsbruchpunkte sind in Abbildung 13 dargestellt.

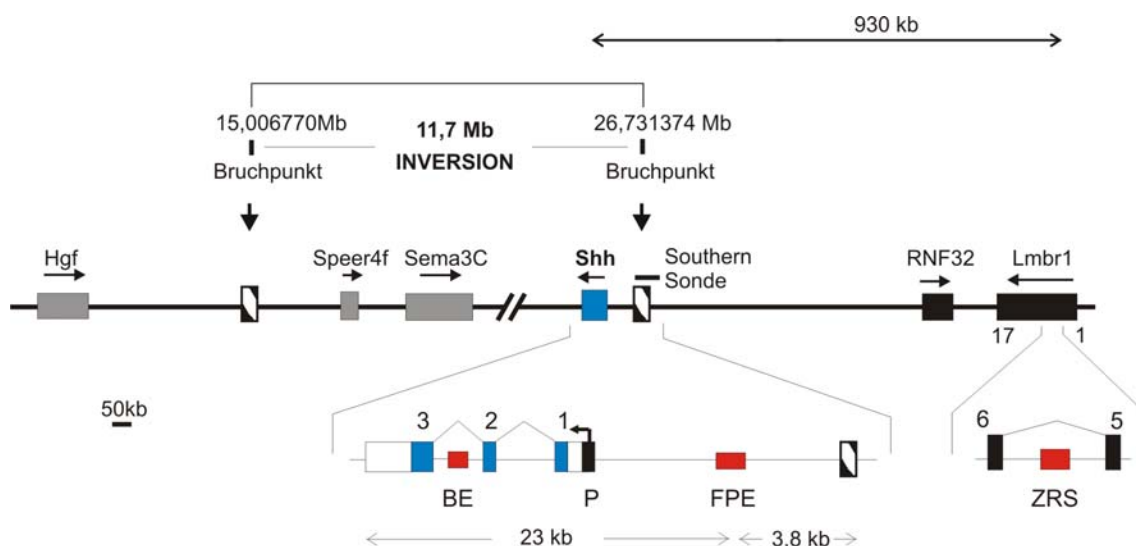


Abbildung 13: Genomische Region des proximalen und distalen Bruchpunktes. Gene sind als Boxen dargestellt, die Transkriptionsrichtung der Gene ist mit einem Pfeil markiert. BE, brain enhancer; FPE, floor plate enhancer; P, Promotor; ZRS, regulatorisches Element;

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

3.8 Einfluß der Dsh Inversion auf flankierende Gene

Wie in Abbildung 13 gezeigt ist, kann nach dem momentanen Kenntnisstand ausgeschlossen werden, dass der heterozygote Phänotyp der Dsh Maus auf einen direkten Effekt durch den centromeren Bruchpunkt zurückzuführen ist; da kein bisher bekanntes Gen den centromeren Bruchpunkt überspannt und somit inaktiviert wird. Dennoch kann ein indirekter Effekt, zum Beispiel auf die Transkription von flankierenden Genen, der somit zum Dsh/+ Hand Phänotyp führen könnte, nicht ausgeschlossen werden. Das nächste proximal zum centromeren Bruchpunkt flankierende Gen, *hepatocyte growth factor (Hgf)*, ist 450kb von diesem entfernt. Distal zum centromeren Bruchpunkt befinden sich die Gene *spermatogenesis associated glutamate (E)-rich protein 4f (Speer4f)* und *semaphorin 3 C (Sema3C)* in einer Entfernung von 200 kb und 300 kb. *Speer4f* wird ausschließlich in Spermatozyten exprimiert [Spiess et al., 2003] und kann somit als möglicher Verursacher ausgeschlossen werden. Um die Auswirkungen der Inversion auf die Expression dieser flankierenden Gene zu überprüfen, wurde mit Hilfe der Real Time PCR der Expressionsgrad dieser Gene in RNA aus Extremitäten der Embryonalstadien E 10.5- E 14.5 gemessen. Die Analyse ergab keine Unterschiede in der Stärke der Expression von *Hgf* und *Sema3C* in der Extremitätenknospe von Wt und *Dsh/+* Mäusen. (Abbildung 14 A, B). Die flankierenden Gene im Bereich des telomeren Bruchpunktes, *RNF32* und *Lmbr1*, sind 700kb bzw. 910kb von diesem entfernt. Quantitative RT PCR mit RNA aus Embryonen der Stadien E 10.5- E13.5 zeigen für diese Gene keinen Unterschied in der Expressionsstärke zwischen Wt und *Dsh/Dsh* Mäusen. (Abbildung 14 C, D). Diese Experimente zeigen, dass die Expression der flankierenden Gene beider Bruchpunkte nicht in kausalem Zusammenhang mit den Mechanismen stehen können, die zum *Dsh/Dsh* oder *Dsh/+* Phänotyp führen.

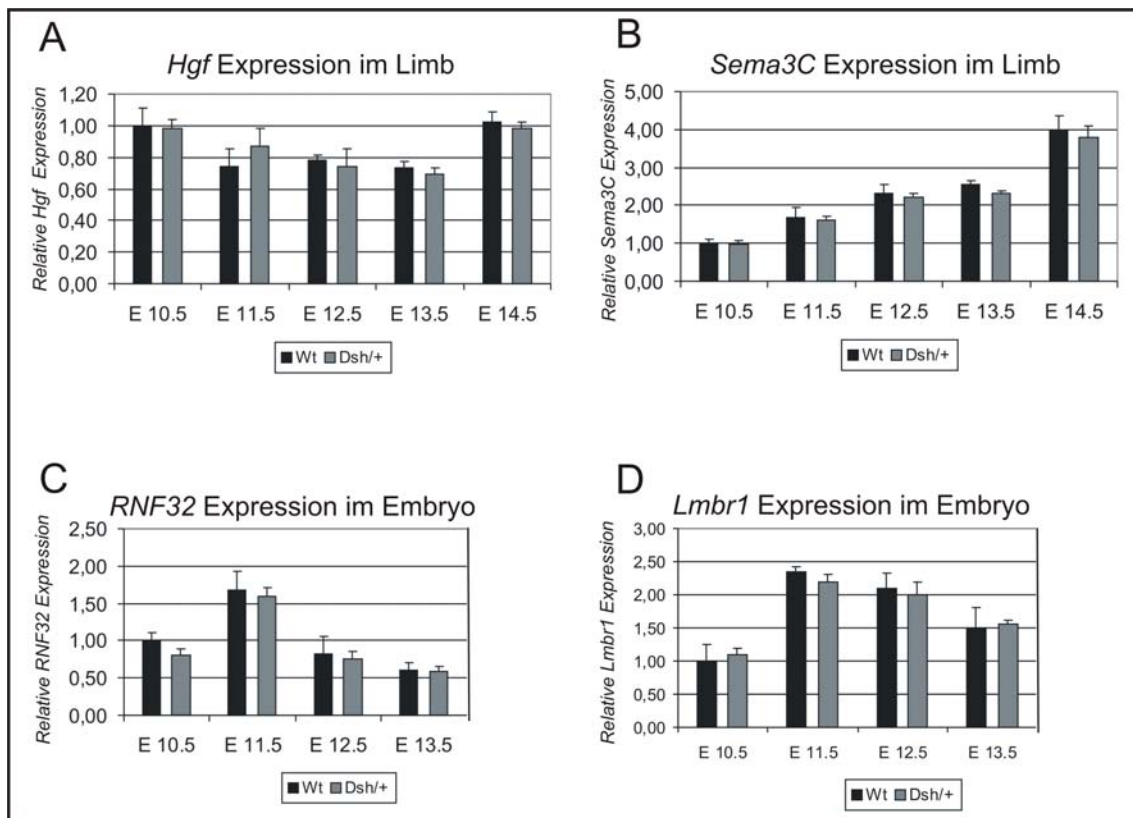


Abbildung 14: Expressionsanalyse von Genen, welche die Bruchpunkte flankieren.

(A, B): Quantitative RT-PCR von Wt und Dsh/+ RNA Proben, die aus Limbs (engl: Extremitätenknospe) der Stadien E 10.5, E 11.5, E 12.5, E 13.5, und E 14.5 isoliert wurden. Der Grad der Expression von *Hgf* (A) und *Sema3C* (B), welche den centromeren Bruchpunkt flankieren, unterscheidet sich nicht in Limbs von Wt und Dsh/+ Mäusen. (C, D): Quantitative RT-PCR von Wt und Dsh/Dsh RNA Proben, die aus Embryonen der Stadien E 10.5, E, E 11.5, E 12.5 und E 13.5 isoliert wurden. Die Gene *RNF32* (C) und *Lmbr1* (D), welche den telomeren Bruchpunkt flankieren, unterscheiden sich nicht im Grad ihrer Expression zwischen Wt und Dsh/Dsh Embryonen. Die Balken in A, B, C, D stellen den Grad (+/- SD) der Genexpression relativ zum Wt E 10.5 dar.

3.9 Molekulare Konsequenzen der Dsh Inversion

Dsh/Dsh Embryonen weisen in frühen (E10.5-E11.5) Entwicklungsstadien eine vollständige Inaktivierung der *Shh* Transkription auf, in späteren (E12.5-E13.5) Entwicklungsstadien ist jedoch eine Reaktivierung zu beobachten. (siehe Abbildung 7) Wie durch eine in situ Hybridisierung gezeigt werden konnte, lässt sich *Shh* Transkript im Proboscis von Dsh/Dsh Embryonen am Tag E13.5 nachweisen (Abbildung 15). Es kann somit festgestellt werden, dass die Dsh Inversion eine Misregulierung der *Shh* Genexpression in Dsh/Dsh Mutanten verursacht. Diese Misregulierung von *Sonic hedgehog* ist ursächlich für die Ausbildung des Dsh/Dsh Phänotyps.



Abbildung 15: *Shh* Expression in E 13.5 Dsh/Dsh Embryonen

Nicht radioaktive In situ Hybridisierung auf Gefrierschnitten von E 13.5 Dsh/Dsh Embryonen zeigt eine deutliche Expression von *Shh* im Proboscis (Pfeile).

Dsh/+ Mäuse weisen einen charakteristischen Extremitäten Phänotyp auf: Sie besitzen sowohl an den Vorderpfoten als auch an den Hinterpfoten kurze Finger. Die Ursache liegt in einer Fusion der ersten und zweiten Phalanx in den Fingern II-V und in einer verkürzten proximalen Phalanx in Finger I (siehe Abbildung 4). Nachdem in der homozygoten Dsh/Dsh Mutante eine Misregulation der *Shh* Genexpression, die durch die 11.7 Mb große Inversion verursacht wird, nachgewiesen werden konnte, sollte die Möglichkeit einer *Shh* Misregulation als primärer pathogener Mechanismus von Dsh/+ überprüft werden: Hierzu wurde mit quantitativer Realtime PCR die *Shh* Expression von gepoolter RNA aus Dsh/+ Extremitäten zu verschiedenen Entwicklungsstadien

untersucht. Die Analyse ergab, dass im Stadium E 10.5 und E 11.5 das *Shh* Transkript auf ungefähr 50% der Menge des Wt reduziert war; das Ergebnis ist im Einklang mit der Erwartung an eine regulatorische heterozygote Mutation. In den Wt Extremitäten wird *Shh* zum Zeitpunkt E 12.5 stark herunterreguliert und danach abgeschaltet. In der Dsh/+ Extremität wird das *Shh* Transkript zum Zeitpunkt E 12.5 ebenfalls herunterreguliert. Im Gegensatz zum Wildtyp wird *Shh* in der Dsh/+ Mutante zum Zeitpunkt E 13.5 und E 14.5 stark hochreguliert.

In situ Hybridisierungen auf Dsh/+ Schnitten zum Zeitpunkt E 13.5 und E 14.5 zeigen deutlich die ektope *Shh* Expression in den aus Knorpel bestehenden Analgen der entstehenden Finger (Abbildung 16 A). Im Wt hingegen kann kein *Shh* Signal in der Hand beobachtet werden, dies belegt die Spezifität der *Shh* Sonde. In Übereinstimmung mit dem Dsh/+ Phänotyp konnte das *Shh* Transkript nur in den Phalangen, nicht aber in den Metacarpalia oder anderen Strukturen der entstehenden Hand nachgewiesen werden.

Es ist bekannt, dass das Hedgehog Signalmolekül die Expression von *Pthlh* in der Gelenkregion über eine große Entfernung hinweg induziert (Vortkamp *et al.*, 1996). Aufgrund der ektope *Shh* Expression wird *Pthlh* seinerseits ab E 13.5 über die ganze, aus Knorpel bestehende phalangeale Anlage hinweg ektop exprimiert (Abbildung 16 B). Dieses Ergebnis wird durch eine quantitative RT PCR bestätigt, die ab E 13.5 eine starke Hochregulation von *Pthlh* in Dsh/+ Händen aufweist (Abbildung 16 E). Hybridisierungen mit einer *Ihh* Sonde zeigen starke Signale in den entstehenden metacarpalen und phalangealen Anlagen in Wt Händen. Dsh/+ Hände weisen hingegen nur ein Signal in den metacarpalen, nicht jedoch in den phalangealen Anlagen auf. Die *Shh* Expressionsdomänen korrelieren mit der Region, in der *Pthlh* hochreguliert und *Ihh* herunterreguliert ist.

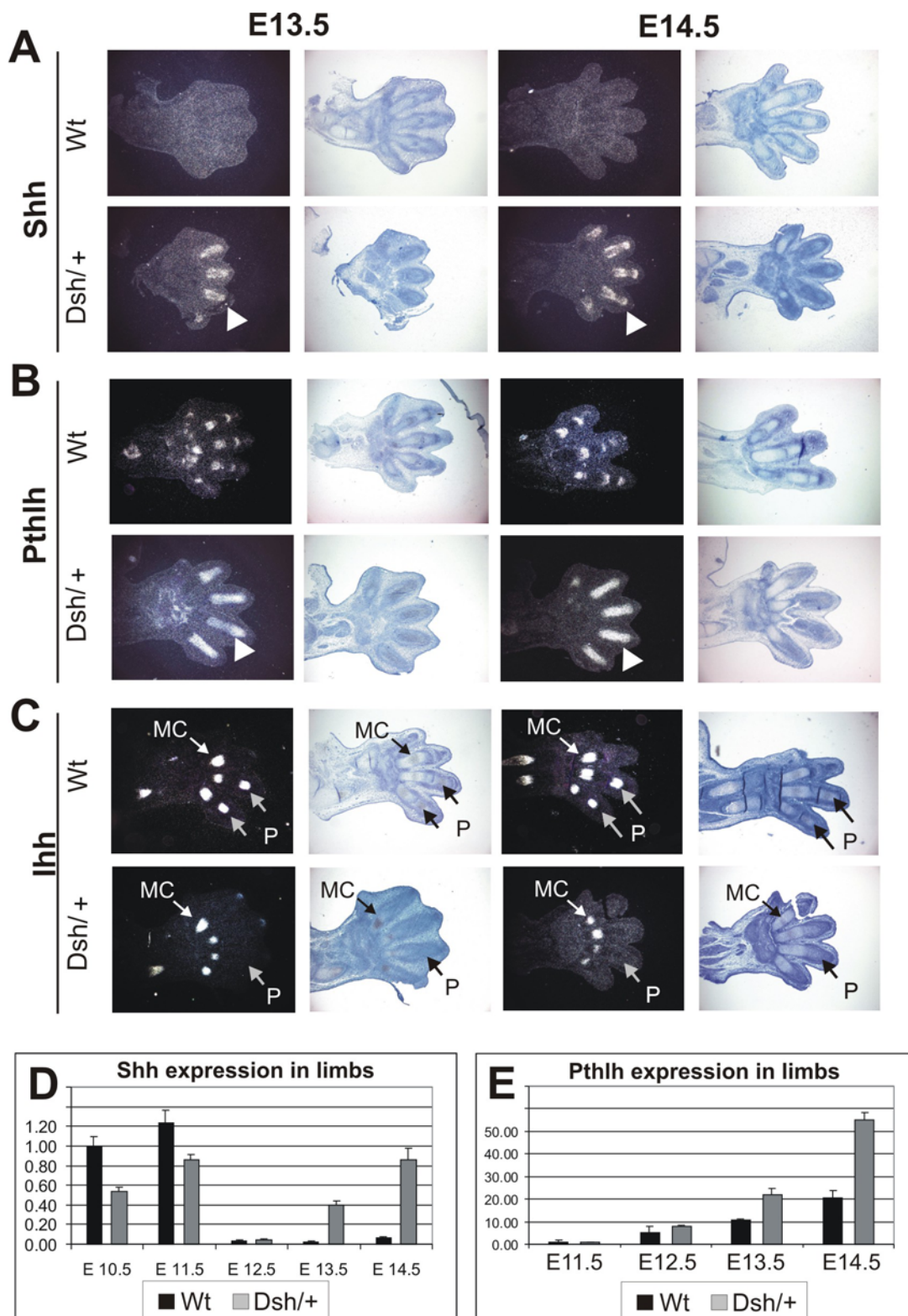


Abbildung 16: Molekulare Konsequenzen der Inversion für *Dsh/+* Mutanten.

(A) ^{32}P In situ Hybridisierung auf *Dsh/+* und Wt Schnitten: ein starkes *Shh* Signal kann ausschließlich in den sich entwickelnden distalen Fingern von *Dsh/+* Händen zum Zeitpunkt E 13.5 und E 14.5 detektiert werden, jedoch nicht in Wt Händen. Die Expression von *Shh* ist auf die Anlage der Phalangen beschränkt (Pfeile). Zum Zeitpunkt E 14.5 ist die Expression im Perichondrium der proximalen Phalanx am stärksten. (B) *Pthlh* ist in *Dsh/+* über die ganze

phalangeale Anlage hinweg stark überexprimiert; im Wt hingegen wird *Pthlh* nur in den Enden der Anlagen gebildet. Die *Pthlh* Expressionsdomäne überlappt mit der von *Shh* (gezeigt in **A**). **(C)** Expression von *Ihh* in Wt Metacarpalia (**MC**) und Phalangen (**P**). In Dsh/+ Händen wird *Ihh* im Gegensatz zum Wt nicht exprimiert. **(D und E)** Quantitative RT-PCR von *Shh* (**D**) und *Pthlh* (**E**) mRNA in Wt und Dsh/+ Händen zum Zeitpunkt E10.5 bis E 14.5. Die Balken stellen den Grad der (+- SD) der *Shh* Expression relativ zum Wt E 10.5 und die *Pthlh* Expression relativ zum Wt E 11.5 dar. Vergrößerung, x50 (**A-C**).

Es galt zu klären, wie der Positionseffekt, der durch die Inversion auf das *Shh* Gen ausgeübt wird, zustande kommt. Positionseffekte betreffen die transkriptionelle Regulation eines Gens, dessen funktionelle Grundeinheiten, Promoter, Exone intakt sind. Positionseffekte werden durch chromosomale Rearrangements, wie zum Beispiel einer Inversion hervorgerufen. Durch die relativ junge Disziplin der vergleichenden Genom Sequenzanalyse konnten evolutionär hoch konservierte Sequenzabschnitte identifiziert werden, welche zum Beispiel als Enhancer (engl.:Verstärker) der Transkription eines Gens über große Distanzen wirken können. Für den *Shh* Locus wurde bereits ein Element, das die Expression in der Extremität steuert, im Intron 5 des flankierenden *Lmbr1* Gens beschrieben [Lettice et al. 2003]. Werden nun solche Elemente aufgrund einer Inversion von der basalen Transkriptionseinheit getrennt, führt dies zu einem Positionseffekt.

3.10 Identifizierung von konservierten nichtcodierenden Elementen (CNE) durch vergleichende Genom Sequenzanalyse

Um putative regulatorische Elemente im Bereich des telomeren Bruchpunktes zu identifizieren, wurden die genomische Sequenz des Menschen, der Maus, des Huhnes und des Kugelfisches *Fugu rubripes* verglichen. Die genomischen Sequenzen wurden der ENSEMBL Datenbank (<http://www.ensembl.org/>) entnommen.

Zur vergleichenden Sequenzanalyse wurde das Programm MultiPIPMaker (<http://pipmaker.bx.psu.edu/cgi-bin/multipipmaker>) und das Programm mVISTA (<http://gsd.lbl.gov/vista>), verwendet. Das MultiPIPMaker Programm stellt das Ergebnis als „percent identity plot“ (engl.: Plot der Identität in Prozent) graphisch dar.

Auf diese Weise konnten 5 (CNE1-CNE5) nichtcodierende Elemente, die in den Genomen der untersuchten Arten konserviert sind identifiziert werden (Abbildung 17). Diese distal vom Bruchpunkt gelegenen, nicht kodierenden Elemente stellen bislang unbekannte, putative cis-regulatorische Elemente von *Sonic hedgehog* dar. Eine weiterführende *in silico* Analyse der Elemente wurde mit der Datenbank TRANSFAC PRO (<http://www.biobase.de>) durchgeführt. Die konservierten Elemente können mittels eines Suchalgorithmus auf Bindungsstellen für spezifische Transkriptionsfaktoren untersucht werden. Die vorhergesagten Transkriptionsfaktorbindungsstellen können Hinweise auf die assoziierten Signalwege und mögliche Funktionen der Elemente geben.

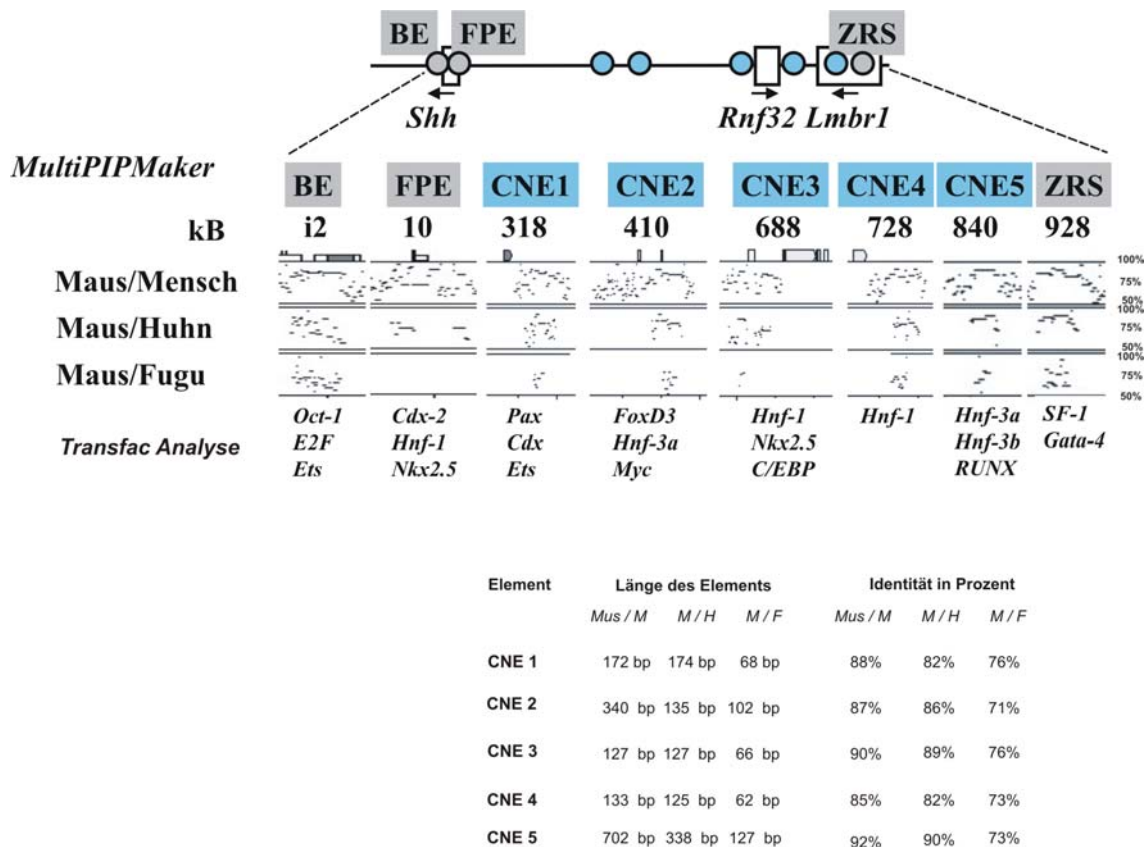


Abbildung 17: Sequenzkonservierung am Maus *Shh* Locus

Zusammenfassung der Ergebnisse der Genom Sequenz Vergleiche, die mittels des MultiPIPMaker Programmes erstellt wurden: 5 konservierte, nicht kodierende Elemente (CNE1-CNE5) können identifiziert werden, die in den Genomen des Menschen, des Huhnes und des Kugelfisches *Fugu rubripes* konserviert sind. Bekannte regulatorische Elemente sind grau unterlegt: BE, brain enhancer, FPE, floor plate enhancer; ZRS, regulatorisches Element; In dieser Arbeit identifizierte putativ regulatorische Elemente CNE1-CNE5 sind blau unterlegt. Relative Entfernungen der Elemente von *Shh* sind in Kilobasen (kb) angegeben. Signifikante Alignments werden als horizontale Linien dargestellt (x-Achse); die y-Achse zeigt den Grad der Konservierung in Prozent. Putative Transkriptionsfaktorbindungsstellen wurden mit Hilfe der Transfac Pro Datenbank ermittelt und sind aufgeführt. Die Länge (Core Alignment) der Elemente CNE 1- CNE 5, und der Grad ihrer Konservierung ist für den jeweiligen Genomvergleich aufgeführt.

CNE 1, CNE 2, CNE 3 und CNE 4 befinden sich 318 kb, 410 kb, 688 kb und 728kb stromabwärts von *Shh*. Das 840 kb entfernte Element CNE 5 ist als einziges der 5 Elemente innerhalb des genomischen Locus eines flankierenden Gens lokalisiert: Die MultiPIPMaker Analyse (Maus/FUGU Vergleich) von *Lmbr1* zeigt neben dem bereits bekannten ZRS Element, welches die *Shh* Expression im Autopod steuert und sich innerhalb des Intron 5 befindet, nur 1 weiteres konserviertes Element: CNE 5, das im Intron 9 von *Lmbr1* lokalisiert ist.

3.11 Funktionelle Charakterisierung der CNE mittels Reporter-Konstrukten

Die mittels vergleichender Sequenzanalyse vorhergesagten putativen *Shh* cis Kontrollelemente sollten auf ihre funktionelle Relevanz untersucht werden. Hierfür wurden Maus DNA Fragmente der CNE 1-3 in einen β -Galaktosidase (lacZ)-Reporter-Vektor P1230 (freundliche Gabe von Dr. Rob Krumlauf) kloniert. Dieser Vektor enthält ein Reporter-gen, β -Galaktosidase, dessen enzymatische Aktivität leicht nachweisbar ist, und das unter der Kontrolle eines humanen minimalen β Globin Promotors exprimiert wird. Die Maus CNE Fragmente wurden vor den β -Globin Minimalpromoter kloniert und die sequenzverifizierten Konstrukte zur Generierung von transgenen Reporter-mäusen verwendet. Transgene männliche Founder Tiere wurden mittels PCR identifiziert und mit C57Bl/6 Weibchen verpaart. Die Embryonen aus diesen Verpaarungen sollten zu definierten Zeitpunkten während der Entwicklung, E9.5-E13.5, auf spezifische Aktivität der CNE untersucht werden. Die Expressionsdomänen des Reporters sollten im Idealfall wenigstens Teile der endogenen *Shh* Expression widerspiegeln. Die Aktivität der Elemente kann durch eine Färbetechnik (lacZ Färbung) der Embryonen sichtbar gemacht werden.

Aus Konstrukt P1230/CNE 2 ging 1 transgener Bock hervor, der zwar das inserierte Konstrukt exprimierte, aber nicht an die Nachkommen weitergab. Es konnte nur 1 Wurf untersucht werden, da der Bock verstarb. Die analysierten E 12.5 Embryonen des Konstruktes P1230/CNE2 zeigen eine spezifische LacZ Färbung in den Extremitäten und den Somiten (Pfeile). Die Expression des Reporters ist im Gegensatz zur ZPA spezifischen *Shh* Expression in der gesamten Extremitätenanlage vorhanden, jedoch nicht ubiquitär. Dies wird durch die distale Expressionsdomäne belegt, die auf die Anlagen der Phalangen beschränkt ist, das zwischen den Fingern liegenden mesenchymale Gewebe bleibt ungefärbt (Abbildung 18).

Die LacZ Aktivität, die von Element CNE2 gesteuert wird, ist in den Extremitäten stärker als in den Somiten. Konstrukt P1230/CNE 3 brachte 2 transgene Männchen hervor. Konstrukt P1230/CNE 1 generiert 3 transgene Männchen. Die Analyse der Aktivität der Konstrukte P1230/CNE3 und P1230/CNE1 steht zum Zeitpunkt der schriftlichen Anfertigung dieser Arbeit noch aus.

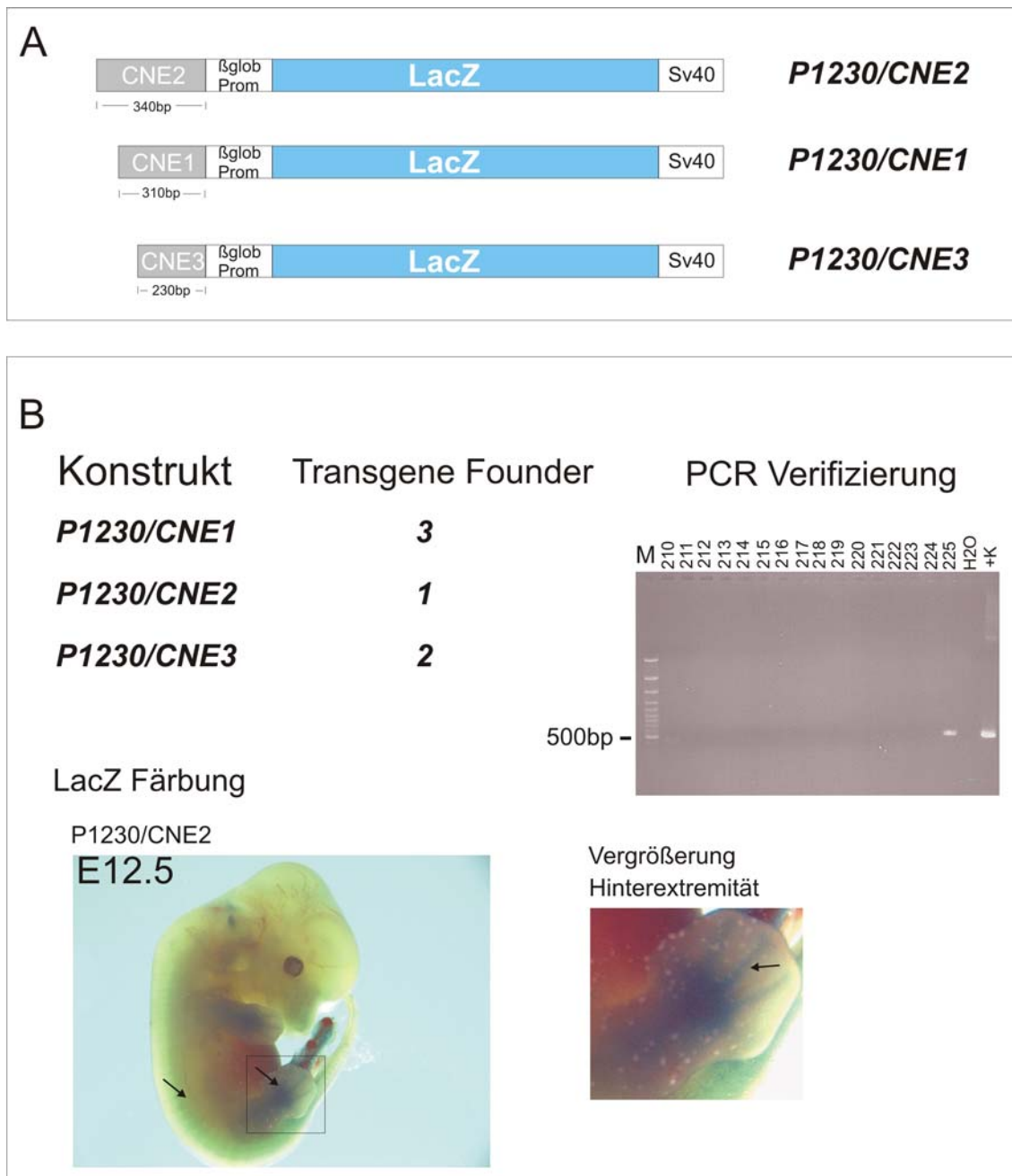


Abbildung 18: Übersicht der generierten Reporterkonstrukte/ Transgenen Mäuse

(A) Der Reporter-Vektor besitzt einen minimalen β Globin Promoter, der an das LacZ-Gen fusioniert ist, und ein terminales SV40. Die Größe der CNE PCR Fragmente, die für die Generierung der Reporterkonstrukte (*P1230/CNE1-3*) vor den β Globin Promoter kloniert wurden, ist in Basenpaaren (bp) angegeben. (B) Zusammenstellung der generierten Transgenen Founder Mäuse aus den Reporterkonstrukten und deren Verifizierung mittels PCR (Founder 225 des Konstruktes *p1230/CNE2*). LacZ Färbung von E 12.5 Embryonen, die das Konstrukt *P1230/CNE2* exprimieren: LacZ Aktivität kann unter dem Einfluß von CNE2 in den Extremitäten (Abbildung Embryo und Vergrößerung der Extremität) und den Somiten detektiert werden (Pfeile).