

**Analyse von genomischen Aberrationen  
mit hochauflösender Array-CGH bei Patienten mit  
Fehlbildungen der Extremitäten**

---

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

**Silke Lohan**

aus Berlin

August 2012



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01. Januar 2009 bis 30. Juni 2012 an der Charité - Universitätsmedizin Berlin (Campus Virchow-Klinikum) im Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik und am Max Planck Institut für Molekulare Genetik unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan Mundlos und Dr. Eva Klopocki angefertigt.

**Erster Gutachter: Prof. Dr. Stefan Mundlos**

Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik  
Augustenburger Platz 1  
Campus Virchow-Klinikum  
Charité, Universitätsmedizin Berlin  
13353 Berlin  
E-Mail: stefan.mundlos@charite.de

---

Max Planck Institut für Molekulare Genetik  
Arbeitsgruppe Development & Disease  
Ihnestr. 63-73  
14195 Berlin  
E-Mail: mundlos@molgen.mpg.de

**Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Günther Weindl**

Freie Universität Berlin  
Institut für Pharmazie  
Pharmakologie und Toxikologie  
Königin-Luise-Str 2+4  
14195 Berlin  
E-Mail: Guenther.Weindl@fu-berlin.de

Disputation am : 31.01.2013

Freude an der Arbeit lässt das Werk trefflich geraten.

(Aristoteles)

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Literaturquellen verwendet habe. Diese Arbeit wurde bei keiner anderen Prüfungsbehörde eingereicht.

Berlin, den 20.08.2012

-----

Silke Lohan

## Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. Stefan Mundlos für die Bereitstellung des interessanten Themas, das ich an der Charité Campus-Virchow Klinikum und am Max Planck Institut für Molekulare Genetik bearbeitet durfte. Diskussionen und Gespräche gaben mir immer wieder richtungsweisende Denkanstöße und neue Motivation.

Prof. Dr. Günther Weindl danke ich sehr für die kurzfristige Übernahme des Korreferats.

Ein großer Dank geht an meine Betreuerin Dr. Eva Klopocki. Gemeinsame Gespräche, Diskussionen verleihen mir immer wieder neue Motivation und neue Perspektiven für den Fortgang der Arbeit. Das Heranführen an das wissenschaftliche Arbeiten, Verfassen von Texten sowie das Präsentieren von wissenschaftlichen Daten gaben mir sehr viele positive Impulse und Anregungen.

Dem ganzen Team Mundlos danke ich für die kollegiale und hilfreiche Zusammenarbeit, Unterstützung und viele Stunden Spaß im Labor.

Ganz besonders möchte ich mich dabei bei Nicole Rösener, Monika Osswald, Norbert Brieske, Asita Carola Stiege, Anja Will, Sinje Geuer und Martin Franke bedanken. Es war eine klasse Zusammenarbeit! Vielen Dank für die Unterstützung, interessanten Gespräche und Ratschläge.

Ein ganz besonderer Dank geht an PD Dr. Sigmar Stricker und Dr. Malte Spielmann, die mir mit Tipps, Ratschlägen und ihrem Wissen durch manch harten Laboralltag geholfen haben.

Ein großes Dankeschön geht auch an die Charité-Mitarbeiter. Besonders möchte ich mich bei Dr. Sandra Dölken für die hilfreiche Unterstützung in medizinischen Fragestellungen bedanken.

Randy Koll und Fabienne Trotier danke ich für die freundliche Aufnahme in ihr Laborteam, ihre hilfreichen Tipps und Ratschläge für den Laboralltag und den „Labordrill“ bezüglich Ordnung und Sauberkeit. Danke für Eure Unterstützung, Herzlichkeit und den Humor - es war eine wunderbare Zeit!

Besonders bei meinen Eltern möchte ich mich für die starke Unterstützung, Aufheiterung, den nicht nachlassenden Beistand und den Rückhalt bedanken. Ohne Euch hätte ich diesen Weg nicht geschafft!

Zu guter Letzt danke ich Stephan für die Liebe und den Beistand während der ganzen Zeit! Deine Liebe und deine Stärke haben mich nicht unterkriegen lassen!



## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Das Skelettsystem .....	1
1.2	Desmale Ossifikation .....	1
1.3	Endochondrale Ossifikation .....	2
1.3.1	Indian Hedgehog: Essentiell während der endochondralen Ossifikation .....	3
1.4	Extremitätenentwicklung bei Wirbeltieren .....	4
1.4.1	Signalwege und Schlüsselgene der Extremitätenentwicklung .....	6
1.5	Extremitätenfehlbildungen .....	9
1.5.1	Spalthand-/ fußfehlbildungen (split hand/ foot malformation, SHFM) .....	9
1.6	Kopienanzahlveränderungen (CNVs, copy number variations) im Genom .....	11
1.6.1	Entstehungsmechanismen von CNVs .....	12
1.7	Regulation der Genexpression .....	14
2	Zielsetzung der Arbeit .....	16
3	Material .....	17
3.1	Geräte und Zubehör .....	17
3.2	Verbrauchsmaterialien .....	18
3.3	Chemikalien .....	18
3.4	Microarray-Utensilien .....	21
3.5	PCR Utensilien .....	21
3.6	Zellkultur/ Maus-ES-Zellkultur .....	22
3.7	Puffer und Lösungen .....	22
3.8	Enzyme .....	28
3.9	Bakterienstamm .....	28
3.10	Vektorsysteme .....	28
3.11	PC-Programme/ Internet-Datenbanken .....	29
3.12	Tiere für experimentelle Untersuchungen .....	29
3.12.1	Mäuse .....	29
3.12.2	Zebrafische .....	30
4	Methoden .....	31
4.1	Mikroarray basierte vergleichende genomische Hybridisierung .....	31
4.2	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) .....	32
4.3	Allgemeine molekularbiologische Methoden .....	33
4.3.1	DNA-Isolation .....	33
	Isolierung genomischer DNA aus EDTA-Blut .....	33
	Isolierung genomischer DNA .....	33
	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen .....	34
4.3.2	Amplifikation von DNA-Abschnitten .....	34
	Primer/ Primerdesign .....	34
	Polymerasekettenreaktion .....	34
	Kolonie-PCR .....	35
	Genotypisierungs-PCR .....	35
	Aufreinigung von DNA-Fragmenten .....	35

Enzymatische Reinigung .....	36
Sequenzierung nach Sanger .....	36
4.4 Klonierungstechniken .....	36
4.4.1 Klonierung des gewünschten DNA-Fragments .....	36
4.4.2 TA-Klonierung.....	37
4.4.3 <i>LacZ</i> -Expressionsvektor für Enhancerstudien .....	37
4.4.4 Fällung von DNA mittels Natriumacetat .....	37
4.4.5 Kultivierung von Bakterien.....	38
4.4.6 Transformation von Bakterien .....	38
4.5 Histologische Methoden .....	38
4.5.1 RNA <i>In situ</i> Hybridisierung .....	38
Herstellung von DIG markierten Sonden .....	38
4.5.2 Paraffineinbettung und Schnittpräparation von Gewebepreparaten .....	41
4.5.3 Vibratomschnitte.....	41
4.5.4 Plastikeinbettung/ Plastikschneiden und Entplasten .....	42
4.5.5 Skelettpräparation .....	42
4.5.6 X-Gal-Färbung von Embryonen .....	43
4.6 Das Modellsystem Zebrafisch .....	43
4.6.1 Zebrafisch-Haltung .....	43
4.6.2 Morpholino-Technologie.....	43
4.6.3 RNA <i>in situ</i> bei Zebrafischen.....	45
4.7 Zellkulturmethoden .....	46
4.7.1 Auftauen von Zellen.....	46
4.7.2 Einfrieren von Zellen.....	46
4.7.3 Luziferase Assay .....	46
4.8 Embryonale Stammzellkultur (ES-Zellkultur).....	47
4.8.1 Embryonale Fibroblasten (Feederzellen) .....	48
4.8.2 Aussäen und Trypsinbehandlung von C2-Zellen .....	49
4.8.3 Transfektion der C2-Zellen.....	50
4.8.4 Selektion der ES-Zellen.....	50
4.8.5 Picken von positiven ES-Zellklonen .....	50
4.8.6 DNA-Präparation der ES-Zellklone .....	51
4.9 Southern Blot Analyse .....	51
5 Ergebnisse .....	54
5.1 Untersuchung von Patienten auf Mikroduplikationen im SHH-Enhancer (ZRS) .....	54
5.1.1 Patientenkollektiv.....	54
5.1.2 Detektion von Mikroduplikationen innerhalb der ZRS-Region mittels Array-CGH.....	56
5.1.3 Bruchpunktbestimmung der duplizierten Regionen .....	58
5.2 Untersuchung von Patienten mit einem klinischen Phänotyp der Syndaktylie in Kombination mit sagittaler Kraniosynostose auf strukturelle Veränderungen im Genom.....	62
5.2.1 Patientenkollektiv.....	62
5.2.2 Untersuchung des Patientenkollektivs mittels Array-CGH.....	67
5.2.3 Bestätigung der Duplikationen mittels qRT-PCR .....	68



5.2.4	<i>In silico</i> Analyse des Überlappungsbereiches der betroffenen Patienten mit SD1 und Kraniosynostose Philadelphia Typ.....	68
5.2.5	Nähere Charaterisierung des <i>NHEJ1</i> -Gens mittels WISH.....	69
5.2.6	Untersuchung der CNEs am <i>IHH</i> -Lokus auf Enhancer-Aktivität.....	70
5.3	Untersuchung von Patienten mit dem klinischen Phänotyp der Ektrodaktylie und Tibia Hemimelie (SHFLD) auf strukturelle Veränderungen im Genom.....	74
6	Diskussion.....	97
6.1	Mikroduplikationen des SHH-Enhancers (ZRS) verursachen ein Spektrum von Extremitätenfehlbildungen.....	97
6.2	Aberrationen am IHH-Lokus sind mit Syndaktylien und Kraniosynostose verbunden.....	105
6.3	Duplikationen von BHLHA9 sind mit dem klinischen Phänotyp der Ektrodaktylie und Tibia Hemimelie (SHFLD) assoziiert, vererbt in einem nicht-Mendelschen Vererbungsmodus.....	110
7	Ausblick.....	119
8	Zusammenfassung .....	121
9	Summary.....	123
10	Literaturverzeichnis.....	125
11	Weitere Verzeichnisse .....	132
11.1	Abbildungsverzeichnis.....	132
11.2	Tabellenverzeichnis.....	135
11.3	Abkürzungsverzeichnis.....	136
11.4	Verzeichnis der erfolgten Publikationen .....	140
11.5	Kongressbeiträge.....	141
11.6	Lebenslauf .....	142
12	Anhang.....	143
12.1	Projekt IHH .....	143
12.1.1	Stammbaum der Familie 1 .....	143
12.2	Projekt BHLHA9.....	144
12.2.1	Duplikationsübersicht der untersuchten Familien .....	144
12.2.2	Stammbäume der untersuchten Familien .....	145
12.2.3	Potenzielle Transkriptionsfaktorbindestellen für den untersuchten Promoterbereich.....	146
12.3	Primer .....	149
12.3.1	SHH-Projekt.....	149
12.3.2	IHH Projekt .....	150
12.3.3	BHLHA9 Projekt .....	153
12.4	PCR Pipettierschemata .....	158
	Standard-PCR.....	158
	Kolonie-PCR .....	158
	Genotypisierungs-PCR für Mäuse des IHH- Projekts.....	158
	GenotypisierungsPCR I/ II der Mäuse des BHLHA9-Projekts .....	158
	Plasmidsequenzierung/ PCR-Produkt-Sequenzierung.....	159
12.5	Cyclerprogramme .....	160
	Standard PCR-Programm.....	160
	Touch-down PCR-Programm .....	160
	Phusion © PCR-Programm.....	160

Expand Long Template PCR Systems PCR-Programm .....	161
Kolonie-PCR PCR-Programm .....	161
Genotypisierungs-PCR für das Ihh-Projekt, PCR-Programm.....	161
Genotypisierungs-PCR der Mäuse des BHLHA9-Projekts, PCR-Programm .....	161
Sequenzierung Plasmid, PCR-Programm .....	162
12.6 Kultivierung von ES Zellen .....	162

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Skelettsystem

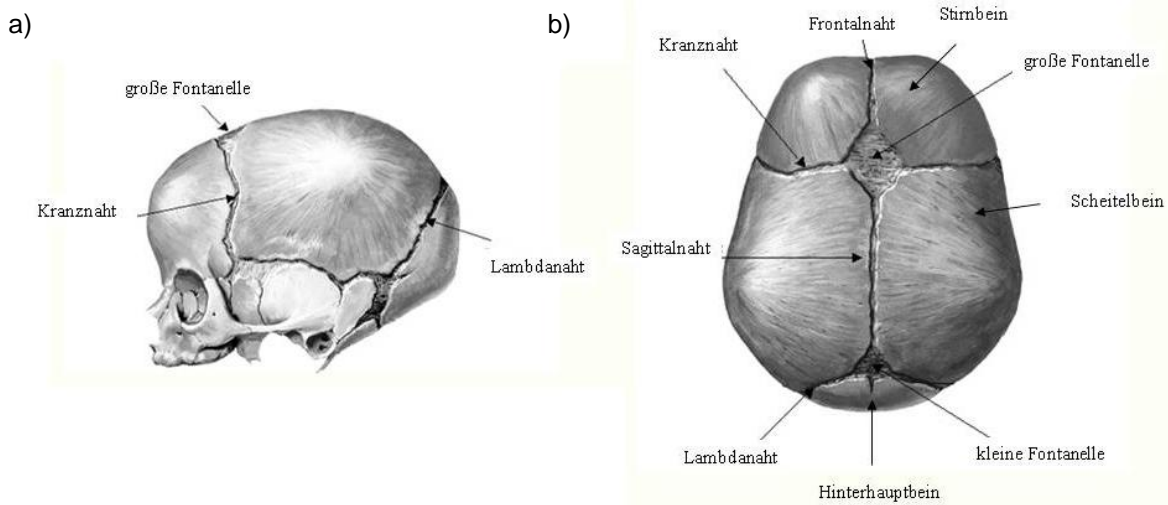
Das Skelett der Vertebraten: Ein Wunderwerk der Natur! Es besteht aus 200 Knochen und stellt eine multifunktionelle Einheit im Körper dar. Es ist als Stütz- und Bewegungsapparat für die Gestaltgebung und Stabilität des Körpers verantwortlich, schützt die inneren Organe, das Knochenmark und das Gehirn vor äußeren Einflüssen und ist ein wichtiger Speicherort für Mineralien (u.a. Kalzium und Phosphat). Des Weiteren ist das Knochenmark maßgeblich an der Blutbildung und immunitären Antworten des Körpers auf äußere Einflüsse beteiligt. Das Skelett wird in das kraniale, axiale und appendikulare Skelett unterteilt. Das kraniale Skelett umfasst die Schädelknochen, die mit dem axialen Skelettelementen, der Wirbelsäule, den Rippen und dem Sternum in Verbindung stehen. Zu dem appendikularen Skelett werden die Extremitäten, der Schultergürtel sowie die Hüftknochen gezählt. Das Skelett ist ein dynamisches System, das sich im gesamten Leben immer wieder neu organisiert. Die Knochensubstanz wird durch Osteoblasten (knochenbildende Zellen) auf- und durch Osteoklasten (knochenabbauende Zellen) abgebaut (Kornak und Mundlos 2003).

Alle skelettären Elemente bei den Vertebraten sind auf mesenchymale Vorläuferzellen zurückzuführen. Abhängig von deren Lokalisation, Formgebung und Funktion durchlaufen diese Zellen einen von zwei knochenbildenden Prozessen, die desmale oder die endochondrale Ossifikation (Cancedda et al. 2000; Olsen et al. 2000).

## 1.2 Desmale Ossifikation

Bei der desmalen Ossifikation differenzieren Mesenchymzellen direkt zu Osteoblasten, die parallel auch die neue Knochenmatrix synthetisieren und mineralisieren. Die desmale Ossifikation spielt insbesondere bei der Bildung des Kopfskeletts und des Schlüsselbeins eine Rolle. Der Schädel (lat. Cranium) des Menschen besteht aus 22 Einzelknochen, die über Knochennähte (lat. Suturae) miteinander in Verbindung stehen. In der Anatomie werden der Gesichtsschädel (lat. Viscerocranium), der die Grundlage der Gesichtsknochen bildet, und der Hirnschädel (lat. Neurocranium), der das Gehirn umhüllt, unterschieden. Der Hirnschädel kann in die Schädelbasis und das Schädeldach (lat. Calvaria) unterteilt werden (Slater et al. 2008). Man unterscheidet folgende Hauptknochennähte: Die Pfeilnaht/ Sagittalnaht (Sutura sagittalis) zwischen den beiden Scheitelbeinen, die Stirnnaht (Sutura frontalis) zwischen den beiden Stirnbeinen, die Kranznaht (Sutura coronalis) zwischen dem Stirnbein und dem Scheitelbein, und die Lambdanaht (Sutura lambdoidea) zwischen dem Scheitelbein und dem Hinterhauptsbein (Abbildung 1). Das Krankheitsbild der autosomal-dominant vererbten Kranio-synostose ist durch das vorzeitige Zusammenwachsen einer oder mehrerer Schädelnähte (Synostose) bei Säuglingen und Kleinkindern gekennzeichnet. Dadurch kann das Schädel- und Gehirnwachstum nicht normal ablaufen und eine Verformung des Schädels entsteht. Durch das verminderte Wachstum des Gehirns kommt es häufig zu einer Beeinträchtigung der Sehfähigkeit und der geistigen Entwicklung (Gault et al. 1992; Hukki et al. 2008; Slater et al. 2008).

Eine Kombination des klinischen Phänotyps der sagittalen Kraniosynostose mit einer kutanen Syndaktylie der Finger wird als Kraniosynostose Typ Philadelphia bezeichnet (Robin et al. 1996; Jain et al. 2008).



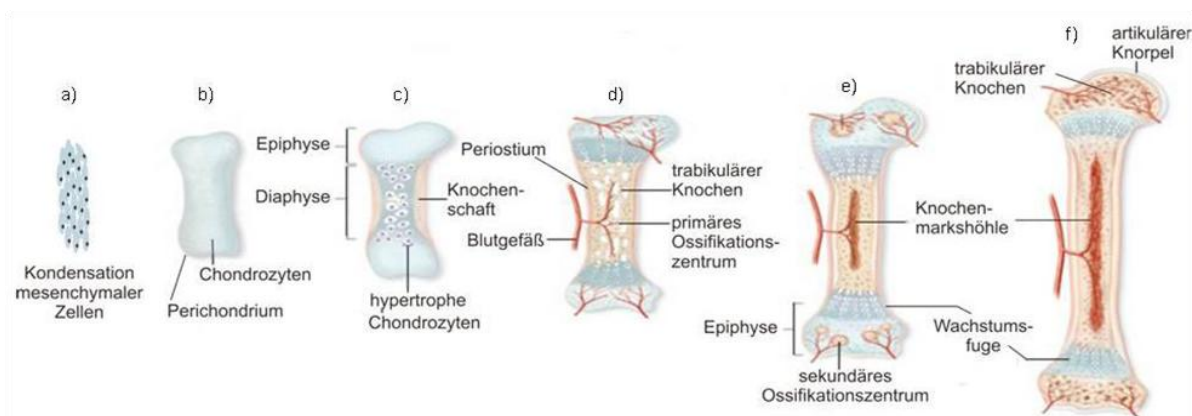
**Abbildung 1 Anatomie des Schädels.**

a) laterale Ansicht der Schädelknochen und -nähte; b) Aufsicht auf die Schädelknochen und -nähte (Quelle: [http://www.uke.de/kliniken/neurochirurgie/index\\_15719.php](http://www.uke.de/kliniken/neurochirurgie/index_15719.php)).

### 1.3 Endochondrale Ossifikation

Bei der endochondralen Ossifikation werden aus Mesenchymzellen zuerst knorpelige Skelettelemente gebildet, die dann durch Chondroklasten (knorpelabbauende Zellen) abgebaut werden und durch Osteoblasten verknöchern. Diesen Prozess der Ossifikation findet man beim axialen und appendikularen Skelett (Olsen et al. 2000) (Abbildung 2).

Zu Beginn der endochondralen Ossifikation kondensieren die Mesenchymzellen und differenzieren zu Knorpelvorläuferzellen (Prächondrozyten). Während dieser Phase sekretieren die Prächondrozyten Matrixproteine, die die Knorpelmatrix ausbilden. Zellen im Zentrum des Knorpels differenzieren zu Knorpelzellen (Chondrozyten), peripher gelegene Zellen bilden das Perichondrium aus, das die Knorpelstruktur von dem umliegenden Gewebe isoliert. Die Chondrozyten durchlaufen mehrere Proliferationsschritte und es kommt zur Ausbildung säulenförmiger Strukturen im Zentrum der Knochenanlage. In der Epiphyse ist die Teilungsrate der Chondrozyten vermindert, die hier befindlichen Chondrozyten stellen Reservechondrozyten dar. Postmitotisch differenzieren die Chondrozyten dann zu hypertrophen Chondrozyten, erkennbar an der starken Volumenzunahme (Erlebacher et al. 1995; Johnson und Tabin 1997; Olsen et al. 2000; Kronenberg 2003). Parallel zu der hypertrophen Differenzierung mineralisiert die Knorpelmatrix. Nach vollständiger Ausdifferenzierung der Chondrozyten unterlaufen diese die Apoptose und werden durch Knochengewebe ersetzt. Während dieses Vorgangs wandern Blutgefäße in das zukünftige Knochengewebe ein, in dessen Blutstrom Osteoblasten befindlich sind. Die Osteoblasten fangen an Knochenmatrix zu synthetisieren, parallel werden die Chondrozyten durch die Chondroklasten abgebaut (Olsen et al. 2000).



**Abbildung 2 Endochondrale Ossifikation.**

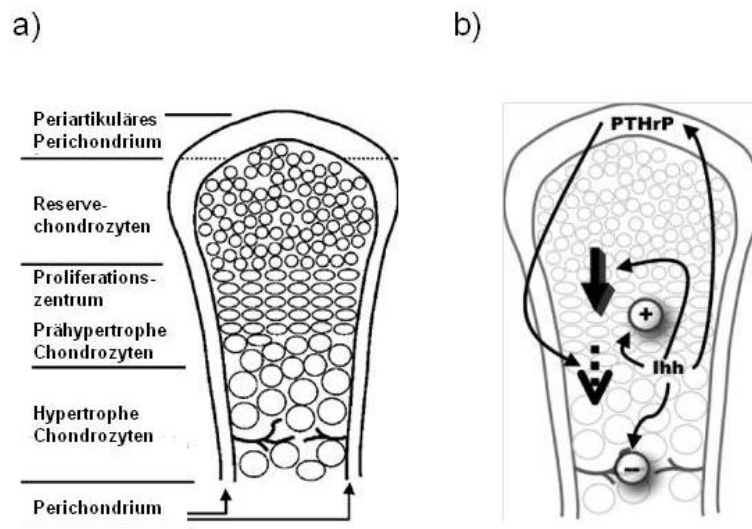
a) Kondensation mesenchymaler Zellen zu Prächondrozyten (Knorpelvorläuferzellen); b) Ausbildung der Knorpelmatrix, Zellen im Zentrum der Knorpelmatrix differenzieren sich zu Chondrozyten, periphere Zellen bilden das Perichondrium aus; c) Unterteilung der Knorpelstruktur in zwei Bereiche: Epiphyse (mit Reservechondrozyten) und Diaphyse (hohe Chondrozytenteilung und -differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten), Ausbildung der Knochenschaft durch kortikale Ossifikation; d) Invasion der Blutgefäße und Osteoblasten, Ausbildung des primären Ossifikationszentrums durch Osteoblasten (trabikulärer Knochen), Abbau der Knorpelmatrix durch Chondroklasten, das Perichondrium wird zum Periostium; e) Ausbildung der Knochenmarkshöhle, Entstehung des kortikalen Knochens und der sekundären Ossifikationszentren im epiphysealen Bereich; f) Ausbildung von trabikulärem Knochen im epiphysären Bereich, Längenwachstum des Knochens mittels Wachstumsfuge, Einwanderung von hämatopoetischen Zellen in die Knochenmarkshöhle (nach Mader et al., 2008).

Im Laufe der Embryonalentwicklung bildet sich ein Ossifikationszentrum in der Knochenanlage aus, das die verschiedenen Stadien der Chondrozytendifferenzierung beinhaltet. Dieser Streifen wird als Wachstumsfuge der Knochenanlage bezeichnet und ist so lange offen, bis das Längenwachstum des Knochens abgeschlossen ist (Kronenberg 2003).

### 1.3.1 Indian Hedgehog: Essentiell während der endochondralen Ossifikation

Indian Hedgehog (IHH, MIM 600726) ist ein Mitglied der Hedgehog (HH)-Proteinfamilie und stellt ein wichtiges Signalmolekül während der endochondralen Ossifikation dar (Abbildung 3) (McMahon et al. 2003; Lai und Mitchell 2005). Es wird von Chondrozyten der prähypertrophen Zone exprimiert und reguliert die Chondrozytenproliferation und -differenzierung mittels eines negativen Rückkopplungsmechanismus, der aus dem sezernierten Signalfaktor Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) und Ihh besteht (Vortkamp et al. 1996; Lai und Mitchell 2005). PTHrP wird von den periartikulären Chondrozyten im Perichondrium und dessen Rezeptor (PTH/PTHrP-Rezeptor, PPR) von den prähypertrophen Chondrozyten exprimiert. Während des Prozesses der endochondralen Ossifikation ist PTHrP ein Inhibitor der Chondrozytendifferenzierung. PTHrP diffundiert vom Perichondrium in die Wachstumsfuge und bindet an den Rezeptor PPR. Dadurch wird die Differenzierungsrate der proliferierenden Chondrozyten in hypertrophe Chondrozyten gehemmt, wodurch die Versorgung der proliferierenden Chondrozyten mit Ihh unterbunden wird. Diese negative Rückkopplungsschleife ist essentiell für eine korrekte Knochenentwicklung (St-Jacques et al. 1999; Lai und Mitchell 2005). Des

weiteren kontrolliert *Ihh* die Osteoblastendifferenzierung über den Transkriptionsfaktor *Runx2* (runt-related transcriptionfactor2, MIM 600211) (Yoshida et al. 2004) und ist in weiteren Signalwegen wie FGF (Fibroblast Growth Factor, MIM 134934), Wnt (Wingless-type MMTV integration site, MIM 606359) und BMP (Bone morphogenetic proteins, MIM 112261) beteiligt (Iwata et al. 2000; Chen et al. 2001; Minina et al. 2002; Lai und Mitchell 2005). Mutationen im *IHH* verursachen Abnormalitäten in der Extremitätenentwicklung: Kurzfingerigkeit vom Typ Brachydaktylie Typ A1 (BDA1, MIM 112500) oder Akrocapitofemorale Dysplasie mit Brachydaktylie (MIM 607778) (Gao et al. 2001; Hellemans et al. 2003; Lai und Mitchell 2005).

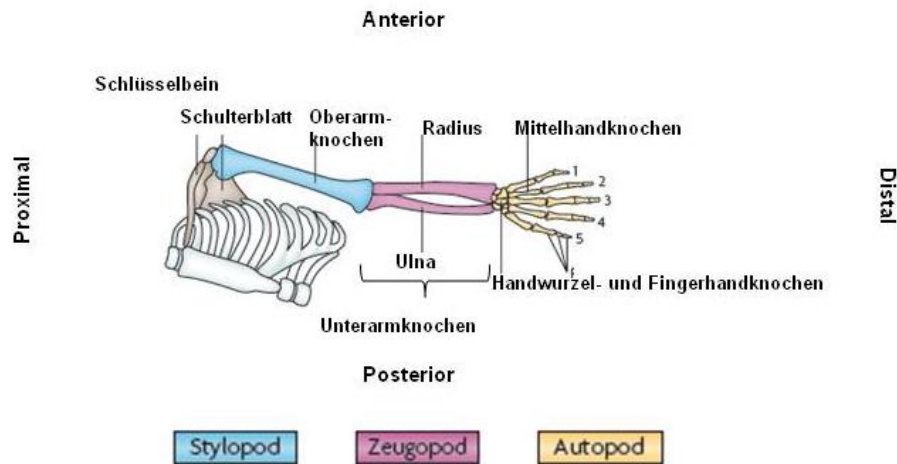


**Abbildung 3 Funktion von *Ihh* während der endochondralen Ossifikation.**

a) Überblick der verschiedenen Differenzierungsschritte der Chondrozyten innerhalb der Wachstumsfuge; b) Expression von PTHrP fördert die Proliferation der Chondrozyten und gleichzeitig die Herabsetzung der Differenzierung in hypertrophe Chondrozyten. *Ihh* wird während der endochondralen Ossifikation von den prähypertrophen Chondrozyten exprimiert und reguliert die Chondrozytenproliferation und -differenzierung mittels eines negativen Rückkopplungsmechanismus mit dem sezernierten Signalfaktor Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) (nach Lai et al, 2005).

#### 1.4 Extremitätenentwicklung bei Wirbeltieren

Extremitäten (Gliedermaßen) sind bei Gliederfüßern und Vertebraten paarig angelegt und dienen hauptsächlich als Fortbewegungs- oder Greifwerkzeuge. Bei den Vertebraten werden Vorderextremitäten (Arme) und Hinterextremitäten (Beine) unterschieden, welche jeweils aus einem proximalen Stylopod, einem medianen Zeugopod und einem distalen Autopod aufgebaut sind (Zeller et al. 2009) (Abbildung 4).



**Abbildung 4 Aufbau der Extremität beim Menschen.**

Das menschliche Extremitätenskelett besteht aus dem Stylopod (blau), Zeugopod (rosa) und Autopod (gelb), Lagebezeichnungen (proximal, distal, anterior, posterior) sind relativ zur Körpermitte (nach Zeller et al., 2009).

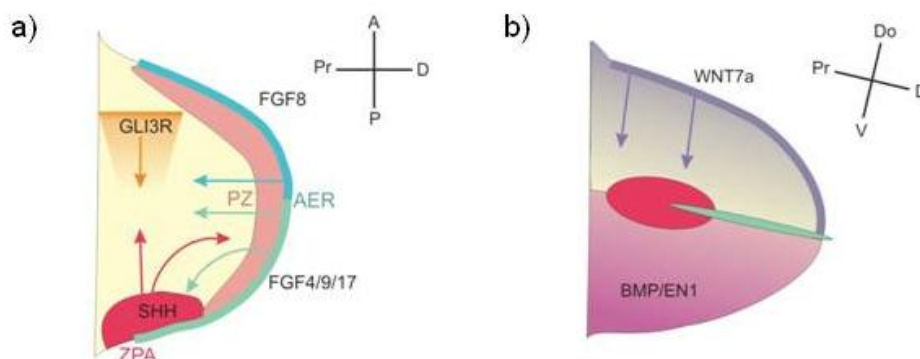
Die embryonale Entwicklung der Extremitäten bei Vertebraten stellt ein gutes Modellsystem für die Untersuchung von zellulären Interaktionen und interzellulären Signalübertragungen dar (Niswander 2003).

In der frühen Embryogenese kommt es zur Ausbildung von drei Keimblättern, die in das Ektoderm, das Endoderm und das Mesoderm unterschieden werden. Aus dem Ektoderm entstehen u.a. die Epidermis, Teile des Schädels und das zentrale Nervensystem. Das Mesoderm ist für den Stütz- und Bewegungsapparat, das Blut, die Lymphe mit den entsprechenden Gefäßen, die Ausscheidungs- und Exkretionsorgane und das Gonadensoma verantwortlich. Das Endoderm bildet die endogenen Strukturen aus, wie den Verdauungstrakt mit Anhangsdrüsen (z.B. Leber, Bauchspeicheldrüse, Lunge, Schilddrüse). Das Mesoderm wird in das paraxiale, intermediäre und laterale Plattenmesoderm unterteilt. Das laterale Plattenmesoderm ist neben der Entwicklung von verschiedenen Geweben (u.a. Bindegewebe, das Endothel der Blutgefäße sowie deren glatte Muskulatur) für die Entstehung der Extremitäten verantwortlich (Pearse et al. 2007). Es werden paarige Extremitätenknospen ausgebildet, die aus mesenchymalen Zellen aufgebaut und von einer einlagigen Schicht ektodermaler Epithelzellen umgeben sind. Aus den mesenchymalen Zellen entstehen die Skelettelemente und das Bindegewebe. Die myogenen Zellen, die die spätere Muskulatur bilden, wandern sekundär von den Somiten in die Extremitätenknospe ein (Johnson und Tabin 1997; Wolpert 1999). Die Extremitätenknospe wird in drei Primärachsen unterteilt, die als proximo-distale (Schulter bis Fingerkuppe), anterior-posteriore (Daumen bis kleiner Finger) und dorso-ventrale Achse (Handrücken zu Handinnenfläche) bezeichnet werden (Shubin et al. 1997; Zeller et al. 2009). Bei der korrekten Anlage und Entwicklung der dreidimensionalen Extremität sind unterschiedliche Signalzentren und Schlüsselgene beteiligt. Zu den essentiellen Signalzentren zählt die apikale ektodermale Randleiste (AER), die Progresszone (PZ) und die Zone polarisierender Aktivität (ZPA) (vgl. Abbildung 5).

Die AER wird an der dorso-ventralen Grenze aus Epithelzellen ausgebildet und besteht aus einer Leiste zylindrischer Zellen. Unterhalb der AER befindet sich die PZ, die aus undifferenzierten, rasch proliferierenden mesenchymalen Zellen besteht und den Großteil der Extremität ausbildet (Zeller et al. 2009). Im posterioren Bereich der Knospe liegt die ZPA, die die korrekte Entwicklung der Extremität in der anterior-posterioren Achse steuert (Wolpert 1969; Tickle et al. 1975; Zeller et al. 2009).

#### 1.4.1 Signalwege und Schlüsselgene der Extremitätenentwicklung

Nach der Lokalisation (Hox-Gene) (Capdevila und Izpisua Belmonte 2001) und Determination der Gliedmaßenanlagen (Vorderextremität: Tbx5, Hinterextremität: Tbx4) (Gibson-Brown et al. 1996) wird die Entstehung der Extremitätenknospe sowie die Ausbildung der proximo-distalen Achse von Fgf-Signalen induziert (Niswander et al. 1994). Fgf10, exprimiert von den mesenchymalen Zellen der PZ, induziert die Extremitätenknospe und fördert gleichzeitig die Produktion von Fgf8 in der AER. Fgf10 und Fgf8 stimulieren die Proliferation der Zellen in der PZ und halten die AER aufrecht (Martin 1998; Xu et al. 1998). Fgfs der AER, Retinsäure, aber auch Hox-Genprodukte induzieren die Synthese von Shh in der ZPA (Zeller et al. 2009). Shh ist für die Ausbildung der anterior-posterioren Achse essentiell (vgl. Kapitel 1.4.1.1.) Durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus von Shh und der Repressorform von Gli3 (Gli3R) wird ein Shh-Gradient von der posterioren zur anterioren Achse aufrecht gehalten und im anterioren Bereich die Expression spezifischer Gene ermöglicht (Theil et al. 1999; Zeller et al. 2009). Shh steht mit Fgf8 und Fgf4 in einem positiven Rückkopplungsmechanismus, indem Shh über Formin und Gremlin die Bmp-Signalübertragung unterbindet, so dass die Fgf-Aktivität in der AER aufrechterhalten wird (vgl. Abbildung 5 a) (Zwilling 1956; Saunders und Gasseling 1963; Pizette und Niswander 1999; Zeller et al. 2009). Die dorso-ventrale Achse wird maßgeblich durch Wnt7a determiniert, das im dorsalen Epithel exprimiert wird und die Synthese von Lmx1b im darunter liegenden Mesoderm induziert. Lmx1b ist für die Differenzierung von dorsalen Strukturen verantwortlich. Das ventrale Ektoderm synthetisiert hingegen Bmps, die die Synthese von Engrailed (En1) induzieren, das wiederum die Synthese von Wnt7a im ventralen Bereich hemmt (Riddle et al. 1995; Zeller et al. 2009) (vgl. Abbildung 5 b).



**Abbildung 5 Signalzentren während der Entwicklung der Extremitätenknospe.**

a) Die AER sezerniert Wachstumsfaktoren (FGF 4, 8, 9 und 17) an die unterliegende PZ, wodurch die Proliferation angeregt und das Längenwachstum gefördert wird. Die ZPA, die AER sowie der anteriore Bereich stehen durch die Signalmoleküle SHH, Gli3R und FGF in Wechselwirkung und bedingen



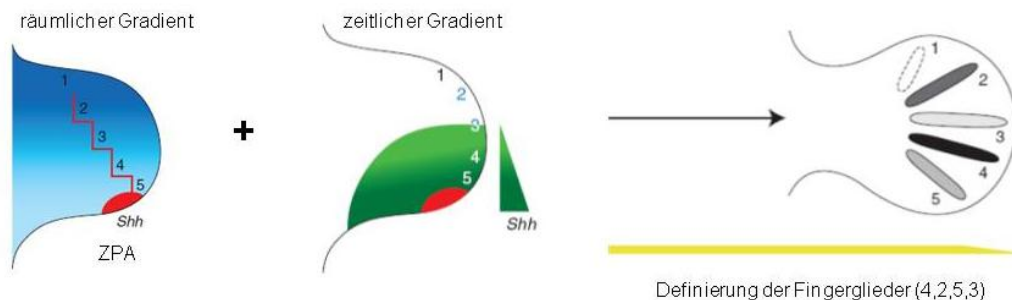
dadurch die korrekte Extremitätenentwicklung; b) Das Signalmolekül WNT7a beeinflusst die Entwicklung der dorsalen Identität der Extremitätenknospe, BMP-Faktoren sowie EN1 sind für die Entstehung der ventralen Strukturen verantwortlich. AER= Apikale ektodermale Randleiste, BMP= Bone morphogenetic Protein, EN1= Engrailed 1, FGF= Fibroblast Growth-Factor, GLI3R= GLI-Zinkfingerprotein 3 Repressor, PZ= Progresszone, SHH= Sonic hedgehog, WNT7a= wingless-type MMTV integration site family, member 7A (nach Niswander et al., 2003).

Es existieren derzeit zwei verschiedene Modelle, die das Längenwachstum der Extremität von proximal nach distal beschreiben: In dem „Progresszonen-Modell“ wird angenommen, dass sich die proliferierenden Zellen erst nach dem Verlassen der PZ spezifizieren, so dass die Differenzierung, die Ausbildung der Knorpelstrukturen und die Entstehung der einzelnen Skelettelemente von proximal nach distal geschieht (Stylopod, Zeugopod, Autopod) (Summerbell et al. 1973).

Das alternative Modell geht von einer frühen Spezifikation der proliferierenden Zellen in der PZ aus, so dass schon während der Knospenentwicklung die letztendliche Funktion im Gesamtkontext determiniert wird (Dudley et al. 2002; Sun et al. 2002).

#### 1.4.1.1 *SHH*, ein Schlüsselgen während der Extremitätenentwicklung

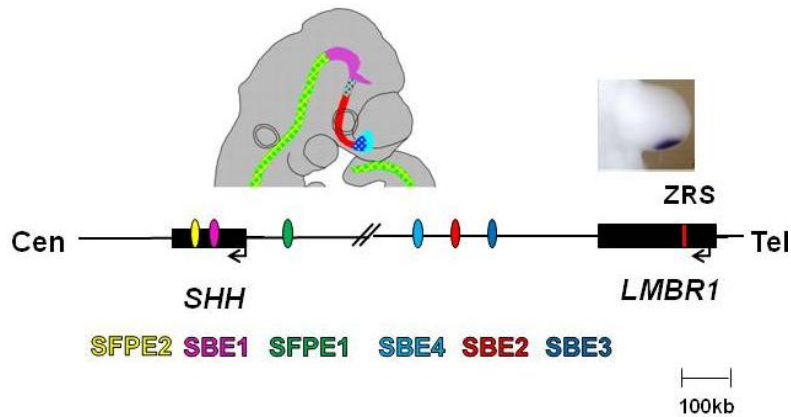
*SHH* (MIM 600725) ist auf dem Chromosom 7q36.3 lokalisiert und beeinflusst u.a. die Entstehung des ventralen Neuralrohrs, die Entwicklung der ventralen Somiten und die Musterbildung der sich entwickelnden Extremität. Mittels eines Zeit- und Konzentrationsgradienten beeinflusst es maßgeblich die Musterausbildung der anterioren-posterioren Achse sowie die Identität der einzelnen Fingerglieder (Benazet und Zeller 2009) (Abbildung 6).



**Abbildung 6** Musterbildung der sich entwickelnden distalen Extremität durch einen räumlichen und zeitlichen *Shh*-Gradienten.

Die Fingerglieder werden in der Reihenfolge 4, 2, 5 und 3 festgelegt. Die Entwicklung des Daumens (1) ist unabhängig von *Shh* (nach Bénazet et al., 2009).

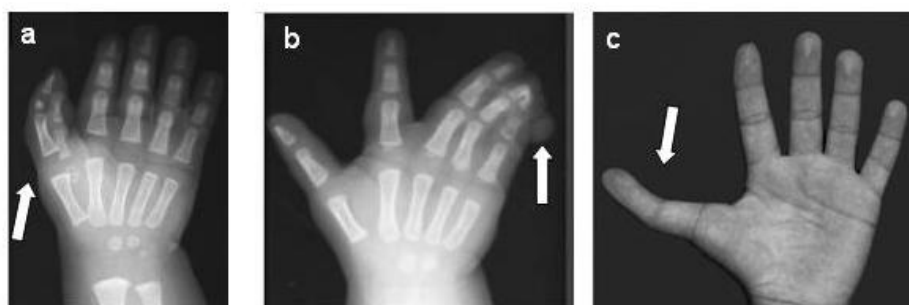
Reguliert wird *Shh* durch unterschiedliche cis-regulatorische Elemente (Kornak und Mundlos 2003), die dessen Expression während der diversen mustergebenen Prozesse beeinflussen (Abbildung 7) (Jeong et al. 2006; Benazet und Zeller 2009).



**Abbildung 7 Enhancer-Regionen des *SHH*-Gens.**

*SHH* benötigt für eine geregelte Expression in verschiedenen Geweben unterschiedliche cis-regulatorische Regionen (Enhancer). Für die Expression von *SHH* während der Neuralrohrentwicklung und innerhalb des ZNS werden sechs verschiedene Enhancer benötigt (SFPE1, SFPE2, SBE1, SBE2, SBE3, SBE4). Die Expression im posterioren Part der Extremität wird durch die ZRS-Region gesteuert; SFPE= Shh floor-plate enhancer, SBE= Shh brain enhancer, ZRS= ZPA regulatory sequence (nach Jeong et al., 2006; Bénazet et al., 2009).

Der extremitätenspezifische cis-Regulator befindet sich ca. 1Mb aufwärts des *Shh*-Gens und wird als ZPA regulatorische Sequenz (ZRS) bezeichnet. Hierbei handelt es sich um einen sogenannten "long-range-Regulator". Die ZRS befindet sich innerhalb eines hoch konservierten nicht codierenden Bereichs, innerhalb des Introns 5 des *LMBR1*-Gens (MIM 605522) (Lettice et al. 2003; Sagai et al. 2004). Mutationen innerhalb der ZRS-Region verursachen unterschiedliche klinische Phänotypen, die die Autopod-Entwicklung betreffen. Punktmutationen in der murinen ZRS-Region führen zur Ausbildung von zusätzlichen präaxialen Phalangen, verursacht durch eine ektope *Shh*-Expression. Eine verstärkte *Shh*-Expression im posterioren Bereich äußert sich in einer postaxialen Polydaktylie (Lettice und Hill 2005). In Patienten konnte nachgewiesen werden, dass ZRS-Punktmutationen und Mikroduplikationen, die diese Region beinhalten, mit dem klinischen Krankheitsbild der Polysyndaktylie mit Triphalangealen Daumen (TPT-PS, MIM 174500) und der Syndaktylie Typ IV (SD4, MIM 186200) assoziiert sind (Lettice et al. 2003; Klopocki et al. 2008).



**Abbildung 8 Phänotyp von Patienten mit einer Duplikation innerhalb der ZRS-Region des *SHH*-Gens.**

a) präaxiale Hexadaktylie; b) Syndaktylie der Finger III, IV und V und einer zusätzlichen postaxialen Hexadaktylie; c) Triphalangealer Daumen (nach Klopocki et al. 2008).

Das Laurin-Sandrow Syndrom (LSS, MIM 135750) ist durch Polysyndaktylie der Hände und/ oder Füße und Spiegelduplikationen der Füße beschrieben. Weiter Merkmale können nasale Anomalien (verkürzte Kolumella), eine fehlende Kniescheibe (Patella) sowie auch ein Identitätsverlust zwischen der Fibula und Tibia sein. Die genetische Ursache für dieses Krankheitsbild ist derzeit noch nicht beschrieben, es wurde aber zum chromosomalen Lokus 7q36 kartiert (Kjaer et al., 2005).

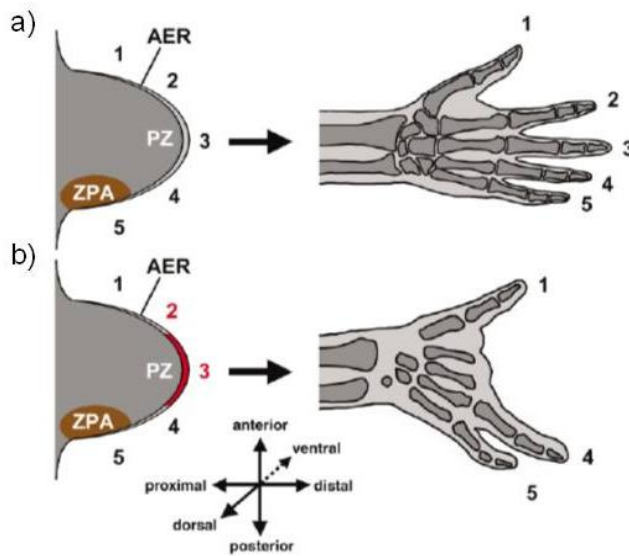
## 1.5 Extremitätenfehlbildungen

Extremitätenfehlbildungen beschreiben anatomisch abweichende Phänotypen von Gliedmaßen innerhalb der Bevölkerung, die vererbt werden oder *de novo* entstehen. Man unterscheidet verschiedene Typen der Fehlentwicklungen:

- a) Brachydaktylie: Kurzfingerigkeit einzelner Finger und/oder Zehen
- b) Polydaktylie: überzählige Finger und/oder Zehe (z.B. Hexadaktylie mit sechs Fingern)
- c) Oligodaktylie: Fehlen einzelner Finger und/ oder Zehe
- d) Ektrodaktylie: Sonderform der Oligodaktylie gekennzeichnet durch Fehlen der zentralen Strahlen
- e) Syndaktylie: zusammengewachsene Finger und/oder Zehen, kutan (die Haut betreffend) oder ossär (den Knochen betreffend). Eine totale Syndaktylie bezeichnet das Verwachsen aller Finger/Zehe.
- f) Polysyndaktylie/Synpolydaktylie: Gleichzeitiges Auftreten von Polydaktylie und Syndaktylie

### 1.5.1 Spalthand-/ fußfehlbildungen (split hand/ foot malformation, SHFM)

Spalthand- und -fußfehlbildungen (split hand/foot malformation, SHFM) sind genetisch bedingte Malformationen des distalen Extremitätenskeletts. SHFM, auch unter der Bezeichnung Ektrodaktylie bekannt, ist durch das Fehlen von zentralen Strahlen im Autopod gekennzeichnet, d.h. eine Sonderform der Oligodaktylie (Abbildung 9) (Duijf et al. 2003).

**Abbildung 9 Entstehung der Ektrodaktylie.**

a) Normale Entwicklung des distalen Extremitätenskeletts, ausgehend von einer intakten Extremitätenknospe mit AER, PZ und ZPA; b) Fehlbildung des distalen Extremitätenskeletts, hervorgerufen durch eine funktionelle Störung der medianen AER-Aktivität gekennzeichnet durch einen roten Balken innerhalb der AER-Region an der Position von Finger zwei und drei; Lagebezeichnungen der Extremität sind auf die Körperachse bezogen; AER= apikale ektodermale Randleiste, PZ= Progress-Zone, ZPA= Zone polarisierender Aktivität, Zahlen 1 bis 5 geben die Position der Fingeranlagen an (nach Duijf, 2003).

Weitere Merkmale sind oft Syndaktylien aber auch Aplasien/ Hypoplasien der Phalangen, das Fehlen der Radialstrahlen, was zur Ausbildung einer Hand mit einem Finger (Monodaktylie) führt. Auch Aplasien/ Hypoplasien der Metakarpalen/ Metatarsalen (Mittelhand-, Mittelfußknochen) sind als phänotypische Ausprägung bekannt (Duijf et al. 2003).

SHFM ist eine selten auftretende Erkrankung (0,54/ 10000 bis 0,60/ 10000) (Stoll et al. 1996; McGuirk et al. 2001) und kann als solches isoliert auftreten (nicht syndromale Form) oder in Kombination mit anderen klinischen Phänotypen z.B. Lippen-Kiefer-Gaumenspalte, Taubheit oder Augenanomalien (syndromale Form). Es existiert eine hohe klinische Variabilität zwischen SHFM-Patienten, aber auch die Ausprägung innerhalb eines Patienten kann variieren (Elliott et al. 2005; Lezirovitz et al. 2008; Armour et al. 2011).

Die genetische Grundlage dieses Krankheitsbildes kann nicht auf einen Genlocus manifestiert werden. Derzeit sind sechs verschiedene Genloci bekannt, wobei nur drei genetische Ursachen im Detail verstanden sind (Tabelle 1).

**Tabelle 1 Übersicht der SHFM-Typen mit dem dazugehörigen Genlocus (nach Duijf et al. 2003).**

SHFM-Typ	MIM	Genlocus	Genetische Veränderung	(potenzielle) Kandidatengene
SHFM1	183600	7q21	Deletion, Translokation	( <i>DLX5, DLX6, DSS1</i> )
SHFM2	313350	Xq26	unbekannt	( <i>FGF13, TONDU</i> )
SHFM3	246560	10q24	Duplikation	( <i>Dactylin, SUFU, BTRC</i> )
SHFM4	605289	3q27	Mutationen (dominant)	<i>TP63</i>
SHFM5	606708	2q31	Deletion	( <i>DLX1, DLX2</i> )

SHFM6	225300	12q13	Mutation (rezessiv)	<i>WNT10B</i>
-------	--------	-------	---------------------	---------------

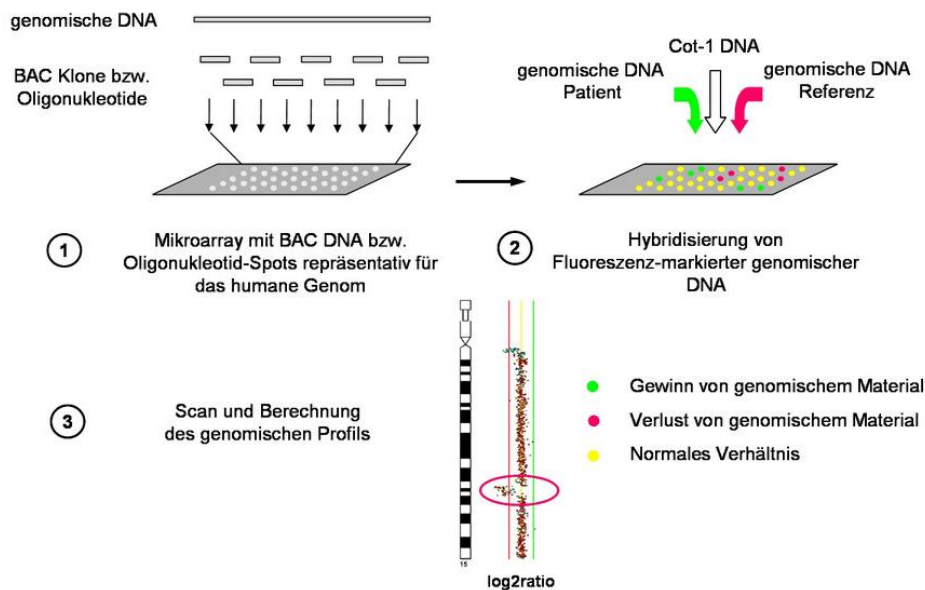
Patienten mit Mutationen im *TP63*-Gen (MIM 603273) können sowohl nicht-syndromale als auch syndromale SHFM-Formen zeigen. Dieser Transkriptionsfaktor wird in basalen Zellschichten epithelialer Gewebe exprimiert und stellt einen Schlüsselregulator für die Zellproliferation und -differenzierung von Stammzellen mehrschichtiger Plattenepithelien dar. Eine Veränderung im *TP63*-Gen kann neben Extremitätenfehlbildungen (SHFM4) auch Gesichts-, Haut und Schädelanomalien, die sich u.a. in der Verdickung der Oberhaut, Lippen-Kiefer-Gaumenspalte, und Fehlbildungen der Nägel, Haare und Zähne auswirken, hervorrufen (Yang et al. 1999). SHFM-Typ 1, 3 und 5 sind mit genomischen Aberrationen assoziiert: SHFM1 mit Deletionen oder Translokationen, SHFM3 mit Duplikationen und SHFM5 mit Deletionen (vgl. Tabelle 1) (Duijf et al. 2003).

Eine zusätzliche Defizienz (Aplasie/ Hypoplasie) der langen Röhrenknochen, insbesondere der Tibia, kennzeichnet das Krankheitsbild SHFLD (split hand/ foot malformation with long bone deficiency, SHFLD, MIM 275220). Diese Sonderform der Ektrodaktylie wird auch als Tibia Hemimelie-Ektrodaktylie-Syndrom bezeichnet. Zusätzliche Merkmale können eine femurale Bifurkation oder distale Hypoplasie, eine Ulna Hypo- oder Aplasie, eine Aplasie der Patella, Hypoplasien der großen Zehen und auch Fehlbildungen der Hörorgane in Form von kelchförmigen Ohren sein (Managoli und Chaturvedi 2005; Lezirovitz et al. 2008). SHFLD tritt mit einer Häufigkeit von 1 zu 1 Million Neugeborenen auf und zeigt einen autosomalen dominanten Erbgang mit unvollständiger Penetranz. SHFLD-Patienten weisen eine variable Expressivität auf. Die Ausprägung der klinischen Merkmale ist wie bei SHFM innerhalb einer Familie, aber auch zwischen einzelnen Patienten stark variabel (Duijf et al. 2003; Lezirovitz et al. 2008). Für SHFLD sind derzeit vier genetische Loci bekannt: 1q42.2-q43 (SHFLD1, MIM 119100), 6q14.1 (SHFLD2, MIM 610685), 17p13.1-17p13.3 (SHFLD3, MIM 612576) und 2q44.2 (SHFLD4). Derzeit sind die genetischen Ursachen für SHFLD unklar.

## 1.6 Kopienanzahlveränderungen (CNVs, copy number variations) im Genom

Veränderungen im Genom fördern die Entstehung der genetischen Variabilität und Vielfalt zwischen einzelnen Individuen und Spezies (Freeman et al. 2006). Man unterscheidet Einzelnukleotid-austausche (Punktmutationen), strukturelle (Deletion, Duplikation, Insertion, Translokation) sowie numerische Chromosomenaberrationen (Veränderung der Anzahl der Chromosomen, Genommutation). Strukturelle Chromosomenaberrationen sind in den letzten Jahren immer stärker in den wissenschaftlichen Vordergrund gerückt und stellen einen wichtigen Aspekt bezüglich der Entstehung von Erkrankungen dar. 1997 wurde die hochauflösende Analyseverfahren der Array-CGH (comparative genomic hybridization) eingeführt (Solinas-Toldo et al. 1997), die es erlaubt, die Struktur des gesamten Genoms eines Patienten im Vergleich zu einer Referenz-DNA zu untersuchen (Genomanalyse). Diese Methode ermöglicht die Detektion von Zugewinnen oder Verlusten chromosomalen Materials in hochauflösendem Maßstab. Mit der Array-CGH lassen sich Genomveränderungen in einer Größenordnung von 1kb bis 1Mb nachweisen, abhängig von der Dichte/ Auflösung des verwendeten Arrays (z.B. 244K Array= 244.000 Oligonukleotiden, die das

Gesamtgenom abdecken). Die Detektionsrate chromosomaler Aberrationen kann mit dieser hochauflösenden Technologie, im Vergleich zu den konventionellen Untersuchungsmethode der Zytogenetik (Metaphasenpräparate und FISH-Analyse (Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung)), deutlich verbessert werden (Oostlander et al. 2004). Für die Array-CGH werden Objektträger (Slides) verwendet, auf denen Oligonukleotide aufgebracht sind, die das gesamte Genom oder eine bestimmte Genregion (Customarray) abdecken. Die zu untersuchende DNA des Patienten und eine Referenz-DNA werden mit Restriktionsenzymen geschnitten, mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert und auf einen Objektträger kohybridisiert. Eine Verschiebung der Fluoreszenzsignale der Referenz-DNA zur Patienten-DNA verweist auf eine Aberration innerhalb des Genoms (Lapierre und Tachdjian 2005).



**Abbildung 10 Schematische Übersicht der Array-CGH.**

Test-DNA und Referenz-DNA werden mit unterschiedlichen fluoreszierenden Farbstoffen markiert und auf gespottete BAC-Klone oder Oligonukleotide (Array) hybridisiert. Die Fluoreszenzsignale der Referenz- und Patienten-DNA werden mit einem Scanner gescannt und im Anschluss mit einer Auswertungssoftware analysiert. In der Auswertungssoftware wird das zur Basis 2 logarithmierte (Log<sub>2</sub>) Verhältnis der Signalintensitäten für die einzelnen BAC-Klone/ Oligonukleotide berechnet, die genomischen Positionen der Oligonukleotide geordnet und Aberrationen (Gewinne und Verluste) von genomischen Material angezeigt.

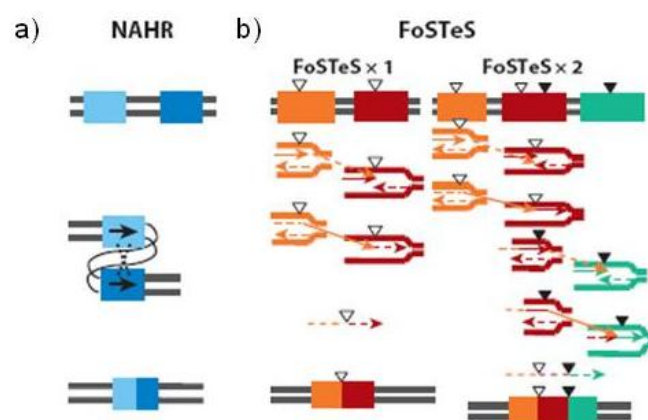
(Quelle: [http://genetik.charite.de/diagnostik/array\\_cgh/](http://genetik.charite.de/diagnostik/array_cgh/))

### 1.6.1 Entstehungsmechanismen von CNVs

CNVs können auf unterschiedliche Weise entstehen. Es wird zwischen Rekombinations- und Replikationsereignissen unterschieden. Zu den Rekombinationsereignissen zählen die nicht allelische homologe Rekombination (non allelic homologous recombination, NAHR) und die nicht homologe Verknüpfung von DNA-Strängen (nonhomologous end Joining, NHEJ). Bei der NAHR (vgl. Abbildung 11a) kommt es zu Rekombinationsereignissen zwischen DNA-Abschnitten mit gleicher oder ähnlicher Nukleotid-Sequenz, die nicht allelisch sind. Die Rekombination ereignet sich meist zwischen Regionen mit sogenannten low copy repeats (LCRs). LCRs sind distinkte nicht-allelische genomische Segmente

mit gleicher DNA-Sequenz. Sie machen 5-10% des menschlichen Genoms aus und zeigen eine zu 95%ige Sequenzübereinstimmung untereinander. Meist sind sie zwischen 10-300kb groß und ubiquitär im Genom vorzufinden. Befinden sich die LCRs in einer Distanz < 10Mb zueinander, können sie Fehlalignments zwischen Chromosomen oder Chromatiden herbeiführen. NAHR zwischen LCRs, welche in direkter Orientierung zueinander ausgerichtet sind, führen zu Deletionen oder reziproken Duplikationen. Liegen die LCRs invertiert vor, so kann die dazwischenliegende Region invertiert werden. Bei einer komplexen Struktur von LCRs, bestehend aus direkten und invertierten Einheiten, können Duplikationen, Deletionen oder Inversiconen entstehen. NHEJ stellt eine essentielle Rolle bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen dar. DNA-Enden werden miteinander verbunden, ohne homologe Sequenzabschnitte (LCRs bzw. minimale Sequenzübereinstimmungen) zueinander aufzuweisen. DNA-Doppelstrangbrüche werden mittels eines Proteinkomplexes detektiert, räumlich zueinander geführt, modifiziert und letztendlich wieder ligiert. Die reparierten Stücke enthalten oft zusätzliche Nukleotide, die wiederum zur genomischen Vielfalt beitragen.

Aber auch Fehler bei der Replikation der DNA können CNVs entstehen lassen. Eine verlangsamte Entwindung der Replikationsgabel sowie ein Matrizenwechsel (fork stalling and template switching, FoSTeS) können zu komplexen Strukturveränderungen innerhalb des Genoms führen (vgl. Abbildung 11b). Die Existenz von Mikrohomologien fördert diesen Mechanismus (microhomology mediated break-induced replication MMBIR).



**Abbildung 11 Entstehungsmechanismen von CNVs durch NAHR oder FoSTes.**

a) Modell für die nicht allele homologe Rekombination (homologous recombination, NAHR) zwischen repetitiven/ homologen Sequenzen (waagerechte schwarze Pfeile). b) Modell für den Matrizenwechsel und anschließende Replikation eines neuen Matrizenstrangs innerhalb der integrierten Replikationsgabel (fork stalling and template switching, FoSTeS). Die Neuordnung des Genoms und Entstehung von Aberrationen innerhalb des Genoms wird durch Mikrohomologien (minimale Sequenzübereinstimmungen) hervorgerufen. FoSTeSx1 symbolisiert eine einfache Neuordnung zwischen zwei chromosomalen Bereichen mit übereinstimmenden Homologien. FoSTeSx2 verdeutlicht die Entstehung von komplexen Änderungen innerhalb des Genoms, resultierend durch Mikrohomologien zwischen mehr als zwei DNA-Abschnitten (nach Zhang et al., 2009).

An der Stelle der Mikrohomologien kommt es zu einer Bruchpunktentstehung. Je nach Lage der neuen Replikationsgabel beim Matrizenwechsel (stromauf- oder abwärts) kann es zu einer Deletion

oder Duplikation des Abschnitts kommen. Der Folgestrang löst sich von der DNA-Matrize los und lagert sich an eine physikalisch in der Nähe befindlichen neuen Replikationsgabel an. Die DNA-Synthese wird an diesem Strang erneut initiiert. Je nachdem, ob es sich bei dem invadierten Strang um den Leit- oder den Folgestrang handelt, kommt es zur Entstehung einer direkten oder indirekten Orientierung der integrierten Region.

Es gibt LCRs oder Mikrohomologien im Genom, die hohe Präferenzorte für Aberrationen darstellen und rekurrente Bruchpunkte aufweisen sowie Regionen, bei denen LCRs oder Mikrohomologien immer wieder differente CNVs entstehen lassen (nicht-rekurrente Bruchpunkte) (Gu et al. 2008; Zhang et al. 2009).

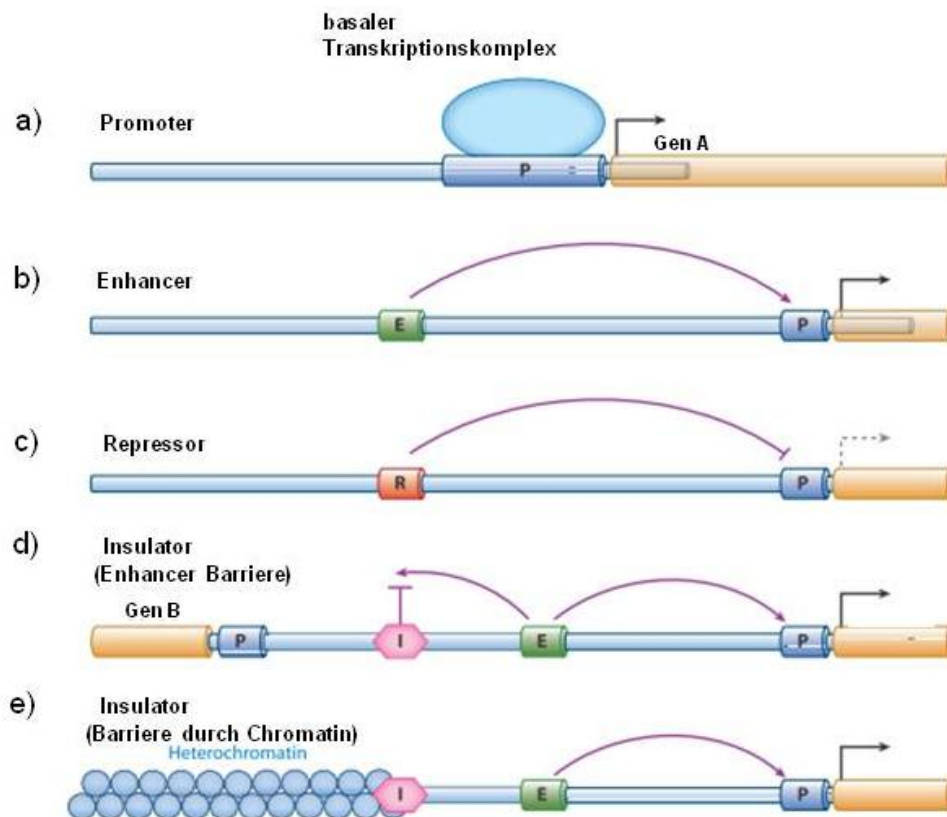
## 1.7 Regulation der Genexpression

Die räumlichen, zeitlichen und quantitativen Aspekte der Genexpression werden durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst (Levine und Tjian 2003). Die Transkriptionsaktivität von Genen wird durch flankierende Sequenzbereiche und weiter entfernte Genomabschnitte reguliert (Howard und Davidson 2004). Diese cis-agierenden Elemente können in unterschiedliche Elemente untergliedert werden: Der Promoterbereich direkt aufwärts (5') des Transkriptionsstarts wird als Minimalpromoter oder auch Kernpromoterbereich bezeichnet (30bp vor und ca. 4bp nach dem Startpunkt der Transkription) und beeinflusst die letztendliche Zusammensetzung des finalen Protein-komplexes, der für die RNA-Synthese benötigt wird. Zu den basalen Promotorelementen gehören: BRE (TFII Recognition Element), TATA-Box, Inr (Initiator) und DPE (Downstream Promotor Elements), die die Anlagerung und Positionierung der DNA-abhängigen-RNA-Polymerase an den Transkriptionsstartpunkt unterstützen. Gene, die konstitutionell exprimiert werden („Housekeeping-Genes“), haben keine TATA-Box, sondern GC- oder CAAT-Boxen (Breathnach und Chambon 1981; Butler und Kadonaga 2002; Levine und Tjian 2003). Viele Gene weisen zusätzlich regulatorische Bereiche mit Bindestellen für spezifische Transkriptionsfaktoren auf. Man unterscheidet proximale (bis ca. 200bp vor dem Transkriptionsstart) und distale (1000-2000bp von dem Transkriptionsstart entfernte) Promotorelemente. Einige Gene benötigen zusätzlich zu den basalen, proximalen und distalen Abschnitten multiple cis-agierende Elemente, die weiter entfernt liegen (Enhancer, Repressoren, Insulatoren) (vgl. Abbildung 12) und durch die die korrekte räumliche und zeitliche Expression eines Gens gewährleistet wird. Solche regulierenden Elemente können stromaufwärts und -abwärts eines Gens, innerhalb intronischer Sequenzen benachbarter Gene oder auch auf anderen chromosomalen Abschnitten liegen. Befinden sich cis-agierende Elemente in einem größeren Abstand zum Gen, spricht man auch von long-range-Enhancern (Howard und Davidson 2004; Kleinjan und van Heyningen 2005). Damit ein Enhancer die Transkription eines Gens beeinflussen kann, muss dieser mit dem Gen und seinem Promoterbereich in Kontakt treten. Aktuelle Untersuchungen suggerieren, dass eine strukturelle Veränderung des Chromatins zu einer Loop-Ausbildung führt, wodurch Gen und Enhancer in Verbindung kommen (Feuk et al. 2006). Es existiert somit ein komplexes Netzwerk zwischen den zu transkribierenden Genen, den Promoterbereichen und den „long-range“- Elementen.

Viele Gene sind multifunktional und zeigen während der Entwicklung ein breites Genexpressionsmuster. Das *Shh*-Gen (vgl. Kapitel 1.4.1.1) ist während der frühen Embryogenese an differenten



Entwicklungsprozessen beteiligt, ermöglicht durch unterschiedliche cis-agierende Elemente (Enhancer), die dessen Expression zeit- und ortsspezifisch regulieren (Jeong et al. 2006).



**Abbildung 12 Regulation der Genexpression mittels cis-agierender Elemente.**

Darstellung der Gene A und B mit ihren möglichen cis-agierenden Elementen.

a) Bindung der generellen Transkriptionseinheit an die Promotersequenz des Gens A (basaler Transkriptionskomplex); b) Enhancer (E)- und c) Repressor (R)-Sequenzen beeinflussen die Transkription des Gens A positiv bzw. negativ via Interaktion mit den basalen Promoterelementen; d) Unterdrückung der Enhancer-Wirkung auf das benachbarte Gen B durch ein Insulatorelement (I); e) Unterdrückung der Transkription des Gens B durch fehlende Chromatinentfaltung, wodurch nur die Transkription von Gen A durch den Enhancer aktiviert wird. E= Enhancer, P= Promoter, R= Repressor, I= Insulator (nach Noonan und McCallion 2010).

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Die Entwicklung einer pentadaktylen Extremität bedingt ein aufeinander abgestimmtes Signalnetzwerk von Molekülen. Abweichungen innerhalb eines Signalwegs, hervorgerufen durch genomische Veränderungen, können zu angeborenen Fehlentwicklungen der gesamten Extremität oder auch nur einzelner Skelettelemente führen. Solche genomischen Variabilitäten können durch Einzelnukleotid-austausche sowie strukturelle und numerische Chromosomenaberrationen entstehen. In den letzten Jahren ist die Untersuchung von Kopienzahlveränderungen (copy number variations, CNVs) immer stärker in den Vordergrund gerückt und es konnte eindrücklich gezeigt werden, dass strukturelle Aberrationen für die Entstehung von angeborenen Fehlbildungen verantwortlich sein können.

Patienten mit angeborenen Extremitätenfehlbildungen mit unklarer genetischer Ursache sollen mittels hochauflösender Array-CGH auf strukturelle Aberrationen (Deletionen und Duplikationen) im Genom untersucht werden. Über diesen Ansatz sollen bisher unbekannte, krankheitsassoziierte Gene bzw. Mutationsmechanismen identifiziert werden. Für diese Arbeit werden Patientenkollektive mit unterschiedlichen Phänotypen untersucht:

- 1) Polysyndaktylie, der Syndaktylie Typ IV und des Laurin Sandrow Syndroms
- 2) Syndaktylien der Hände und Füße, teilweise in Kombination mit einer sagittalen Kraniosynostose (Kraniosynostose Typ Philadelphia)
- 3) Ektrodaktylie in Kombination mit tibialen Defekten

Detektierte Imbalancen werden zunächst auf ihre klinische Relevanz getestet, indem der Vererbungsmodus in den Familien und die Segregation mit dem Phänotyp mittels einer unabhängigen Methode verifiziert werden. Die innerhalb der Mikrodeletionen bzw. Mikroduplikationen lokalisierten Gene sollen näher charakterisiert und über funktionelle Analysen *in vitro* und *in vivo* eine Klärung der Pathogenese angestrebt werden. Diese Ergebnisse ermöglichen die Rolle dieser Kandidatengene im komplizierten Prozess der Musterbildung von Extremitäten untersuchen und verstehen zu lernen.

### 3 Material

#### 3.1 Geräte und Zubehör

<u>Gerät</u>	<u>Zusatzinformationen</u>	<u>Hersteller</u>
ABI PRISM® 7900 HT	qRT PCR Maschine	Applied Biosystems Foster City, USA
Binokular	MZ 12	Leica, Heerbrug, Schweiz
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Steri-Cycle HEPA Class 100	Thermo, Schwerte, D
Entwässerungsautomat	TP 1020	Leica, Heerbrug, Schweiz
Einbettstation	EC 350-1/EC 350-2	Microm, Heerburg, Schweiz
Glasröhrchen (Southern Blot)	WHEATON	Industries, Milville, USA
Heizblock	Ori-Block OV 3	Techne, Jahnsdorf, D
Hybridisierungsöfen	OV 2	Biometra, Göttingen, D
Hybridisierungsöfen		Agilent, Santa Clara, USA
Luminometer	1450 MicroBeta Trailux	Wallac, Shelton, USA
Microarray-Scanner + Zubehör	Agilent Microarray Scanner	Agilent, Santa Clara, USA
Mikrotom		Leica, Heerbrug, Schweiz
Spektralphotometer	NanoDrop™ 2000c Nanophotometer™	Thermo Scientific Wilmington, USA Implen, München, D
Netzchen (WISH)	BD Falcon Cell Strainer	BD Bioscience Heidelberg, D
Phosphor Imager	STORM820	Amersham, Glattbrugg, Schweiz
Röntgenkassette	HYpercassette™	Amersham, Glattbrugg, Schweiz
Sequenzierer	Sequence Analyser 3100	Applied Biosystems Foster City, USA
Sterilbank	HERA safe	Thermo Scientific Wilmington, USA
Thermal Cycler	2720 AB	Applied Biosystems Foster City, USA
Thermomixer Comfort	für 1,5ml Gefäße	Eppendorf, Hamburg, D
Vibratom HM650V		Microm, Heerburg, Schweiz
Zellzählkammer (Neubauer-)	Tiefe 0,100mm; 0,0025mm	Birker, Friedrichsdorf, D
Zentrifugen	Biofuge pico	Thermo Scientific

	Wilmington, USA
3417R	Eppendorf, Hamburg, D
RC-5 Superspeed DuPont	Instruments, Sorvall, Miami, USA
Ultrazentrifuge L7.55	Beckman, Krefeld, D
Megafuge 1.0	Heraeus, Buckinghamshire, England

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Zusatzinformationen</b>	<b>Hersteller</b>
96 well Platte Luci		Wallac, Shelton, USA
Deckgläschen		Leica, Heerbrug, Schweiz
„Coverslips“ ( <i>in situ</i> )	Polypropylenbeutel	Roth, Karlsruhe, D
Einbettförmchen	verschiedene Größen	Polysciences, Eppelheim, D
Glaspipetten	1ml, 5ml, 10ml, 20ml	Fortuna, München, D
Injektionsnadeln	BM100T-10 (OD = 20µM)	Biomedical Instruments Birkenfeld, D
Gefrier Röhrchen	Cryo.S PP	Greiner, Frickenhausen, D
Küvetten	Polysterol	Roth, Karlsruhe, D
Nylonmembran (Cat.Nr:RPN203B)	Hybon™-N+	Amersham, Glattbrugg, Schweiz
Pasteurpipette	3ml	Brand, Wertheim, D
Phosphoimageplatten		Kodak, Stuttgart, D
Reaktionsgefäße	0,5ml-, 1,5ml-, 2ml	Eppendorf, Hamburg, D
Zellkultur	6-, 12-, 24-, 96-Loch	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflaschen / -schalen	25cm <sup>2</sup> , 75cm <sup>2</sup> , 150cm <sup>2</sup> / 60mm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkultur-Pipetten	StripetteR	Costar, New York, USA
Zellsieb	40µm Nylon	BD Falcon, Heidelberg, D

### 3.3 Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
2-Methoxyethylacetat (MEA)	VWR, Darmstadt, D
Aceton	Merck, Darmstadt, D
Adenosintriphosphat (ATP)	Roche, Mannheim, D

---

Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, D
	Biozym, Oldendorf D
Ammoniumsulfat (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, D
Ammoniumchlorid NH <sub>4</sub> Cl	Merck, Darmstadt, D
Alcian Blau	Sigma, München, D
Alizarin Rot	Sigma, München, D
Ampicillin	Bayer, Leverkusen, D
Aprotinin 1mg/ ml	Sigma, München, D
Ammoniumpersulfat	Sigma, München, D
Blocking Reagenz	Roche, Mannheim, D
BM Purple	Roche, Mannheim, D
Boehringer´s Blocking Reagent	Roche, Mannheim, D
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
Chloroform	Merck, Darmstadt, D
DAPI	Invitrogen, Darmstadt, D
DPBS (Zellkultur)	Lonza, Köln, D
Dextran Sulfat 40%	Sigma, München, D
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, München, D
Dinatriumhydrogenphosphat Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, D
Dinatriumthiosulfat (Na <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt, D
Dispase	Gibco, Darmstadt, D
Distilled Water, Bio Whittaker™	Cambrex, Wiesbaden, D
Disulfiram	Fluka, München, D
DMPT (N,N-Dimethyl-p-toluidin)	Merck, Darmstadt, D
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt, D
EDTA	Merck, Darmstadt, D
Eisessig; 100% Essigsäure	Merck, Darmstadt, D
Entellan	Merck, Darmstadt, D
Essigsäureanhydrid	Merck, Darmstadt, D
Ethanol; pro analysis	Merck, Darmstadt, D
Ethidiumbromid-Lösung 10mg/ ml	Roth, Karlsruhe, D
Ethylenglycolmonobutylether	Roth, Karlsruhe, D
Formaldehyd	Merck, Darmstadt, D
Formamid, pro analysis	Merck, Darmstadt, D
Fetales Kalberserum (FCS)	Gibco, Darmstadt, D
	Biochrom, Berlin, D
Glutaraldehyd 25%	Sigma, München, D
Glycerin	Merck, Darmstadt, D
Glycin, pro analysis	Merck, Darmstadt, D
Hefeextrakt	Gibco, Darmstadt, D
Heparin	Sigma, München, D

HISS (hitzeinaktiviertes Kälberserum)	Gibco, Darmstadt, D
HydroMatrix	Micro-Tech-Lab, Graz, Österreich
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt, D
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, D
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, D
Kalimhydroxid (KOH)	Merck, Darmstadt, D
L-Glutamin	Cambrex, Wiesbaden, D
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt, D
Maleinsäure	Sigma, München, D
Mercaptoethanol	Fluka, München, D
Methanol, pro analysis	Merck, Darmstadt, D
Methyl-Methacrylat	Polyscience, Warrington, Pennsylvania
Natriumacetat (82,03g/ ml)	Merck, Darmstadt, D
Natriumbicarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt, D
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt, D
Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, D
Natriumdeoxycholate	Sigma, München, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, D
Natronlauge	Merck, Darmstadt, D
Natriumperchlorat	Merck, Darmstadt, D
NBT/BCIP (Nitroblau-Tetrazolium/ 5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphat)	Roche, Mannheim, D
Nonidet P40 (NP40)	Fluka, München, D
Paraffin	Leica, Heerbrug, Schweiz
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, D
peqGOLD TriFast	peqLab, Erlangen, D
Phenol	Roth, Karlsruhe, D
Proteinase K (stock 20mg/ ml)	Boehringer, Ingelheim, D
RNaseZap	Sigma, München, D
Salzsäure (HCl, 37%)	Merck, Darmstadt, D
Select Agar	Gibco, Darmstadt, D
Select Pepton	Gibco, Darmstadt, D
Silbernitrat (AgNO <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe, D
Saccharose	Merck, Darmstadt, D
Sucrose	Invitrogen, Darmstadt, D

SYBR Green	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Triethanolamin (TEA)	Merck, Darmstadt, D
Triton X-100	Sigma, München, D
t-RNA (Typ III baker's yeast)	Sigma, München, D
Trypsin	Cambrex/ Gibco, Wiesbaden/ Darmstadt, D
Tween20	Roth, Karlsruhe, D
Ultraclear	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt, D
Xylol	Roth, Karlsruhe
Zitronensäure	Merck, Darmstadt, D

### 3.4 Microarray-Utensilien

244K Oligonukleotid-Array	Agilent, Santa Clara, USA
Custom Array	NimbleGen, Mannheim, D

#### Restriktionsenzyme

AluI (10U/ µl)	Promega, Mannheim, D
RsaI (10U/ µl)	Promega, Mannheim, D
Puffer für Restriktionsverdau (10x)	Promega, Mannheim, D
Bovine Serum Albumin (BSA) (10mg/ ml)	Promega, Mannheim, D
Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit	Agilent, Santa Clara, USA
CotI Human DNA (1mg/ ml)	Roche, Mannheim, D

### 3.5 PCR Utensilien

10x <i>Taq</i> -Puffer	Biotherm, Fermentas, Köln/ St. Leon-Rot, D
<i>Taq</i> -Polymerase (5U/ µl)	Biotherm, Köln, D
<i>Taq</i> -Polymerase (5U/ µl)	Eigenherstellung am MPI für Molekulare Genetik
Ampli- <i>Taq</i> (5U/ µl)	Applied Biosystems, Foster, Foster City, USA
<i>Pfu</i> -Polymerase (ca.5U/ µl)	Eigenherstellung am MPI für Molekulare Genetik
dNTP Set (100mM)	GE Healthcare, Wien, Österreich Fermentas, St. Leon-Rot, D

Expand Long PCR System	Roche, Mannheim, D
50mM Magnesiumchlorid	Biotherm, Köln, D

### DNA Längenstandards

1kb Marker	Fermentas, St. Leon-Rot, D
1kb plus Marker	Fermentas, St. Leon-Rot, D
100bp Marker	Fermentas, St. Leon-Rot, D
100bp plus Marker	Fermentas, St. Leon-Rot, D
DNA Molecular Weight Marker (DIG labeled 0.081, 8,57kb)	Roche, Mannheim, D

### 3.6 Zellkultur/ Maus-ES-Zellkultur

DMEM, 4,5mg/ ml Glucose, ohne Sodium Pyruvat	Lonza, Köln, D
Knockout DMEM, 4,5mg/ ml Glucose, ohne Sodium Pyruvat	Gibco, Darmstadt, D
ES-Zell-Serum	Lonza, Köln, D
D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Lonza, Köln, D
Gelatine (2%)	Sigma, München, D
Glutamin (100x)	Lonza, Köln, D
H <sub>2</sub> O	Lonza, Köln, D
Hepes	Sigma, München, D
LIF (Murine Leukemia Inhibitory Factor ESGRO™ (107U/ ml)	Gibco, Darmstadt, D
Lipofectamin™2000	Invitrogen, Darmstadt, D
Mitomycin C	Sigma, München, D
Nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco, Darmstadt, D
Nukleoside (100x)	Chemicon, Schwalbach, D
OptiMEM	Gibco, Darmstadt, D
Penicillin (5U/ ml)/ Streptomycin (5U/ ml) (100x)	Lonza, Köln, D
Trypsin-EDTA (0,5g/ l)	Gibco, Darmstadt, D
β-Mercaptoethanol (2-ME)	Sigma, München, D

### 3.7 Puffer und Lösungen

Für die Herstellung der Lösungen/ Puffer wurde, wenn nicht gesondert aufgeführt, H<sub>2</sub>O bidest verwendet.



<b>Puffer/ Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
6x Ladepuffer für Agarosegele	15g Sucrose, 0,175g Orange G mit H <sub>2</sub> O ad 50ml
10x DNA-Polymerase-Puffer	750mM Tris-HCl (pH 8,8), 200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 15mM MgCl <sub>2</sub> mit H <sub>2</sub> O auffüllen, anschließend Sterilfiltration
LB-Medium (Luria Bertani)	10g Pepton, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl; pH 7,4 → autoklavieren
SOC-Medium	20g Trypton, 5g Hefeextrakt, 9,5g NaCl, 10ml 0,25M KCl, 5ml 2M MgCl <sub>2</sub> , 20ml 1M Glucose mit H <sub>2</sub> O ad 1L, pH 7,0, autoklavieren
PBS (10x)	Für 1L: 80g NaCl, 2g KCl, 14,4g Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2,4g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit H <sub>2</sub> O (DEPC) auffüllen, pH 7,4
PBST	1x PBS, 0.1% Tween20
4% PFA / PBS	40g PFA in 1L PBS durch Erhitzen lösen; pH 7,4
4% PFA / EDTA	40g PFA in 0,5mM EDTA (pH 7,4)
<i>Pfu</i> -Puffer 10x mit MgSO <sub>4</sub>	200mM Tris-HCl (pH 8,8), 100mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 100mM KCl, 1mg/ ml BSA, 1% TritonX-100, 20mM MgSO <sub>4</sub>
<b>Waschpuffer für die Microarray-Analyse</b>	
Waschpuffer 1 (WP1) (0,5x SSPE/ 0,025% SDS)	194,75ml H <sub>2</sub> O, 5,0ml 20x SSPE, pH 7,4, 250µl 20% SDS, ad 200ml mit H <sub>2</sub> O
Waschpuffer 2 (WP2) (0,1x SSPE/ 0,025% SDS)	99,375ml H <sub>2</sub> O, 500µl 20x SSPE, pH 7,4, 125µl 20% SDS, ad 100ml mit H <sub>2</sub> O
Waschpuffer 3 (WP3) (0.1x SSPE)	500µl 20x SSPE, pH 7,4, ad 100ml mit H <sub>2</sub> O
<b>Isolierung genomischer DNA</b>	
Tail-tip-Puffer	8,5ml 1M Tris-HCl, pH 7,5, 17ml 0,5M EDTA, 17ml 5M NaCl, 21,25ml 20% SDS, ad 500ml mit H <sub>2</sub> O
Lösung A	109,5g Saccharose, 5ml 1M MgCl <sub>2</sub> , 10ml TritonX- 100, 1M Tris-HCl (pH 8,0), ad 1L mit H <sub>2</sub> O, autoklavieren
Lösung B	40m 1M Tris-HCl (pH 8,0), 12ml 0,5M Na-EDTA, 15ml 1M NaCl, ad 95ml mit H <sub>2</sub> O, autoklavieren, anschließend Zugabe von 5ml 20% SDS

Lösung C	5M Natriumperchlorat (100g in 142ml H <sub>2</sub> O lösen), nicht autoklavieren!!
TE (pH 8,0)	1ml 1M Tris-HCl (pH 8,0), 200µl 0,5M EDTA (pH 8,0), ad 100ml mit H <sub>2</sub> O, autoklavieren

### ***In situ* Hybridisierung auf Paraffinschnitte**

Acetylierungslösung	0,1M TEA, 500µl Essigsäureanhydrid ad 200ml mit H <sub>2</sub> O
ALP-Puffer	16ml NaCl, 80ml 1M Tris (pH 9,5) , 40ml 1M MgCl <sub>2</sub> , 4ml 10%Tween20
Blocking Reagenz	10% BBR in 1x MABT
H <sub>2</sub> O-DEPC	0.1% (v/v) DEPC, üN 37°C , autoklavieren
Heparin	100mg/ ml in 4x DEPC-SSC
Hybridisierungspuffer	1ml 1M Tris, 12ml 5M NaCl, 200µl 0,5M EDTA, 1,25ml 20% SDS, 25ml 40% Dextran Sulfat, 2ml Denhardt´s, 2ml tRNA, 50ml Formamid, ad 100ml mit H <sub>2</sub> O (DEPC)
5x MABT	100ml 1M Maleinsäure (pH 7,5), 30ml 5M NaCl, 10ml 10%Tween20, ad 200ml H <sub>2</sub> O (DEPC)
10x RNase-Waschpuffer	800ml 5M NaCl, 100ml 1M Tris, 100ml 0,5M EDTA
20x SSC	175,3g NaCl, 88,2g Na-Citrat/1L H <sub>2</sub> O (DEPC), pH 7,0
50x Denhardt´s Solution	1% Ficoll 400, 1% Polyvinylpyrrolidon, 1% BSA

### **Whole mount *in situ* Hybridisierung (WISH): Maus**

Alkalischer Phosphatase-Puffer	12ml 5M NaCl, 30ml 1M MgCl <sub>2</sub> , 6ml 10% Tween20, 60ml 1M Tris (pH9,5), 300mg Tetramisol, ad 600ml mit H <sub>2</sub> O
Hybridisierungspuffer	25ml Formamid, 12,5ml 20x SSC, 25µl Heparin, 500µl 10% Tween20, ad 50ml mit H <sub>2</sub> O (DEPC)
PBST/ Glycin	2mg/ ml Glycin
PBST/ Tetramisol	500mg Tetramisol auf 1L PBST
4% PFA/PBS/0,8% Glutaraldehyd	50ml 4% PFA/PBS, 400µl Glutaraldehyd, 500µl 0,5M EDTA
Proteinase K Puffer	1ml Tris (pH 7,0), 0,1ml EDTA [0,5M], ad 50ml mit H <sub>2</sub> O (DEPC)

RIPA-Puffer	2,5ml SDS 10%, 15ml NaCl [5M], 5ml NP40, 2,5g Deoxycholat, 1ml EDTA [0,5M], 25ml Tris [1M, pH8,0], ad 500ml mit H <sub>2</sub> O (DEPC)
RNase-Lösung	5ml NaCl [5M], 500µl Tris [1M, pH7,5], 500µl 10% Tween20, ad 50ml H <sub>2</sub> O
RNase A-Lösung	50ml RNase-Lösung, 500µl 10mg/ml RNase-stock
SSC/FA/T	100ml 20x SSC, 500ml Formamid, 10ml Tween20 (10%), ad 1L mit H <sub>2</sub> O

### Plastikeinbettung

Gießlösung	200ml entstabilisiertes Methyl-Methacrylat (MMA), 20ml LPG, 1,1g Benzoylperoxid
MMA Infiltrationslösung	200ml entstabilisiertes MMA, 20ml LPG, 0,66g Benzoylperoxid (Lagerung: 4°C, dunkel)
Streckflüssigkeit	300ml Ethanol (70%), 200ml Ethylen-glycolmonobutylether
Schneidelösung	0,5% Triton

### Zebrafische

E3-Puffer	5mM NaCl, 0,17mM KCl, 0,33mM CaCl <sub>2</sub> , 0,33mM MgSO <sub>4</sub> , 0,1% Methylenblau
-----------	---

### WISH

Auflistung spezieller Puffer/ Lösungen, abweichend zur Maus-WISH.

Hyb <sup>+</sup> -Puffer	25ml Formamid, 12,5ml 20x SSC, 0,5ml Tween20, 2,5ml tRNA, 25µl Heparin, ad 50ml mit H <sub>2</sub> O (DEPC)
Hyb <sup>-</sup> Puffer	25ml Formamid, 12,5ml 20x SSC, 0,5ml Tween20, ad 50ml mit H <sub>2</sub> O (DEPC)
5xSSCT	125ml 20x SSC (pH 6,0), 500µl Tween20, ad 500ml mit H <sub>2</sub> O

### Skelettpräparationen

Alcian Blau-Färbelösung	Für 1L: 800ml absoluten EtOH (100%), 200ml Eisessig (100% Essigsäure), 500mg Alcian Blau
Alizarin Rot-Färbelösung	Für 1L: 50mg Alizarin Rot in 1% KOH lösen

**LacZ-Färbung von Embryonen**

Fixierungslösung 2% PFA (PBS), 0,2% Glutaraldehyd in PBS

X-Gal Färbelösung 1mg/ml X-Gal, 5mM  $K_3Fe(CN)_6$ , 5mM  $K_4Fe(CN)_6$ ,  
2mM  $MgCl_2$  in 1x PBS (bidest), Eisenlösungen zuletzt  
zufügen

**Zellkultur**

HEK 293T-Medium DMEM-Medium(4,5 mg/ ml Glucose), 10% FCS, 2%  
L-Glutamin 1% Pen/ Strep

HEK-Einfriermedium 3,5ml HEK-Medium, 0,5ml DMSO 10%, 1ml FCS

**Maus-ES-Zellkultur**Fibroblasten-/ Feederzell-Medium

Für 550ml

500ml	DMEM-Medium
(4,5mg/ml Glucose, ohne Natrium Pyruvat)	
55ml	FCS
5,5ml	100x Glutamin
5,5ml	100x Penicillin(5U/ml)/ Streptomycin (5µg/ ml)

2x Einfriermedium (20% FCS/ 20% DMSO)

Für 100ml

60ml	DMEM-Medium
(4,5mg/ ml Glucose, ohne Natrium Pyruvat)	
20ml	FCS
20ml	DMSO
Lagerung bei - 20°C	

0,1% Gelatine-Lösung 2% Gelatine mit  $H_2O$  zu 0,1% lösen, Sterilfiltration,  
Lagerung bei 4°C

100x  $\beta$ -Mercaptoethanol (2-ME)-Stock-  
Lösung (10mM)(immer frisch herstellen) 7µl 14,3M 2-ME zu 10ml PBS

ES-Zellmedium (15% FCS, 1000U/ ml LIF)

Für 500ml

400ml	Knockout DMEM (4,5mg/ ml Glucose mit Natrium Pyruvat)
75ml	ES-Zell getestetes FCS-Medium
5ml	100x Glutamin, 200mM
5ml	100x Penicillin (5U/ ml)/ Streptomycin (5µg/ ml)
5ml	100x Nicht essentielle Aminosäuren
5ml	100x 10mM β-Mercaptoethanol in PBS
5ml	100x Nucleoside
50µl	LIF(10 <sup>7</sup> U/ ml)

Einfrriermedium für ES-Zellen im Plattenformat

Bicarbonat freies DMEM (10mM Hepes)	DMEM-Pulver in 1L H <sub>2</sub> O lösen, Zugabe von 10ml 1M Hepes (pH 7,2); Sterilfiltration, Lagerung bei 4°C
-------------------------------------	---

Bicarbonatfreies DMEM/ 10mM Hepes ES-Zell-Medium

Für 250ml

200ml	Bicarbonatfreies DMEM (10mM Hepes)
37,5ml	ES-Zell getestetes FCS
2,5ml	100x Glutamin
2,5ml	100x Penicillin/ 5U/ ml)/ Streptomycin (5µg/ ml)
2,5ml	100x Nicht essentielle Aminosäuren
2,5ml	100x 10mM β-Mercaptoethanol
2,5ml	100x Nucleoside

Bicarbonatfreies DMEM/ 10mM Hepes (20% FCS/ 20% DMSO)

Für 100ml

80ml	Bicarbonatfreies DMEM-Medium (10mM Hepes)
20ml	FCS
	Lagerung bei - 20°C

2x Einfriermedium für ES-Zellen (20% FCS/ 20% DMSO)

Für 100ml

60ml	Bicarbonatfreies DMEM-Medium (10mM Hepes)
20ml	FCS
20ml	DMSO
	Lagerung bei - 20°C

Lysis Puffer 10 mM Tris-Cl (pH 7,5), 10 mM EDTA (pH 8,0), 10 mM NaCl, Zugabe von Proteinase K (Endkonzentration 1 mg/ ml)

### Southern-Blot

Denaturierungslösung	0,5M NaOH, 1,5M NaCl
Neutralisierungslösung	0,5M Tris-HCl (pH 7,5, 1,5M NaCl)
1M NaPi (Church-Stock-Puffer)	Für 1L: 142g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (= 1M di-Natriumhydrogenphosphat oder 178 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat), pH 7,2 mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , autoklavieren
10xDIG1	Für 1L: 116.1g Maleinsäure (1M), 87.7g NaCl (1.5M), pH 7.5 mit NaOH, autoklavieren
Blocking Reagenz	Blocking Reagenz (Roche #11363514910) lösen zu 10% w/v in 1xDIG, autoklavieren, Aufbewahrung bei 4°C
Church-Waschpuffer	1L: 40ml 1M NaPi, 50 ml 20% SDS, ad 1L
Church-Hybridisierungspuffer (pH8,0), ad 100ml	50ml 1M NaPi, 35ml 20% SDS, 200µl 0,5M EDTA
DIG3	0,1M Tris (pH9,5), 0,1M NaCl

### 3.8 Enzyme

Die Restriktionsenzyme wurden, wenn nicht gesondert aufgelistet, von MBI Fermentas (St. Leon-Rot, D) und New England Biolabs (Frankfurt, D) bezogen und laut Herstellerangaben verwendet. Die Restriktionsansätze wurden bei 37°C für 3h inkubiert.

### 3.9 Bakterienstamm

In dieser Arbeit wurde der Bakterienstamm *E. Coli* Top10 (Invitrogen, Darmstadt, D) für die Klonierungsarbeiten verwendet.

### 3.10 Vektorsysteme

<u>Vektorbezeichnung</u>	<u>Herstellername/ Firma</u>
pCS2 <sup>+</sup>	von der AG Hermann, Hermann, Bauer
pGL4.10	Promega, Madison, USA
pTA-GFP	Herstellung Arbeitsgruppen-intern
psk Blue	Herstellung Arbeitsgruppen-intern
psfi Hsp-LacZ	Portnoy et al., 2005

### 3.11 PC-Programme/ Internet-Datenbanken

Programme	Verwendung	Internetadresse
Axio Vision 4.6	Digitale Photoaufnahmen	
DNA-Star (EditSeq, MapDraw, SeqMan)	Sequenzbearbeitung/ -auswertung	
Easy Win32	Geldokumentation	
ECR Browser	Genomkonservierung	<a href="http://ecrbrowser.dcode.org/">http://ecrbrowser.dcode.org/</a>
ENSEMBL Genomdatenbank	Bioinformatische	<a href="http://www.ensembl.org/">http://www.ensembl.org/</a>
ExpASy	Datenbankportal	<a href="http://expasy.org/">http://expasy.org/</a>
MGI	Maus-Genom Datenbank	<a href="http://www.informatics.jax.org/">http://www.informatics.jax.org/</a>
NCBI Genomdatenbank	Bioinformatische	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)		<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/</a>
Primer3	Primerdesign	<a href="http://frodo.wi.mit.edu/">http://frodo.wi.mit.edu/</a>
SDS 2.1	Real Time PCR Daten- auswertung	
UCSC Genomdatenbank	Bioinformatische	<a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a>
Vector NTI 10.0	Sequenzanalysen	Vektorkartenerstellung

### 3.12 Tiere für experimentelle Untersuchungen

#### 3.12.1 Mäuse

Für Experimente mit Wildtyp-Mäusen wurde der Stamm C57Bl/6 verwendet. Bei Verpaarungen der Mäuse wurde der Tag des Vaginalplugs als Embryonalstadium E0.5 gezählt. Die Züchtung und Haltung der Tiere erfolgte im institutseigenen Tierhaus (MPI für Molekulare Genetik).

Die pronuklearen Injektionen wurden an Mäusen des Stammes NMRI/ CD1 durchgeführt.

Für die diploide Aggregation wurden Zellen der Hybridlinie C57Bl/6 und 129 verwendet. Um einen genetischen C57Bl/6-Hintergrund zu bekommen, wurden die erhaltenen Hybridmännchen anschließend mit C57/Bl6-WT-Weibchen verpaart. Die pronuklearen Injektionen und die diploide Aggregation wurden von Dr. Lars Wittler und Lara Mosch durchgeführt.

### 3.12.2 Zebrafische

Für die Zebrafisch-Analysen wurden Zebrafische des Stammes „AB“ verwendet. Die Züchtung und Haltung der Tiere erfolgte im institutseigenen Tierhaus (MPI für Molekulare Genetik) unter der Leitung von Dr. Ludger Hartmann, Ulf Schröder und David Brandenburg.



## 4 Methoden

### 4.1 Mikroarray basierte vergleichende genomische Hybridisierung

(Mikroarray-CGH, *Comparative Genomic Hybridization*)

Die Mikroarray-CGH erlaubt eine Analyse des Gesamtgenoms eines Patienten auf Verluste (Deletionen) oder Zugewinne (Duplikationen) des genetischen Materials.

Jeweils 1µg für 180K/ Custom Oligonukleotid Array bzw. 1,5µg für 1M Oligonukleotid Arrays der zu untersuchenden DNAs und der Referenz-DNA wurden mit *AluI* und *RsaI* bei 37°C für 2h enzymatisch verdaut (Promega, Mannheim, D). Nach einer 20minütigen Inaktivierung der Enzyme bei 65°C erfolgte eine Qualitätskontrolle des Restriktionsverdaus: 7µl des Verdaus wurden für 2min bei 98°C denaturiert und auf ein 1% iges Agarosegel aufgetragen und bei 80V für 40min laufen gelassen.

Nach erfolgreichem Restriktionsverdau der DNA (gleichmäßiger Bandenschmierzug auf dem Agarosegel) erfolgte mit den restlichen 19µl die Markierungsreaktion mit Fluoreszenzmarkierten Nukleotiden (Random Primer Labeling) unter Verwendung des Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit (Agilent, Santa Clara, USA). Ein Mix aus dem Restriktionsverdau (19µl), der Random-Primer-Lösung und dem Puffer wurde für 3min bei 95°C erhitzt (Denaturierung der DNA), anschließend für 10min auf 4°C herunter gekühlt, wobei die Zugabe der restlichen Komponenten erfolgte (5µl Random Primer (10x), 5µl dNTP-Mix (10µl), 3µl gelabelte dUTPs (Cy3 oder Cy5), 1µl Klenow Fragment (40U/ µl) und dann der gesamte Reaktionsansatz (50µl) über Nacht bei 37°C inkubierte.

Die Aufreinigung der markierten DNA zur Abtrennung nicht eingebauter Fluoreszenz-markierter Nukleotide erfolgte über Microcon-Säulen (Millipore, Schwalbach, D). 430µl 1x TE (pH 8,0) wurden zu der jeweiligen Probe gegeben und im Anschluss der gesamte Ansatz (480µl) auf den Filter der Säule überführt. Nach einer 20minütigen Zentrifugation bei 11.500rpm wurde der Überstand verworfen, der Filter umgedreht und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Eine Zentrifugation bei 3100rpm für 2min erfolgte, um die aufgereinigten Proben zu erhalten. Für die Messung der Einbaurate der Fluoreszenzmarker wurden 2µl der Proben abgenommen und mittels eines Nanophotometer<sup>TM</sup> (Implen, München, D) bestimmt. Die zu untersuchenden DNAs (Patienten-DNA und Referenz-DNA) wurden zusammengeführt und deren Gesamtvolumen bestimmt. Im Anschluß wurden diese gepoolten DNAs in 5µl Cot1-DNA (human), 55µl Hybridisierungspuffer (2x) und 11µl Blocking Agent (10x) in einem Gesamtvolumen von 110µl (ad mit H<sub>2</sub>O bidest) gelöst.

Nach vorsichtigem Lösen der einzelnen Reaktionskomponenten (Schnipsen, zentrifugieren). erfolgte die Denaturierung bei 95°C für 3min und eine Vorhybridisierung bei 37°C für 30min. Die Cot1-DNA dient dabei der Absättigung hochrepetitiver DNA-Sequenzen, die im Bereich des Heterochromatins vorzufinden sind. Für die Hybridisierung wurden Hybridisierungskammern der Firma Agilent (Santa Clara, USA) verwendet. Ein Glasobjektträger (gasket slide) wurde mit den Gummirändern nach oben in die Hybridisierungskammer gelegt, anschließend die jeweilige Probe darauf geladen (1M Oligonukleotid Array:490µl/ Hybridisierungsfläche, 180K Oligonukleotid Array: 100µl/ Hybridisierungsfläche) und final der Array mit der Hybridisierungsfläche nach unten luftblasenfrei aufgelegt. Die Hybridisierungskammer wurde nach Angaben des Herstellers zusammengebaut und für 24h bei 65°C und 20rpm im Hyb -Ofen (Agilent, Santa Clara, USA) inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte das Waschen der Slides und die Detektion der Fluoreszenzsignale mit Hilfe eines Laserscanners.

Die Kammern mit den Slides wurden aus dem Hybridisierungsofen genommen und die Schraube sowie der Deckel der Kammer vorsichtig entfernt. Der Objektträger wurde im ersten Waschpuffer (WP1) aus der Apparatur entfernt. Es folgte ein Waschschrift im WP1 bei RT für 5min schüttelnd (50rpm) im Dunkeln. Anschließend wurden die Objektträger für 2min in einem 37°C warmen Wasserbad bei 50rpm im WP2 geschüttelt (dunkel). Es folgte ein finaler Waschschrift im WP3, wobei der Objektträger dreimal kurz eingetaucht wurde. Nach einer dreiminütigen Zentrifugation bei 900rpm wurde der Objektträger im Agilent-Scanner (Santa Clara, USA) bei 3µm gescannt. Die Auswertung der Signale erfolgte mit der Feature Extraction v9.53.1 und der CGH-Analytics v3.4.40 Software (Agilent, Santa Clara, USA) (Einstellungen der Analyse-Software: aberration algorithm: ADM-2; threshold: 6.0; window size: 0.2 Mb; filter: 5 probes, log2ratio=0.29). Custom-Arrays wurden mittels der NimbleScan-Software und dem circulären binären Segmentationsalgorithm analysiert. Zur Visualisierung wurde die SignalMap-Software (SignalMap v1.9.0.03, NimbleGen Systems Inc.) verwendet.

Die Patienten des ersten Projekts (Phänotyp: Syndaktylie Typ IV, Polysyndaktylie und Laurin Sandrow Syndrom) wurde gegen eine weibliche Kontroll-DNA auf gesamtgenomische 244K Oligonukleotid-Arrays (Agilent, Santa Clara) und selbst designten Custom-Arrays (NimbleGen, Roche, durchschnittlicher Oligonukleotidabstand: 8bp), die die kritische Region von 219,5 bis 222,2Mb (hg18) der humanen chromosomalen Region 7q36 abdeckten, hybridisiert.

Für die Analyse der Patienten des zweiten Projekts (Phänotyp: Syndaktylie der Hände und Füße, teilweise in Kombination mit sagittaler Kraniosynostose) wurden gesamtgenomische 244K Oligonukleotid-Arrays (Agilent, Santa Clara) und selbst designte Custom-Arrays (NimbleGen, Roche) verwendet, die das Kopplungsintervall (Position 219,5-222,2Mb; hg18) auf dem humanen Chromosom 2q35 abdeckten.

Die Patienten des dritten Projekts (Phänotyp: verschiedene Ausprägungen der Ektrodaktylie) wurden mittels 244K Oligonukleotid-Arrays (Agilent, Santa Clara) und 1M Oligonukleotid-Array (Agilent, Santa Clara) auf genomische Aberrationen untersucht.

#### 4.2 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Patienten, bei denen genomische Aberrationen nachgewiesen werden konnten sowie deren Angehörige, wurden mit der qRT-PCR überprüft. Die qRT-PCR ermöglicht neben der Amplifikation auch die Quantifizierung der DNA. Die Quantifizierung wird durch kationische Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht, die in doppelsträngige DNA-Moleküle interkalieren können, z.B. SYBR®Green I. Während der PCR-Zyklen wird die Fluoreszenz gemessen, die exponentiell mit der Amplifikatmenge zunimmt.

Zur Determinierung der Amplifikatmenge wurden Primerpaare verwendet, die innerhalb und außerhalb der genomischen Aberration lagen und eine Fragmentgröße von 80-90bp amplifizierten. Die Konzentration der DNA wurde mittels des Nanophotometer<sup>TM</sup> (Implen, München, D) bestimmt und auf 2ng/ µl eingestellt. Ein Reaktionsansatz hatte ein Endvolumen von 12µl und enthielt 10ng DNA, 2,5pmol je Primerpaar(1µl) und 6µl des SYBR®Green Mastermixes (Applied Biosystems, Darmstadt,

D). Pro getestetem Primerpaar wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Als Kalibrator diente weibliches DNA-Material. Die Auswertung der Kopienanzahl erfolgte mit der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Die Werte für die relative Quantifizierung (RQ-Werte) wurde mit der 7500 SDS Software erhalten. Die Normalisierung und Quantifizierung der erhaltenden RQ-Werte aller Primerpaare erfolgte relativ zur Amplifikatmenge des autosomalen Referenzgens Albumin (ALB, 4q11), welches in zwei Kopienanzahlen im Genom existent ist. Zur Unterscheidung des Geschlechts und als interne Kontrolle wurde ein Primerpaar für den Faktor VIII (Xq28) gewählt. Ein RQ-Wert von 1,0 war ein Indikator für die Existenz von zwei Kopien eines Allels, ein RQ-Wert von ca. 1,5 zeigt eine zusätzliche Kopie (3 Kopien) eines chromosomalen Abschnitts an. Es wurde das qRT-PCR Gerät „ABI Prism 7500 Sequence Detection System“ (Applied Biosystems, Darmstadt, D), das Computerprogramms SDS v2.3 (Applied Biosystems, Darmstadt, D) verwendet (Cyclerprogramm vgl. Anhang Kapitel 0)

### 4.3 Allgemeine molekularbiologische Methoden

#### 4.3.1 DNA-Isolation

##### **Isolierung genomischer DNA aus EDTA-Blut**

1ml EDTA-Blut wurde mit 6ml Lösung A kurz vermischt (vortexen) und für 4min bei RT inkubiert, wobei die Lösung mehrmals geschüttelt wurde (Erylyse). Anschließend erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 1300 x g. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Es folgte die Lyse der Zellen, indem das Zellpellet in 600 $\mu\text{l}$  Lösung B resuspendiert wurde. Nach Zugabe von 125 $\mu\text{l}$  Lösung C wurde das Reaktionsgefäß 10-15mal über Kopf gemischt. 700 $\mu\text{l}$  Chloroform wurden dem Gemisch beigefügt, es erfolgte eine wiederholte Vermischung über Kopf (15mal) und eine Zentrifugation bei 1300 x g. Es kommt zu Phasentrennung zwischen der DNA und den restlichen Komponenten. Der gewonnene DNA-Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abpipettiert und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. 510 $\mu\text{l}$  Isopropanol wurden zu dem Überstand gegeben und die DNA durch vorsichtiges über Kopf schütteln ausgefällt. Anhand der DNA-Menge wurde das finale Resuspensionsvolumen der DNA in TE-Puffer bestimmt (100-250 $\mu\text{l}$ ). Nach kurzem Anzentrifugieren des Reaktionsgefäßes (1min bei 13000rpm) wurde das Isopropanol entfernt und es erfolgte ein Waschschrift mit 500 $\mu\text{l}$  gekühlten 70% Ethanol (10min, 13000rpm). Das gewonnene DNA-Pellet wurde kurz bei 37°C getrocknet (glasiges DNA-Pellet) und anschließend in TE-Puffer (pH 8,0) gelöst.

##### **Isolierung genomischer DNA**

Für die Genotypisierung transgener Tiere sowie zur Gewinnung genetischen Materials aus Mäusen, Hühnchen oder Zebrafischen, wurde die genomische DNA aus den zu untersuchenden Tieren präpariert. Für die Isolierung der genomischen DNA wurde der Amnionsack des Embryos, ein gesamter Hühnchenembryo ohne Kopf (Hamburger-Hamilton-Stadium (HH) 3,5-4,5 Tage) oder Zebrafisch-Embryonen (72 hours post fertilization (hpf)) in 0,5ml Proteinase K-SDS-Puffer (Tail-tip-Puffer) mit 200 $\mu\text{g/ml}$  Proteinase K schüttelnd bei 55°C über Nacht verdaut. Dann wurden 250 $\mu\text{l}$  5M NaCl-Lösung zu den verdauten Proben gegeben und 10min bei 55°C und 10min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben bei 4°C für 20min bei 9000rpm zentrifugiert und 500 $\mu\text{l}$  des Überstands in

ein neues Reaktionsgefäß mit 1ml eiskaltem 100%igem Ethanol pipettiert. Die DNA wurde bei -20°C für 30min gefällt und anschließend bei 4°C für 20min bei 13000rpm zentrifugiert. Nach zwei Waschschritten mit 70% Ethanol, wurde das DNA-Pellet an der Luft getrocknet und in 100-200µl Wasser (bidest) gelöst.

### **Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen**

Die DNA-Isolation aus Bakterien erfolgte unter der Verwendung des Mini-Kits (A&A Biotechnology, Gdynia, Polen) oder im größeren Maßstab mit dem Midi-Präparations-Kit Nucleobond PC 100 (Machery-Nagel, Düren, D) nach Herstellerangaben.

#### **4.3.2 Amplifikation von DNA-Abschnitten**

##### **Primer/ Primerdesign**

Für eine erfolgreiche Amplifizierung eines gewünschten DNA-Fragments ist das Primerdesign von essentieller Bedeutung. Die ausgewählten Primer sollten nicht mit sich selber hybridisieren, keine intramolekulare Schleifenbildung (hairpin Struktur) zeigen und möglichst nur einmal im Genom binden. Des weiteren sollten die Primerpaare einen ähnlichen GC-Gehalt und eine annähernd gleiche Schmelztemperatur aufweisen. Fast alle verwendeten Primer wurden unter der Verwendung der „Primer3 Input“ (Version 0.4.0) Software ausgewählt (Primergröße: 20 bis 25bp, Schmelztemperatur: 58°C bis 62°C) und mit dem Programm „Ensembl Genome Browser-Blast“ auf das Bindungsverhalten im Genom untersucht. Einige Primer wurden selber designt.

Die Primer wurden von der Eurofins MWG GmbH (Ebersberg, D) synthetisiert. Die gelieferten Primer wurden mit Wasser (bidest) auf eine Konzentration von 100pmol/ µl gebracht (Primer-Stammlösung). Ausgehend von den Primer-Stammlösungen wurden Verdünnungen mit einer Endkonzentration von 10pm/ µl hergestellt, mit denen die PCR- und Sequenzierungsreaktionen durchgeführt wurden.

##### **Polymerasekettenreaktion**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) dient zur sequenzspezifischen Amplifizierung von DNA-Molekülen.

Für die Amplifikation der zu untersuchenden DNA-Abschnitte wurden kommerziell erhältliche DNA-Polymerasen: *Phusion*® von Finnzymes, *Ampli-Taq*-Polymerase von Biotherm und Invitrogen sowie am Max Planck Institut für Molekulare Genetik hergestellte *Taq*- oder *Pfu*-Polymerasen verwendet. Für die Amplifikation sehr langer DNA-Abschnitte (> 3000kb) wurde das PCR-Kit Expand Long Template PCR Systems (Roche Applied Science, Mannheim, D) verwendet, das ein *Taq/Pfu*-Polymerase-Gemisch beinhaltet. Die Amplifikation erfolgte nach Herstellerangaben bzw. entsprach einer Standard-PCR-Reaktion (vgl. Anhang, Kapitel 12.4).

Die Amplifikation der Konstrukte für das *IHH*-Projekt wurden mit der Long-Range-Polymerase sowie mit der *Pfu*-Polymerase durchgeführt, für die Konstruktgenerierungen, die das *BHLHA9*-Projekt betrafen, wurde die *Phusion*® Polymerase mit dazugehörigem GC-Puffer und die Long-Range-

Polymerase verwendet. Die Bruchpunktbestimmungen wurden mit der Ampli *Taq*-Polymerase und der Phusion® Polymerase durchgeführt (Cyclerprogramme vgl. Anhang, Kapitel 12.5).

Die Optimierung einer PCR erfolgte durch Veränderungen der Konzentration der Matrizen-DNA, Zugabe von DMSO (1,5-3%), Veränderung der Annealingtemperaturen in den PCR-Programmen oder durch die Durchführung einer geschachtelten PCR (Nested-PCR) (Erste PCR: Verwendung von mehr außerhalb liegenden Primern; Zweite PCR: Auf das PCR Produkt der ersten PCR wird eine PCR mit den Primern für die Zielsequenz durchgeführt).

Zur Überprüfung der Amplifikationsprodukte wurden 0,8% ige bzw. 1,5% ige Agarosegele verwendet, die mit Ethidiumbromid (0,25µg/ ml) versetzt waren. 5µl des PCR-Produkts wurden mit 2µl Ladepuffer vermischt. Als Referenzen dienten Größenmarker der Firma Fermentas (vgl. Kapitel 3.5) Die Agarosegele liefen bei einer Spannung von 100V ca. 45-60min.

### **Kolonie-PCR**

Die Kolonie-PCR ist eine Selektionsmethode, mit der man erhaltene Bakterienkolonien, nach einer Transformation, auf eine erfolgreiche Insertion des DNA-Fragments und dessen Orientierung verifizieren kann. Für die Detektion der Fragmente wurde ein PCR-Mastermix erstellt und ein Abstrich der zu untersuchenden Bakterienkultur als DNA-Ausgangsmaterial verwendet. Es wurden Kolonie-PCR-Primer, die innerhalb des Fragments binden und vektorspezifische Primer verwendet (Primer vgl. Anhang, Kapitel 12.3). Je nach Menge an Klonen wurde ein PCR-Mastermix in die Reaktionsgefäße vorgelegt (Pipettierschema vgl. Anhang, Kapitel 12.4) und dann mit einer sterilen Pipettenspitze etwas von der zu untersuchenden Bakterienkolonie gepickt, auf eine Replika-Platte übertragen und dann in den PCR-Ansatz überführt (Cycler-Programm, vgl. Anhang, Kapitel 12.5). Die Replika-Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **Genotypisierungs-PCR**

Die Genotypisierungs-PCR wurde mit genomischer DNA aus den Amnion oder Schwanzspitzen der zu untersuchenden Embryonen/ adulten Mäuse durchgeführt (vgl. Kapitel 4.3.1). Für die Genotypisierungs -PCR (Pipettierschema vgl. Anhang, Kapitel 12.4) wurde eine Konzentration von 20ng/ µl verwendet (Cycler-programme, vgl. Anhang, Kapitel12.5).

Ein PCR-Produkt in der Größe von 1200bp verwies auf das Vorhandensein des Hsp-Lacz-Konstrukts (*IHH*-Projekt, Pipettierschema, Cyclerprogramm vgl. Anhang, Kapitel 12.4 und 12.5).

Für die Genotypisierung der Tiere nach durchgeführter diploider Aggregation wurden zwei voneinander unabhängige PCRs durchgeführt (I/II), die das Insert (1972bp), oder das WT-Allel (1644bp) nachwiesen (*BHLHA9*-Projekt, Pipettierschema, Cyclerprogramm vgl. Anhang, Kapitel 12.4 und 12.5).

### **Aufreinigung von DNA-Fragmenten**

Die Aufreinigung von PCR-Ansätzen sowie gewünschten DNA-Fragmenten nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurde mit dem Gelextraktionskit Gel Out Kit (A&A Biotechnologie, Gdynia,

Polen) vorgenommen. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die Effektivität der Aufreinigung wurde mit einem Agarosegel überprüft.

### **Enzymatische Reingung**

Amplifikationsprodukte von Patienten-DNA wurden vor einer Sequenzierungsreaktion enzymatisch aufgereinigt. 8µl des PCR-Produkts wurden mit 0,3µl *SAP* (*Shrimp-Alkaline-Phosphatase*, 1U/ µl) und 0,15µl *Exonuklease I* (20U/ µl) vermischt und auf ein Endvolumen von 10µl mit Wasser (bidest) aufgefüllt. Die *Exonuklease I* baut einzelsträngige DNA und Primer ab, die *SAP* hydrolysiert nicht eingebaute dNTPs. Der Aufreinigungsansatz wurde nacheinander für 15min bei 37°C und bei 72°C inkubiert.

### **Sequenzierung nach Sanger**

Die Grundlage der durchgeführten Sequenzierungen war die Didesoxy-Methode (Kettenabbruch-Methode) nach Sanger (1977). Für die Sequenzierung wurde der BigDye v3.1 Sequenzierungs-Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, D) verwendet. In einem Endvolumen von 5µl wurden 200ng aufgereinigte Plasmid-DNA bzw. 50ng PCR-Produkt mit 1µl 5xBigDye-Reaktionspuffer, 0,5µl BigDye-Sequenziermix und 0,5µl Sequenzierprimer (10pmol/ µl) versetzt, das Restvolumen wurde durch Wasser (bidest) aufgefüllt.

Jede aufgereinigte DNA wurde bidirektional sequenziert (Cyclerprogramm, vgl. Anhang Kapitel 12.5).

Nach der Sequenz-PCR wurden die Reaktionsansätze mit Wasser (bidest) auf 10µl Endvolumen aufgefüllt und einer Fällung mit magnetischen Kügelchen unterzogen. Die Aufreinigung und Fällung der Sequenzansätze fand mit der „Automation Workstation“ der Firma Biomek NKp (Krefeld, D) statt, unter Verwendung des Programms: CleanSEQ NO Transfer (Biomek R, Krefeld, D). Die Plattenanalyse wurde an einem Kapillarautomat ABI3730 (Applied Biosystems, Darmstadt, D) durchgeführt. Für die Sequenzierungsauswertung wurden das Computer-Programm SeqMan II Version 5.0 (DNA Star Inc, Madison, USA) verwendet.

## **4.4 Klonierungstechniken**

### **4.4.1 Klonierung des gewünschten DNA-Fragments**

5µg des gewünschten Vektors wurde mittels Restriktionsenzymen linearisiert und via Agarosegelelektrophorese oder PCR-Purification-Kit (Gel Out Kit, A&A Biotechnologie, Gdynia, Polen) aufgereinigt. Um eine Religation des Vektors zu vermeiden, wurden 200ng Vektor mit *SAP* nach Herstellerangaben (Fermentas, St. Leon-Rot, D) dephosphoryliert.

Nach einer zweistündigen Inkubation des Reaktionsansatzes bei 37°C erfolgte eine 15minütige Inaktivierung des Enzyms bei 65°C.

Die Ligation eines gewünschten DNA-Fragments mit dem jeweiligen Vektor erfolgte mit einem Vektor-Insert-Verhältnis von 1:5. Zur Vereinfachung der Ligation erfolgte diese meist mit komplementären

Enden (sticky ends), nicht mit „stumpfen“ DNA-Enden (blunt ends). Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben (Fermentas, St. Leon-Rot, D) in einem Endvolumen von 20µl.

Berechnung des Vektor-Insert-Verhältnisses:

$$\frac{50 \text{ ng Vektor} \times xy \text{ kb Fragment}}{xy \text{ kb Vektor}} \times 5 = \text{ng Insert, die eingesetzt werden müssen bei 50ng Vektor}$$

Im Anschluss erfolgte eine Transformation in chemisch kompetente Bakterienzellen (*Top10*, Invitrogen, Karlsruhe, D, vgl. Kapitel 4.4.6). Die erhaltenen Klone wurden mittels Kolonie-PCR, Sequenzierung (vgl. Kapitel 4.3.2), oder Restriktionsverdau (vgl. Kapitel 4.4.1) auf eine erfolgreiche Ligation getestet.

#### 4.4.2 TA-Klonierung

Die DNA-Fragmente wurden zuerst in den pTA-GFP Vektor (eigene Herstellung) kloniert. Die Klonierung erfolgte über TA Klonierung, wodurch eventuelle Schwierigkeiten bei der Amplifikation umgangen wurden und eine effizientere Klonierung von Amplifikaten erreicht wurde. Der pTA-GFP-Vektor weist an seinen 5'-Enden einzelne Desoxythymidinreste auf, die mit den Desoxyadenosinmonophosphaten an den 3'-Ende der PCR-Produkte verknüpft werden. DNA-Fragment wurde aus dem Zwischenvektor mittels Restriktionsverdau gewonnen, über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt (vgl. Kapitel 4.3.2) und in den Zielvektor kloniert. Im Regelfall wurden 3-5µg Plasmid-DNA verdaut. Die Lagerung der extrahierten DNA erfolgte bei -20°C.

#### 4.4.3 *LacZ*-Expressionsvektor für Enhancerstudien

Für Enhancerstudien (Projekt 2) wurde der *LacZ*-Reporter-Vektor pSfi-Hsp68-*LacZ*-Vektor verwendet (Portnoy et al., 2005). Der Reporter-Vektor beinhaltet ein *LacZ*-Gen, welches unter der Kontrolle eines Minimalpromotors (*hsp68*) steht. Das zu untersuchende Konstrukt (K1, vgl. Ergebnisteil, Kapitel 5.2.2) wurde stromaufwärts des Reporter-Gens inseriert (vgl. Kapitel 4.3.2 und 4.4, Primer vgl. Anhang Tabelle 5). Nach einer Linearisierung und Aufreinigung des Konstrukts wurde dieses für pronukleare Mikroinjektionen verwendet.

Bei der pronuklearen Mikroinjektion wird fremde DNA in die Vorkerne von befruchteten Mauseizellen (Zygoten) injiziert. Anschließend wird die behandelte Zygote in den Eileiter einer Ammenmaus überführt. Die überführten Embryonen entwickeln sich dann in der Gebärmutter der Ammenmaus weiter, bis zur Geburt. Ein Teil der neugeborenen Mäuse hat die eingebrachte DNA in das eigene Genom integriert (transgene Mäuse). Nach Bestätigung der Integration über Genotypisierung (vgl. Kapitel 4.3.2) der Embryonen können die transgenen Mäuse für weitere Analysen verwendet werden.

#### 4.4.4 Fällung von DNA mittels Natriumacetat

Nach Restriktionsverdau oder anderen biochemischen Reaktionen wurden die Ansätze mittels Natriumacetat gefällt. Zum jeweiligen Reaktionsansatz wurde 1/10 einer Salz-Lösung (3M

Natriumacetat, pH 5,3), sowie 2,5 Volumina 100%iger Ethanol (eiskalt) pipettiert. Anschließend erfolgte die DNA-Fällung bei -20°C für mindestens 30min. Es folgten eine 30minütige Zentrifugation bei 13.000rpm, zweimaliges Waschen mit 70%igem Ethanol und eine Resuspension der gewonnenen DNA in einem Endvolumen von 50-100µl Wasser (bidest).

#### 4.4.5 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien fand bei 37°C auf LB-Platten bzw. in flüssigem LB-Medium mit einer Ampicillin-Konzentration von 50µg/ml statt. Die Flüssigkulturen wurden zusätzlich bei 190rpm geschüttelt.

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Bakterienkulturen wurde eine Glycerinkultur hergestellt. Hierzu wurden 0,8ml einer 87%igen Glycerinlösung mit 1ml einer Übernachtskultur vermischt und im Anschluss bei -80°C gelagert. Zum erneuten Animpfen der Kultur wurde mit einer sterilen Pipettenspitze etwas von der Glycerinkultur auf eine LB-Platte mit Antibiotikum ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert bzw. in einem Glasröhrchen mit dem entsprechendem LB-Medium schüttelnd inkubiert.

#### 4.4.6 Transformation von Bakterien

Für die Transformation von Bakterien wurden 100µl chemisch kompetente Zellen (*Top 10*, Invitrogen, Karlsruhe, D) mit 10µl eines Ligationsansatzes versetzt und 30min auf Eis inkubiert. Nach einem 90sec bis 2min Hitzeschock bei 42°C wurde der Transformationsansatz erneut für 5min auf Eis inkubiert mit 1ml SOC-Medium ohne jegliche Antibiotika-Zusätze versetzt und bei 200rpm für 30min geschüttelt. Das Ausplattieren fand auf LB-Platten mit einer Antibiotika-Resistenz (Ampicillin: 50µg/ml) statt.

### 4.5 Histologische Methoden

#### 4.5.1 RNA *In situ* Hybridisierung

Die RNA *in situ* Hybridisierung ist eine direkte Nachweismethode für mRNA in einzelnen Zellen und Geweben von Embryonen. Unter der Verwendung einer Digoxigenin (DIG) markierten Sonde, deren Basenabfolge komplementär zu dem jeweils nachzuweisenden Nukleinsäureabschnitt ist (antisense Sonde), kann der Expressionsort sowie das Expressionslevel während der embryonalen Entwicklung nachvollzogen werden. Die antisense Sonde bindet an die gewünschte Nukleinsäure und wird in einem zweiten Schritt mit einem DIG gerichteten Antikörper, der mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt ist, durch eine enzymatische Reaktion farblich detektiert.

#### Herstellung von DIG markierten Sonden

Für die Anfertigung einer DIG markierten RNA-Sonde wurden die jeweiligen Primerpaare für das zu untersuchende Gen in die 3' oder 5' UTR (untranslatierte Region) des Transkripts gelegt. Die Sonde wies mindestens eine Länge von 400bp auf, um Spezifität zu gewährleisten. Für die Amplifizierung der Sonde wurde, je nach Amplifizierungseffizienz, genomische oder cDNA verwendet. Das PCR Produkt



wurde aufgereinigt (vgl. Kapitel 4.4) und in den pTA GFP-Vektor kloniert, der einen Sp6- und einen T7-Promoter aufweist. Ausgehend von diesen beiden Promotoren kann eine antisense Sonde, je nach Orientierung des einklonierten PCR-Produkts erhalten werden. Die *in vitro* Sondentranskription und DIG Markierung erfolgte mit dem DIG RNA Labeling Kit (Roche, Karlsruhe, D) nach Herstellerangaben.

Die *in vitro* Transkription wurde für 2h bei 37°C durchgeführt, anschließend wurden 2µl *DNaseI* zur Entfernung der Vorlagen-DNA zugegeben, 15min bei 37°C inkubiert und dann mit 2µl 0,2M EDTA (pH 8,0) die Reaktion abgestoppt. Nach dem Abstoppen der Reaktion wurde das Volumen auf 100µl mit H<sub>2</sub>O (DEPC) aufgefüllt und 10µl 4M LiCl (DEPC) und 300µl kalter 100%iger Ethanol zugefügt. Der gesamte Ansatz wurde dann bei -80°C für mindestens 30min belassen, um die Sonden-DNA auszufällen. Eine längere Inkubationszeit erhöht die Sondenausbeute. Nach einer 20minütigen Zentrifugation bei 13000rpm bei 4°C, wurde zweimal mit 75%igem Ethanol (DEPC) gewaschen und das finale RNA-Pellet in 100µl DEPC-Wasser resuspendiert. Nach Überprüfung der Sondenqualität auf einem 1%igen Agarosegel wurde die fertige Sonde bei -80°C gelagert.

#### 4.5.1.1 Whole mount RNA *in situ* Hybridisierung (WM-ISH)

Für die WM-ISH wurden Mausembryonen (E9.5 bis E13.5), Mauskalvarien (E18.5) und Hühnchenembryonen (HH23 bis HH26) in PBS/ DEPC präpariert und in 4% PFA/ PBS üN bei 4°C fixiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Embryonen 2x 30min in PBST/ DEPC gewaschen und mittels einer aufsteigenden Methanolreihe in PBST/ DEPC (jeweils 1x: 25%, 50%, 70%, 2x: 100% für jeweils 10min) bei 4°C dehydriert. Die dehydrierten Embryonen wurden bis zur Verwendung in 100% Methanol bei -20°C gelagert.

Die gewünschten Embryonalstadien wurden zur Hybridisierung mittels einer absteigenden Methanolreihe (75%, 50%, 25%, Methanol/ PBST/ DEPC) rehydriert, mit PBST/ DEPC 2x gewaschen und 1h mit 6% Wasserstoffperoxid/PBST bei 4°C gebleicht. Nach zweimaligen Waschen mit PBST/ DEPC wurden die Embryonen mit Proteinase K (PK) bei RT verdaut, um die Zugänglichkeit des Gewebes für den Hybridisierungsprozess zu verbessern. Die Mausstadien E9.5 bis E11.5 wurden mit 10µg/ ml PK für 3 min, die Stadien E12.5 und E13.5 und die Kalvarien E18.5 mit 20µg/ ml PK für 5min inkubiert. Die Hühnchenembryonen wurden im Stadium HH22 für 5min mit 10µg/ ml PK, HH23 bis HH24 für 10min mit 15µg/ ml PK und HH25 für 10min mit 20µg/ ml PK behandelt.

An das zweimalige Waschen der Präparate mit PBST/ Glycin [2mg/ ml] für 5min, zum Abstoppen des PK-Verdau, schlossen sich Waschschrte in folgender Reihenfolge an: PBST/DEPC (2x je 5min), RIPA-Puffer (3x je 5min), PBST/ DEPC (3x je 5min). Nach einer 20minütigen Fixierung der Embryonen mit 4%PFA/ 0,2% Glutaraldehyd/ 1% TWEEN20 wurden diese mehrmals mit PBST, PBST/ Hybridisierungspuffer (1:1) und Hybridisierungspuffer gewaschen und für mindestens 2h einer Prähybridisierung mit dem Hybridisierungspuffer bei 65°C unterzogen. Nach Zugabe des Sondenmixes mit der gewünschten Sonde wurden die Embryonen über Nacht bei 65°C inkubiert. Der Sondenmix ist ein Gemisch aus dem Hybridisierungspuffer mit transfer-RNA (tRNA) [100µg/ ml] 100:1. 1ml des Sondenmixes wurde mit 10µl der gewünschten Sonde [0,1-1µg/ ml] gemischt und anschließend 4min bei 80°C erhitzt, um eine Denaturierung der Sonde zu erzielen. Nach Zugabe des

gesamten Mixes zu den Embryonen wurden diese üN bei 65°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die überschüssige Sonde durch 2x 30min Waschen mit dem Hybridisierungspuffer bei 65°C entfernt. Nach Abkühlen der Embryonen auf RT wurde ein RNase-Verdau (vgl. Kapitel 3.7) 2x 30min bei 37°C durchgeführt, um nicht hybridisierte Sondenreste vollständig zu entfernen. Es folgte eine Waschserie mit SSC/ FA/ T bei 65°C: 2x 5min, 3x 10min, 6x 20min. Anschließend wurden die Embryonen auf RT abgekühlt und diese auf MABT umgepuffert: 1x 10min 1:1 SSC/ FA/ T/ 1x MABT, 2x 10min in 1x MABT. Unspezifische Bindungsstellen für den DIG-Antikörper wurden durch eine 1h Inkubation bei RT in einer Blockierlösung (5% BBR (Boehringer blocking reagent) in MABT) abgesättigt. Anschließend wurden die Präparate üN bei 4°C mit Anti-DIG-Fab-ALP Antikörper (Roche, Karlsruhe, D) 1:5000 in 1% BBR/ MABT schwenkend inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch eintägiges Waschen mit PBST/ Tetramisol [500mg/ l] entfernt. Am vierten Tag kam es zur Visualisierung der Antikörpersignale: die Embryonen wurden 3x 20min mit ALP-Puffer äquilibriert und anschließend in BM Purple AP Substrat (Roche, Karlsruhe, D) beim RT, im Dunklen und schwenkend inkubiert. Die Signalintensität für die einzelnen Sonden bestimmte die Inkubationszeit. Zur Fixierung der Signale wurden die Embryonen 3x 20min mit ALP-Puffer gewaschen und in 4% PFA/ PBS/ 5mM EDTA/ 0,2% Glutaraldehyd bei 4°C aufbewahrt. Die Ergebnisse wurden am Binokular aufgenommen und mit der AxioVision 4.6 Software (Zeiss, Göttingen, D) dokumentiert.

#### 4.5.1.2 RNA *in situ* Hybridisierung auf Paraffinschnitten

Für eine RNA *in situ* Hybridisierung auf Paraffinschnitten wurden 7µm dicke Gewebeschnitte verwendet. Die Gewebeschnitte wurden auf einer Heizplatte 1h auf 60°C erwärmt, um die nachfolgende Entparaffinierung und Entwässerung zu erleichtern. Alle nachfolgenden Protokollschritte wurden bei RT gemacht. Dazu wurden die Schnitte 2x 15min in Ultra Clear (UC), 2x 10min in 100% Ethanol, 5min in 75% Ethanol, 5min in 50% Ethanol/ PBS, 5min in 25% Ethanol/ PBS und 2x 5min in PBS inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Gewebepreparation: Die Präparate wurden 10min in 4%PFA/ PBS fixiert, 3x mit PBST gewaschen und in Proteinase K (PK) Lösung für 10min verdaut. Die PK Konzentration war abhängig vom Embryonalalter. Für E12.5 und E13.5 wurden 1,5µg/ ml, für E14.5 3µg/ ml und für E16.5 und ältere Stadien 6µg/ ml eingesetzt. Der PK Verdau verlängerte sich bei den Stadien E16.5 und älter auf 20-30min. Im Anschluss erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBST/ DEPC, eine 5minütige Fixierung in 4% PFA/ PBS, eine erneute Waschserie mit PBST/ DEPC und eine Acetylierung (Acetylierungslösung) von 10min. Nach dreimaligem Waschen mit PBST/ DEPC wurden die präparierten Gewebeschnitte einer Prähybridisierung unterzogen. Die Proben wurden in einer Feuchtkammer, die mit 5x SSC/ 50% Formamid vorbereitet war, für mindestens 4h mit vorgewärmten Hybridisierungspuffer bei 65°C vorhybridisiert, um unspezifische Bindungen abzudecken. Danach fand die Hybridisierung mit der Sonde statt: die Sonde wurde in einem Verhältnis 1:100 mit Hybridisierungspuffer verdünnt, bei 85°C für 5min denaturiert, auf die Objektträger verteilt und üN bei 65°C in der Feuchtkammer belassen. Am nächsten Tag erfolgten die Entfernung überschüssiger Sonde und die Antikörperzugabe. Die Objektträger wurden kurz in 5x SSC, 30min in 1x SSC/ 50% Formamid bei 65°C und 10min bei 37°C in RNase-Waschpuffer inkubiert, dann für 30min bei 37°C in RNase-Waschpuffer mit 400µl/ 200 ml RNase A belassen und final erneut mit RNase-Waschpuffer für 10min bei 37°C gewaschen. Nach 20min Inkubation in 2x SSC bei 65°C, in 0,2x SSC bei 65°C und in

0,2x SSC bei RT wurden die Objektträger für die Antikörperinkubation vorbereitet. Einem zweimaligen Waschen mit 1x MABT bei RT folgte eine über mindestens 2h andauernde Blockierung mit 20% HISS/ MABT in einer Feuchtkammer (1x MABT), um unspezifische Wechselwirkungen mit dem Antikörper zu unterbinden. Für die Antikörperlösung wurde der anti-DIG-AP Antikörper 1:2500 in 5% HISS/ MABT bei 4°C vorinkubiert und später zu den Schnitten gegeben und diese üN bei 4°C belassen. Für die Antikörperfärbung wurden die Schnitte 3x 5min in 1x MABT und 10min in ALP-Puffer gewaschen und unter der Verwendung von NBT/BCIP in ALP-Puffer (je 70µl/ 200ml) auf einem Schüttler lichtgeschützt bei RT inkubiert. Die Inkubationszeit richtete sich nach der Spezifität der Signalfärbung auf den Schnitten. Beendet wurde die Antikörperfärbung durch 10min Waschen in ALP-Puffer. Anschließend wurde 2x 5min in PBS/ bidest gewaschen, 30min bei RT in 4%PFA/ PBS fixiert, wiederholt in PBS/ bidest gewaschen und final mit HydroMatrix eingedeckelt. Die Objektträger sind nun für eine sehr lange Zeit bei RT lagerbar.

Die fotografische Dokumentation der Signalmuster erfolgte mit dem Mikroskop Leica DMR und der AxioVision 4.6 Software (Zeiss, Göttingen, D).

#### 4.5.2 Paraffineinbettung und Schnittpräparation von Gewebepreparaten

Die zu untersuchenden Gewebe gewünschter Stadien wurden von den Mausembryonen abpräpariert und im Anschluss in 4%iges PFA/ PBS (DEPC) überführt und üN bei 4°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Präparate 2x 5min in PBS (DEPC) gewaschen, dann für 1h bei RT in 50% Ethanol belassen, und dann für mindestens 2h in 70% Ethanol dehydriert. Alle weiterführenden Entwässerungsschritte wurden mit dem Entwässerungsautomaten (Leica, Heerbrug, Schweiz) und dem folgenden Programm durchgeführt: 3h 90% Ethanol, 3h 95% Ethanol, 3x 2h mit Vakuum 100% Ethanol, 2x 15min mit Vakuum Ultra Clear, 30min Vakuum Ultra Clear, 3h mit Vakuum Ultra Clear/Paraffin, 3h mit Vakuum Paraffin. An der Einbettstation wurden die Präparate in flüssigem Paraffin, unter der Verwendung von Einbettförmchen, in die gewünschte Position eingebettet. Die eingebetteten Präparate wurden bei -20°C vollständig ausgehärtet, aus den Förmchen gelöst und am Cool-cut-Mikrotom (Leica, Heerbrug, Schweiz) geschnitten. Für die RNA *in situ* Hybridisierungen wurden 7µm dicke Schnitte angefertigt und auf unbehandelte Glasobjektträgern gezogen. Die Schnittanordnung erfolgte seriell. Die entstandenen Schnitte wurden dann auf einer Heizbank bei 37°C getrocknet und über Nacht bei 40°C in einem Trockenofen belassen. Die fertigen Schnitte wurden bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

#### 4.5.3 Vibratonschnitte

Um die Färbung von Embryonen oder einzelnen Gewebeteilen näher untersuchen zu können, wurden Gewebeschnitte am Vibratom angefertigt. Die zu untersuchenden Präparate wurden mit PBS (bidest) gewaschen und einer anschließend aufsteigenden Succrosereihe bei 4°C unterzogen: jeweils 1h in 5%, 15% und 30% Sucrose in PBS.

Die Präparate wurden dann in eine Gelatine/ Albumin (BSA)/ Sucrose Lösung in PBS überführt (0,5% Gelatine, 30% BSA, 20% Sucrose in PBS) und üN oder einige Tage (je nach Größe des Präparats) bei

4°C aufbewahrt. Die Einbettung erfolgte in der gleichen Lösung unter zusätzlicher Verwendung von 100µl 25%igem Glutaraldehyd. Die Positionierung der Gewebe musste sehr schnell erfolgen, da die Aushärtung nach wenigen Minuten vollzogen war. Durch Kühlung der verwendeten Förmchen konnte eine Aushärtung etwas verzögert werden. Die Blöckchen mussten sofort verwendet werden, um eine Austrocknung der Proben zu vermeiden. Nach dem Zurechtschneiden der Blöckchen wurden diese am Vibratom (Microm, Heerburg, Schweiz) in 20-40µm dicke Schnitte geschnitten und mittels Hydromatrix eingedeckelt. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte am Mikroskop.

#### 4.5.4 **Plastikeinbettung/ Plastikschnitten und Entplasten**

Gewebe später embryonaler Stadien wurden in Plastik eingebettet, um eine bessere Analyse von kalzifizierten Geweben vornehmen zu können. Die Extremitäten wurden abpräpariert und üN in 4% PFA/ PBS bei 4°C fixiert. Am nächsten Tag wurden die Gewebe 2x 5min mit PBS (bidest) gewaschen und auf die vollständige Entwässerung vorbereitet: 1h in 50% Ethanol, 6h in 70% Ethanol bei RT. Die folgenden Entwässerungsschritte wurden jeweils für 6h bei RT ausgeführt: 80% Ethanol, 90% Ethanol, 100% Ethanol, 1:1 Ethanol:Aceton. Final inkubierten die Proben 2x für 3h in Xylol und 48h in Methyl-Methacrylat (MMA) Infiltrationslösung, wobei nach 24h ein Lösungswechsel erfolgte. Die Blöckchen wurde unter der Verwendung von Polymerisationsgefäßen gegossen: 100ml Gießlösung wurden mit 500µl DMPT (Dimethyl-Para-Toluidin) versetzt, wodurch die Polymerisation des MMA beschleunigt wurde. Die jeweilige Probe wurde ausgerichtet und mit Sekundenkleber fixiert, bevor das Gefäß mit der Gießlösung gefüllt wurde. Nach einer 10minütigen Inkubation im Vakuum, erhärteten die Blöckchen bei RT üN. Am darauf folgenden Tag wurde das Blöckchen am Mikrotom geschnitten (7µm Schnitte). Die Fixierung der Schnitte fand auf Objektträgern statt. Nach einer fünfminütigen Überschichtung mit Streckflüssigkeit (300ml Ethanol (70%), 200ml Ethylenglycolmonobutylether), wurde der Objektträger mit Kisolfolie abgedeckt und in einem Whatman Trockenblock getrocknet. Nach vollständiger Trocknung der Schnitte konnte die Kisolfolie abgezogen werden und die Schnitte bei 4°C für mehrere Monate gelagert werden. Die Entfernung des Plastiks aus den Geweben erforderte die Inkubation der Objektträger in folgender Lösungsreihe: 3x 10min in Monoethanolamin (Lösung musste jeweils gewechselt werden), 2x 8min in Ultra Clear, 2x 2min in 100% Ethanol, 2min in 90% Ethanol, 2min in 70% Ethanol, 2min in 50% Ethanol, 2x 2min in H<sub>2</sub>O (bidest). Nun konnten die zellulären Strukturen des Gewebes genauer untersucht werden. Um die Zellkerne anzufärben wurden die Plastikschnitte für 15min in Kernrot inkubiert und anschließend für 3min mit H<sub>2</sub>O bidest entfärbt.

#### 4.5.5 **Skelettpräparation**

Die Skelettpräparation verdeutlicht den Entwicklungsstand der skelettalen Elemente im zu untersuchenden Embryo, in dem mit Alcian Blau die im Knorpel vorkommenden Polysaccharide blau und mit Alizarin Red die kalzifizierende, extrazelluläre Matrix (Knochenmaterial) rot angefärbt wird. Die zu untersuchenden Tiere wurden gehäutet, ausgenommen und über Nacht in 100% Ethanol bei 4°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde 2 Tage lang mit Alcian Blau in 80% Ethanol/ 20% Eisessig gefärbt. Ein eintägiges Waschen mit 50% Ethanol und ein Tag Färbung mit Alizarin Red in 1% KOH folgte. Überschüssiges Gewebe wurde mit 0,3%iger KOH-Lösung entfernt. Die Präparate wurden einer aufsteigenden Glycerinreihe unterzogen und letztendlich in 80%igem Glycerin bei RT gelagert.

Für Skelettpräparationen von Zebrafischen mit Alcian Blau wurden diese in 100% Ethanol für 2h inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation für 5h oder üN in Alcian Blau-Färbelösung.

Die Dokumentation erfolgte am Binokular mit der Software Axion Vision 4.6 (Zeiss, Göttingen, D).

#### 4.5.6 X-Gal-Färbung von Embryonen

Das *LacZ*-Gen (*E.Coli*) codiert für das Enzym  $\beta$ -Galactosidase, das das chromogene Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D.galactopyranosid) zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl umsetzt, welches wiederum nach Oxidation an der Luft dimerisiert und eine blaue Färbung zeigt. Diese Färbung wurde im Experiment an ganzen Embryonen durchgeführt. Die Embryonen von transgenen Mäusen im Embryonalstadium E13.5, E14.5, E15.5 und E17.5 wurden in PBS (bidest) gewaschen und für 1h in 2% PFA/ 0,2% Glutaraldehyd bei 4°C fixiert. Nach 3x 15min waschen mit PBS wurden die Embryonen üN bei RT unter Lichtausschluss gefärbt (*LacZ*-Färbelösung, vgl. Kapitel 3.7). Die Färbung variierte von Embryo zu Embryo, aufgrund unterschiedlicher Diffusionsvorgängen der Färbelösung und unterschiedlicher Anzahl an Integrationsereignissen des Reportervektor-Konstrukts in das murine Genom, wodurch sich unterschiedliche Inkubationszeiten ergaben. Die Präparate wurden nach mehrmaligem Waschen mit PBS erneut fixiert (2% PFA/ 0,2% Glutaraldehyd) und bei 4°C gelagert. Die Dokumentation erfolgte zeitnah (innerhalb weniger Tage) an einem Binokular unter der Verwendung der AxioVision 4.6 Software.

### 4.6 Das Modellsystem Zebrafisch

Um einen ersten Eindruck über die mögliche Funktion von Genen während der Embryonalentwicklung und im adulten Stadium zu bekommen, ist das Modellsystem Zebrafisch eine sehr effektive Herangehensweise.

#### 4.6.1 Zebrafisch-Haltung

Für die Zebrafisch-Experimente wurden Wildtypen des Stamms „AB“ verwendet. Die Zebrafische wurden in 28,5°C warmen Wasserbädern gehalten, deren pH Wert bei 7,0 und NaCl-Gehalt bei 60µg/L lag. Der Raum unterlag einem Tag/ Nacht Zyklus von 14h Licht und 10h Dunkelheit, was dem natürlichen Biorhythmus der Tiere entspricht. Die Zebrafisch-Embryonen schlüpften spätestens nach drei Tagen. Bis zum siebten Tag wurden diese in „Zebrafisch-Puffer“ (E3) gehalten, danach wurde zusätzlich spezielles Fischfutter hinzugegeben. Die Umsetzung der Jungfische in die Zebrafisch-Anlagen erfolgte parallel.

#### 4.6.2 Morpholino-Technologie

Die Morpholino-Technologie wird seit dem Jahre 2000 erfolgreich in verschiedenen Modellsystemen eingesetzt (u.a. Zebrafische, Krallenfrösche, Hühnchen) und verursacht im zu untersuchenden Organismus ein Knockdown eines Gens mittels Morpholino (= Oligo, der an eine komplementäre mRNA eines gewünschten Gens binden und dadurch die Translation hemmt). Durch diese Technologie lassen sich Gene innerhalb des frühen Embryonalstadiums funktionell gut untersuchen.

Die Morpholino Oligos werden im 1-2 Zellstadium injiziert, daher muss berücksichtigt werden, dass mit zunehmender Zellteilung (steigendem Embryonalstadium) die Morpholino-Konzentration pro Zelle geringer wird und somit die Blockierung der Translation nachlässt und irgendwann aufgehoben ist (Gene Tools, LLC, Philomath, OR).

Die in dieser Arbeit verwendeten Antisense Custom Morpholinos (MO) wurden bei der Firma Gene Tools (Gene Tools, LLC, Philomath, OR) bestellt. Die Morpholinos deckten das Startcodon (AUG) der Translation ab. Vor der Injektion wurden die Morpholinos in sterilem Wasser auf 1mM verdünnt.

#### 4.6.2.1 Injektionsexperimente

Für die Injektionsexperimente wurden befruchtete Zebrafischeier benötigt. Nach Eintreten des Tageszyklus wurden die Fische in einem Gitter verpaart. Die befruchteten Eier fielen durch das Gitter und konnten aus dem Becken entnommen werden. Die Eier wurden mit Fischwasser und anschließend mit E3-Puffer zweimal gewaschen und für die Injektionsexperimente vorbereitet. Die Eier mussten direkt im 1-2 Zellstadium injiziert werden, um die fortlaufende Entwicklung beeinflussen zu können. Die Eier wurden an einem Objektträger ausgerichtet, der in einer Petrischale positioniert war. Die Injektion über dünne Glaskapillaren erfolgte in den Plasmastrom (zwischen Dottersack und Eizelle befindlich). Pro befruchtetem Ei wurden 5µM einer 1mM konzentrierten Morpholino-Lösung injiziert. Die Konstrukte waren 1:10 mit Phenolrot/ DPBS verdünnt. Es wurden vier bis zehn Streifen pro zu untersuchendem Konstrukt (Morpholino) injiziert. Dies entspricht 200 bis 500 Eiern, wovon meist 40% der Eier am Ende überlebten. Die restlichen Eier zeigten Fehlentwicklungen, waren unbefruchtet oder abgestorben. Uninjizierte Eier desselben Eierpools wurden als Wildtyp-Kontrolle verwendet. Die behandelten Eier wurden in Petrischalen mit E3-Puffer in einem Inkubator mit 28,5°C und Tag/ Nacht Rhythmus inkubiert. Das Medium wurde täglich gewechselt und tote Eier, Eierreste und Verunreinigungen wurden entfernt. Die gewünschten Zebrafischstadien wurden in 4% PFA/ PBS für 6h bei RT, oder üN bei 4°C fixiert, anschließend zweimal mit PBST/ DEPC gewaschen und in 100% Methanol bei 4°C aufbewahrt.

Die Dokumentation der Zebrafische wurde mit dem Binokular und der AxioVision 4.6 Software vorgenommen.

#### 4.6.2.2 Rescue Experiment

Um die Spezifität des untersuchten Morpholinos zu charakterisieren wurden mRNA-Rescue-Experimente gemacht, die den Wildtyp-spezifischen Phänotyp bei MO-behandelten Zebrafischen wieder herstellen sollten. Es wurde eine Ko-Injektion mit dem Morpholino und einer mRNA, die für das unterdrückte Protein codiert, durchgeführt. Dabei musste beachtet werden, dass die 5'-UTR (untranslatierte Region) nicht von dem Morpholino gebunden werden konnte: es wurden daher synonyme Codons ausgewählt, die im Zebrafisch-Genom standardmäßig vorkommen und die Synthese der jeweiligen Aminosäure gewährleisten.

Die Amplifizierung des Abschnitts für das Rescue-Experiment erfolgte auf genomischer Zebrafisch-DNA. Das Konstrukt wurde in „sense-Orientierung“ in den pcs2+-Vektor kloniert, der anschließend mit

dem Restriktionsenzym *ApaI* linearisiert wurde. Die Herstellung synthetischer RNA zur Injektion in Zebrafisch-Eier erfolgte mit dem mMessageMachine-Kit Sp6 (Ambion, Darmstadt, D) nach Angaben des Herstellers.

Bei allen Injektionen wurde in Eizellen desselben Geleges der Morpholino (*bhlha9*), der nicht spezifisch bindende Kontroll-Morpholino (5' mispair Morpholino), Standardnegativ-Kontroll-Morpholino sowie uninjizierte Zebrafisch-Eier untersucht, um unspezifisch veränderte Embryophänotypen, bedingt durch den Injektionsprozess, zu ermitteln.

#### 4.6.3 RNA *in situ* bei Zebrafischen

Für die RNA *in situ* Hybridisierung wurden die Zebrafische dechoriniert in PBS und anschließend für 6h bei RT oder bei 4°C üN in 4% PFA (PBS) fixiert. Anschließend wurden sie 2x mit PBST und 2x mit 100% Methanol auf Eis gewaschen und bei -20°C gelagert. Die Lagerung war für mehrere Monate möglich.

Die *in situ* Hybridisierung fand in feinmaschigen Netzen (75µm) statt und erfolgte nach Standard-Protokoll (Xu et al. 1994). Abweichende Durchführungsschritte sind nachfolgend aufgelistet: Für die Prähybridisierung wurden die Embryonen in Cryoröhrchen gesammelt und für mindestens 2h (bis zu 6h möglich) in Hyb<sup>+</sup> Puffer (vgl. Puffer und Lösungen) bei 68°C inkubiert. Nach 2h wurden die antisense Sonden 1:100 in Hyb<sup>+</sup> Puffer verdünnt, bei 80°C für 2min denaturiert und mit dem in den Cryoröhrchen befindlichen Hyb<sup>+</sup> Puffer ausgetauscht. Die Hybridisierung der Sonden fand üN bei 68°C statt. Am nächsten Tag wurden die Sonden entfernt und die Embryonen wieder in die Netze überführt. Überschüssige Sonde wurde durch mehrmalige Waschschrte bei 68°C entfernt: 1x 5min mit Hyb<sup>-</sup> Puffer, 3x 10min mit 25% Hyb<sup>-</sup> Puffer in 2x SSCT, 1x 5min 2x SSCT und 2x 30min in 0,2x SSCT. Anschließend wurden die Embryonen noch für 1x 5min in 0,2x SSCT+50% 1xMABT und 1x5min mit 1x MABT gewaschen. Für die Sondendetektion wurden die Embryonen primär für 1h mit 1x MABT+2% DIG Block Lösung auf einem Schüttler bei RT blockiert und dann in Anti-DIG-AP Antikörper Lösung für 2h bei RT. Danach folgten vier jeweils 15minütige Waschschrte mit 1x MABT. Nach dem letzten Waschschrte wurden die Embryonen in eine 24 well Platte überführt und BM Purple (Farbreaktion, Roche, Mannheim, D) zugesetzt. Die Entwicklung erfolgte schüttelnd im Dunkeln, bei RT. Die Detektionszeit der Sonden lag bei ca. 30h. üN wurden die Embryonen bei 4°C gelagert, um eine Überfärbung der zu verhindern. Nach erfolgreicher Detektion der Sonde wurde die Reaktion durch zweimaliges schnelles Waschen mit PBST, einer anschließenden Fixierung mit PFA/ PBS für 30min (oder 4°C, üN) und 2x Waschen für 5min mit PBST abgestoppt. Um eine bessere Signalgebung zu erreichen, wurden die Embryonen, unter Verwendung einer Glycerolreihe, aufgehellt: 5min 30% Glycerol/ PBS, 5min 50% Glycerol/ PBS, 5min 70% Glycerol/ PBS. Die Aufbewahrung und Dokumentation der Embryonen erfolgte in 70% Glycerol/ PBS.

## 4.7 Zellkulturmethoden

Alle verwendeten Medien wurden auf 37°C vorgewärmt, wenn nicht anders angegeben.

### 4.7.1 Auftauen von Zellen

Die HEK293-Zellen wurden im Wasserbad (37°C) aufgetaut und in ein Falcon mit 5ml Medium überführt, um die Wirkung des Einfriermediums DMSO zu neutralisieren. Anschließend wurde die Suspension für 5min bei 5000rpm zentrifugiert, das überschüssige Medium abgesaugt und das Pellet in frischem Medium (20ml) resuspendiert. Der Ansatz wurde auf Zellkulturflaschen (75cm<sup>2</sup>) überführt, und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Sättigung im Brutschrank kultiviert. Das Medium wurde regelmäßig gewechselt.

Erreichten die Zellen eine Konfluenz von ca. 80% wurden sie in eine neue Zellkulturflasche umgesetzt. Das verbrauchte Medium wurde zunächst abgesaugt, 1x mit DPBS (Lonza, Köln, D) gewaschen, in 10% des Volumens der Zellkulturflasche trypsinisiert und für 2min im Brutschrank inkubiert. Zusätzliches Beklopfen der Flasche förderte die Zellablösung. Die gelösten Zellen wurden in 10ml Medium aufgenommen, wodurch die toxische Wirkung des Trypsins eingeschränkt wurde. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 5000rpm, wurde das Zellpellet in neuem frischem Medium (20ml) resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20µl Zelllösung in die Neubauerzählkammer (Faktor: 10<sup>4</sup>) pipettiert und die vier Quadrate ausgezählt. Nach Bestimmung des Mittelwertes (MW) konnte die Zellzahl/ ml bestimmt werden:

$$\frac{\text{MW} \times 10^4}{\text{Volumen, in dem Zellen resuspendiert wurden}}$$

Volumen, in dem Zellen resuspendiert wurden .

Ein Teil der Zellsuspension wurde nach Auszählung der Zellzahl für Versuche verwendet, der Rest wurde auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt.

### 4.7.2 Einfrieren von Zellen

Die Zellen in den Zellkulturflaschen wurden 1x mit DPBS gewaschen, mit 1ml Trypsin versehen und für 2min im Brutschrank inkubiert. Zusätzliches beklopfen der Zellkulturflasche förderte die vollständige Ablösung der Zellen. Die Zellen wurden in 10ml Medium aufgenommen und für 5min bei 5000rpm zentrifugiert. Das Sediment einer >90% konfluenten Zellkulturflasche wurde in 1,5ml Medium resuspendiert. 0,5ml dieser Suspension wurden in Kryoröhrchen überführt, mit 0,5ml 2x Einfriermedium (vgl Zellkultur/ Maus-ES-Zellkultur) versetzt und sofort bei -80°C weggefroren. Nach einem Tag bei -80°C erfolgte die endgültige Lagerung in flüssigem Stickstoff.

### 4.7.3 Luziferase Assay

In dieser Arbeit wurde das Dual-Glo<sup>TM</sup> Luziferase Assay System von Promega (Madison, USA) verwendet. Mit diesem Reporter-Assay wird die Promoteraktivität einklonierter Genomabschnitte nachgewiesen, indem die Aktivität der Firefly-Luziferase (aus *Photinus phyalis*) im Verhältnis zur



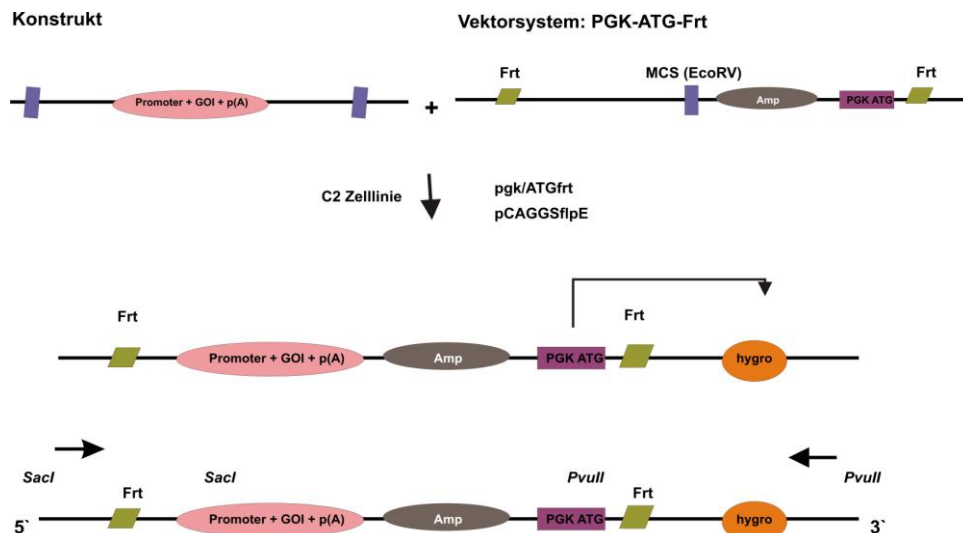
Renilla-Luziferase (*Renilla reniformis*) analysiert wird. Nach Messung der Firefly-Luziferaseaktivität (Dual-Glo™-Luziferase Reagenz), wird die Renilla-Luziferaseaktivität gemessen. Durch Zugabe eines „Renilla-Reagenz“ (Dual-Glo™ Stop&Glo® Reagenz) wird die Firefly-Luziferaseaktivität gestoppt und im Gegenzug die Renilla-Luziferase aktiviert.

Für die Luziferase-Assays wurden 24 well Platten verwendet, in denen 24h vor der Transfektion  $2,0 \times 10^5$  HEK293-Zellen („Human embryonic Kidney“), pro Well ausgesät wurden. Vor der Transfektion der Zellen erfolgte ein Austausch des HEK-Nährmediums mit 400µl frischem Medium/ Well. 7µl des Luziferase-Konstrukt [125ng/ µl], 3µl des Renilla-Vektors (pRL-CMV-Vektor) [5ng/ µl] sowie 58µl DMEM mit 1g/ l Glucose, ohne weitere Zusätze wurden mit 7µl Polyfect vermischt und 10min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 22µl/ Well des Transfektionsansatzes pipettiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Kontrollansätze wurden in jedem Versuch Leervektorkontrollansätze und untransfizierte Zellen mitgeführt, um jeden Versuch in sich normalisieren und auswerten zu können.

24h nach Transfektion der Zellen wurden diese mit 1x DPBS gewaschen und mit 100µl Passiven Lysis Puffer (Promega, 1:5 mit Wasser verdünnt) für 15min bei RT auf einer Wippe inkubiert. Anschließend wurde jeder Ansatz durch gründliches auf- und abpipettieren durchmischt. Die Aktivitätsmessungen erfolgten in einer weißen LuminNuni 96 well Platte. 5µl des Lysats wurden mit 25µl Dual-Glo® Ansatz 10 Minuten bei RT inkubiert und im Luminometer gemessen. Anschließend wurden 25µl Dual-Stop und Glo®-Substrat (1:100) zu den Ansätzen pipettiert, und nach 10minütiger Inkubation eine erneute Messung durchgeführt. Die gemessenen Werte wurden gegen die Renilla-Messwerte normalisiert. Die Messergebnisse des Luziferase-Assays wurden mit dem „EG & G Berthold WinGlow“ Version 1.24 Computerprogramm (EG & G Berthold Technologies) berechnet.

#### 4.8 Embryonale Stammzellkultur (ES-Zellkultur)

Für die ES-Zellkultur-Experimente wurden C2-Zellen (Open Biosystems, MES4305) verwendet. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine F1 Zelllinie, die aus einer Kreuzung der Mausstämmen C57B/6 und 129svJae hervorgegangen ist und für diploide Blastozysten-Injektionen verwendet werden kann. Mit Hilfe dieser Zellen ist es möglich eine zusätzliche Kopie eines Gens oder eines chromosomalen Abschnitts abwärts des *CoIA1*-Lokus zu inserieren (mm8, chr11:94,752,360-94,767,937). Das Genom dieser Zellen besteht aus einem *CoIA1*-Wildtyp-Allel und einem modifiziertem *CoIA1*-Allel, das eine PGK-Neomycin-Resistenz-Kassette, flankiert durch Flippase (Flp)-Recombinase-Target-Erkennungssequenzen (frt) sowie ein Hygromycin-Resistenzgen ohne jegliche Promotorelemente und Initiationscodon (ATG) aufweist. Zur Klonierung einer potenziellen Promoterregion mit dazugehörigem Genbereich (Gene of interest, GOI) wurde das Vektorsystem PGK-ATG-Frt (Open Biosystems, MES4490) verwendet (Abbildung 13). In Gegenwart der FLPe-Recombinase (Open Biosystems, MES4488) besteht die Möglichkeit, das klonierte Fragment im PGK-ATG-Frt-Vektorsystem in das modifizierte Allel des *CoIA1*-Lokus mittels der frt-Erkennungssequenzen zu inserieren. Die Insertion des GOI, sowie des PGK-Promoters und des Initiationscodons ATG aufwärts und in richtiger Orientierung zum Hygromycin-Resistenzgen ermöglicht eine positive Selektion über Hygromycin-Resistenz der rekombinierten Klone.



**Abbildung 13 Schematischer Überblick der methodischen Vorgehensweise der zielgerichteten Klonierung eines Zielgens in den *CoIA1*-Lokus von C2-Zellen.**

Ein Konstrukt mit den Restriktionsschnittstellen der MCS kann in das Vektorsystem PGK-ATG-Frt eingebracht werden. Unter der Verwendung einer Flp-Rekombinase (pCAGGSflpE) wird dann dieses Konstrukt über die Frt-Sequenzen in den modifizierten *CoIA1*-Lokus der C2-Zellen integriert werden. Das inserierte Konstrukt bringt eine Transkriptionsstartseite mit (ATG), wodurch im Anschluß die Selektion der positiven Klone mittels Hygromycin ermöglicht wird. Mittels Restriktionsverdauen (*Sacl*, *PvuII*) kann dann mittels Southern Blot das Insert nachgewiesen werden.

Amp = Ampicillin-Resistenzgen, Frt = Flippase (Flp)-Rekombinase-Target-Erkennungssequenz, GOI = Gene of interest, hygro = Hygromycin-Resistenzgen, MCS = Multiple Klonierungsstelle, p(A) = poly A - Signal, Restriktionsenzyme: *EcoRV*, *PvuII*, *Sacl*, pCAGGSflpE = Flp-Rekombinase-Vektorpgk/ATGftrt = Vektorsystem mit GOI, Pfeile kennzeichnen die verwendeten Sonden (5' und 3') für die Southern Blot-Analyse (Bild verändert nach Open Biosystems, Thermo Scientific (2009)).

Zellen mit einer Insertion des GOI am *COLA1*-Lokus werden im Anschluss zur Generierung transgener Mäuse verwendet. Die transgenen Tiere weisen eine zusätzliche Kopie des GOI im Genom auf (single-copy transgenic mouse), das eine konstitutive Expression zeigt. Die Integration eines GOI in den *CoIA1*-Lokus erlaubt die Analyse und funktionelle Charakterisierung des Gens *in vivo* und trägt zur Aufklärung der Bedeutung des Gens im Gesamtkontext bei.

#### 4.8.1 Embryonale Fibroblasten (Feederzellen)

Bei der Kultivierung von ES-Zellen ist es von essentieller Bedeutung, die Zellen in einem undifferenzierten Zustand zu belassen. Um diese Bedingungen zu gewährleisten wurden die ES-Zellen auf mitoseinhierten Mausfibroblasten (Feederzellen) ausplattiert sowie das Zytokin LIF (leukemia inhibitory factor) dem Medium beigefügt, das eine vorzeitige Differenzierung der Zellen unterbindet. Die Kultivierung der Zellen fand auf zuvor Gelatine-vorbehandelten Petrischalen statt.

Um einen ebenmäßigen Anheftungsuntergrund für die Feederzellen zu schaffen wurden Petrischalen/Platten mit einer 0,1% (w/v) sterilfiltrierten Gelatine-Lösung überschichtet. Nach einer einminütigen Inkubation bei RT wurde die Gelatine Lösung abgesaugt und die Gefäße unter der Clean-Bench getrocknet. Die Lagerung der Platten erfolgte bei RT.

Für die ES-Zellkultur-Experimente wurden DR4 mitomycin behandelte Fibroblasten-Zellen als Feederzellen verwendet, die von Dr. H. Schrewe (Abteilung Herrmann, Max Planck Institut für Molekulare Genetik) zur Verfügung gestellt wurden. Die Feederzellen waren zu  $2,5 \times 10^6$  Zellen/Gefrieröhrchen weggefroren (Stickstofftank) und entsprachen der Passage 3-5.

Zur Verwendung wurden die Zellen im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  vorsichtig aufgetaut und in 5ml Feederzell-Medium (vgl. Zellkultur/ Maus-ES-Zellkultur, 15ml Röhrchen) überführt, um das DMSO zu verdünnen. Die Zellen wurden für 5min bei 1000rpm zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in einer zum ausplattieren entsprechenden Menge Medium resuspendiert (z.B.: 1,5 ml/ Well für 6 well Platte (Wachstumsfläche:  $9,6\text{cm}^2$ ), Resuspensionsmenge: 9ml) (vgl. Tabelle 15, Anhang).

Die ES-Zellkulturen wurden bei  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  und einer Luftfeuchtigkeit von 95% in einem Inkubator kultiviert. Da ES-Zellen eine sehr hohe Stoffwechselaktivität aufweisen, erfolgte ein täglicher Mediumwechsel, um Stoffwechselendprodukte zu entfernen. Die verwendeten Medienbestandteile und Seren wurden zuvor auf die ES-Zellkulturtauglichkeit überprüft.

Waren die ausgesäten Feederzellen konfluent gewachsen, wurden sie auf weitere Platten aufgeteilt. Nach der Zugabe von Trypsin/ EDTA (z.B.: 1ml Trypsin pro 6cm Schale) wurden die Zellen für 10min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung des Trypsin durch Zugabe von entsprechendem Medium zu den losgelösten Zellen (z.B.: 3ml auf eine 6cm Schale) und die Zellen wurden in einem 15ml Röhrchen gesammelt. Nach Vereinzeln der Zellen durch vorsichtiges auf- und abpipettieren wurden die Zellen für 5min bei 1000rpm zentrifugiert, das Zellpellet in Feederzell-Medium resuspendiert und auf neue mit Gelatine beschichtete Petrischalen ausplattiert.

Nach konfluentem Wachstum der Feederzellen wurde das Wachstumsmedium gegen Feederzell-Medium ausgetauscht, das  $0,01\text{mg/ml}$  Mitomycin C (Sigma #M-4287) beinhaltet. Die Zellen wurden für 2-3h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, anschließend dreimal mit DPBS gewaschen, trypsinisiert und in FB-Medium aufgenommen. Nach einer Zentrifugation bei 1000 rpm für 5min wurden die Zellen in Feederzell-Medium resuspendiert und auf gelatinisierten Platten ausplattiert (Dichte:  $3-4 \times 10^4$  Zellen/  $\text{cm}^2$ ) oder weggefroren ( $2,5 \times 10^6$  Zellen/ Gefrieröhrchen, vgl. Kapitel 4.7.2).

Eine konfluente Platte wurde mit DPBS gewaschen und trypsinisiert. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 5ml Feederzell-Medium inaktiviert, die Zellzahl mit der Neubauerzählkammer bestimmt und die Zellen bei 1000rpm für 5min zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 50% Einfriervolumen (20% FCS) resuspendiert und dann das restliche 50%ige Einfriervolumen durch 2x Einfriermedium ersetzt. Nach vorsichtigem Durchmischen der Suspension wurde 1ml in Gefrieröhrchen ( $2,5 \times 10^6$  Zellen/ Gefrieröhrchen) überführt und langsam bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Gefrieröhrchen in den flüssigen Stickstofftank überführt.

Das Ausplattieren und die Transfektion der C2-Zellen fand auf 6 well Platten statt, die nachfolgende Selektion mit Hygromyzin wurde auf 6 cm Schalen ausgeführt.

#### 4.8.2 Aussäen und Trypsinbehandlung von C2-Zellen

Auf zuvor gelatinisierten Platten wurden Mitomycin behandelte Feederzellen mit einer Dichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/ Well ausgesät ( $3,4 \times 10^4$  Zellen/  $\text{cm}^2$ ). Hierzu wurden die Zellen vorsichtig bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut, in 5ml ES-Zellmedium überführt und anschließend bei 1000rpm für 5min zentrifugiert. Pro

Well wurden 1,5ml resuspendierte Feederzellen verteilt und diese für 3h bei 37°C inkubiert. Nach einer Inkubationszeit der Feederzellen von 3h wurden die C2-Zellen aufgetaut und auf das Monolayer der Feederzellen gegeben (2ml/ Well,  $3,1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ ). Das zuvor vorhandene Medium der Feederzellen wurde nicht abgesaugt, sodass ein Endvolumen von 3,5ml in jedem Well vorzufinden war (Kultivierung von ES Zellen

Tabelle 15). Ab diesem Zeitpunkt wurde mit LIF-Zugabe gearbeitet (50µl LIF [ $10^7 \text{U} / \text{ml}$ ] auf 500ml ES-Zellmedium, vgl. Zellkultur/ Maus-ES-Zellkultur).

Nach Absaugen des Mediums und anschließendem Waschen mit DPBS wurde zuvor erwärmtes Trypsin (0,5ml/ Well) zu den Zellen gegeben und für 10min bei 37°C inkubiert. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 1,5ml Medium inaktiviert und die erhaltene Zellsuspension in ein steriles 15ml Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Zellzahlbestimmung mittels der Neubauerzählkammer (vgl. Kapitel 4.7.1) und eine Ausplattierung von 300.000 Zellen auf einer mit Feederzellen bestückten 6 well Platte.

#### 4.8.3 Transfektion der C2-Zellen

Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das Medium der zu behandelnden Zellen gegen neues frisches Medium ausgewechselt. Die Transfektion wurde mit Lipofectamin2000 (Invitrogen, Darmstadt, D) durchgeführt. 5µg der Konstrukt-DNA wurden mit 1µg pCAGGS-Flpe-DNA und 125µl OptiMEM (Gibco, Darmstadt, D) vermischt und auf Eis gelagert (DNA-Mix, Reaktionsgefäß 1). In einem weiteren Reaktionsgefäß (Reaktionsgefäß 2) wurden 25µl Lipofectamin 2000 mit 110µl OptiMEM vermischt (Lipofectamin-Mix). Anschließend wurden 125µl DNA-Mix mit 125µl Lipofektamin-Mix vermischt und für 15min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1,25ml ES-Medium wurde das gesamte Volumen auf die C2-Zellen gegeben und für 3-5 h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte eine Trypsinierung der Zellen und Ausplattierung der transfizierten Zellen auf 3x6 cm Schalen (mit Feederzellen) mit unterschiedlichen Konzentrationen (1/6, 2/6, 3/6, Endvolumen jeweils: 3ml).

#### 4.8.4 Selektion der ES-Zellen

Ein Tag nach der Transfektion beginnt die Selektion von positiven Klonen, unter der Verwendung von Hygromycin (150µg/ ml). Die Zellen wurden trypsiniert und auf neue Platten ausplattiert. Es erfolgte ein täglicher Mediumwechsel mit Hygromycin und dadurch ein Selektionieren nach den positiven Klonen. Das Absterben der negativen Klone wurde täglich via Mikroskop verfolgt. Je nach Konstrukt, Zellmetabolismus und sonstigen Bedingungen dauert die Selektion ca. 7-10 Tage.

#### 4.8.5 Picken von positiven ES-Zellklonen

Einen Tag vor dem Klone picken wurde eine 96 well Platte gelatinisiert, sowie mit Feeder-Zellen behandelt ( $1 \times 10^4$  Zellen/ Well, Medienvolumen: 150µl). Am Tag des Klone pickens wurden 30µl Trypsin/ Well in eine 96-well Platte mit rundem Boden pipettiert und bei 37°C inkubiert. Die Platten mit den positiven Klonen wurden 2x mit DPBS gewaschen (jeweils 4ml), wobei mit kreisenden Bewegungen die Platte vorsichtig geschwenkt wurde. Final wurden 3ml DPBS in die zu pickende

Platte gegeben und diese außerhalb der Clean-Bench weiter behandelt. Unter der Verwendung einer 10er  $\mu$ l-Pipette wurden die Kolonien vom Untergrund gelockert und vorsichtig aufgesogen. Die gepickte Kolonie wurde in die vorbereitete 96well Platte mit Trypsin überführt. Nach einer Inkubation der Platte bei 37 °C für 10 min wurde das Trypsin durch die Zugabe von 60 $\mu$ l ES-Zellmedium inaktiviert. Nach mehrmaligem Durchmischen dieser Zellsuspension wurden die gepickten Klone auf eine Feeder-Platte (96Well-Format) übertragen und über Nacht bei 37°C belassen. Es folgte ein täglicher Mediumwechsel mit gleichzeitiger Betrachtung des Wachstums der ES-Zellen.

Drei Tage nach erfolgreichem Picken der positiven ES-Zellklone erfolgte das „Split und Freeze“-Verfahren. Das Medium auf der 96 well Platte wurde abgesaugt, die Zellen 2x mit DPBS gewaschen und anschließend trypsinbehandelt (50 $\mu$ l/ Well). Währenddessen wurde eine 96 well Platte mit rundem Boden mit 50 $\mu$ l 2x Einfriermedium versehen (Masterplatte), sowie 200 $\mu$ l ES-Zell-Medium in eine zuvor gelatinisierte 96 well Platte ohne Feeder-Zellen überführt. Es folgte die Inaktivierung und Vorbereitung der Zellen auf die „Split-Freeze“-Methode durch Zugabe von 100 $\mu$ l bicarb-freeDMEM/ Hepes/ 20% FCS/Well mit anschließender Durchmischung. 50 $\mu$ l der Zellen kamen in die 96 well Platte mit rundem Boden, weitere 50 $\mu$ l wurden zu den 200 $\mu$ l ES-Zell-Medium gegeben (1. Expansionsplatte). Zu der Ursprungsplatte wurden 200 $\mu$ l ES-Zell-Medium (ohne jegliche Zusätze) gegeben (2. Expansionsplatte) und beide Platten für weitere 3 bis 4 Tage bei 37°C inkubiert. Die Masterplatte wurde vorsichtig mit Parafilm geschlossen und in einer Styroporbox bei -80°C gelagert. Durch die „Split und Freeze“-Methode hatte man nun eine Masterplatte und zwei Expansionsplatten, die für die DNA-Isolierung und anschließende Analyse verwendet werden konnten.

#### 4.8.6 DNA-Präparation der ES-Zellklone

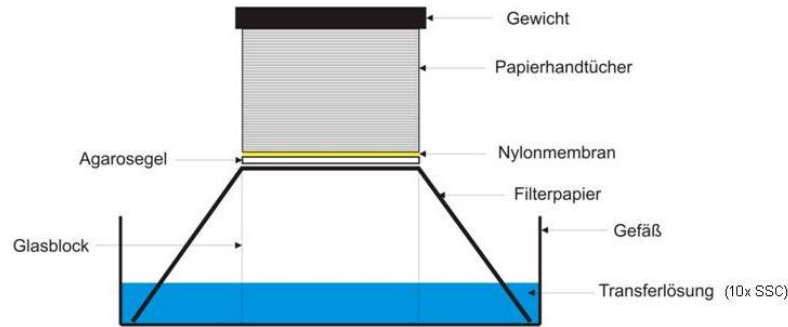
Nach dreitägiger Inkubation wurde das Medium abgesaugt, die Zellen 2x mit DPBS gewaschen und 50 $\mu$ l vorgewärmter Lysis Puffer hinzugegeben und die Platte in einer befeuchteten Box über Nacht bei 60°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden 100 $\mu$ l/ Well eiskalter 100%iger Ethanol/ 75mM NaCl zugegeben und 30min bei RT inkubiert. Danach wurde der Ethanol durch schnelles Auskippen entfernt und es folgten drei Waschschrte mit 70% Ethanol. Der überschüssige Ethanol wurde abgedampft und die Platte mit der DNA bei -20°C weggefroren oder sofort für den Restriktionsverdau mit anschließendem Southern Blot verwendet.

#### 4.9 Southern Blot Analyse

Zur Detektion von spezifischen DNA-Fragmenten wurde die Southern Blot Methode angewendet, bei der spezifische DNA-Sequenzen mittels einer markierten Sonde nachgewiesen werden können. Aus den expandierten C2-Zellen wurde die DNA gewonnen (vgl. Kapitel 2.11.13), welche anschließend einer Southern Blot-Analyse unterzogen wurde. Die DNA-Proben wurden üN mit dem Restriktionsenzym *PvuII* bzw. *SacI* (vgl. Kapitel 4.4.1) verdaut.

Die Proben wurden bei 80V für mindestens 6h laufen gelassen, um eine gute gleichmäßige Auftrennung der einzelnen DNA-Fragmente zu erhalten. Die Laufgeschwindigkeit und Auftrennung der einzelnen DNA-Proben wurde regelmäßig im UV-Licht kontrolliert. Nach erfolgreicher Auftrennung

wurde ein Foto zur qualitativen Beurteilung des Restriktionsverbaus gemacht. Das Gel wurde dann für 30min denaturiert (Denaturierungslösung) und anschließend zweimal für 20min neutralisiert (Neutralisierungslösung). Alle Waschschrte erfolgten auf einem Schüttler bei RT. Der Kapillartransfer der DNA-Proben auf eine Nylon-Membran erfolgte ün mittels Nasstransfer (Blotting-Verfahren) (Abbildung 14).



**Abbildung 14 Schematische Darstellung des Southern Blot Aufbaus.**

(Quelle:<http://nawipro.de/molekularbiologisches-methoden/dna-methoden/113-southern.html>)

Eine Nylon-Membran wurde dem Gel entsprechend zugeschnitten und anschließend kurz mit 10xSSC angefeuchtet. Für den Kapillartransfer erfolgte der Blot-Aufbau in einer mit 10xSSC gefüllten Plastikwanne. Auf einen Glasblock wurde eine doppelte Lage Whatman-Papier gelegt, wobei die Enden des Whatman-Papiers in das 10xSSC eingetaucht waren. Anschließend wurden zwei Lagen Whatman-Papier (der Gelgröße entsprechend zugeschnitten, angefeuchtet in 10x SSC) auf das doppelt gefaltete Whatman-Papier gelegt. Das Gel wurde plan aufgelegt und mit einem Glasstab die entstandenen Luftblasen und Unebenheiten entfernt. Anschließend wurde die zuvor angefeuchtete Nylon-Membran (10x SSC) auf das Gel gelegt und mit zwei Lagen Whatman-Papier (angefeuchtet) bedeckt. Im Anschluss wurde dieser Aufbau mit Frischhaltefolie abgedeckt, um das Verdunsten von Flüssigkeit zu vermeiden und eine geradlinigen Transfer zu gewährleisten. In dem Bereich des Nasstransfers wurde ein Fenster ausgeschnitten. Mehrere Lagen Papierhandtücher und ein Gewicht gewährleisteten letztendlich die Übertragung der DNA-Fragmente auf die Nylon-Membran via Flüssigkeitstransport. Am nächsten Tag erfolgte die Prä-/Hybridisierung der Proben. Mit einem weichen Bleistift wurden die Geltaschen auf die Nylon-Membran übertragen und die Membran für 5min mit 50mM NaPi neutralisiert. Dann wurde die Membran zwischen zwei trockene Whatman-Papiere gelegt und bei 80°C für 2h „gebacken“ (Fixierung der DNA an die Membran). Die Hybridisierung der Proben erfolgte in Glasröhrchen. Die getrockneten Blots wurden kurz in H<sub>2</sub>O (bidest) angefeuchtete, mit der Transferseite nach innen eingedreht (luftblasenfrei) und mit 25ml Church-Hybridisierungslösung (Hyp-Puffer) für 30min im Inkubator bei 65°C und 10rpm prähybridisiert. In der Zwischenzeit wurden 4-12µl (Menge abhängig von der Markierungseffizienz) mit 25ml Hyp-Puffer vermischt und für 10min bei 100°C denaturiert (Wasserbad). Der Hyp-Puffer, der für die Prähybridisierung eingesetzt wurde, wurde verworfen und durch frischen Hyb-Puffer mit markierter Sonde ersetzt. Die Hybridisierung der Proben erfolgte bei 65°C über Nacht im Inkubator bei 10rpm. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung abgegossen und die Membranen in den Glasröhrchen bei 65°C und 10rpm für 10min mit dem Church-Waschpuffer gewaschen. Anschließend

---

wurde die Membran aus den Glasröhrchen genommen und nochmals mit dem Church-Waschpuffer für 10min bei RT auf einem Schüttler gewaschen. Nach einer fünfminütigen Equilibrierung in 1x DIG1/ 0,3% TWEEN wurde die Membran in einem Plastikbeutel eingeschweißt und für 30min in dem Blocking-Puffer DIG2 (DIG2: Verdünnung des Blocking Reagenzes 1:10 in 1x DIG1) stark schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde der Blocking-Puffer gegen die Anti-Dig-Lösung (1:20000 in DIG1) ausgetauscht und die Membranen wieder für 30min inkubiert (stark schüttelnd). Die Membranen wurden aus der Plastiktüte entnommen und bei RT für 20min mit 1x DIG1/ 0,3% Tween und für 5min mit DIG3-Lösung gewaschen. Die gewaschenen Membranen wurden in eine Plastikhülle mit der DNA-Seite nach oben gelegt und mit einigen ml „ready to use CDPstar-Lösung“ bedeckt und für 5 bis 10min im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurde die überschüssige „ready to use CDPstar-Lösung“ entfernt, die Membranen in der Plastikhülle in eine Röntgenkassette gelegt und auf einen Film exponiert. Die Expositionszeit lag zwischen 5-20min.

## 5 Ergebnisse

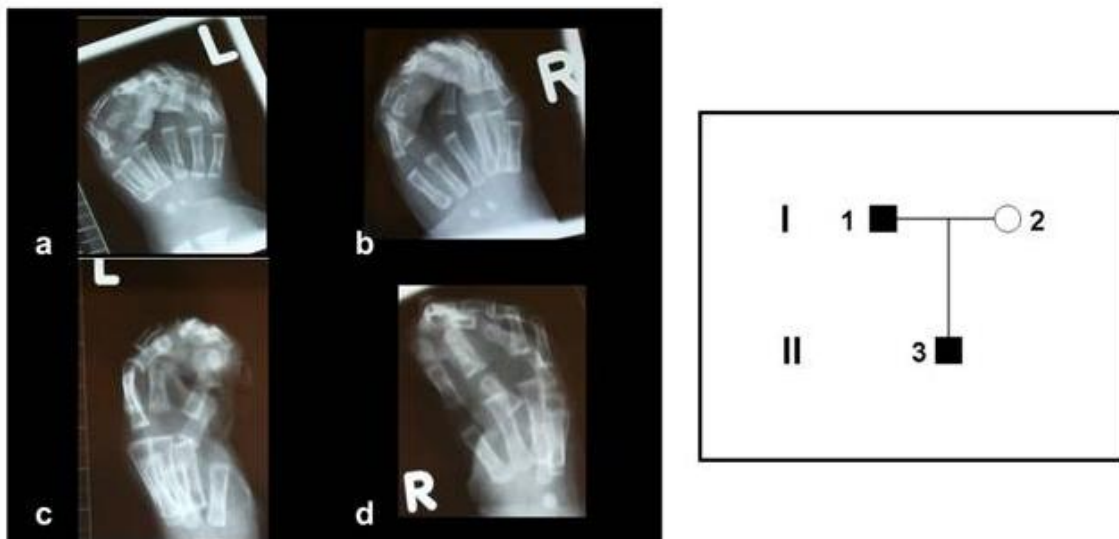
### 5.1 Untersuchung von Patienten auf Mikroduplikationen im *SHH*-Enhancer (ZRS)

In diesem Teilprojekt wurden drei Familien untersucht, deren phänotypisches Erscheinungsbild mit den derzeit beschriebenen SHH-Krankheitsbildern bzw. mit dem Laurin Sandrow-Syndrom (LSS) überlappende Merkmale aufwiesen. Mittels Array-CGH wurden diese Patienten auf Aberrationen im Genom untersucht und deren genetischer Defekt näher charakterisiert.

#### 5.1.1 Patientenkollektiv

Familie 1 zeigte eine vollständige Polysyndaktylie der Hände und Füße (vgl. Abbildung 15). Der Stammbaum dieser Familie ließ auf einen autosomal dominanten Vererbungsmodus schließen, wobei der Vater und dessen Sohn das Krankheitsbild aufzeigten, während die Mutter phänotypisch nicht betroffen war. Familie 2 bestand aus 13 Familienmitgliedern (vgl. Abbildung 16), wobei aus einer konsanguinen Ehe (III.7, III.8), deren männlicher Part betroffen war (III.7), zwei kranke Töchter (IV.9, IV.10) hervorgegangen sind. Die betroffenen Patienten zeigten eine ausgeprägte Form des klinischen Erscheinungsbildes Syndaktylie Typ IV (vgl. Abbildung 16: a, b, d), wobei eine Kombination dieses Phänotyps mit einer Spiegelpolydaktylie der Füße (Abbildung 16 c) einher ging.

Familie 1



**Abbildung 15 Röntgenaufnahmen und Stammbaum der Familie 1 mit einer vollständigen Polysyndaktylie der Hände und Füße.**

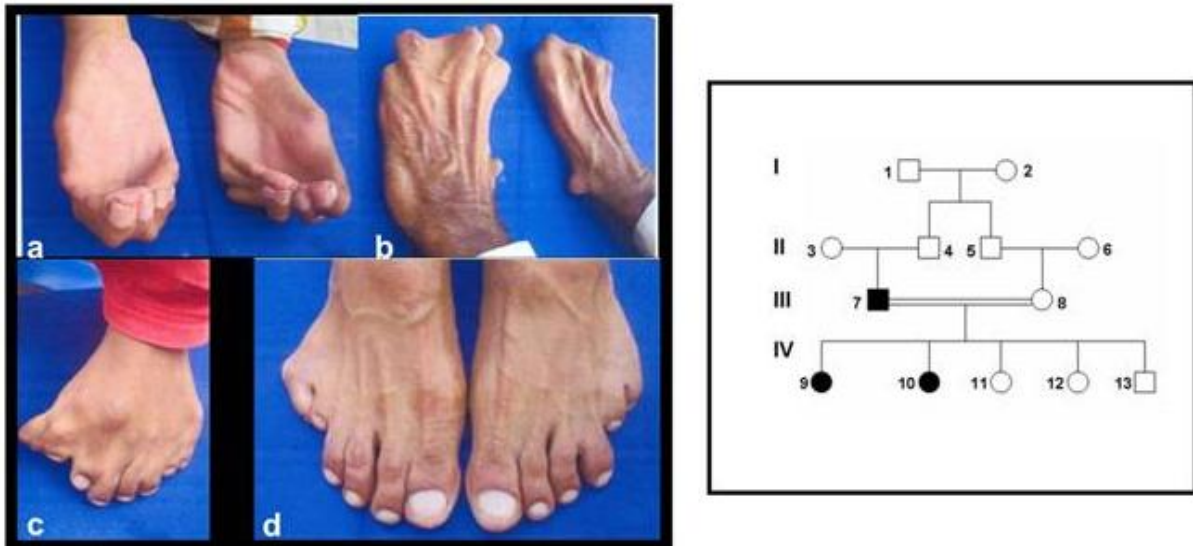
Röntgenbilder der Familie 1 (II.3) zeigten eine vollständige Polysyndaktylie der Hände und Füße (a-d), der Phänotyp wurde parental vererbt (I.1, II.3) und der Vererbungsmodus war autosomal dominant.

Familie 3, mit einem typischen LSS-Phänotyp, wurde bereits im Jahre 2005 von Kjaer et al. klinisch beschrieben und zeigte eine präaxiale Spiegelduplikation der Füße, eine vollständige Syndaktylie der



Finger sowie nasale Anomalien in Form einer verkürzten Kolumella (vgl. Abbildung 17 a, b, c, d). Die untersuchte Familie bestand aus sechs Familienmitgliedern, in dessen zweiter Generation es zu einer paternalen Vererbung (II.3) des klinischen Phänotyps auf den Sohn kam (III.6). Vater sowie Sohn zeigten nach der Geburt einen ähnlichen Schweregrad des Phänotyps. Die Syndaktylien wurden in beiden Patienten operativ korrigiert.

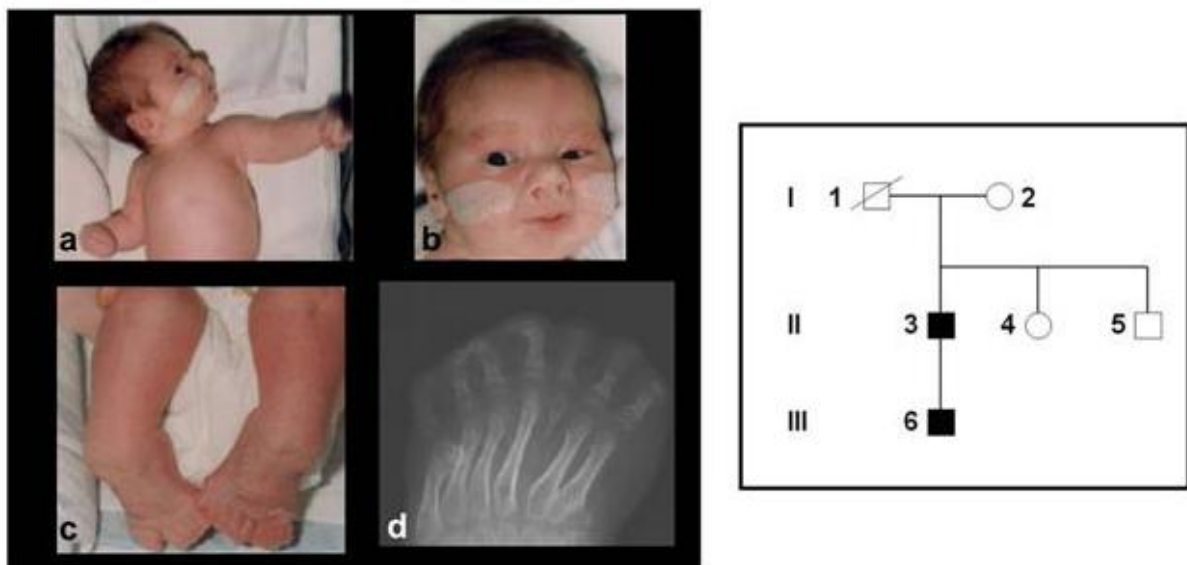
### Familie 2



**Abbildung 16** Klinische Bilder und Stammbaum der Familie 2 mit einer Polysyndaktylie der Hände und einer Spiegelpolydaktylie der Füße.

Familie 2 zeigte den Phänotyp einer Syndaktylie Typ IV (a, b, d) sowie eine Form der Spiegelpolydaktylie der Füße (c), die Vererbung des Phänotyps ist aus einer konsanguinen Ehe hervorgegangen (III.7/ 8 auf IV.9/ 10).

### Familie 3

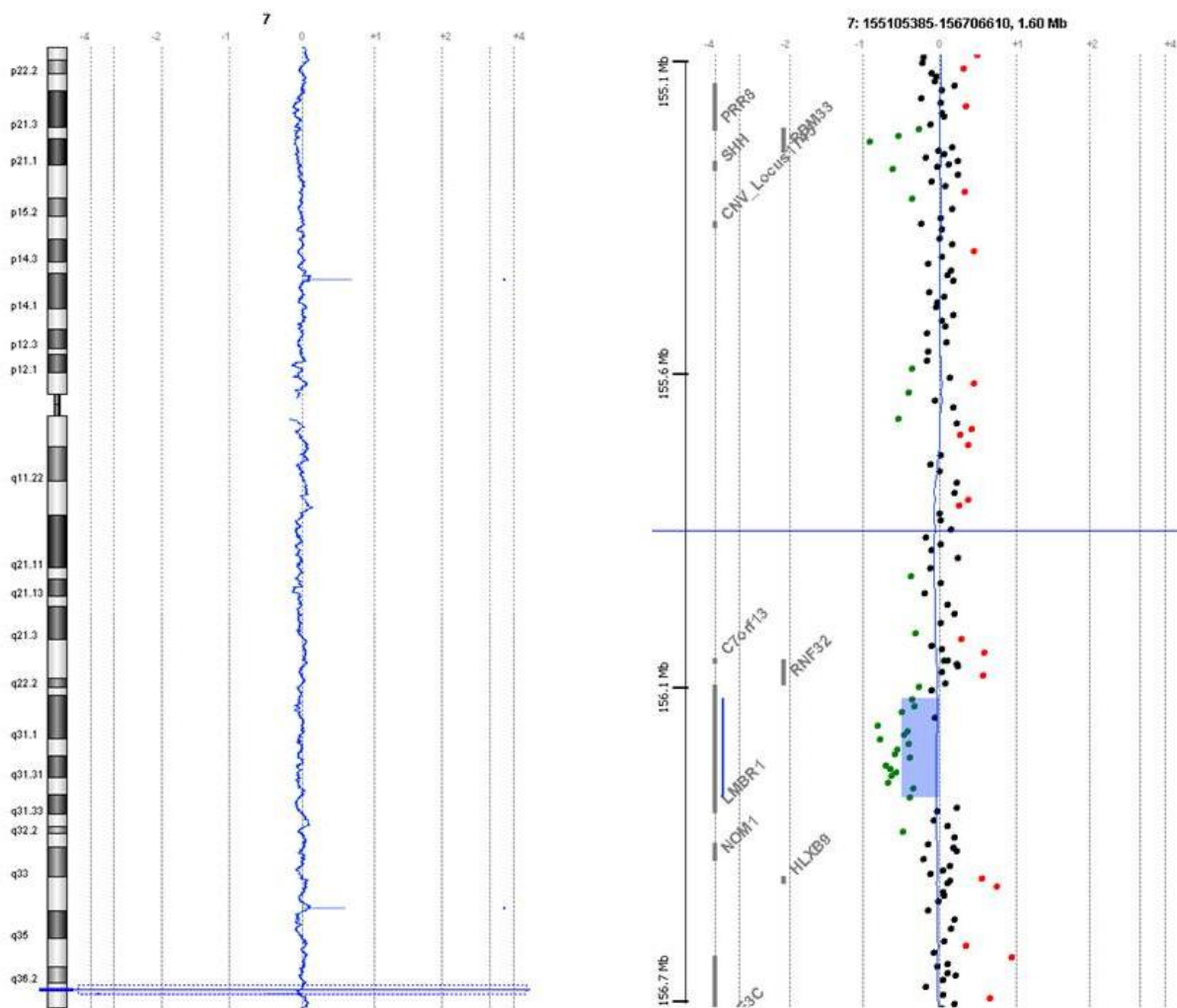


**Abbildung 17 Klinische Bilder und Stammbaum der Familie 3 mit einer vollständigen Syndaktylie der Hände und einer präaxialen Spiegelduplikation der Füße.**

Röntgenbild und klinische Fotos des Patienten III.6 mit dem Phänotyp des Laurin-Sandrow Syndroms zeigten eine vollständige Syndaktylie an den Händen (a), eine verkürzte Kolumella und hypoplastische Nasenflügel (b) und eine vollständige präaxiale Spiegelduplikation der Füße (c, d). Es handelte sich um eine paternale autosomal dominante Vererbung (II.3 auf III.6).

**5.1.2 Detektion von Mikroduplikationen innerhalb der ZRS-Region mittels Array-CGH**

Die erste genetische Charakterisierung erfolgte mittels Array-CGH (Familie 1: II, 3; Familie 2: IV, 10; Familie 3: II, 3) gegen eine weibliche Kontroll-DNA. Aufgrund von Literaturrecherchen und näherer Bestimmung des klinischen Phänotyps des Patientenkollektivs wurde eine Veränderung auf dem Chromosom 7q36 angenommen (verwendete Arrays vgl. Kapitel 4.1). Die Auswertung der Array-Analyse ergab bei allen betroffenen Patienten eine Mikroduplikation unterschiedlicher Größe auf dem Chromosom 7q36.3 (vgl. Abbildung 18).

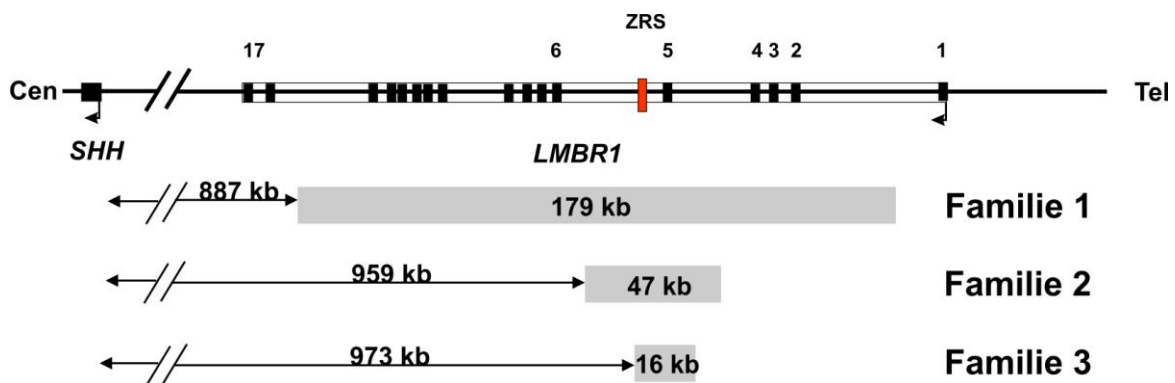


**Abbildung 18 Array-CGH-Profile für die chromosomale Region 7q36.3 der Familien 1 (II,3).**

Im distalen Bereich des langen Arms von Chromosom 7 ist eine Verschiebung des Profils nach links zu erkennen (linke Darstellung). Auf der rechten Darstellung ist eine Vergrößerung dieses Bereichs gezeigt. Der Patient der Familie (II,3) zeigt folglich einen Gewinn ( $\log_2\text{ratio} > 0.29$ ) auf dem Chromosom 7q36.3 an genetischem Material (blauer Balken). Dieser Patient weist eine Duplikation von 168kb (chr7: 156.188.585-156.357.323, hg18) auf, die innerhalb des *LMBR1*-Gens lokalisiert ist. Die Oligonukleotide auf dem 244K Array sind durch Punkte veranschaulicht ((Schwarz –  $\log_2\text{ratio}$  von -0.29 bis +0.29; grün –  $\log_2\text{ratio} > 0.29$ ; rot -  $\log_2\text{ratio} < -0.29$ ).

Die Array-CGH-Analyse der Patienten der Familie 1 mit einem 244K Array zeigte eine 168kb Mikroduplikation auf dem chromosomalen Abschnitt 7q36.3 (vgl. Abbildung 18). Die Oligonukleotiddichte dieser chromosomalen Region auf dem Array ermittelte in erster Annäherung die Aberrationsposition: chr7: 156.188.585-156.357.323. Für die Patienten der Familie 2, die mittels eines Custom Arrays für den *SHH* Locus analysiert worden sind, konnte eine Aberration für die Position chr7: 156.253.187-156.304.388 ermittelt werden. Die Probanden der Familie 3 wurden ebenfalls auf dem Custom Array untersucht und eine 18kb Mikroduplikation (chr7: 156.269.850-156.287.850) konnte detektiert werden.

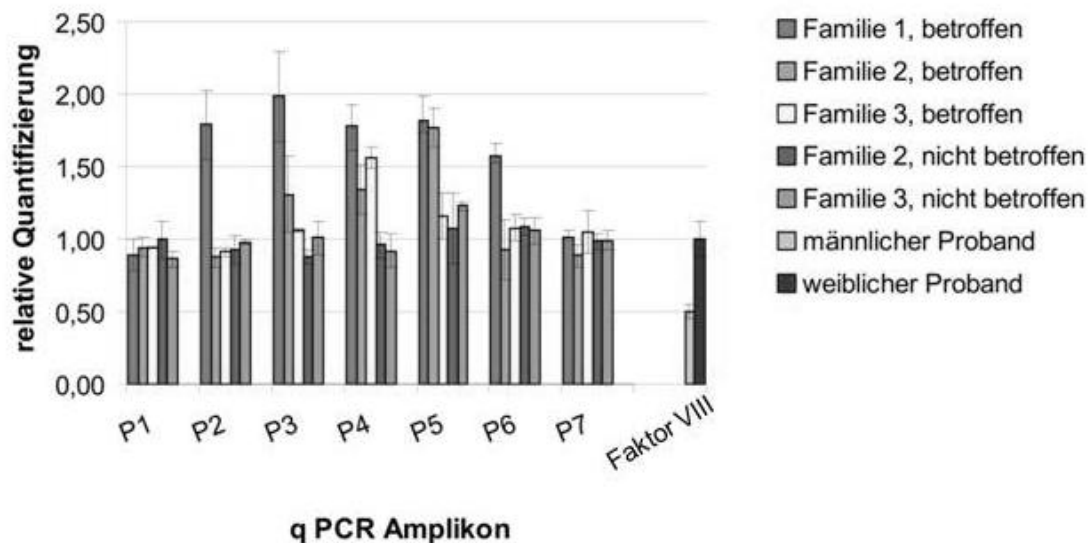
Diese Mikroduplikationen beinhalten alle den extremitätenspezifischen long-range-Enhancer von *SHH* (ZRS) sowie das Exon 5 des benachbarten *LMBR1*-Gens. Die duplizierte Region der Familie 1 enthielt zusätzlich noch die Exons 2 bis 15 des *LMBR1*-Gens. Die Distanzen der einzelnen Duplikationen zum *SHH* reichten von 887kb (Familie 1), 959kb (Familie 2) bis hin zu 973kb (Familie 3) (vgl. Abbildung 19).



**Abbildung 19 Schematische Darstellung von Mikroduplikationen bei drei Familien mit Synpolydaktylien der Hände, Spiegelpolydaktylien/-duplikationen der Füße auf dem Chromosom 7q36.3.**

Die Mikroduplikationen sind durch grau unterlegte Balken eingezeichnet, deren Distanz zum *SHH*-Gen ist durch waagerechte Doppelpfeile verdeutlicht. Die Aberrationsgrößen sind auf den grau unterlegten Balken notiert. Das *SHH*-Gen ist durch ein schwarzes Kästchen, das *LMBR1*-Gen durch ein nicht ausgefülltes Kästchen verdeutlicht, der Transkriptionsstart ist jeweils durch Pfeile gekennzeichnet. Exons sind durch schwarze Kästchen ohne Pfeilkennzeichnung dargestellt. Die ZRS-Region ist gelb markiert. P1 bis P7 markieren die Lage der Amplikons für die anschließend durchgeführte quantitative RT-PCR. Cen= Centromer, Tel= Telomer, ZRS= ZPA regulierende Sequenz.

Zur Verifizierung und weiteren Einengung der Bruchpunkte wurde eine quantitative RT-PCR (qRT-PCR, vgl. Kapitel 4.2) mit den betroffenen und gesunden Familienmitgliedern durchgeführt (vgl. Abbildung 20). Die Lage der verwendeten Amplikons ist der Abbildung 19 zu entnehmen.



**Abbildung 20** Quantitative RT-PCR Analyse (qRT-PCR) von betroffenen und gesunden Probanden der Familien 1 bis 3 zur näheren Charakterisierung der Aberrationsgröße der jeweiligen Mikroduplikationen auf dem Lokus 7q36.3.

Die Werte für die relative Quantifizierung (RQ) wurden unter der Verwendung der 7500 SDS Software ermittelt. Als Kalibrator wurde eine weibliche Kontroll-DNA verwendet. Ein RQ-Wert von ca. 1,5 zeigt eine zusätzliche Kopie des untersuchten chromosomalen Abschnitts an. Faktor VIII (Xq28) wurde zur Geschlechtsunterscheidung zwischen den Patienten verwendet.

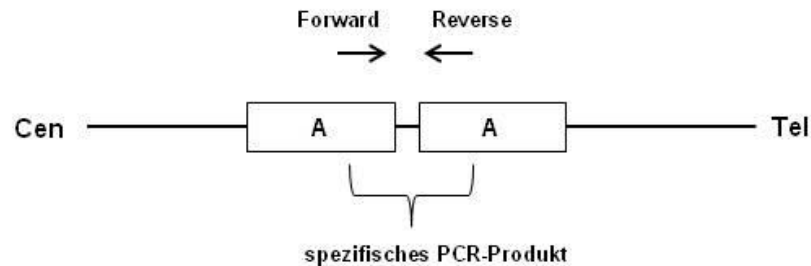
Die Auswahl der Primerpaare basierte auf den durch die Array-CGH ermittelten Duplikationsgrößen. Es wurden proximal sowie distal zur Aberration Primer ausgewählt (vgl. Anhang, Primer, Tabelle 3), die es erlaubten den duplizierten Bereich näher einzugrenzen. Die Amplikons P1 und P7 waren so gewählt, dass sie bei allen untersuchten Probanden außerhalb der duplizierten Region lagen und stellten somit Kontroll-Primer dar. Die Amplifikatmenge (relative Quantifizierung, RQ) für die Amplikons P2 bis P6 waren je nach untersuchtem Patienten normal (RQ-Wert: 1,0; wie Kalibrator) oder erhöht (RQ-Wert: 1,5). Bei den Patienten der Familie 1 zeigten die Amplikons P2 bis P6 einen RQ-Wert von 1,5, die betroffenen Patienten der Familie 2 für die Amplikons P3 bis P5 und die Patienten der Familie 3 lediglich für das Amplikons P4. Die klinisch nicht-betroffenen Familienangehörigen der unterschiedlichen Familien zeigten für die gesamte untersuchte Region 7q36.3 in der qRT-PCR normale RQ-Werte (RQ-Wert: 1,0).

### 5.1.3 Bruchpunktbestimmung der duplizierten Regionen

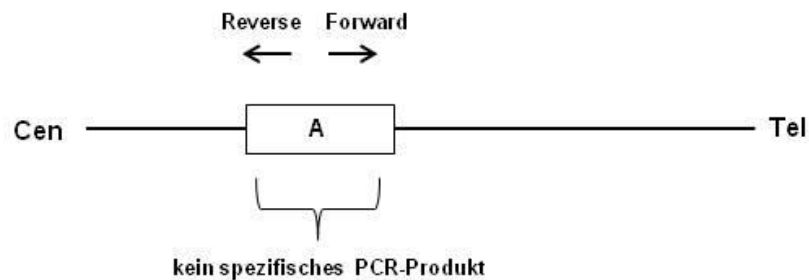
Mit der Bruchpunktbestimmung versucht man die genaue Lage der Bruchpunkte einer Aberration zu erfassen. Liegt z.B. eine Duplikation vor, kann nur bei dem Patienten mit der Aberration ein spezifisches Amplifikat erhalten werden (vgl. Abbildung 21). Der Abschnitt in der Kontroll-DNA zeigt

den duplizierten Bereich nicht auf, so dass kein spezifisches PCR-Produkt bekommen werden kann. Eine anschließende Sequenzierung gibt einen genauen Überblick über die Bruchpunkte der Aberration. Solch eine Bruchpunktbestimmung erlaubt Aussagen über den Mechanismus der Deletions- bzw. Duplikationsentstehung.

a) Patient mit einer Duplikation



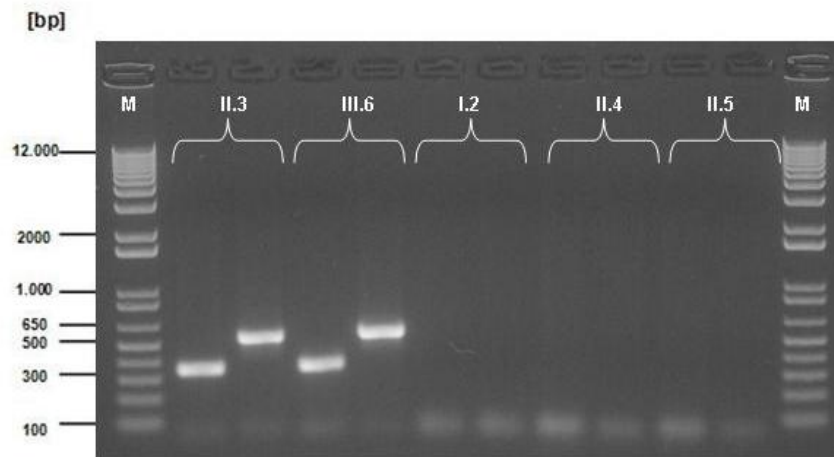
b) Kontroll-DNA



**Abbildung 21 Exemplarisches Beispiel einer Bruchpunktbestimmung bei einem Patienten mit einer Duplikation in Tandemorientierung.**

a) Patient mit einer Duplikation in Tandemorientierung zeigt, unter der Verwendung von gegenläufigen Primern, ein spezifisches PCR-Produkt; b) Kontroll-DNA ohne eine Duplikation innerhalb der zu untersuchenden Region zeigt, unter der Verwendung der gleichen Primer wie in a), kein PCR-Produkt. Primer sind als waagerechte Pfeile gekennzeichnet; Cen= Centromer, Tel= Telomer.

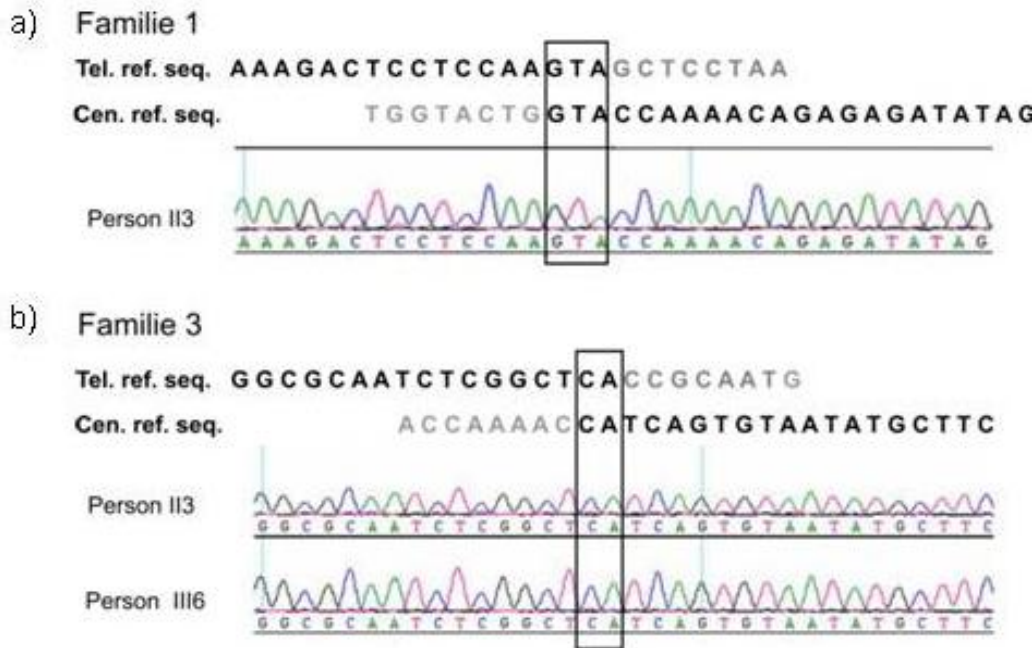
Durch die qRT-PCR konnte die Größe der duplizierten Regionen näher eingegrenzt werden, so dass der Bruchpunkt bei den Familien 1 und 3 durch Sequenzierung (vgl. Kapitel 4.3.2) bestimmt werden konnte (vgl. Abbildung 22, Abbildung 23). Die Bruchpunktbestimmung wurde sowohl mit den betroffenen als auch mit den gesunden Familienmitgliedern, bei denen kein PCR-Produkt entstehen konnte, durchgeführt.



**Abbildung 22 Detektion der Bruchpunkte mittels PCR bei Familie 3 mit Laurin-Sandrow Syndrom.**

Unter der Verwendung von gegenläufigen Primern, die am distalen Anfang und Ende der Aberration lagen, konnte ein spezifisches PCR-Produkt von 349 und 547 bp bei den betroffenen Patienten (II.3; III.6) erhalten werden. Die nicht betroffenen Familienmitglieder zeigten kein PCR-Produkt (I.2; II.4; II.5). M= Größenstandard.

Durch die gezielte Auswahl von Primerpaaren kann die Organisation einer Duplikation im genomischen Kontext festgestellt werden. Unter der Hypothese, dass eine direkte Tandemorganisation des duplizierten Bereichs in den Patientenkollektiv vorliegt, wurden ein Forward-Primer im distalen und ein Reverse-Primer im proximalen Duplikationsbereich gewählt. Unter der Verwendung von verschiedenen Primerkombinationen (vgl. Anhang, Primer, Tabelle 4) konnte ein spezifisches PCR-Produkt von 349 und 547bp bei den betroffenen Patienten der Familie 3 erhalten werden, d.h. es liegt eine direkt Tandemorganisation vor. Die gesunden Patienten zeigten erwartungsgemäß kein Produkt. Die erhaltenen PCR-Produkte der Familie 1 und der Familie 3 wurden anschließend sequenziert (vgl. Kapitel 4.3.2), um die genaue Bruchpunktsequenz zu bestimmen (vgl. Abbildung 23).



**Abbildung 23 Bruchpunktbestimmung via Sequenzanalyse von betroffenen Patienten mit einer Mikroduplikation auf dem Chromosom 7q36.3.**

Für die Familie 1 (a) und für die Familie 2 (b) wurde eine Bruchpunktbestimmung durchgeführt. Unter der Verwendung spezifischer Primerpaare (vgl. Primertabelle Tabelle 4) konnte für beide Familien eine Tandemduplikation detektiert werden. Die Mikrohomologien an den Bruchpunkten sind durch schwarze Kästchen eingerahmt. Familie 1 (a) zeigt eine Mikrohomologie von drei Nukleotiden (GTA), Familie 2 weist eine Mikrohomologie von zwei Nukleotiden auf (CA). Zum Detektieren des Bruchpunkts wurden die telomerische und die centromer Referenzsequenz der chromosomalen Region 7q36.3 verwendet (a) chr7: 156.184.648-156.363.777, b) chr7: 156.270.869-156.287.512, hg18).

Es konnten bei der Familie 1 und 3 Mikrohomologien am Bruchpunkt detektiert werden, die vermutlich zu der Entstehung der Duplikation auf dem chromosomalen Abschnitt 7q36.3 geführt haben: Bei Familie 1 eine Mikrohomologie von drei Nukleotiden (GTA, Position chr7: 156.184.648-156.363.777; Duplikationsgröße 179kb) und bei Familie 3 eine Homologie von zwei Nukleotiden (CA, Position chr7: 156.270.869-156.287.512, Duplikationsgröße 16kb). Die Sequenzierung bestätigte die Tandemorientierung der Aberrationen (Abbildung 23). Für die Familie 2 konnte der Bruchpunkt nicht bestimmt werden. Die Lage der Aberration konnte jedoch auf folgende Region minimiert werden: chr7: 156.256.617-156.303.393 (47kb) (Übersicht vgl. Abbildung 19).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der LSS-Phänotyp (Familie 3) und die anderen Extremitätenfehlbildungen der Familien 1 und 2 mit Mikroduplikationen des *SHH*-Enhancers innerhalb der chromosomalen Region 7q36.3 assoziiert sind.



## 5.2 Untersuchung von Patienten mit einem klinischen Phänotyp der Syndaktylie in Kombination mit sagittaler Kraniosynostose auf strukturelle Veränderungen im Genom

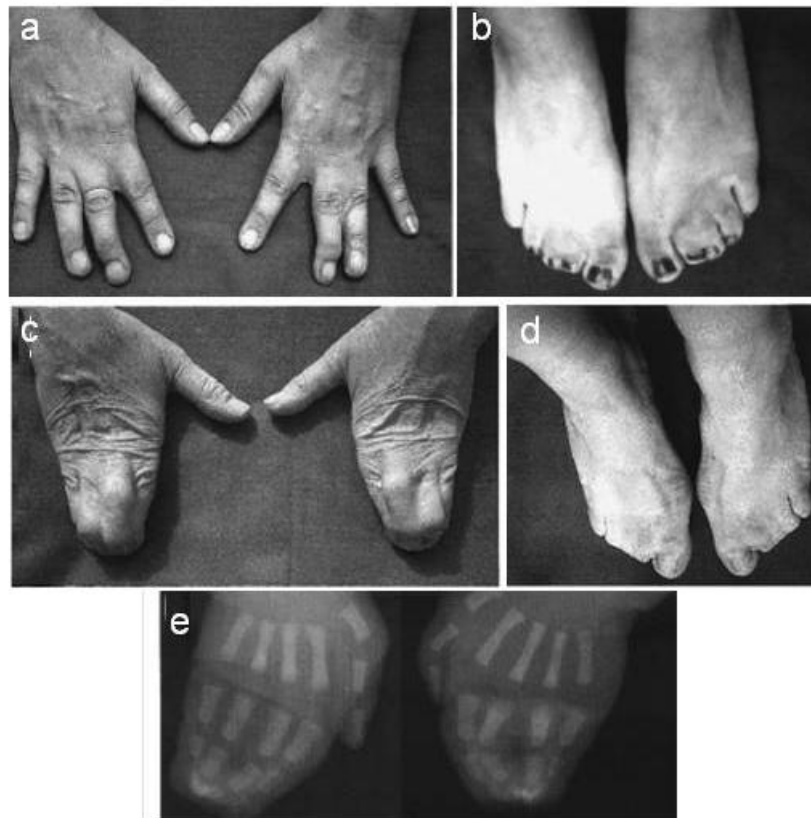
In diesem Teilprojekt wurden Patienten mit dem Phänotyp der Syndaktylie Typ 1 (SD1, MIM 185900) und Kraniosynostose Philadelphia Typ (MIM 601222) mittels Array-CGH untersucht, um genomische Aberrationen nachzuweisen. Die Ergebnisse wurden anschließend im Tiermodell näher analysiert.

### 5.2.1 Patientenkollektiv

Es wurden drei Familien (Familie 1, 2, 3) untersucht, die kutane und teilweise distale ossäre Syndaktylien der Hände und/ oder Füße und Kraniosynostose Philadelphia Typ als klinischen Phänotyp aufwiesen.

SD1 ist eine autosomal dominante Erkrankung der Extremitäten, wobei es in der klassischen Form zu einer Verwachsung zwischen dem dritten und vierten Finger und/ oder dem zweiten mit dem dritten Zeh kommt. Das phänotypische Erscheinungsbild ist sehr variabel und kann auch mehrere Finger und/ oder Zehen bis hin zur kompletten Syndaktylie II-V betreffen. Die Probanden der ersten Familie zeigten Syndaktylien vom Typ 1 und wurden im Jahre 1938 (Lueken et al.) zum ersten Mal klinisch näher beschrieben. Im Jahre 2000 konnten Bosse et al. mittels Kopplungsanalysen den genetischen Locus in dieser Familie mit kutaner SD1 auf die chromosomale Region 2q34-2q36 kartieren. Die untersuchte Familie bestand aus 77 betroffenen Patienten aus acht Generationen (vgl. Abbildung 62, Anhang). Alle Probanden zeigten eine kutane Syndaktylie der Hände und/ oder Füße, wobei eine variable Expressivität zu beobachten war (vgl. Abbildung 24).

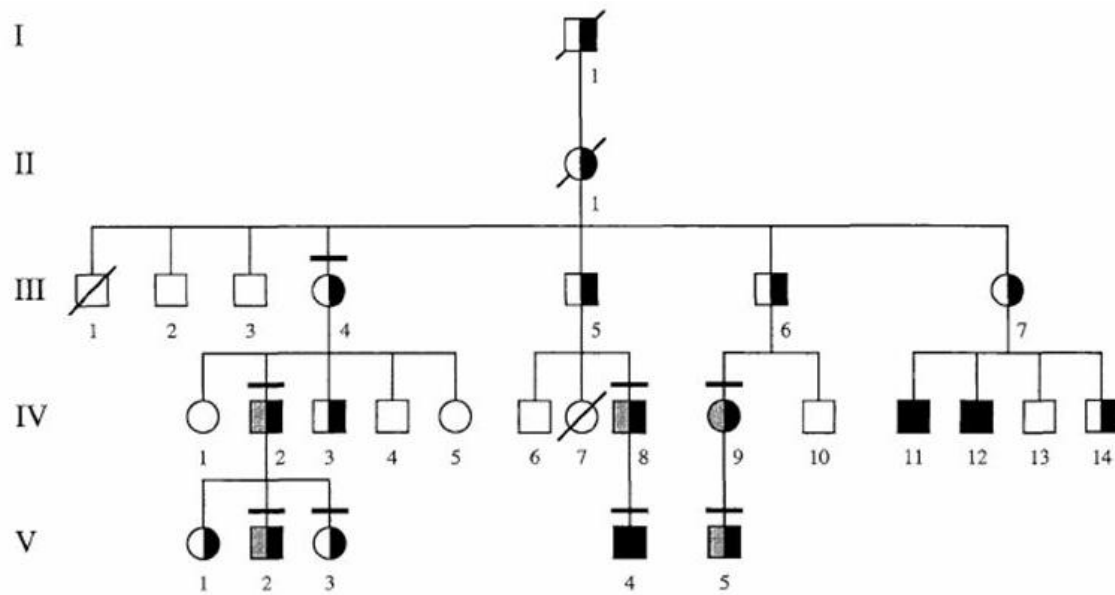




**Abbildung 24 Phänotyp der Familie 1 mit Syndaktylie Typ 1.**

a,b) Patient VII,11: Die Hände zeigten eine kutane Syndaktylie des dritten und vierten Fingers (linke Hand stärker als rechts), die Füße wiesen eine komplette kutane Syndaktylie zwischen dem zweiten und dritten Zeh sowie eine abgeschwächte Form der Syndaktylie zwischen dem dritten und vierten Zeh auf; c, d) Patient VI,2: Beide Hände und Füßen zeigten eine komplette kutane Syndaktylie zwischen dem zweiten und dem fünften Finger bzw. ersten Zeh bis vierten Zeh; e) Röntgenaufnahme der Hände des Patienten VII,2 kurz nach der Geburt. Die distalen Phalangen des dritten, vierten und fünften Fingers wiesen in beiden Händen eine Synostose auf (nach Bosse et al. 2000).

Die zweite untersuchte Familie (5 Generationen, vgl. Stammbaum in Abbildung 25) mit dem klinischen Phänotyp Kraniosynostose Philadelphia Typ wurde erstmals 1996 von Robin et al beschrieben.

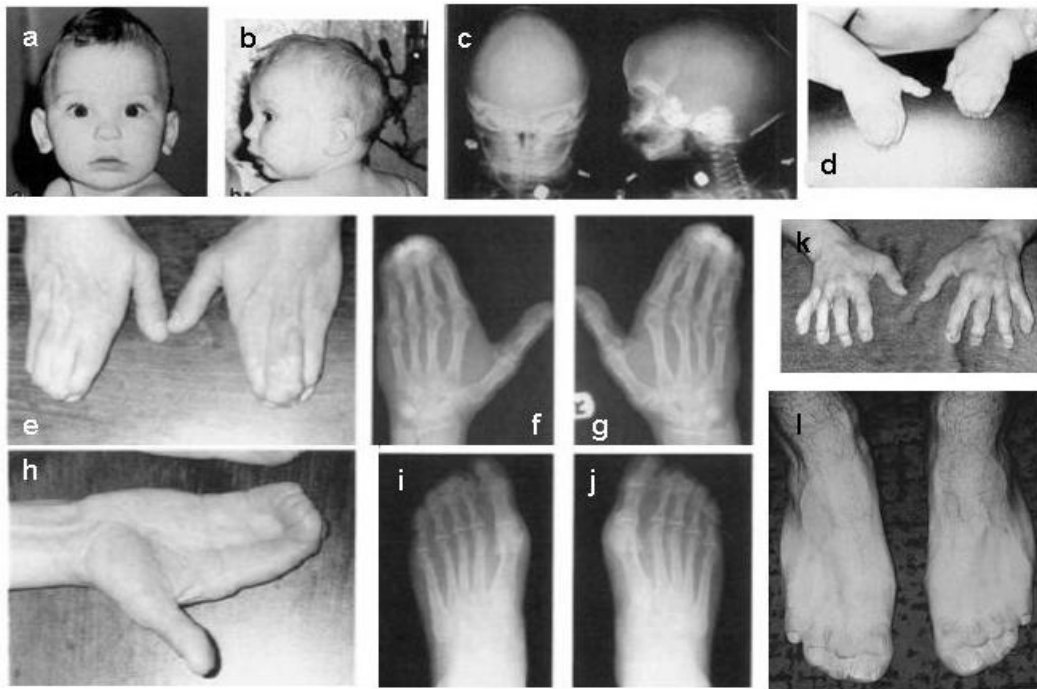


**Abbildung 25 Stammbaum der Familie 2 mit Kraniosynostose Philadelphia Typ und kutaner/ossärer Syndaktylie der Finger und Zehe.**

Ein ausgefülltes Symbol steht für eine Syndaktylie der Finger und Zehen in Kombination mit sagittaler Kraniosynostose; halb ausgefüllte Symbole stehen für Syndaktylie der Finger und Zehe; Schwarz/grau schattierte Symbole für eine Syndaktylie der Finger und Zehen mit Dolichocephalie (nach Robin et al. 1996).

Einige Familienmitglieder zeigten Kraniosynostose Philadelphia Typ in Kombination mit einer kompletten kutanen Syndaktylie der Finger II bis V und der Zehen I bis V. In manchen Fällen war distal in den Händen und Füßen eine ossäre Syndaktylie festzustellen. Des weiteren zeigten die Patienten eine Fusion einzelner Finger-/ Zehennägel (Synonychia) (vgl. Abbildung 26). Das Vererbungsmuster entsprach einem autosomal dominanten Erbgang mit variabler Expressivität (vgl. Abbildung 25).

Dieser klinische Phänotyp kann zu den Acrocephalosyndaktylie Syndromen (ACS) gezählt werden, die den klinischen Phänotyp der Kraniosynostose in Kombination mit Extremitätenfehlbildungen vereinigen.

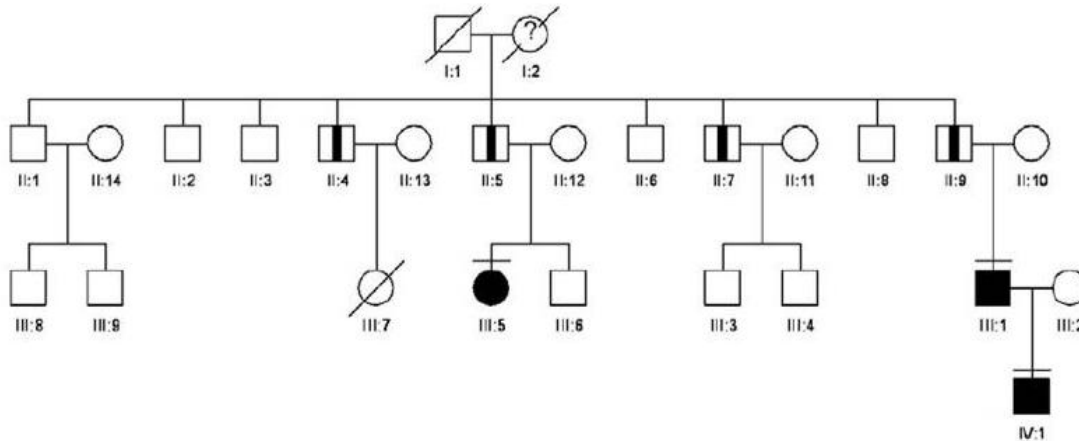


**Abbildung 26** Klinische Bilder und Röntgenaufnahmen der Familie 2 mit Kraniosynostose Philadelphia Typ mit einer kutanen und ossären Syndaktylie der Finger und Zehen.

a-d) Patient V,4 im Alter von 11 Monaten mit Kraniosynostose, durch eine verfrühte Verknöcherung der sagittalen Schädelnähte; d) vollständige kutane Syndaktylie der Finger II bis V, mit Fusion der Fingernägel (Synonychia); e-j) Patient III,4 mit einer kutanen und einer ossären Syndaktylie der Endphalangen der Finger 2 bis 5 (e-h), Füße zeigten eine Fusion der Zehen II und III (i, j); k, l) Hände und Füße von Patient IV,8 (Vater von V,4), k) Hände nach OP, zuvor bestand eine Fusion der Finger II bis V mit Synonychia der Fingernägel III/IV; l) vollständige Syndaktylie der Zehen II bis V, mit Fusion der Zehennägel I bis IV (nach Robin et al. 1996).

Kennzeichnend für die Kraniosynostose Philadelphia Typ ist die verfrühte Verknöcherung der sagittalen Schädelnähte, mit einem verstärkten Längen-, aber einem minimierten Breitenwachstum des Schädels (Dolichocephalie), faziale Auffälligkeiten oder mentale Retardierungen sind dabei nicht bekannt. Auch bei den untersuchten Probanden konnten keine fazialen Veränderungen oder mentale Retardierung festgestellt werden. Im Jahre 2008 (Jain et al.) konnte mittels Kopplungsanalysen in der Familie 2 eine Lokus-Homogenität zwischen dem klinischen Phänotyp der SD1 und der Kraniosynostose Philadelphia Typ festgestellt werden (Kopplungsintervall: 2q34-q36).

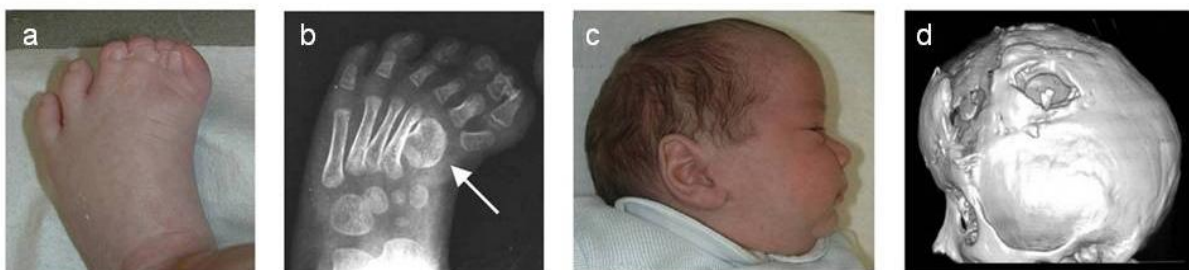
In der Familie 3 (vgl. Stammbaum in Abbildung 27) war eine kutane und distale ossäre Syndaktylie hauptsächlich an den Füße sowie eine Kraniosynostose der sagittalen Schädelnähte vorherrschend (vgl. Abbildung 28).



**Abbildung 27 Stammbaum der Familie 3 mit kutaner/ossärer Syndaktylie und Kraniosynostose.**

Symbole mit einem senkrechten Balken stehen für Probanden mit Syndaktylie, ausgefüllte Symbole markieren den klinischen Phänotyp der Syndaktylie in Kombination mit einer Kraniosynostose. Insgesamt besteht die Familie aus 3 Generationen und 26 Familienmitgliedern (nach Klopocki et al. 2010).

Eine betroffene Person (IV, 1) zeigte den klinischen Phänotyp einer präaxialen Polydaktylie (vgl. Abbildung 28a, b). Der Schweregrad des klinischen Erscheinungsbildes variierte zwischen den einzelnen Probanden. Die Patientin III, 5 zeigte die schwerste Kraniosynostose-Form, d.h. eine Synostose aller Schädelnähte, bekannt als Kleeblattschädel (vgl. Abbildung 28d)

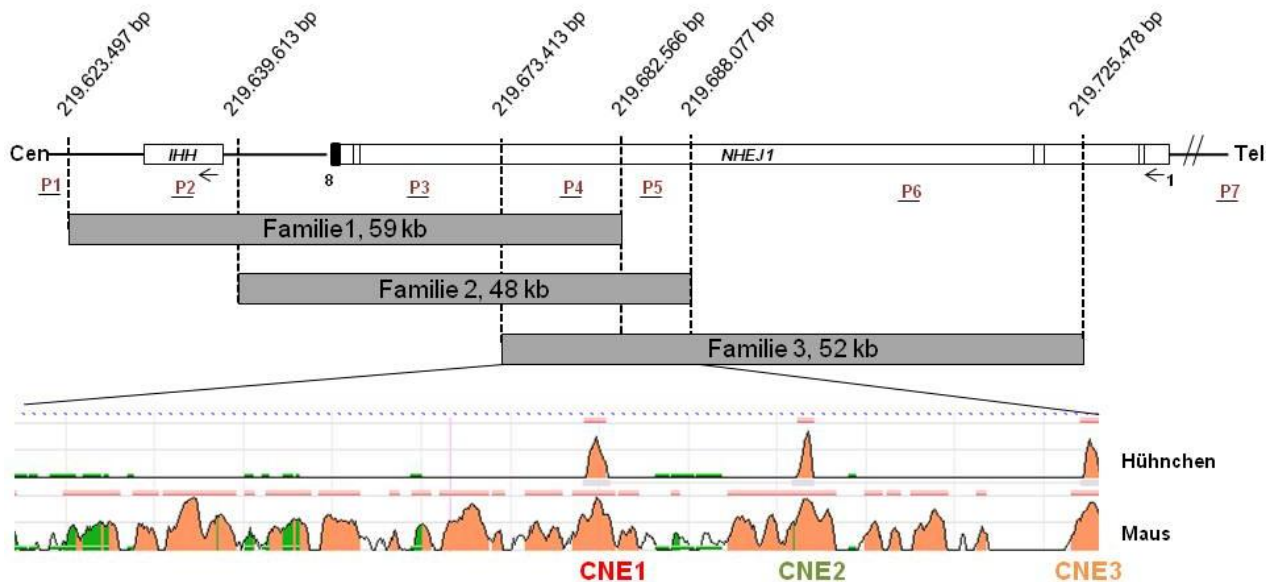


**Abbildung 28 Klinischer Phänotyp der Familie 3 mit kutaner und ossärer Syndaktylie der Füße und sagittaler Kraniosynostose.**

a) Präaxiale Synpolydaktylie der Füße (IV, 1); b) Röntgenaufnahme einer präaxialen Polydaktylie mit einer abnormalen Formgebung des ersten Mittelfußknochens (IV, 1, Pfeil); c) Dolichocephalie, entstanden durch eine verfrühte Verknöcherung der sagittalen Schädelnähte (IV, 1); d) Dreidimensionale CT-Aufnahme: Synostose aller Schädelnähte (Patient III 5) (nach Klopocki et al. 2010).

### 5.2.2 Untersuchung des Patientenkollektivs mittels Array-CGH

Um den genetischen Defekt der Familien 1 bis 3 näher zu charakterisieren wurde Array-CGH durchgeführt (vgl. Kapitel 4.1). Es konnten bei den betroffenen Patienten Duplikationen verschiedener Größen und Lage auf dem Chromosom 2q35 detektiert werden (vgl. Abbildung 29).



**Abbildung 29** Schematische Abbildung der detektierten Duplikationen der Familien 1 bis 3 und Überblick über die Lage konservierter Nukleotidabschnitte innerhalb der Überlappungsbereiche.

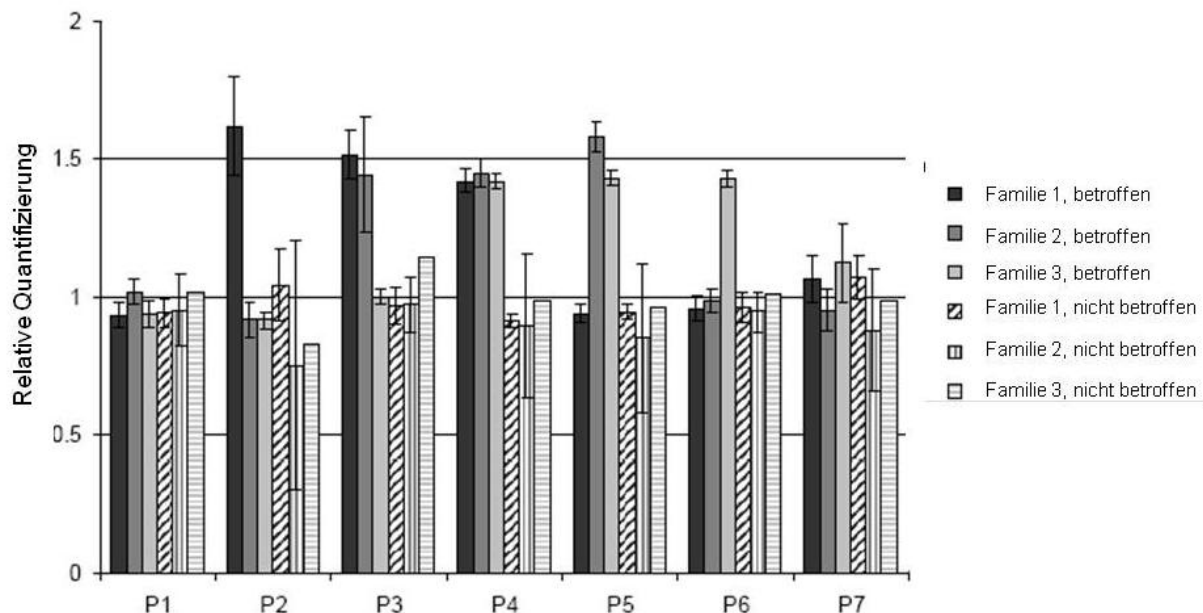
Die duplizierten Regionen der Familien 1 bis 3 sind grau unterlegt. Die genomischen Positionen der Duplikationen sind oberhalb der Abbildung notiert (hg18) und durch senkrecht gestrichelte Linien verdeutlicht. Das Gen *NHEJ1* ist mit seinen acht Exons (senkrechte schwarze Balken) schematisch dargestellt, der Transkriptionsstart ist durch einen waagerechten Pfeil gekennzeichnet.

Für die überlappende Region sind die in Maus und Hühnchen konservierten nicht codierenden Bereiche (CNE1 bis CNE3) abgebildet (ECR Browser-Version 32). Grün- transponal, orange- intronische Regionen. Die Lage der verwendeten Amplikons für die anschließend durchgeführte qRT-PCR ist durch Zahlen gekennzeichnet (P1 bis P7); Cen= Centromer, Tel= Telomer.

Familie 1 wies eine Duplikation von 59kb auf (chr2: 219.623.497-219.682.566), die das gesamte *IHH*-Gen, den kompletten 5' gelegenen nicht-kodierenden Bereich sowie einen Teil des telomerwärts benachbarten Gens *NHEJ1* beinhaltete. Eine 48kb Duplikation zeigten die betroffenen Individuen der Familie 2 (chr2: 219.639.613-219.688.077). Diese Aberration überlappte mit der gefundenen Aberration der Familie 1 um 42kb. Die Patienten der Familie 3 zeigten ebenfalls eine Duplikation im Bereich des Chromosoms 2q35 (chr2: 219.673.413-219.725.478, 52kb), die mit den Duplikationen der Familie 1 und Familie 2 teilweise überlappte (Überlappungsbereich 9,1kb: chr2: 219.673.413-219.688.077).

### 5.2.3 Bestätigung der Duplikationen mittels qRT-PCR

Um die Kosegregation des klinischen Phänotyps mit den gefundenen Duplikationen zu verifizieren, wurden qRT-PCR-Analysen (vgl. Kapitel 4.2) mit betroffenen und nicht-betroffenen Familienmitgliedern durchgeführt (vgl. Abbildung 30).



**Abbildung 30 qRT-PCR Ergebnisse für die genomische Region 2q35 mit betroffenen und nicht betroffenen Familienmitgliedern der Familien 1 bis 3.**

Bei den klinisch betroffenen Individuen bestätigte die qRT-PCR die Ergebnisse der Array-CGH, d.h. eine erhöhte Kopienzahl am *IHH* Locus (RQ~ 1,5). Die Amplikons P1 und P7 liegen außerhalb der mit Array-CGH detektierten Mikroduplikationen und zeigen sowohl bei betroffenen als auch nicht betroffenen aus den drei Familien eine normale Kopienzahl (RQ= 1). Die Amplikons P2 bis P6 differenzieren zwischen den verschiedenen Duplikationsgrößen: Familie 1 zeigt erhöhte Kopienzahl für P2-P4, Familie 2 P3-P5 und Familie 3 P4-P6 (vgl. Abbildung 29).

Da die Array-CGH und qRT-PCR Analysen keine Aussage über die genaue Lage und Orientierung der Duplikationen erlaubten, wurde eine Amplifikation von Bruchpunktüberspannenden Fragmenten mit anschließender Sequenzierung durchgeführt (vgl. Kapitel 4.3.2). Die Mikroduplikationen lagen in allen drei Familien in direkter Tandemorientierung am *IHH*-Locus vor (Daten nicht gezeigt).

### 5.2.4 *In silico* Analyse des Überlappungsbereiches der betroffenen Patienten mit SD1 und Kraniosynostose Philadelphia Typ

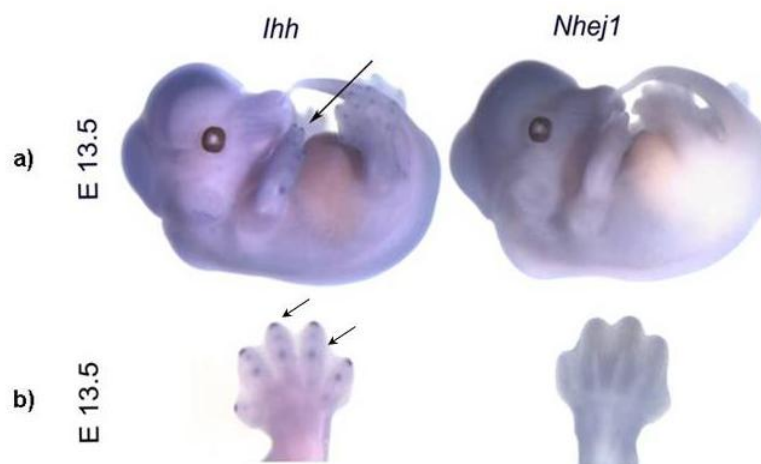
Die duplizierten Regionen der drei Familien wurden auf konservierte Regionen untersucht (ECR-Browser 32, Evolutionary Conservation Regions of genomes, vgl. Abbildung 29). Im überlappenden Bereich zwischen allen drei Familien (chr2: 219.673.413-219.682.566, 9,1kb) konnte ein konservierter Abschnitt identifiziert werden (conserved noncoding element, CNE1, vgl. Abbildung 29), der eine ca.

75%ige Konformität zwischen dem humanen, Maus- und Hühnchen-Genom zeigte. Dieser Bereich war 245bp groß und wies einen GC-Gehalt von 44,9% auf. Die kritische Region für die Familien 2 und 3 (chr2: 219.682.566-219.688.077, 5,5kb) beinhaltete darüber hinaus zwei weitere hoch konservierte Regionen (CNE2, CNE3, vgl. Abbildung 29) mit einem ca. 80% Konservierungsgrad. Diese Bereiche waren jeweils ~200bp groß mit einem GC-Gehalt im Mittel von 46,5%. Bei den konservierten Bereichen handelte es sich um nicht codierende Sequenzabschnitte, die alle innerhalb des Introns 5 des *NHEJ1*-Gens lokalisiert waren. Die CNEs lagen 48kb (CNE1), 51kb (CNE2) bzw. 54kb (CNE3) stromaufwärts des *IHH*-Gens.

### 5.2.5 Nähere Charakterisierung des *NHEJ1*-Gens mittels WISH

Die detektierten Duplikationen umfassten Teile des *NHEJ1*-Gens (MIM 611290; Nonhomologous end-joining factor 1), das stromaufwärts von *IHH* befindlich ist. Um die Expression des Gens während der endochondralen Ossifikation näher zu charakterisieren, wurden WISH-Analysen (vgl. Kapitel 4.5.1 und 4.5.1.1) zu unterschiedlichen embryonalen Entwicklungsstadien (E12.5-E15.5) durchgeführt (exemplarisch, vgl. Abbildung 31). *NHEJ1* zeigte kein spezifisches Signale an den Extremitäten bzw. der Wachstumszone der Knochen (vgl. Abbildung 31 a, b, rechts).

Im Vergleich zu *Nhej1*, zeigt *Ihh* eine distinkte Expression in den Extremitäten (vgl. Abbildung 31 a, b, links). Es kann eine Expression von *Ihh* in den kondensierenden Bereichen der Phalangen und an den distalen Enden der Fingerglieder detektiert werden (Pfeile in Abbildung 31).



**Abbildung 31 Vergleich der Expression von *Ihh* und *Nhej1* (Stadium E 13.5).**

a) gesamten Embryo; b) Vorderextremität (Pfeile kennzeichnen die Expression von *Ihh* innerhalb der Fingergliedern).

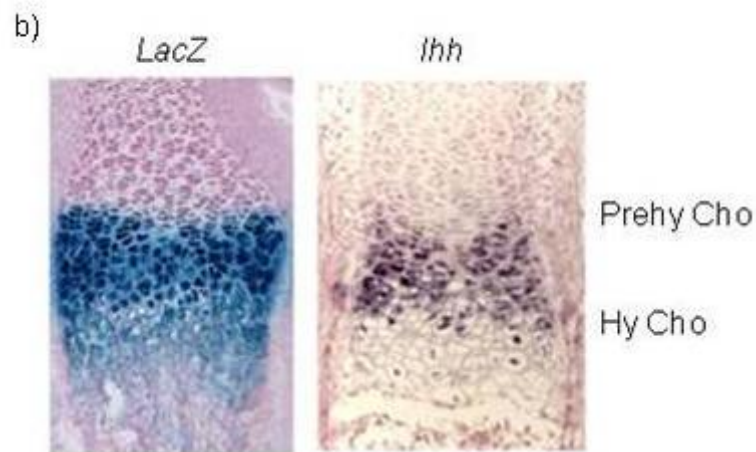
### 5.2.6 Untersuchung der CNEs am *IHH*-Lokus auf Enhancer-Aktivität

Die Überlappungsbereiche zwischen den Duplikationen in den drei Familien beinhalteten hochkonservierte nicht kodierende Sequenzabschnitte (vgl. Kapitel 5.2.2, CNE1 bis CNE3). Um die funktionellen Eigenschaften dieser CNEs näher zu charakterisieren, wurde die orthologe Sequenz aus dem murinen Genom (chr1: 74.940.512-74.946.807bp, ca. 6,2kb, mm8) amplifiziert (Konstruktbezeichnung: K1) und in einen *LacZ*-Reporter-Vektor (pSfi-Hsp68-*LacZ*-Vektor) kloniert, um transgene Mäuse zu generieren (vgl. Kapitel 4.3.2 und 4.4, Primer vgl. Anhang Tabelle 5).

Die transgenen Mäuse mit Integration des Konstrukts K1 wurden auf die Enhancer-Eigenschaft des eingebrachten Sequenzabschnitts überprüft, d.h. die Aktivität des *LacZ*-Gens wurde mittels X-Gal Färbung visualisiert (vgl. Kapitel 4.5.6, Abbildung 32a). Vergleichend zu den X-Gal-Färbungen wurden *WISH* und *in situ* Hybridisierungen auf Paraffinschnitte (vgl. Kapitel 4.5.1.1 und 4.5.1.2, Primer vgl. Anhang Tabelle 5) für die Gene *Ihh* und *Ptc1* herangezogen (vgl. Abbildung 32b) um das *LacZ*-Färbungsmuster mit dem wildtypischen Expressionsmuster dieser beiden Gene vergleichen zu können.







**Abbildung 32** Expressionsmuster von *LacZ* in transgenen Mäuse verschiedener embryonaler Stadien (E 13.5, E15.5 und E 17.5).

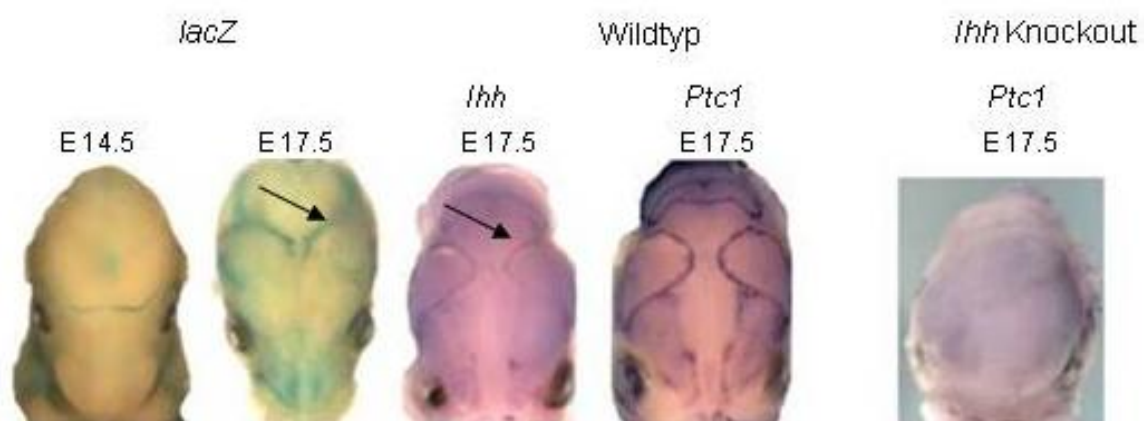
a) *LacZ*-Färbungsmuster ganzer Embryonen mit detaillierter Analyse der Extremitäten; b) Longitudinale Schnitte der langen Röhrenknochen transgener Mäuse (*LacZ*) und Wildtyp-Embryonen (E 17.5) mit anschließender *in situ* auf das Transkript *Ihh*: prehy Cho= prähypertrophe Chondrozyten, Hy Cho= hypertrophe Chondrozyten.

Eine X-Gal-Färbung war ab dem Embryonalstadium E 13.5 in den mesenchymalen Kondensationsregionen des Humerus und des Femurs sowie den distalen Fingergliedern detektierbar (Pfeile in Abbildung 32a) und verstärkte sich in den späteren Entwicklungsstadien (E 15.5, E17.5). Die transgenen Mäuse rekapitulierten das *Ihh*-Transkriptionsmuster in den prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten (vgl. Abbildung 32b). Um die Färbung der transgenen Mäuse näher zu charakterisieren, wurden longitudinale Schnitte der Extremitäten von transgenen Mäusen und zum Vergleich von Wildtyp-Embryonen (E 15.5) angefertigt und *in situ* Hybridisierungen zum Nachweis der *Ihh* und *Ptc1* Expression durchgeführt (vgl. Kapitel 4.5.1.2 und 4.5.2). Der Transmembranrezeptor *Ptc1* interagiert direkt mit den Hedgehog-Proteinen, wodurch die Signaltransduktion in Gang gebracht wird. Die *LacZ*-Färbungen in den transgenen Embryonen überlappten mit den Expressionsmustern von *Ihh* und seinem Rezeptor *Ptc1* und waren in den Wachstumsfugen der langen Knochen nachweisbar (vgl. Abbildung 33).



**Abbildung 33 Vergleich der Expressionsmuster von *LacZ* in transgenen Mäusen zur Expression von *Ihh* und *Ptc1* im Wildtyp (longitudinal Paraffinschnitte der Vorderextremität) im Stadium E 15.5.**

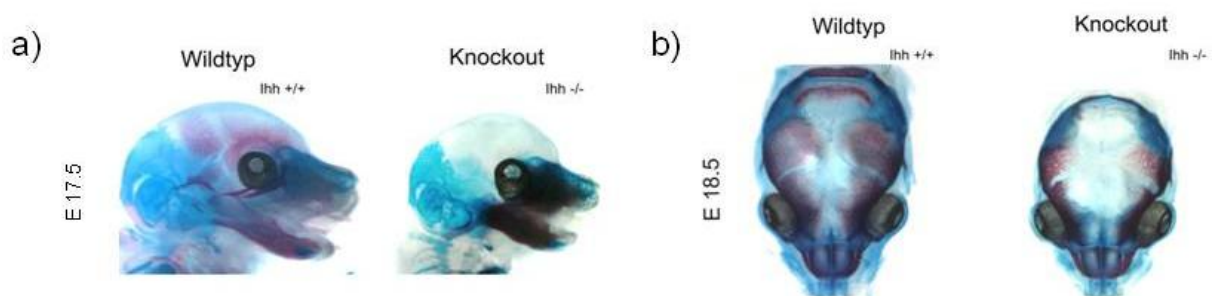
Eine nähere Betrachtung der Schädel verschiedener Embryonalstadien zeigte auch Reporterexpression in den sich entwickelnden Schädelnähten an (vgl. Abbildung 34). Während der frühen Schädelformierung (E 14.5) konnten primär Anfärbungen der Frontalnähte (Stirnschädelnähte) beobachtet werden, in den späteren Entwicklungsstadien waren auch die Kranznaht, Sagittalnaht und Lambdanaht intensiv angefärbt.



**Abbildung 34 Reporterexpression (transgene Embryonen) im Vergleich zu *Ihh* und *Ptc1* Expression im Wildtyp und *Ihh*-Knockout Embryo in Schädeln der Embryonalstadien E 14.5, E 17.5.**

Um die Beteiligung von *Ihh* während der Schädelentwicklung und der Schädelnahtformierung zu untersuchen, wurde dessen Expression sowie die Expression des direkten Zielgens *Ptc1* in Kalvarien von Wildtyp-Embryonen und *Ihh*-Knockout-Embryonen (E 17.5) analysiert (vgl. Abbildung 34). Für *Ihh* sowie *Ptc1* konnten Signale in den sich entwickelnden kranialen Schädelnähten detektiert werden. Das Expressionsprofil von *Ihh* war im Gegensatz zu *Ptc1* schwächer. Es zeigte sich eine Überlappung der *LacZ*-Signale mit den detektierten *Ihh*- und *Ptc1*-WISH-Signalen (s Pfeil, Abbildung 34) in den Kranznähten. Die Analyse der Schädel von *Ihh*-Knockout-Embryonen zeigte keine Expression von *Ptc1* in den Schädelnähten (vgl. Abbildung 34, rechts). Allgemein war bei den *Ihh*-Knockout-

Embryonen eine atypisch Schädelform zu beobachten: Der Schädel war insgesamt verkleinert, instabil und zeigte eine eher runde Form. Skelettpräparationen von Schädeln von *Ihh*-Knockout- und WT-Embryonen (E 17.5, E 18.5) bestätigen eine verzögerte Initiation der kranialen Ossifikation bei den *Ihh*-Knockout-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp (vgl. Abbildung 35). Anhand der Alcian Blau und Alizarin Rot Färbungsmuster ließ sich erkennen, dass diese Schädel noch kein kalzifizierendes Knochengewebe im E 17.5 aufzeigten (reduzierte Alizarin Rot Färbung, vgl. Abbildung 35a). Erst im Embryonalstadium E 18.5 kam es zur Bildung von Knochenmaterial entlang der Kranznaht sowie im Bereich des Stirnbeins und des Scheitelbeins (vgl. Abbildung 35b). Die Knochensubstanz an den Lambdanähten sowie entlang der Sagittalnaht war im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert.



**Abbildung 35** Schädel von Wildtyp- und *Ihh*-Knockout-Mäusen im Embryonalstadium E 17.5 (a, lateral) und E 18.5 (b, Aufsicht).

Alcian Blau und Alizarin Rot Färbung zum Nachweis von Knorpel- bzw. Knochen.

Die Array-CGH Untersuchung von Patienten mit Syndaktylie der Hände und/ oder Füße in Kombination mit sagittaler Kraniosynostose wies Mikroduplikationen auf dem chromosomalen Lokus 2q35 nach. Es konnte ein Überlappungsbereich von 9,1kb 5' von *IHH* detektiert werden. Die Untersuchung dieses chromosomalen Abschnitts mit hochkonservierter Region mittels eines *LacZ*-Reporter-Vektors zeigte eine Rekapitulation des *Ihh*-Expressionsmusters innerhalb der Wachstumsfugen der Knochen und an den Schädelnähten.

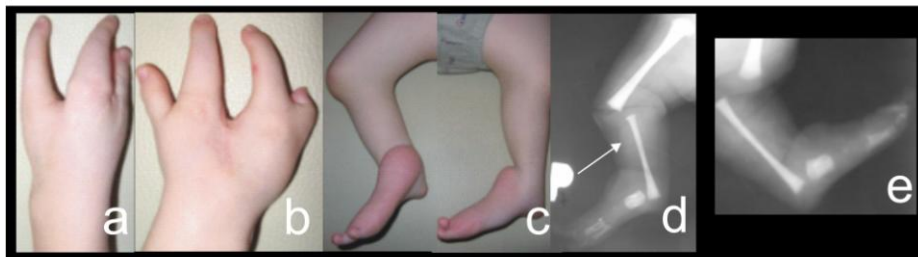
### 5.3 Untersuchung von Patienten mit dem klinischen Phänotyp der Ektrodaktylie und Tibia Hemimelie (SHFLD) auf strukturelle Veränderungen im Genom

In diesem Teilprojekt wurden 17 Familien mit dem klinischen Phänotyp der Ektrodaktylie und teilweiser Beteiligung der Tibia (Tibia Hemimelie) auf genomische Aberrationen mittels Microarray-CGH untersucht. Im Anschluß wurden die Ergebnisse in weiteren *in vivo* und *in vitro* Analysen analysiert.

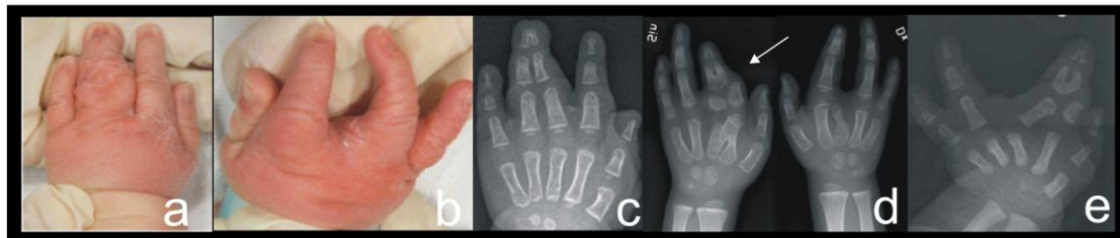
### 5.4 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden 17 Familien mit einem unterschiedlich stark ausgeprägten Phänotyp von SHFM/SHFLD untersucht. In Abbildung 36 ist exemplarisch der klinische Phänotyp der Familie 3 und der Familie 9 dargestellt. Das Patientenkollektiv zeigte eine sehr unterschiedliche Expressivität hinsichtlich des klinischen Phänotyps, vgl. Tabelle 2 im Anhang.

#### Familie 3



#### Familie 9



**Abbildung 36** Klinische Bilder und Röntgenaufnahmen der Familie 3 und Familie 9 mit einem SHFM/SHFLD-Phänotyp.

Der Patient der Familie 3 zeigte den klinischen Phänotyp der SHFLD (Bilder a bis e).

a, b) Ektrodaktylie beider Hände, hervorgerufen durch das Fehlen der mittleren Fingerglieder (Finger III) einschließlich des entsprechenden Mittelhandknochens (Metacarpal III); Beine im Fußgelenkbereich disloziert; c) Tibia Aplasie (Pfeil, Röntgenbild d, e), Füße zeigten ebenfalls ein Fehlen der mittleren Fußstrahlen.

Die Familie 9 zeigte nur in den Händen den Phänotyp der Ektrodaktylie (Bilder a bis e). a) unterschiedlicher Schweregrad der Ektrodaktylie: ossäre und kutane Syndaktylien (Bilder a und c : kutane Syndaktylie der Phalangen I der Finger III und IV sowie eine ossäre Syndaktylie der gleichen Finger der Phalangen III; d) kutane und ossäre Syndaktylie der Finger II und III (Pfeilkennzeichnung, linke Hand); b) und d) (rechte Hand) zeigen einen vollständigen Verlust der Fingergliedern des dritten

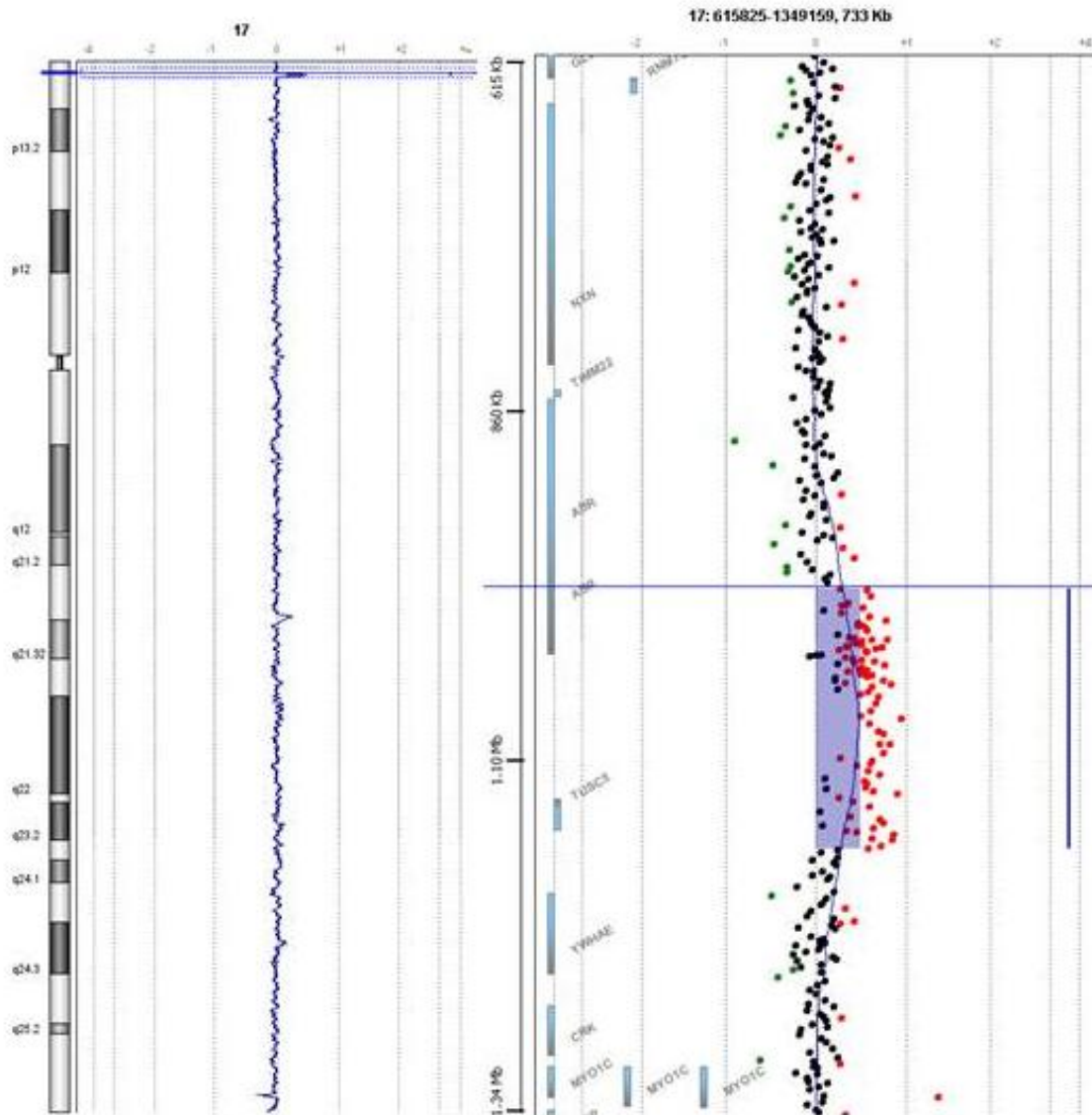
Fingers (Verlust der Phalangen I bis III). Das Röntgenbild e zeigt eine össäre und kutane Verwachsung des zweiten mit dem dritten Finger.

Familie 3 bestand aus insgesamt drei Familienmitgliedern. Der Stammbaum spricht für eine autosomal dominante Vererbung (vgl. Anhang, Stammbaum, Abbildung 63). Der Sohn zeigte eine starke Expressivität des Phänotyps: Beide Hände und Füße waren von der Ektrodaktylie betroffen. Die Hände sowie die Füße zeigten eine Aplasie der mittleren Strahlen. Des weiteren waren in beiden Beinen tibiale Defekte vorhanden (Tibia Hemimelie). Die betroffenen Patienten der Familie 9 zeigten den Phänotyp der SHFM. Die Hände wiesen einen unterschiedlichen Schweregrad der Ektrodaktylie auf, wobei eine ossäre und kutane Syndaktylie teilweise existent war (Beispiel: vgl. Pfeil in Abbildung 36). Die Füße bzw. die Knochen der Beine waren nicht betroffen.

Die klinischen Merkmale der übrigen Indexpatienten der untersuchten Familien sind der Tabelle 2 (vgl. Anhang) zu entnehmen.

### 5.5 **Microarray-CGH von Patienten mit einem SHFM/ SHFLD-Phänotyp**

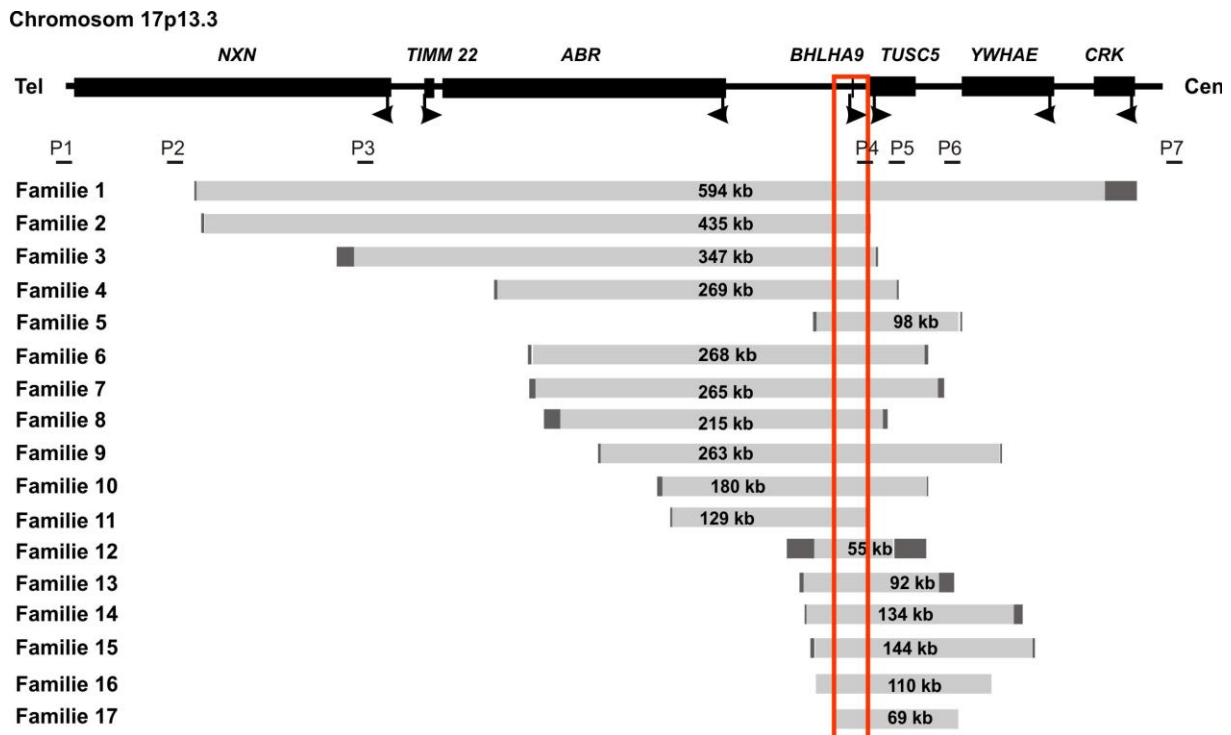
Die Indexpatienten der 17 Familien wurden mittels Microarray-CGH auf genomische Kopienzahlveränderungen im Genom untersucht (Material und Methode vgl. Kapitel 4.1). Abbildung 37 zeigt exemplarisch das Array-CGH Profil von Chromosom 17 für den Index-Patient der Familie 10.



**Abbildung 37** Array-CGH-Profil für das Chromosom 17 des Indexpatienten der Familie 10.

Im distalen Bereich des kurzen Arms von Chromosom 17 ist eine Verschiebung des Profils nach rechts zu erkennen (linke Darstellung). Auf der rechten Darstellung ist eine Vergrößerung dieses Bereichs gezeigt. Der Indexpatient der Familie 10 zeigt folglich einen Gewinn ( $\log_2\text{ratio} > 0.29$ ) auf dem Chromosom 17p13.3 (blauer Balken). Es handelt sich um eine Duplikation von 180kb (chr17:984489-1163727, hg18), die die Gene *ABR* (partiell), *BHLHA9* und *TUSC5* beinhaltet. Die Oligonukleotide auf dem 1M-Array sind durch Punkte veranschaulicht (Schwarz –  $\log_2\text{ratio}$  von  $-0.29$  bis  $+0.29$ ; rot –  $\log_2\text{ratio} > 0.29$ ; grün -  $\log_2\text{ratio} < -0.29$ ).

Bei allen Indexpatienten konnten Duplikationen auf dem Chromosom 17p13.3 nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 38 und Tabelle 2).

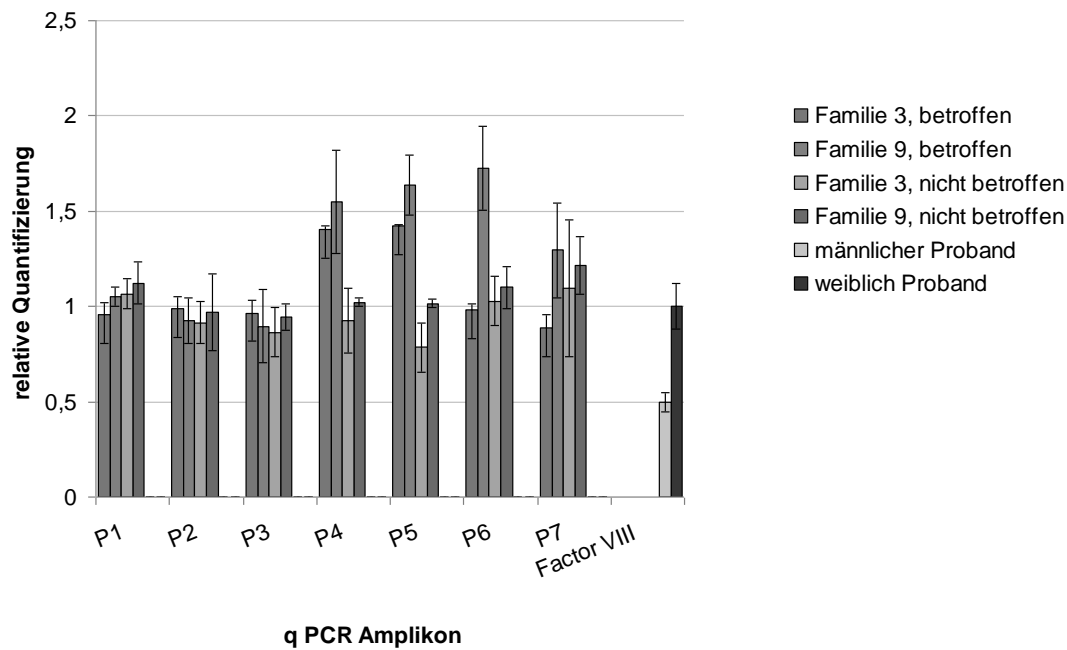


**Abbildung 38 Schematische Darstellung der gefundenen Duplikationen auf dem Chromosom 17p13.3 bei 17 Familien mit SHFM/SHFLD-Phänotyp.**

Die Familien wiesen Mikroduplikationen unterschiedlicher Größe auf, die in einem kritischen Bereich überlappten (roter Kasten). Die Duplikationen (minimale Duplikationsgröße) sind durch hellgrau unterlegte Balken eingezeichnet, dunkelgraue Balken stellen die maximale Duplikationsgröße dar. Der Transkriptionsstart und –richtung der Gene ist jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet. P1 bis P7 markieren die Lage der Amplikons für die anschließend durchgeführte quantitative qRT-PCR; Cen= Centromer, Tel= Telomer.

Die Duplikationen variierten innerhalb der verschiedenen Familien stark und wiesen Größen von 55 bis 594kb auf. Mittels qRT-PCR (vgl. Kapitel 4.2) wurden die Duplikationen der Indexpatienten verifiziert und in ihrer Größe eingengt (exemplarische Darstellung vgl. Abbildung 39). Auch die Familienangehörigen der Indexpatienten wurden mittels qRT-PCR auf eventuelle genomische Strukturveränderungen untersucht. Die Ergebnisse der qRT-PCR aller Familien sind in der Tabelle 2 (Anhang) aufgelistet. Die qRT-PCR bestätigte bei allen betroffenen Patienten (Merkmalsträger) sowie bei einigen Familienmitgliedern, die keinen Phänotyp zeigten (Überträger), eine Mikroduplikation unterschiedlicher Größe auf dem Chromosom 17p13.3.



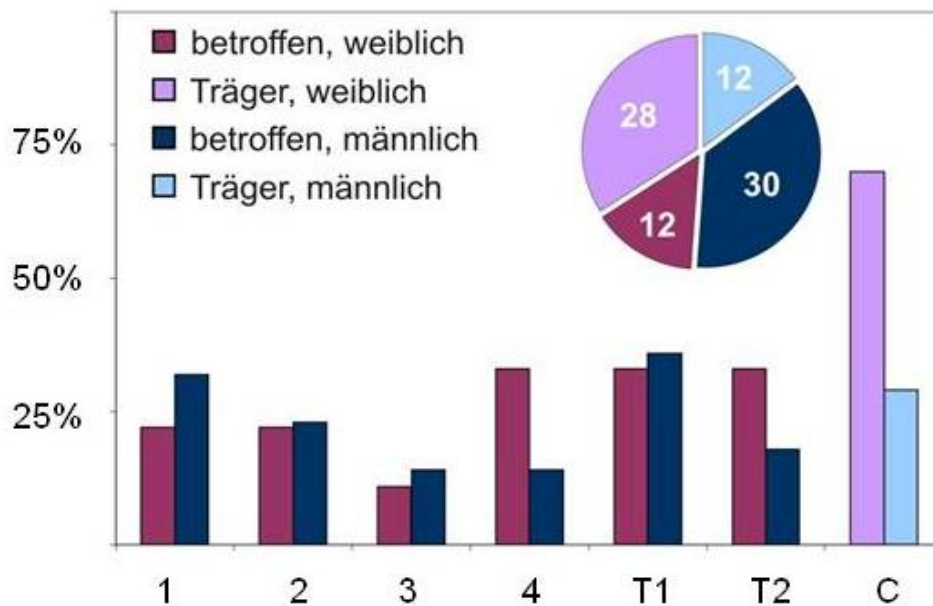


**Abbildung 39** Quantitativen qRT-PCR Analyse von betroffenen und gesunden Probanden der Familien 3 und 9.

Es wurden betroffenen und nicht betroffene Patienten der Familien 3 und 9 wurden auf Duplikation auf dem Locus 17p13.3 überprüft. Die qRT-PCR bestätigte die Duplikation ( $RQ > 1,5$ ) in den klinisch betroffenen Patienten und erlaubte die nähere Charakterisierung der Aberrationsgröße der jeweiligen Mikroduplikationen auf dem Locus 17p13.3. Die betroffenen Patienten der Familie 3 zeigten eine kleiner Duplikation (olivgrün, Amplikon P4, P5 dupliziert), im Vergleich zu den betroffenen Patienten der Familie 9 (grün, Amplikons P4 bis P6 dupliziert). Die nicht betroffenen Patienten beider Familien zeigten keine Duplikationen auf diesem Locus ( $RQ = 1,0$ ). Die Lage der Amplikons ist der Abbildung 38 und der Tabelle 8 (Anhang) zu entnehmen. Die RQ-Werte wurden unter der Verwendung der 7500SDS Software ermittelt. Als Kalibrator wurde eine weibliche Kontroll-DNA verwendet. Faktor VIII wurde zur Geschlechtsunterscheidung zwischen den Patienten verwendet.

Anhand der Array- und der qRT-PCR-Ergebnisse konnte der Vererbungsmodus der verschiedenen Patienten nachvollzogen werden (vgl. Anhang, Stammbäume, Abbildung 63). Eine Mikroduplikation auf 17p13.3 konnte insgesamt bei 40 nicht-betroffenen (Überträger) und 42 betroffenen Probanden (Merkmalsträger) nachgewiesen werden. 15 % der weiblichen Probanden, welche eine Duplikation auf 17p13.3 zeigten, waren von dem klinischen Phänotyp der Ektrodaktylie betroffen. Bei den männlichen Patienten mit einer 17p13.3 Duplikation trat in 36% der Fälle der SHFM/ SHFLD-Phänotyp auf (vgl. Abbildung 40, Kuchendiagramm). Bei den weiblichen Probanden zeigte sich eine starke Präferenz für die Betroffenheit von allen vier Gliedmaßen sowie waren beidseitige (bilaterale) tibiale Defekten häufiger bei ihnen zu beobachten. Bei den männlichen betroffenen Patienten war meist nur eine Extremität betroffen und eher unilaterale tibiale Defekte vorherrschend (vgl. Abbildung 40, Balkendiagramm). Es konnten mehr als 60% weibliche nicht betroffene Merkmalsträger auffindig gemacht werden.





**Abbildung 40** Verteilung der 17p13.3 Duplikationen zwischen den weiblichen und männlichen Probanden der 17 untersuchten Familien.

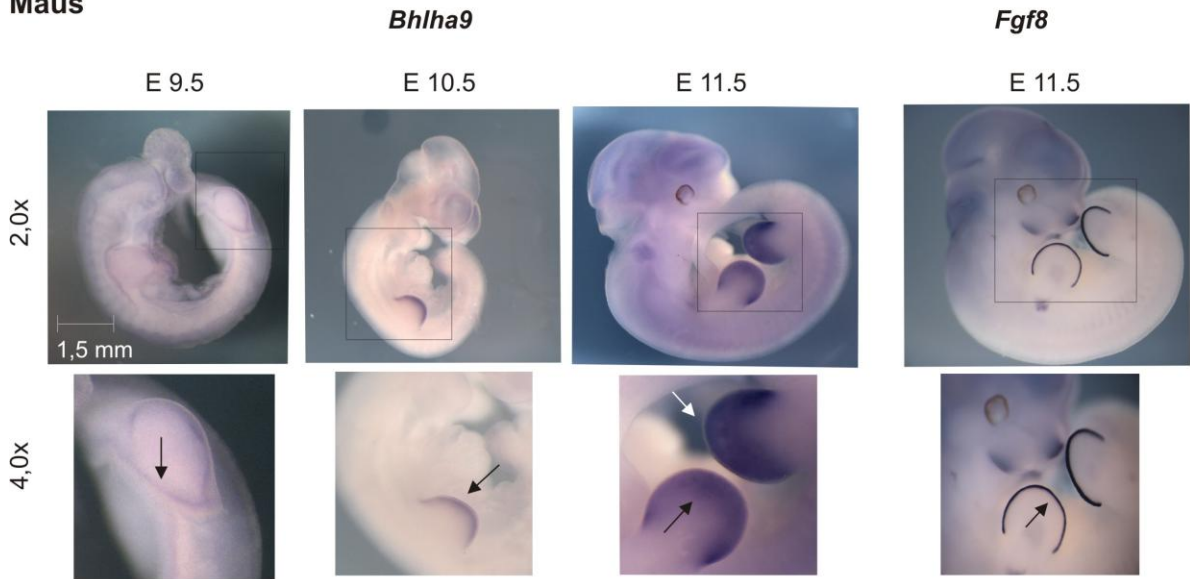
Das obere Diagramm zeigt die Geschlechterverteilung der 17p13.3-Duplikation, wobei zwischen betroffenen und klinisch nicht betroffenen Duplikationsträgern unterschieden wird (Indexpatienten mit Familienangehörigen, n= 82). Das Balkendiagramm zeigt die klinische Ausprägung der betroffenen Patienten (n= 31, 16 Familien), unterteilt nach Geschlecht und Betroffenheitsgrad der Extremitäten. Die Zahlen 1 bis 4 repräsentieren die Anzahl an betroffenen Extremitäten, für Tibia Hemimelie wird unterschieden in T1 (einseitig) und T2 (beidseitig). C repräsentiert die gesamte Verteilung der nicht-betroffenen Merkmalsträger (Überträger) zwischen den Geschlechtern.

Ausgehend von allen detektierten Duplikationen konnte eine kritische Region (Überlappungsbereich aller Duplikationen) ausfindig gemacht werden, die das Gen *BHLHA9* beinhaltet (vgl. Abbildung 38, roter Kasten). Das Gen *BHLHA9* (ID 727857) transkribiert für einen potenziellen Transkriptionsfaktor, der bisher in seiner Funktionalität noch nicht näher untersucht wurde.

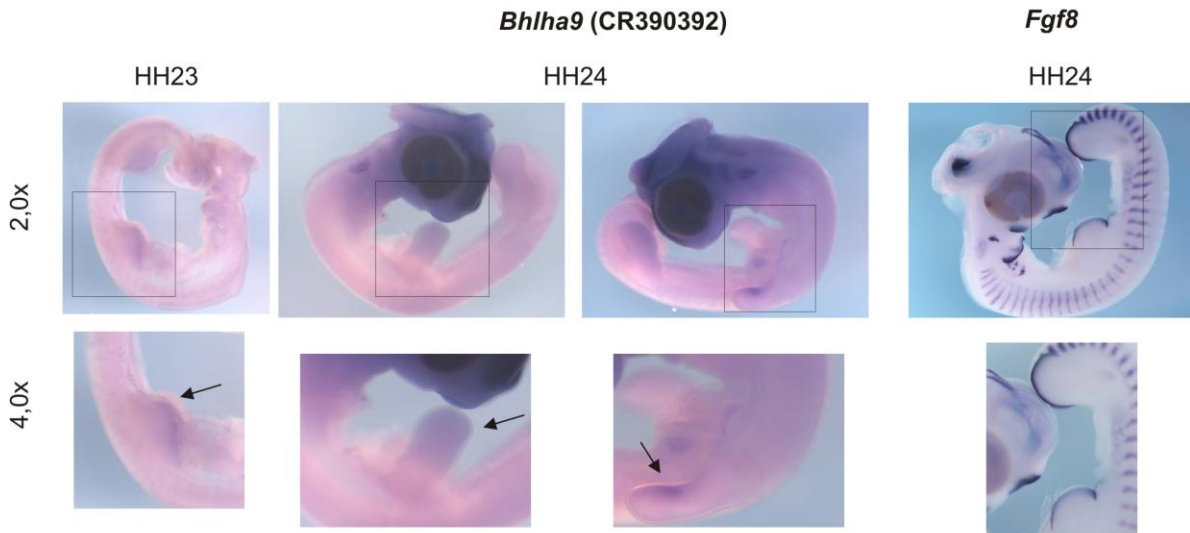
## 5.6 Expressionsanalyse von *Bhlha9*

Um einen ersten funktionellen Eindruck vom Kandidatengen *Bhlha9* zu bekommen, wurden zum Nachweis des Expressionsmusters während der Embryonalentwicklung RNA *in situ*-Experimente (vgl. Kapitel 4.5.1.1) an ganzen Embryonen verschiedener Spezies durchgeführt (Maus, Hühnchen, Zebrafisch) (vgl. Abbildung 41). Es konnte ein Expressionssignal von *Bhlha9* in der sich entwickelnden Extremität detektiert werden. Im Vergleich zum Expressionsmuster des AER-spezifischen-Markers *Fgf8* war das Signal für *Bhlha9* unterhalb der AER lokalisiert und deckte die darunterliegende PZ ab (Pfeile in Abbildung 41). Dieses Signalmuster von *Bhlha9* in der Extremitätenknospe ähnelte sich in allen untersuchten Spezies und deutet somit auf eine konservierte Funktion innerhalb der Extremitäten-/ Flossenentwicklung hin.

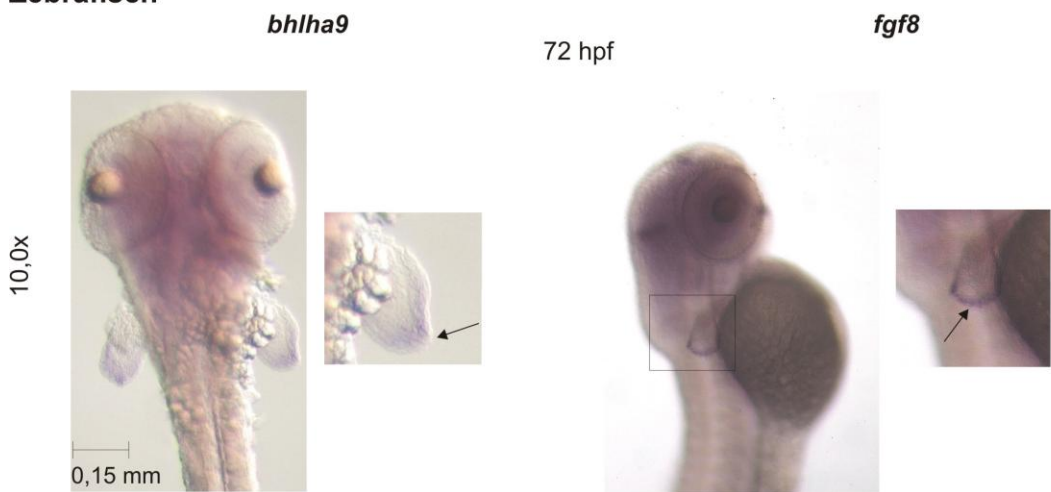
**Maus**



**Hühnchen**



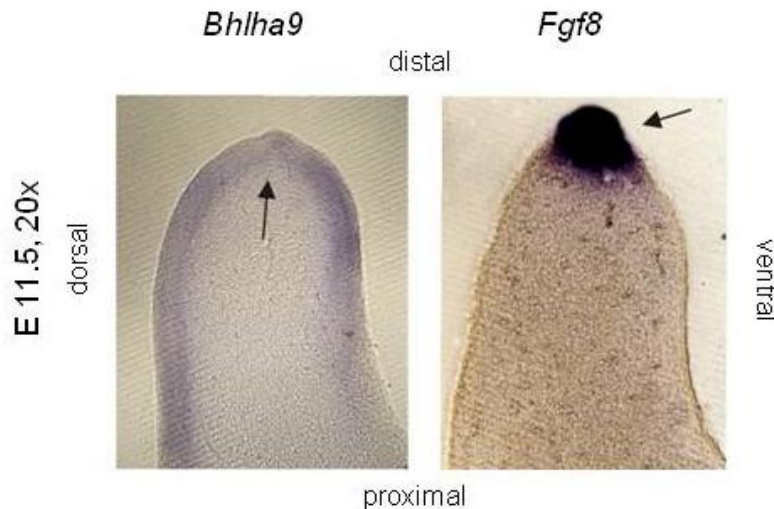
**Zebrafisch**



**Abbildung 41** Expression von *Bhlha9* und *Fgf8* während der Embryonalentwicklung.

Das Expressionsmuster von *Fgf8* kennzeichnete den Bereich der AER in der Extremitätenknospe. *Bhlha9* wurde unterhalb der AER, im Bereich der PZ exprimiert (vgl. Pfeile). Gezeigt sind verschiedene Embryonalstadien der Maus (E 9.5, E 10.5, E 11.5), des Hühnchens (HH23, HH24) und des Zebrafisches (72 hpf) und jeweils Vergrößerungen der Extremitätenknospe.

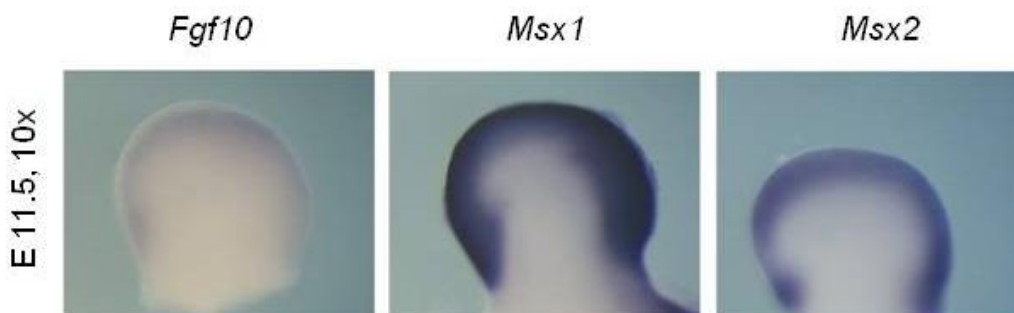
An Vibratomschnitten (vgl. Kapitel 4.5.3) der Extremitätenknospe ist deutlich erkennbar, dass sich die Expression von *Bhlha9* unterhalb der AER bis in den dorsalen und ventralen Bereich der Extremität erstreckte (vgl. Abbildung 42). *Bhlha9* wurde im dorsalen Bereich etwas stärker exprimiert, als im ventralen Part. Im Bereich der AER war kein Signal von *Bhlha9* nachweisbar.



**Abbildung 42 Lokalisierung der *Bhlha9*-Expression in der Extremitätenknospe.**

a) Longitudinale Vibratomschnitte der Vorderextremitäten der Mausembryonen E11.5 der *WISH* mit *Bhlha9* und *Fgf8*.

Die Expressionsdomäne von *Bhlha9* überlappte mit anderen extremitätenspezifischen Markern (*Fgf10*, *Msx1*, *Msx2*), welche innerhalb der PZ exprimiert werden (vgl. Abbildung 43).



**Abbildung 43 RNA *in situ* für Gene, die innerhalb der Progresszone exprimiert werden**

Vorderextremitäten von Mausembryonen E 11.5 mit den Expressionsmustern der Gene *Fgf10*, *Msx1*, *Msx2*.

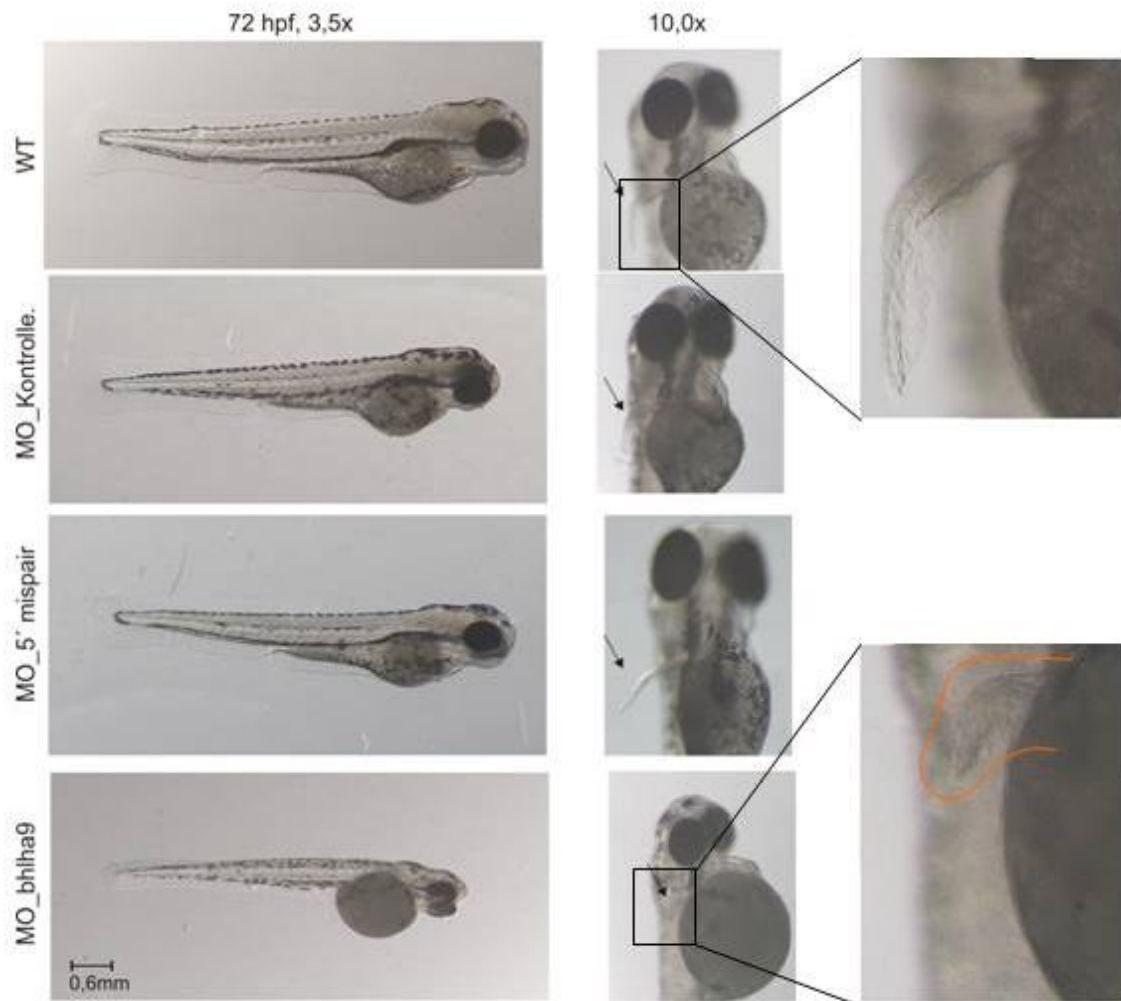
## 5.7 Funktionelle Untersuchung von BHLHA9 im Modellsystem Zebrafisch

Für eine erste Charakterisierung des *BHLHA9*-Gens *in vivo* wurde das Modellsystem des Zebrafischs herangezogen. Zebrafische gehören zu den Vertebraten und sind, neben der Maus und dem Hühnchen, ein weit verbreiteter Modellorganismus in der Genetik. Der Vorteil dieses Modellsystems ist ein kurzer Generationszyklus (Geschlechtsreife nach 12-16 Wochen), eine hohe und regelmäßige Abgabe an Eiern, ein geringer Platzanspruch und eine extramaternale und transparente Embryonalentwicklung. Zebrafische lassen sich relativ einfach genetisch manipulieren, so dass spezifische Aussagen über Gene und deren Funktion im Entwicklungskontext gemacht werden können. Der Mensch und der Zebrafisch zeigen in manchen Entwicklungsprozessen einen hohen Grad an Gemeinsamkeiten, so dass sich viele der beim Zebrafisch gewonnen entwicklungsbiologischen Erkenntnisse auf den Menschen übertragen lassen. Das Modellsystem Zebrafisch wird u.a. als Krankheitsmodell (z.B. nähere Untersuchung von krebsverursachenden Genen) verwendet, erlaubt die Generierung transgener Linien, Zufallsmutanten können physiologische Prozesse erklären und mit der „Reverse Genetics“ (Knockdown von Genen während verschiedener Entwicklungsprozesse) kann die Funktion von Genen analysiert werden (Schredelseker 2009).

### 5.7.1 Morpholino-Experimente

Die Flossenentwicklung der Pectoralflosse ist sehr intensiv untersucht und zeigt eine starke Ähnlichkeit mit der murinen Gliedmaßenentwicklung (Mercader 2007). Während der murinen Extremitätenentwicklung, so wie auch in der frühen Ausbildung der Pectoralflosse konnte das Transkript für *BHLHA9* detektiert werden (vgl. Abbildung 41).

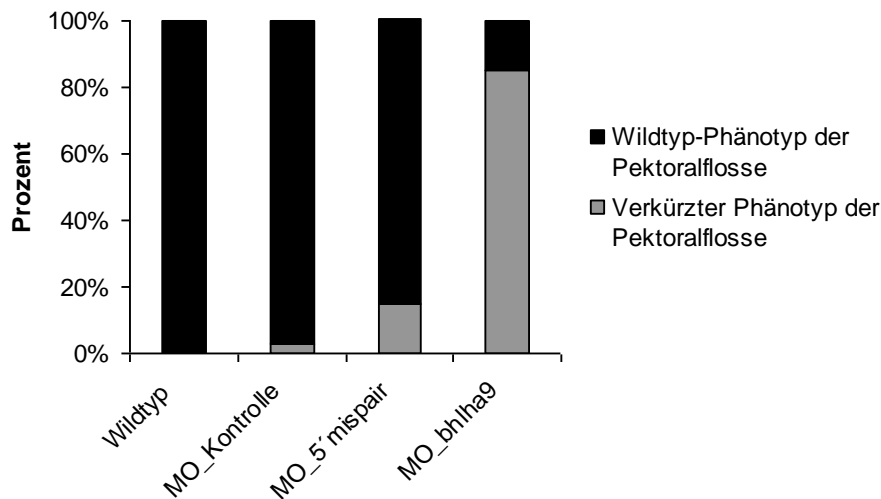
Um erste Hinweise über die Funktion dieses Gens zu bekommen, wurde ein Knockdown-Experiment (vgl. Kapitel 4.6.2) in Zebrafischen durchgeführt. Es wurde ein spezifischer Morpholino (MO) gegen das *bhlha9*-Transkript generiert, der den Translationsstart abdeckte (vgl. Anhang Tabelle 12) und somit einen Knockdown des zu untersuchenden Gens auf Proteinebene verursacht. Der Morpholino (MO\_bhlha9) bindet an die komplementäre Sequenz und unterbindet dadurch die Translation und somit die Bildung des Proteins. Um die Spezifität des Morpholinos beurteilen zu können, wurde zusätzlich ein 5´Mispair-Morpholino (MO\_5´mispair) generiert, der fünf fehlerhafte Nukleotide, im Vergleich zum MO\_bhlha9, aufwies. Um die Handhabung der Injektionsmethode an sich beurteilen zu können, wurde ein Standard-negativ-Morpholino (MO\_Kontrolle) mitgeführt. Zebrafische aus demselben Wurf, wie die behandelten Fische, wurde zum phänotypischen Vergleich herangezogen. Da die Konzentration des Morpholinos mit zunehmendem Entwicklungsalter der Fische abnimmt, wurde die Flossenentwicklung von Zebrafischen drei Tage (72 hours post fertilization, hpf) nach Eiablage untersucht (vgl. Abbildung 44).



**Abbildung 44 Funktionelle Untersuchung von *BHLHA9* mittels Morpholino-Technologie.**

Im Vergleich zum Wildtyp (WT) und zu den Kontroll-Morpholinos zeigen die mit MO\_bhlha9 behandelten Fische stark verkürzte Pektoralflossen. MO= Morpholino; MO\_bhlha9= Morpholino gegen das bhlha9-Transkript; MO\_5' mispair= veränderter Morpholino zum bhlha9-Morpholino; MO-Kontrolle= Standard negativ Kontrolle; WT= Wildtyp.

Die Wildtyp-Zebrafische (WT), sowie die Zebrafische, die mit den Kontroll-Morpholinos behandelt wurden (Mo\_Std.neg,Kontr., Mo\_5' mispair) zeigten eine ähnlich ausgebildete Pektoralflosse. Die Pektoralflosse war senkrecht zum Körper ausgerichtet und der distale Part der Flosse verlief im 90° Winkel zur Körpermitte. Die Fische, die mit dem MO\_bhlha9 injiziert wurden, wiesen eine um die Hälfte verkürzte Pektoralflosse auf. Auch die anderen Flossen waren in leicht verringerter Größe vorzufinden. Insgesamt zeigten 80% der mit dem MO\_bhlha9 injizierten Fische eine verkürzte Pektoralflosse (Abbildung 45). Die mit dem 5' mispair-Morpholino behandelten Fische sowie auch die Fische, die mit der Standard-negativ-Kontrolle injiziert wurden, wiesen nur in 2,5% bzw. 15% eine verkürzte Pektoralflosse auf.



**Abbildung 45 Anteil Zebrafische mit verkürzter Pectoralflosse nach Morpholino-Injektion.**

Im Vergleich zu den Wildtyp-Fischen war bei den MO\_bhlha9 behandelten Fischen ein auffälliges Schwimmverhalten zu beobachten: Die Fische zeigten rotierende Körperbewegungen anstatt geradeaus zu schwimmen, wodurch das Zurücklegen von Distanzen verlangsamt war.

Um das Verhältnis der Körperlänge zur Pectoralflossenlänge besser beurteilen zu können, wurden pro injiziertem Konstrukt bei > 200 Fische die Körperlänge sowie die Länge der Pectoralflosse gemessen. Die Messungen erfolgten am Binokular unter der Verwendung des Axionvison-Computerprogramms.

Die MO\_bhlha9 behandelten Zebrafische zeigten im Vergleich zu den anderen Fischen eine reduzierte Körperlänge (25% verkleinerte Körperlänge im Vergleich zum WT) und eine noch stärkere reduzierte Flossenlänge (ca. 50%) (vgl. Abbildung 47 a, b). Generell zeigte sich bei allen injizierten Konstrukten, im Vergleich zum Wildtyp, ein Unterschied in der Flossenlänge und beim Verhältnis Flossenlänge zur Körperlänge. Die größte Differenz war bei den MO\_bhlha9 behandelten Zebrafischen zu beobachten (vgl. Abbildung 47 c).

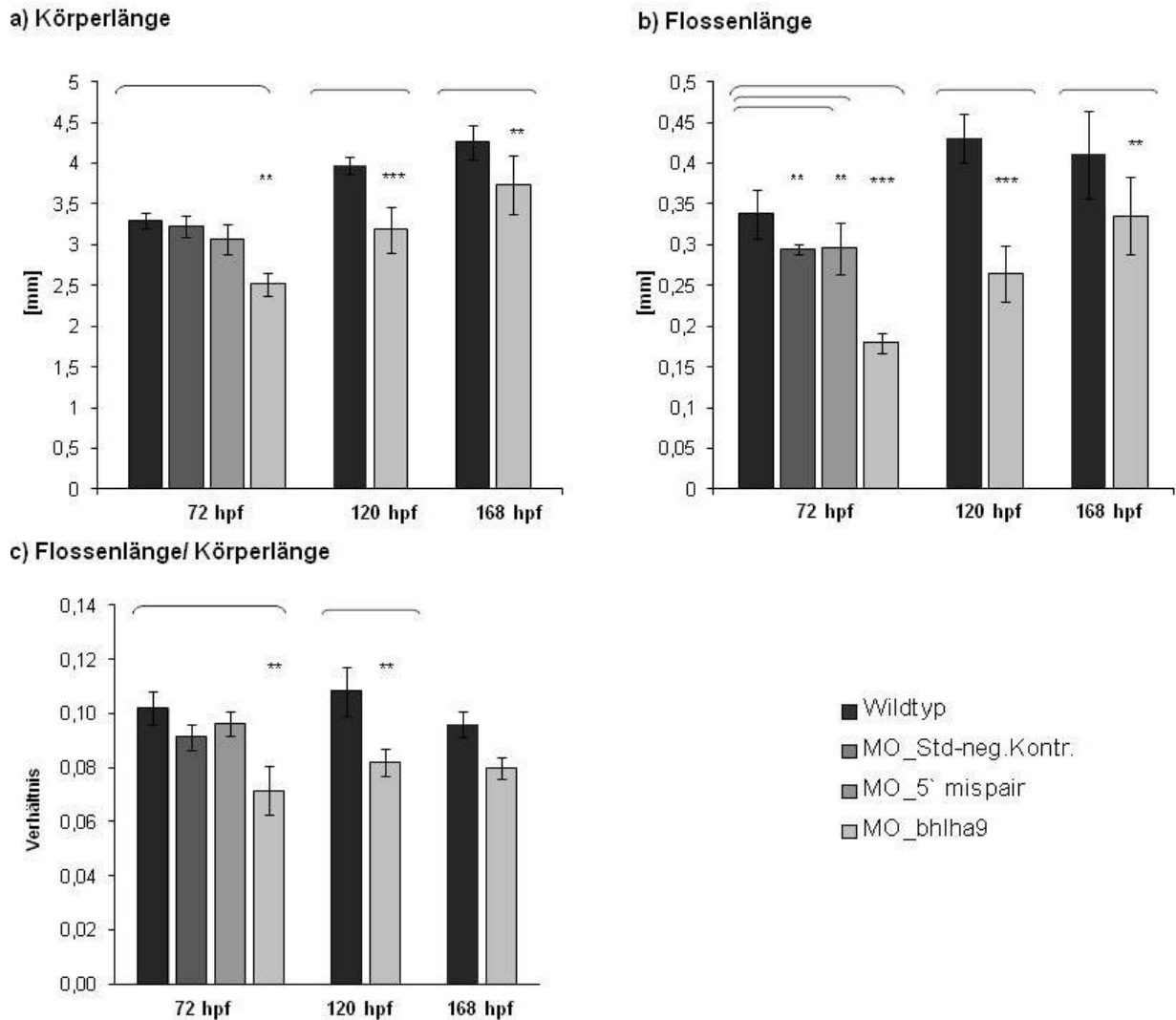
Um die Wirkung des bhlha9-Morpholinos auf das Flossenwachstum und dessen Entwicklung über die Zeit besser beurteilen zu können, wurden MO\_bhlha9 behandelte Zebrafische im Vergleich zum Wildtyp an späteren Zeitpunkten, d.h. nach 5 Tagen (120hpf) und nach 7 Tagen (168hpf) untersucht (vgl. Abbildung 46).



**Abbildung 46** Entwicklung der Pectoralflosse bei Wildtyp-Zebrafischen und Mo\_bhlha9 behandelten Zebrafischen nach 5 Tagen (120 hpf) und 7 Tagen (168 hpf).

Es lässt sich erkennen, dass die Wirkung des bhlha9-Morpholinos auf die Körperlänge und die Länge der Pectoralflosse mit zunehmendem Alter der Zebrafische abnimmt. Die MO\_bhlha9 behandelten Zebrafische wiesen im Alter von 7 Tagen eine starke Annäherung der Körper- und Flossenlänge an den Wildtyp auf. Die Messdaten zeigten, dass die Körper- und Flossenlängen der behandelten MO\_bhlha9\_Zebrafische sich den Daten der Wildtyp-Zebrafische annäherten, aber trotzdem noch signifikante Unterschiede vorhanden waren (vgl. Abbildung 47 a, b, c).

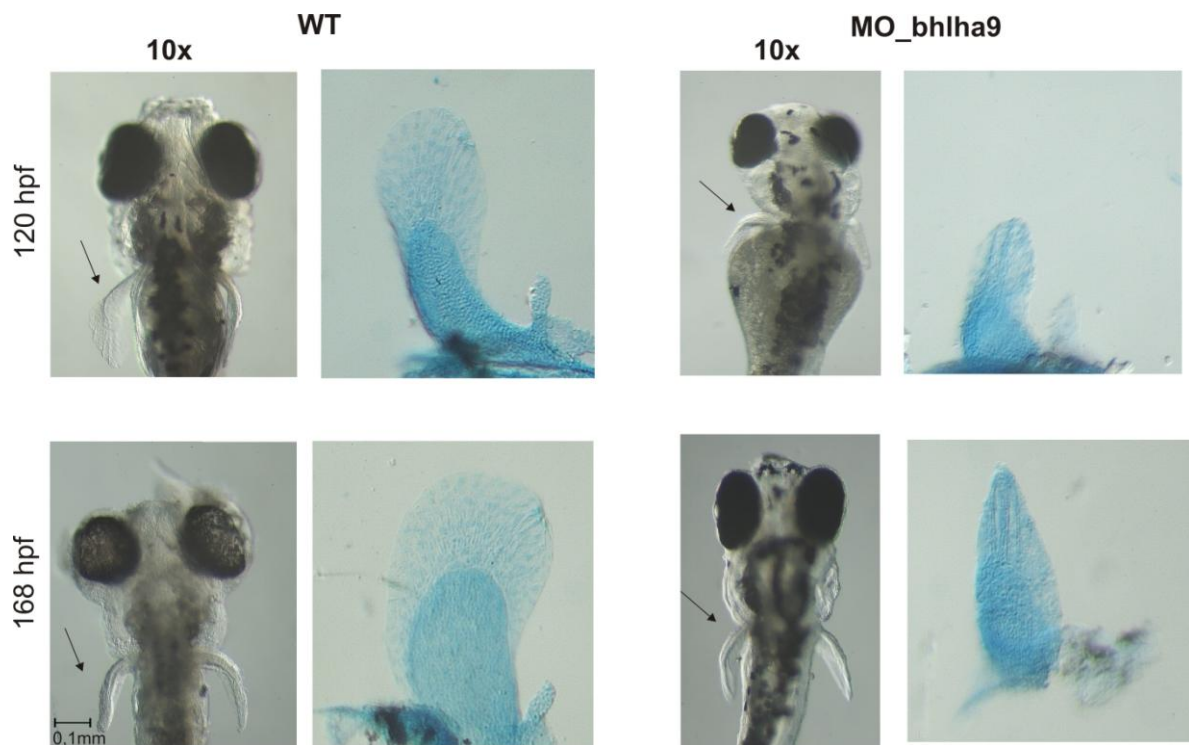




**Abbildung 47 Zusammenfassung der Messdaten des Morpholino-Experiments: Körperlänge (a), Flossenlänge (b) und Darstellung des Verhältnisses Flossenlänge zu Körperlänge (c) bei Wildtyp-Zebrafischen (Wildtyp) und Morpholino behandelten Zebrafischen (MO) im Entwicklungsstadium 72 hpf, sowie nach 120 hpf und 168 hpf. Legende: MO\_Std-neg.Kontr.= Standard negativ Kontrolle eines Morpholions; 5' mispair= 5' mispair Morpholino; MO\_bhlha9= Morpholino gegen das Transkript von bhlha9.**

Um morphologische Veränderungen der Pectoralflosse zu untersuchen, wurden Skelettpräparationen (vgl. Kapitel 4.5.5) von MO\_bhlha9 behandelten- und Wildtyp-Zebrafischen durchgeführt (vgl. Abbildung 48). Die Pectoralflosse zeigte auch bei den MO\_bhlha9 behandelten Zebrafischen ein Längenwachstum über die Zeit, jedoch waren starke morphologische Defekte bezüglich der Flossenform zu erkennen. Die Flossen der MO\_bhlha9 behandelten Zebrafische waren vom anterioren zum posterioren Ende verkleinert und zeigten eine kegelförmige Struktur, die aber zum distalen Ende hin abflacht.



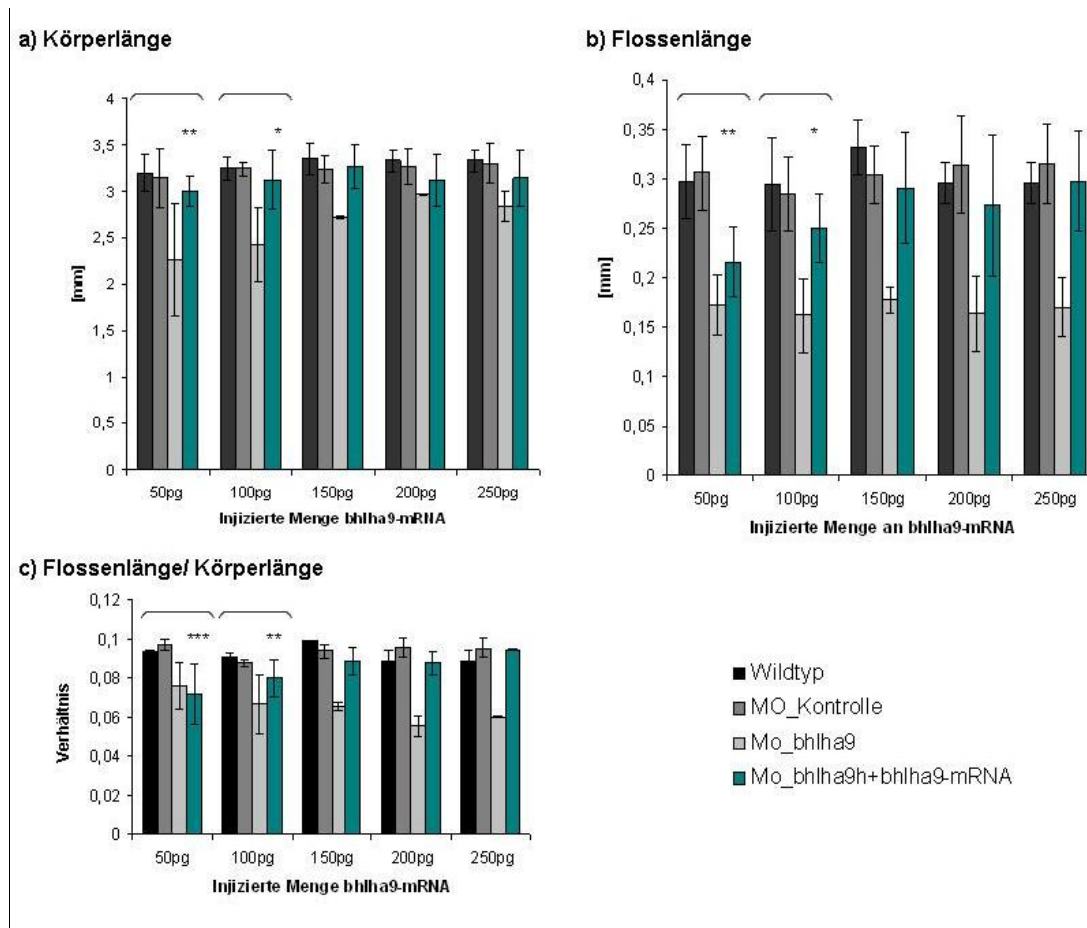


**Abbildung 48** Skelettpräparation mit Alcian Blau Färbung von Wildtyp- und MO\_bhlha9-behandelten Zebrafischen nach 5 Tagen (120hpf) und 7 Tagen (168hpf).

Die Flossenstruktur der MO\_bhlha9 behandelten Zebrafische wich von der wildtypischen Flossenstruktur stark ab. Die Flosse war kegelförmig und wies eine verkürzte Flossenlänge auf.

Die Injektion des bhlha9-Morpholinos verursachte eine starke Größenabnahme und Formveränderung (teller- zu kegelförmig) der Pectoralflosse, wodurch das Schwimmverhalten und die generelle Motorik der Tiere beeinträchtigt wurde. Um die veränderten morphologischen und motorischen Eigenschaften mit dem knock-down von bhlha9 in direkte Verbindung zu bringen, wurde ein Rescue-Experiment durchgeführt (vgl. Kapitel 4.6.2.2).

Bei dem Rescue-Experiment wurde das Augenmerk vor allem auf die Länge der Pectoralflosse gelegt, welche in den MO\_bhlha9-behandelten Fischen stark verkürzt war.



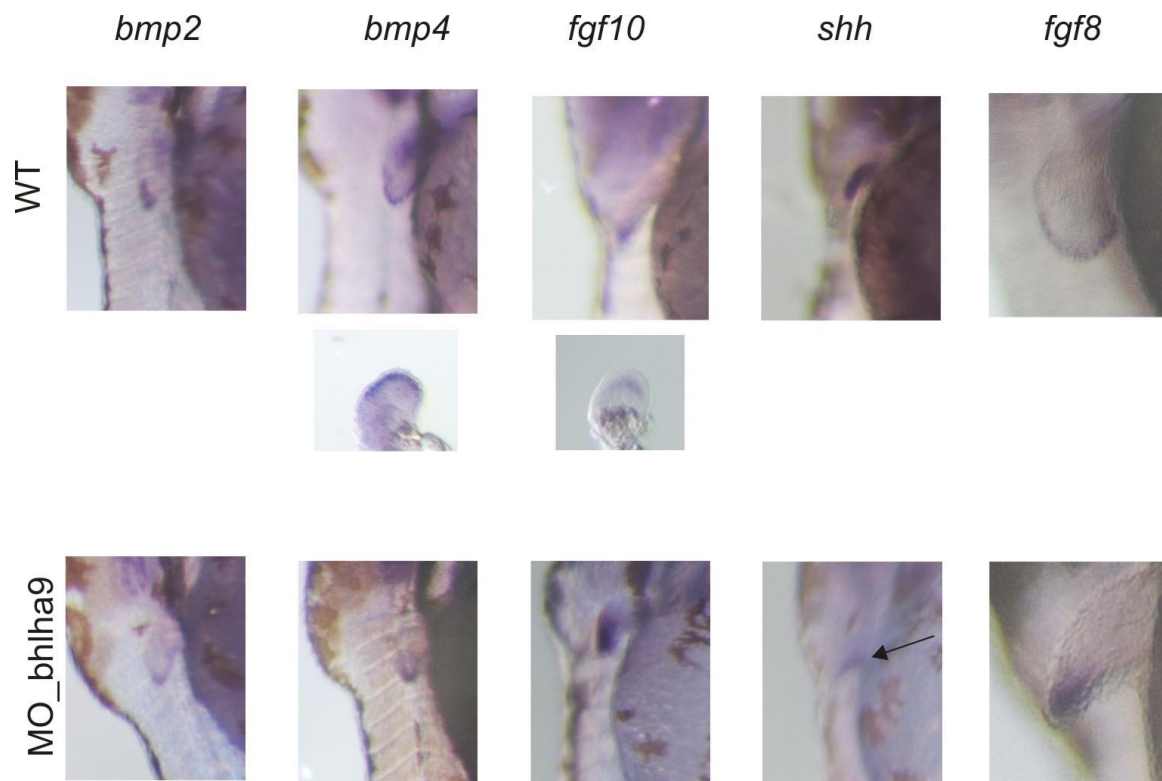
**Abbildung 49 Rescue-Experiment: Körperlänge (a), Flossenlänge (b) und Darstellung des Verhältnisses Flossenlänge zu Körperlänge (c) nach 72hpf.**

Die Zebrafische, die nacheinander mit dem bhlha9-Morpholino und anschließend mit der bhlha9-mRNA behandelt wurden, zeigten mit zunehmender Injektionsmenge eine dem Wildtyp entsprechende Flossenlänge (vgl. Abbildung 49). Nach einer Injektion von 250pg bhlha9-mRNA wurde die finale Flossenlänge erreicht. Es konnten signifikanten Unterschiede bis 100pg Injektionsmenge festgestellt werden. Die Messungen der Körperlänge zeigten schon nach 150pg Injektionsmenge eine annähernd dem wildtyp-entsprechenden Wert.

### 5.7.2 Expressionsprofil von Markergenen innerhalb der Pektoralflosse von Wildtyp- und Morpholino-behandelten Zebrafischen

Experimentell konnten Reduktionsdefekte der Pektoralflosse festgestellt werden (vgl. Abbildung 44). Die Pektoralflossen der MO\_bhlha9-behandelten Zebrafische waren stark verkürzt und zeigten eine kegelförmige Struktur. Um die Beeinträchtigung der Flossenentwicklung und die Auswirkung auf andere Gene durch den Knockdown von bhlha9 besser beurteilen zu können, wurde die Expression von spezifischen Markergenen, die während der Extremitätenentwicklung in spezifischen Regionen exprimiert werden, in Wildtyp- und MO\_bhlha9 behandelten Zebrafischen verglichen (vgl. Kapitel

4.6.3, vgl. Abbildung 50). Es zeigte sich für beide untersuchte Fischgruppen, dass die Gene *bmp2*, *bmp4*, *fgf10*, *shh* und *fgf8* in der Pektoralflosse exprimiert werden. Die Expression war für die innerhalb der PZ exprimierten Gene *bmp2*, *bmp4* und *fgf10* annähernd wildtyp- entsprechend. Die Expression von *shh* im posterioren Part der Pektoralflosse war etwas schwächer in den MO\_bhlha9 behandelten Zebrafischen. Die Expression von *fgf8* in den MO\_bhlha9 behandelten Zebrafischen war verändert, im Vergleich zum Wildtyp: Das Gen war stark im distalen Part der kegelgörmigen Pektoralflossen exprimiert, dorsal und ventral war kaum eine *fgf8*-Expression zu erkennen.



**Abbildung 50** Expressionsprofil von Markergenen (*bmp2*, *bmp4*, *fgf10*, *shh*, *fgf8*) innerhalb der Pektoralflosse von Wildtyp (WT)- und MO\_bhlha9 behandelten Zebrafischen nach 72hpf.

Die Gene *bmp2*, *bmp4* und *fgf8* werden im AER exprimiert. Das Transkript von *shh* ist im posterioren Part der Flossen vorhanden und *fgf10* wird im posterioren Part exprimiert. Ein Vergleich zwischen WT und MO\_bhlha9 behandelten Zebrafischen zeigt bei den Genen *bmp2*, *bmp4* keine starken Veränderung bezüglich des Expressionsmusters. Die Expression von *fgf10* ist etwas verstärkt im distalen Part der Flossen vorzufinden, *shh* wird abgeschwächt im posterioren part exprimiert. Die expression von *fgf8* ist in den MO\_bhlha9 behandelten zebrafischen stark abweichend: das Gen ist im distalen Part der Flosse stark konzentriert, anterior/ posterior ist keine Expression nachweisbar.

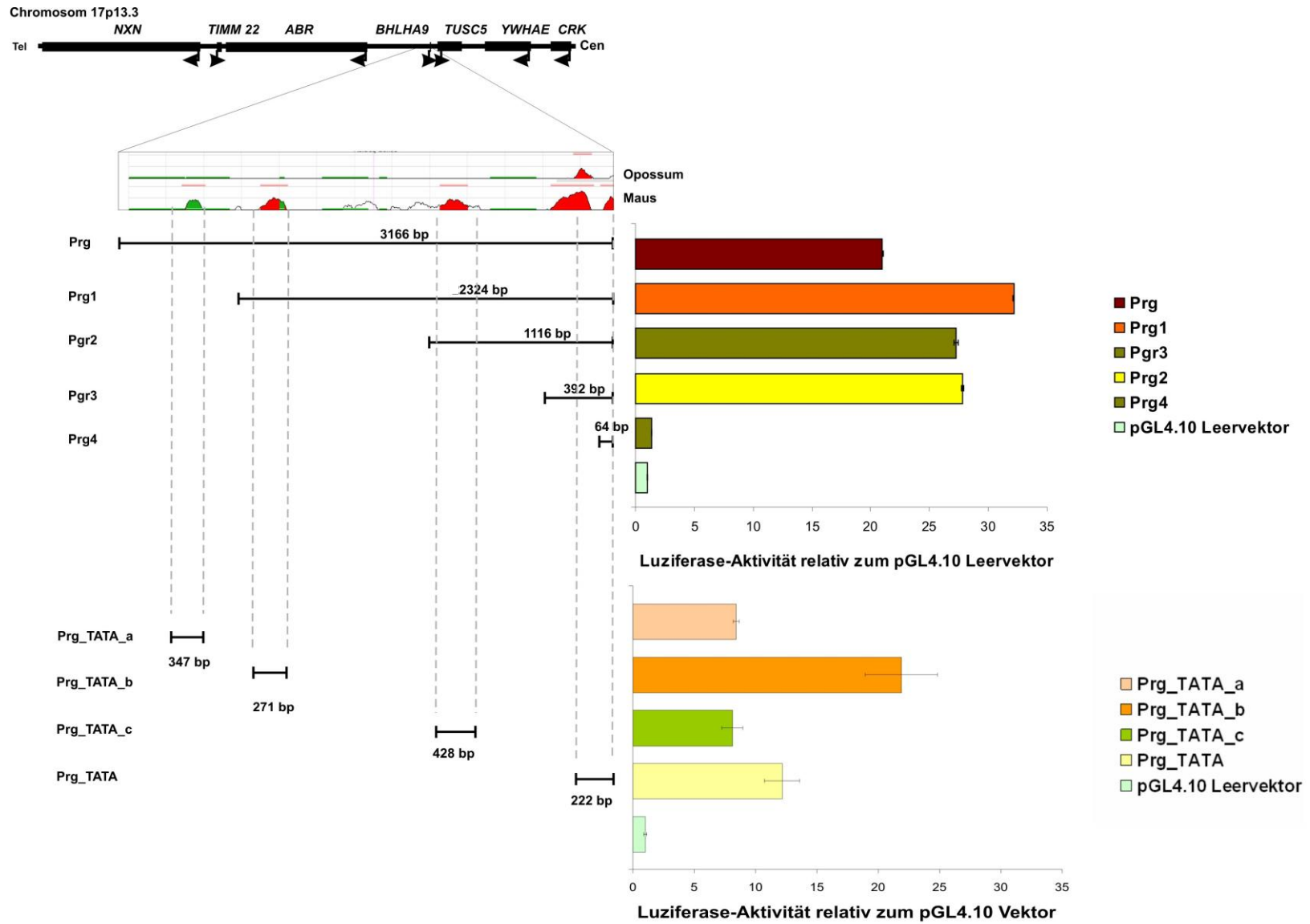
## 5.8 Untersuchung der Transkriptionseinheit von *BHLHA9*

Die Expression eines Gens wird durch proximale und distale Promoterelemente beeinflusst. Um die Transkriptionseinheit (proximaler/ distaler Promoterbereich) von *BHLHA9* näher zu untersuchen und relevante Bereiche zu identifizieren, wurden Luziferase-Assay Experimente, unter der Verwendung von *HEK293*-Zellen, mit einem promoterlosen Vektor (pGL4.10, Promega) durchgeführt (vgl. Kapitel 4.7.3). Die 5' des Gens befindliche Region wurde im Hinblick auf konservierte Bereiche analysiert (ECR-Browser) und dementsprechend unterschiedlich große Konstrukte für die Promoteruntersuchung generiert (vgl. Abbildung 51, Primer Anhang Tabelle 10).

Die Konstrukte zeigten eine unterschiedliche Luziferase-Aktivität (vgl. Abbildung 51). Der pGL4.10 Leervektor und ein Konstrukt ohne TATA-Box (Prg4), das nur 32bp des Promoterbereichs beinhaltet, zeigten nur eine geringe Luziferase-Aktivität. Die Konstrukte Prg1, Prg2 und Prg3 hatten eine 25 bis 30fach erhöhte Luziferase-Aktivität im Vergleich zum Leervektor. Die höchste Aktivität wies das Konstrukt Prg1 auf. Das Konstrukt Prg, welches alle konservierten Bereiche beinhaltet, zeigte hingegen die niedrigste Aktivitätssteigerung (~20fach).

Eine nähere Untersuchung der vier konservierten Bereiche (Prg\_TATA\_a bis Prg\_TATA) zeigte für die Region Prg\_TATA\_b die stärkste Luziferase-Aktivität, was auf deren regulatorische Bedeutung im distalen Promoterbereich hindeutet. Die Abschnitte Prg\_TATA\_a, Prg\_TATA\_c und Prg\_TATA wiesen im Vergleich eine um die Hälfte verminderte regulatorische Aktivität auf.

Der Bereich Prg\_TATA\_b, der die höchste Luziferase-Aktivität induziert, wurde nach potenziellen Transkriptionsfaktorbindestellen untersucht (vgl. Anhang, Kapitel 12.2.3). Es zeigten sich Bindestellen für den Transkriptionsfaktor AP2, der während der Extremitätenentwicklung mitwirkt.



### Abbildung 51 Analyse der potenziellen Promoterregion von *BHLHA9*.

*In silico Analyse* (linke Spalten): Vier konservierte Regionen im Bereich 1117442 -1120607 bp auf Chromosom 17 (hg18) unter Verwendung des ECR-Browsers (grün= Sequenzwiederholungen; rot= intergenische Regionen). Die potenzielle Promoterregion wurde insgesamt in neun Konstrukte unterteilt: fünf unterschiedlich große Konstrukte mit jeweils unterschiedlichen Kombinationen der konservierten Bereiche (Konstrukt Prg bis Prg4) und die vier konservierten Bereiche jeweils einzeln inklusive der TATA-Box (Konstrukte Prg\_TATA\_a bis Prg\_TATA\_c). Die Größen der Konstrukte sind oberhalb der waagerechten Markierungsbalken angegeben.

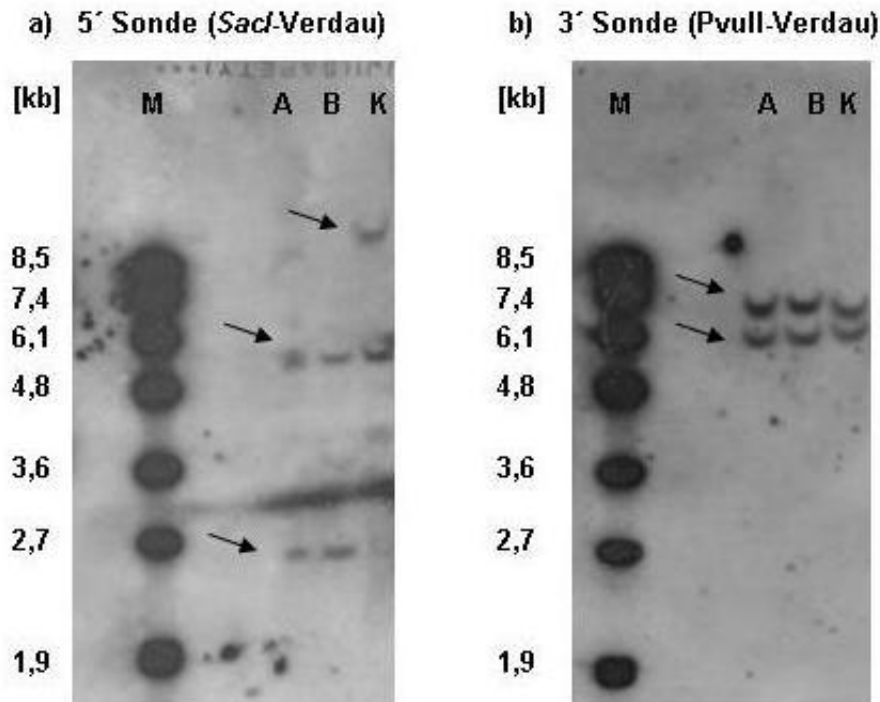
Luziferase Assay Ergebnisse (Balkendiagramme, rechts): Die generierten Konstrukte (Prg bis Prg4 und Prg\_TATA\_a bis PRG\_TATA) zeigten unterschiedliche regulatorische Potenziale/ Enhanceraktivitäten bezüglich des Luziferase-Gens. Der Leervektor, sowie der Abschnitt ohne eine Transkriptionsstartsequenz (Prg4) zeigten eine minimale Luziferase-Aktivität an. Die Konstrukte (Prg bis Prg3), welche eine aufsteigende Anzahl an konservierten Bereichen beinhalten, wiesen im Durchschnitt eine 25fache Aktivität auf. Das Konstrukt Prg1 hatte das stärkste Aktivierungspotenzial (ca. 35fache Aktivität). Die Einzelbereiche (Prg\_TATA\_a bis Prg\_TATA) zeigten eine verringerte Luziferase-Aktivität (im Durchschnitt: ca. 10fach). Der Bereich Prg\_TATA\_b wies das stärkste regulatorische Potenzial auf (> 20fach).

## 5.9 Untersuchung des Dosiseffekts von *Bhlha9* innerhalb des *CoIA1*-Lokus

Nachdem RNA *in situ* Hybridisierungen verschiedener Spezies (Maus, Hühnchen, Zebrafisch) gezeigt haben, dass *Bhlha9* während der frühen Embryonalentwicklung in den Extremitäten exprimiert wird und *in vivo* Experimente dessen Beteiligung im Kontext der Extremitätenentwicklung unterstützten (vgl. Kapitel 5.6 und 5.7), wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Mausmodell generiert, dass die Wirkungsweise einer Verdopplung des Gens *Bhlha9* mit seinem potentiell Promoterbereich demonstrieren sollte (Dosiseffekt).

Für diesen Versuchsansatz wurden modifizierte ES-Zellen (Open Biosystems, MES4305) verwendet, die bezüglich des *CoIA1*-Lokus zwei verschiedene Allele aufwiesen (vgl. Kapitel 4.8). Neben dem Wildtyp-Allel wiesen diese Zellen ein modifiziertes Allel auf, welches stromabwärts des *CoIA1*-Lokus, die Insertion eines gewünschten Genbereichs erlaubte. Die Region des *Bhlha9*-Gens wurde zusammen mit dem potenziellen Promoterbereich (vgl. Kapitel 5.8) in den modifizierten *CoIA1*-Lokus kloniert (Primer vgl. Anhang, Tabelle 13)

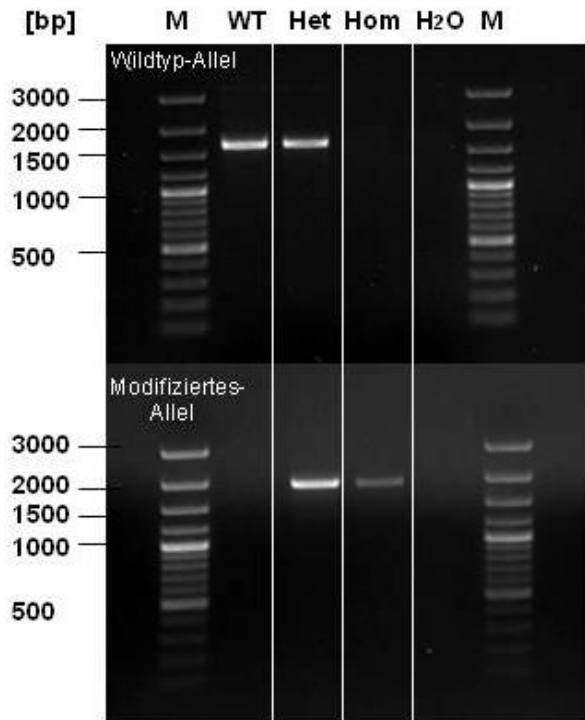
Die korrekte Insertion in den *CoIA1*-Lokus wurde mit einer Southern-Blot-Analyse überprüft (vgl. Kapitel 4.9). Hierzu wurden zwei verschiedene Sonden verwendet (5'- und 3'-Sonde, Primer vgl. Anhang Tabelle 14). Positive Klone zeigen nach Restriktionsverdau zwei Banden: 2,5kb bei der 5'-Sonde bzw. 5,9kb bei der 3' Sonde. C2-Zellen ohne Insertion dagegen zeigten für den modifizierten *CoIA1*-Lokus bei der 5'-Sonde eine Bande bei 8,7kb und eine Bande bei 6,1kb für die 3'-Sonde. Die Bande für den wildtypischen Locus lag bei 5,2kb (vgl. Abbildung 52).



**Abbildung 52 Southern-Blot Analyse der ausselektionierten ES-Zellklone mit einer spezifischen 5'- und 3'-Sonde.**

Die DNA der ES-Zellklone (A, B) sowie C2-DNA (K) wurden für den Southern Blot mit der 5'-Sonde mit dem Restriktionsenzym *SacI* (a), für die 3'-Sonde mit dem Restriktionsenzym *PvuII* (b) geschnitten. Es ergaben sich Banden bei 2,5kb bzw. 5,9kb (5' bzw. 3' Sonde) für die positiven Klone. Die Kontroll-DNA (K) zeigte ein Bandenmuster auf der Höhe von 8,7kb bzw. 6,1kb (5' bzw. 3' Sonde). Die Bande für das Wildtyp-Allel von *ColA1* ergab eine Bande bei 5,2kb. Bandenmuster sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Die positiven Klone wurden expandiert (vgl. Kapitel 4.8) und im Anschluß für die diploide Morula-Aggregation verwendet. Bei der diploiden Morula-Aggregation werden 2,5 Tage alte Embryonen mit den positiven ES-Zellklonen kombiniert. Dieser Verband wird im Anschluß wieder in pseudoschwangere Mäuse transferiert. Die ersten Embryonen sind Chimäre, durch Kreuzungsversuche erhält man dann eine reine Keimbahn bezüglich des modifizierten Allels. Die Nachkommen der Kreuzungen wurden mittels Genotypisierungs-PCR auf Insertion im *ColA1*-Lokus getestet (Abbildung 53, Primer vgl. Anhang, Tabelle 13). DNA von Mäusen, ohne jegliche Modifikation am *ColA1*-Lokus (WT), zeigten ein PCR-Produkt von 1644bp. Mäuse, welche heterozygot bezüglich des modifizierten *ColA1*-Lokus waren, wiesen zwei Banden auf: 1644bp (Wildtyp-Allel) und 1972bp (modifiziertes Allel). Homozygote Mäuse für das modifizierte Allel zeigten entsprechend nur eine Bande von 1972bp.

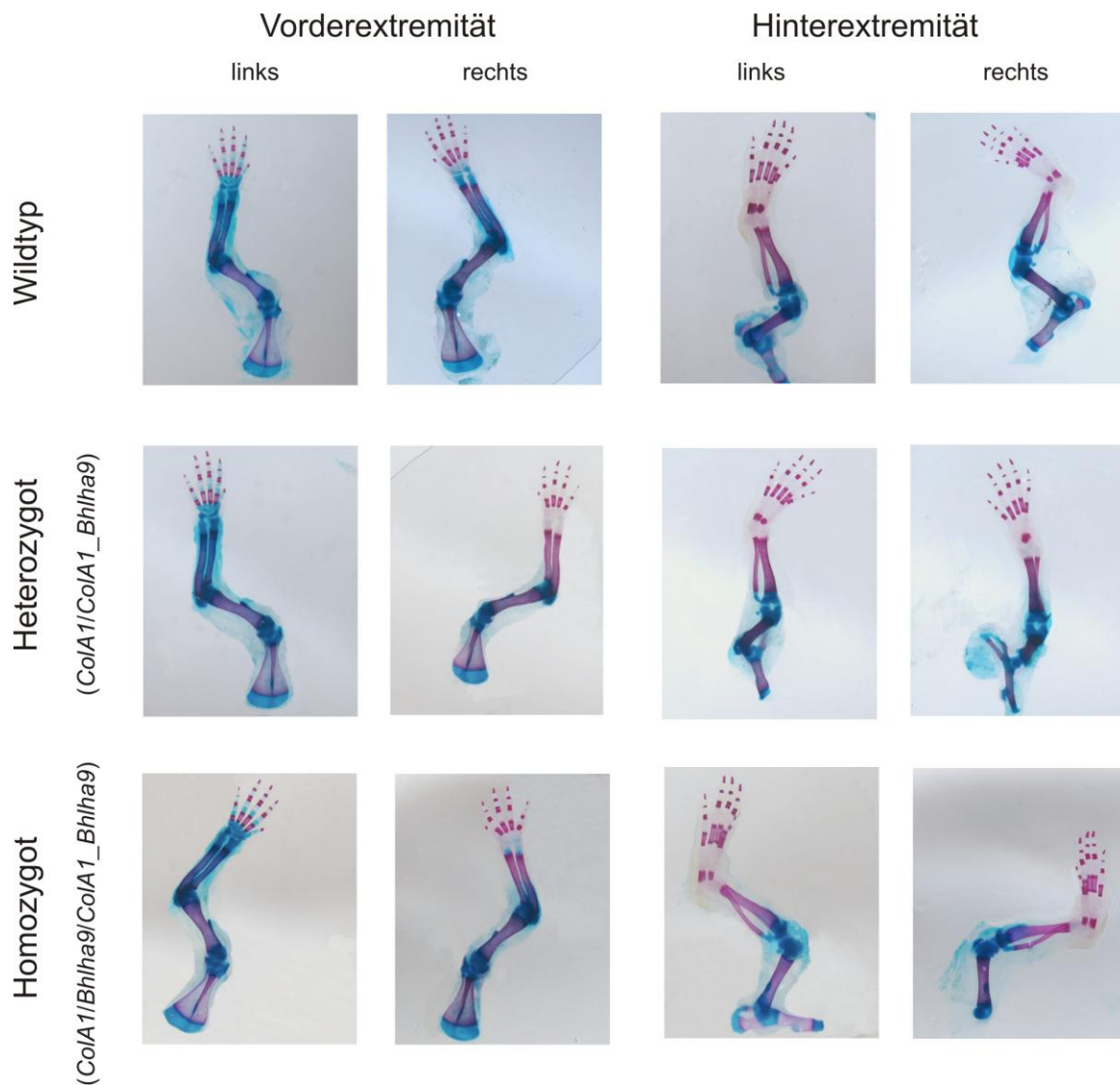


**Abbildung 53 Genotypisierungs-PCR für Mäuse mit einem modifizierten *CoIA1*-Lokus.**

Für das WT-Allel (WT) ergibt die PCR ein Produkt von 1644 bp. Das modifizierte Allel zeigte ein PCR-Produkt von 1972 bp. Mäuse mit einem unmodifizierten Allel zeigten eine WT-Bande. Heterozygote Mäuse (Het) bezüglich des modifizierten *CoIA1*-Lokus zeigten 2 Banden (WT und modifiziert). Homozygote Mäuse für das modifizierte Allel (Hom) zeigten nur eine Bande bei 1972 bp. Eine Wasserprobe ( $H_2O$ ) diente als Negativkontrolle, M= Größenstandard.

Um einen ersten Eindruck über den Phänotyp der Extremitäten der genetisch veränderten Mäuse (heterozygot, homozygot) zu bekommen, wurden Skelettpräparationen (vgl. Kapitel 4.5.5) der Vorder- und Hinterextremitäten angefertigt (vgl. Abbildung 54). Wildtyp-Mäuse, ohne eine Modifikation im *CoIA1*-Lokus, dienten als Referenz.





**Abbildung 54 Skelettpräparationen von Wildtyp-Mäusen und Mäusen mit einem modifizierten *ColA1*-Lokus (heterozygot, homozygot im postnatalen Stadium P1).**

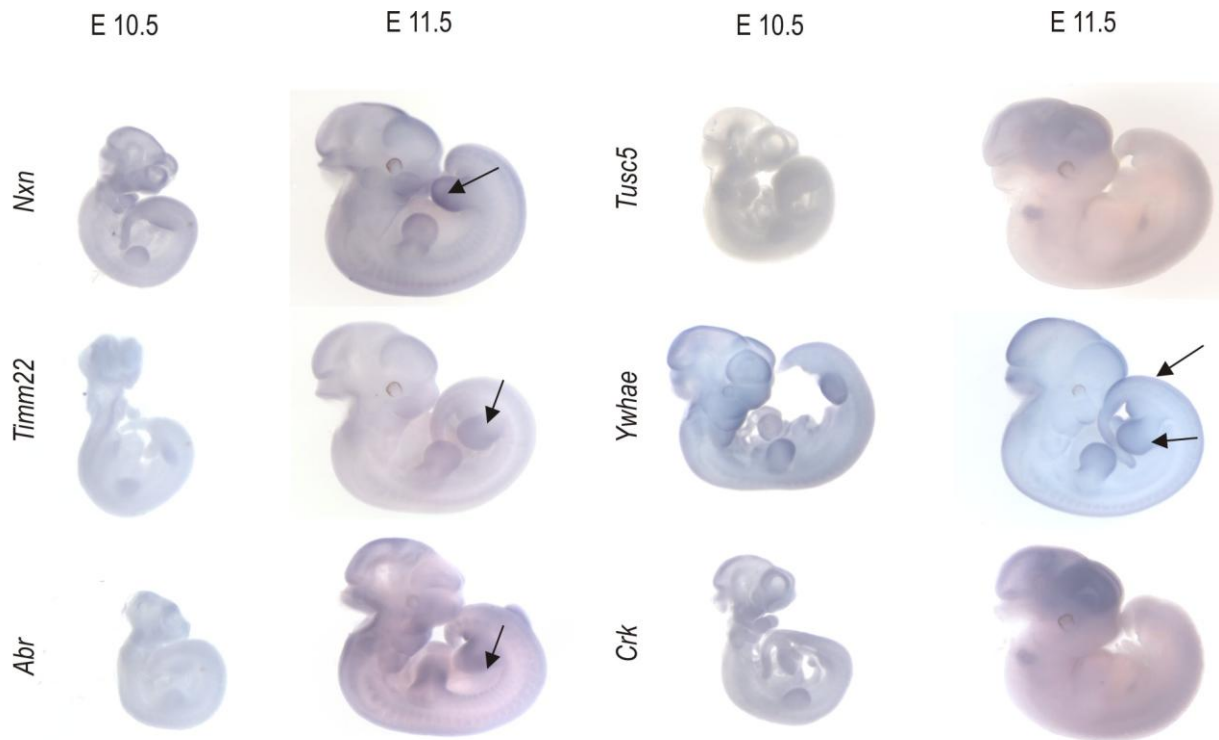
Es wurden jeweils die Vorderextremitäten und Hinterextremitäten photographisch dokumentiert. Insgesamt wurden zwei Wildtyp-Mäuse, fünf heterozygote und drei homozygote Mäuse mit einem modifiziertem *ColA1*-Lokus untersucht. Blaue Färbung kennzeichnet knorpeliges Gewebe, eine rote Anfärbung zeigte Knochenstrukturen an. Es konnten keine nennenswerten Unterschiede bezüglich der Gliedmaßenstruktur festgestellt werden.

Die Extremitäten der heterozygoten Tiere sowie der homozygoten Tiere weisen, im Vergleich zum Wildtyp, keine Auffälligkeiten an den Extremitäten auf. Die Extremitäten waren in ihrer Struktur, ihrem Entwicklungsgrad und Größe dem Wildtyp entsprechend.

### 5.10 Expressionsprofil der benachbarten Gene von *Bhlha9*

Das untersuchte Patientenkollektiv zeigte Duplikationen auf dem Chromosom 17p13.3 (vgl. Abbildung 38), die in ihrer Größe stark variierten (55kb bis 594kb). Ausgehend von diesen Duplikationen konnte eine kritische Region definiert werden, die in allen untersuchten Patienten dupliziert war und das Gen *BHLHA9* beinhaltet. Doch nicht nur das Gen *BHLHA9* war von den Duplikationen betroffen, sondern

auch Teile der benachbarten Gene: *NXN*, *TIMM22*, *ABR*, *TUSC5*, *YWHAE*, *CRK*. Über die Beteiligung dieser Gene während der Gliedmaßenentwicklung ist derzeit nichts bekannt. Um einen besseren Überblick über deren Expressionsmuster während der frühen Extremitätenentwicklung zu bekommen, wurden RNA *in situ* Hybridisierungen (vgl. Kapitel 4.5.1.1) an Mausembryonen (E 10.5, E 11.5) durchgeführt (vgl. Abbildung 55).



**Abbildung 55** RNA *in situ* Hybridisierung der benachbarten Gene zu *Bhlha9*. Mausembryonalstadium E 10.5 und E 11.5.

Pfeile verdeutlichen die Expressionsorte der verschiedenen Gene.

Die benachbarten Gene *Nxn*, *Timm22*, *Abr* und *Ywhae* zeigten ein Expressionsmuster in der sich entwickelnden Extremität, welches mit dem *Bhlha9*-Expressionsmuster teilweise überlappte. *Nxn*, *Timm22* sowie *Ywhae* wurden ebenfalls unterhalb des AERs exprimiert. Das Gen *Abr* dagegen war mehr anterior und posterior exprimiert und zeigte unterhalb des AERs kein Signal. Die Gene *Tusc5* und *Crk* zeigten keine eindeutigen Signale innerhalb der Extremität. Das Transkript des Gens *Ywhae* konnte außerdem im gesamten Ektoderm nachgewiesen werden (vgl. Pfeilkennzeichnung Abbildung 55).

Die Ergebnisse in diesem Projekt zeigten, dass der Phänotyp SHFLD mit Duplikationen auf dem Chromosom 17p13.3 assoziiert ist. Das Gen *BHLHA9*, das innerhalb der kritischen Region befindlich ist, konnte in ersten *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen funktionell charakterisiert werden und in seiner Transkriptionseinheit näher bestimmt werden.

## 6 Diskussion

### 6.1 Mikroduplikationen des SHH-Enhancers (ZRS) verursachen ein Spektrum von Extremitätenfehlbildungen

Die korrekte Entwicklung von Gliedmaßen ist von einem exakt aufeinander abgestimmten Netzwerk von Signalwegen abhängig (Niswander 2002). Mutationen, Aberrationen oder Fehlregulationen von Signalmolekülen innerhalb des komplexen Signalnetzwerkes können Fehlentwicklungen, wie z.B. Vielfingrigkeit, Brachydaktylie oder Ektrodaktylie entstehen lassen (Zeller et al. 2009). Die *Shh*-Expression beeinflusst maßgeblich die anteriore-posteriore Musterausbildung der sich entwickelnden Extremität und wird durch einen extremitätenspezifischen Enhancer (ZRS), der im Intron 5 des benachbarten *LMBR1*-Gens lokalisiert ist, reguliert (Lettice et al. 2003). Punktmutationen sowie Aberrationen innerhalb dieser Region verursachen ein Spektrum an Extremitätenfehlbildungen wie z.B. präaxiale Polydaktylie (PPD), das Triphalangeale-Daumen-Polysyndaktylie-Syndrom (TPT-PS), komplexe Polysyndaktylie (CPS) und Syndaktylie Typ IV (SD4) (Tsukurov et al. 1994; Lettice et al. 2003; Lettice and Hill 2005; Klopocki et al. 2008; Sun et al. 2008; Wieczorek et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit wurden drei nicht verwandte Familien mit einer partiellen bis kompletten Syndaktylie der Hände und/ oder Füße und einer Spiegelpolydaktylie der Füße mittels Array-CGH untersucht. Für alle betroffenen Patienten wurden Mikroduplikationen auf dem Chromosom 7q36.3 am *SHH*-Lokus detektiert. Die Extremitätenfehlbildungen dieser Patienten überlappten mit den oben genannten Phänotypen, so dass die hier detektierten Duplikationen sehr wahrscheinlich ursächlich für das Krankheitsbild der Patienten waren.

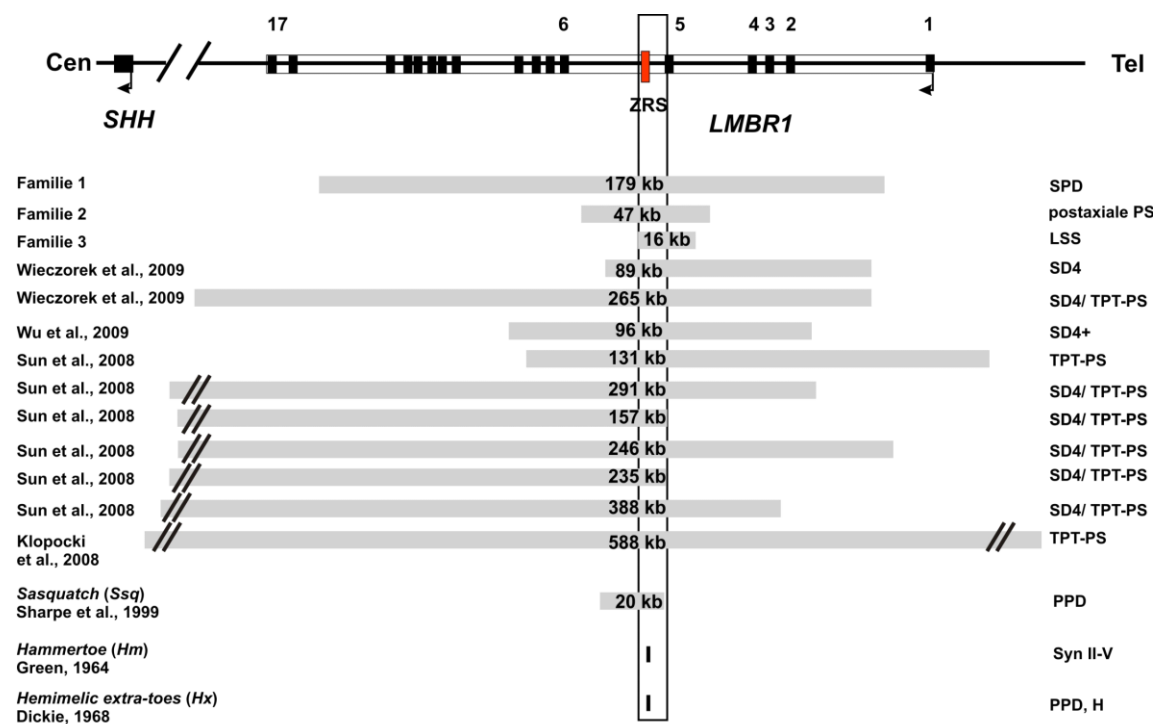
Die Bruchpunktsequenzierungen bei den Familien 1 und 3 zeigten eine direkte Tandemorientierung der Duplikationen mit nicht-rekurrenten Bruchpunkten (vgl. Kapitel 5.1.3, Abbildung 23). Mikrohomologien in einem Umfang von drei (Familie 1) bzw. zwei (Familie 3) Nukleotiden an den Bruchpunkten haben vermutlich die Entstehung der Duplikationen auf dem Locus 7q36 gefördert. CNVs können durch Rekombinatio- und Replikationsereignisse entstehen (vgl. Einleitung, Kapitel 1.6.1). Anhand der detektierten Mikrohomologien kann angenommen werden, dass die Duplikationen durch einen Fehler bei der Replikation entstanden sind (microhomology mediated break-induced replication, MMBIR) (vgl. Kapitel 1.6.1, Abbildung 11). Für den MMBIR Mechanismus ist das Vorhandensein von Mikrohomologien einer Länge von 2 bis mehreren 1000 Basenpaaren möglich. Während der Replikation der DNA scheint es in dem untersuchten Patientenkollektiv zu einem Strangbruch und einem darauffolgenden Templatewechsel zwischen parallel aktiven Replikationsgabeln gekommen zu sein. Der Folgestrang hat sich an die physikalisch nächstgelegene Replikationsgabel angelagert und wurde erneut repliziert. Ein erneuter Bruch und eine Reorientierung des Folgestrangs an die zuvorige Replikationsgabel hat eine Duplikation in direkter Tandemorientierung entstehen lassen. Dieser Mechanismus wurde schon für zahlreiche andere Mikrohomologie-vermittelte Aberrationen nachgewiesen, wie z.B. bei Deletionen auf dem Chromosom 17p13.3, die dem Miller-Dieker Syndrom zugrunde liegen (Nagamani et al. 2009).

Die bei den Patienten nachgewiesenen Duplikationen, mit einer Größe zwischen 16kb und 179kb, umfassen alle den Extremitäten-Enhancer (ZRS) von *SHH* (vgl. Kapitel 5.1.2, Abbildung 19). Dieser Enhancer reguliert die Expression von *SHH* in der ZPA. Die Untersuchung von Genomen einiger Schlangen und extremitätenloser Amphibien zeigte, dass in diesen Spezies, im Vergleich zu Wirbeltieren und Säugern mit Extremitäten, der Enhancer fehlt. Der Verlust dieser genomischen Region bei diesen Tieren scheint mit der Extremitätenlosigkeit in direktem Zusammenhang zu stehen (Benazet and Zeller 2009). Die ZRS-Region, auch bekannt als MFCS1 (mammal-fish conserved sequence 1), ist folglich nicht nur essentiell für die Entwicklung und Identität der Phalangen, sondern auch für die Extremitätenentwicklung ansich (Sagai et al. 2004). Saunders und Gasseling konnten 1968 erstmalig zeigen, dass durch die Transplantation von Zellen aus dem posterioren in den anterioren Bereich der Extremitätenknospe eine zusätzliche Ausbildung von Fingergliedern mit Spiegelidentität induziert werden kann. Die Anzahl der zusätzlichen Finger war dabei abhängig von der Anzahl an transplantierten Zellen aus der ZPA-Region. Die transplantierten Zellen erhöhen die *Shh*-Konzentration im anterioren Bereich der Extremitätenknospe, sodass der natürlich vorhandene *Shh*-Konzentrationsgradient von posterior nach anterior gestört und somit eine Verdoppelung von Fingern im Sinne einer Spiegelidentität möglich wird.

Doch nicht nur Transplantationsexperimente, sondern auch verschiedene Mausmodelle konnten die Beteiligung von *Shh* an der Entstehung einer präaxialen Polydaktylie bestätigen. Sowohl das Mausmodell *Sasquatch* (*Ssq*) als auch das Mausmodell *Hemimelic extra-toes* (*Hx*) weisen eine ektopische *Shh*-Expression im anterioren Bereich der Extremitätenknospe auf. *Ssq*, entstanden durch ein Insertionsereignis in der ZRS, definiert sich durch eine PPD der Hinterextremitäten (heterozygot) bzw. an allen vier Gliedmaßen (homozygot) (Sharpe et al. 1999; Hill et al. 2003). *Hx*-Mäuse, mit einer mutierten ZRS-Region, zeigen ebenfalls eine präaxiale Polydaktylie sowie eine Veränderung der langen Röhrenknochen (Clark et al. 2000). Das Mausmodell *Hammertoe* (*Hm*) weicht von den bisher beschriebenen Mausmodellen ab, da der Phänotyp hier hauptsächlich durch eine Syndaktylie der Finger II bis V gekennzeichnet ist (Green 1964). Auch hier findet sich die genetische Ursache in der orthologen Region zu der humanen ZRS-Region (Tsukurov et al. 1994; Lettice et al. 2012). Dieses phänotypische Spektrum von reiner Syndaktylie bis zu präaxialer Polydaktylie, das durch Veränderungen innerhalb der ZRS-Region bedingt wird, spiegelt sich in den klinischen Phänotypen innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs wieder. Folglich sind strukturelle Veränderungen innerhalb der Enhancer-Region beim Menschen ausreichend, um einen erweiterten PPD-Phänotyp entstehen zu lassen (Lettice et al. 2008). Aufgrund des Phänotyps ist bei den hier untersuchten Patienten davon auszugehen, dass die detektierten Duplikationen eine Über- oder Misexpression von *SHH* auslösen. Im Gegensatz dazu führt ein Fehlen von *Shh* z.B. durch ein Knockout in der Maus zu einer Degenerierung der skelettären Elemente distal zum Stylopod/ Zeugopod im Sinne einer Reduktionsfehlbildung. Im Patienten äußert sich ein Verlust der *SHH*-Expression in dem Acheiropodie-Syndrom, bei dem die Humerus-Epiphyse und die Tibia-Diaphyse nicht richtig ausgebildet sind. Die restlichen Skelettelemente des Zeugopods und Autopods fehlen komplett (Sagai et al. 2005).

SHH ist aber nicht nur an der Musterausbildung der Extremitäten beteiligt, sondern beeinflusst u.a. auch die Entwicklung des ZNS. Punktmutationen innerhalb des *SHH*-Gens selbst sowie Deletionen oder Translokationen führen zu dem klinischen Phänotyp der Holoprosenzephalie (HPE, Fehlentwicklung des Vorderhirns) (Dubourg et al. 2007). In dem untersuchten Patientenkollektiv sind keinerlei Fehlentwicklung des Gehirns oder mentale Merkmale bekannt. Die detektierten Duplikationen innerhalb der ZRS-Region, obwohl diese zum Teil die ZNS-spezifischen Enhancer einschließen (vgl. Abbildung 7 und Abbildung 56), scheinen diese in ihrer Funktion nicht zu beeinträchtigen.

Ein Vergleich aller bisher publizierten Duplikationen auf dem Locus 7q36.3 zeigt eine große Mannigfaltigkeit bezüglich der Aberrationsgrößen mit nicht-rekurrenten Bruchpunkten zwischen den verschiedenen Patienten - die klinischen Phänotypen unterscheiden sich hingegen nur minimal voneinander. Die minimale kritische Region in unserem Patientenkollektiv stellt die 16kb Duplikation der Familie 3 dar, die die mutierten Regionen der Mausmodelle *Hm* und *Hx* beinhaltet und mit der Aberration des Mausmodells *Ssq* überlappt (Abbildung 56).



**Abbildung 56 Schematische Übersicht der Duplikationen in Familie 1-3 im Vergleich mit bisher publizierten Duplikationen innerhalb der ZRS-Region sowie den genetischen Veränderungen bekannter Mausmodelle.**

Duplikationen sind hellgrau, Deletionen sind dunkelgrau unterlegt; die jeweilige Größe ist angegeben. Punktmutationen sind mit einem senkrechten Strick markiert. Das *SHH*-Gen ist durch ein schwarzes Kästchen, das *LMBR1*-Gen durch ein nicht ausgefülltes Kästchen (schwarze Kästchen; *LMBR1* Exons) verdeutlicht (Pfeile= Transkriptionsstart und -richtung). Die ZRS-Region ist rot markiert. Die klinischen Phänotypen sind jeweils auf der rechten Seite aufgelistet. H= Hemimelie von Radius/Tibia; LSS= Laurin-Sandrow-Syndrom; SPD= Synpolydaktylie; PPD= präaxiale Polydaktylie; SD4= Syndaktylie Typ IV; SD4+= Syndaktylie Typ IV und Tibia Hypoplasie; TPT-PS= Triphalangealer Daumen mit Polysyndaktylie.

Zwischen dem Schweregrad des Phänotyps und der Größe und Lage der detektierten Duplikationen besteht keine direkte Korrelation. Familie 3 weist die kleinste Duplikation (16kb) auf, zeigt aber den komplexesten Phänotyp mit einer kompletten Syndaktylie der Hände, einer Aplasie der Patella, einem Identitätsverlust zwischen den langen Knochen (Fibula und Tibia) und einer Spiegelpolydaktylie der Füße. Die Familie aus der Publikation Klopocki et al. (2008) weist die größte Duplikation auf (569kb), doch ist deren Phänotyp auf das distale Handskelett beschränkt (TPT-PS). Die durch die Duplikationen veränderte chromosomale Struktur und daraus resultierende Fehlregulation von *SHH* scheint der bestimmende Faktor für den Schweregrad des Phänotyps zu sein. Shh beeinflusst die anterior-posteriore Musterausbildung der Extremität durch einen räumlichen und zeitlichen Konzentrationsgradienten (vgl. Kapitel 1.4.1.1). Wie kann eine Duplikation innerhalb der Enhancer-Struktur in unserem Patientenkollektiv eine ektope und/ oder verstärkte *SHH*-Expression induzieren?

Der räumliche und zeitliche Konzentrationsgradient von Shh wird durch die Repressorform von Gli (GliR) im anterioren Part kontrolliert (vgl. Kapitel 1.4.1). Aufgrund der vorhandenen Polydaktylie der Hände und Füße der untersuchten Patienten kann eine ektope *SHH*-Expression und somit symmetrische Verteilung posterior und anterior angenommen werden. Eine erhöhte Konzentration von SHH im anterioren Part resultiert in einer gestörten Funktion der Gli-Transkriptionsfaktoren: Eine erhöhte Konzentration an aktiven Gli-Transkriptionsfaktoren kann in diesem Bereich die Expression von posterior-spezifischen Genen induzieren. Dies führt letztendlich zu einer Fehlentwicklung der Extremität bezüglich der Strahlenanzahl und Identität im anterioren Bereich, erkennbar an einer symmetrischen Duplikation in Form der Spiegelpolydaktylie (Familie 3).

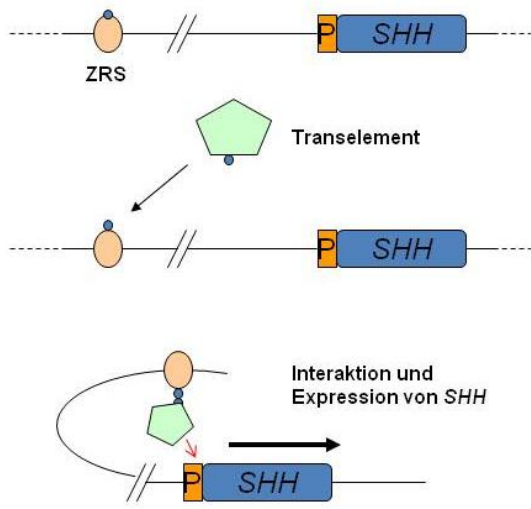
Ein Vergleich der klinischen Phänotypen der „Duplikationspatienten“ mit denen der Patienten, die eine Punktmutation innerhalb der ZRS-Region aufweisen, zeigt, dass ein einziger Nukleotidaustausch innerhalb der ZRS-Region genügt, um einen äquivalenten klinischen Phänotyp hervorzurufen. Duplikationen sowie Punktmutationen scheinen folglich in ähnlicher Weise die Enhancer-Aktivität der ZRS-Region zu beeinflussen. Es lässt sich aber auch erkennen, dass die Patienten mit einer Duplikation zusätzlich Syndaktylien einzelner Finger aufweisen, die bei den Patienten mit einer Punktmutation nicht vorhanden sind (Albuisson et al. 2011).

Der Regulationsmechanismus der ZRS-Region, im Hinblick auf das Expressionsmuster von *Shh*, ist im Detail noch nicht aufgeklärt, doch sind einige Hinweise gegeben (Hill et al. 2003; Albuisson et al. 2011; Lettice et al. 2012). Die ZRS-Region zeigt zwischen verschiedenen Spezies (Mensch, Maus, Hühnchen, Hund und Katze) einen hohen Konservierungsgrad (Sagai et al. 2004), wodurch dessen funktionelle Relevanz untermauert wird. Innerhalb der ZRS-Region sind konservierte Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren vorhanden, die für die korrekte Expression von *Shh* verantwortlich sind (Albuisson et al. 2011; Lettice et al. 2012). Punktmutationen innerhalb dieser Regionen erhöhen die Bindungsaffinität und -kapazität einzelner Transkriptionsfaktoren, wodurch expandierte und ektope Shh-Signale entstehen (Lettice et al. 2012). Innerhalb der ZRS-Region sind neben anderen Transkriptionsfaktorbindungsstellen fünf ETS- und zwei ETV-Bindungsstellen konserviert. Untersuchungen

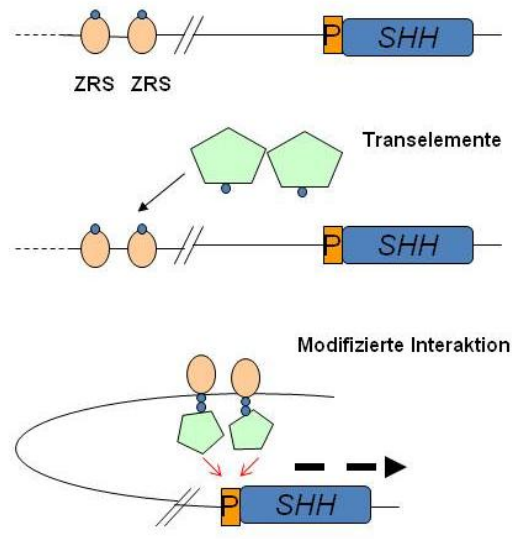
zeigten, dass Punktmutationen in Patienten das Verhältnis zwischen diesen Bindestellen zugunsten der ETS-Bindestellen verändern, wodurch sowohl eine verstärkte posteriore als auch eine ektope, anteriore *Shh*-Expression gefördert wird. ETS-Faktoren beeinflussen die *Shh*-Expression im posterioren Part der Extremität (ZPA), ETV-Faktoren unterdrücken dagegen die *Shh*-Expression im anterioren Bereich der Extremitätenknospe. Mikroduplikationen innerhalb der ZRS-Region beeinflussen die Bindungskapazität von Transkriptionsfaktoren (Albuisson et al. 2011; Lettice et al. 2012). Es ist möglich, dass die Aberrationen in dem hier präsentierten Patientenkollektiv die Bindungskapazität der Transkriptionsfaktoren positiv beeinflussen, wodurch die Expression von *SHH* erhöht und expandiert wird. Innerhalb der kritischen Region des hier untersuchten Patientenkollektivs befinden sich 11 ETS- und 9 ETV-Bindestellen. Ein Ungleichgewicht zwischen ETS und ETV Bindestellen innerhalb der ZRS Region bei Patienten mit Duplikationen könnte ein Erklärungsansatz für die Unterscheidung zwischen den einzelnen klinischen Phänotypen sein.

Weiterhin wäre es möglich, dass die unterschiedlichen Größen der Duplikationen die Effizienz, mit der die ZRS-Region mit *SHH* in Interaktion tritt, beeinflussen. Die Größen der Aberrationen könnten die Loopbildung der DNA beeinträchtigen und dadurch die *SHH*-Expression beeinflussen. Im Normalfall kommt es durch DNA-Schleifenbildung, zum direkten Kontakt zwischen Gen und Enhancer (hier: ZRS-Region mit *SHH*) (Abbildung 57a). Bei einer großen Duplikation (> 100kb) kann, im Vergleich zu einer 16kb Duplikation, die Loopformierung der DNA eventuell stärker beeinträchtigt werden (Abbildung 57b, c). Die Mehrzahl an Transkriptionsfaktoren kann aus sterischen Gründen nicht mit dem Promoterbereichs in Interaktion treten, eine geringere Transkription ist das Resultat. Eine leichtere Faltung der DNA ermöglicht dagegen eine bessere Bindung des Enhancers über Transkriptionsfaktoren an das Zielgen, und die Expression wird stärker gefördert. Dieses Modell könnte die unterschiedlichen Phänotypen zwischen den untersuchten Familien erklären, und auch verdeutlichen, warum die Familie 3 mit der kleinsten Duplikation den komplexesten Phänotyp aufweist.

a) Normal

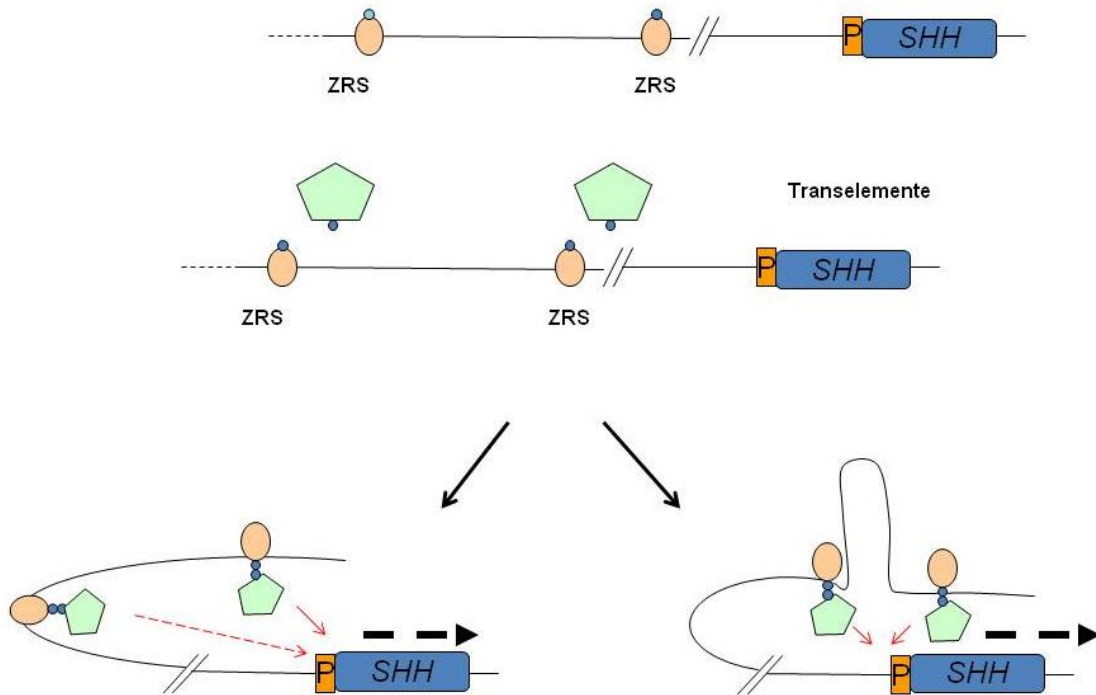


b) Duplikation (< 20kb)



Fehl- und/ oder ektopische Expression von SHH

c) Duplikation (> 100kb)



Fehl- und/ oder ektopische Expression von SHH

Abbildung 57 Möglicher Mechanismus zur Entstehung einer Polydaktylie unterschiedlichen Schweregrades, hervorgerufen durch Duplikationen innerhalb der ZRS-Region.



a) Normale Expression des *SHH*-Gens nach Interaktion eines Transkriptionsfaktors (Transelement) mit der ZRS-Region. Nach der Faltung der DNA interagieren die ZRS-Region und *SHH* miteinander und es kommt zur Expression des Gens (durchgezogener waagerechter Pfeil). b) Eine Duplikation (<20kb) innerhalb der ZRS-Region erhöht die Bindungskapazität für einen Transkriptionsfaktor, wodurch es zu einer modifizierten Interaktion zwischen *SHH* und der ZRS-Region kommt. Eine verstärkte Transkription (erhöhte Anzahl an roten Pfeilen) fördert eine stärkere Konzentration an SHH in der ZPA oder ektop (anteriore Part der Extremität), wodurch eine Polydaktylie entstehen kann. c) Unterschiede in den Duplikationsgrößen beeinflussen in einem unterschiedlichen Maße die Loopformierung der DNA. Eine große Duplikation (> 100kb) erschwert die korrekte DNA-Faltung mehr, sodass die ZRS-Region und *SHH* eventuell nicht optimal in Interaktion treten können (linke Abbildung, gestrichelter roter Pfeil). Es kann aber auch eine verstärkte Expression von *SHH* gefördert werden (rechte Abbildung). Durchgezogene rote Pfeile zeigen eine starke Interaktion zwischen der ZRS-Region und *SHH* an. Ein gestrichelter roter Pfeil verdeutlicht eine verminderte Interaktion zwischen ZRS und *SHH*.

Die untersuchten Patienten können dem Typ II der ZRS-assoziierten Syndrome zugeordnet werden (Wieczorek et al. 2010). Typ II umfasst genomische Duplikationen, welche die ZRS-Region beinhalten und vereint das klinische Erscheinungsbild der komplexen Polysyndakylie mit triphalangealen Daumen. Im Vergleich dazu weisen Patienten mit dem LSS-Syndrom zusätzliche nasale Defekte, Brachymesophalangie und teilweise auch mentale Retardierung auf (Laurin et al. 1964; Sandrow et al. 1970; Martin et al. 1993; Kantaputra 2001). Die fazialen Merkmale oder die mentale Retardierung könnten durch Veränderungen innerhalb der Wirkungsweise der ZNS-Enhancer verursacht werden. Die Duplikation könnte die chromosomale Struktur stromaufwärts des Gens so beeinträchtigen, dass die Loopformierung der ZNS-Enhancer beeinflusst wird und dadurch die *SHH*-Expression auch im ZNS nicht korrekt ist. Es könnte aber auch sein, dass neben einer Fehlregulation von *SHH* weitere Signalwege, die mit SHH direkt oder indirekt in Beziehung stehen, in Betracht zu ziehen sind. Die korrekte Expression von *Shh* wird durch verschiedene Signalnetzwerke reguliert und kontrolliert. Neben der direkten Interaktion von Hand2 und Hoxd13 mit der ZRS-Region, stehen auch BMP-Signalmoleküle, Genprodukte der Tbx-Gen-Familie und das Signalmolekül Fgf8 in direkter Interaktion mit Shh. Eine Veränderung in diesem komplexen Netzwerk beeinflusst die interagierenden Signalwege, wodurch die abweichenden klinischen Phänotypen zum PPD-Krankheitsbild erklärt werden können.

In diesem Projekt konnte gezeigt werden, dass ein Spektrum an verschiedenen Syndromen: Syn-/Polydaktylie (SD4), TPT-PS, Tibiafehlbildungen und das LSS mit Aberrationen innerhalb der ZRS-Region assoziiert sind. Bezugnehmend auf Literaturdaten kann postuliert werden, dass die detektierten Aberrationen das räumliche Expressionsmuster sowie die Konzentration von SHH während der Extremitätenentwicklung beeinflussen. Fehlregulationen anderer Signalmoleküle und dadurch bedingte Störungen der Signalkaskaden untereinander, fördern die Entstehung der phänotypischen Variabilität unter den betroffenen Patienten.

In diesem Projekt wurde erstmalig die genetische Ursache für das LSS identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Patienten mit dem LSS die kleinste Mikroduplikation innerhalb der ZRS-Region aufweisen, die bis jetzt im Zusammenhang mit Extremitätenfehlbildungen publiziert wurde.

## 6.2 Aberrationen am *IHH*-Lokus sind mit Syndaktylien und Kraniosynostose verbunden

Indian Hedgehog ist ein wichtiges Signalmolekül während der endochondralen Ossifikation und als solches maßgeblich an der Chondrozyten-Proliferation und -Differenzierung, der kortikalen Knochenentwicklung und Gelenkentstehung beteiligt (Vortkamp et al. 1996; Lai und Mitchell 2005). Funktionsverlustmutationen (loss-of-function Mutationen) im *IHH*-Gen bedingen skelettäre Fehlbildungen, wie Brachydaktylie Typ A1 (BDA1) oder Akrocapitofemorale Dysplasie, gekennzeichnet durch Kleinwuchs und verkürzte Extremitäten, bedingt durch eine fehlgebildete Epiphyse (Zapfenepiphyse) (Hellemans et al. 2003). Ein vollständiger Knockout des *Ihh*-Gens verursacht bei Mäusen eine Störung der Proliferation und Maturation der Chondrozyten sowie der Osteoblasten-Entwicklung, wodurch verkürzte und fusionierte Fingerelemente entstehen (Mundlos 2009). Das klinische Erscheinungsbild der hier untersuchten Patienten weicht von den Phänotypen, die mit einer Funktionsverlustmutation im *IHH*-Gen assoziiert sind, ab. Die Probanden der Familien 1 bis 3 weisen kutane Syndaktylien im Autopod und eine verfrühte Verknöcherung, vornehmlich der sagittalen Schädelnahte, auf (vgl. Kapitel 5.2.1). Die Patienten zeigten Duplikationen in direkter Tandemorientierung innerhalb dieses Lokus. Bei Familie 1 ist das *IHH*-Gen, bei den Familien 2 und 3 nur der aufwärts (5') gelegene genomische Bereich betroffen (vgl. Kapitel 5.2.2). Aufgrund der starken phänotypischen Diskrepanz kann postuliert werden, dass nicht ein Funktionsverlust des *IHH*-Gens die genetische Ursache darstellt, sondern die Steuerung der Genexpression an sich und damit einhergehend das Konzentrationslevel sowie das Expressionsmuster von IHH beeinflusst sein könnte.

Bei allen detektierten Duplikationen ist das benachbarte Gen *NHEJ1*, ein DNA-Reparaturfaktor, beteiligt (Ahnesorg et al. 2006; Buck et al. 2006). Da Patienten mit einer Mutation innerhalb dieses Gens eine Immunschwäche mit Mikrozephalie zeigen (Buck et al. 2006), ein Phänotyp, der in dem hier untersuchten Patientenkollektiv nicht vorliegt, und *Nhej1* keine Expression in den sagittalen Schädelnähten und den Extremitäten zeigt (vgl. Abbildung 31) ist eine Relevanz bei der Entstehung der Syndaktylie in Kombination mit sagittaler Kraniosynostose unwahrscheinlich.

Neben kutanen Syndaktylien der Extremitäten weisen die Patienten eine sagittale Kraniosynostose auf. Eine Kombination von sagittaler Kraniosynostose mit einer kutanen Syndaktylie wird als Kraniosynostose Philadelphia Typ bezeichnet (Robin et al. 1996; Jain et al. 2008). Eine Kombination von Kraniosynostose mit Syndaktylien der Extremitäten ist auch für weitere Syndrome wie z.B. das Pfeiffer- (MIM 101600), Sakati- (MIM 241410), Saethre-Chatzen- (MIM101400) und das Apert-Syndrom (MIM 101200) beschrieben. Als genetische Grundlage bei bisher beschriebenen Kraniosynostose-Syndromen sind Veränderungen innerhalb der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren *FGFR1*, *FGFR2* und *FGFR3* bekannt [Apert, Crouzon- (MIM 123500), Muenke- (MIM 602849) oder Jackson Weiss-Syndrom (MIM 123150)] (Morriss-Kay und Wilkie 2005; Ciurea und Toader 2009). Auch die Gene *TWIST1* (MIM 601622, Saethre-Chatzen-Syndrom MIM 180750) und *MSX2* (MIM 123101, Boston-Typ-Kraniosynostose MIM 604757) konnten mit der Entstehung von Kraniosynostose in Verbindung gebracht werden (Jabs et al. 1993; Ciurea und Toader 2009). Die in diesem Projekt untersuchten Patienten weichen von den aufgezählten Syndromen ab, da sie keine fazialen

Auffälligkeiten und mentalen Retardierungen zeigten. Mutationen in den derzeit bekannten Genen konnten somit ausgeschlossen werden. Die mit Hilfe der Array-CGH gefundenen Aberrationen innerhalb des *IHH*-Lokus in den Familien 2 und 3 können eindeutig mit dem klinischen Phänotyp der Kraniosynostose Philadelphia Typ assoziiert werden (vgl. Kapitel, 5.2.2). Eine direkte Beteiligung von *IHH* an der desmalen Ossifikation sowie der Schädelentwicklung war bisher jedoch unbekannt.

Der Überlappungsbereich (kritische Region) aller betroffenen Patienten beinhaltete drei hochkonservierte Bereiche (vgl. Abbildung 29, Ergebnisteil), wodurch ein erster Hinweis für die Bedeutung dieser nicht kodierenden Region im genetischen Kontext gegeben ist, denn hohe Konservierungen in nicht codierenden Bereichen können auf eine regulatorische Bedeutung im genomischen Kontext hinweisen (Klopocki und Mundlos 2011).

*IHH*, *SHH* und *DHH* sind Mitglieder der Hedgehog-Familie. Wie bereits im ersten Teilprojekt dieser Arbeit beschrieben wurde, ist bekannt, dass die extremitätenspezifische Expression des *SHH*-Gens durch die hochkonservierte ZRS-Region, die ca. 1Mb aufwärts des Gens lokalisiert ist, reguliert wird (Lettice et al. 2003; Sagai et al. 2004). Die Genregulation von *IHH* während der Embryonalentwicklung ist weniger intensiv untersucht und es ist derzeit kein extremitätenspezifischer Enhancer für dieses Gen bekannt. Aufgrund des phylogenetischen gemeinsamen Ursprungs der HH-Gene kann vermutet werden, dass die Organisation der Gen-Loci ähnlich ist und somit auch 5' des *IHH*-Gens ein Enhancer-Element existiert, das die Expression während der Entwicklung maßgeblich steuert.

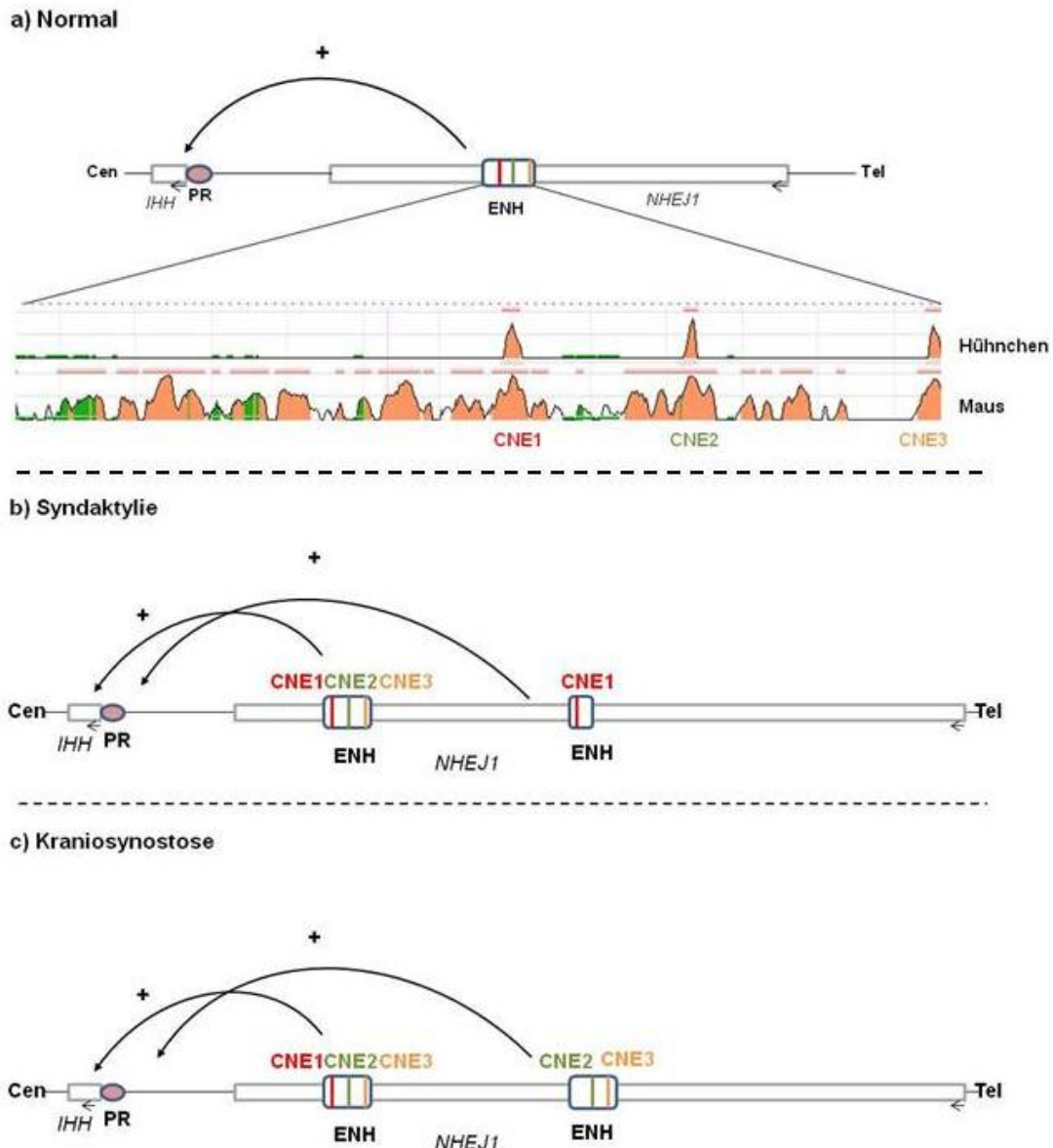
Um die Orthologie der HH-Regulation zu zeigen, wurde der konservierte Bereich der kritischen Region in einen *LacZ*-Reporter-Vektor kloniert und *in vivo* dessen regulatorische Funktion untersucht. Es zeigte sich in den Extremitäten, speziell in den Phalangen, ein übereinstimmendes Expressionsmuster des wildtypisch exprimierten *Ihh* mit dem des Reporter-Gens (vgl. Abbildung 33, Abbildung 34). Auch im Bezug auf die Schädelnähte konnten überlappende Expressionsmuster identifiziert werden (vgl. Abbildung 35). Der Expressionsnachweis von *Ihh* und *Ptch1* an den Schädelnähten im Wildtyp und die bei *Ihh*-Knockout-Mäusen klar erkennbare verringerte Verknöcherung der Kalvarien (vgl. Abbildung 35) zeigen eindeutig, dass das *Ihh*-Gen während der desmalen Ossifikation aktiv und notwendig ist: Da die *LacZ*-Signale zum Teil mit dem wildtypischen *Ihh*-Expressionsmuster überlappten, kann geschlossen werden, dass die konservierten Regionen innerhalb der kritischen Region potenzielle Enhancer-Elemente für *IHH*, sowohl in der Extremitäten- als auch in der Schädelentwicklung darstellen.

Doch wie können Aberrationen 5' des *IHH*-Gens den klinischen Phänotyp der Kraniosynostose Philadelphia Typ hervorrufen?

Mit Hilfe von *LacZ*-Experimenten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die hochkonservierten Bereiche innerhalb der kritischen Region ein regulatorisches Potenzial aufweisen und als potentielle Enhancer des *Ihh*-Gens bezeichnet werden können. Die Ergebnisse der Array-CGH (vgl. Abbildung 29) zeigten, dass bei der Familie 1, die den klinischen Phänotyp der SD1 aufwies, nur ein CNE (CNE1) dupliziert war. Bei den Familien 2 und 3 waren zusätzlich noch das CNE2 bzw. CNE3 von der Aberration betroffen. Die Untersuchung der drei CNEs *in vivo* zeigte *LacZ*-Signale in den Extremitäten, aber auch in den Schädelnähten (vgl. Abbildung 33 und Abbildung 34). Die CNEs scheinen unterschiedliche gewebespezifische regulative Potenziale, analog zu dem *SHH*-Enhancer-Cluster (vgl.

Kapitel 1.4.1.1, Abbildung 7), aufzuweisen. Resultierend aus diesen Ergebnissen kann angenommen werden, dass das CNE1 für den klinischen Phänotyp der Syndaktylie, das CNE2 und CNE3 für die Ausprägung der sagittalen Kraniosynostose verantwortlich sind.

In Abbildung 58 wird ein möglicher Pathomechanismus bezüglich der regulatorischen Wirkung der CNEs auf die *IHH*-Expression und die Entstehung der verschiedenen klinischen Phänotypen postuliert. Diese hypothetischen Annahmen basieren auf den experimentellen Ergebnissen und beziehen sich nur auf die regulatorischen Funktionen der verschiedenen CNEs, die Duplikation von *IHH* (Familie 1) wird in diesem Modell nicht berücksichtigt. Im Normalfall (vgl. Abbildung 58 a) wird *IHH* durch den Promoter (PR) und einen Enhancer (ENH) in seiner gewebespezifischen Expression beeinflusst, sodass die benötigte Menge an Transkript (Transkriptmenge = +) im Zielgewebe produziert wird. Eine Duplikation die den Enhancer-Bereich umfasst kann die Expression positiv verändern (gesteigerte Transkriptmenge = ++), was sich wiederum positiv auf den Signalweg und die Transkription von *IHH*-spezifischen Zielgenen auswirkt. Diese gesteigerte Expression der Zielgene, die für die Osteoblastenproliferation und -differenzierung verantwortlich sind, resultiert in einer vorzeitigen Differenzierung zum endgültigen Knochen. CNE1 (5' des *IHH*-Gens) könnte für die *IHH*-Expression in der Extremitätenknospe (vgl. Abbildung 58 b), die weiter distal gelegenen CNEs (CNE2 und CNE3) könnten einzeln oder in Kombination für die Expression von *IHH* an den Schädelnähten verantwortlich sein (vgl. Abbildung 58 c). Die Duplikationen dieser CNEs bedingen dann eine gewebespezifische Misexpression von *IHH*: CNE1 ist damit für die Syndaktylie, CNE2 und CNE3 für die Kraniosynostose verantwortlich.



**Abbildung 58 Schematische Darstellung der Regulation der gewebespezifischen *IHH*-Expression und Erklärungsansatz für die Entstehung der klinischen Phänotypen.**

a) Normale Expression (Transkriptmenge = +) des *IHH*-Gens, gesteuert durch die Interaktion des Gens mit dem basalen Promoterbereich (PR) und dem potenziellen Enhancerbereich (ENH). b) Eine Duplikation des CNE1 erhöht gewebespezifisch die Transkriptmenge des *IHH*-Gens (++) in den Extremitäten, und führt zum Phänotyp der Syndaktylie. c) CNE2 und CNE3 fördern einzeln oder in Kombination die Expression von *IHH* in den Schädelnähten. Duplikation innerhalb dieser Region führen zu einer gesteigerten Transkriptmenge (++) und der klinische Phänotyp der sagittalen Kraniosynostose entsteht; Ellipse = Promoterbereich; Viereck = Enhancer; waagerechter Pfeil = Transkriptionsstart und Richtung; Pluszeichen steht für die Expression des *IHH*-Gens.

Funktionsverlustmutationen innerhalb des *IHH*-Gens sind intensiv untersucht worden und führen zu dem Krankheitsbild der Brachydaktylie Typ A1 (BDA1) oder dem klinischen Erscheinungsbild der akrocapitofemorale Dysplasie (Hellemans et al. 2003). Aberrationen innerhalb des *IHH*-Lokus sind bisher kaum untersucht. Neben den hier beschriebenen Duplikationen ist bei Patienten nur eine weitere Duplikation beschrieben. Yuksel-Apak et al. (2012) untersuchten einen Patienten mit

Akrokallal-Syndrom (MIM 200990), der eine 900 kb Duplikation innerhalb des *IHH*-Lokus zeigte. Neben kraniofazialen Fehlbildungen (Makrozephalie, Agenesie des Corpus callosum) ist in diesem Fall eine starke Polysyndaktylie der Hände und Füße beschrieben. Das Mausmodell *Doublefoot* (*Dbf*) weist ebenfalls eine starke Polydaktylie und kraniofaziale Fehlbildungen auf, die sich in einem vorgewölbten Kraniaum und einer verbreiterten Schnauze äußern. *Dbf* ist mit einer 600 kb Deletion am *Ihh*-Lokus assoziiert (Babbs et al. 2008). Diese Deletion ist mit einer ektope *Ihh*-Expression und einer erhöhten Gli3-Aktivator Konzentration in der anterioren Hälfte der sich entwickelnden Extremität assoziiert (Yang et al. 1998). Es wird angenommen, dass ein *Ihh*-Repressor durch die Deletion verloren geht, wodurch die ektope Expression von *Ihh* gefördert wird (Yang et al. 1998). Die *Dbf* Deletion liegt im Vergleich zu den Duplikationen weiter distal. Ein Patient der Familie 3 weist ebenfalls eine präaxiale Polydaktylie auf. Die Theorie der Eliminierung eines Repressors bzw. dessen verringerte Aktivität in Familie 3, hervorgerufen durch eine erhöhte Distanz zum *IHH*-Gen via Duplikation, könnte den abweichenden Phänotyp dieses Patienten erklären.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen, dass der *IHH*-Lokus und die chromosomale Region 2q35 für eine Vielzahl an klinischen Phänotypen verantwortlich ist, vornehmlich Fehlbildungen an den Extremitäten und des Schädels. In diesem Projekt konnte erfolgreich gezeigt werden, dass CNEs eine Regulatorwirkung auf die Expression von *IHH* haben und dass Duplikationen dieser CNEs zu einer Syndaktylie der Hände und Füße zum Teil in Kombination mit sagittaler Kraniosynostose (Kraniosynostose Philadelphia Typ) führen. Die genaue regulatorische Funktion der einzelnen CNE für die Entstehung der Schädelanomalie bzw. der Extremitätenfehlentwicklung bleibt zu klären. Es konnten in diesem Projekt erstmalig potentielle Enhancer des *Ihh*-Gens nachgewiesen werden, analog zu der für *SHH* bekannten Regulation durch long-range Enhancer wie die ZRS-Region.

### 6.3 Duplikationen von *BHLHA9* sind mit dem klinischen Phänotyp der Ektrodaktylie und Tibia Hemimelie (SHFLD) assoziiert, vererbt in einem nicht-Mendelschen Vererbungsmodus

In diesem Teilprojekt wurden Patienten mit einem unterschiedlichen Schweregrad der Ektrodaktylie (SHFM), teilweise in Kombination mit einer Tibia Hemimelie (SHFLD), genomweit auf Kopienzahlveränderungen untersucht. In einer großen brasilianischen Familie mit SHFLD konnten Lezirovitz et al. (2008) mittels Kopplungsanalysen den genetischen Defekt auf die chromosomale Region 17p13.1-17p13.3 einschränken (SHFLD3). Bei Patienten aus dieser Familie gelang im Rahmen dieser Arbeit der Nachweis einer Duplikation von 110 kb auf dem Chromosom 17p13.3 (vgl. Abbildung 38, Familie 16). Patienten aus weiteren 16 Familien zeigten Duplikationen variabler Größe in Tandemorientierung auf dem Chromosom 17p13.3, die mittels qRT-PCR bestätigt und in ihrer Größe näher definiert werden konnten. Eine kanadische Arbeitsgruppe konnte 2011 ebenfalls Duplikationen auf dem Chromosom 17p13.3 mit dem klinischen Phänotyp SHFLD in Zusammenhang bringen (Armour et al. 2011). Folglich liegt der Schluss nahe, dass die detektierten Aberrationen in unserem Patientenkollektiv mit dem klinischen Phänotyp der Ektrodaktylie (SHFM/ SHFLD) assoziiert sind.

Es ist bekannt, dass SHFM- und SHFLD-Patienten intra-, interfamiliär sowie zwischen den einzelnen betroffenen Gliedmaßen innerhalb eines Individuums einen hohen Variabilitätsgrad bezüglich der Expressivität (phänotypische Ausprägung) zeigen. Der Phänotyp kann nur einzelne Finger betreffen (Oligodaktylie), sich in einer Syndaktylie äußern oder teilweise auch zu einer Monodaktylie führen (Ausbildung eines einzelnen Fingers) (Duijf et al. 2003). Eine nähere Betrachtung der Phänotypen aller untersuchten Patienten der 17 Familien in diesem Projekt zeigte ebenfalls eine hohe Variabilität bezüglich der Ektrodaktylie-Ausprägung (vgl. Tabelle 2, Anhang). Die Ektrodaktylie konnte in ca. 25% nur an einer Extremität festgestellt werden, 27% zeigten die schwerste Ausprägung d.h. alle vier Gliedmaßen waren betroffen. Das Vorkommen einer zusätzlichen Tibiaaplasie/ hypoplasie konnte bei insgesamt 12 von 17 Familien beobachtet werden, wobei in nur 6 Fällen eine bilaterale Betroffenheit vorlag. Die Duplikationen innerhalb der Familien variierten stark in ihrer Größe von 55kb bis 594kb. Zwischen dem Schweregrad des Krankheitsbildes und der Duplikationsgröße konnte jedoch keine Korrelation gefunden werden. Die Größe der Duplikation scheint somit nicht ausschlaggebend für den Schweregrad der Ektrodaktylie zu sein.

Bei der Untersuchung weiterer Familienangehöriger wurden die Duplikationen innerhalb der chromosomalen Region 17p13.3 sowohl bei betroffenen als auch bei klinisch nicht betroffenen Familienangehörigen (Überträger) nachgewiesen, d.h. es liegt eine unvollständige Penetranz vor. Zusätzlich war ein starker Unterschied zwischen den Geschlechtern festzustellen (vgl. Abbildung 40, Ergebnisteil). Von den insgesamt 82 untersuchten Individuen waren 40 weiblich und 42 männlich. Von den weiblichen Probanden waren 70% Überträger und nur 30% klinische Merkmalsträger. Bei den männlichen Personen war die Verteilung zwischen Überträgern und Betroffenen vice versa: 70% zeigten Merkmale der Ektrodaktylie, 30% dagegen waren ohne phänotypische Auffälligkeiten.



Eine nähere Auswertung des Schweregrades der Ektrodaktylie zwischen weiblichen und männlichen Patienten konnte für 31 Fälle vorgenommen werden. Es zeigte sich, dass die Wahrscheinlichkeit für eine Betroffenheit aller vier Gliedmaßen bei den weiblichen Patienten im Vergleich zu männlichen Patienten stärker ausgeprägt war (39% vs. 21%). Die Männer wiesen dagegen im Durchschnitt eine höhere Wahrscheinlichkeit für die Betroffenheit nur einer Extremität auf (35%, Frauen: ca. 23%), wobei zwischen Hand und Fuß keine Präferenzen vorlagen. Die Verteilung der Geschlechter bei zwei bzw. drei betroffenen Extremitäten war jeweils annähernd gleich (ca. 20%). Weibliche Patienten mit einer 17p-Duplikation zeigten eine gesteigerte Präferenz für bilaterale tibiale Defekte, unilaterale tibiale Defizite waren dagegen zwischen den Geschlechtern ähnlich verteilt. Diese Daten verdeutlichen, dass weibliche Patienten mit einer Duplikation auf dem Chromosom 17p13.3 eine stärkere Ausprägung des Ektrodaktylie-Phänotyps bezüglich der Anzahl an betroffenen Gliedmaßen zeigten, mit einer hohen Präferenz zu vier betroffenen Gliedmaßen. Die Entstehung von bilateralen tibialen Defekten ist begünstigt.

Es scheint, dass für die Ausprägung der Ektrodaktylie neben einer Duplikation auf 17p13.3 noch ein weiterer Faktor benötigt wird, der den Unterschied zwischen den Geschlechtern und die reduzierte Penetranz erklärt (modifizierender Faktor). Unter dem Begriff des modifizierenden Faktors versteht man zusätzliche Defekte (z.B. genetische oder hormonelle) bei einem Patienten mit einer bereits detektierten Veränderung im Genom, die eine nicht nach Mendel vererbte Erkrankung und deren Ausprägungsgrad erklären können. Das Thrombozytopenie Radiusaplasie (TAR) -Syndrom (MIM 274000) ist charakterisiert durch eine bilaterale Radiusaplasie und Thrombozytopenie (Mangel an Blutplättchen) und stellt ebenfalls eine Erkrankung dar, bei der die unvollständige Penetranz und das Geschlechterverhältnis bezüglich der Betroffenheit durch einen modifizierenden Faktor erklärt werden konnte. Patienten mit dem TAR-Syndrom weisen eine Deletion innerhalb des Lokus 1q21.1 auf und zeigen auf dem zweiten Allel zusätzliche nicht-codierende SNPs innerhalb der regulatorischen Bereiche von *RMB8A*, das für eine geregelte Produktion von Thrombozyten verantwortlich ist. Folglich ist der modifizierende Faktor bei dieser Erkrankung nicht auf dem Deletionschromosom oder einem anderen Locus im Genom lokalisiert, sondern auf dem zweiten Allel und äußert sich durch zwei verschiedene regulatorische Varianten von *RMB8A* (Albers et al. 2012).

Wie bereits erwähnt muss auch in dem hier untersuchten Patientenkollektiv ein modifizierender Faktor beteiligt sein, der die unvollständige Penetranz und das Geschlechterverhältnis bezüglich der phänotypischen Ausprägung erklärt. Es kann auf genomischer Ebene, aber auch auf hormoneller Ebene bezüglich des modifizierenden Faktors spekuliert werden.

Der Hormonspiegel an weiblichen (Östrogenen) bzw. männlichen (Androgenen) Hormonen könnte die unterschiedliche Expressivität der Ektrodaktylie zwischen den Patienten erklären. In der 7. SSW kommt es zur Verknöcherung der langen Röhrenknochen und parallel zur Ausdifferenzierung des gonadalen Geschlechts. Wissenschaftler aus Florida konnten kürzlich zeigen, dass das Verhältnis zwischen dem Zeige- und dem Ringfinger von dem hormonellen Milieu während der Schwangerschaft abhängig ist. Es konnten die spezifische Rezeptoren für die Sexualhormone an den Fingerelementen nachgewiesen werden (Zheng und Cohn 2011). Eventuelle Diskrepanzen zwischen der Östrogenrezeptoren-/ Androgenrezeptorenanzahl an den sich entwickelnden Gliedmaßen in dem

untersuchten Patientenkollektiv und Aktivitätsunterschiede der Sexualhormone könnten die Entwicklung einer Tibiaaplasie/ Hypoplasie erklären (Ulfig, 2005).

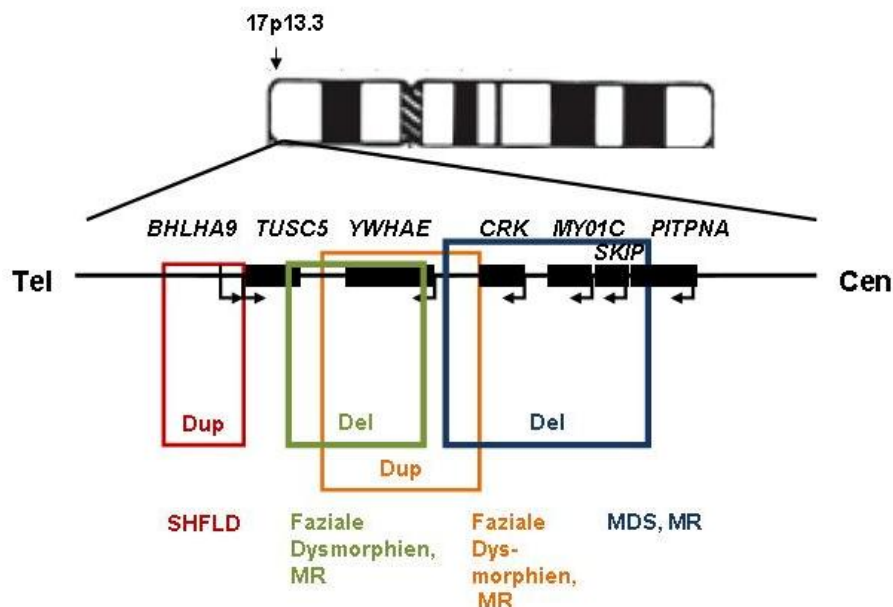
Die Stammbäume zeigen, dass sowohl paternale als auch maternale Vererbung des genetischen Defekts vorliegen (vgl. Abbildung 63, Anhang). Ein Imprinting-Effekt (epigenetische Prägung) kann deshalb ausgeschlossen werden.

Innerhalb der kritischen Region (Überlappungsbereich aller detektierten Duplikationen) ist das Gen *BHLHA9* sowie dessen potenzieller Promoterbereich lokalisiert (vgl. Abbildung 38). Die Transkriptionseinheit eines Gens setzt sich aus dem codierenden Bereich und dem regulatorischen Bereich zusammen (Kleinjan und van Heyningen 2005). Veränderungen im regulatorischen Bereich könnten analog zu dem beim TAR-Syndrom identifizierten Mechanismus in diesem Fall ebenfalls den modifizierenden Faktor darstellen. Um die regulatorische Region von *BHLHA9* experimentell zu identifizieren, wurden Luziferase-Assays mit einem promoterlosen Vektor durchgeführt (vgl. Kapitel 5.8). *In silico* Analysen des Bereichs stromaufwärts des Gens identifizierten vier hoch konservierte Bereiche. Diese Bereiche wurden einzeln und in verschiedenen Kombinationen auf ihr regulatorisches Potential mit Hilfe des Luziferase-Assays untersucht (vgl. Abbildung 51). Die Ergebnisse zeigten, dass drei der vier konservierten Bereiche ein regulatorisches Potenzial aufwiesen. Die Transkriptionseinheit von *BHLHA9* setzt sich folglich aus basalen (bis ca 1000bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts) und distalen Promoterelementen (bis 3000bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts) zusammen. Weiter entfernte Enhancer-Elemente sind möglich, doch zum derzeitigen Standpunkt noch nicht identifizierbar. Der ca. 2287bp vom Transkriptionsstart lokalisierte Bereich (Prg\_TATA\_b) induziert die stärkste Luziferase Aktivität. In dieser Region liegen potenzielle Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor AP2. AP2-Proteine sind involviert in Zellwachstumsprozesse, Zelldifferenzierung und Apoptose. AP2-Missense-Mutationen sind assoziiert mit dem Char-Syndrom, das u.a. durch Handanomalien (Aplasie oder Hypoplasie der Kleinfinger-Mittelphalanx) gekennzeichnet ist (Hilger-Eversheim et al. 2000). Es kann spekuliert werden, dass Veränderungen innerhalb dieser Region die Bindungsaffinität von AP2 verändern, wodurch die Expression von *BHLHA9* beeinträchtigt wird.

Nach der Definierung der Transkriptionseinheit von *BHLHA9* wurden die Indexpatienten auf mögliche genomische Veränderungen innerhalb der regulatorischen Elemente untersucht. Es zeigte sich, dass keine genomischen Veränderungen, die den modifizierenden Faktor bezüglich der Geschlechterverhältnisse der Ektrodaktylieausprägung erklären könnten, vorlagen. Ein weiterer genetischer Defekt innerhalb der chromosomalen Region 17p13.3 oder an einem anderen Locus im Genom könnte die Geschlechterverhältnisse bezüglich der Entstehung der Ektrodaktylie erklären. Die Grundlage des ungleichen Geschlechterverhältnisses kann zum derzeitigen Stand nur spekulierend betrachtet werden. Insgesamt lässt sich feststellen, dass bei weiblichen betroffenen Duplikationsträgern im Vergleich zu männlichen Patienten der Phänotyp meist schwerer ausgeprägt ist. 60% der betroffenen Patienten mit einer 17p-Duplikation wiesen tibiale Defekte auf, ein starkes Indiz dafür, dass eine Duplikation innerhalb dieser Region die Entstehung tibialer Defekte fördert.

Die Größe und Lage der Duplikationen ist zwischen den untersuchten Familien jeweils verschieden, doch weisen alle detektierten Aberrationen einen gemeinsamen Überlappungsbereich von ca. 11,8kb

auf (chr17: 1117153-1128992, hg18). Dieser Bereich ist in der Datenbank für genomische Variationen (<http://projects.tcag.ca/variation/>) nicht aufgeführt und ist bis jetzt auch nicht mit dem klinischen Phänotyp SHFM/ SHFLD assoziiert worden. Mikrodeletionen in der chromosomalen Region 17p13.3 sind hingegen mit dem klinischen Phänotyp des Miller-Dieker-Syndroms (MDS) assoziiert (Bruno et al. 2010). Das Miller-Dieker-Syndrom ist phänotypisch gekennzeichnet durch mentale Retardierung (MR), Entwicklungsstörungen und Autismus. Neben Mikrodeletionen sind bei Patienten mit mentalen Retardierungen, Entwicklungsstörungen und Autismus auch Duplikationen innerhalb der chromosomalen Region 17p13.3 beschrieben worden (Bruno et al. 2010). Die bisher beschriebenen Patienten mit MDS, mentaler Retardierung oder Entwicklungsstörungen mit Aberrationen im Bereich 17p13.3 zeigen keine Extremitätenfehlbildungen. Die kritische Region in unserem Patientenkollektiv überschneidet sich nicht mit den bereits detektierten Aberrationen auf dem telomeren Abschnitt des Chromosoms 17 (vgl. Abbildung 59).



**Abbildung 59** Übersicht der kritischen Region auf 17p13.3, welche mit neuronalen und extremitätenspezifischen Phänotypen in Assoziation gebracht werden.

Die farbig markierten Boxen kennzeichnen kritische Regionen für das Miller-Dieker-Syndrom (MDS, blau), mentale Retardierung und Autismus (MR, grün, orange) sowie faziale Dysmorphien (grün, orange). Die kritische Region des Patientenkollektivs mit SHFM/ SHFLD (rot) überschneidet sich nicht mit den anderen kritischen Regionen (nach Bruno et al., 2010).

Da das Gen *BHLHA9* als einziges Gen in der kritischen Region für SHFLD lokalisiert ist, ist eine Bedeutung dieses Gens für die Skelettentwicklung im Allgemeinen und bei einer Veränderung dieses Gens für die Entstehung der Ektrodaktylie und der tibialen Defekte sehr wahrscheinlich. *BHLHA9* kodiert für einen potenziellen Transkriptionsfaktor, aus der Helix-Loop-Helix (HLH)-Transkriptionsfaktorfamilie. Das Protein weist neben der HLH-DNA-Bindedomäne zusätzlich ein basisches Bindemotiv und eine prolinreiche Region auf, welche für die DNA-Bindung bzw. die korrekte

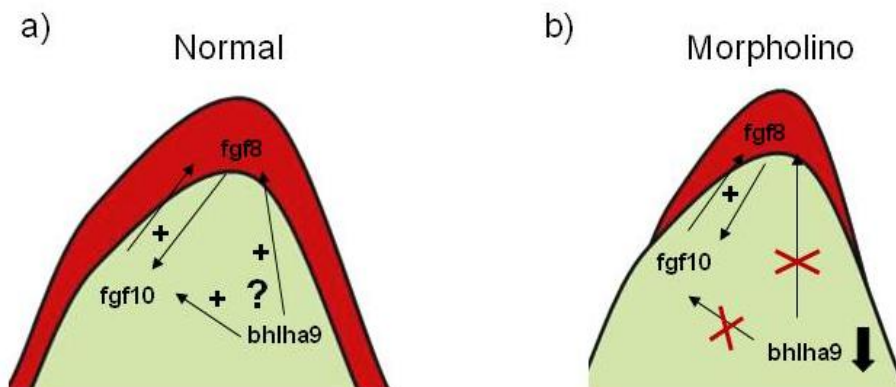
Proteinfaltung verantwortlich sind. Man unterscheidet bei BHLH-Proteinen unterschiedliche Typen, welche von A bis F bezeichnet werden. Typ A- und B-Proteine binden an E-Box Sequenzen innerhalb der DNA (Sequenzmotiv: CANNTG). Proteine des Typs C erkennen die Bindemotive ACGTG oder GCGTG und weisen stromabwärts der HLH-Domäne eine weitere DNA-spezifische Erkennungsdomäne auf (PAS, **P**eriod, **A**ryl hydrocarbon nuclear receptor translocator, **S**ingle-minded) auf. Proteine des Typs D besitzen kein basisches Bindemotiv. Sie bilden Heterodimere mit Proteinen der Gruppe A. BHLHE-Proteine binden an N-Boxen (Bindemotiv: CACGCG, CACGAG) und weisen eine zusätzliche Domäne auf (Orange-Domäne). Die Proteine des Typs F interagieren zusätzlich über eine COE-Domäne mit der DNA, welche aber auch die Dimerisierung fördert. HLH-Proteine liegen meist als Homodimere oder Tetramere vor und sind an diversen regulatorischen Signalwegen während der Entwicklung beteiligt. BHLH-Proteine, wie z.B. Hand2 und Twist1 wirken während der Extremitätenentwicklung mit (Jones 2004).

Über das Expressionsmuster und die Funktion von BHLHA9 ist derzeit nichts bekannt. Nach der Identifizierung der homologen Bereiche für das *BHLHA9*-Gen im Maus-, Hühnchen- und Zebrafisch-Genom wurde dessen Funktion in *in vitro* und *in vivo* Experimenten näher untersucht. Um einen ersten Eindruck über die Expression von *Bhlha9* während der Embryonalentwicklung und besonders während der Extremitätenentwicklung zu bekommen, wurden RNA *in situ* Experimente an Embryonen aus verschiedenen Spezies durchgeführt (Maus, Hühnchen, Zebrafisch, vgl. Abbildung 41). Es zeigte sich, dass dieses Gen während der Extremitätenentwicklung in der Progresszone (PZ) exprimiert wird (vgl. Vibratonschnitte, Abbildung 42 und Abbildung 43). Die PZ ist unterhalb der AER befindlich und besteht aus einem mesenchymalen undifferenzierten Zellpool. Dieser Zellpool, zusammen mit der AER, ist vor allem für die Entwicklung der Skelettelemente sowie anderer Gewebekomponenten von proximal nach distal verantwortlich. Mitglieder der Fgf-Familie sind während dieses Entwicklungsprozesses maßgeblich für den geregelten Ablauf verantwortlich. Die AER steht mit der PZ in einem positiven Feedback-Loop. Die Signalmoleküle Fgf4, Fgf8, Fgf9 und Fgf17 werden von der AER exprimiert und beeinflussen positiv die Zellteilung (Proliferation) und/ oder die Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zellzustands in der PZ. Fgf10 wird von den distalen Mesenchymzellen der PZ exprimiert und durch Fgf8 in seiner Expression gefördert. Im Gegenzug beeinflusst Fgf10 die Aufrechterhaltung der AER (vgl. Kapitel 1.4.1) (Lewandoski et al. 2000; Zeller et al. 2009). Transkriptionsfaktoren des BHLH-Typs sind in Prozesse der Zellproliferation, -differenzierung sowie verschiedene Entwicklungsprozesse während der Embryogenese (u.a. Neurogenese, Myogenese, Herzentwicklung) involviert (Stevens et al. 2008). Das Expressionsmuster von *Bhlha9* gibt einen ersten Hinweis auf eine mögliche Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors während der Zellproliferation in der PZ.

Die Ergebnisse der funktionellen Analysen im Zebrafisch unterstützen die Annahme, dass *Bhlha9* eine Aufgabe während der frühen Extremitätenentwicklung ausübt (vgl. Kapitel 4.6). Die Pektoralflossenentwicklung der Zebrafische zeigt eine hohe Übereinstimmung bezüglich der Signalwege zur murinen Extremitätenentwicklung. Ein Knockdown von *bhlha9* zeigte eine starke Längenreduktion der Pektoralflossen, im Vergleich zum Wildtyp (vgl. Abbildung 44). Die Pektoralflossen in den behandelten Zebrafischen waren um die Hälfte verkürzt und zeigten eine

kegelförmige Gesamtstruktur (vgl. Abbildung 48). Aufgrund dieser Reduktionsdefekte waren die Fische in ihrer Motorik gestört und die Fortbewegung erfolgte strudelnd und/ oder kreisend. Die RNA *in situ* Hybridisierung von Morpholino-behandelten Zebrafischen im Vergleich zum Wildtyp zeigte, dass die spezifischen Zonen/ Regionen, die während der Extremitätenentwicklung ausgebildet werden, auch in den behandelten Zebrafischen existent waren. Die AER, die ZPA sowie die Expression von *bmp2b* und *bmp4* waren an den entsprechenden Lokalisationsorten zu finden (vgl. Abbildung 50). Die Flosseninduktion an sich ist gegeben, doch können vermutlich aufgrund von Interaktionsstörungen zwischen der PZ und der AER die Proliferation und das damit verbundene Längenwachstum nicht aufrechterhalten werden.

Die RNA *in situ* Experimente demonstrierten, dass die *fgf8* Expression in den Morpholino-behandelten Zebrafischen gestört ist (vgl. Abbildung 50). Anstatt einer Expression im Bereich der gesamten AER ist eine starke Konzentrierung von *fgf8* im distalen Bereich der Pectoralflosse zu beobachten, anterior und posterior ist für *fgf8* hingegen nur eine reduzierte Expression nachweisbar. *fgf10* steht in einem positiven Feedback Loop mit *fgf8*, wodurch die Proliferation und der undifferenzierte Zellzustand der Zellen in der PZ aufrechterhalten wird. Ein Knockdown von *bhlha9* beeinflusst direkt oder indirekt (über *fgf10*) die Expression von *fgf8* und resultiert in dem beschriebenen veränderten Expressionsmuster dieses Gens. In der Folge wird die Aufrechterhaltung der AER-Struktur gestört und die Proliferation der Zellen innerhalb der PZ reduziert. Die kegelförmige Struktur der Pectoralflosse bei den Morpholino-behandelten Zebrafischen lässt sich folglich durch eine reduzierte Interaktion zwischen der PZ und der AER erklären (vgl. Abbildung 60). Es kann spekuliert werden, dass *bhlha9* während der pectoralen Flossenentwicklung als positiver Transkriptionsfaktor fungiert, der die Proliferation in der PZ über eine direkte oder indirekte Interaktion mit *fgf8*/ *fgf10* beeinflusst.



**Abbildung 60 Entstehungsmechanismus einer verkürzten Pectoralflosse durch einen Knockdown von *bhlha9*.**

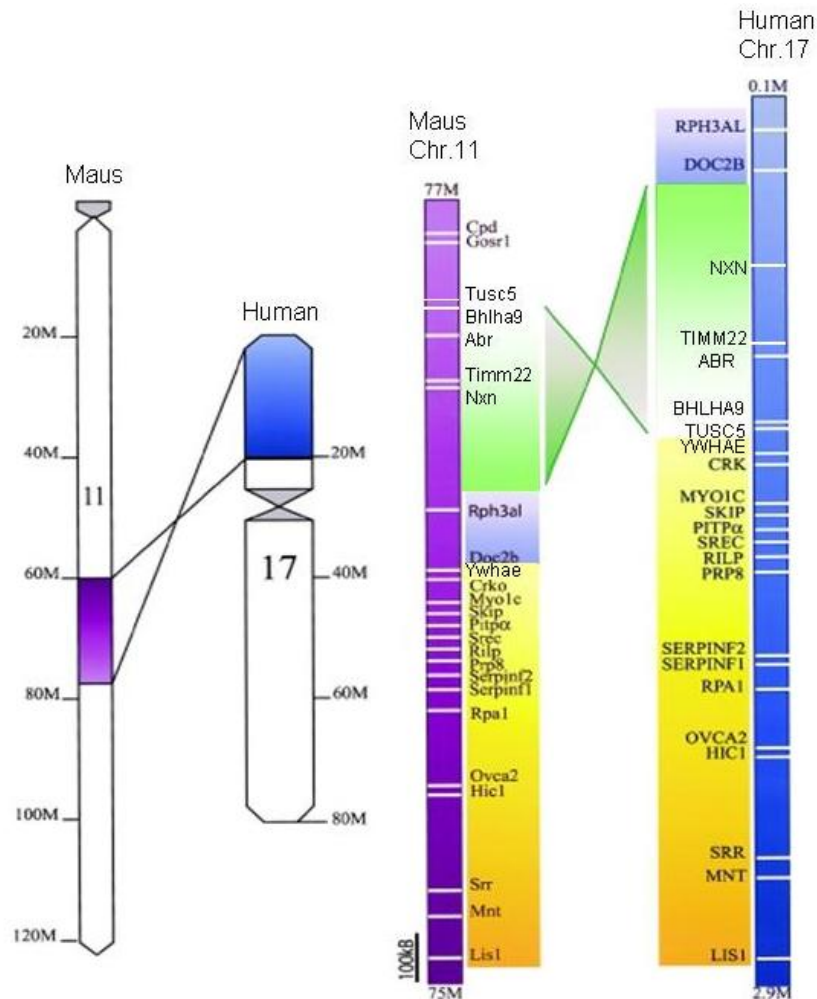
a) Die apikale ektodermale Randleiste (AER, rot) und die Progresszone (PZ, grün) sind maßgeblich für das Längenwachstum der Pectoralflosse verantwortlich. Ein positiver Feedback Loop zwischen *fgf10* und *fgf8* fördert den Erhalt des undifferenzierten Zellzustandes innerhalb der PZ sowie deren Proliferation. *bhlha9* wird in der PZ exprimiert und könnte die *fgf8* und/oder *fgf10* Expression positiv (+) beeinflussen. b) Ein Knockdown von *bhlha9* führt zu einem veränderten Expressionsmuster von *fgf8* und beeinflusst die Interaktion zwischen *fgf8* (AER) und *fgf10* (PZ), wodurch die Ausbildung der AER beeinträchtigt wird. Durch die Fehlentwicklung der AER und die veränderte Expression von *fgf8*

und/oder *fgf10* wird die Zellproliferation negativ beeinflusst und eine verkürzte und kegelförmige Pectoralflosse entsteht.

Eine Untersuchung älterer Stadien zeigte, dass die Wirkung des Morpholinos mit zunehmender Zeit, wie erwartet, nachlässt, da durch Zellteilungsprozesse die Konzentration des injizierten Morpholinos geringer wird (vgl. Abbildung 46). Bei geringer Konzentration des *bhlha9*-Morpholinos, kann das Gen wieder ohne Beeinträchtigung exprimiert werden und somit seine Funktion in der PZ aufnehmen, wodurch ein gesteigertes Längenwachstum der Zebrafische nach 5 Tagen zu erklären ist. Das Längenwachstum der Pectoralflosse nach 7 Tagen entspricht fast annähernd dem Wildtyp (vgl. Abbildung 46, Abbildung 47).

Die Hypothese, dass eine Störung der AER-Aufrechterhaltung das Längenwachstum und die Formgebung der Pectoralflosse bei den behandelten Zebrafischen beeinflusst, wird durch unterschiedliche SHFM-Mausmodelle unterstützt (Duijf et al. 2003). Die Signale, die von der AER an die umgebenden Gewebe abgegeben werden, sind für das Längenwachstum und die korrekte Musterausbildung der Extremität verantwortlich (Zeller et al. 2009). Eine Störung der AER-Funktion und damit einhergehend eine Beeinträchtigung der Fgf-Signale bedingt im Mausmodell die Entstehung einer Ektrodaktylie. Die simultane Deletion der Gene *Dlx5* und *Dlx6* in der Maus, ein Modell für SHFM1, führt zu einem Verlust an Zellen im medianen Bereich der AER, und reduzierter Proliferation (Crackower et al. 1998).

Die chromosomale Region 17p13.3, welche in unserem Patientenkollektiv betroffen ist, umfasst maximal 656kb (chr17: 649,335-1306294, hg18) und enthält die Gene *NXN*, *TIMM22*, *ABR*, *BHLHA9*, *TUSC5*, *YWHAE* und *CRK*. Die orthologen Gene sind im murinen Genom auf dem Chromosom 11B5 im mittleren Part lokalisiert (vgl. Abbildung 61). Eine genauere Betrachtung dieser chromosomalen Region zeigt, dass sich die Anordnung dieser Gene während der Evolution zwischen Mensch und Maus durch eine Inversion und zusätzliche abweichende Inserierung eines Teilabschnitts (*RPH3AL*, *DOC2B*) verändert hat. Die Gene *Nxn*, *Timm22*, *Abr*, *Bhlha9* und *Tusc5* bilden ein Cluster (chr11B5: 76070700-76512166, mm8) und sind im telomeren Bereich der chromosomalen Region 11B5 lokalisiert. Die Gene *Crk* und *Ywhae* liegen, im Gegensatz zum humanen Genom, invertiert und zum Centromer orientiert vor (chr11B5:75492761-75579347, mm8) (Yingling et al. 2003).



**Abbildung 61 Vergleich der Anordnung der Gene der chromosomalen Region 17p13.3 mit der orthologen Region des murinen Chromosoms 11. Die Farben kennzeichnen die orthologen Bereiche auf den jeweiligen Chromosomenabschnitten (nach Yingling et al. 2003).**

Aufgrund dieser Syntenieauflösung im murinen Genom ist es sehr schwer, die Entstehung der Ektrodaktylie mit Hilfe eines Mausmodells nachzuvollziehen. Wenn nur das Gen *Bhlha9* für die Ektrodaktylie-Entstehung verantwortlich sein sollte, könnte dies im Mausmodell ohne Probleme untersucht werden, aber ein zusätzlicher Positionseffekt würde die Erforschung maßgeblich erschweren.

Um die Konsequenz einer Duplikation von *Bhlha9* beurteilen zu können, wurde unter der Verwendung von modifizierten ES Zellen (C2 Zellen, vgl. Kapitel 4.8) eine zusätzliche Kopie des *BHLHA9*-Gens mit seinem potenziellen Promoterbereich in den *CoIA1* Locus integriert. Mit Hilfe dieses Versuchsansatzes lässt sich schnell und eindrücklich zeigen, ob die Entstehung der Ektrodaktylie durch eine zusätzliche Kopie des Gens, also einen reinen Dosisseffekt gefördert wird, oder ob es sich um einen Positionseffekt handelt und zusätzliche Regionen innerhalb der duplizierten Region benötigt werden. Eine zusätzliche Kopie des Gens auf dem *CoIA1* Locus zeigte keinen veränderten Phänotyp in den Mäusen (vgl. Abbildung 54). Das Nichtvorhandensein eines Extremitäten-Phänotyps bei den untersuchten Mäusen kann unterschiedliche Gründe haben. Das Gen *Bhlha9* mit seinem endogenen

Promoterbereich wurde zwar in den *CoIA1* Locus kloniert, doch ist die Aktivität des Promoters an diesem Locus nicht gewährleistet. Es wäre möglich, dass der Promoter während der Extremitätenentwicklung (E9.5-E11.5) am *CoIA1*-Locus nicht aktiv ist, da seine endogene cis-regulatorische Umgebung fehlt. Weiterhin bleibt unklar, ob die Mäuse ein erhöhtes *Bhlha9*-Level zeigen. Um dies festzustellen, müsste die RNA der Vorder- und Hinterextremitäten modifizierter Mäuse sowie von Wildtypen isoliert werden und der quantitative Nachweis an *Bhlha9*-Transkript über qPCR oder des Proteins (Western Blot Verfahren) durchgeführt werden.

Ein weiterer Diskussionsaspekt ist der Positionseffekt. RNA *in situ* Hybridisierungen der benachbarten Gene zeigten teilweise überlappende Expressionsmuster mit *Bhlha9* (vgl. Abbildung 55). Diese Gene sind bis jetzt nicht näher bezüglich der Extremitätenentwicklung untersucht worden, doch kann eine Beteiligung nicht ausgeschlossen werden. Die telomere Region 17p13.3 könnte ein Cluster von extremitätenspezifischen Genen darstellen und eine Aberration innerhalb dieser Region könnte einen Funktionsverlust hervorrufen. Es kann spekuliert werden, ob die Gene *Nxn*, *Abr*, *Timm22*, *Bhlha9*, *Tusc5* alle von einem gemeinsamen extremitätenspezifischen Enhancer in ihrer Transkription beeinflusst werden. Dieser spezifische Enhancer könnte innerhalb der kritischen Region befindlich sein oder durch Aberrationen in seiner regulativen Funktion beeinträchtigt werden. Die Gene *Crk* und *Ywhae* können bezüglich einer Beteiligung der Ektrodakylie-Entstehung ausgeschlossen werden. Sie zeigten keine eindeutige Expression in den Extremitäten. Das Gen *Ywhae* weist eine ubiquitäre Expression im ektodermalen Gewebe auf, was eine Beteiligung dieses Gens an der Entstehung für Ektrodakylie abschwächt. Um zu untersuchen, ob die benachbarten Regionen zu *Bhlha9* verantwortlich für die Entstehung der Ektrodakylie mit verschobenem Geschlechterverhältnis sind, müsste eine der in Patienten detektierten Duplikationen im Mausmodell nachgestellt werden, was durch die nicht vollständige Syntenie erschwert wird.

Mit Hilfe der *in vivo* Experimente im Zebrafisch konnten erste Hinweise auf die Funktion von *bhlha9* bezüglich der Extremitätenentwicklung gewonnen werden. Ausgehend von den RNA *in situ* Analysen und den Injektionsexperimenten kann folgende Hypothese zur Entstehung der Ektrodakylie erstellt werden: *Bhlha9* wird während der frühen Entwicklung der Extremitätenknospe in der PZ exprimiert. Während eines bestimmten Zeitfensters, in dem die einzelnen Strahlen der Extremität gebildet und definiert werden, beeinflusst *Bhlha9* maßgeblich die Transkription von *Fgf8* und/ oder *Fgf10*. Dies kann direkt geschehen, oder indirekt über dessen positiven Feedback-Loop. Kommt es im Patienten zu einer Duplikation, unter Beteiligung der kritischen Region auf 17p13.3 und ist der modifizierende Faktor gegeben, so kommt es zu einer Fehlregulation von *BHLHA9* und die Zellproliferation wird gestört. Die Zellen könnten demnach vorzeitig differenzieren. Eine andere Möglichkeit wäre die gesteigerte Apoptose von Zellen in der PZ, gefördert durch eine Aberration auf 17p13.3.



## 7 Ausblick

Die Prozesse der frühen Embryonalentwicklung bedingen eine Vielzahl an Signalmolekülen, die über komplexe Signalnetzwerke miteinander in Verbindung stehen. Punktmutationen sowie strukturelle Veränderungen im Genom können einzelne Gene, Genkomplexe oder auch regulatorische Bereiche in ihrer Funktion beeinträchtigen und zu pathogenen Erkrankungen führen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Extremitätenfehlbildungen nicht nur durch Punktmutationen, sondern auch durch strukturelle Imbalancen im Genom entstehen können. Die Aberrationen beeinträchtigten entweder die Regulation eines Gens (Projekt 1: SHH, Projekt 2: IHH) oder aber auch direkt die Funktionalität eines Gens (Projekt 3: BHLHA9). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten und bestätigten, dass Aberrationen im Genom einen wichtigen Anteil bezüglich der Entstehung von angeborenen Fehlbildungen darstellen und dass die Array-CGH-Technologie eine adäquate Methodik zur Detektion von genomischen Aberrationen darstellt.

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit stellen interessante Ausgangspunkte für ein weiteres experimentelles Vorgehen dar.

Um zu klären, inwiefern die Größe und Lage von Duplikationen innerhalb der ZRS-Region relativ zum *SHH*-Gen mit dem jeweiligen klinischen Phänotyp von Patienten korreliert, sollten die detektierten Aberrationen im Mausmodell nachgestellt werden. Die detaillierte Analyse dieser Mäuse könnte Aufschluß über diesen Kausalitätszusammenhang geben. Des Weiteren könnte untersucht werden, inwiefern solche Duplikationen die Expression von *Shh* sowie die nachfolgenden Signalkaskaden beeinflussen.

Im zweiten Projekt konnte gezeigt werden, dass Aberrationen am *IHH*-Lokus mit Syndaktylien und sagittaler Kraniosynostose assoziiert sind. Die Untersuchung der kritischen Region deckte drei hochkonservierte Regionen (CNE 1 bis 3) auf, die in *in vivo* Experimenten eine Rekapitulation des *Ihh*-Expressionsmusters hervorriefen. Um die Rolle der drei CNEs besser beurteilen zu können, sollten Mausmodelle generiert werden, die den humanen Defekt vollständig rekapitulieren (Duplikation der drei CNEs) bzw. nur bestimmte CNEs dupliziert vorliegen haben. Anhand dieser experimentellen Vorgehensweise könnte gezeigt werden, ob die drei CNEs unterschiedliche regulatorische Potenziale bezüglich der *IHH*-Expression aufweisen.

Mittels *in vitro* und *in vivo* Experimenten konnten erste funktionelle Erkenntnisse bezüglich der Genfunktion von *BHLHA9* (Projekt 3) im extremitätenspezifischen Kontext gewonnen werden. Es bleiben aber noch viele Fragen zu klären: Inwiefern beeinflusst *BHLHA9* die Extremitätenentwicklung im Detail? Kommt es innerhalb der PZ zu einer Apoptose der mesenchymalen Vorläuferzellen oder wird lediglich deren Proliferation beeinträchtigt? Warum zeigt sich im untersuchten Patientenkollektiv eine solch starke Geschlechterwendigkeit bezüglich der Penetranz und Expressivität? Welcher zusätzliche Faktor wird benötigt, um die Entstehung von SHFM/ SHFLD zu fördern? Um diese verschiedenen Fragestellungen zu klären, sollten mehrere Mausmodelle generiert werden, in denen z.B. der humane Defekt rekapituliert wird (Duplikation der kritischen Region), zum anderen das Gen

als solches vollständig ausgeschaltet wird (Knockout). Es bleibt des Weiteren zu klären, inwiefern die benachbarten Gene Einfluss auf die Entstehung der Ektrodaktylie haben.

## 8 Zusammenfassung

Veränderungen im Genom fördern die genomische Vielfalt zwischen Individuen und Spezies, können aber auch Fehlentwicklungen während der frühen Embryogenese hervorrufen. In den letzten Jahren konnte eindrücklich gezeigt werden, dass strukturelle Aberrationen (Deletionen, Duplikationen, Inversionen, Translokationen) für die Entstehung von verschiedenen Krankheiten und Fehlbildungen verantwortlich sein können.

In dieser Arbeit wurden Patienten mit verschiedenen angeborenen Fehlbildungen der Extremitäten mittels hochauflösender Array-CGH untersucht, um genomische Aberrationen im Genom als mögliche Ursache für die Fehlbildungen zu detektieren.

Da die Entwicklung des Skelettsystems bei Vertebraten ein sehr komplexer Prozess ist, der die Beteiligung und korrekte Interaktion einer Vielzahl an Signalmolekülen erfordert, stellen die Extremitäten ein gutes Modellsystem für die Untersuchung von zellulären Interaktionen und interzellulären Signalübertragungen dar. *Fgf8*, *Shh* und *Ihh* sind wichtige Signalmoleküle während der frühen Extremitätenentwicklung. Sie beeinflussen das distale Längenwachstum, die anterior-posteriore Musterausbildung und den Prozess der Verknöcherung (endochondrale Ossifikation). Konzentrations- oder Strukturänderungen von Molekülen, die während der Gliedmaßenentstehung von Bedeutung sind, können einzelne Signalwege in ihrer Aktivität so beeinflussen, dass Fehlentwicklungen von einzelnen Skelettelementen oder von der gesamten Extremität die Folge sind.

In Projekt 1 wurden Patienten mit dem klinischen Erscheinungsbild einer Polysyndaktylie, einer Syndaktylie Typ IV (SD IV) sowie mit dem klinischen Erscheinungsbild des Laurin Sandrow Syndroms (LSS) auf genomische Aberrationen analysiert. Es konnten Duplikationen mit nicht-rekurrenten Bruchpunkten auf dem Locus 7q36.3 nachgewiesen werden. Diese überlappenden Aberrationen befanden sich innerhalb der cis-regulatorischen Enhancer-Region (ZRS-Region) des *SHH*-Gens, das für die korrekte Expression von *SHH* während der Extremitätenentwicklung verantwortlich ist. Aus vorangegangenen Arbeiten ist bekannt, dass Punktmutationen, aber auch strukturelle Veränderungen innerhalb dieser Region, mit Handfehlbildungen (Polysyndaktylie und triphalangealer Daumen) assoziiert sind. Im Rahmen dieser Arbeit konnten weitere Handfehlbildungen mit einer Fehlexpression von *SHH* in Verbindung gebracht werden, sowie erstmalig die genetische Ursache für das LSS identifiziert werden.

In Projekt 2 wurden Patienten mit einer Syndaktylie der Hände und Füße zum Teil in Kombination mit einer sagittalen Kraniosynostose (Kraniosynostose Philadelphia Typ) mit der Array-CGH Methode untersucht. Es konnten überlappende nicht-rekurrente Duplikationen detektiert werden, die am *IHH*-Locus auf Chromosom 2 lokalisiert waren. Der Überlappungsbereich beinhaltete konservierte Regionen, für die in *in vivo*-Experimenten eine regulatorische Funktion gezeigt werden konnte. Diese Elemente induzieren eine mit dem *Ihh*-Wildtyp überlappende Expression des Reportergens in den Extremitäten und an den Schädelnähten. Es konnte erstmalig eine Enhancer-Region für *Ihh* ausfindig gemacht werden, die vermutlich die orthologe Region zu der ZRS-Region darstellt und für eine korrekte Expression von *Ihh* verantwortlich ist. Die Ergebnisse sprechen für eine wichtige Rolle von

IHH während der Schädelentwicklung und erweitern die Bedeutung von IHH auf die desmale Ossifikation.

Das Projekt 3 beschäftigte sich mit Patienten, die den klinischen Phänotyp der Ektrodaktylie in Kombination mit tibialen Defekten (SHFLD) aufwiesen. Eine Untersuchung von 17 Familien deckte überlappende Duplikationen auf dem Chromosom 17p13.3 mit nicht-rekurrenten Bruchpunkten auf. Der gemeinsame Überlappungsbereich, d.h. die kritische Region, beinhaltete das Gen *BHLHA9*, welches bis jetzt in seiner Funktion nicht näher definiert war. Das Expressionsmuster während der Embryonalentwicklung bei Mäusen, Hühnchen und Zebrafisch ergab eine extremitätenspezifische Expression in der Progresszone der Extremitätenknospe. *In vivo* Analysen dieses Gens im Modellsystem Zebrafisch zeigten dessen Relevanz während der Extremitätenentwicklung. Die Stammbaumanalyse der 17 Familien demonstriert eindrücklich das Vorliegen einer unvollständigen Penetranz und eine stark ausgeprägte Verschiebung des Geschlechterverhältnisses, eine sogenannte Geschlechterwendigkeit. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass zusätzlich zu der Duplikation auf dem Chromosom 17p13.3 ein modifizierender Faktor benötigt wird. Um diesen Faktor zu identifizieren sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass strukturelle Aberrationen für eine Vielzahl von angeborenen Fehlentwicklungen verantwortlich sind. Sie können, wie im Fall der Spalthand-Spaltfußfehlbildungen, die Funktionalität eines Gens direkt beeinflussen oder aber, wenn sie nicht-kodierende Bereiche des Genoms betreffen, durch die Veränderung von regulatorischen Elementen und der Interaktion zwischen Regulatoren und dem Zielgen, indirekt auf die Zielgene wirken.

## 9 Summary

Genomic rearrangements lead to genomic diversity between individuals and species, however, they can also cause developmental defects during the early embryogenesis. In the last years structural variations (deletions, duplications, inversions, translocations) have been shown to cause human developmental defects such as limb malformations.

The complex process of skeletal development in vertebrates needs a multitude of different signaling molecules, interacting in the right and specific manner. In this context, the limbs represent a good model to examine cellular interactions and intercellular communication. Signaling molecules like Fgf8, Shh and Ihh are very important during this process. They influence the proximal-distal outgrowth, the anterior-posterior patterning and the process of endochondral ossification. Changes in the concentration or structure of these signaling molecules can influence downstream pathways negatively and can cause malformations of single skeleton elements and the whole extremity.

In this study patients with different congenital limb malformations were analyzed by high resolution array CGH for genomic aberrations i.e. deletions (losses) and duplications (gains).

In the first project a patient cohort with the clinical phenotypes of polysyndactyly, syndactyly type IV (SD IV) and the Laurin-Sandrow syndrome (LSS) were analyzed. Duplications with non recurrent breakpoints were detected in all affected patients at the *SHH* locus on chromosome 7q36.3. These aberrations were encompassing the limb specific enhancer of *SHH* (ZRS) which promotes the expression of *SHH* during early limb development. It is known that point mutations but also structural aberrations at the ZRS region lead to limb malformations like polysyndactyly and the clinical phenotype of a triphalangeal thumb. We could show that a range of hand anomalies, including the LSS, are associated with microduplications most likely causing a misexpression of *SHH*. It was the first time that the genetic cause of LSS could be identified.

The focus of the second project was on patients with syndactyly of the hands and feet partly in combination with sagittal craniosynostosis (craniosynostosis type Philadelphia). Non-recurrent duplications at the *IHH* locus were identified in all affected patients. The critical region contained highly conserved non-coding elements which have regulatory functions in limb as well as skull development as demonstrated by *in vivo* experimental approaches. The expression pattern of a reporter gene showed an overlapping expression pattern with the wildtype *Ihh* expression in the limb and skull sutures. It was the first time that an enhancer region for *Ihh* was identified which could represent the equivalent to the ZRS-region of *Shh* gene. Furthermore our results demonstrate the importance of *Ihh* not only during the endochondral ossification, but also in the process of desmal ossification.

In the third project 17 families with ectrodactyly in combination with tibial defects (SHFLD) were analyzed by array CGH. All of the affected individuals carried non-recurrent duplications on 17p13.3 which overlap in a 9,1kb region containing a single gene *BHLHA9*. The function of *BHLHA9* was so far unknown. RNA *in situ* hybridization for this gene in mouse, chicken and zebrafish showed an expression pattern within the progress zone of the limb bud. *In vivo* analyses of this gene by

Morpholino knock-down in the model system zebrafish resulted in severe reduction of fin outgrowth, thus, revealing the functional relevance of *Bhlha9* during early fin development. Based on the pedigrees of the 17 families an incomplete penetrance and a strong sex bias regarding the clinical phenotype were shown. One can speculate that in addition to duplications on chromosome 17p13.3 a modifying factor is needed for expressivity of phenotype. For this approach additional experiments are required.

Based on these results it was further strengthened that genomic aberrations can cause a number of different congenital malformations. These aberrations can alter the function of one gene in a direct way (like in our patient cohort with SHFLD) or can influence the regulatory function of enhancer elements. Such aberrations are located within conserved noncoding regions and can influence the right interaction between the enhancer-element and its target gene.

## 10 Literaturverzeichnis

- Ahnesorg, P., P. Smith, et al. (2006). "XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining." Cell **124**(2): 301-13.
- Albers, C. A., D. S. Paul, et al. (2012). "Compound inheritance of a low-frequency regulatory SNP and a rare null mutation in exon-junction complex subunit RBM8A causes TAR syndrome." Nat Genet **44**(4): 435-9, S1-2.
- Armour, C. M., D. E. Bulman, et al. (2011). "17p13.3 microduplications are associated with split-hand/foot malformation and long-bone deficiency (SHFLD)." Eur J Hum Genet **19**(11): 1144-51.
- Babbs, C., D. Furniss, et al. (2008). "Polydactyly in the mouse mutant Doublefoot involves altered Gli3 processing and is caused by a large deletion in cis to Indian hedgehog." Mech Dev **125**(5-6): 517-26.
- Benazet, J. D. and R. Zeller (2009). "Vertebrate limb development: moving from classical morphogen gradients to an integrated 4-dimensional patterning system." Cold Spring Harb Perspect Biol **1**(4): a001339.
- Bosse, K., R. C. Betz, et al. (2000). "Localization of a gene for syndactyly type 1 to chromosome 2q34-q36." Am J Hum Genet **67**(2): 492-7.
- Breathnach, R. and P. Chambon (1981). "Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins." Annu Rev Biochem **50**: 349-83.
- Bruno, D. L., B. M. Anderlid, et al. (2010). "Further molecular and clinical delineation of co-locating 17p13.3 microdeletions and microduplications that show distinctive phenotypes." J Med Genet **47**(5): 299-311.
- Buck, D., L. Malivert, et al. (2006). "Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly." Cell **124**(2): 287-99.
- Butler, J. E. and J. T. Kadonaga (2002). "The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression." Genes Dev **16**(20): 2583-92.
- Cancedda, R., P. Castagnola, et al. (2000). "Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis." Int J Dev Biol **44**(6): 707-14.
- Capdevila, J. and J. C. Izpisua Belmonte (2001). "Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 87-132.

- Chen, L., C. Li, et al. (2001). "A Ser(365)-->Cys mutation of fibroblast growth factor receptor 3 in mouse downregulates Ihh/PTHrP signals and causes severe achondroplasia." Hum Mol Genet **10**(5): 457-65.
- Ciurea, A. V. and C. Toader (2009). "Genetics of craniosynostosis: review of the literature." J Med Life **2**(1): 5-17.
- Crackower, M. A., J. Motoyama, et al. (1998). "Defect in the maintenance of the apical ectodermal ridge in the Dactylaplasia mouse." Dev Biol **201**(1): 78-89.
- Dudley, A. T., M. A. Ros, et al. (2002). "A re-examination of proximodistal patterning during vertebrate limb development." Nature **418**(6897): 539-44.
- Duijf, P. H., H. van Bokhoven, et al. (2003). "Pathogenesis of split-hand/split-foot malformation." Hum Mol Genet **12 Spec No 1**: R51-60.
- Elliott, A. M., J. A. Evans, et al. (2005). "Split hand foot malformation (SHFM)." Clin Genet **68**(6): 501-5.
- Erlebacher, A., E. H. Filvaroff, et al. (1995). "Toward a molecular understanding of skeletal development." Cell **80**(3): 371-8.
- Feuk, L., C. R. Marshall, et al. (2006). "Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies." Hum Mol Genet **15 Spec No 1**: R57-66.
- Freeman, J. L., G. H. Perry, et al. (2006). "Copy number variation: new insights in genome diversity." Genome Res **16**(8): 949-61.
- Gao, B., J. Guo, et al. (2001). "Mutations in IHH, encoding Indian hedgehog, cause brachydactyly type A-1." Nat Genet **28**(4): 386-8.
- Gault, D. T., D. Renier, et al. (1992). "Intracranial pressure and intracranial volume in children with craniosynostosis." Plast Reconstr Surg **90**(3): 377-81.
- Gibson-Brown, J. J., S. I. Agulnik, et al. (1996). "Evidence of a role for T-box genes in the evolution of limb morphogenesis and the specification of forelimb/hindlimb identity." Mech Dev **56**(1-2): 93-101.
- Gu, W., F. Zhang, et al. (2008). "Mechanisms for human genomic rearrangements." Pathogenetics **1**(1): 4.
- Hellemans, J., P. J. Coucke, et al. (2003). "Homozygous mutations in IHH cause acrocapitofemoral dysplasia, an autosomal recessive disorder with cone-shaped epiphyses in hands and hips." Am J Hum Genet **72**(4): 1040-6.



- Hilger-Eversheim, K., M. Moser, et al. (2000). "Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control." Gene **260**(1-2): 1-12.
- Howard, M. L. and E. H. Davidson (2004). "cis-Regulatory control circuits in development." Dev Biol **271**(1): 109-18.
- Hukki, J., P. Saarinen, et al. (2008). "Single suture craniosynostosis: diagnosis and imaging." Front Oral Biol **12**: 79-90.
- Iwata, T., L. Chen, et al. (2000). "A neonatal lethal mutation in FGFR3 uncouples proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes in embryos." Hum Mol Genet **9**(11): 1603-13.
- Jabs, E. W., U. Muller, et al. (1993). "A mutation in the homeodomain of the human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis." Cell **75**(3): 443-50.
- Jain, M., D. Wallis, et al. (2008). "Locus homogeneity between syndactyly type 1A and craniosynostosis Philadelphia type?" Am J Med Genet A **146A**(17): 2308-11.
- Jeong, Y., K. El-Jaick, et al. (2006). "A functional screen for sonic hedgehog regulatory elements across a 1 Mb interval identifies long-range ventral forebrain enhancers." Development **133**(4): 761-72.
- Johnson, R. L. and C. J. Tabin (1997). "Molecular models for vertebrate limb development." Cell **90**(6): 979-90.
- Jones, S. (2004). "An overview of the basic helix-loop-helix proteins." Genome Biol **5**(6): 226.
- Kleinjan, D. A. and V. van Heyningen (2005). "Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease." Am J Hum Genet **76**(1): 8-32.
- Klopocki, E., S. Lohan, et al. (2010). "Copy-number variations involving the IHH locus are associated with syndactyly and craniosynostosis." Am J Hum Genet **88**(1): 70-5.
- Klopocki, E. and S. Mundlos (2011). "Copy-number variations, noncoding sequences, and human phenotypes." Annu Rev Genomics Hum Genet **12**: 53-72.
- Klopocki, E., C. E. Ott, et al. (2008). "A microduplication of the long range SHH limb regulator (ZRS) is associated with triphalangeal thumb-polysyndactyly syndrome." J Med Genet **45**(6): 370-5.
- Kornak, U. and S. Mundlos (2003). "Genetic disorders of the skeleton: a developmental approach." Am J Hum Genet **73**(3): 447-74.
- Kronenberg, H. M. (2003). "Developmental regulation of the growth plate." Nature **423**(6937): 332-6.
- Lai, L. P. and J. Mitchell (2005). "Indian hedgehog: its roles and regulation in endochondral bone development." J Cell Biochem **96**(6): 1163-73.

- Lapierre, J. M. and G. Tachdjian (2005). "Detection of chromosomal abnormalities by comparative genomic hybridization." Curr Opin Obstet Gynecol **17**(2): 171-7.
- Lettice, L. A., S. J. Heaney, et al. (2003). "A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly." Hum Mol Genet **12**(14): 1725-35.
- Lettice, L. A. and R. E. Hill (2005). "Preaxial polydactyly: a model for defective long-range regulation in congenital abnormalities." Curr Opin Genet Dev **15**(3): 294-300.
- Levine, M. and R. Tjian (2003). "Transcription regulation and animal diversity." Nature **424**(6945): 147-51.
- Lewandoski, M., X. Sun, et al. (2000). "Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development." Nat Genet **26**(4): 460-3.
- Lezirovitz, K., S. R. Maestrelli, et al. (2008). "A novel locus for split-hand/foot malformation associated with tibial hemimelia (SHFLD syndrome) maps to chromosome region 17p13.1-17p13.3." Hum Genet **123**(6): 625-31.
- Managoli, S. S. and P. Chaturvedi (2005). "Tibial hemimelia-split hand/foot syndrome with rare anomalies." Indian Pediatr **42**(2): 190-1.
- Martin, G. R. (1998). "The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs." Genes Dev **12**(11): 1571-86.
- McGuirk, C. K., M. N. Westgate, et al. (2001). "Limb deficiencies in newborn infants." Pediatrics **108**(4): E64.
- McMahon, A. P., P. W. Ingham, et al. (2003). "Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling." Curr Top Dev Biol **53**: 1-114.
- Mercader, N. (2007). "Early steps of paired fin development in zebrafish compared with tetrapod limb development." Dev Growth Differ **49**(6): 421-37.
- Minina, E., C. Kreschel, et al. (2002). "Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation." Dev Cell **3**(3): 439-49.
- Morriss-Kay, G. M. and A. O. Wilkie (2005). "Growth of the normal skull vault and its alteration in craniosynostosis: insights from human genetics and experimental studies." J Anat **207**(5): 637-53.
- Mundlos, S. (2009). "The brachydactylies: a molecular disease family." Clin Genet **76**(2): 123-36.
- Niswander, L. (2003). "Pattern formation: old models out on a limb." Nat Rev Genet **4**(2): 133-43.

- Niswander, L., S. Jeffrey, et al. (1994). "A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb." Nature **371**(6498): 609-12.
- Noonan, J. P. and A. S. McCallion (2010). "Genomics of long-range regulatory elements." Annu Rev Genomics Hum Genet **11**: 1-23.
- Olsen, B. R., A. M. Reginato, et al. (2000). "Bone development." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 191-220.
- Oostlander, A. E., G. A. Meijer, et al. (2004). "Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics." Clin Genet **66**(6): 488-95.
- Pearse, R. V., 2nd, P. J. Scherz, et al. (2007). "A cellular lineage analysis of the chick limb bud." Dev Biol **310**(2): 388-400.
- Pizette, S. and L. Niswander (1999). "BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge." Development **126**(5): 883-94.
- Riddle, R. D., M. Ensini, et al. (1995). "Induction of the LIM homeobox gene Lmx1 by WNT7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb." Cell **83**(4): 631-40.
- Robin, N. H., B. Segel, et al. (1996). "Craniosynostosis, Philadelphia type: a new autosomal dominant syndrome with sagittal craniosynostosis and syndactyly of the fingers and toes." Am J Med Genet **62**(2): 184-91.
- Sagai, T., H. Masuya, et al. (2004). "Phylogenetic conservation of a limb-specific, cis-acting regulator of Sonic hedgehog ( Shh)." Mamm Genome **15**(1): 23-34.
- Saunders, J. W., Jr. and M. T. Gasseling (1963). "Trans-filter propagation of apical ectoderm maintenance factor in the chick embryo wing bud." Dev Biol **7**: 64-78.
- Shubin, N., C. Tabin, et al. (1997). "Fossils, genes and the evolution of animal limbs." Nature **388**(6643): 639-48.
- Slater, B. J., K. A. Lenton, et al. (2008). "Cranial sutures: a brief review." Plast Reconstr Surg **121**(4): 170e-8e.
- Solinas-Toldo, S., S. Lampel, et al. (1997). "Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances." Genes Chromosomes Cancer **20**(4): 399-407.
- St-Jacques, B., M. Hammerschmidt, et al. (1999). "Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation." Genes Dev **13**(16): 2072-86.
- Stevens, J. D., E. H. Roalson, et al. (2008). "Phylogenetic and expression analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor gene family: genomic approach to cellular differentiation." Differentiation **76**(9): 1006-22.

- Stoll, C., E. Calzolari, et al. (1996). "A study on limb reduction defects in six European regions." Ann Genet **39**(2): 99-104.
- Summerbell, D., J. H. Lewis, et al. (1973). "Positional information in chick limb morphogenesis." Nature **244**(5417): 492-6.
- Sun, X., F. V. Mariani, et al. (2002). "Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development." Nature **418**(6897): 501-8.
- Theil, T., S. Kaesler, et al. (1999). "Gli genes and limb development." Cell Tissue Res **296**(1): 75-83.
- Tickle, C., D. Summerbell, et al. (1975). "Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis." Nature **254**(5497): 199-202.
- Vortkamp, A., K. Lee, et al. (1996). "Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein." Science **273**(5275): 613-22.
- Wolpert, L. (1969). "Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation." J Theor Biol **25**(1): 1-47.
- Wolpert, L. (1999). "Vertebrate limb development and malformations." Pediatr Res **46**(3): 247-54.
- Xu, Q., N. Holder, et al. (1994). "Spatially regulated expression of three receptor tyrosine kinase genes during gastrulation in the zebrafish." Development **120**(2): 287-99.
- Xu, X., M. Weinstein, et al. (1998). "Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction." Development **125**(4): 753-65.
- Yang, A., R. Schweitzer, et al. (1999). "p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development." Nature **398**(6729): 714-8.
- Yang, Y., P. Guillot, et al. (1998). "Evidence that preaxial polydactyly in the Doublefoot mutant is due to ectopic Indian Hedgehog signaling." Development **125**(16): 3123-32.
- Yingling, J., K. Toyo-Oka, et al. (2003). "Miller-Dieker syndrome: analysis of a human contiguous gene syndrome in the mouse." Am J Hum Genet **73**(3): 475-88.
- Yoshida, C. A., H. Yamamoto, et al. (2004). "Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog." Genes Dev **18**(8): 952-63.
- Zeller, R., J. Lopez-Rios, et al. (2009). "Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis." Nat Rev Genet **10**(12): 845-58.

- 
- Zhang, F., W. Gu, et al. (2009). "Copy number variation in human health, disease, and evolution." Annu Rev Genomics Hum Genet **10**: 451-81.
- Zheng, Z. and M. J. Cohn (2011). "Developmental basis of sexually dimorphic digit ratios." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(39): 16289-94.
- Zwilling, E. (1956). "Genetic mechanism in limb development." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **21**: 349-54.

## 11 Weitere Verzeichnisse

### 11.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Anatomie des Schädels.....	2
Abbildung 2 Endochondrale Ossifikation.....	3
Abbildung 3 Funktion von Ihh während der endochondralen Ossifikation. ....	4
Abbildung 4 Aufbau der Extremität beim Menschen. ....	5
Abbildung 5 Signalzentren während der Entwicklung der Extremitätenknospe. ....	6
Abbildung 6 Musterbildung der sich entwickelnden distalen Extremität durch einen räumlichen und zeitlichen Shh-Gradienten. ....	7
Abbildung 7 Enhancer-Regionen des <i>SHH</i> -Gens. ....	8
Abbildung 8 Phänotyp von Patienten mit einer Duplikation innerhalb der ZRS-Region des <i>SHH</i> -Gens.8	
Abbildung 9 Entstehung der Ektrodaktylie. ....	10
Abbildung 10 Schematische Übersicht der Array-CGH. ....	12
Abbildung 11 Entstehungsmechanismen von CNVs durch NAHR oder FoSTes. ....	13
Abbildung 12 Regulation der Genexpression mittels cis-agierender Elemente. ....	15
Abbildung 13 Schematischer Überblick der methodischen Vorgehensweise der zielgerichteten Klonierung eines Zielgens in den <i>CoIA1</i> -Lokus von C2-Zellen. ....	48
Abbildung 14 Schematische Darstellung des Southern Blot Aufbaus. (Quelle: <a href="http://nawipro.de/molekularbiologiesche-methoden/dna-methoden/113-southern.html">http://nawipro.de/molekularbiologiesche-methoden/dna-methoden/113-southern.html</a> ) .....	52
Abbildung 15 Röntgenaufnahmen und Stammbaum der Familie 1 mit einer vollständigen Polysyndaktylie der Hände und Füße. ....	54
Abbildung 16 Klinische Bilder und Stammbaum der Familie 2 mit einer Polysyndaktylie der Hände und einer Spiegelpolydaktylie der Füße. ....	55
Abbildung 17 Klinische Bilder und Stammbaum der Familie 3 mit einer vollständigen Syndaktylie der Hände und einer präaxialen Spiegelduplikation der Füße. ....	56
Abbildung 18 Array-CGH-Profile für die chromosomale Region 7q36.3 der Familien 1 (II,3). ....	56
Abbildung 19 Schematische Darstellung von Mikroduplikationen bei drei Familien mit Synpolydaktylien der Hände, Spiegelpolydaktylien/- duplikationen der Füße auf dem Chromosom 7q36.3.....	57
Abbildung 20 Quantitative RT-PCR Analyse (qRT-PCR) von betroffenen und gesunden Probanden der Familien 1 bis 3 zur näheren Charakterisierung der Aberrationsgröße der jeweiligen Mikroduplikationen auf dem Lokus 7q36.3. ....	58
Abbildung 21 Exemplarisches Beispiel einer Bruchpunktbestimmung bei einem Patienten mit einer Duplikation in Tandemorientierung.....	59

---

Abbildung 22 Detektion der Bruchpunkte mittels PCR bei Familie 3 mit Laurin-Sandrow Syndrom. ...	60
Abbildung 23 Bruchpunktbestimmung via Sequenzanalyse von betroffenen Patienten mit einer Mikroduplikation auf dem Chromosom 7q36.3.....	61
Abbildung 24 Phänotyp der Familie 1 mit Syndaktylie Typ 1. ....	63
Abbildung 25 Stammbaum der Familie 2 mit Kraniosynostose Philadelphia Typ und kutaner/ ossärer Syndaktylie der Finger und Zehe. ....	64
Abbildung 26 Klinische Bilder und Röntgenaufnahmen der Familie 2 mit Kraniosynostose Philadelphia Typ mit einer kutanen und ossären Syndaktylie der Finger und Zehen.....	65
Abbildung 27 Stammbaum der Familie 3 mit kutaner/ossärer Syndaktylie und Kraniosynostose. ....	66
Abbildung 28 Klinischer Phänotyp der Familie 3 mit kutaner und ossärer Syndaktylie der Füße und sagittaler Kraniosynostose. ....	66
Abbildung 29 Schematische Abbildung der detektierten Duplikationen der Familien 1 bis 3 und Überblick über die Lage konservierter Nukleotidabschnitte innerhalb der Überlappungsbereiche. ....	67
Abbildung 30 qRT-PCR Ergebnisse für die genomische Region 2q35 mit betroffenen und nicht betroffenen Familienmitgliedern der Familien 1 bis 3. ....	68
Abbildung 31 Vergleich der Expression von <i>Ihh</i> und <i>Nhej1</i> (Stadium E 13.5).....	69
Abbildung 32 Expressionsmuster von <i>LacZ</i> in transgenen Mäuse verschiedener embryonaler Stadien (E 13.5, E15.5 und E 17.5). ....	71
Abbildung 33 Vergleich der Expressionsmuster von <i>LacZ</i> in transgenen Mäusen zur Expression von <i>Ihh</i> und <i>Ptc1</i> im Wildtyp (longitudinal Paraffinschnitte der Vorderextremität) im Stadium E 15.5. ....	72
Abbildung 34 Reportergenexpression (transgene Embryonen) im Vergleich zu <i>Ihh</i> und <i>Ptc1</i> Expression im Wildtyp und <i>Ihh</i> -knockout Embryo in Schädeln der Embryonalstadien E 14.5, E 17.5. 72	
Abbildung 35 Schädel von Wildtyp- und <i>Ihh</i> -Knockout-ScMäusen hädeln im Embryonalstadium E 17.5 (a, lateral) und E 18.5 (b, Aufsicht).....	73
Abbildung 36 Klinische Bilder und Röntgenaufnahmen der Familie 3 und Familie 9 mit einem SHFM/SHFLD-Phänotyp. ....	74
Abbildung 37 Array-CGH-Profil für das Chromosom 17 des Indexpatienten der Familie 10. ....	76
Abbildung 38 Schematische Darstellung der gefundenen Duplikationen auf dem Chromosom 17p13.3 bei 17 Familien mit SHFM/SHFLD-Phänotyp.....	77
Abbildung 39 Quantitativen qRT-PCR Analyse von betroffenen und gesunden Probanden der Familien 3 und 9.....	78
Abbildung 40 Verteilung der 17p13.3 Duplikationen zwischen den weiblichen und männlichen Probanden der 17 untersuchten Familien. ....	79
Abbildung 41 Expression von <i>Bhlha9</i> und <i>Fgf8</i> während der Embryonalentwicklung.....	80
Abbildung 42 Lokalisierung der <i>Bhlha9</i> -Expression in der Extremitätenknospe.....	81
Abbildung 43 RNA <i>in situ</i> für Gene, die innerhalb der Progresszone exprimiert werden .....	81
Abbildung 44 Funktionelle Untersuchung von <i>BHLHA9</i> mittels Morpholino-Technologie. ....	83

Abbildung 45 Anteil Zebrafische mit verkürzter Pectoralflosse nach Morpholino-Injektion. ....	84
Abbildung 46 Entwicklung der Pectoralflosse bei Wildtyp-Zebrafischen und Mo_bhlha9 behandelten Zebrafischen nach 5 Tagen (120 hpf) und 7 Tagen (168 hpf). ....	85
Abbildung 47 Zusammenfassung der Messdaten des Morpholino-Experiments: Körperlänge (a), Flossenlänge (b) und Darstellung des Verhältnisses Flossenlänge zu Körperlänge (c) bei Wildtyp-Zebrafischen (Wildtyp) und Morpholino behandelten Zebrafischen (MO) im Entwicklungsstadium 72 hpf, sowie nach 120 hpf und 168 hpf. Legende: MO_Std-neg.Kontr.= Standard negativ Kontrolle eines Morpholions; 5` mispair= 5` mispair Morpholino; MO_bhlha9= Morpholino gegen das Transkript von bhlha9. ....	86
Abbildung 48 Skelettpräparation mit Alcian Blau Färbung von Wildtyp- und MO_bhlha9-behandelten Zebrafischen nach 5 Tagen (120hpf) und 7 Tagen (168hpf). ....	87
Abbildung 49 Rescue-Experiment: Körperlänge (a), Flossenlänge (b) und Darstellung des Verhältnisses Flossenlänge zu Körperlänge (c) nach 72hpf. ....	88
Abbildung 50 Expressionsprofil von Markergenen ( <i>bmp2</i> , <i>bmp4</i> , <i>fgf10</i> , <i>shh</i> , <i>fgf8</i> ) innerhalb der Pectoralflosse von Wildtyp (WT)- und MO_bhlha9 behandelten Zebrafischen nach 72hpf. ....	89
Abbildung 51 Analyse der potenziellen Promoterregion von <i>BHLHA9</i> . ....	92
Abbildung 52 Southern-Blot Analyse der ausselektionierten ES-Zellklone mit einer spezifischen 5´- und 3´-Sonde. ....	93
Abbildung 53 Genotypisierungs-PCR für Mäuse mit einem modifizierten <i>ColA1</i> -Lokus. ....	94
Abbildung 54 Skelettpräparationen von Wildtyp-Mäusen und Mäusen mit einem modifizierten <i>ColA1</i> -Lokus (heterozygot, homozygot im postnatalen Stadium P1). ....	95
Abbildung 55 RNA <i>in situ</i> Hybridisierung der benachbarten Gene zu <i>Bhlha9</i> . Maus-Embryonalstadium E 10.5 und E 11.5. ....	96
Abbildung 56 Schematische Übersicht der Duplikationen in Familie 1-3 im Vergleich mit bisher publizierten Duplikationen innerhalb der ZRS-Region sowie den genetischen Veränderungen bekannter Mausmodelle. ....	99
Abbildung 57 Möglicher Mechanismus zur Entstehung einer Polydaktylie unterschiedlichen Schweregrades, hervorgerufen durch Duplikationen innerhalb der ZRS-Region. ....	102
Abbildung 58 Schematische Darstellung der Regulation der gewebespezifischen <i>IHH</i> -Expression und Erklärungsansatz für die Entstehung der klinischen Phänotypen. ....	108
Abbildung 59 Übersicht der kritischen Region auf 17p13.3, welche mit neuronalen und extremitätenspezifischen Phänotypen in Assoziation gebracht werden. ....	113
Abbildung 60 Entstehungsmechanismus einer verkürzten Pectoralflosse durch einen Knock-down von bhlha9. ....	115
Abbildung 61 Vergleich der Anordnung der Gene der chromosomalen Region 17p13.3 mit der orthologen Region des murinen Chromosoms 11. Die Farben kennzeichnen die orthologen Bereiche auf den jeweiligen Chromosomenabschnitten (nach Yingling et al. 2003). ....	117
Abbildung 62 Stammbaum der Familie 1 mit SD1 (Abbildung nach Bosse et al., 2000) ....	143
Abbildung 63 Stammbäume der untersuchten Familien mit einem SHFM/ SHFLD-Phänotyp. ....	145



## 11.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht der SHFM-Typen mit dem dazugehörigen Genlocus (nach Duijf et al. 2003). ....	10
Tabelle 2 Übersicht aller Duplikationen auf Chromosom 17p13.3 für die Familien 1 bis 17 .....	144
Tabelle 3 Primerpaare für die quantitative real-time PCR (qPCR) zur Verifizierung der detektierten Mikroduplikationen und zur Minimierung der Aberrationsgröße.....	149
Tabelle 4 Primer zur Bestimmung der Bruchpunkt mittels konventioneller PCR für die Familie 1 und die Familie 3. ....	149
Tabelle 5 Primerpaare für die Amplifizierung und Sequenzierung (Seq) der konservierten Region (CE) innerhalb des murinen(m) <i>Ihh</i> -Lokus.....	150
Tabelle 6 Primerpaare für die quantitative real-time PCR (qPCR) zur Verifizierung der detektierten Mikroduplikationen und zur Minimierung der Aberrationsgröße innerhalb des Patientenkollektivs....	151
Tabelle 7 Primer für die Bruchpunktsequenzierung .....	152
Tabelle 8 Primerpaare für die quantitative real-time PCR (qRT-PCR) zur Verifizierung der detektierten Mikroduplikationen auf 17p13.3.....	153
Tabelle 9 Primer für die RNA <i>in situ</i> Hybridisierung für das Projekt BHLHA9 .....	153
Tabelle 10 Promoteranalyse des humanen <i>BHLHa9</i> -Gens .....	154
Tabelle 11 Sequenzierprimer für die humane Promoterregion .....	155
Tabelle 12 Injektionsexperimente: Morpholinosequenzen und Primersequenzen.....	156
Tabelle 13 Integration einer zusätzlichen Kopie von BHLHA9 (mit potenziellem Promoterbereich) in den <i>CoIA1</i> -Lokus .....	156
Tabelle 14 Primer für die Generierung der Southern Blot Sonden ( <i>CoIA1</i> -Lokus) .....	157
Tabelle 15 Volumen- und Mengenverhältnisse von Feeder- und ES-Zellen auf 6 well Platten.....	162

### 11.3 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AER	Apikale ektodermale Randleiste
ALB	Albumin
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
BBR	Boehringers Blocking Reagent
BCIP	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BDA1	Brachydaktylie Typ A1
BHLHA9	Basic helix-loop-helix family, member a9
bidest	zweifach destilliert
BMP	Bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
C2	spezifisches ES-Zelllinie (Open Biosystems)
Cen	Centromer
CGH	Comparativ genomic Hybridisation
Ch	Chicken (Speziesbezeichnung: Hühnchen)
CNE	Conserved noncoding element
CNV	copy number variation
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
ColA1	Collagen alpha type I
D	Deutschland
DEPC (D)	Diethylpyrocarbonate
DIG	Digoxygenin
DLX	Distal-less homeobox
DNA	Desoxyribonucleinacid
dNTPs	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
DPE	Downstream promoter element
DSS	Dosage-sensitive sex reversal
E	Mouse embryonic day

---

E3	“Zebrafisch-Puffer”
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EN	Engrailed
ENH	Enhancer-Element
ES	Embryonale Stammzellen
FA	Formamid
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor
Flp	Flippase
FoSTeS	Fork stalling and template switching
Frt	Flippase-Recombinase-Target-Erkennungssequenz
G	Guanin
GLI	Gliotactin
GOI	Gene of interest
H <sub>2</sub> O	Wasser
HBSS	Hanks Buffered Saline Solution
HEK293	Human Embryonic Kidney 293 cells
HH	Hamburger-Hamilton-Stadien
HISS	Hitze inaktiviertes Schafserum
h	Stunde
HOX	Homeobox gene
hpf	hours post fertilization
hygro	Hygromyzin
Hyp	Hybridisierung
IHH	Indian Hedgehog
Inr	Initiator
kb	Kilobase(n)
L	Liter
<i>LacZ</i>	Gen, codiert für das Enzym $\beta$ -Galactosidase ( <i>E. coli</i> )
LB	Luria Bertani
LCR	Low copy repeat
LIF	Leukemia inhibitory factor

---

LMBR1	Limb region 1 homolog
LSS	Laurin-Sandrow Syndrom
m	Mili
M	Molar
MCS	multibel Klinierungsstelle (cloning site)
mg	Miligramm
min	Minute
ml	Mililiter
MMBIR	Microhomology mediated break-induced replication
MO	Morpholino
NAHR	Non allelic homologous recombination
NBT	Nitro blue tetrazolium
ng	Nanogramm
NHEJ	Nohomologous end joining
P	Primer(paar)
p	pico
p(A)	polyA-Signal
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentium hydrogenii
PK	Proteinase K
PPR	Parathyroidhormon related peptide Rezeptor
PR	basaler Promoter
PTHrP	Parathyroid hormone related peptide
PZ	Progress-Zone
qRT-PCR	Quantitative Real-Time-PCR
RNA	Ribonucleinacid
rpm	Revolutions per minute
RQ	Relative Quantifizierung
RT	Raumtemperatur
Runx2	runt related transcription factor 2
s	Sekunde

---

s.	siehe
SAP	<i>Shrimp-Alkaline-Phosphatase</i>
SD4	Syndakylie Typ IV
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SHFM	Spli hand/ foot malformation
SHFLD	Split hand/ foot malformation with long bone deficiency
SHH	Sonic Hedgehog
SNP	Einzel (Singel) Nukleotid Polymorphismus
SSC	Standard Saline Citrat Puffer
SSW	Schwangerschaftswoche
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEA	Triethanolamin
Tel	Telomer
TPT-PS	Triphalangeal-thumb-Polysyndactyly
TP63	Tumor protein 63
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
t-RNA	Transfer-RNA
U	Unit
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
üN	über Nacht
USA	United States of America
UTR	Untranslatierte Region
V	Volt
Wnt	Wingless-related MMTV integration site
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D.galactopyranosid
ZPA	Zone polarisierender Aktivität
ZRS	ZPA regulierende Sequenz

Gängige Abkürzungen aus dem Duden sind nicht aufgeführt.

#### 11.4 Verzeichnis der erfolgten Publikationen

Klopocki E, **Lohan S**, Brancati F, Koll R, Brehm A, Seemann P, Dathe K, Stricker S, Hecht J, Bosse K, Betz RC, Garaci FG, Dallapiccola B, Jain M, Muenke M, Ng VC, Chan W, Chan D, Mundlos S.

**Copy-number variations involving the *IHH* locus are associated with syndactyly and craniosynostosis**

The American Journal of Human Genetics, Volume 88, Issue 1, 70-75

-----

Klopocki E, **Lohan S**, Doelken SC, Stricker S, Ockeloen CW, Soares Thiele de Aguiar R, Lezirovitz K, Mingroni Netto RC, Jamsheer A, Shah H, Kurth I, Habenicht R, Warman M, Devriendt K, Kordass U, Hempel M, Rajab A, Mäkitie O, Naveed M, Radhakrishna U, Antonarakis SE, Horn D, Mundlos S.

**Duplications of *BHLHA9* are associated with ectrodactyly and tibia hemimelia inherited in non-Mendelian fashion**

Journal of Medical Genetics 2012;49 (2): 119-125

-----

Ott CE, Hein H, **Lohan S**, Hoogeboom J, Foulds N, Grünhagen J, Stricker S, Villavicencio-Lorini P, Klopocki E, Mundlos S.

**Microduplications upstream of *MSX2* are associated with a Phenocopy of cleidocranial dysplasia**

Journal of Medical Genetics 2012 Jul; 49 (7): 437-41

-----

Spielmann M, Brancati F, Krawitz P, Robinson PN, Ibrahim D, Franke M, Hecht J, **Lohan S**, Dathe K, Nardone AM, Ferrari P, Landi A, Wittler L, Timmermann B, Chan D, Mennen U, Klopocki E, Mundlos S.

**Homeotic arm to leg transformation associated with genomic rearrangements at the *PITX1* locus**

The American Journal of Human Genetics, accepted.

**Titelbild:**

**Ergebnisse wurden auf dem Titelbild der Zeitung „Journal of Medical Genetics“ abgebildet:**

Journal of Medical Genetics, February 2012, Volume 49, Issue 2.

## 11.5 Kongressbeiträge

### Vorträge

**„Spalthand-Spaltfuß-Syndrom und deren genetischer Hintergrund“**

131. „Berliner Treffen“ der Zytogenetiker, Oktober 2009, Chorin

**„Microduplications including an enhancer element of SHH (ZRS) cause a spectrum of limb malformations including Laurin-Sandrow syndrome“**

21. Jahrestagung der Humangenetik (GfH-Jahrestagung), März 2010, Hamburg

## 11.6 **Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen ist der Lebenslauf entfernt worden.



## 12 Anhang

### 12.1 Projekt IHH

#### 12.1.1 Stammbaum der Familie 1

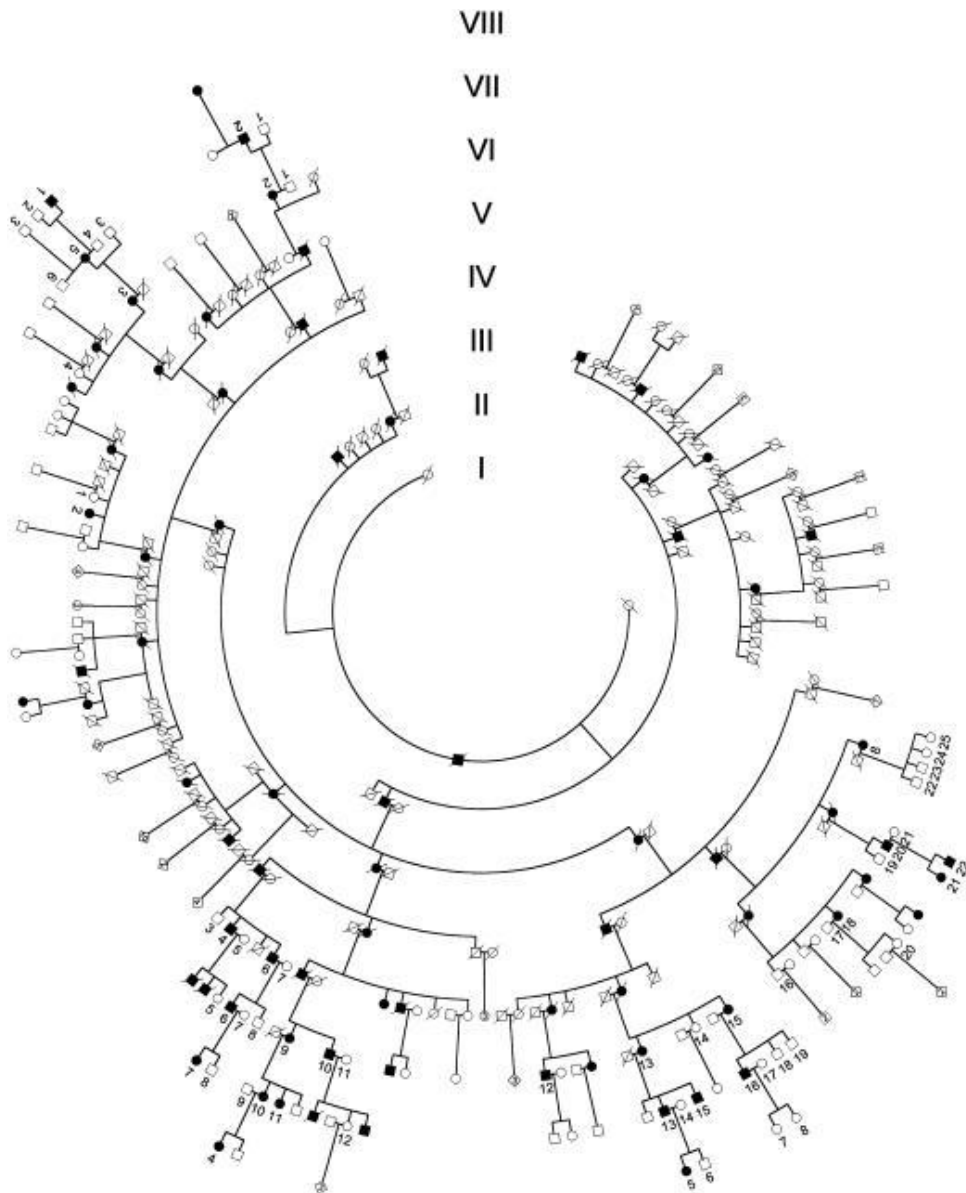


Abbildung 62 Stammbaum der Familie 1 mit SD1 (Abbildung nach Bosse et al., 2000)

## 12.2 Projekt BHLHA9

### 12.2.1 Duplikationsübersicht der untersuchten Familien

**Tabelle 2 Übersicht aller Duplikationen auf Chromosom 17p13.3 für die Familien 1 bis 17**

				Phänotyp des Indexpatienten					
				Ektrodaktylie der Hände		Ektrodaktylie der Füße		Tibia Hemimelie	
Familie	Genotyp	Duplikationsgröße	Duplikationsgröße (maximale Duplikationsgröße)	links	rechts	links	rechts	links	rechts
1	17p13.3	594 kb	(690784) 692236 - 1286762 (1307759)	+	+	-	-	-	+
2	17p13.3	435 kb	(688800) 690697 - 1126437 (1129071)	kA	kA	kA	kA	kA	+
3	17p13.3	347 kb	(785771) 797183 - 1144468 (1146127)	+	+	+	+	+	+
4	17p13.3	269 kb	(877888) 879173 - 1148448 (1150131)	+	+	+	-	-	-
5	17p13.3	98 kb	(1103785)1104999 -1203282 (1205681)	+	+	-	+	-	+
6	17p13.3	268 kb	(900124) 904273 - 1172214 (1174154)	kA	kA	kA	kA	kA	+
7	17p13.3	265 kb	(900124) 904273 - 1170156 (1174154)	+	+	+	+	+	+
8	17p13.3	215 kb	(907995) 919063 - 1134823 (1138178)	+	+	+	-	+	+
9	17p13.3	263 kb	(949603) 951149 - 1214,380(1215506)	+	+	-	-	-	-
10	17p13.3	180 kb	(98450105)984489 - 1163727 (1164804)	+	+	+	+	-	-
11	17p13.3	129 kb	(996457) 997565 - 1126676 (1128753)	-	+	-	-	-	+
12	17p13.3	55 kb	(1067405) 1085566 - 1140759 (1161914)	+	+	+	-	+	+
13	17p13.3	92 kb	(1074589) 1077326 - 1170156 (1180183)	-	+	-	-	+	-
14	17p13.3	134 kb	(1083105) 1084390 - 1219310 (1224902)	-	+	+	+	+	+
15	17p13.3	144 kb	(1098191) 1101066 - 1245760 (1247314)	+	+	+	-	-	-
16	17p13.3	110 kb	1092185 - 1203023	+	+	+	+	+	+
17	17p13.3	69 kb	1117153 - 1186524	+	+	+	+	-	-

## 12.2.2 Stammbäume der untersuchten Familien

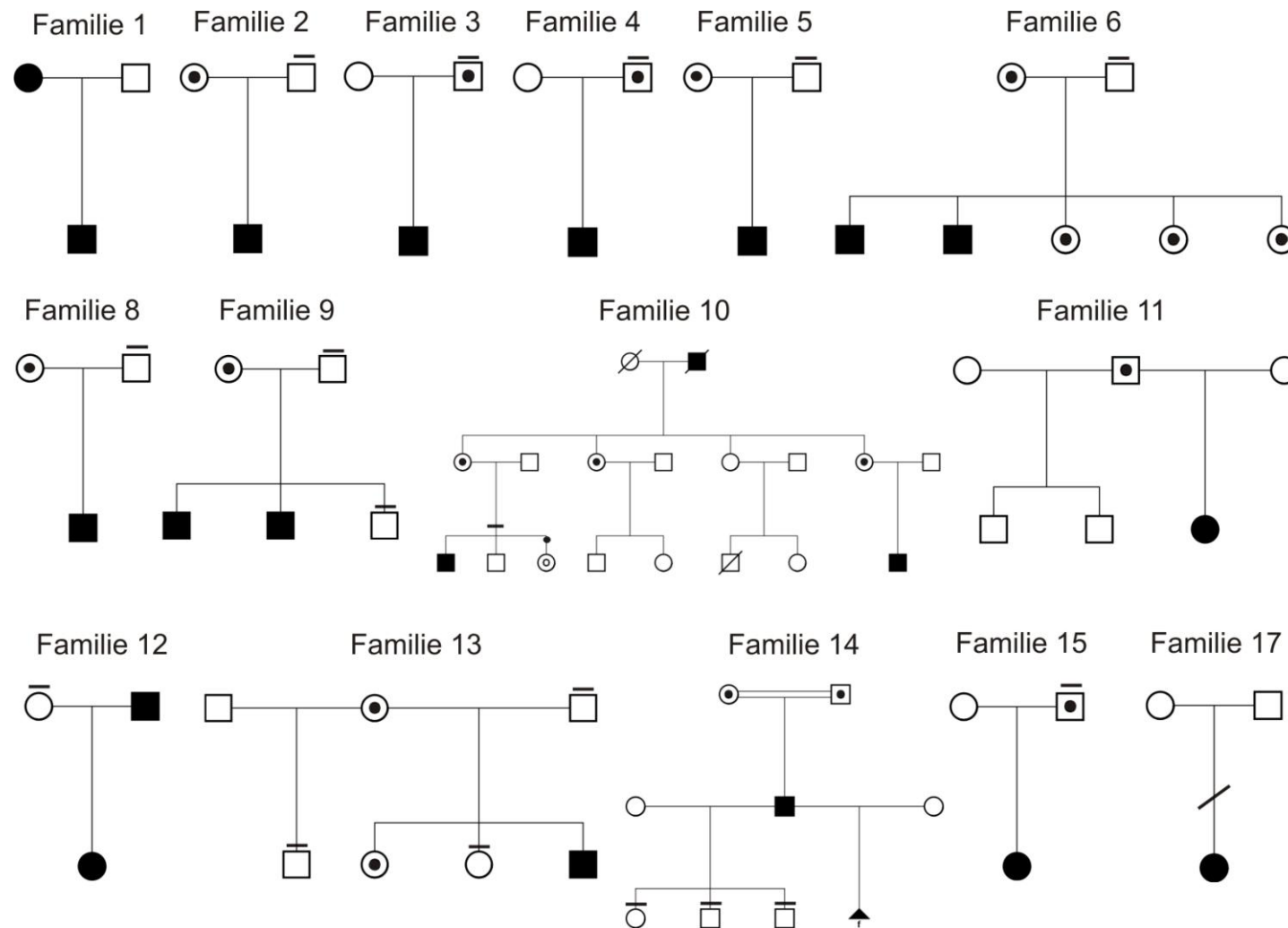


Abbildung 63 Stammbäume der untersuchten Familien mit einem SHFM/ SHFLD-Phänotyp

### 12.2.3 Potenzielle Transkriptionsfaktorbindestellen für den untersuchten Promoterbereich

Prg\_TATA\_b (nach ECR Browser 32)

V\$ZF5_01		9 (+)		GGGAGCgg
V\$DEAF1_01		12 (+)		aGCGGCGCCGGAACCTCCGgaggaa
V\$DEAF1_02		12 (+)		agcggCGCCGGAACCTCCGgaggaa
V\$DEAF1_01		14 (-)		cggcgcCGGAACCTCCGgAGGAAGa
V\$DEAF1_02		14 (-)		cggcgcCGGAACCTCCGgAGGaaga
V\$ELK1_02		15 (+)		ggcgcCGGAActtc
V\$E2F1_Q6_01		15 (-)		ggCGCCGGAa
V\$CREL_01		20 (+)		cGGAACCTCC
V\$NFKAPPAB65_01		20 (+)		cGGAACCTCC
V\$CETS1P54_03		20 (-)		cggaactTCCGgagga
V\$CREL_01		21 (-)		GGAACCTCCg
V\$GABP_B		21 (-)		ggAACTTCCGga
V\$NFKAPPAB65_01		21 (-)		GGAACCTCCg
V\$CETS1P54_02		22 (-)		gaactTCCgagg
V\$ELK1_02		22 (-)		gaacTTCCGgagga
V\$CETS1P54_01		23 (-)		aactTCCGga
V\$NRF2_01		23 (-)		aaCTTCCGGA
V\$PEA3_Q6		24 (+)		ACTTCCg
V\$CETS168_Q6		24 (-)		aCTTCCGG
V\$GABP_B		30 (+)		gGAGGAAGAGcc
V\$ZID_01		30 (-)		GGAGGAAGAGCCg
V\$ELK1_02		36 (+)		agagcCGGAActtt
V\$UF1H3BETA_Q6		54 (-)		GCCAGGCCCCCGCC
V\$KROX_Q6		56 (+)		ccAGGCCCCgccc
V\$AP2_Q3		59 (-)		ggccccGCCCGGCgt
V\$SP1_Q4_01		59 (-)		ggccCCGCCggc
V\$SP1_Q6		59 (-)		ggcCCCGCCggc
V\$SP1_01		60 (-)		gcCCCGCCg
V\$SP1_Q6_01		60 (-)		gcCCCGCCg
V\$CAD_01		61 (+)		CCCCGCC
V\$SP1_Q2_01		61 (+)		cCCCGCCgg
V\$E2F1_Q3_01		61 (-)		ccCCGCCCGGCtaa
V\$ZF5_01		61 (-)		ccCCGCC
V\$E2F_Q2		62 (-)		ccCGCC
V\$E2F1_Q3_01		67 (+)		ccgGCGCTAATAGGca
V\$E2F1DP1RB_01		70 (-)		GCGCTAAT
V\$E2F4DP1_01		70 (-)		GCGCTAAT
V\$E2F_Q3		70 (-)		GCGCTAAT
V\$EFC_Q6		71 (+)		cgctaATAGGCACc
V\$EGR3_01		80 (-)		gCACCTACGCgg
V\$AP2_Q6_01		88 (+)		gcggCCGCCGGCg
V\$AP2_Q6		89 (+)		cgGCCGCCGgcg
V\$AP2_Q3		90 (+)		ggCCGCCGGCggaacc
V\$AP2ALPHA_01		91 (-)		gCCGCCGGC
V\$AP2GAMMA_01		91 (-)		gCCGCCGGC
V\$AP2_Q6		93 (-)		cgcCGGCCGAac
V\$AP2_Q6_01		93 (-)		cGCCGGCCGAacc
V\$HAND1E47_01		103 (-)		accgCCAGAccctaaa
V\$E2F1_Q4		104 (-)		CCGCCAGa
V\$E2F_Q6		104 (-)		cCGCCAGa
V\$GFI1_01		109 (+)		agaCCCTAAATCACGGCGCCCcg
V\$GFI1_Q6		114 (+)		ctaAATCacggcg
V\$GFI1B_01		115 (+)		tAAATCACGGCg
V\$ZBRK1_01		116 (-)		AAATCACGGCGCCCC
V\$ZF5_01		122 (-)		cgCGGCC
V\$MAZR_01		124 (-)		gcgCCCCGCCcg

V\$AP2_Q3		125	(-)		cgccccGCCCGCCCcc
V\$SP1_Q4_01		125	(-)		cgccCCGCCCGcc
V\$SP1_Q6		125	(-)		cgccccCGGCCCGcc
V\$EGR_Q6		126	(-)		gcccCGCCCCGC
V\$SP1_01		126	(-)		gcCCCGCCcg
V\$SP1_Q6_01		126	(-)		gcCCCGCCCg
V\$UF1H3BETA_Q6		126	(-)		GCCCCGCCCGCCCC
V\$CAD_01		127	(+)		CCCCGCC
V\$SP1_Q2_01		127	(+)		cCCCGCCCgc
V\$ZF5_01		127	(-)		ccCCGCC
V\$KROX_Q6		128	(+)		ccCGCCCCGCccccg
V\$E2F_Q2		128	(-)		ccCGCC
V\$SP1_Q4_01		129	(-)		ccgcCCGCCCccg
V\$SP1_Q6		129	(-)		ccgCCCGCCCccg
V\$ZF5_01		129	(-)		ccGCCCGC
V\$ZF5_B		129	(-)		ccGCCCGcccccg
V\$AP2_Q6		130	(+)		cgCCCGCCCccg
V\$ZNF219_01		130	(+)		CGCCCCGCCCCCG
V\$SP1_Q6_01		130	(-)		cgCCCGCCCCc
V\$UF1H3BETA_Q6		130	(-)		CGCCCCGCCCCCGCC
V\$SP1_Q2_01		131	(+)		gCCCGCCCcc
V\$AP2_Q6_01		132	(+)		cccgCCCCCGCCc
V\$KROX_Q6		132	(+)		ccCGCCCCCGccccg
V\$E2F_Q2		132	(-)		ccCGCC
V\$EGR_Q6		132	(-)		cccgCCCCCGC
V\$MAZ_Q6		132	(-)		CCCGCCCCc
V\$EGR1_01		133	(-)		cCGCCCCCGCCc
V\$EGR2_01		133	(-)		cCGCCCCCGCCc
V\$EGR3_01		133	(-)		cCGCCCCCGCCc
V\$ETF_Q6		133	(-)		CCGCC
V\$NGFIC_01		133	(-)		CCGCCCGCCc
V\$ZF5_01		133	(-)		ccGCCCC
V\$AP2_Q6		134	(+)		cgCCCCCGCccg
V\$ZNF219_01		134	(+)		CGCCCCGCCCG
V\$WT1_Q6		135	(+)		gcCCCCGCC
V\$AP2_Q3		135	(-)		gccccGCCCGCCCcc
V\$SP1_Q4_01		135	(-)		gcccCCGCCCGcc
V\$SP1_Q6		135	(-)		gcccCCGCCCGcc
V\$KROX_Q6		136	(+)		ccCCCGCCCgcccc
V\$CHCH_01		136	(-)		ccCCcg
V\$EGR_Q6		136	(-)		ccccCGCCCCGC
V\$MOVOB_01		136	(-)		CCCCgc
V\$SP1_Q6_01		136	(-)		ccCCCGCCCg
V\$CAD_01		137	(+)		CCCCGCC
V\$SP1_Q2_01		137	(+)		cCCCGCCCgc
V\$ZF5_01		137	(-)		ccCCGCC
V\$KROX_Q6		138	(+)		ccCGCCCCGCccccg
V\$E2F_Q2		138	(-)		ccCGCC
V\$SP1_Q4_01		139	(-)		ccgcCCGCCCccg
V\$SP1_Q6		139	(-)		ccgCCCGCCCccg
V\$ZF5_01		139	(-)		ccGCCCGC
V\$ZF5_B		139	(-)		ccGCCCGcccccg
V\$AP2_Q6		140	(+)		cgCCCGCCCccg
V\$ZNF219_01		140	(+)		CGCCCCGCCCCCG
V\$SP1_Q6_01		140	(-)		cgCCCGCCCCc
V\$UF1H3BETA_Q6		140	(-)		CGCCCCGCCCCCGCC
V\$SP1_Q2_01		141	(+)		gCCCGCCCcc
V\$AP2_Q6_01		142	(+)		cccgCCCCCGCCc
V\$KROX_Q6		142	(+)		ccCGCCCCCGccccg
V\$E2F_Q2		142	(-)		ccCGCC
V\$EGR_Q6		142	(-)		cccgCCCCCGC

---

V\$MAZ_Q6		142 (-)		CCCGCCCc
V\$EGR1_01		143 (-)		cCGCCCCCGCCc
V\$EGR2_01		143 (-)		cCGCCCCCGCCc
V\$EGR3_01		143 (-)		cCGCCCCCGCc
V\$ETF_Q6		143 (-)		CCGCCCC
V\$NGFIC_01		143 (-)		CCGCCCCCGCCc
V\$ZF5_01		143 (-)		ccGCCCC
V\$AP2_Q6		144 (+)		cgCCCCCGCccg
V\$ZNF219_01		144 (+)		CGCCCCCGCCCC
V\$WT1_Q6		145 (+)		gcCCCCGCC
V\$AP2_Q3		145 (-)		gccccGCCCCGGCcg
V\$SP1_Q4_01		145 (-)		gcccCGCCCggg
V\$SP1_Q6		145 (-)		gccCCCGCCCggg
V\$CHCH_01		146 (-)		ccCCCg
V\$MOVOB_01		146 (-)		CCCCCgc
V\$SP1_Q6_01		146 (-)		ccCCCGCCCg
V\$AP2_Q6_01		147 (+)		ccccGCCCCGGCc
V\$CADC_01		147 (+)		CCCCGCCC
V\$SP1_Q2_01		147 (+)		cCCCGCCCgg
V\$ZF5_01		147 (-)		ccCCGCC
V\$E2F_Q2		148 (-)		ccCGCC
V\$ZF5_01		166 (-)		tcGCGCTC
V\$GABP_B		167 (-)		cgCGCTCCCCG

### 12.3 Primer

Alle Primerpositionen für das humane Genom beziehen sich auf die genomische Datenbank: hg18 (März 2006/ NCBI36). Die Primerpositionen im murinen (m) Genom beziehen sich auf die genomische Datenbank mm8 (Februar 2006/ NCBI36), für Primer im Hühnchengenom (ch) wurde die Datenbank WUGSC2.1 (Mai 2006/ galGal3) herangezogen. Für die Zebrafisch-Analysen (zf) wurde die Zebrafisch-Datenbank Zv9/danRer7(Juli 2010) verwendet.

#### 12.3.1 SHH-Projekt

**Tabelle 3 Primerpaare für die quantitative real-time PCR (qPCR) zur Verifizierung der detektierten Mikroduplikationen und zur Minimierung der Aberrationsgröße**

	Primer-Sequenz (5`-3`)		Nukleotidposition auf dem Chromosom 7	
	Forward (F)	Reverse (R)	Start	Ende
P1	gcccacactctgttcaggat	tctctgccttcacaccaaa	155826674	155826755
P2	gaaattaatgttcaggtagactgaga	ttcctatgctgcctagagagag	156203123	156203210
P3	tctgtatgttggtggacct	ttgggctgaagtagtgaac	156269860	156269940
P4	catattggcctggttctgg	taaattcctgcagggttcc	156276691	156276649
P5	agaaactttgaggccaatgc	ccaaggaggttcctggta	156313215	156276649
P6	tccccacatccctgtatcat	gtgagcctagctcagcatcc	156301009	156301108
P7	gaggggctgcacttctcata	ctttggtcatctgggtcct	156424781	156425486

**Tabelle 4 Primer zur Bestimmung der Bruchpunkt mittels konventioneller PCR für die Familie 1 und die Familie 3.**

Die Primer BP1, BP2 und BP3 wurden mit den Primern BP4 und BP5 kombiniert (Familie 1). Der Primer BP6 wurde mit den Primern BP7 und BP8 kombiniert (Familie 3)

Familie 1				
	Primer-Sequenz (5`-3`)		Nukleotidposition auf dem Chromosom 7	
	Forward (F)	Reverse (R)	Start	Ende
BP1	tgatacaccacacgaacagaa		156363372	156363392
BP2	caccacacgaacagaattaa a		156363377	156363398
BP3	caagaaaaggatgccactc		156363597	156363616
BP4		tctgaatggtattgcctag	15618491	156184938
BP5		tctggatattagcccttgt	15618511	156185134
Familie 3				
	Primer-Sequenz (5`-3`)		Nukleotidposition auf dem Chromosom 7	
	Forward (F)	Reverse (R)	Start	Ende
BP6	agccagctaccacctaata		156287283	156287302
BP7		aggttgcaagatgattccta	156270968	156270987
BP8		acctctgggaagattcagat	156271166	156271185

## 12.3.2 IHH Projekt

**Tabelle 5 Primerpaare für die Amplifizierung und Sequenzierung (Seq) der konservierten Region (CE) innerhalb des murinen(m) *Ihh*-Lokus.**

Zur Einklonierung der konservierten Region in den Hsp-LacZVektor wurden *NotI* Restriktionschnittstellen (rot gekennzeichnet) verwendet.

Klonierung der konservierten Region (CE)						
	Primer Sequenz (5`-3`)			Nukleotidposition auf dem Chromosom 1		Produktgröße [bp]
Primer	Forward (F)	Reverse (R)	Start	Ende		
mNhej1_CE	GTATGCGGCCGCTCTCCACCCTCTGTGCTCTT	GTATGCGGCCGCAAGTTGAGGTTTGGGGTTTTT	74940512	74946807	6296	
Sequenzierprimer	Primer Sequenz (5`-3`)			Start	Ende	
	Forward (F)	Reverse (R)	Start	Ende		
mNhej1_kol_R		CCTCATACACCCCAAACCAC	74941007	74941026		
mNhej1_Seq1_F	AAAATAGCCCCCTCCTTCA		74940836	74940855		
mNhej1_Seq1a_F	CCTGCCACACAACCTGATGTC		74940875	74940894		
mNhej1_Seq1a_R		GAAGAGGTCTCCCCAAATC	74941359	74941378		
mNhej1_Seq1b_F	TTGCACATGAGGCTTAGCAC		74941165	74941184		
mNhej1_Seq1b_R		TTGCACATGAGGCTTAGCAC	74941688	74941707		
mNhej1_Seq2_F	AACACATGATTTGGGGGAGA		74941352	74941371		
mNhej1_Seq3_F	TCAAGGCCAACTCAGGCTAC		74941852	74941871		
mNhej1_Seq4_F	TATGGCTTGACTGCCTGTTG		74942332	74942351		
mNhej1_Seq5_F	GAAGGCTCACAGCCATCTGTA		74942828	74942848		
mNhej1_Seq6_F	TGCAGGATCTGAAGACCACA		74943337	74943356		
mNhej1_Seq6a_F	TGTATGCATGCACAAACGTG		74943463	74943482		
mNhej1_Seq6a_R	TAGTTGGCCAAGCATTCTCC		74944015	74944034		
mNhej1_Seq7_F	TCTCTGAAAGTGGGGACAGG		74943828	74943847		
mNhej1_Seq8_F	CACAAAGCTGCTGGGAAAAT		74944342	74944361		



mNhej1-seq8a_F	TTGATCCTCCCCTTGCAGTA		74944207	74944226
mNhej1-seq8b_F	GAACGGAGCCTTGACAACAT		74944726	74944745
mNhej1_Seq9_F	CTTCAGCACAACCCAGGAAC		74944841	74944860
mNhej1_Seq10_F	TGCATCTGAAAAGGTAATGACTG		74945319	74945341
mNhej1_Seq11_F	GGAGAACTAGCTGACCTTCCA		74945842	74945862
mNhej1_Seq12_F	TTCTGAGACCCAGGCATAGC		74946326	74946345
mNhej1-seq12a_F	GCCAAGGGAAAATGCTGTTA		74946528	74946547
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG			
T7	TAATACGACTCACTATAGGG			

**Tabelle 6 Primerpaare für die quantitative real-time PCR (qPCR) zur Verifizierung der detektierten Mikroduplikationen und zur Minimierung der Aberrationsgröße innerhalb des Patientenkollektivs**

	Primer-Sequenz (5´-3´)		Nukleotidposition auf dem Chromosom 2	
	Forward (F)	Reverse (R)	Start	Ende
P1	GTGCAGCTCGAATGAAACAG	TGCAGGCTAGTGGGAAAGTT	219613897	219613985
P2	GAGAGCCCAAGAGACTGTGC	GAGTCGAGGACTGGTGAAG	219631624	219631717
P3	GAATCCGGGACAAAGTTTCA	GGCTCAGAGAGGGTGTCAAG	219664872	219664959
P4	TGCCTCAGATCCCAGGACTA	GAGCCAGGCAAGGTCTTCTT	219679097	219679186
P5	CACCGGTCTCAGATGTTCAA	GCGCTGTGATGAACAGTAGC	219683755	219683835
P6	AGCGCTCTAGCTTTGAACCA	GGGCAGTAGGCAAGATTGAG	219704773	219704858
P7	TTCCAGGACTGTTGTTGGTG	TGTCCCGTCTGTCTTCTTGA	220610851	220610937

Tabelle 7 Primer für die Bruchpunktsequenzierung

Primer	Primer-Sequenz (5`-3`)		Nukleotidposition auf dem Chromosom 2	
	Forward (F)	Reverse (R)	Start	Ende
BP1	GACTTGGGCCCTTTTCTCATCC		219624017	219624038
BP2	CCTGGCTTCCATCCTGGCCA		219624055	219624074
BP3	TGGTCTAGGACACCAACTCCCC		219624134	219624155
BP4	CTCTGGTCTGCCCTCCAT		219624179	219624197
BP5	GGGAAACCACCATGGGCCA		219681870	219681889
BP6		TGTCTGGGTCACCACACAT	219637607	219637694
BP7		AGGCCATCATCTTTGCTTGT	219638014	219638094
BP8	GGAGAAAGAACTGGGCTGAA		219670760	219670846
BP9	AATCTGGACCCACGAAGCTA		219673722	219673801
BP10	TCCGCACTAAGTTCAGCATC		219675505	219675586
BP11	TGCCTCAGATCCCAGGACTA		219679097	219679186
BP12	GGGAAACCACCATGGGCCA		219681870	219681889
BP13	CCAGTGCCCCAGCACCTAAAC		219682045	219682065
BP14	GGGTTCATTTGGGCAACTGG		219682173	219682193
BP15	GGAGCCAGAACCAGAATGCTGC		219682220	219682241
BP16	ACCAGAATGCTGCTGTGCTA		219682229	219682318
BP17		CCTTAGGCAATCTGGTGGTC	219675550	219675569
BP18		CTGTGTTGGTTCACCTTCC	219675568	219675587
BP19		CCTCAAGTGATCTGCCTGTG	219675738	219675757
BP20		ATGTTGGCCAGGCTGATCTT	219675768	219675787
BP21		TCTCGGCTCACTGCAAGCA	219675906	219675924
BP22	TCCGTGGCTCTAATCTGGAC		219705068	219705087
BP23	TTCGCTATGCTCTTCCCCTA		219705330	219705349
BP24	TCAGAATTGCTCAGGCTTCA		219705516	219705535
BP25	TTTCCTTCAGCAGCCACTCT		219705645	219705664

BP26	CAGCAGCCACTCTCCATACA	219705652	219705671
------	----------------------	-----------	-----------

Die Primer für die Sonden *Ihh* und *Patched1* sind der Veröffentlichung Vortkamp et al., 1996 zu entnehmen.

### 12.3.3 BHLHA9 Projekt

**Tabelle 8 Primerpaare für die quantitative real-time PCR (qRT-PCR) zur Verifizierung der detektierten Mikroduplikationen auf 17p13.3**

	Forward (5')	Reverse (3')	Chromosom 17	
P1	CAGTCTACACAGGTGGCAGT	TAATGTCAGAACCACGTCCT	619685	619764
P2	CTTTACCTCCGCAGACAAGC	CCACTGTCTAGCTCTTCAGCA	699656	699741
P3	CACAGAAATCACACCTCCAC	ACGTTCTGTGAGGAAAACAG	807873	807961
P4	TGTGTAGCCTCCGTTACGTG	ATGGACACGATCTTGGGAAG	1124158	1124239
P5	AGAAGCCCCCAGAGATTACC	ATGATGAGGGGGATGAGGTT	1130339	1130422
P6	AACCATTCCGCCATTTATCC	CCATGACAAATAAAGCACCT	1187528	1187617
P7	CACCATATTTTCAGCCTTTCT	TTCCTTCGTCAATGAGATTC	1532150	1532229

**Tabelle 9 Primer für die RNA *in situ* Hybridisierung für das Projekt BHLHA9**

	Maus			Nukleotidposition auf dem	
	Forward (5')	Reverse (3')	Chromosom 11		
mNxn	CTTGGACTTTTCCAGCGTGT	CTGGTTTTCCCTCAGACCAA	76074256	76074678	
mTimm22	TGCTCTGTGGAGCAGTTTCTAC	TAATTGCCTCGATGGCATAAGTT	76230363	76230762	
mAbr	GCCCCGACATAGACTTGAAA	AGAACTTTGCGGTGATGGAG	76234770	76235249	
mBhlha9	AGTCATCCTGGACAGAGCAAA	TTTGATCATTTTCTGGGCTTC	76489500	76489849	
mTusc5	TCTCTTGCCACGGACTCTTT	CTATGGCTACTGGGCCTTTG	76513192	76513594	
mYwhae	CCCATTGTCACTGAGAACCA	AAGGAAAAATGACAGCGCATA	75580935	75581316	

mCrk	CCCATGACGTAATCATGCAC	GATTGGTCCTTCCACTCCAA	75520109	75520587
			Chromosom 13	
mFgf10	TGTGCTGATGCTTGACCAGT	CCAACGTCTGCACTATTTGC	119909982	119910453
Hühnchen				
			Chromosom 19	
chbhlha9	ATGCCCCGAGCAGCTGCAG	TCAGTGGATGGGGAGGCATT	6250222	6250859
Sequenzierprimer				
chbhlha9_Seq_F	GGCTCTCGTAGCAATGGAGT		6250377	6250396
chbhlha9_Seq_R		TCTGTCCCTGTCTTGCCT	6250500	6250519
Zebrafisch				
			Chromosom 10	
zfbhlha9	GGAGTTTTTCGGAGGAAGAGC	TCACAGTGTGTTTGGGCAAT	39291124	39291847

Die Sonden für zfbmp2, zffgf10, zfshh, zffgf8 undzf bmp4 wurden von Norton, W.H ( Development 2005) zur Verfügung gestellt worden.

**Tabelle 10 Promoteranalyse des humanen *BHLHa9*-Gens**

			Nukleotidpositionen auf dem Chromosom 17	
Prg_KpnI/ XhoI	gtatGGTACCACTGCCTGCATAGCTCAGGC	gtatCTCGAGGGCCTTCCCGGGCACTCG	1117442	1120607
Prg1_KpnI	GGTACCGGCTCCCGGACTTTCTCTC	gtatCTCGAGGGCCTTCCCGGGCACTCG	1118284	1120607
Prg2_KpnI	GGTACCCAGGGCTGTGTACAAGATG	gtatCTCGAGGGCCTTCCCGGGCACTCG	1119492	1120607
Prg3_KpnI	GGTACCGGAATGGGGAGGAAGAATGT	gtatCTCGAGGGCCTTCCCGGGCACTCG	1120216	1120607
Prg4_KpnI	GGTACCAGTGGGCAGAGGGCAGAG	gtatCTCGAGGGCCTTCCCGGGCACTCG	1120544	1120607
Prga_KpnI/ Sacl	gtatGGTACCTTTCTGTATTTTTTCGCATCA	gtatGAGCTCCACTGCAAGCTCCACCTCTC	1117702	1118048
Prgb_KpnI/ Sacl	gtatGGTACCGCTCCCGGACTTTCTCTCC	gtatGAGCTCGCGCGGCCGACTTCAAAGCG	1118285	1118555

Prgc_KpnI/ Sacl	gtatGGTACCTGGATTGTGACTGGGAATGA	gtatGAGCTCGCAGGTAAAGCTGACCCAGA	1119313	1119740
TATA_Sacl/ XhoI_F	gtatGAGCTCCCTACCTGGAGGCCGATAAT	gtatCTCGAGGGCCTTCCCGGGCACTCG	1120386	1120607

**Tabelle 11 Sequenzierprimer für die humane Promoterregion**

			Nukleotidpositionen auf dem Chromosom 17	
hPrBh_1_F	TCTCACCCTGCCTGCATAG	CTCCCGAGTACGTGGGATTA	1117435	1118001
hPrBh_2_F	TCCTTTGAAATCCAGTTCAGG	CGCCGTGATTTAGGGTCTG	1117802	1118444
hPrBh_3_F	GAGGAAGAGCCGGAACCTTTT	TTGCCCACTAGGATGAAAGC	1118351	1119136
hPrBh3a_Seq_F	TGGGCATTTTCTTTGCTTTT	GCAGATTTGGGGGACATAGA	1118697	1119088
hPrBh_4_R	CGGCTTTTTCAGCTATGGAG	TCATTCCCAGTCACAATCCA	1119696	1119332
hPrBh_5_F	GCCCTCCATAGCTGAAAAAG	CTTGCCCTGCCTAGCTCTG	1119693	1120280
hPrBh_6_F	AAGCTTCCCTCCTTGCTTTC	CGATCTTGGAGAGCCTCTTG	1120337	1120920

**Tabelle 12 Injektionsexperimente: Morpholinosequenzen und Primersequenzen**

bhlha9 Morpholino	CACAGGTAAACTCTCAACACACA[TATCC(ATG)ACTCCAGCGAGCGTCTG]C AGGT			
5' mispair Morpholino	CAcACcCTCGgTGGAGTgATGcATA			
Standardnegativ Kontrolle	CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA			
Rescue Experiment			Nukleotidpositionen auf dem Chromosom 10	
ZFrE_Bamhl/ XhoI	GGATCCATACCATGACCCCTGCTAGTG TATGTCGGTTTTCCATGGCGAGCAGAGGCAGCTT	CTCGAGTTGTGCATG TTTTATTACAAAAGTGA	39291087	39292054
ZFbhlha9_Nested-PCR	CCAACTCTTCCCGTCTGTGT	GCTGATGCCAGGTTAGGAAG	39290861	39291539
ZFbhlha9_1SeqF	AGCGATGGCTTAGGAGGTCT		39291179	39291198
ZFbhlha9_2SeqF	CGTATCAGCAGGGAGTTTGG		39291717	39291736

**Tabelle 13 Integration einer zusätzlichen Kopie von BHLHA9 (mit potenziellem Promoterbereich) in den *CoIA1*-Lokus**

		Nukleotidpositionen auf dem Chromosom 11	
m1PrBH_PACI_F	gtatTTAATTAAGACAGCATGAAGCAGCAGAG	76482372	76482391
m1PrBH_Nsil_R_(Nsil in Sequenz)	TCTCCATCGCTGTCACTGAG	76487831	76487850
m2PrBH_Nsil_F_(Nsil in Sequenz)	TGGCTGGGAATGAGGTTAAA	76487666	76487685
m2PrBH_NheI_R	gtatGCTAGCTGTGACTGTGGACCAGGTGT	76490598	76490617
mBHLHA9_kol_Primer_R	GACCACAGCTGCACATCAAT	76482816	76482835
mBHLHA9_kol_Primer_F	CGCCAAGGTTTCTGGTAGAG	76490177	76490196
2mBHLH_kol_F	GAAACTGGCGTCAATGTCCT	76489354	76489373
2mBHLH_kol_R	GCATTAAGCAAGGCGAACC	76483556	76483575
1Seq_mBHLHA9_R	CCCACCTTGGAAGAAAATCA	76482502	76482521
2Seq_mBHLHA9_F	TCAGCTTGAAAGCAATGAGG	76487584	76487603
3Seq_mBHLHA9_R	AGCCACATTCCAATGCTGT	76487651	76487670

4Seq_mBHLHA9_F	CCCTCCTTCCATCTTTTTCC	76487769	76487788
5Seq_mBHLHA9_F	GGGTCAGGAGTAGGGGAAAC	76488365	76488384
6Seq_mBHLHA9_R	TCCTGACCCCAGGTAGAATG	76488354	76488373
7Seq_mBHLHA9_F	CAGCAAGAGCCATCAGTCAG	76488667	76488686
8Seq_mBHLHA9_F	CAGCAAGAGCCATCAGTCAG	76488667	76488686
9Seq_mBHLHA9_R	CATGGCCTATGTCCTGGTCT	76488727	76488746
10Seq_mBHLHA9_F	AGCGCATCCTGGATTACAAC	76488958	76488977
11Seq_mBHLHA9_F	GAAACTGGCGTCAATGTCCT	76489354	76489373
12Seq_mBHLHA9_F	CCTTTGGAAAGTGGGACTTG	76489723	76489742
13Seq_mBHLHA9_F	AGTGGCCTTTGCTTTCTTT	76489675	76489694
14Seq_mBHLHA9_R	ACCCACACAGTCCCACAAGT	76489738	76489757
15Seq_mBHLHA9_F	CGCCAAGGTTTCTGGTAGAG	76490177	76490196
16Seq_mBHLHA9_F	TTTAGGATGGGTTCTGCTG	76490426	76490445
17Seq_mBHLHA9_R	GTCTCTCCAGCCTCCATTCA	76490490	76490509

**Tabelle 14 Primer für die Generierung der Southern Blot Sonden (*ColA1*-Lokus)**

		Nukleotidpositionen auf dem Chromosom 11	
3' Sonde (Southern Blot)			
mColA1_3_F	TCATGAGCCCTCAAAGGGATT	94769601	94769621
mColA1_3_R	TGAAAGGAAGGAACAGGCCAT	94770231	94770251
5' Sonde (Southern Blot)			
mColA1_5_F	CCTAATGCTGCCTTTTCTGC	94768055	94768074
mColA1_5_F	AGATGCTCCCTAGACCAGCA	94768645	94768664

## 12.4 PCR Pipettierschemata

### Standard-PCR

Menge	Reaktionskomponenten
20-100ng	DNA
5µl	10xDNA-Polymerase Reaktionspuffer
1µl	dNTPs (12,5 mM)
1µl	5´- Primer (10 pmol/ µl)
1µl	3´- Primer (10 pmol/ µl)
0,5-1µl	DNA-Polymerase (5U/ µl)
ad 50µl H <sub>2</sub> O (bidest)	

### Kolonie-PCR

Menge	Reaktionskomponenten
2µl	10x DNA-Polymerase Reaktionspuffer
0,5µl	dNTPs (1,25mM)
0,4µl	5´- Primer (10pmol/ µl)
0,4µl	3´- Primer (10pmol/ µl)
0,25µl	Taq-DNA-Polymerase (5U/ µl)
16,45µl	H <sub>2</sub> O (bidest)

### Genotypisierungs-PCR für Mäuse des IHH- Projekts

Menge	Reaktionskomponenten
1µl	DNA (20ng/ µl)
2µl	10x DNA-Polymerase-Reaktionspuffer
1µl	dNTPs (12,5mM)
1µl	mNHEj1_seq12_for (10pmol/ µl)
1µl	Hsp68-LacZ_rev (841) (10pmol/ µl)
1µl	Taq- DNA-Polymerase (5 U/ µl)
ad 50µl H <sub>2</sub> O (bidest)	

### GenotypisierungsPCR I/ II der Mäuse des BHLHA9-Projekts

Menge	Reaktionskomponenten
-------	----------------------



1µl	DNA (20ng/ µl)
5µl	10x DNA-Polymerase-Reaktionspuffer
1µl	dNTPs (12,5mM)
1µl	GenoIV_for (WT/ Insert) (10pmol/ µl)
0,4µl	GenoIV_rev (WT/ Insert) (10pmol/ µl)
0,7µl	<i>Pfu</i> - DNA-Polymerase (5U/ µl)
0,3µl	<i>Taq</i> - DNA-Polymerase (5U/ µl)
ad 50µl H <sub>2</sub> O (bidest)	

### Plasmidsequenzierung/ PCR-Produkt-Sequenzierung

Menge	Reaktionskomponenten
200ng	Plasmid DNA / 50ng PCR - Produkt
1µl	5xBigDye-Reaktionspuffer
0,5µl	BigDye-Sequenziermix
0,5µl	Sequenzierprimer (10pmol/µl)
ad 5µl H <sub>2</sub> O (bidest)	

## 12.5 Cyclorprogramme

### Standard PCR-Programm

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	4min	1x
Denaturierung	94°C	30sec	25-35 x
Primer Anlagerung (Annealing)	Variabel, je nach Primer (50-60°C)	30sec	
Elongation	72°C 68°C	<i>Taq/AmpliTaq</i> 1000bp/ 1min <i>Pfu</i> 500bp/ 1min	
Finale Elongation	72°C	7min	1x
Kühlung	4 °C	∞	

### Touch-down PCR-Programm

Temperatur	Zeit	Zyklen
94°C	5min	1x
94°C	30sec	
61°C	45sec	
72°C	Taq/ AmpliTaq 1000bp/ 1min Pfu 500bp/ 1min	2x
94°C	30sec	2x
59°C	45sec	
72°C	variabel je nach verwendeter Polymerase	
94°C	30sec	
57°C	45sec	
72°C	variabel je nach verwendeter Polymerase	2x
94°C	30sec	
55°C	45sec	
72°C	variabel je nach verwendeter Polymerase	2x
72°C	10min	1x
4°C	∞	

### Phusion ® PCR-Programm

Temperatur	Zeit	Zyklen
98°C	30sec	1x
98°C	10sec	
70°C-1°C/ Zyklus	45sec	
72°C	Phusion 1000bp/ 30sec	10x
98°C	10sec	30x
60°C	30sec	
72°C	Phusion 1000bp/ 30sec	
72°C	7min	1x
4°C	∞	

**Expand Long Template PCR Systems PCR-Programm**

Temperatur	Zeit	Zyklen
94°C	2min	1x
94°C	10sec	
55°C	30sec	
68°C	2min ≤ 3kb 4min = 6kb 8min = 10kb 15min = 20kb 20mn = 30kb	10x
94°C	15sec	20x
55°C	30sec	
68°C	Elongationszeit + 20sec /Zyklus	
68°C	7min	1x
4°C	∞	

**Kolonie-PCR PCR-Programm**

Temperatur	Zeit	Zyklen
96°C	5min	1x
96°C	30sec	35 x
55°C	30sec	
72°C	1min (variabel, je nach zu erwartender Fragmentgröße)	
72°C	7min	
4°C	∞	

**Genotypisierungs-PCR für das Ihh-Projekt, PCR-Programm**

Temperatur	Zeit	Zyklen
96°C	5min	1x
94°C	30sec	35 x
61°C	30sec	
72°C	2min	
72°C	7min	1x
4°C	∞	

**Genotypisierungs-PCR der Mäuse des BHLHA9-Projekts, PCR-Programm**

Temperatur	Zeit	Zyklen
98°C	30sec	1x
98°C	10sec	30 x
60°C	30sec	
72°C	2min	
72°C	7min	1x
4°C	∞	

### Sequenzierung Plasmid, PCR-Programm

Temperatur	Zeit	Zyklen
96°C	5min	1x
94°C	30sec	30 x
50°C	30sec	
60°C	4min	
4°C	∞	

### 12.6 Kultivierung von ES Zellen

**Tabelle 15 Volumen- und Mengenverhältnisse von Feeder- und ES-Zellen auf 6 well Platten**

Zellen	Kulturschale	Mediumvolumen [ml]	Dichte
Feederzellen (Gefrierrohrchen: $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml)	6 well Platte (Wachstumsfläche: $9,6 \text{ cm}^2$ )	1,5	$3,4 \times 10^4/\text{cm}^2$ → $3 \times 10^5$ Zellen/Well
ES - Zellen (C2) (Gefrierrohrchen: $2 - 5 \times 10^6$ Zellen/ml)	6 well Platte (Wachstumsfläche: $9,6 \text{ cm}^2$ )	2	$3,1 \times 10^4/\text{cm}^2$ → $5,8 \times 10^5$ bis $1,75 \times 10^6$ Zellen/Well
		Endvolumen (ml)	
	6 well Platte (Wachstumsfläche: $9,6 \text{ cm}^2$ )	3,5	